



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Estudo da Produção de Levana através de *Zymomonas mobilis*

Raquel Wendt
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Raquel Wendt, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de abril de 2001.

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

Campinas, 11 de abril de 2001

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Presidente da Banca



UNIDADE Be
 N.º CHAMADA:
TI UNICAMP
W484e
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 45207
 PROC. 16-392107
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 07/10/101
 N.º CPD

CM00157756-3

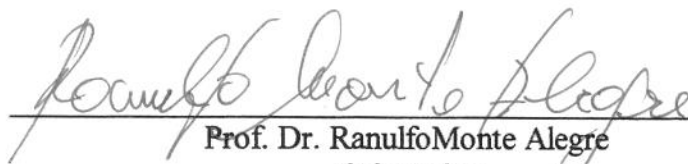
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

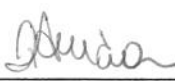
Wendt, Raquel
 W484e Estudo da produção de levana através de *Zymomonas mobilis*
 / Raquel Wendt. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

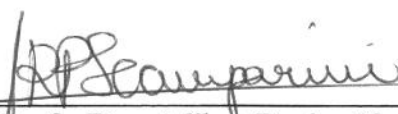
1.Zymomonas mobilis. 2.Polissacarídeo. 3.*Levanasacarose.
 I.Monte Alegre, Ranulfo. II.Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador


Profa. Dra. Regina de Oliveira Moraes Arruda
Membro

Profa. Maria Assima Bittar Gonçalves
Membro


Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
Membro

Campinas, 2001

Retoma-te

Renasce em ti mesmo

Multiplica os teus olhos para verem mais

Multiplica os teus braços para semeares tudo

Destrói os olhos que tiverem visto

Cria outros, para visões novas

Destrói os braços que tiverem semeado

Para se esquecerem de colher

Sê sempre o mesmo

Sempre outro

Mas sempre alto

Sempre longe

E dentro de tudo.

Cecília Meireles

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
Wilson e Edla, pessoas maravilhosas e,
com certeza, os grandes responsáveis
pelo que sou.

Ao Cauê pelo simples fato
de ser presente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre pela orientação, dedicação, compreensão, paciência e amizade ao longo deste trabalho.

As amigas e companheiras Adriana, Gláucia e Kelly, por cada momento vivido e compartilhado comigo nesta batalha.

Aos amigos especiais, Rômulo e Célia, por serem um porto seguro.

Aos amigos, Rodenei e Christiane pelo apoio e convivência.

Aos companheiros de Laboratório, Álvaro, David, Everly, Jean, Maurício, Mauro e Tânia pela convivência, amizade e colaboração.

A Mareci pela colaboração e paciência.

À banca examinadora pela contribuição através de correções e sugestões apresentadas ao trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

A toda minha família, em especial, meus pais e minha irmã Kelly, por estarem sempre ao meu lado. Aos meus avós (*in memoriam*), por tanta sabedoria.

À Deus por tudo que representa.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. FRUTOSE	4
2.2. POLIFRUTOSE	4
2.3. LEVANA	6
2.3.1. Caracterização.....	6
2.3.2. Condições de Produção	7
2.3.3. Frutoligossacarídeos	9
2.4. IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	11
2.4.1. Características Fisiológicas do Microrganismo	11
2.4.2. Metabolismo dos Carboidratos	12
2.4.3. Substratos.....	14
2.4.4. Temperatura e pH.....	15
2.5. ENZIMAS	15
2.5.1. Caracterização da Enzima Levanasacarase	15
2.5.2. Condições de Produção da Levanasacarase.....	16
2.5.3. Efeito da Temperatura na Atividade da Levanasacarase.....	18
2.5.4. Efeito do pH na Atividade da Levanasacarase.....	19
2.6. FERMENTAÇÃO	19
2.6.1. Matérias-Primas da Fermentação.....	20
2.7. TIPOS DE FERMENTAÇÃO	20
2.8. APLICAÇÕES	21
3. MATERIAL. E MÉTODOS.....	24
3.1. MATERIAL.....	24
3.1.1. Microrganismos.....	24

3.1.2. Manutenção do Microrganismos	24
3.1.3. Preparação do Inóculo	25
3.1.4. Condições de Fermentação em Frascos de Erlenmeyers	25
3.1.5. Seleção de Mutantes da <i>Zymomonas mobilis</i>	26
3.1.6. Condições de Fermentação em Fermentador de Bancada em Batelada	26
3.1.7. Condições de Fermentação em Fermentador de Bancada em Batelada Alimentada	26
3.2. MÉTODOS	27
3.2.1. Levana	27
3.2.2. Determinação de Etanol	27
3.2.3. Atividade Enzimática	27
3.2.4. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática	28
3.2.5. Efeito do pH de Pré-incubação na Atividade Enzimática	28
3.2.6. Efeito da Concentração de Sacarose na Atividade Enzimática	29
3.2.7. Efeito do Açúcar Invertido na Atividade Enzimática	29
3.2.8. Métodos Analíticos	29
3.2.8.1. Massa Celular Seca	29
3.2.8.2. Determinação de Açúcar	30
3.2.8.3. Análise de pH	30
3.2.8.4. Cromatografia em Papel	30
3.2.8.5. Determinação da Relação Carbono-Nitrogênio	30
3.2.9. Cálculos dos Parâmetros Cinéticos	31
3.2.9.1. Coeficientes de Rendimento	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. FERMENTAÇÃO UTILIZANDO <i>BACILLUS SUBTILIS</i> E <i>ERWINIA HERBICOLA</i>	33
4.2. SELEÇÃO DE MUTANTES PARA A FERMENTAÇÃO	34
4.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA PRODUÇÃO DE LEVANA PELO MUTANTE SELECIONADO	36
4.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LEVANASACARSE	39
4.4.1. Efeito do pH de Pré-incubação na Estabilidade e Atividade da Enzima	39
4.4.2. Efeito da Temperatura na Atividade da Enzima	40
4.4.3. Efeito da Concentração de Sacarose na Atividade da Enzima	41
4.5. FERMENTAÇÃO EM FERMENTADOR DE BANCADA	42
4.5.1. Efeito do controle de pH	43
4.5.2. Efeito do Oxigênio Dissolvido	45
4.5.3. Atividade Enzimática	47
4.5.4. Fermentação em batelada alimentada	49
4.6. PRODUÇÃO DE ETANOL	51
4.7. CROMATOGRAFIA EM PAPEL	52

5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE	63
7.1. CURVAS PADRÃO PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS	64
7.2. RELAÇÃO CARBONO-NITROGÊNIO.....	67
7.3. TESTES PRELIMINARES NA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SACAROSE.....	68
7.4. TESTES PRELIMINARES NA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SACAROSE, EXTRATO DE LEVEDURA E SULFATO DE AMÔNIO	69
7.5. FERMENTAÇÃO A 30°C, SEM CONTROLE DE PH E COM ADIÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO	70
7.6. FERMENTAÇÃO A 30°C E SEM CONTROLE DE PH.....	71
7.7. FERMENTAÇÃO A 30°C COM CONTROLE DE PH EM 5,5.....	72
7.8. FERMENTAÇÃO A 30°C COM CONTROLE DE PH EM 4,5.....	73
7.9. FERMENTAÇÃO A 30°C SEM CONTROLE DE PH	74
7.10. FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA A 30°C COM CONTROLE DE PH EM 5,5	75
7.11. CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO ETANOL.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura $\beta(2\rightarrow6)$ da ramificação principal da levana.....	7
Figura 4.1: Atividade de levansacarase em função do pH de pré-incubação por 1h a 30°C.....	40
Figura 4.2: Efeito da temperatura de pré-incubação na atividade enzimática	41
Figura 4.3: Efeito da concentração inicial de sacarose na atividade da levansacarase em diferentes tempos de reação.	42
Figura 4.4: Produção de levana nos ensaios sem e com controle de pH em 5,5 e 4,5.....	43
Figura 4.5: Açúcares Redutores (AR) liberados no meio de fermentação durante a fermentação sem e com controle de pH em 5,5 e 4,5.	44
Figura 4.6: pH das fermentações pelo mutante ZA de <i>Zymomonas mobilis</i>	45
Figura 4.7: Produção de levana pelo mutante ZA de <i>Zymomonas mobilis</i> com e sem a adição de oxigênio dissolvido.....	46
Figura 4.8: Açúcares Redutores (AR) liberados durante a fermentação de sacarose pelo mutante ZA de <i>Zymomonas mobilis</i> com e sem a adição de oxigênio dissolvido.	46
Figura 4.9: Perfil de pH no decorrer das fermentações de sacarose com e sem adição de oxigênio dissolvido.	47
Figura 4.10: Atividade Enzimática da levansacarase (U/mL) no decorrer da fermentação a 30°C e sem controle de pH.....	48
Figura 4.11: Produção de levana pelo mutante ZA de <i>Zymomonas mobilis</i> no decorrer das fermentações em batelada e batelada alimentada.	49
Figura 4.12: Açúcares redutores liberados no decorrer da fermentação de sacarose pelo mutante ZA de <i>Zymomonas mobilis</i> em batelada e batelada alimentada.....	50
Figura 4.13: Perfil do pH de fermentação de sacarose pelo mutante ZA de <i>Zymomonas mobilis</i> batelada e batelada alimentada.	51
Figura 4.14: Cromatograma dos padrões, glicose e frutose, e da levana revelado com solução de nitrato de prata, NaOH 0,5N alcoólico e tiosulfato de sódio 10%.....	53
Figura 4.15: Cromatograma dos padrões, glicose e frutose, e da levana revelado com o reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Meio de Manutenção dos microrganismos <i>Erwinia herbicola</i> e <i>Zymomonas mobilis</i>	24
Tabela 3.2: Meio de Fermentação para <i>Erwinia herbicola</i>	25
Tabela 3.3: Meio de Fermentação para <i>Bacillus subtilis</i>	25
Tabela 4.1: Resultados utilizando o <i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089 com 50 e 100g/L de sacarose após 24h de fermentação.....	33
Tabela 4.2: Comparação dos mutantes de <i>Zymomonas mobilis</i> ZA e ZM, quanto a produção de levana em concentração de sacarose de 180g/L em diferentes tempos de fermentação (16, 24 e 48h).....	35
Tabela 4.3: Comparação da cepa mutante ZA com a cepa de <i>Zymomonas mobilis</i> natural (CCT 4494) quanto a produção de levana em concentração de sacarose em 180g/L em diferentes tempos de fermentação (4, 8, 10 e 24h).	35
Tabela 4.4: Efeito da variação da concentração inicial de sacarose na produção de levana pelo mutante ZA (<i>Zymomonas mobilis</i>). Fermentação por 16h a 30°C e pH inicial 6,5.....	36
Tabela 4.5: Variação da concentração inicial de sacarose, extrato de levedura e sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ . Fermentação de 16h a 30°C e pH inicial de 6,5.	38
Tabela 4.6: Parâmetros cinéticos da fermentação em batelada a 30°C e pH inicial 6,5.....	48

RESUMO

A levana, formada através de reações de transfrutossilação, constitui-se basicamente por unidades de frutose e encontra aplicação como espessante na indústria alimentícia, sendo utilizada ainda nas áreas médica e farmacêutica. Pode ser sintetizada por vários grupos de bactérias, entre elas a *Zymomonas mobilis*, através de meio fermentativo a base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais. As fermentações foram conduzidas a 30°C, em erlenmeyers e em fermentador de bancada. A *Zymomonas mobilis* estudada foi um mutante obtido através de tratamento da cepa natural com NTG (N-metil N'nitro N'nitroso Guanidina). Os resultados mostram que este mutante pode produzir até 30g/L de levana e que a concentração de extrato de levedura pode influenciar na síntese da levana. A atividade da levanasacarase da *Zymomonas mobilis* foi estudada em diferentes temperaturas e pH e demonstrou-se através dos resultados das fermentações que os parâmetros cinéticos são afetados tanto pela temperatura quanto pelo controle do pH do meio.

SUMMARY

Levan is formed through transfructosilation reactions and is constituted basically by units of fructose and finds application as thicker in the food industry, being still used in the medical and pharmaceutical areas. It can be synthesized by several groups of bacteria among them the *Zymomonas mobilis* in media with sucrose, yeast extract and mineral salts. The fermentations were carried out at 30°C, in erleynmeyers and in bench fermentador. *Zymomonas mobilis* studied was a mutant obtained through the treatment of the natural *Zymomonas mobilis* with NTG (N-methyl N'nitro N'nitroso Guanidin). The results show this mutant can produce up to 30g/L of levan and that the yeast extract concentration can influence the levan production. The levansucrase activity of the *Zymomonas mobilis* was studied at different temperatures and pH and demonstrated through the fermentation results that the kinetic parameters are affected by the temperature and pH control of the middle.

1. INTRODUÇÃO

A década de 70 caracterizou-se por apresentar diversos esforços, no sentido de melhorar a e buscar novas fontes para a produção de etanol. Dentro deste contexto, a bactéria *Zymomonas mobilis* revelou-se um microrganismo promissor, no entanto durante a fermentação da sacarose para sua conversão em etanol surgiu, como uma das razões do baixo rendimento, um polissacarídeo, a princípio de alto peso molecular, formado através da hidrólise da sacarose, denominado então de levana.

Com o aparecimento deste polissacarídeo, iniciaram-se estudos para sua caracterização e aplicabilidade. A levana é um polímero de frutose, polissacarídeo que consiste basicamente de unidades de frutose com uma única glicose no grupo inicial da sacarose produzido por reações de transfrutossilacção, podendo ser de alto ou baixo peso molecular, dependendo da fonte de carbono utilizada na fermentação. Assim como a dextrana, ela causa dificuldade no processo de fabricação do etanol, pois aumenta a viscosidade de sucos e xaropes de cana-de-açúcar. Pode ser produzida por *Zymomonas mobilis* com peso molecular em torno de 10^7 , correspondendo a aproximadamente 60.000 unidades de frutose.

A identificação representativa da *Zymomonas* foi atribuída a Lindner em 1924, mas Barker e Hillier (1911) foram os primeiros a estudar a bactéria que era responsável pela deterioração do sabor e do *flavour* de bebidas fermentadas. *Zymomonas* são bastonetes gram-negativos e móveis, mas que toleram algum oxigênio e também pode crescer a baixos valores de pH; entretanto, o pH ótimo para o crescimento é 7,3 e o pH final depois de 3 dias a 30°C em meio padrão está entre 4,8 e 5,2. A faixa de temperatura na qual as células de *Zymomonas* podem crescer é de 25 a 30°C.

A fermentação quase quantitativa de glicose e frutose a etanol e dióxido de carbono é considerada uma característica importante do gênero *Zymomonas*, no entanto essa bactéria utiliza, para o catabolismo anaeróbio desses carboidratos, uma modificação do mecanismo de Entner-Duodoroff. A descoberta deste mecanismo em *Zymomonas* foi

surpreendente, pois foi o primeiro exemplo de uma bactéria anaeróbia utilizando uma via que ocorre principalmente em bactérias estritamente aeróbias. A *Zymomonas* precisa glicose, frutose ou ainda sacarose no meio de cultura para o crescimento. O primeiro passo de quebra da sacarose deve produzir glicose e frutose, mas um importante aspecto do mecanismo enzimático de quebra da sacarose deve ser observado: durante o crescimento do microorganismo no meio de sacarose ocorre a formação da levana.

A *Zymomonas mobilis* possui diferentes enzimas capazes de hidrolisar a sacarose, a presença de duas sacarases na hidrólise da sacarose, uma invertase intracelular e uma extracelular, e a levanasacarase (EC 2.4.1.10) que converte a sacarose em frutanas com pontes $\beta(2\rightarrow6)$, pois transfere o radical frutossil da sacarose para o C-6 da frutose no terminal não redutor formando a cadeia da levana. A levanasacarase pode ser produzida por diversas famílias de bactérias como *Pseudomonas* sp., *Acetobacter aceti*, e *Aerobacter levanicum* (*Erwinia herbicola*) (Hestrin et al., 1943; Cote, 1988), *Bacillus natto's* e *Bacillus polymyxa* (Hestrin et al., 1943; Kojima et al., 1993), sendo *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* os mais estudados para este fim.

A levana, principalmente a de alto peso molecular, vem sendo aplicada tanto na indústria alimentícia, substituindo a dextrana como espessante de alimentos, quanto na área médica e farmacêutica. Estudos indicam que ela pode apresentar um efeito hipocolesterolêmico no organismo de ratos e, além disso, regula o trato gastrointestinal, pois oligômeros de frutose e sacarose não são digeríveis por humanos, assumindo, neste aspecto, comportamento semelhante ao das fibras. A levana tem ainda ação anticarcinogênica, ou seja, atua diretamente nas células tumorosas através de modificações na membrana da célula, incluindo uma mudança na permeabilidade desta que permite uma melhor absorção de drogas antitumorais.

O objetivo deste trabalho foi sintetizar o polissacarídeo levana e, para tanto, produzir a enzima levanasacarase. Além disso, estudou-se a cinética da fermentação para produção da enzima, caracterizando as variáveis decorrentes do processo.

A produção de levana por *Zymomonas mobilis* a partir da hidrólise da sacarose foi estudada a 30°C e diferentes pH, demonstrado-se através dos resultados da fermentação com *Zymomonas mobilis* que os parâmetros cinéticos são afetados tanto pela temperatura quanto pelo controle do pH do meio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Frutose

A frutose é uma hexose, cuja fórmula molecular é $C_6H_{12}O_6$ e o peso molecular é igual a 180,16 Da (Vettorazzi e Macdonald, 1989).

Assim como a glicose, a frutose abaixa o ponto de congelamento dos alimentos por possuir baixo peso molecular quando comparados com di e oligossacarídeos; e por serem açúcares redutores estes monossacarídeos desenvolvem cor nos produtos através da reação de Maillard, envolvendo proteínas e aminoácidos. Esta reação promove a formação de cor marrom e o estágio inicial da reação ocorre mais rapidamente com frutose do que com glicose (Dillis, 1993)

A frutose forma complexos estáveis com ferro e efeitos sobre o cobre estão sendo estudados mais intensivamente. Em humanos, a frutose consumida como 20% de energia não tem efeito no balanço do cobre (O'Dell, 1993).

2.2. Polifrutose

Polímeros de frutose são polissacarídeos que podem ser produzidos por diversos grupos de microrganismos. Polímeros com nome trivial de polifrutose, consistem basicamente de frutose com uma única glicose no grupo inicial da sacarose (Clarke *et al.*, 1990), produzidos pela transferência de grupos frutossil da sacarose a outros aceptores, como frutose no caso da levana, onde a especificidade do acceptor para transfrutossilção, a estrutura do produto transfrutossilado, bem como a proporção da transfrutossilção na catálise total dependem da fonte da enzima e das condições da reação (Cheetham, 1989).

A polifrutose pode ser produzida de sacarose pura, de sacarose de melaço e de xaropes de cana ou de beterraba, é solúvel em água e quando hidrolisada produz frutose a altas temperaturas e pH ácido. A polifrutose é estável, não higroscópica e pode ser conservada em condições atmosféricas por vários meses (Clarke *et al.*, 1990).

As enzimas formadoras da polifrutose foram designadas, segundo Edelman (1954) (citado por Oliveira, 1997), por invertases, que são aquelas associadas com a simples hidrólise da sacarose a glicose e frutose. Entretanto, foi sugerido que o termo sacarase seria mais apropriado, em virtude dos muitos tipos de reações que estas preparações são capazes de catalisar, utilizando a sacarose como substrato. As sacarases podem ser classificadas em: glucosacarases (glicosidases: atacam a sacarose pelo lado da glicose) e frutosacarases (frutofuranosidases: que atacam a sacarose pelo lado da frutose), tendo sido observada a inibição de algumas sacarases pela glicose e frutose.

Na natureza, os polímeros de frutose (frutanas) além de serem produzidos por certas bactérias, são encontrados também em algumas espécies de plantas (Riesneier *et al.*, 1998) como reserva de carboidratos (Yun, 1996).

Segundo Aspinall (1970), plantas das famílias *Compositae* e *Graminea* armazenam carboidratos através da 1-frutossiltransferase, que transfere a frutose da sacarose para o trissacarídeo inicial. Nas plantas as frutanas podem ser divididas no grupo da inulina, caracterizada por ligações (2→1), e no grupo da levana, caracterizada por ligações (2→6).

Atualmente, os frutoligossacarídeos são comercialmente disponíveis nos Estados Unidos (ZeaGen Corp., Westminster, Colo.). Oligossacarídeos provenientes da soja foram considerados alimentos GRAS (Generally Recognized as Safe) pela Food and Drug Administration. Os frutoligossacarídeos também foram aceitos como fibra alimentar pelas autoridades francesas, CEDAP, em 13 de setembro de 1995. Na França a Direção Geral do Consumidor, da Competência e da Repressão a Fraude reconheceu em 4 de janeiro de 1995 que os frutoligossacarídeos (marca Actilight) estimulam o crescimento e a atividade das bifidobactérias do intestino humano (Alegret, 1996).

2.3. Levana

2.3.1. Caracterização

A levana é um polímero de frutose sintetizado através de reações de transfrutossilação por muitas espécies de bactérias e que inicialmente foi considerado um subproduto da fermentação alcoólica para produção de etanol, assim como o sorbitol. A levana, como a dextrana, causa dificuldade no processo de fabricação do etanol, pois aumenta a viscosidade de sucos e xaropes de cana-de-açúcar (Clarke *et al.*, 1990).

Segundo Dawes *et al.* (1966) a levana produzida por bactérias é uma frutana (fructan), polímero natural da frutose de alto peso molecular, no qual unidades de D-fructofuranosil são associadas por pontes (2→6), com ramificação (2→1) a cada nove unidades.

Conforme Viikari e Gisler (1986), a levana produzida por *Zymomonas mobilis* é um polímero de frutose, ponte $\beta(2\rightarrow6)$, com peso molecular em torno de 10^7 , correspondendo a aproximadamente 60.000 unidades de frutose. É formada em consequência da hidrólise da sacarose, e juntamente com a levana de alto peso molecular detectaram fruto-oligômeros ou levana de baixo peso molecular. Os aspectos da formação de levana e sorbitol são antagonistas: alta taxa de hidrólise da sacarose favorece a formação de sorbitol e baixa taxa de hidrólise a formação de levana de alto peso molecular.

Euzenat *et al.* (1997) caracterizaram a levana produzida por *Bacillus subtilis* como polímero de frutose altamente ramificado, com pontes $\beta(2\rightarrow6)$ da cadeia principal, identificando também a formação de levana de alto e baixo peso molecular, as quais demonstram diferentes propriedades.

A levana de alto peso molecular é produzida principalmente por microrganismos, enquanto que a de baixo peso pode ser encontrada também em plantas. Este polissacarídeo

pode ser produzido na forma encapsulada ou secretado diretamente no meio de crescimento, e é usado pelos microrganismos como mecanismo de defesa ou como reserva de substrato (Clarke *et al.*, 1990). Sua estrutura pode ser observada na Figura 2.1.

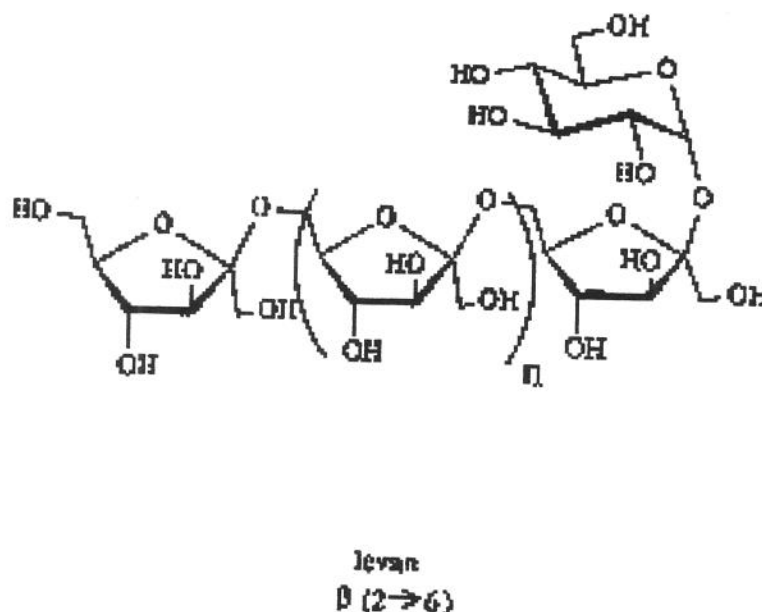


Figura 2.1: Estrutura $\beta(2 \rightarrow 6)$ da ramificação principal da levana.

2.3.2. Condições de Produção

A hidrólise da sacarose conduz à formação de polifrutose, frutoligossacarídeos ou levana a partir da ação de enzimas frutotransferases (van Balken *et al.*, 1991). A distribuição destes produtos depende da concentração inicial de sacarose, sendo que alta taxa de hidrólise da sacarose com acúmulo de açúcares monoméricos leva a diminuição da produção de levana (Viikari e Linko, 1986).

Euzenat *et al.* (1997) produziram frutoligossacarídeos por fermentação através de *Bacillus subtilis* e observaram que no início do experimento, enquanto ocorria a hidrólise da sacarose, o aparecimento da frutose foi mais rápido que o da levana, ou seja, a síntese de levana a partir da frutose liberada no meio mostrava-se mais lenta do que a própria liberação desta. Mais tarde, a taxa de produção de frutose diminuiu, quando então passou a ocorrer a síntese de levana. A quantidade de sacarose hidrolisada passou de 65% na

primeira hora de síntese para 33% depois de 8h. O experimento foi então finalizado após 8h para manter alta proporção de transformação de frutose em levana, atingindo-se rendimento de 30% desta, em relação à massa inicial de sacarose.

Conforme Cheetham (1989) a levanasacarase pode catalisar a reação desproporcionalmente, no qual há uma modificação na polidispersão do polímero levana ou oligômeros. Vinhas *et al.* (2000) observou que as levanas são produzidas como uma mistura de pesos moleculares, cujas curvas de distribuição apresentam altos índices de polidispersividade.

A formação de levana, conforme estudos de Belghith *et al.* (1996), é maior a temperaturas baixas, estabelecendo a temperatura ótima em 0°C. No entanto, Calazans *et al.*, (1997) sugeriram a temperatura de 25°C como sendo a melhor para a produção deste polissacarídeo e Sangiliyandi *et al.* (1999) estabeleceram em 30°C.

A produção de levana por *Zymomonas mobilis* a partir da hidrólise da sacarose foi estudada na fermentação por suspensão de células em diferentes temperaturas e pH por Park *et al.* (1983), os quais observaram que os melhores rendimentos ocorreram a 30°C e pH 5,0. Já Euzenat *et al.* (1997) trabalharam com temperaturas distintas e concentrações de sacarose com o *Bacillus subtilis*. Os principais resultados obtidos com as modificações na temperatura e concentração de sacarose demonstraram que para a mesma concentração inicial de sacarose, há maior formação de levana na temperatura de 37°C do que a 60°C. Na temperatura de 60°C houve maiores variações na produção de levana. No entanto, esta diferença diminui com as maiores concentrações de sacarose. Com 2,6M de concentração inicial de sacarose, a concentração de levana na solução apresentou valores próximos tanto a 37°C quanto a 60°C. Na segunda temperatura (60°C), a taxa de reação foi variável nas três maiores concentrações iniciais de sacarose. Resultados obtidos em experimento realizado a 50°C não produziram informações diferentes, e para todas as condições testadas, a maior conversão em levana, a partir da concentração inicial de sacarose, aproximadamente 32%, foi atingida a temperatura de 37°C e 1,8 M de sacarose.

Diez Jerez (1993) demonstrou através dos resultados da fermentação com *Zymomonas mobilis* que os parâmetros cinéticos são afetados tanto pela temperatura quanto pelo controle do pH do meio. Utilizando a temperatura de 37°C, com e sem controle de pH, a taxa específica de crescimento é maior e a quantidade de levana produzida é menor que na temperatura de 30°C

Belghith *et al.* (1996) investigaram uma faixa de pH com o intuito de observar a influência na síntese da levana. A formação da levana foi mais significativa em pH abaixo de 6,0, estabelecendo o pH ótimo em 5,0.

Han e Clarke (1990) observaram aumento na produção do polissacarídeo quando a cultura foi levemente agitada durante a fermentação, pois a agitação vigorosa e a aeração inibem a produção da levana. Vinhas *et al.* (2000) concluíram que na produção de levana por *Zymomonas mobilis* não é vantajoso promover a agitação, pois a mesma conduz a uma aeração que, em última análise, prejudica a produção de células e de levana.

2.3.3. Frutoligosacarídeos

Viikari e Gisler (1986) enquanto faziam ensaios de fermentação para produção de levana por *Zymomonas mobilis*, distinguiram também levana de alto e baixo peso molecular. Os oligômeros de baixo peso molecular, continham frutose e glicose, e a levana de alto peso molecular continha somente frutose. A proporção da concentração de glicose e frutose em oligômeros hidrolisados indicou que o principal tipo de molécula encontrada continha um mol de glicose para cada dois moles de frutose, que correspondia ao maior pico na análise de açúcares redutores por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Stanek *et al.* (1965) observaram que na transferência da D-frutose da molécula de sacarose por processo enzimático pela ação da levanasacarase de *Aerobacter levanicum* são produzidos os oligossacarídeos isokestose e kestose. Na nomenclatura original usada em

artigos da área, isokestose é nomeado de 1^F - β -frutosilsacarose ou 1-kestose, enquanto os nomes 6^F - β -frutosilsacarose ou 6-kestose são usados para kestose.

Os oligômeros podem ser formados em diferentes proporções, assim como identificado por Crittenden e Doelle (1993), sendo que o mais produzido, o 1-kestose, representa 98% do total de oligômeros. Viikari e Gisler (1986) sugeriram a existência de tetrâmeros e/ou pentâmeros em pequenas quantidades. Deste modo, assumiu-se que a sacarose serve como um aceptor na reação de transfrutossilação. O sistema pelo qual a levanasacarase atua quando da utilização de *Zymomonas mobilis* é, aparentemente, semelhante ao verificado quando do uso de *Erwinia herbicola*, no qual as transfrutossilações podem ser polirepetitivas, produzindo levana, ou oligorrepetitivas, resultando na formação de oligossacarídeos. Observaram que com o microrganismo *Erwinia herbicola* houve a formação de fruto-oligômeros, no qual 95% consistiam em trimeros do tipo 1- β -frutosilsacarose e 4% em tetrâmeros (frutosil- 1^F - β -frutosilsacarose).

Viikari (1984) observou a formação de levana imediatamente após a inoculação do meio de cultura com *Z. mobilis* através da quantificação por precipitação. A síntese de levana atingiu seu máximo ao final da hidrólise da sacarose do meio, porém a precipitação de levana diminuiu após este tempo. Depois de 10h de fermentação a quantidade de levana decresceu, indicando que outros produtos somaram-se ao etanol e à levana precipitada. Este autor presumiu que parte da levana poderia estar na forma não precipitada. Para verificar isto amostras foram hidrolisadas com ácido fraco e os açúcares foram analisados. Toda a sacarose foi hidrolisada, causando um incremento na quantidade de glicose e frutose, de forma que a concentração de frutose aumentou significativamente por causa desta hidrólise, o que permitiu corrigir o cálculo da massa pela quantidade de frutose original a partir da sacarose hidrolisada. Assim, admitindo a hidrólise completa, a massa de levana produzida foi equivalente a 10% da sacarose original.

2.4. Identificação do Microrganismo

A identificação representativa da *Zymomonas* foi atribuída a Lindner em 1924, mas Barker e Hillier (1911) foram os primeiros a estudar a bactéria que era responsável pela deterioração do sabor e do *flavour* de bebidas fermentadas, sendo a eles atribuída a real descoberta desse gênero. Lindner em 1928 deu o nome de *Termobacterium mobile* a seu isolado. A bactéria foi posteriormente denominada *Pseudomonas lindner* por Kluyver e Hoppenbrouwers (1931). Kluyver inseriu o gênero na 7ª edição do Bergey's Manual (1957), propondo duas espécies: *Zymomonas mobilis* e *Zymomonas anaerobia* (Mortatti, 1985).

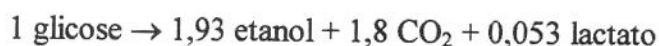
Swings e de Ley (1975) e de Ley e Swings (1976) reexaminaram muitas características de um grande número de linhagens de *Zymomonas*, utilizando métodos mais modernos e propuseram nova classificação taxonômica para *Zymomonas*.

2.4.1. Características Fisiológicas do Microrganismo

Zymomonas são bastonetes gram-negativos, com 2 a 6 μm de comprimento por 1 a 1,4 μm de largura, geralmente ocorrendo aos pares e não formam esporos. São móveis, têm de um a quatro flagelos polares e a motilidade pode ser perdida espontaneamente. São organismos anaeróbios, mas que toleram algum oxigênio. Não é observado o crescimento em ágar nutriente ou caldo nutriente e requerem pantotenato e biotina para o crescimento. Crescem e fermentam glicose e frutose com produção de quantidades equimolares de etanol e CO_2 , sendo que algumas linhagens utilizam a sacarose. Pouco ácido lático e traços de acetilmetilcarbinol são formados. Muitas linhagens toleram altas concentrações de glicose, na proporção de 20 até 40%; são tolerantes também ao etanol na concentração de 7,7 a 10% de etanol. *Zymomonas* também pode crescer a baixos valores de pH; entretanto, o pH ótimo para o crescimento é 7,3 e o pH final depois de 3 dias a 30°C em meio padrão está entre 4,8 a 5,2. A temperatura na qual as células de *Zymomonas* podem crescer é de 25 a 30°C (Swings e de Ley, 1977).

2.4.2. Metabolismo dos Carboidratos

A fermentação quase quantitativa de glicose e frutose a etanol e dióxido de carbono é considerada uma característica importante do gênero *Zymomonas*. Gibbs e DeMoss (1951, 1954) demonstraram que essa bactéria utiliza, para o catabolismo anaeróbio desses carboidratos, uma modificação do mecanismo de Entner-Duodoroff, podendo produzir mais do que 1,9 mol de etanol por mol de glicose fermentada e pequena quantidade de lactato, de acordo com a seguinte equação:



Já o balanço molar da fermentação estudado por Kluyver e Hoppenbrouwers (1931) é o seguinte:



A descoberta do mecanismo de Entner-Duodoroff em *Zymomonas* foi surpreendente, pois foi o primeiro exemplo de uma bactéria anaeróbia utilizando uma via que ocorre principalmente em bactérias estritamente aeróbias (Kerstens e de Ley, 1968).

Bauchop e Elsdon (1960) estudando o crescimento do microrganismo em relação ao seu suprimento de energia, calcularam o rendimento molar de crescimento e sugeriram que somente um mol de ATP era produzido por mol de glicose fermentada pela *Zymomonas mobilis*, isto é, a fermentação pela via Entner-Duodoroff rende metade da energia obtida pela glicólise. Como foi citado, *Zymomonas* precisa de um açúcar fermenticível no meio de cultura para o crescimento, podendo ser glicose ou frutose ou ainda, para algumas linhagens, sacarose. A característica de utilizar ou não a sacarose foi descrita por vários autores (Kluyver e Hoppenbrouwers, 1931; Dadds *et al.*, 1973) como um fenômeno indutível específico de uma linhagem e sem valor taxonômico.

O primeiro passo de quebra da sacarose deve inevitavelmente render glicose e frutose. Dawes *et al.* (1966) e Ribbons *et al.* (1962) estudaram importantes aspectos do mecanismo enzimático de quebra da sacarose e observaram: (a) que durante o crescimento do microrganismo no meio de sacarose ocorre a formação de levana, um polissacarídeo contendo somente unidades de frutose; (b) que o coeficiente de rendimento de crescimento de *Zymomonas mobilis* no meio contendo sacarose é apreciavelmente menor do que o mesmo coeficiente obtido em meios contendo concentrações equivalente de glicose, frutose ou glicose mais frutose; (c) que esse baixo coeficiente obtido no meio contendo sacarose ocorre devido à formação de levana durante o crescimento; (d) e que *Zymomonas* produz levana de sacarose, mas não de glicose ou frutose ou uma mistura de ambos.

Os mesmos autores, Dawes *et al.* (1966), sugeriram então que uma levanasacarase pode ser responsável tanto pela formação de levana como pela hidrólise da sacarose à glicose e frutose.

Mortatti *et al.* (1983) estudaram várias linhagens de *Zymomonas mobilis* para comparar a capacidade de utilizar a sacarose e descrever algumas características de enzima hidrolizante de sacarose. Dentre as 6 linhagens estudadas, descreveram que a linhagem NRRL B-14022 é capaz de crescer e utilizar a sacarose mais rapidamente e que a atividade da enzima extracelular hidrolizante da sacarose é bastante elevada. Essa enzima é específica para grupos β -frutossil, assemelhando-se a uma β -D-fruto-furanosídeo frutohidrolase (E.C. 3.2.1.26).

Uma importante característica do metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas* é que, quando cultivada em meio complexo contendo grandes quantidades de peptona e extrato de levedura, 98% da glicose consumida é convertida em etanol, CO₂, ATP e calor, e somente 2% é usado para material celular (Swings e de Ley, 1977). No entanto, Belaich e Senez (1965) demonstraram que metade do carbono celular é derivado dos 2% da glicose incorporada pela *Zymomonas mobilis* e que os aminoácidos e/ou os vários constituintes orgânicos da peptona ou do extrato de levedura não são utilizados como fonte de energia para crescimento, mas como blocos construtivos para biossíntese.

2.4.3. Substratos

Como descrito por Gibbs e DeMoss (1951,1594), *Zymomonas mobilis* pode fermentar glicose, frutose ou sacarose. O principal produto da fermentação de açúcares por *Zymomonas mobilis* é o etanol quando a glicose e frutose são utilizados como fonte de carbono, obtendo rendimento superior a 95% em relação ao rendimento teórico (Lee *et al.*, 1981). Entretanto, quando sacarose é utilizada para a fermentação, o rendimento fermentativo diminui devido a formação de subprodutos como levana (Lyness e Doelle, 1983; Park *et al.*, 1983 e Yoshida *et al.*, 1990) e sorbitol (Viikari, 1984; Amin e Khalaf Allah, 1992). Além destes compostos também são produzidos acetaldeído e ácido acético (Tanaka *et al.*, 1990) e pequenas quantidades de alguns ácidos superiores e fenol (Rao e Jones, 1987 citado por Diez e Yokoda, 1996).

Lyness e Doelle (1981) estudaram a fermentação descontínua da sacarose com duas linhagens de *Zymomonas mobilis* e observaram que um aumento na concentração de sacarose afetou a velocidade específica de crescimento na linhagem Z₁₀, bem como a atividade hidrolizante da sacarose para a linhagem Z₇, mas não influenciou significativamente a formação de biomassa. Demonstraram que a hidrólise da sacarose pode ser independente da utilização da glicose, que de acordo com a linhagem usada, a hidrólise da sacarose pode levar ao acúmulo significativo de glicose no meio e que a velocidade de produção de etanol e o tempo de fermentação dependem da velocidade de catabolismo dos produtos de hidrólise da sacarose.

Dawes *et al.* (1966) e McGill e Dawes (1971) observaram, no meio contendo frutose, rendimento de massa celular relativamente baixo e crescimento lento. No meio contendo sacarose, a redução observada no rendimento da massa celular comparando-se ao crescimento em glicose tem sido atribuída à formação de levana (Lee *et al.*, 1981 e Ribbons *et al.*, 1962).

2.4.4. Temperatura e pH

A temperatura e o pH desempenham um papel importante no controle dos produtos da fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. A taxa de hidrólise da sacarose depende da temperatura de fermentação (Lyness e Doelle, 1980; Lopes *et al.*, 1991), concentração de sacarose e pH (Lyness e Doelle, 1983; Lopes *et al.*, 1991).

2.5. Enzimas

Kannan *et al.* (1993) comentam que a *Zymomonas mobilis* possui três diferentes enzimas capazes de hidrolisar a sacarose. Elas são a sacarase intracelular (SacA), a levanasacarase extracelular (SacB) e a sacarase extracelular (SacC). A função da SacA não está claramente conhecida enquanto que a SacC é responsável pela hidrólise da sacarose e a SacB está envolvida na formação da levana. A análise sequencial dos aminoácidos revela forte semelhança entre a SacB e a SacC, mas não mostra nenhuma similaridade com a SacA.

Kannan *et al.* (1997) e Oda *et al.* (1994) relataram a presença de duas sacarases na hidrólise da sacarose, a invertase intracelular e a extracelular. Entretanto, Crittenden e Doelle (1994) negam que a adição de invertase é requerida para síntese de oligossacarídeos produzidos em fermentações de sacarose.

2.5.1. Caracterização da Enzima Levanasacarase

A levanasacarase (EC 2.4.1.10) converte a sacarose em frutanas com pontes $\beta(2\rightarrow6)$ na ramificação principal (Hestrin *et al.*, 1956). As frutanas (fructans) são oligossacarídeos e polissacarídeos de frutose, e entre elas encontra-se a levana (van Balken *et al.*, 1991). A levanasacarase transfere o radical frutossil da sacarose para o C-6 da frutose no terminal não redutor formando a cadeia da levana (Dedonder, 1966).

Lyness e Doelle (1983) estudaram a atividade da levanasacarase purificada, através da análise da liberação de glicose. Não foram encontradas diferenças entre as reações de frutossilacção com a água, sacarose ou polifrutose como acceptor de frutossil.

A formação de levana durante a fermentação da sacarose indica a presença da enzima levanasacarase, que pode ocorrer intracelularmente e como constituinte da célula (Hestrin *et al.*, 1943), e/ou extracelularmente (Cote, 1988), transferindo o radical frutossil da sacarose para formar a levana (Euzenat *et al.*, 1997) a baixas temperaturas, máximo de 35°C e pH ótimo de 5,5 (Crittenden e Doelle, 1994). Cote e Iman (1989) encontraram o peso molecular aparente da enzima na forma monomérica em torno de 48kD, e o pH ótimo de atividade foi 6, sendo as menores atividades observadas abaixo de 3,6 e acima de 9,0.

Conforme Chambert e Gonzy-Tréboul (1976) a levanasacarase é uma frutossiltransferase que catalisa principalmente a seguinte reação: sacarose + acceptor → glicose + acceptor-frutossil, sendo identificada como 2,6-β-D-frutana 6-β-frutossil-transferase.

A levanasacarase pode ser produzida por diversas famílias de bactérias como *Pseudomonas sp.*, *Acetobacter aceti*, e *Aerobacter levanicum* (*Erwinia herbicola*) (Hestrin *et al.*, 1943; Cote, 1988), *Bacillus natto's* e *Bacillus polymyxa* (Hestrin *et al.*, 1943; Kojima *et al.*, 1993), sendo *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* os mais estudados para este fim.

Vários trabalhos descrevem a formação de levana de alto e baixo peso molecular durante a fermentação, quando incubada a levanasacarase com sacarose. Desta maneira, há uma dualidade nos produtos da enzima, de forma que o processo pode demonstrar peculiaridades quanto às características do polissacarídeo formado, dependendo do microrganismo e da fonte de carbono a ser utilizada.

2.5.2. Condições de Produção da Levanasacarase

Cote (1988) estudou o crescimento da *Erwinia herbicola* e produção de levanasacarese em diferentes meios de fermentação. Comparou as densidades celulares

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

Tanaka *et al.* (1979) (citado por Euzenat *et al.*, 1997) investigaram as condições de produção de levana e estabeleceram que levana de baixo peso molecular adicionada ao meio de reação atua como ativador da enzima mais do que a de alto peso molecular, e que este efeito diminui com o aumento da força iônica do meio de reação.

Euzenat *et al.* (1997) acabaram por confirmar que a presença de levana atua diretamente sobre a enzima, isto é, a produção de levana de baixo peso molecular induziu um incremento na atividade de levanasacarase, uma vez que os melhores aceptores são os resíduos frutósil ao invés da água ou glicose.

A ação da levanasacarase, segundo Lyness e Doelle (1983), é controlada, ainda que de formas distintas, pela concentração de sacarose, glicose e frutose presentes no meio. Quando a levanasacarase foi utilizada para produção de levana de alto peso molecular através de qualquer tipo de enzima invertase que atuava sobre a sacarose, sua ação foi levemente inibida pela glicose. Ainda assim, ficou constatado que a concentração de sacarose é o ponto de maior influência sobre a enzima, uma vez que a hidrólise ocorre

mesmo em concentrações elevadas de glicose, bem como a síntese de levana a partir da frutose resultante. A alta taxa de hidrólise da sacarose foi relacionada à baixa afinidade da enzima com o substrato, ou seja, a baixa afinidade da enzima pela sacarose ocorre em fermentações com microrganismos que normalmente crescem em altas concentrações de sacarose e requerem a rápida produção de glicose como fonte de energia.

2.5.3. Efeito da Temperatura na Atividade da Levanasacarase

Considerando que a levanasacarase é responsável pela hidrólise da sacarose, formação da levana e produção de oligossacarídeos, Crittenden e Doelle (1994) investigaram o efeito da temperatura nestas três atividades. Os resultados demonstraram que a atividade da enzima foi máxima em 45°C, tanto na hidrólise da sacarose como na formação de oligossacarídeos. A atividade para a formação de levana apresentou seu ponto ótimo em aproximadamente 15°C e caiu a zero quando a temperatura atingiu 35°C. Sangiliyandi *et al.* (1999) observaram sua estabilidade a 30°C, mantendo atividade relativa maior que 90% mesmo depois de 6 horas de incubação.

Dedonder (1966) estudou a levanasacarase produzida por *B. subtilis* e observou que a enzima pode ser conservada a -20°C sem que ocasione perda da sua atividade. No entanto, repetidos descongelamentos resultam na destruição parcial da atividade. A sua atividade é instantaneamente reduzida à metade se colocada a 60°C, e tem sua estabilidade aumentada com a adição de metais como ferro, alumínio e zinco.

Cote e Imam (1989) purificaram a levanasacarase da *Erwinia herbicola* e constatarem sua estabilidade quando incubada por 30min a temperaturas superiores a 52°C, mas foi desnaturada irreversivelmente quando aquecida a 66°C. A enzima demonstrou também estabilidade quando congelada, podendo ser liofilizada e conseqüentemente reconstituída com pequena perda da atividade.

2.5.4. Efeito do pH na Atividade da Levanasacarase

Crittenden e Doelle (1994) identificaram o pH ótimo para a levanasacarase de *Z. mobilis* em 5,5 para a formação dos três produtos. Em relação à formação de levana, a atividade da levanasacarase é menos tolerante a pH baixos do que em relação a hidrólise da sacarose ou a produção de oligossacarídeos. O pH ótimo encontrado por Mortatti *et al.* (1983) está entre 4,7 e 5,6. Sangiliyandi *et al.* (1999) demonstraram que a estabilidade da enzima está entre os pH 5,0 e 7,0, sendo inativada em pH 9,0.

A levanasacase do *B. subtilis*, conforme Dedonder (1966), tem o pH ótimo entre 5,8 e 6,0, e a atividade é reduzida em 50% nos valores de pH abaixo de 4,4 e superiores a 7,5. Cote e Imam (1989) estudaram o pH da levanasacarase da *Erwinia herbicola* e encontraram a maior atividade da enzima em pH 6,0 e menor em pH abaixo de 3,6 e acima de 9,0.

2.6. Fermentação

Tem-se observado um progresso contínuo no processo de fermentações, tanto no que diz respeito a microbiologia como a cinética e a engenharia dos sistemas de reação. Há que distinguir entre fermentações aeróbicas e anaeróbicas, segundo a natureza dos microrganismos por elas responsáveis, isto é, conforme o seu metabolismo celular, resultado do seu mecanismo enzimático. É a rota metabólica que a célula do microrganismo em questão utiliza para o aproveitamento de carboidratos e gorduras, conforme haja ou não disponibilidade de oxigênio, que determina a aerobiose ou anaerobiose do processo fermentativo (Reguly, 1996).

Em qualquer caso, os microrganismos obtêm sua energia da oxidação da matéria orgânica, sendo fundamental um processo de desidrogenação desta. Este processo de oxidação é gradual, dando-se através de múltiplas etapas ou reações enzimáticas acopladas, cada uma catalisada por enzima distinta, somente microrganismos cujo metabolismo seja respiratório, isto é, que conduz o hidrogênio até o oxigênio aceptor para formar a água, é que obtém a máxima energia (Reguly, 1996).

A grande importância do oxigênio reside no fato de que ele age como aceptor do hidrogênio para produzir água, um composto biologicamente inócuo, mas vital. Quando não existe oxigênio, outros aceptores de hidrogênio podem ser usados pela célula, pelo que as condições serão anaeróbias por definição, não obtendo os microrganismos toda a energia contida na matéria orgânica. E a ausência desta paralisa aí (Reguly, 1996).

Do ponto de vista transformativo, os processos anaeróbicos são mais rendosos, pois cada célula de microrganismo rende maior quantidade de produtos intermediários, estágios que são da oxidação ou degradação total da matéria orgânica (Reguly, 1996).

2.6.1. *Matérias-Primas da Fermentação*

Praticamente quaisquer produtos naturais ou seus derivados de natureza orgânica, basicamente produtos ou subprodutos da agricultura e do processamento de vegetais, podem constituir a base ou substrato para processos fermentativos (Reguly, 1996). Dada a importância dos carboidratos no metabolismo de qualquer célula viva, não é por acaso constituírem eles as principais matérias-primas de fermentações. Mas também devem estar presentes compostos nitrogenados, além de probióticos (fatores de crescimento), como vitaminas e coenzimas. Indispensável é a presença de fósforo, sob a forma de fosfatos, o qual costuma ser adicionado aos meios, exercendo também ação tamponante ou inibidora de flutuações de pH.

As matérias-primas ricas em carboidratos podem conter açúcares diretamente fermentescíveis ou carboidratos mais complexos como amido e celulose, os quais devem ser hidrolisados previamente, sendo a transformação da celulose muito mais complexa e dispendiosa do que a do amido (Reguly, 1996).

2.7. Tipos de Fermentação

A maioria dos experimentos realizados até então utilizaram-se da fermentação convencional submersa (CSF) ou células imobilizadas no reator. No entanto, a fermentação

direta de substâncias ricas em açúcar usando o processo que consiste na extração do açúcar de um pequeno pedaço de cana para meio líquido, e simultaneamente fermentado, chamado EX-FERM (Rolz e Cabrera, 1980), ou fermentação semi-sólida (SSF), onde substâncias ricas em açúcar são diretamente fermentadas com fatura de partículas sólidas úmidas impregnadas com o microrganismo (Amin, 1992), constitui-se em uma possibilidade atrativa para a produção de levana.

Comparando a EX-FERM com a fermentação convencional, a utilização de suspensão de células livres apresenta várias vantagens, que incluem aceleração da taxa de reação, devido ao contato direto entre o substrato e as células microbianas, eliminando o caro processo de extração e a redução do volume no fermentador, por eliminar a adição de água e reduzir os custos com energia, mantendo alta concentração de etanol (Amin, 1992).

Amin e Khalaf Allah (1992) estudaram a formação de levana no processo CSF e no SSF, concluindo que sua síntese ocorre em ambas as fermentações, mas de maneiras diferentes. No processo CSF, a concentração de levana alcançou o valor máximo de 22g/L, e então decresceu e estabeleceu-se num novo valor de 11,5 g/L, quando cessou a hidrólise de sacarose. Ao contrário, no processo SSF aconteceu um gradual aumento da síntese de levana e a concentração alcançou 18g/L. As quantidades utilizadas de açúcar em ambas fermentações tinham níveis similares.

Quanto à influência da temperatura na síntese da levana pelo processo SSF, Amin e Khalaf Allah (1992) mostraram que um aumento na temperatura de 30 para 35°C há uma redução na síntese de levana de 21g/L para 4g/L. De forma contrária, quando a temperatura da fermentação é diminuída de 30 para 25°C, há aumento na síntese de levana.

2.8. Aplicações

A levana apresenta aplicações em diversas áreas de interesse, como saúde e alimentação humana. Uma das faculdades deste derivado da frutose em ciência e tecnologia de alimentos é, além de ser uma importante fonte de frutose (Ananthalakshmy e

Gunasekaran, 1999), devido as suas características físico-químicas, é a capacidade de atuar como espessante de alimentos, gelificante e estabilizante em substituição à dextrana (Cote, 1988), que também é utilizada na complexação do ferro na corrente sanguínea (Queiroz, 1987). Segundo Fuchs (1991) (citado por Calazans *et al.*, 1997) este polissacarídeo apresenta grande potencial na utilização como fonte de frutose, emulsificante, agente encapsulante, agente de acabamento de superfície, carreador de sabor e fragância. A alta solubilidade e a baixa viscosidade das soluções aquosas de levana levaram a sugerir-la como uma possível substituta da goma arábica.

Segundo estudos de Calazans *et al.* (1997) sua utilização na medicina está relacionada com suas atividades antiviral e antitumoral. Leibovici e Stark (1985) observaram a ação antitumoral, ou seja, a atuação direta nas células tumorosas através de modificação na membrana da célula, aumentando assim a permeabilidade destas para agentes citotóxicos, e conseqüentemente a ação destes agentes. Diversos tumores diferem em sua sensibilidade a agentes quimioterapêuticos, e além disso, células do mesmo tumor podem, durante a progressão do mesmo, tornar-se resistentes a agentes citotóxicos aos quais eles foram sensíveis anteriormente. Assim, células do mesmo tumor são heterogêneas em relação a várias propriedades, incluindo a sensibilidade a drogas. A levana auxilia no tratamento de tumores, combinada a agentes citotóxicos, aumentando o efeito antitumoral. A resistência de células tumorosas deve-se à baixa permeabilidade das mesmas, sendo que é possível que este polissacarídeo possa aumentar a absorção de drogas antitumorais por estas células, melhorando a eficiência terapêutica das drogas.

Segundo Lima *et al.* (2000) além da inibição tumoral, observou-se o efeito da quimioterapia sobre o estado físico dos animais, onde não se constatou nenhuma alteração dos mesmos, no que diz respeito à perda de peso, queda de pelo, alterações na excreção de líquidos e na motilidade

Yamamoto *et al.* (1999) estudaram outra aplicação da levana a partir do grande interesse despertado pela capacidade das fibras de reduzir os níveis de colesterol e triglicerídeos na corrente sanguínea, e regular o trato intestinal em humanos e animais. A

não digestibilidade de oligômeros de frutose e outros sacarídeos por enzimas digestivas traz efeitos fisiológicos e bioquímicos semelhantes aos das fibras. Os frutoligosacarídeos estimulam o crescimento de bifidobactérias e melhoram a microflora intestinal pela produção de ácidos de baixo peso molecular, com efeitos fisiológicos benéficos para a saúde humana. São também reconhecidos por abaixarem o colesterol e os triglicerídeos da corrente sanguínea em ratos, muito embora estes resultados não tenham sido comprovados em humanos. A levana, sintetizada a partir da levanasacarase bacteriana, foi utilizada como agente hipocolesterolêmico em ratos. O estudo foi realizado com um grupo de ratos que cresceu sob dieta normal, considerado ratos de controle, e dois outros grupos alimentados com ração contendo variações na quantidade de levana, 1% e 5%, respectivamente. Pode-se observar que não houve diferença significativa entre eles no que diz respeito ao peso corporal, mas em relação ao nível de colesterol sanguíneo, os ratos alimentados com as dietas contendo levana apresentaram índices significativamente menores que os ratos de controle. Além disso, o nível de colesterol diminuiu com o aumento do conteúdo de levana na dieta, muito embora os níveis de triglicerídeos não tenham sido afetados pela dieta diferenciada. A digestibilidade da levana foi analisada *in vivo* e *in vitro*. A levana hidrolisada por suco gástrico artificial durante 60 minutos foi reduzida a uma levana de baixo peso molecular, com uma pequena quantidade de frutose e traços de glicose, sendo que não foram detectados frutoligosacarídeos. Para o processo *in vivo* os produtos da digestão foram medidos por retenção de tempo por HPLC, sendo então expressos como uma função do período de reação. A levana de alto peso molecular não foi hidrolisada depois de 60 minutos de exposição à saliva contendo amilase.

Além das aplicações mencionadas, a própria forma como foi primeiramente classificada a levana, ou seja, como um subproduto da fermentação para a produção de etanol, caracteriza também, não uma aplicação, mas um dos propósitos que levariam à maiores estudos das propriedades deste polissacarídeo, que é a questão econômica do aproveitamento de subproduto.

Ao passo que cresce o interesse pelo estudo da obtenção e funcionalidade da levana, a tendência é que cada vez mais, que novas aplicações lhe sejam atribuídas.

3. MATERIAL. E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Microrganismos

Foram testadas cepas de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, *Bacillus subtilis* CCT 0089 e *Erwinia herbicola* NRRL-1678, adquiridas na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”. Entretanto apenas cepas de *Zymomonas mobilis* mostraram-se viáveis após as primeiras corridas de fermentação.

3.1.2. Manutenção dos Microrganismos

Os microrganismos foram cultivados e mantidos em meio ágar RS conforme a Tabela 3.1. e incubados a 30°C por 24 horas. As culturas foram mantidas a 4°C e repicadas a cada 20 dias.

Tabela 3.1: Meio de Manutenção dos microrganismos *Erwinia herbicola*, e *Zymomonas mobilis*

Composto	Concentração (g/L)
Sacarose comercial	50,0
Extrato de Levedura	10,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,0
Ágar-Ágar	20,0

O açúcar refinado foi utilizado como fonte de sacarose e os outros reagentes são de pureza analítica.

3.1.3. Preparação do Inóculo

As cepas foram inoculadas no meio RS e incubadas a 30°C por 24 horas, desta cultura uma alíquota de 10% (v/v) foi transferida para o meio de fermentação.

3.1.4. Condições de Fermentação em Frascos de Erlenmeyers

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em frascos de erlenmeyers de 500mL por 16 horas a 30°C contendo 100mL do meio de fermentação.

Os microrganismos *Erwinia herbicola* e *Bacillus subtilis* foram incubados por 24h a 30°C nos meios descritos na Tabela 3.2 e 3.3, respectivamente. Desta cultura foi transferida uma alíquota de 10% (v/v) em relação ao volume final de cada ensaio.

Tabela 3.2: Meio de Fermentação para *Erwinia herbicola*

Composto	Concentração (g/L)
KCl	2,2
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	2,8
KH ₂ PO ₄	0,8
Extrato de Levedura	3,0
Sacarose	60,0

pH = 7,2

Tabela 3.3: Meio de Fermentação para *Bacillus subtilis*

Composto	Concentração (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
Extrato de Levedura	10,0
Sacarose	100,0

pH = 6,0

O meio de fermentação da *Zymomonas mobilis* continha, além de KH₂PO₄ 1,0g/L e MgSO₄ 7H₂O 0,5g/L, sacarose nas concentrações de 150 e 180g/L, extrato de levedura 5 e 10g/L e (NH₄)₂SO₄, nas concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0g/L.

3.1.5. Seleção de Mutantes da *Zymomonas mobilis*

Após crescimento da cultura, 10mL de inóculo foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos, e a massa celular tratada com NTG (N-metil N'nitro N'nitroso Guanidina) por 45 minutos a 30°C na concentração de 50 µg/mL.

As células foram lavadas repetidas vezes, e ressuspensas com água e com o próprio meio de fermentação, sendo então plaqueadas em meio ágar RS e cultivadas por 24 horas a 30°C.

As colônias distintas foram novamente plaqueadas e incubadas por 30°C durante 24 horas.

3.1.6. Condições de Fermentação em Fermentador de Bancada em Batelada

Utilizou-se um fermentador de bancada Bioflo III de 5L de volume total sendo 4L de volume útil, a fim de estudar a influência das condições de operação como aeração (OD - oxigênio dissolvido) e controle de pH, mantendo-se a velocidade de agitação constante em 200rpm.

O fermentador foi inoculado com 10% (v/v) de pré-inóculo e meio contendo (g/L): sacarose (180,0), extrato de levedura (5,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,2) e KH_2PO_4 (1,0). O pH inicial foi ajustado em 6,0, sendo monitorado no decorrer da fermentação. Amostras foram retiradas de hora em hora.

3.1.7. Condições de Fermentação em Fermentador de Bancada em Batelada Alimentada

No mesmo fermentador de bancada Bioflo III, foi realizada a fermentação em batelada-alimentada, com controle de pH, mantendo-se a velocidade de agitação constante em 200rpm. O fermentador, contendo 2L de volume inicial de meio (item 3.1.6.), foi inoculado com 10% (v/v) de inóculo preparado previamente, e suplementado com 2L de

meio contendo os sais e a sacarose. O pH inicial foi ajustado em 6,0 e monitorado durante o processo.

3.2. Métodos

3.2.1. Levana

O polissacarídeo foi quantificado no sobrenadante das amostras após a centrifugação a 4000rpm durante 20 minutos, para retirada das células, seguindo-se de precipitação pelo etanol 70%. A suspensão obtida foi novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sedimento de levana formado foi secado em estufa a vácuo a 65°C até peso constante, aproximadamente 24h.

3.2.2. Determinação de Etanol

Uma alíquota de 25mL de amostra fermentada foi tomada do reator e destilada por arraste em vapor, em um destilador de nitrogênio Tecnal Modelo TE 012. O destilado recolhido teve seu volume completado a 25mL.

A quantificação de etanol foi feita pelo método descrito por Salik e Povh (1993), que é precisa para soluções hidroalcoólicas até 20%. Este método baseia-se na reação de oxidação de etanol a ácido acético após reação com dicromato de potássio em meio ácido. Esta reação foi feita com o destilado obtido do sobrenadante. As leituras foram feitas em espectrofotômetros em comprimento de onda de 600nm. A curva padrão empregada nesse método encontra-se em anexo no item 7.11.

3.2.3. Atividade Enzimática

As amostras de sobrenadante obtidas conforme item 3.2.1. foram usadas como fonte da enzima extracelular.

A atividade enzimática foi determinada incubando-se a 30°C por 3 horas, 9mL de solução de sacarose 10% (p/v) dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,5 e 1mL de sobrenadante. A reação enzimática foi interrompida em banho de água em ebulição por 10 minutos.

A concentração de glicose foi determinada através do método da glicose oxidase/peroxidase (kit Bio Diagnóstica – Glicose Enz Color).

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

3.2.4. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática, o sistema foi constituído de 1mL do sobrenadante e 9mL de solução de sacarose a 10% em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH5,5. Os tubos de ensaio, contendo a mistura da reação, foram incubados a 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80°C durante 3 horas e a reação enzimática foi interrompida através da fervura em água por 10 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme o item 3.2.2.

3.2.5. Efeito do pH de Pré-incubação na Atividade Enzimática

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática da levanasacarase, a mistura reacional foi constituída de 1mL do sobrenadante e 1mL de solução tampão com sacarose a 10% a 30°C. Foram usados tampão citrato 0,05M (pH 4, 5 e 6,5) e tampão fosfato 0,05M (pH 8). Após 1 hora foram adicionados 9mL de solução de sacarose 10% (p/v) dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,5, incubando novamente a 30°C durante 3 horas. A reação enzimática foi interrompida através da fervura em água por 10 minutos e a atividade enzimática foi determinada conforme o item 3.2.2.

3.2.6. Efeito da Concentração de Sacarose na Atividade Enzimática

Para estudar o efeito da sacarose na atividade da levanasacarase, o sistema de reação foi constituído de 1mL do sobrenadante e 9mL de solução de sacarose em diferentes concentrações (10, 20, 25, 30 e 35%) dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,5, incubado a 50°C. A reação enzimática foi interrompida através da fervura em água por 10 minutos e a atividade enzimática foi determinada conforme o item 3.2.2.

3.2.7. Efeito do Açúcar Invertido na Atividade Enzimática

Para o estudo do efeito do açúcar invertido na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 1mL do sobrenadante e 9mL de solução de açúcar invertido incubados a 50°C por 3 horas. A reação enzimática foi interrompida através da fervura em água por 10 minutos e a atividade enzimática foi determinada conforme o item 3.2.2.

O açúcar invertido foi obtido através da incubação de 100mL de solução de sacarose (220g/L) com 10mL de solução de invertase a 30°C durante 3 horas.

A invertase foi produzida por autólise de 500g de fermento biológico ressuspendido em 300mL de solução 0,5M de Na_2CO_3 , incubado a 40°C por 24 horas, sendo logo após filtrado à vácuo.

3.2.8. Métodos Analíticos

3.2.8.1. Massa Celular Seca

A massa celular foi determinada centrifugando-se 10mL de cada amostra a 4000 rpm por 20 minutos. O precipitado de massa de células foi secado em estufa a vácuo a 65°C até peso constante, aproximadamente 24h.

3.2.8.2. Determinação de Açúcar

Açúcar Redutor Total (ART) e o Açúcar Redutor (AR) foram determinados na solução sobrenadante obtida conforme item 3.2.7.1. pelo Método de Somogy-Nelson (1952). Na determinação do ART, uma alíquota do sobrenadante foi hidrolisada com volume igual de HCl 1,0N, aquecida em banho de água em ebulição, por 15 minutos, resfriada e neutralizada com volume igual de NaOH 1,0N.

3.2.8.3. Análise de pH

O pH foi determinado através de leitura em potenciômetro.

3.2.8.4. Cromatografia em Papel

Em papel Whatman nº1 foram aplicados 1µL da solução de levana, previamente hidrolisada com HCl 0,1N, aquecida em banho de água em ebulição por 15 minutos, resfriada e neutralizada com NaOH 0,1N, e dos padrões de frutose e glicose a 10%. A cromatografia descendente em papel foi desenvolvida por 20 horas, utilizando-se como sistema de solvente acetato de etila, álcool isopropílico e água na proporção 6:3:1 (v/v). O cromatograma foi revelado com reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico, seguindo de aquecimento em estufa a 90°C.

Para determinação de polióis utilizou-se papel Whatman nº1, onde foram aplicados 10µL da solução de levana e dos padrões de frutose e glicose a 10%. O sistema de solvente utilizado foi acetato de etila-álcool isopropílico-água (6:3:1 v/v) durante 20 horas. Os açúcares foram detectados através de revelação com solução de nitrato de prata saturada, NaOH 0,5N alcoólico e tiosulfato de sódio 10%.

3.2.8.5. Determinação da Relação Carbono-Nitrogênio

A relação carbono-nitrogênio foi determinada pelo Método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

$$NT = \frac{(V - V_B) \cdot 14 \cdot N_{H_2SO_4}}{V_{amostra}} \left(\frac{g}{L} \right) \quad \text{eq.(3.1)}$$

V = volume de ácido gasto na titulação da amostra (mL)

V_B = volume de ácido gasto na titulação do branco (mL)

N = normalidade do ácido utilizado (N)

V_{amostra} = volume de amostra (mL)

NT = nitrogênio total (g/L)

3.2.9. Cálculos dos Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados na fase exponencial de crescimento celular de acordo com as equações descritas abaixo, através dos dados obtidos nos gráficos de concentração celular e do substrato em função do tempo.

3.2.9.1. Coeficientes de Rendimento

$$Y^{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} (\%) \quad \text{eq.(3.2)}$$

$$Y^{P/S} = \frac{(P_f - P_0)}{(S_0 - S_f)} (\%) \quad \text{eq.(3.3)}$$

$$P = \frac{(P_f - P_0)}{(t_f - t_0)} \left(\frac{g}{L \cdot h} \right) \quad \text{eq.(3.4)}$$

X₀ = massa celular seca (g/L)

X_f = massa celular seca final (g/L)

S₀ = concentração inicial de substrato (g/L)

S_f = concentração final de substrato (g/L)

P_0 = massa produto inicial (g/L)

P_f = massa de produto final (g/L)

t_0 = tempo inicial (h)

t_f = tempo (h)

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

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

P = produtividade

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fermentação utilizando *Bacillus subtilis* e *Erwinia herbicola*

A Tabela 4.1 mostra resultados de produção de levana por *Bacillus subtilis* CCT 0089, conforme item 3.4.1. do capítulo Material e Métodos, usando sacarose como fonte de carbono. Observa-se que após 24 horas de fermentação a produção de levana atingiu a concentração máxima de 1,47g/L. Euzenat *et al.* (1997) estudaram a produção de levana com *Bacillus subtilis* C4 e encontram em torno de 30% de levana após 8h de fermentação, a 37°C, com concentração inicial de sacarose de 1M. Esta diferença deve-se provavelmente a temperatura da fermentação, que foi de 30°C e à menor concentração de sacarose utilizada nas fermentações, pois pôde-se observar que o aumento da concentração inicial de sacarose de 50 para 100g/L levou a um aumento na concentração de levana, mantendo-se pH inalterado em ambas fermentações. Os parâmetros cinéticos da fermentação aumentaram, sendo que o aumento de 100% na concentração inicial de sacarose gerou um aumento de 200% na produtividade. No entanto o coeficiente de conversão em massa celular diminuiu significativamente.

Tabela 4.1: Resultados utilizando o *Bacillus subtilis* CCT 0089 com 50 e 100g/L de sacarose após 24h de fermentação.

Parâmetros	Sacarose (g/L)	
	50	100
pH final	5,27	5,25
MS (g/L)	7,53	1,90
ART (g/L)	4,93	5,16
AR (g/L)	1,32	1,44
Levana (g/L)	0,41	1,47
$Y_{P/S}$	0,01	0,02
$Y_{X/S}$	0,17	0,02
P (g/L.h)	0,03	0,09

MS: Massa Celular Seca; ART: Açúcares Redutores Totais; AR: Açúcares Redutores; $Y_{P/S}$: Rendimento do Produto; $Y_{X/S}$: Rendimento Celular; P: Produtividade

Nos testes realizados com a *Erwinia herbicola* NRRL-1678, conforme o item 3.4.1. do capítulo Material e Métodos, não foram observados crescimento do microrganismo, entretanto Avigad (1965) produziu de 1,3 a 1,5% (p/v) de levana a partir da fermentação de *Erwinia herbicola*, onde a turbidez e viscosidade do meio fermentado caracterizaram o crescimento do microrganismo e a produção da levana.

4.2. Seleção de Mutantes para a Fermentação

A cepa de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 foi tratada com NTG (N-metil N'nitro N'nitroso Guanidina) para obtenção de mutantes. A literatura descreve a obtenção de mutantes de *Zymomonas mobilis* pelo tratamento com NTG seguindo-se de lavagem das células com água ou meio de cultura (A, M).

Assim, foram feitos tratamentos da cepa natural com NTG e lavagem das células com água ou meio de cultura, conforme item 3.1.5 do capítulo Material e Métodos, o que permitiu obter duas colônias distintas, uma opaca e outra translúcida, com consistência e produção de levanas diferentes, como mostra a Tabela 4.2. O mutante da cultura cujas células foram lavadas com água foi denominado ZA e o outro ZM. A maior produção de levana deu-se em 24h de fermentação, sendo que o mutante ZA produziu cerca de 64% mais levana que o mutante ZM. Porém, para tempos maiores de fermentação, a concentração de levana no meio de cultura diminuiu para ambos mutantes.

O mutante ZA produziu mais levana em relação ao mutante ZM. Na Tabela 4.3 pode-se observar que a produção de levana pela cepa natural tem o metabolismo acelerado e o pico de produção de levana dá-se em torno de 10h de fermentação, enquanto que a fermentação da sacarose pelo mutante ZA é mais lenta, atingindo a produção máxima em 24h de fermentação, produzindo, no entanto, em torno de 97% mais levana que a cepa CCT 4494.

Tabela 4.2: Comparação dos mutantes de *Zymomonas mobilis* ZA e ZM, quanto a produção de levana em concentração de sacarose de 180g/L em diferentes tempos de fermentação (16, 24 e 48h).

Parâmetros	Tempo (h)					
	16		24		48	
	ZM	ZA	ZM	ZA	ZM	ZA
PH	4,54	3,51	3,70	3,66	3,60	3,54
MS (g/L)	4,66	5,17	5,67	4,42	5,95	5,20
ART (g/L)	145,51	100,21	108,58	83,46	87,16	82,48
AR (g/L)	32,42	16,00	10,75	7,55	5,170	6,57
Levana (g/L)	10,24	20,66	26,12	42,76	21,30	12,82
$Y_{P/S}$	0,30	0,26	0,37	0,44	0,23	0,13
$Y_{X/S}$	0,14	0,06	0,08	0,05	0,06	0,05
Y (%)	5,69	11,47	14,51	23,76	11,83	7,12
P (g/L.h)	0,64	1,29	1,08	1,78	0,44	0,27

MS: Massa Celular Seca; ART: Açúcares Redutores Totais; AR: Açúcares Redutores; $Y_{P/S}$: Rendimento do Produto; $Y_{X/S}$: Rendimento Celular; P: Produtividade

Tabela 4.3: Comparação da cepa mutante ZA com a cepa de *Zymomonas mobilis* natural (CCT 4494) quanto a produção de levana em concentração de sacarose em 180g/L em diferentes tempos de fermentação (4, 8, 10 e 24h).

Parâmetros	Tempo (h)							
	4		8		10		24	
	4494	ZA	4494	ZA	4494	ZA	4494	ZA
MS (g/L)	4,75	6,23	6,45	7,49	4,55	5,32	4,45	4,55
ART (g/L)	135,90	135,66	106,40	111,04	86,91	98,73	30,04	38,16
AR (g/L)	8,10	7,80	53,00	12,74	57,18	15,68	5,11	6,98
Levana (g/L)	9,40	10,74	20,52	20,10	23,02	18,34	15,34	30,18
$Y_{P/S}$	0,28	0,24	0,28	0,29	0,25	0,23	0,10	0,21
$Y_{X/S}$	0,11	0,14	0,09	0,11	0,05	0,06	0,03	0,03
Y (%)	6,68	5,97	11,40	11,17	12,79	10,19	8,52	16,77
P (g/L.h)	2,35	2,69	2,57	2,51	2,03	1,83	0,64	1,25

MS: Massa Celular Seca; ART: Açúcares Redutores Totais; AR: Açúcares Redutores; $Y_{P/S}$: Rendimento do Produto; $Y_{X/S}$: Rendimento Celular; P: Produtividade

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) produziram levana e etanol com cepas de *Zymomonas mobilis* B4286 e dois mutantes (ZML1 e ZML2) obtidos através do tratamento com NTG, que produziram a concentração máxima de levana de 21,6 e 20g/L, respectivamente, em 24 horas de fermentação a 30°C com 150g/L de sacarose, enquanto que a cepa natural produziu somente 16g/L de levana, valor semelhante ao produzido em 16 horas de fermentação pelos mutantes, respectivamente, 18,2 e 16,6g/L. Em estudos realizados com mutantes e cepas naturais, observou-se que estas possuem taxas de hidrólise

de sacarose semelhantes, entretanto os mutantes produzem maiores concentrações de levana.

Pode-se observar que nas condições empregadas, o mutante ZA apresentou a melhor capacidade de utilizar a sacarose, sendo selecionado para os estudos da fermentação em fermentador de bancada.

4.3. Efeito da Concentração de Sacarose na Produção de Levana pelo Mutante Selecionado

Nas Tabelas 4.4 e 4.5 são apresentados os resultados do efeito da variação da concentração inicial de sacarose na concentração de açúcares redutores, açúcares redutores totais, concentração final de massa celular seca, concentração e rendimento de levana. A fermentação foi de 16h a 30°C e o pH inicial ajustado em 6,5.

Tabela 4.4: Efeito da variação da concentração inicial de sacarose na produção de levana pelo mutante ZA (*Zymomonas mobilis*). Fermentação por 16h a 30°C e pH inicial 6,5.

Parâmetros	Concentração de Sacarose (g/L)			
	50	100	150	180
PH	4,28	4,30	3,69	3,45
MS (g/L)	1,04	1,73	3,61	4,64
ART (g/L)	36,13	56,50	52,21	57,13
AR (g/L)	1,16	16,33	19,38	23,31
Levana (g/L)	4,36	8,04	19,02	22,02
$Y_{P/S}$	0,31	0,18	0,19	0,18
$Y_{X/S}$	0,07	0,04	0,04	0,04
Y (%)	8,72	8,04	12,68	12,23
P (g/L.h)	0,27	0,50	1,19	1,38

MS: Massa Celular Seca; ART: Açúcares Redutores Totais; AR: Açúcares Redutores; $Y_{P/S}$: Rendimento do Produto; $Y_{X/S}$: Rendimento Celular; P: Produtividade

Foram feitos testes preliminares como finalidade observar o comportamento do microrganismo mutante ZA perante a variação na concentração inicial de sacarose, em 50 e 150g/L. A partir dos resultados encontrados nestes testes preliminares, fez-se ensaios com concentração inicial de sacarose (50, 100, 150 e 180g/L) e observou-se que nestas

fermentações que a concentração final de massa celular seca e de levana aumentaram, quando houve aumento da concentração inicial do substrato.

O microrganismo mutante ZA suportou a variação na concentração de sacarose, levando então, a uma modificação na composição do meio inicial, variando além da concentração de sacarose, a de extrato de levedura e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

A Tabela 4.5 mostra os resultados obtidos sobre a formação de levana e consumo de açúcar em 16 horas de fermentação, quando se variou a concentração de sacarose, extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Estes resultados mostram que com a concentração de sacarose de 150g/L e extrato de levedura de 5g/L, houve redução da concentração de levana produzida. Com o aumento da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verificou-se comportamento oposto ao que ocorreu quando se utilizou 10g/L de extrato de levedura, mostrando que a produção de levana é influenciada não só pela relação carbono/nitrogênio, mas também pela relação nitrogênio orgânico/inorgânico, cabendo lembrar ainda que a porcentagem de nitrogênio no extrato de levedura era 10%.

A concentração média de levana produzida com a concentração de sacarose de 180g/L foi pouco maior em comparação à média obtida com 150g/L de sacarose, não sendo observado o mesmo comportamento em relação à concentração de extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, entretanto foram observados picos de concentração de levana quando se utilizou 5 ou 10g/L de extrato de levedura e 0,2 ou 0,6g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente, e concentração de sacarose de 180g/L.

Diante dos resultados obtidos com a modificação na composição do meio, pode-se observar na Tabela 4.5 que a melhor relação carbono-nitrogênio é 145,36, sendo o segundo maior valor dentre os estudados, confirmando a necessidade de nitrogênio no meio de fermentação, porém em pequena quantidade, evitando assim a influência negativa deste na produção de levana.

O efeito da concentração de extrato de levedura adicionado ao meio foi estudado por Ju *et al.* (1983) que encontraram 10g/L como sendo a concentração ótima. No entanto, Cromie e Doelle (1980) mostraram que elevadas concentrações de extrato de levedura aumentam a produção de massa celular, mas não necessariamente a produtividade.

Tabela 4.5: Variação da concentração inicial de sacarose, extrato de levedura e sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Fermentação de 16h a 30°C e pH inicial de 6,5.

Sacarose (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Relação C/N	pH	MS (g/L)	ART (g/L)	AR (g/L)	Levana (g/L)
150	5	0,0	126,32	4,07	8,63	50,23	16,50	22,78
		0,2	116,53	4,00	7,15	120,27	26,88	21,08
		0,4	108,15	4,07	6,05	96,51	27,21	18,32
		0,6	100,73	3,82	6,90	75,22	23,35	20,74
		0,8	94,27	4,00	5,77	91,59	27,49	18,68
		1,0	88,70	3,32	7,47	53,43	9,19	19,82
150	10	0,0	63,16	4,54	8,32	27,21	3,94	13,20
		0,2	60,61	4,54	8,49	66,72	15,63	16,14
		0,4	58,26	4,47	6,95	67,46	17,40	15,80
		0,6	56,04	4,45	7,40	64,38	19,24	17,26
		0,8	53,98	4,35	8,93	42,10	7,10	18,40
		1,0	52,11	3,72	7,97	65,00	10,75	21,36
180	5	0,0	151,58	3,76	8,96	85,93	27,70	27,30
		0,2	145,36	3,51	7,08	94,67	27,41	30,32
		0,4	129,77	3,35	8,18	98,11	16,50	23,12
		0,6	120,82	3,39	8,46	102,05	13,30	20,06
		0,8	113,17	3,39	8,38	96,51	12,43	19,24
		1,0	106,43	3,36	8,92	70,05	11,16	25,38
180	10	0,0	75,78	4,03	9,81	51,58	13,95	21,60
		0,2	72,73	4,18	10,58	148,34	29,38	18,30
		0,4	69,91	3,84	9,94	111,41	33,28	26,94
		0,6	67,25	3,71	9,32	83,22	20,43	27,14
		0,8	64,78	3,62	9,61	63,52	19,45	24,12
		1,0	62,53	3,58	8,93	50,23	7,14	25,02

MS: Massa Celular Seca; ART: Açúcares Redutores Totais; AR: Açúcares Redutores

Vinhas *et al.* (2000) estudaram a produção de levana por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 em duas diferentes concentrações de sacarose inicial (200 e 250g/L) e observaram que o consumo de sacarose foi praticamente o mesmo nas duas concentrações, no entanto verificaram aumento na concentração celular e diminuição na produção de levana para a concentração inicial de sacarose de 250 g/L. Viikari e Linko (1986) variaram a

concentração inicial de sacarose (50, 100, 150 e 200g/L) e obtiveram a máxima formação de levana com 150g/L de sacarose inicial para a cepa de *Zymomonas mobilis* estudada.

Com o desenvolvimento da fermentação o pH cai para um valor entre 3,8 a 4,5, o que representa a formação de ácidos e a tolerância do microrganismo a pH baixos. Os menores pH encontram-se nas maiores concentrações de sacarose e, conseqüentemente, maior produção de levana.

4.4. Atividade Enzimática da Levanasacarse

4.4.1. Efeito do pH de Pré-incubação na Estabilidade e Atividade da Enzima

Para estudar a estabilidade da levanasacarase em relação ao pH de pré-incubação, alíquotas de sobrenadante tiveram o pH ajustado em 4,0; 5,5; 6,0 e 8,0 e incubadas por 1 hora. Logo após as amostras foram incubadas no pH ótimo da enzima (5,5) por 1, 2 e 3 horas, e determinou-se a atividade.

A Figura 4.1 mostra as curvas de estabilidade da levanasacarase pré-incubada nos diferentes pH. A atividade enzimática cai gradualmente com o aumento do pH de pré-incubação e do tempo de reação. A maior atividade da enzima foi de 0,65 U/mL e se deu em pH de pré-incubação de 4,0 em 1 hora de reação, e a menor (0,35 U/mL) foi em pH 8 em 2 horas de reação.

Em relação ao pH, dados encontrados na literatura referem-se ao pH ótimo da enzima e não ao pH ótimo de pré-incubação. O pH ótimo da enzima de cepas de *Zymomonas mobilis* NRRL B-806, conforme Park *et al.* (1983) está entre 4,7 e 5,6. Preziosi *et al.* (1989) encontraram para a cepa ZM4 (ATCC 31821) o melhor pH igual a 5,5, apresentando uma atividade de 0,83U/mL. Quando a enzima é pré-incubada em um pH diferente do seu pH ótimo, há um deslocamento da atividade enzimática máxima, provavelmente resultado de uma formação iônica imprópria da enzima e/ou do substrato, o

que pode explicar a diferença entre o pH ótimo encontrado na literatura e o pH ótimo de pré-incubação da *Zymomonas mobilis* mutante.

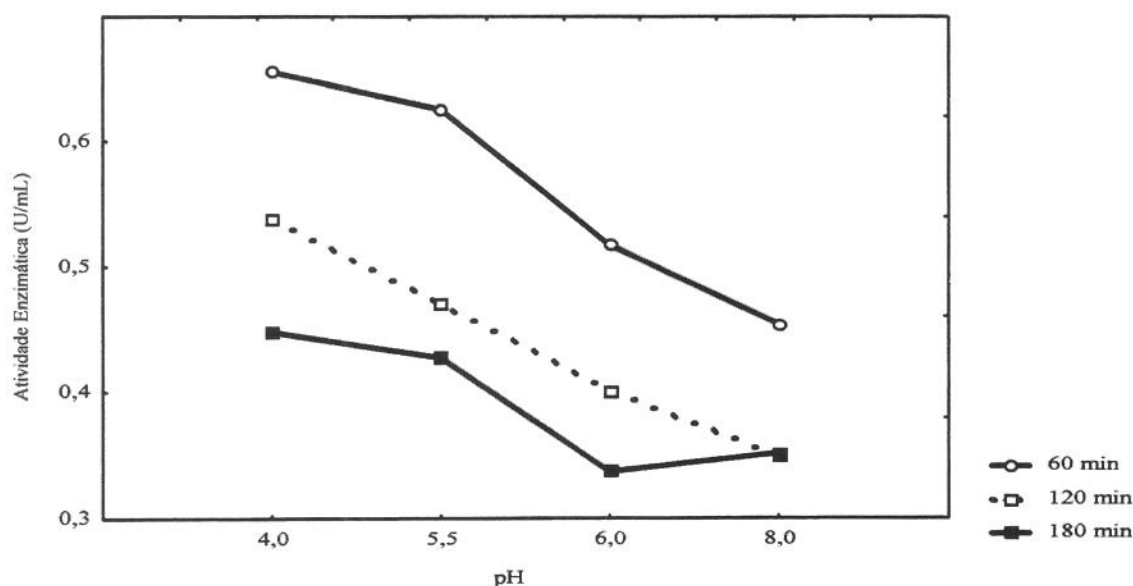


Figura 4.1: Atividade de levanasacarase em função do pH de pré-incubação por 1h a 30°C.

4.4.2. Efeito da Temperatura na Atividade da Enzima

Com o intuito de determinar se a levanasacarase é termolábil, o extrato enzimático foi submetido a diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80°C por diferentes tempos de pré-incubação (1, 2 e 3 horas).

Os resultados desta investigação estão mostrados na Figura 4.2, em que a maior atividade observada da enzima ocorreu a 50°C, assim como encontrado por Park *et al.* (1983). Depois de aquecimento a 35, 45 e 50°C por 12 horas, a atividade relativa caiu para 90, 82 e 61%, respectivamente. Crittenden e Doelle (1994) determinaram, para a mesma enzima, a temperatura de 45°C como sendo a que apresentou a maior porcentagem de atividade enzimática, sendo que a 55°C a atividade caiu para 25%, enquanto que o mutante ZA nesta mesma temperatura possui 57% da atividade inicial.

Quanto ao tempo de reação, observa-se que a atividade enzimática diminui com o tempo de reação, ou porque a enzima perdeu a atividade ou porque foi inibida por produtos de reação.

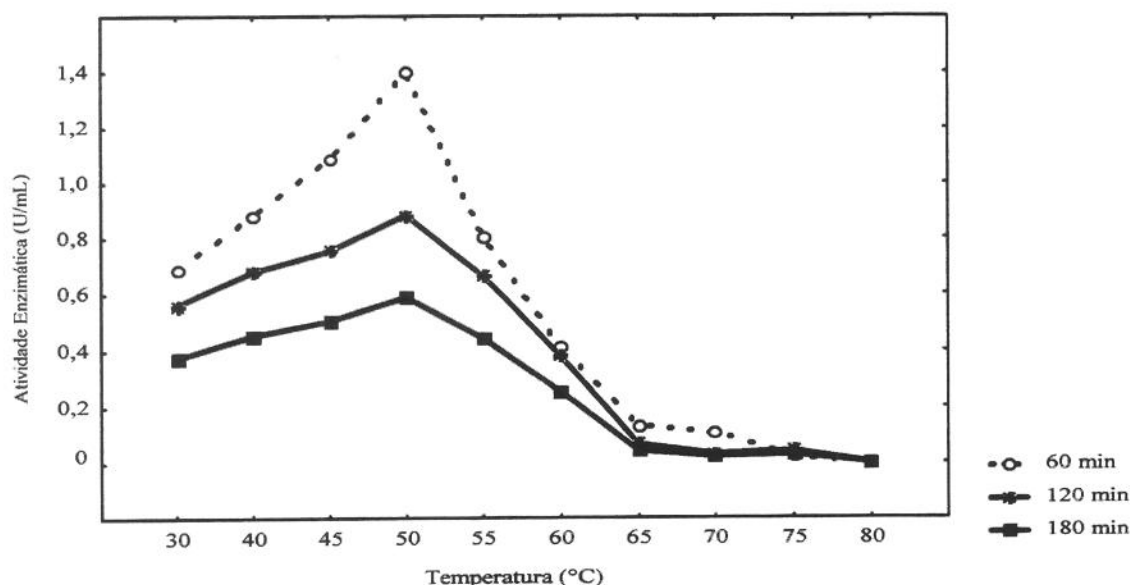


Figura 4.2: Efeito da temperatura de pré-incubação na atividade enzimática

4.4.3. Efeito da Concentração de Sacarose na Atividade da Enzima

O efeito da concentração de sacarose na atividade enzimática foi estudado em diferentes tempos de reação (30 a 180 min) a 30°C. Na Figura 4.3 pode-se observar que a concentração inicial de sacarose influencia na atividade enzimática da levansacarase, pois resultados demonstram que o aumento desta concentração gera um aumento na atividade. Crittenden e Doelle (1994) também estudaram esta influência de levansacarase de *Zymomonas mobilis* ATCC 39676, porém a 25°C, variando a concentração de 68,4 a 273,6g/L e exibiram curva típica hiperbólica demonstrando que a atividade aumenta com o aumento da concentração de substrato.

No item 4.3 mostrou-se o resultado da influência da concentração inicial de sacarose no meio de fermentação com o intuito de produzir levana e foi observado que concentrações superiores a 250g/L inibiram sua produção. Da mesma forma, Crittenden e Doelle (1994) estudaram a influência desta concentração na atividade da levansacarase, levando em consideração a produção de levana, e concluíram que há um pico de atividade

para a formação do produto em 85,5g/L de sacarose, e que a partir desta concentração houve inibição da atividade enzimática pelo substrato. Desta forma pode-se dizer que o aumento da concentração inicial de sacarose aumenta a atividade enzimática, no entanto inibe a formação de levana.

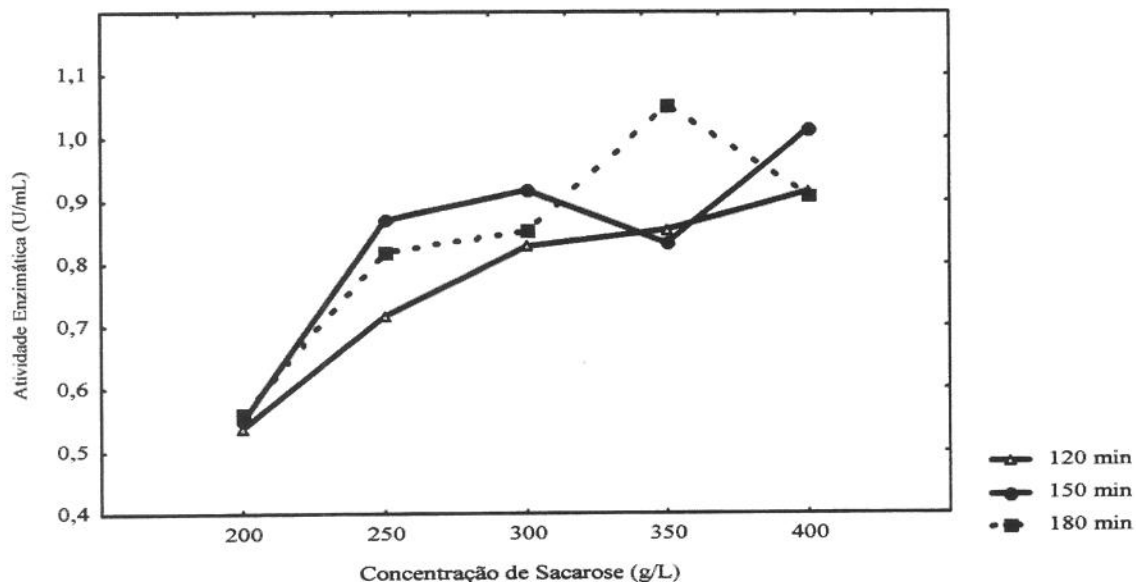


Figura 4.3: Efeito da concentração inicial de sacarose na atividade da levansacarase em diferentes tempos de reação.

4.5. Fermentação em Fermentador de Bancada

Foi utilizado um fermentador de bancada de 5L (Bioflo III), no qual foram testados os processos descontínuo e descontínuo alimentado, nas condições ótimas de fermentação obtidas dos estudos anteriores. Os ensaios foram realizados utilizando sacarose (180g/L) esterilizada. A agitação do meio fermentativo foi de 200rpm, temperatura de 30°C, sem e com controle de pH, sendo este controlado em 4,5 e 5,5. O oxigênio dissolvido também foi testado, numa vazão de 2VVM. As amostras utilizadas nas análises foram retiradas inicialmente a cada duas horas, e posteriormente a cada hora.

4.5.1. Efeito do Controle de pH

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram a concentração de levana formada e açúcar redutor (AR) liberado durante a fermentação, sem e com o controle de pH. Observa-se que a máxima quantidade de levana formada (30,98g/L) foi obtida sem o controle de pH após 14 horas de fermentação e que, nos ensaios com controle de pH a produção de levana manteve-se inferior e constante durante toda a fermentação. As máximas quantidades de AR foram 98,73g/L, para os ensaios sem controle, e 108,66 e 95,86g/L nos ensaios com controle de pH em 5,5 e 4,5, respectivamente, representando, sem o controle de pH, cerca de 10% menos de AR liberado em 10 horas.

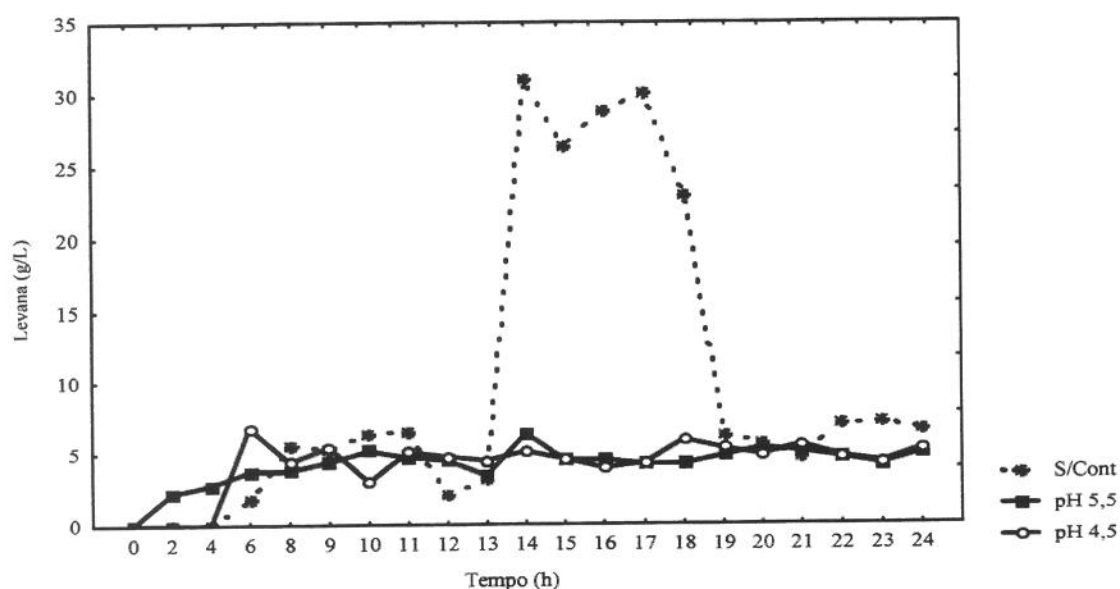


Figura 4.4: Produção de levana nos ensaios sem e com e controle de pH em 5,5 e 4,5.

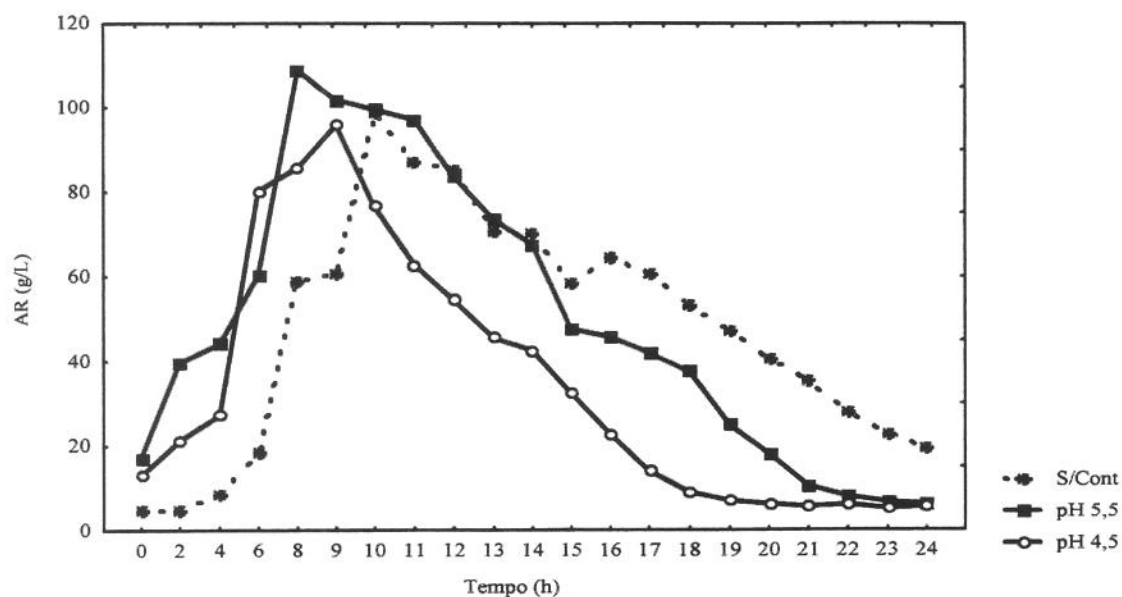


Figura 4.5: Açúcares Redutores (AR) liberados no meio de fermentação durante a fermentação sem e com controle de pH em 5,5 e 4,5.

A Figura 4.6 mostra o perfil do pH no decorrer da fermentação com e sem controle de pH. Nas fermentações sem controle de pH, esse valor sofreu uma queda gradual atingindo o valor 3,79 em 17 horas de fermentação, porém em 14 horas o valor já estava em 3,85, quando ocorreu a maior produção de levana.

Nas fermentações com controle de pH, estes foram mantidos em 4,5 e 5,5 pela adição de NaOH. Os resultados confirmam que o pH é um fator importante na produção de levana, pois o pH inicial elevado reprime a produção de levana pela enzima, conforme estudos de Lyness e Doelle (1983).

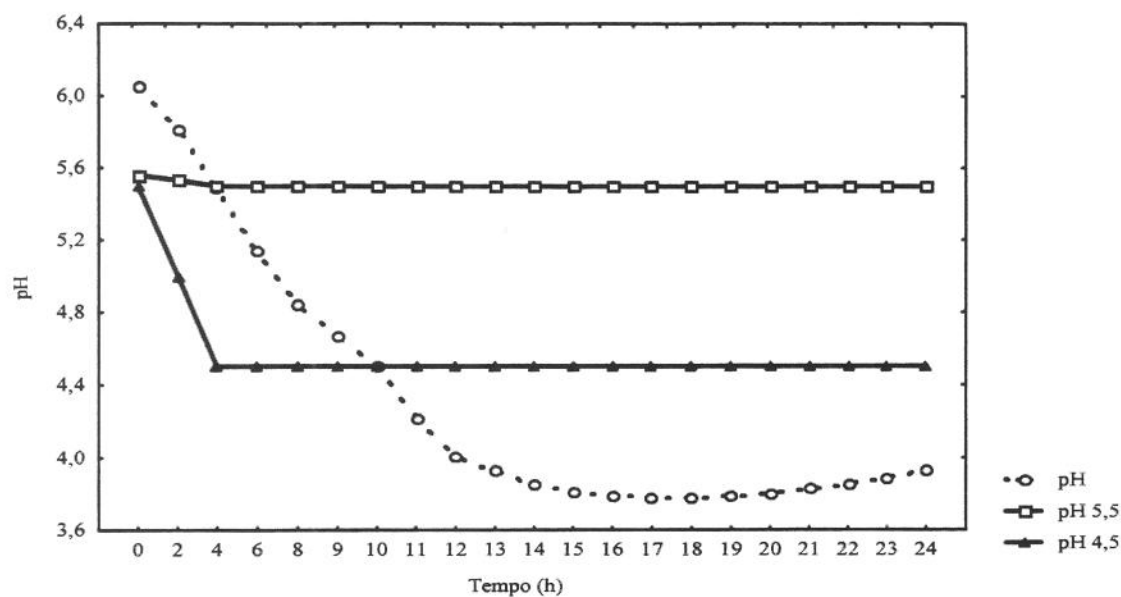


Figura 4.6: pH das fermentações pelo mutante ZA de *Zymomonas mobilis*.

4.5.2. Efeito do Oxigênio Dissolvido

O mutante ZA pode ser considerado uma cepa boa produtora de levana, mas a transferência de escala de frascos agitados para fermentador de bancada reduziu a produção de levana, cujo pico de produção ocorreu em 13h de fermentação, conforme Figura 4.7. Na Figura 4.8 observa-se que pela ação de invertase extracelular a concentração de açúcares redutores no meio de cultura, sem aeração, aumentou após a quarta hora de fermentação, o que induziu a produção de levanasacarase com a conseqüente formação de levana e após a décima hora a queda gradativa do AR liberado. Com aeração do meio de cultura, a produção de levana foi significativamente mais baixa e a concentração de açúcares redutores liberados aumentou no decorrer da fermentação. Desta forma pode-se dizer que houve a hidrólise da sacarose, porém a não houve a polimerização de frutose (Figura 4.7), mostrando que o mutante, assim como a cepa natural, é aerotolerante.

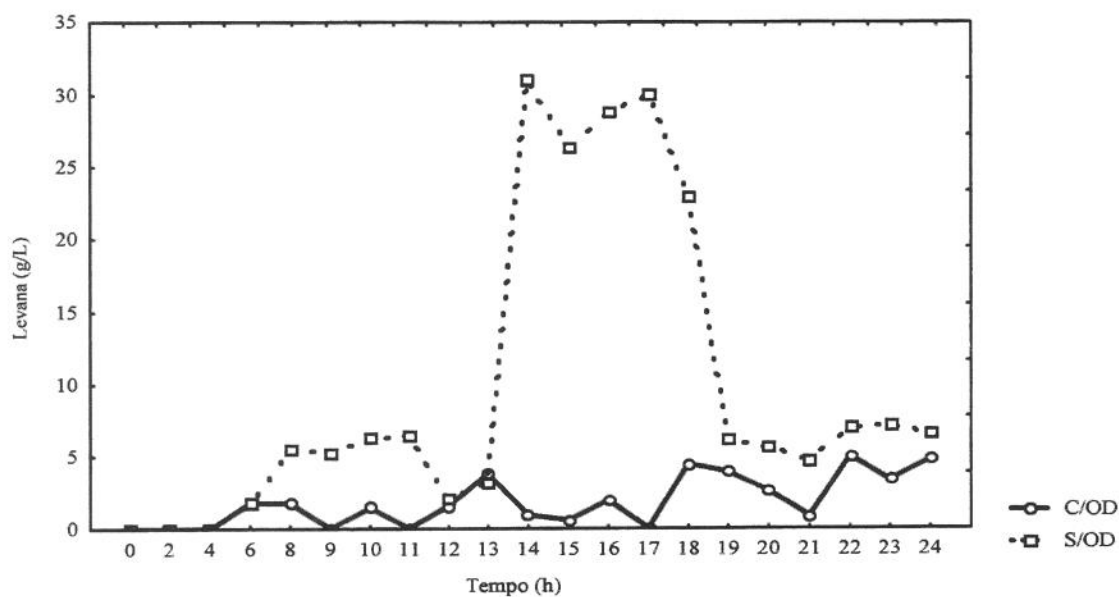


Figura 4.7: Produção de levana pelo mutante ZA de *Zymomonas mobilis* com e sem a adição de oxigênio dissolvido.

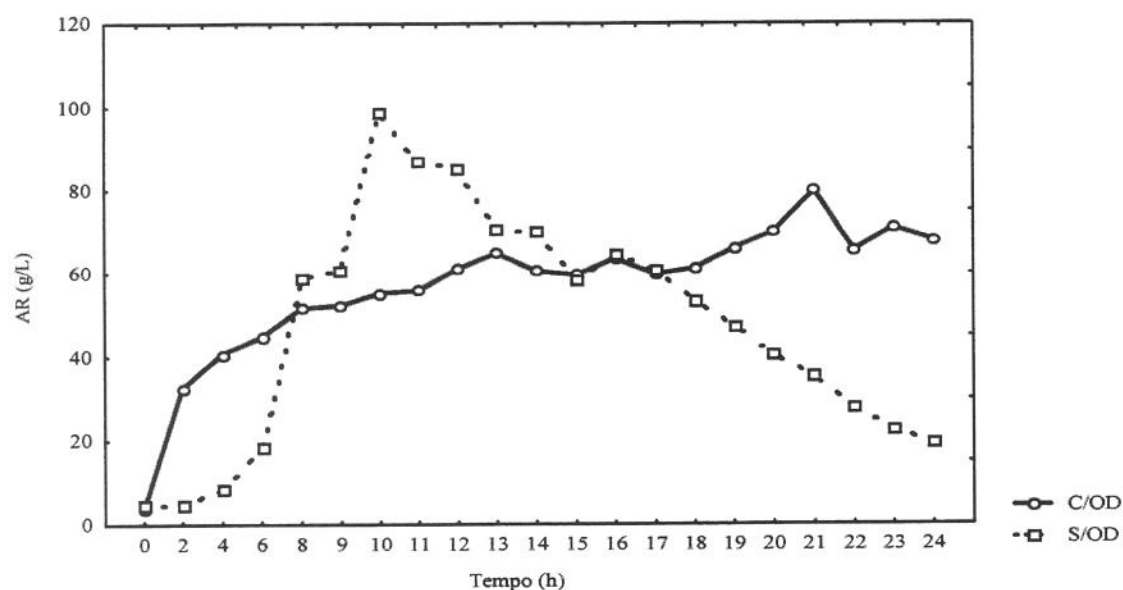


Figura 4.8: Açúcares Redutores (AR) liberados durante a fermentação de sacarose pelo mutante ZA de *Zymomonas mobilis* com e sem a adição de oxigênio dissolvido.

A Figura 4.9 refere-se ao pH no decorrer das fermentações com e sem aeração. As curvas possuem um perfil semelhante, porém com a adição de oxigênio a queda foi mais acentuada, chegando ao valor de 3,28. Este fato pode ser um indício de que o metabolismo

do microrganismo, devido a adição de oxigênio pode estar levando à produção de outros compostos, como por exemplo o ácido glucônico.

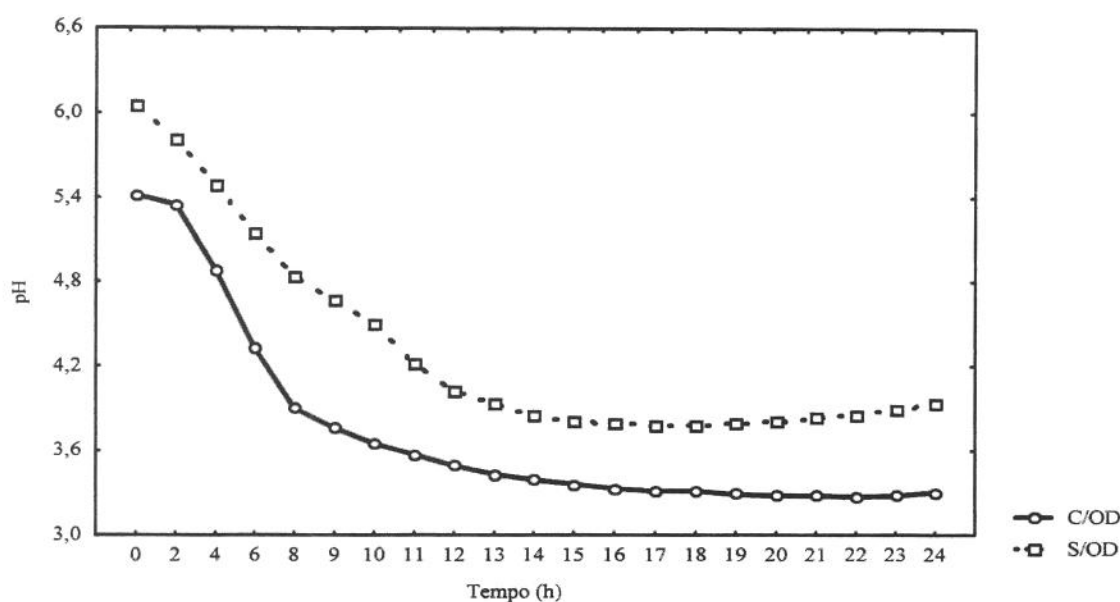


Figura 4.9: Perfil de pH no decorrer das fermentações de sacarose com e sem adição de oxigênio dissolvido.

4.5.3. Atividade Enzimática

A atividade enzimática da fermentação foi determinada ponto a ponto no decorrer da fermentação. Em 6 horas foi atingido a maior atividade da levanasacarase (0,16U/mL), como pode ser observado na Figura 4.10, valor inferior aos encontrados nos testes de atividade enzimática, que chegou a atingir, na temperatura ótima de reação, atividade de 1,4U/mL. Após este tempo (6 horas) a atividade caiu gradativamente ao longo da fermentação, devido talvez à influência do etanol na atividade enzimática, pois segundo Lyness e Doelle (1983) a concentração de 73,6g/L de etanol pode inibir completamente a atividade da levanasacarase. A concentração de etanol foi determinada e discutida no item 4.7.

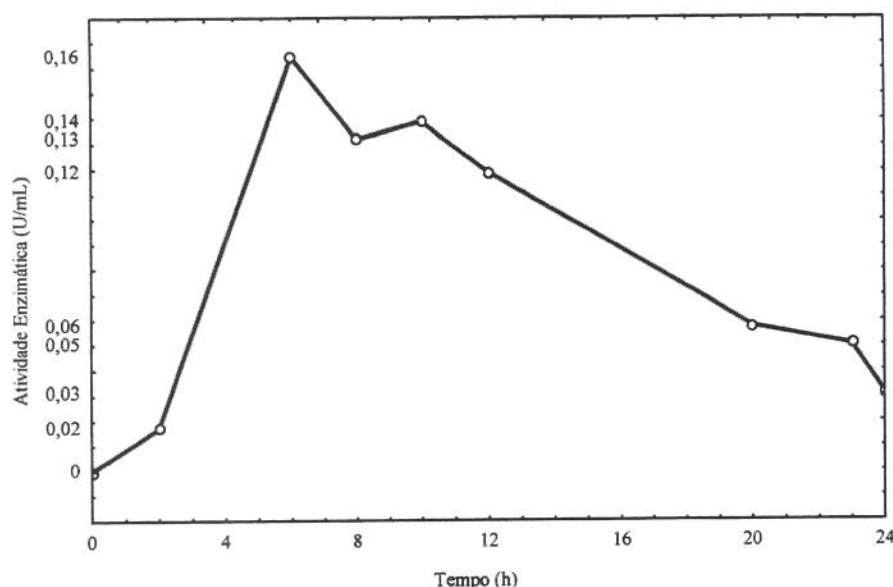


Figura 4.10: Atividade Enzimática da levansacarase (U/mL) no decorrer da fermentação a 30°C e sem controle de pH.

O maior coeficiente de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi atingido em 13 horas de fermentação assim como a maior produtividade (2,09g/L.h), podendo ser visualizado na Tabela 4.6, o que demonstra que esta atividade está diretamente relacionada com a hidrólise da sacarose. Preziosi *et al.* (1989) encontraram 1,35U/mL para a sacarase da *Zymomonas mobilis* em 12 horas de fermentação, caindo para 1,1U/mL em 24 horas de fermentação e associaram a atividade da enzima ao crescimento do microrganismo.

Tabela 4.6: Parâmetros cinéticos da fermentação em batelada a 30°C e pH inicial 6,5.

Parâmetros	Tempo de Fermentação (h)				
	6	10	13	20	24
pH	4,19	3,48	3,46	3,74	3,71
MS (g/L)	3,27	3,97	3,27	3,30	3,43
ART (g/L)	159,78	121,59	83,40	26,58	23,83
AR (g/L)	93,38	117,21	59,67	3,67	4,38
Levana (g/L)	1,64	2,14	27,17	3,99	4,17
$Y_{P/S}$	0,08	0,04	0,28	0,03	0,03
P (g/L.h)	0,27	0,21	2,09	0,20	0,17
At. Enzimática (U/ML)	0,16	0,14	0,07	0,06	0,03

MS: Massa Celular Seca; ART: Açúcares Redutores Totais; AR: Açúcares Redutores; $Y_{P/S}$: Rendimento do Produto; P: Produtividade

4.5.4. Fermentação em batelada alimentada

Foi estudada a cinética da fermentação em processo de batelada alimentada. A fermentação foi conduzida sem controle de pH e a 30°C, a fim de avaliar o consumo de sacarose, açúcares redutores liberados, produção de levana, perfil do pH e atividade enzimática de levanasacarase. Para fins de comparação foram incluídos nas figuras os resultados dos ensaios da fermentação em batelada.

Na Figura 4.11 está mostrada a produção de levana no decorrer da fermentação batelada alimentada. A maior produção de levana foi 7,12g/L em 6 horas de fermentação, sendo que a alimentação foi feita após 8 horas. Houve uma queda na produção de levana após as 10 horas, continuando gradativamente até o final da fermentação. A massa celular obtida no processo batelada alimentada é superior aquela obtida em batelada convencional, mas o rendimento em levana é inferior. O processo batelada alimentada favorece o crescimento celular, diminuindo o rendimento de levana quando comparado com batelada convencional.

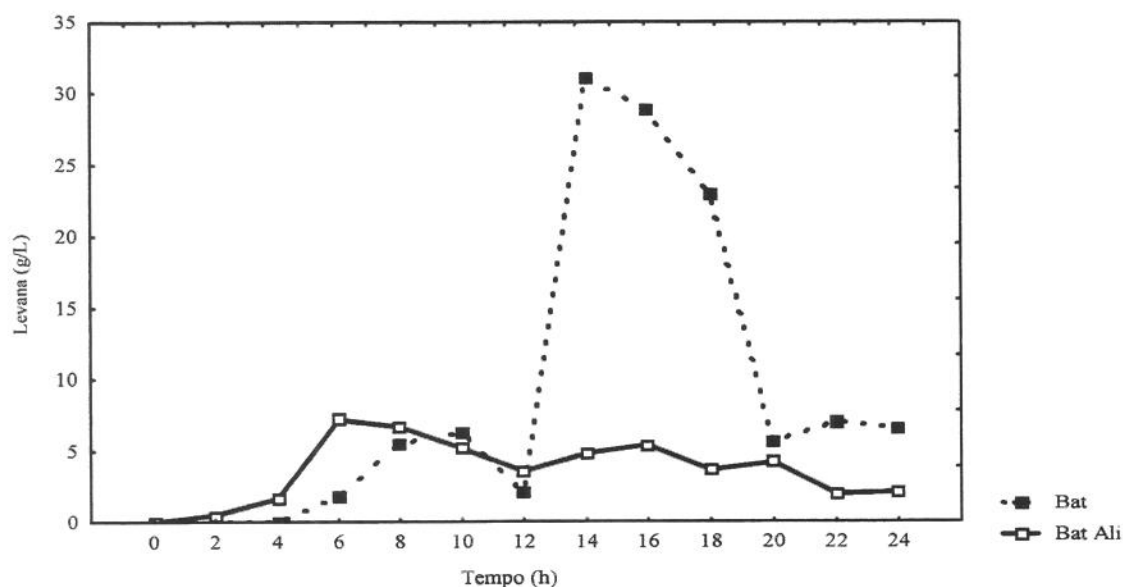


Figura 4.11: Produção de levana pelo mutante ZA de *Zymomonas mobilis* no decorrer das fermentações em batelada e batelada alimentada.

As Figuras 4.12 e 4.13 representam o acompanhamento da fermentação quanto aos açúcares liberados e o perfil de pH, respectivamente. No processo batelada alimentada o teor máximo de açúcares redutores liberados foi de aproximadamente 45% do máximo liberado no processo batelada ao final do tempo de enchimento (14 horas). Este fato novamente indica que a velocidade de adição de açúcar foi maior que a sua velocidade de consumo, fazendo com que a fase da fermentação pós-enchimento fosse mais longa do que a do enchimento.

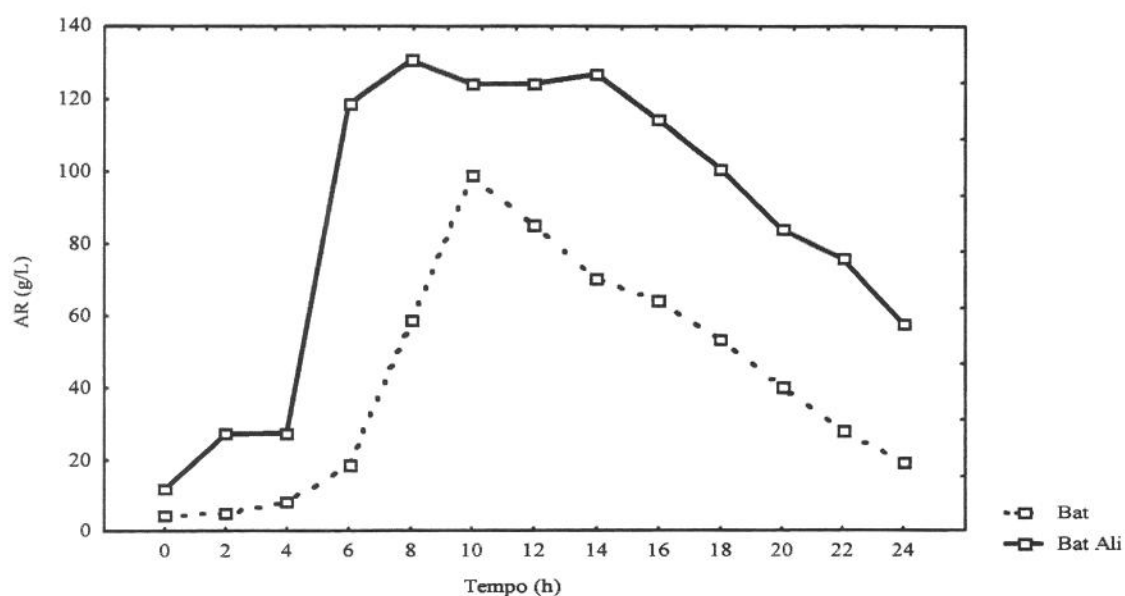


Figura 4.12: Açúcares redutores liberados no decorrer da fermentação de sacarose pelo mutante ZA de *Zymomonas mobilis* em batelada e batelada alimentada.

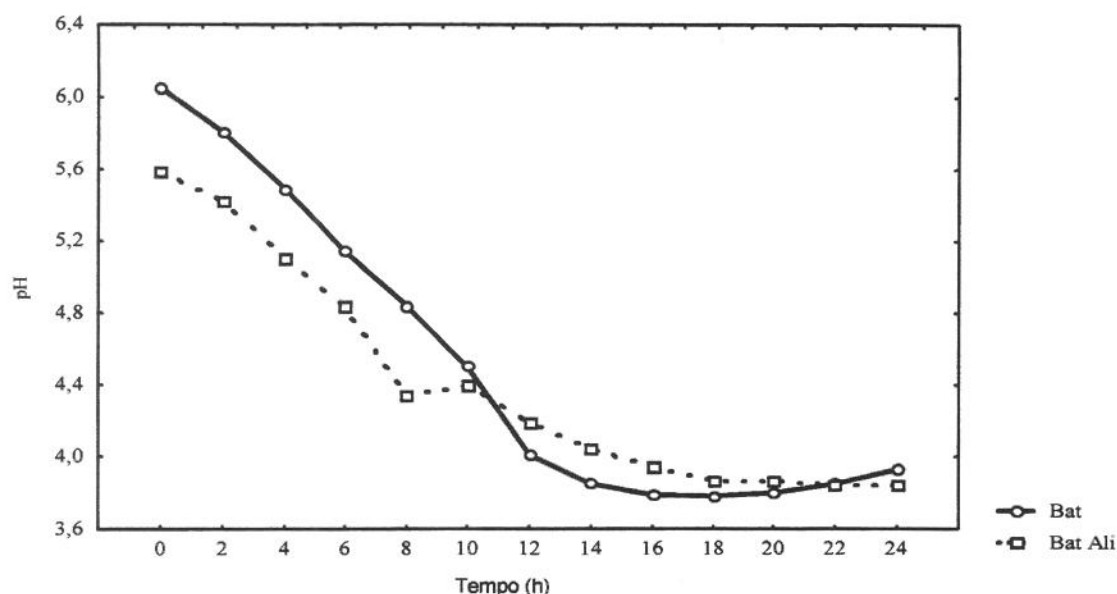


Figura 4.13: Perfil do pH de fermentação de sacarose pelo mutante ZA de *Zymomonas mobilis* batelada e batelada alimentada.

4.6. Produção de Etanol

A *Zymomonas mobilis* tem sido intensamente estudada como agente promissor para a produção de etanol, por fermentar rapidamente e com elevada eficiência (Park *et al.*, 1983).

A análise de determinação de etanol foi realizada em duas corridas com o intuito de verificar se o microrganismo não estava produzindo etanol em vez de produzir levana. Os resultados encontrados foram 7,93%, para a corrida com controle de pH, e 7,71% na corrida sem controle de pH, que comprovam os estudos de Diez Jerez (1993) em relação aos rendimentos fermentativos serem maiores nas fermentações com controle de pH. A produção de etanol encontrada é baixa se comparada a encontrada por outros autores como Rogers *et al.* (1982) que obtiveram produções de etanol maior a 10% (p/v) utilizando 250g/L de glicose, no entanto alta no que diz respeito a produção de levana.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) produziram etanol com cepas de *Zymomonas mobilis* B4286 e dois mutantes (ZML1 e ZML2) obtidos através do tratamento

com NTG e atingiram a produção máxima de etanol de 55,1; 41,0 e 44,2 g/L, respectivamente em 24 horas de fermentação a 30°C com concentração de sacarose de 150g/L, e observaram que os mutantes ZML1 e ZML2 possuem taxas de produção de etanol significativamente menores que a cepa natural.

4.7. Cromatografia em Papel

A cromatografia em papel foi realizada a fim de analisar qualitativamente a produção de levana. Foram aplicados os padrões de frutose e glicose e a amostra de levana não hidrolizada. Os cromatogramas foram revelados com solução de nitrato de prata saturada, NaOH 0,5N alcoólico e tiosulfato de sódio 10% e com o reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico e, podem ser visualizados nas Figuras 4.14 e 4.15, respectivamente.

Pode-se observar nas duas revelações, manchas superiores que representam frutose, centrais que representam a glicose, e na linha da aplicação da levana, na parte inferior à direita, uma pequena mancha que pode significar levana de baixo peso molecular.

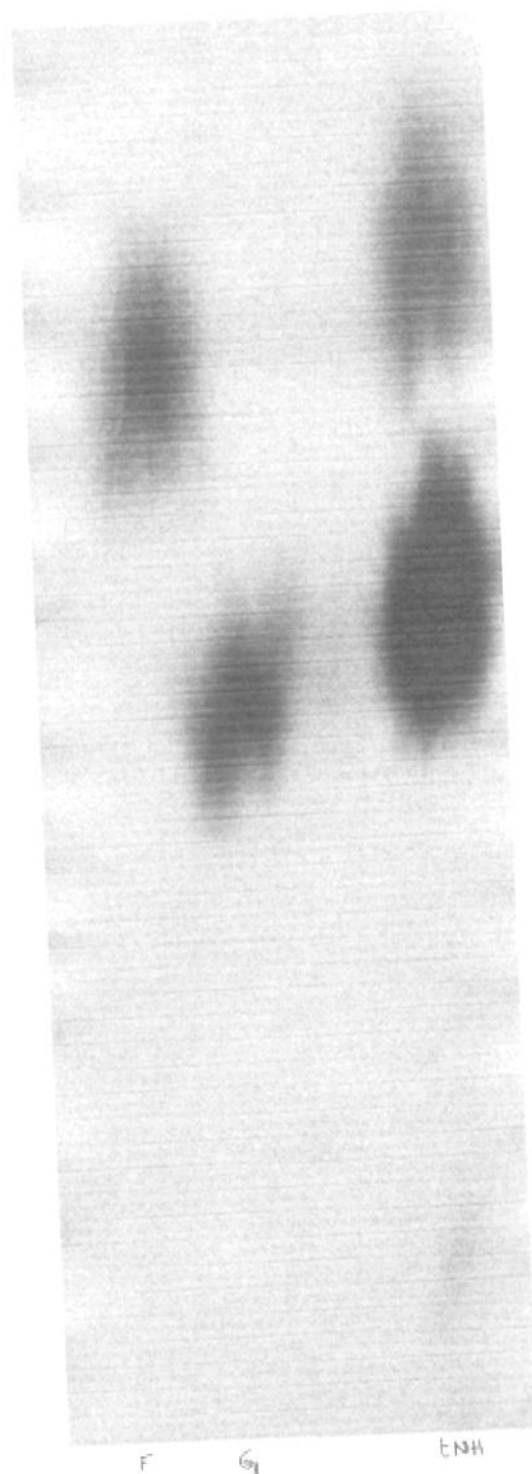
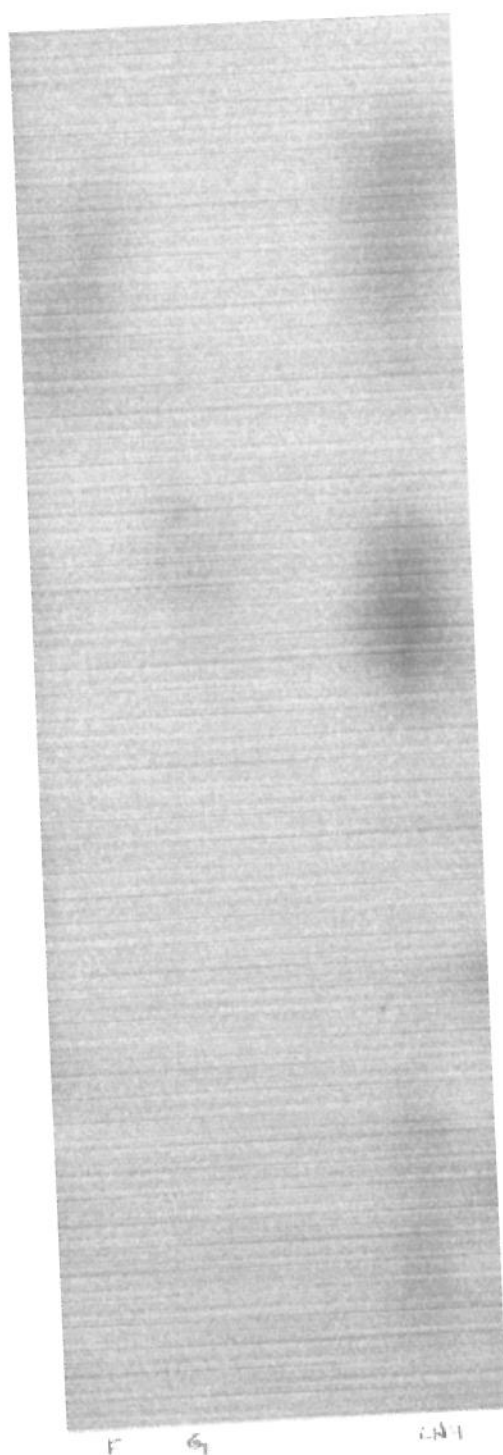


Figura 4.14: Cromatograma dos padrões, glicose e frutose, e da levana revelado com solução de nitrato de prata, NaOH 0,5N alcoólico e tiosulfato de sódio 10%



4.15: Cromatograma dos padrões, glicose e frutose, e da levana revelado com o reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico

5. CONCLUSÕES

1 - Foram obtidos dois mutantes, ZA e ZM a partir da cepa natural de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 tratada com NTG (N-metil N'nitro N'nitroso Guanidina). O mutante denominado ZA apresentou maior produção de levana, cerca de 64% mais que o mutante ZM.

2 - As variações na composição do meio de fermentação permitiram observar que a produção de levana depende das relações carbono-nitrogênio inorgânico e carbono-nitrogênio orgânico.

3 - A atividade enzimática da levanasacarase é influenciada pelo pH de pré-incubação, temperatura de incubação e concentração inicial de sacarose. Seu pH ótimo é de 4,0, temperatura 50°C e o aumento da concentração inicial de sacarose aumenta a atividade.

4 - A produção máxima de levana no reator de bancada foi 30,98g/L e em erlenmeyers foi 42,76g/L.

5 - Nas fermentações em reator de bancada, conclui-se que a aeração do meio de fermentação diminui a produção de levana significativamente, pois interfere no crescimento do microrganismo.

6 - O processo batelada alimentada não permitiu aumentar a produção de levana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRET, P.L. Fructooligosacaridos. **Alimentaria**, v.272, p.21-23, 1996
- AMIN, G. Conversion of sugar-beet particules to ethanol by the bacterium *Zymomonas mobilis* in solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, v.14, nº 6, p.499-504, **June**, 1992.
- AMIN, G.; KHALAF ALLAH, A. M. By-production during direct conversion of sugar beets to ethanol by *Zymomonas mobilis* in conventional submerged and solid-state fermentations. **Biotechnology Letters**, v. 14, nº 12, p. 1187-1192, **Dec.**, 1992.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, nº 2, p. 214-217, **Feb**, 1999.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th, 1995
- ASPINALL, G. O. Others glucans and fructans. **Polysaccharides**, p. 80, 1970.
- AVIGAD, G. Levan. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 161-165, 1965.
- BARKER, B.T.P.; HILLIER, V.F. **Journal Agricultural Science**, v. 5, p. 67-85, 1911.
- BAUCHOP, T.; ELSDEN, S.R. **Journal Gen. Microbiology**, v. 23, p. 457-469, 1960.
- BELAICH, J.P.; SENEZ, J.C. **Journal of Bacteriology**, v. 89, nº 5, 1195-1200, 1965.
- BELGHITH, H.; SONG, K.; KIM, C., RHEE, S. Optimal conditions for levan formation by na overexpressed recombinant levansucrase. **Biotechnology Letters**, v. 18, nº 4, p. 467-472, 1996.
- CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANÇA, F. P. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 19, nº 1, p. 19-21, **Jan.**, 1997.
- CHAMBERT, R.; GONZY-TRÉBOUL, G. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation process. **European Journal Biochemical**, v.62, p.55-64, 1976.
- CHEETHAM, P. S. J.; HACKING, A. J.; VLITOS, M. Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. **Enzyme Microbiol Technology**, v.11, nº 4, p.212-219, **Apr**, 1989.

- CLARKE, M. A.; BAILEY, A. V.; ROBERTS, E. J.; TSANG, W. S. Polyfructose: a New Microbial Polysaccharide. LICHTENTHALER, F. W. **Carbohydrates as Organic Raw Materials**. New York, 1990. 8:169-182.
- COTE, G. L. Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. **Biotechnology Letters**, v.10, n° 12, p.879-882, 1988.
- COTE, G. L.; IMAM, S. H. Purification and properties of an extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. **Carbohydrate Research**, v.190, p.299-307, 1989.
- CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Identification and charaterisation of the extracellular sucraes of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). **Applied Microbiology Biotechnology**, v.41, p.302-308, 1994.
- CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Strutural identification of oligosaccharides produced by *Zymomonas mobilis* levansucrase. **Biotechnology Letters**, v.15, n° 10, p.1055-1060, **Oct.**, 1993.
- CROMIE, S.; DOELLE, H.W. Relationship between maintenance energy requirements, mineral salts and efficincy of glucose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 2, p. 357-362, 1980.
- DADDS, M.J.S.; MARTIN, P.A.; CARR, J.G. The doubtful status of the species *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. **Journal Applied Bacteriology**, v.36, p. 531-539, 1973.
- DAWES, E.; RIBBONS, D. W.; REES, D.A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. **Biochemical Journal**, v.98, p.804-812, 1966.
- DEDONDER, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. **Methods in Enzymology**, v.8, p.500-505, 1966.
- DE LEY, J.; SWINGS, J. Phenothypic description, numerical analysis, and proposal for and improved taxonomy and nomenclature of the genus *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936. **Institute Systematic Bacteriology**, v. 26, p. 146-157, 1976.
- DIEZ JEREZ, M. C. **Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* CP4**. Campinas, 1993, 108p. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- DIEZ JEREZ, C.; YOKODA, F. Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, nº 1, p. 129-137, 1996.
- DILLIS, W.L.J. Protein fructosylation: fructose and the maillard reaction. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 58, p. 779-787, 1993.
- EDELMAN, J. Transfer reactions catalysed by some sucrase preparations. **The Biochemical Journal**, v.57, p.22-33, 1954. *Apud: Produção e caracterização da β -frutofuranosidades de *Aureobasidium* sp e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos*. Campinas,1997, 124p. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v.32, nº 3, p.237-243, 1997.
- FUCHS, A. **Biochemical Society Trans.** v. 19, p. 555-560, 1991. *Apud: Antitumour activities of levans produced by Zymomonas mobilis strains*. **Biotechnology Letters**, v 19, p. 19-21, 1997.
- GIBBS, M.; DEMOSS, R.D. **Journal Biological Chemical**, v. 207, 689, 1954.
- GIBBS, M.; DEMOSS, R.D. Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*. **Arch. Biochemical Biophysical**, v. 34, 478-479, 1951.
- HAN, Y. W.; CLARKE, M.A. Production and characterization of microbial levan. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 38, p. 393-396, 1990.
- HESTRIN, S.; AVINERI-SHAPIO, S; ASCHNER, M. The enzymatic production of levan. **Biochemical Journal**, v.37, p.450-456, 1943.
- HESTRIN, S.; FEINGOLD, D. S.; AVIGAD, G. The Mechanism of Polysaccharide Production from Sucrose. **Biochemical Journal**, v.64, p.340-351, 1956.
- JU, N.J.; DAMIANO, D.; SHIN, C.S.; KIM, N.K.; WANG, S.S. Continuous ethanol fermentation of *Zymomonas mobilis* using soy flour as a protective agent. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 531-536, 1983.

- KANNAN, T. R.; MUKUNDAN, G.A.; GUNASEKARAN, P. Fermentation characteristics of levansucrase mutants of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, nº 4, p. 265-270, 1993.
- KANNAN, T. R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Influence of intra- and extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by-product formation. **Biotechnology Letters**, v.19, nº 7, p.661-664, July, 1997.
- KERSTERS, K.; DE LEY, J. **Journal Microbiological Serol.**, v. 34, p. 393-408, 1968.
- KLUYVER, A.J. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 7th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1957.
- KLUYVER, A.J.; HOPPENBROUWERS, W.J. **Arch. Mikrobiology**, v. 2, p. 245-260, 1931.
- KOJIMA, I.; SAITO, T.; IIZUKA, M.; MINAMIURA, N.; ONO, S. Characterisation of levan produced by *Serratia sp.* **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75, nº 1, p.9-12, 1993.
- LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. The kinetics of ethanolproduction by *Zymomonas mobilis* on fructose and sugar media. **Biotechnology Letters**, v. 3, nº 5, p. 207-212, 1981.
- LEIBOVICI, J.; STARK, Y. Increase cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. **Cellular and Molecular Biology**, v.31, nº 5, p.337-341, 1985.
- LIMA, N.V.R.; SOUZA, I.A.; CALAZANS, G.M.T.; MELO, I.R. Fracionamento de levana e estudo comparativo de sua atividade antitumoral com a de outros polissacarídeos. SINA Ferm, 2000
- LOPES, C.E.; CALAZANS, G.M.T.; RIOS, E.M.M.M.; CARLOS, T.F. On the effect of temperature and pH on the setting behavior of a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 13, nº 1, p. 43-46, 1991.
- LYNESS, E. W., DOELLE, H. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.5, nº 5, p.345-350, 1983.
- LYNESS, E. W., DOELLE, H. W. Fermentation pattern of sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Bioengineering**, v. 23, p. 1449-1460, 1981.

- LYNESS, E. W., DOELLE, H. W. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 2, p. 549-554, 1980.
- McGILL, D.J.; DAWES, E.A. **Biochemical Journal**, v. 125, p. 1059-1068, 1971.
- MORTATTI, M.P.L. Estudo comparativo da fermentação de glicose e sacarose por *Zymomonas mobilis*. Campinas, 1985.82p. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MORTATTI, M.P.L.; SATO, H.H.; PARK, Y.K. Induction and some characteristics of sucrose hydrolizing enzyme from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n° 4, 1983.
- ODA, Y.; YANASE, H.; KATO, N.; TONOMURA, K. Liberation of sucrose-hydrolyzing enzymes from cells by the *zliS* gene product that mediates protein secretion in *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.77, n° 4, p.419-422, 1994.
- O'DELL, B.L. Fructose and mineral metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 771-778, 1993.
- PARK, Y. P.; MORTATTI, M. P. L.; SATO, H. H. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. **Biotechnology Letters**, v.5, n° 8, p.515-518, 1983.
- PREZIOSI, L., MICHEL, G.P.F., BARATTI, J. Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*: production and localization of sucrase and levansucrase activities. **Canadian Journal Microbiology**, v. 36, p. 159-163, 1989
- QUEIROZ, J. H. **Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides***. Campinas, 1987. 118p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RAO, S.C.; JONES, L.P. Formation of higher alcohols and phenol by strains of *Zymomonas* sp. **Acta Biotechnology**, v. 7,p. 209-219, 1987. *Apud*: Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, p. 129-137, 1996.

- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos: Fundamentos, Matérias-Primas Agrícolas Produtos e Processos**. Pelotas: Editora Universitária, 1996. Parte I: Matérias-Primas, p.29-36.
- RIBBONS, D.E.; DAWES, E.A.; REES, D.A. Levan formation by *Zymomonas mobilis*. **Biochemical Journal**, v. 82, p. 45, 1962.
- RIESNEIER, J.; KOßMANN, J.; TRETHEWEY, R.; HEYER, A.; LANDSCHÜTZE, V.; WILHMITZER, L. Production of novel polymers in transgenic plants. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 383-386, 1998.
- ROGERS, P. L.; LEE, K.J.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Advances Biochemical Engineering**, v. 23, p. 37-84, 1982.
- ROLZ, C.; CABRERA, S. Ethanol from sugar cane: Flask experiments using the EX-FERM technique. **Applied and Environmental Microbiology**, v.14, n° 6, p.466-471, Sept., 1980.
- SALIK, F.L.M. POVH, N.P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. **Processamento, Engenharia Industrial e Derivados**, p. 262-266, 1993.
- SANGILIYANDI, G.; RAJ, K.C.; GUNASEKARAN, P. Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levana forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 179-182, 1999.
- SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19, 1952.
- STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J. **The oligosaccharides**. New York, 1965. Synthesis of oligosaccharides.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas mobilis*. **Bacteriological Review**, v. 41, n° 1, p. 1-46, 1977.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. **Int. J. Syst. Bacteriological**, v. 25, p. 324-328, 1975.
- TANAKA, H.; ISHIKAWA, H.; OSUGA, K.; TAKAGI, Y. Fermentative ability of *Zymomonas mobilis* under various oxygen supply conditions in batch culture. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 69, n° 4, p. 234-239, 1990.
- TANAKA, T.; OI, S.; YAMAMOTO, T. Synthesis of levan by levansucrase. Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerisation of levan. **Journal of**

- Biochemistry**, v.85, p.287-293, 1979. *Apud Process Biochemistry*, v.32, n° 3, p.237-243, 1997.
- VAN BALKEN, J. A. M.; VAN DOOREN, J. G. M.; VAN DEN TWEEL, W. J. J.; KAMPHUIS, J.; MEIJER, E. M. Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1^F-fructosyltransferase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.35, p.216-221, 1991.
- VETTORAZZI, G.; MACDONALD, I. **Sacarose: Aspectos nutricionais e de segurança no uso do açúcar**. São Paulo: Editora Hucitec, 1989.p.37.
- VIIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.19, p.252-255, 1984.
- VIIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas*-strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.23, p.240-244, 1986.
- VIIKARI, L.; LINKO, M. Rate and yield limiting factors in continuous fermentation os sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n° 2, p. 1397-144, 1986.
- VINHAS, G.M.; CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E. Produção de levanas por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 e obtenção da curva de solubilidade do sistema levana-água-etanol. SINAFERM, 2000
- YAMAMOTO, Y.; AKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **Journal Nutrition Biochemical**, v.10, p.13-18, Jan, 1999.
- YOSHIDA, Y.; SUZUKI, R.; YAGI, Y. Production of levan by a *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70,n° 4, p. 269-271, 1990.
- YUN, J.W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 107-117, 1996.

APÊNDICE

7.1. Curvas Padrão para Análise de Açúcares Redutores Totais

As análises de açúcares redutores totais (ART) foram executadas segundo o método de Somogy-Nelson adaptado.

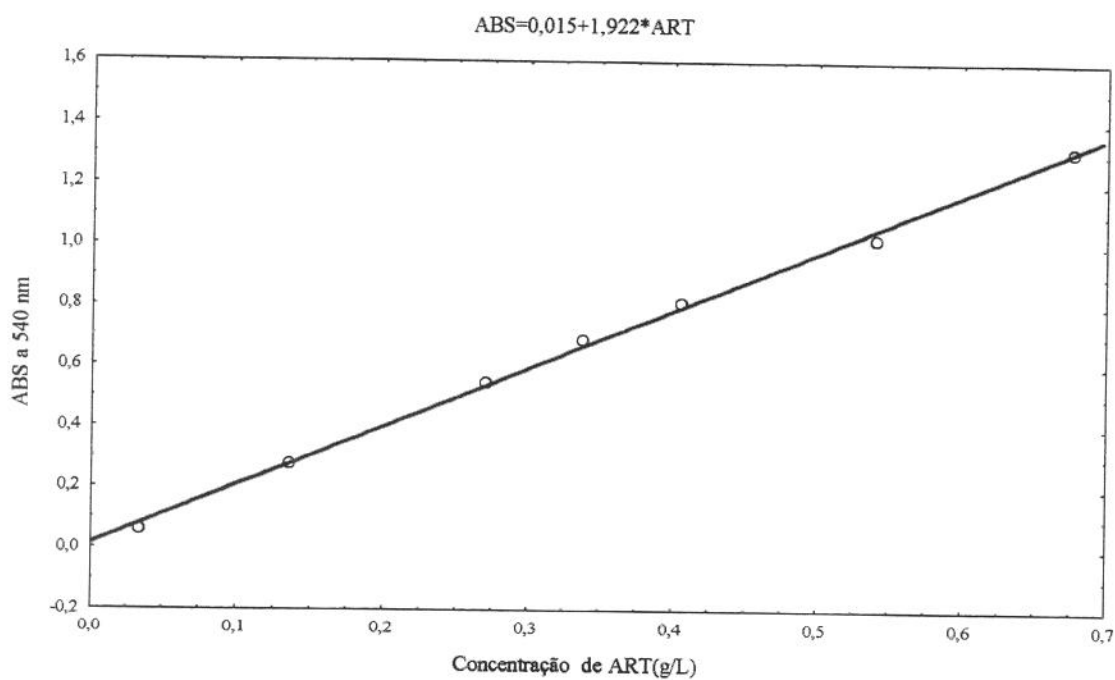


Figura 7.1: Concentração de ART versus Absorbância

A equação de reta disposta na Figura 7.1 possui 0,999 como coeficiente de correlação (R^2).

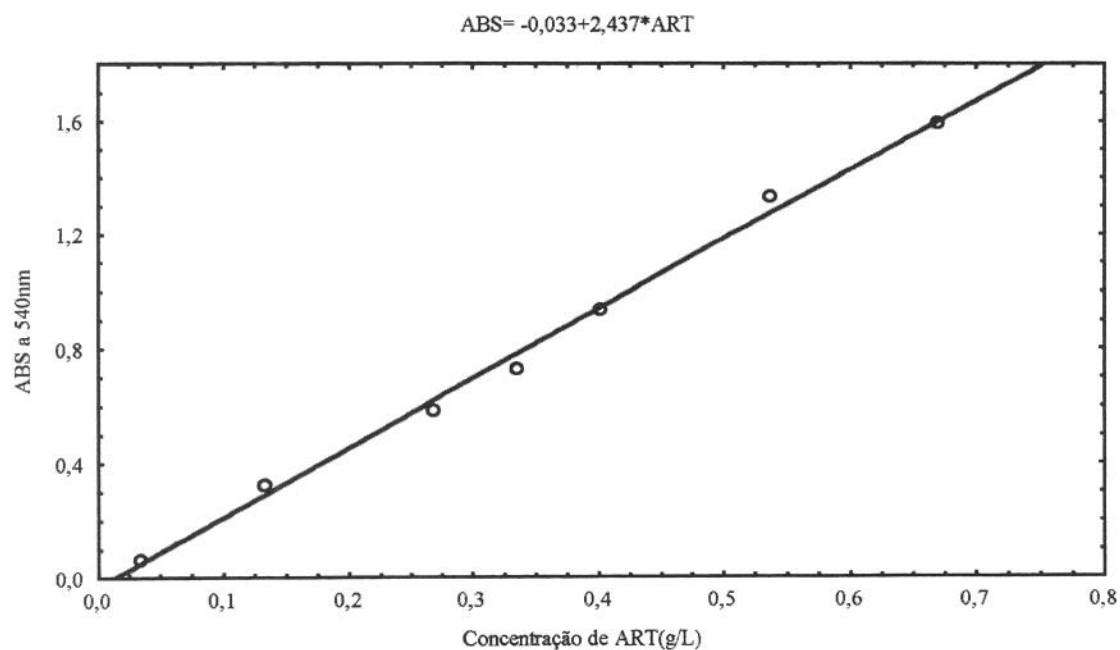


Figura 7.2: Concentração de ART versus Absorbância

A equação de reta disposta na Figura 7.2 possui 0,997 como coeficiente de correlação (R^2).

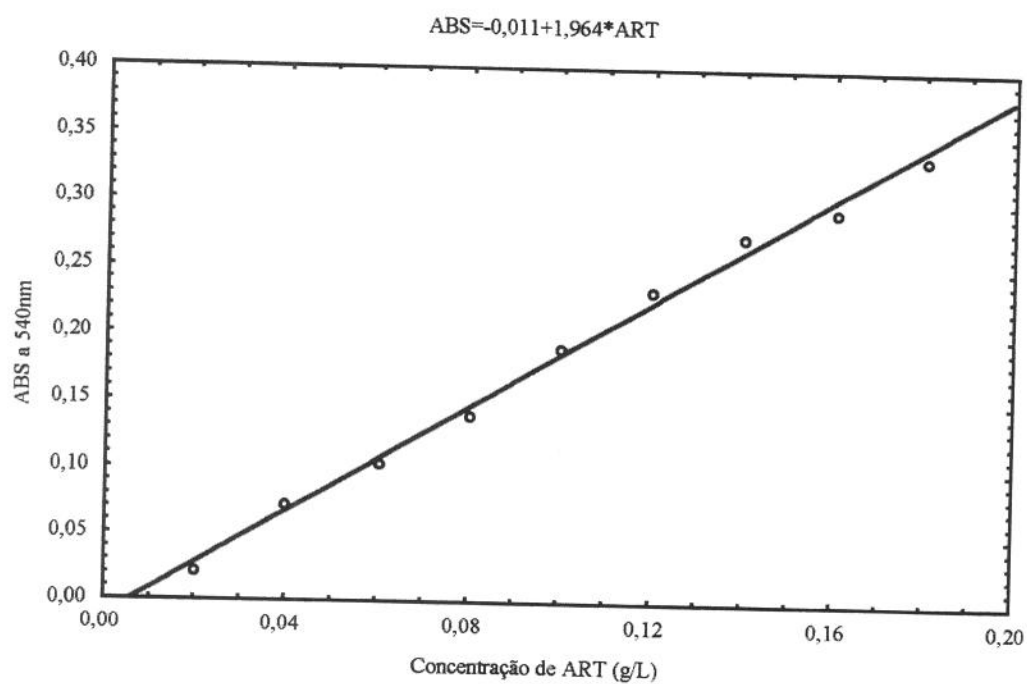


Figura 7.3: Concentração de ART versus Absorbância

A equação de reta disposta na Figura 7.3 possui 0,994 como coeficiente de correlação (R^2).

7.2. Relação Carbono-Nitrogênio

Com a finalidade de determinar a relação carbono-nitrogênio, foi necessário encontrar a quantidade de nitrogênio total no extrato de levedura pelo Método de Kjeldahl (AOAC,1995).

A quantidade de nitrogênio total na amostra de extrato de levedura é de aproximadamente 10%. No sulfato de amônio há 28g de N para cada mol. A relação carbono-nitrogênio foi determinada para 180g/L de sacarose, considerando desta forma a proporção de carbono existente na molécula, ou seja, 144g de carbono por molécula de sacarose, conforme a Tabela I.

Tabela 7.1: Relação carbono-nitrogênio nas concentrações de 180g/L de sacarose e 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de extrato de levedura.

Carbono (g)	Extrato de Levedura (g)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	N total	Relação C/N
75,78	0,5	0	0,500	151,58
75,78	0,5	0,042	0,542	145,36
75,78	0,5	0,084	0,584	129,77
75,78	0,5	0,127	0,627	120,82
75,78	0,5	0,170	0,670	113,17
75,78	0,5	0,212	0,712	106,43
75,78	1,0	0	1,000	75,78
75,78	1,0	0,042	1,042	72,73
75,78	1,0	0,084	1,084	69,91
75,78	1,0	0,127	1,127	67,25
75,78	1,0	0,170	1,170	64,78
75,78	1,0	0,212	1,212	62,53

7.3. Testes Preliminares na Variação da Concentração Inicial de Sacarose

Tabela 7.2: Testes preliminares na variação da concentração inicial de sacarose. Temperatura de 30°C, pH inicial 6,5.

Sacarose (g/L)	pH	MS (g/L)	ART (g/L)	AR (g/L)	Levana (g/L)	Rendimento de Levana (%)
50	5,64	1,90	4,93	1,32	1,47	2,94
50	4,67	0,72	49,30	0,65	1,62	3,24
150	4,09	8,11	37,07	3,93	8,67	5,78
150	5,57	7,45	5,16	1,44	3,50	2,33

7.4. Testes Preliminares na Variação da Concentração Inicial de Sacarose, Extrato de Levedura e Sulfato de Amônio

Tabela 7.3. Resultado da fermentação variando a concentração de extrato de levedura e sulfato de amônio:

Conc. de sacarose (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	pH	MS (g/L)	ART (g/L)	AR (g/L)	Massa de Levana (g/L)
150	5	0,4		2,13	79,92	27,47	12,00
		0,6		2,46	62,59	19,25	13,54
		0,8		1,91	65,87	25,16	10,64
150	10	0,4		1,97	91,47	19,02	10,56
		0,6		2,73	82,73	29,84	11,86
		0,8		3,21	86,16	29,55	12,60
180	5	0,4	3,39	6,37	82,73	30,02	22,72
		0,6	3,26	6,56	91,47	17,64	19,70
		0,8	3,23	7,03	82,57	16,00	19,78
180	10	0,4	3,74	7,39	64,15	16,36	19,98
		0,6	3,68	7,37	45,89	6,56	17,00
		0,8	3,64	6,58	44,33	6,30	17,70

7.5. Fermentação a 30°C, sem controle de pH e com adição de oxigênio dissolvido

Tabela 7.4: Fermentação em fermentador de bancada a 30°C, sem controle de pH e com adição de oxigênio dissolvido.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	pH	OD	MS (g/L)	Levana (g/L)	Levana corrigida (g/L)
0	51,78	136,89	5,42	41,60	8,92	16,12	0,00
2	32,58	149,20	5,35	6,20	8,79	17,50	0,00
4	40,71	156,83	4,88	17,70	2,98	16,62	0,00
6	44,81	143,04	4,33	29,90	8,65	18,60	1,76
8	51,54	146,49	3,9	21,80	6,30	16,36	1,76
9	52,36	133,20	3,76	23,30	8,05	15,74	0,05
10	55,23	146,98	3,65	26,10	8,51	18,76	1,45
11	55,89	149,94	3,57	20,00	6,63	17,70	0,04
12	61,14	148,22	3,49	29,40	8,49	19,02	1,57
13	64,92	139,35	3,43	31,70	8,27	20,24	3,83
14	60,57	148,22	3,39	28,90	11,49	18,40	0,95
15	59,66	142,31	3,36	30,70	7,77	17,34	0,58
16	63,44	154,62	3,33	33,80	7,80	20,16	1,95
17	59,75	140,34	3,31	25,90	8,36	16,58	0,05
18	61,14	142,31	3,31	32,40	8,54	21,20	4,44
19	65,90	143,04	3,29	29,60	6,60	20,76	3,92
20	69,92	143,54	3,28	29,80	7,77	19,50	2,60
21	79,85	142,06	3,28	34,00	7,63	17,60	0,87
22	65,41	139,84	3,27	26,70	11,03	21,48	5,01
23	70,99	141,32	3,28	31,10	7,45	20,04	3,40
24	67,95	129,50	3,30	34,70	7,17	20,04	4,79

7.6. Fermentação a 30°C e sem controle de pH

Tabela 7.5: Fermentação em fermentador de bancada a 30°C e sem controle de pH.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	pH	MS (g/L)	Levana (g/L)	Levana corrigida (g/L)
0	4,51	135,17	6,05	7,60	6,14	0,00
2	4,76	138,61	5,81	6,55	6,32	0,00
4	8,45	145,75	5,49	7,45	6,72	0,00
6	18,55	105,13	5,14	7,06	7,76	1,72
8	58,76	115,47	4,84	4,48	12,18	5,55
9	60,73	125,07	4,67	4,33	12,38	5,20
10	98,73	116,70	4,50	6,73	13,06	6,36
11	87,24	122,12	4,22	9,11	13,48	6,47
12	85,02	113,25	4,01	7,03	8,57	2,07
13	70,58	91,83	3,93	14,49	8,41	3,14
14	70,25	117,69	3,85	9,50	37,74	30,98
15	58,27	81,74	3,81	6,11	31,02	26,32
16	64,51	81,74	3,79	8,59	33,50	28,80
17	60,73	78,05	3,78	9,19	34,52	30,04
18	53,18	65,00	3,78	4,69	26,66	22,93
19	46,86	53,18	3,79	3,68	9,26	6,21
20	40,30	52,44	3,80	3,69	8,64	5,63
21	35,13	45,79	3,83	3,53	7,28	4,65
22	27,90	47,76	3,85	3,90	9,68	6,94
23	22,73	34,47	3,89	4,03	9,08	7,10
24	19,20	32,25	3,93	4,65	8,42	6,57

7.7. Fermentação a 30°C com controle de pH em 5,5

Tabela 7.6: Fermentação em fermentador de bancada a 30°C e com controle de pH em 5,5.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	pH	MS (g/L)	Levana (g/L)	Levana corrigida (g/L)
0	17,15	161,26	5,56	6,29	8,94	0,00
2	39,64	159,79	5,53	5,06	11,08	2,22
4	44,07	159,79	5,50	6,95	11,66	2,80
6	60,40	147,23	5,50	7,78	11,90	3,74
8	108,66	141,32	5,50	8,00	11,64	3,80
9	101,85	122,86	5,50	8,18	11,18	4,37
10	99,63	120,15	5,50	3,49	11,82	5,16
11	97,09	118,67	5,50	3,95	11,26	4,68
12	83,55	118,67	5,50	4,10	11,06	4,48
13	73,37	104,64	5,50	5,23	9,22	3,42
14	67,46	87,16	5,50	5,07	11,2	6,37
15	47,52	77,55	5,50	5,67	8,78	4,48
16	45,71	75,83	5,50	5,26	8,72	4,52
17	41,94	69,92	5,50	4,77	8,08	4,20
18	37,42	61,80	5,50	4,58	7,64	4,21
19	24,78	50,96	5,50	5,09	7,60	4,77
20	18,05	37,42	5,50	4,97	7,38	5,31
21	10,59	31,51	5,50	4,53	6,80	5,05
22	8,04	30,53	5,50	5,07	6,34	4,65
23	6,73	27,08	5,50	4,54	5,64	4,14
24	6,16	24,13	5,50	5,21	6,28	4,94

7.8. Fermentação a 30°C com controle de pH em 4,5

Tabela 7.7: Fermentação em fermentador de bancada a 30°C e com controle de pH em 4,5.

Tempo (h)	AR	ART	pH	MS (g/L)	Levana (g/L)	Levana corrigida (g/L)	AE SN
0	13,05	155,85	5,50	5,63	9,96	0,00	1,27
2	21,17	204,60	5,00	7,59	8,78	0,00	2,24
4	27,25	155,60	4,50	4,41	9,42	0,00	3,56
6	80,18	145,26	4,50	4,05	16,06	6,78	26,27
8	85,76	116,95	4,50	4,54	11,86	4,39	53,92
9	95,86	134,18	4,50	3,71	14,00	5,42	48,47
10	76,49	118,92	4,50	4,11	10,62	3,02	52,80
11	62,78	97,74	4,50	3,72	11,32	5,07	58,60
12	54,41	89,13	4,50	4,01	10,42	4,72	54,63
13	45,47	81,74	4,50	3,60	9,68	4,46	53,36
14	42,51	65,49	4,50	3,55	9,30	5,11	46,44
15	32,25	66,48	4,50	3,96	8,82	4,57	45,32
16	22,73	56,38	4,50	4,30	7,52	3,92	37,93
17	14,12	44,81	4,50	3,89	7,16	4,30	37,78
18	9,03	38,16	4,50	3,94	8,34	5,90	37,78
19	6,98	31,51	4,50	3,83	7,30	5,29	30,30
20	6,16	32,75	4,50	3,85	6,90	4,81	28,11
21	5,50	31,02	4,50	3,65	7,52	5,54	27,85
22	5,99	30,78	4,50	3,84	6,66	4,69	26,68
23	5,17	29,54	4,50	3,92	6,20	4,31	25,36
24	5,58	32,75	4,50	3,94	7,32	5,23	23,88

7.9. Fermentação a 30°C sem controle de pH

Tabela 7.8: Fermentação em fermentador de bancada a 30°C e sem controle de pH.

Tempo (h)	AR	ART	pH	MS (g/L)	Levana (g/L)	Levana corrigida (g/L)	AE SN	AE GO
0	2,85	167,11	5,09	5,16	12,76	0,00	1,07	0,37
2	3,05	173,22	4,62	4,15	11,88	0,00	0,76	0,37
4	4,18	171,38	4,47	6,17	10,30	0,00	0,56	0
6	93,38	159,78	4,19	9,76	13,84	1,64	13,59	10,66
8	113,75	128,62	3,66	5,42	10,94	1,12	43,48	11,40
9	129,33	131,98	3,55	5,85	11,58	1,50	47,66	9,19
10	117,21	121,59	3,48	3,97	11,42	2,14	39,82	15,07
11	74,03	108,45	3,44	5,54	10,72	2,44	32,99	8,82
12	75,15	101,43	3,49	5,18	8,30	0,56	46,69	15,44
13	59,67	83,40	3,46	3,27	33,54	27,17	40,73	9,93
14	43,48	69,35	3,47	4,67	8,30	3,00	38,39	10,66
15	41,14	58,96	3,50	3,98	7,86	3,36	45,42	8,46
16	24,03	48,27	3,54	3,05	8,08	4,39	33,50	7,72
17	17,92	36,35	3,58	3,02	6,12	3,34	36,30	11,76
18	5,60	27,80	3,62	2,57	6,26	4,14	27,24	9,56
19	5,30	28,11	3,66	3,60	5,92	3,77	35,85	10,29
20	3,67	26,58	3,74	3,30	6,02	3,99	33,10	12,50
21	3,26	24,75	3,75	5,26	5,88	3,99	32,43	6,25
22	3,56	25,36	3,73	3,32	6,98	5,04	37,07	10,29
23	3,56	24,44	3,71	3,62	6,04	4,17	41,09	12,50
24	4,38	23,83	3,71	3,43	5,70	3,88	35,08	8,09

7.10. Fermentação em batelada alimentada a 30°C com controle de pH em 5,5

Tabela 7.9: Fermentação em batelada alimentada a 30°C e sem controle de pH.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	pH	MS	Levana (g/L)	Levana corrigida (g/L)	AE SN	AE GO
0	12,12	183,91	5,58	5,15	8,14	0,00	1,07	0,26
2	27,29	172,61	5,42	6,02	8,30	0,48	1,78	0,52
4	27,60	170,16	5,10	6,25	9,32	1,61	3,87	1,29
6	118,43	157,64	4,84	16,95	14,36	7,21	23,93	10,82
8	130,55	142,67	4,34	21,79	13,20	6,73	48,42	19,59
10	124,13	141,75	4,39	23,92	11,62	5,19	44,30	16,75
12	124,13	139,61	4,18	19,41	9,90	3,57	37,32	14,95
14	126,78	134,73	4,04	24,14	10,94	4,83	29,18	10,57
16	114,15	128,31	3,94	19,80	11,24	5,42	28,92	14,95
18	100,71	113,03	3,86	23,29	8,78	3,66	21,84	9,79
20	84,01	115,78	3,86	24,54	9,46	4,21	10,74	5,41
22	75,76	92,26	3,84	28,59	6,12	1,94	13,59	6,44
24	57,84	87,37	3,84	25,75	6,04	2,08	14,56	6,70

7.11. Curva Padrão para determinação do etanol

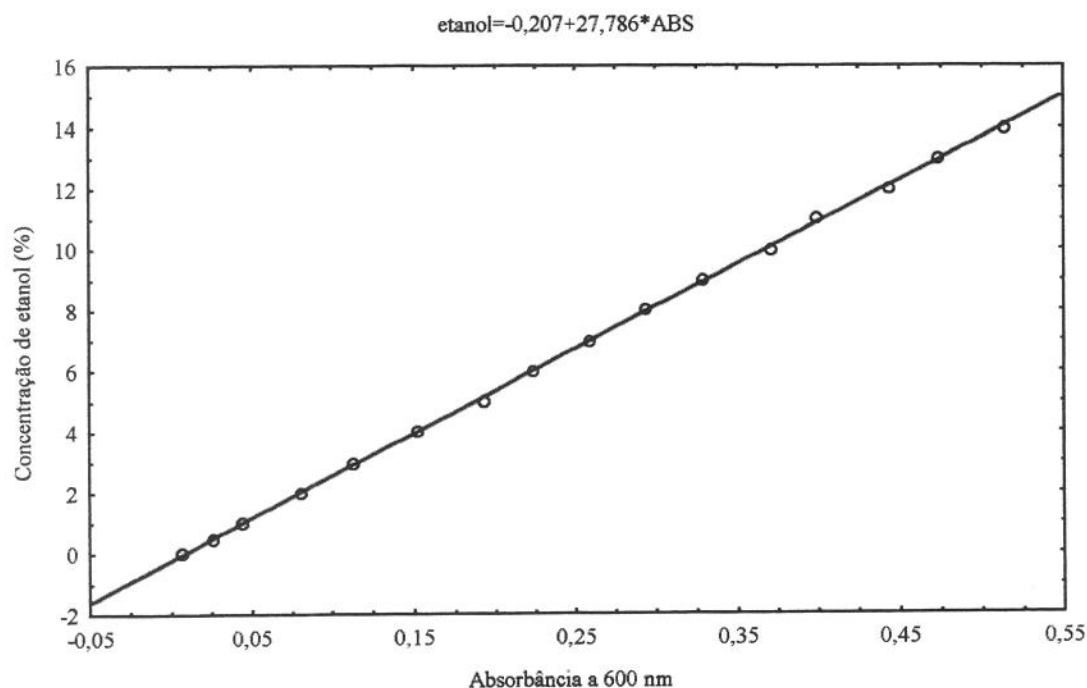


Figura 7.10: Concentração de etanol em função da absorbância a 600 nm

A equação da reta que melhor ajusta os pontos da Figura 7.11 foi utilizada para calcular a concentração de etanol nas amostras coletadas das fermentações, depois de se obter o valor de absorbância na análise de determinação de etanol descrita conforme o item 3.2.7. O coeficiente de correlação (R^2) da equação foi 0,9997.