

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANA-SACARASE POR
Leuconostoc mesenteroides"

José Humberto de Queiróz

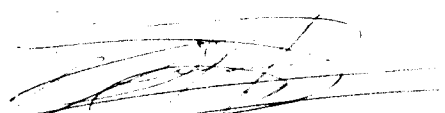
ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco Maugerl Filho

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida por José Humberto de Queiróz
e aprovada pela Comissão Examinadora
em 05.10.87.

Campinas, 05 de
outubro de 1987.

Tese apresentada à Faculdade de En-
genharia de Alimentos da Universi-
dade Estadual de Campinas para ob-
tenção do grau de mestre em Enge-
nharia de Alimentos.


Presidente da Banca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANA-SACARASE POR
Leuconostoc mesenteroides"

"CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PRODUÇÃO
DE DEXTRANA-SACARASE POR
Leuconostoc mesenteroides"

Este trabalho é dedicado à Maria Luzia de Queiróz e suas filhas: Mirtes, Tertulina, Terezinha, Glória, Dalva, Elza, Iracema e Jaqueline. E à Maria Eliana.

Meu carinho e gratidão a elas, que se superaram para melhor ajudar e delas nunca me faltaram confiança e apoio.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho por sua orientação e apoio dado de boa vontade na realização deste trabalho e na continuação dos meus estudos.
- A Profa. Dra. Iracema, pelos ensinamentos e auxílio dado, principalmente na redação final desta tese.
- A Profa. Dra. Adilma por sua participação na banca examinadora e também por sua compreensão.
- Ao Prof. Dr. Vanderlei por sua participação na banca examinadora e também por sua cooperação frente à CPG, juntamente com a Srta. Telma.
- A Faculdade de Engenharia de Alimentos e particularmente ao departamento de Engenharia por possibilitarem a realização deste trabalho.
- A Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos (ABIA) pelo custeio da confecção desta tese.
- A Unicamp, CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.
- Ao pessoal do laboratório de Bioengenharia, D. Maria e Sr. Quirino pela colaboração, à Isabel e Fátima pelo constante apoio na parte experimental, bem como pelas valiosas discussões.
- Aos colegas e amigos do DEA, pela oportunidade que me proporcionaram de ter uma vivência engrandecedora.
- A Srta. Elizabete Suto por sua amizade e colaboração.
- Ao Prof. Benjamin pela amizade e colaboração
- A todos os professores do DEA, pois com cada um aprendi um pouco, dentro e fora das salas de aula.
- A todos aqueles que, com sua maneira singular de doar, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	111
RESUMO	vii
SUMMARY.....	viii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
1. ASPECTOS GERAIS	04
2. DEXTRANA	09
2.1. Produção	09
2.2. Propriedades	13
2.3. Usos	16
3. DEXTRANA-SACARASE	21
3.1. Produção	21
3.2. Propriedades	28
3.3. Mecanismos de ação catalítica	34
3.4. Imobilização	43
3.5. Parâmetros que afetam as propriedades da dextrana na síntese enzimática	45
CAPÍTULO III- MATERIAIS E MÉTODOS	49
1. MICRORGANISMO.	49
2. MEIOS DE CULTURA	50
3. CONDIÇÕES DE CULTURA	51
4. MÉTODOS ANALÍTICOS	54

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
1. FERMENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS	61
a) Condições de referência	61
b) Teste de temperatura de fermentação	62
2. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	65
a) Utilização de melação como fonte de carbono ..	65
b) Utilização de água de maceração de milho (AMM) como substituto de extrato de levedura.....	67
c) Teste de sais	68
d) Teste de fosfato de potássio	71
e) Teste de caldo de cana (Fresco).....	73
3. FERMENTAÇÃO EM MINI-FERMENTADORES-BATELADA.	74
4. ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA ..	80
4.1. Adição de Substrato conjugada com o sistema controlador de pH	80
4.2. Adição de substrato independente do pH	88
4.3. Discussão	98
CONCLUSÕES	100
RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	101
BIBLIOGRAFIA	103

INDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Porcentagem de ligações alfa entre os resíduos glicosídeos das dextranas de diferentes linhagens de microrganismos (86)	8
Tabela 2:	Usos da dextrana (64)	19
Tabela 3:	Usos de derivados da dextrana (64)	20
Tabela 4:	Efeito de íons metálicos divalentes na dextrana-sacarase purificada e tratada com EDTA 5 mM (75)	32
Tabela 5:	Variação das frações de carboidratos e dextrana na reação da dextrana sacarase versus concentração inicial de sacarose (2)	46
Tabela 6:	Efeito da concentração do acceptor sobre o peso molecular da dextrana sintetizada pela dextrana-sacarase de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B - 512 (95)	48
Tabela 7:	Evolução do crescimento celular (DO) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes temperaturas, em meio padrão .65	
Tabela 8:	Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) versus concentração de melão (g/l) durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em frascos agitados. T = 27°C, agitação = 150 rpm	66
Tabela 9:	Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) versus concentração de água de maceração de milho (AMM) durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em frascos agitados	68

Tabela 10: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em frascos agitados, com variação da composição salina do meio de cultura	69
Tabela 11: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em frascos agitados, com variação da composição salina do meio de cultura	70
Tabela 12: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) versus concentração de fosfato de potássio durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	72
Tabela 13: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em meios formulados com caldo de cana	74
Tabela 14: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante as fermentações em batelada alimentada em meios com melão e AMM e alimentação com sacarose, conjugada com o pH ...	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Viscosidade versus concentração das dispersões aquosas de polissacarídeos microbianos e alginato de sódio. Viscosidade medida em viscosímetro Brookfielf LVT a 30 rpm (39).....	15
Figura 2: Condições ótimas de fermentação para produção de dextrana-sacarase (pH = 6,7, T = 23° C). Evolução da atividade enzimática, crescimento celular, sacarose e oxigênio durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512(F) (2)	27
Figura 3: Velocidade inicial da reação de síntese da dextrana versus concentração de substrato a diferentes temperaturas (17) .	30
Figura 4: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por NEELY (65)	36
Figura 5: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por ROBYT (71, 77)	38
Figura 6: Esquema do mecanismo proposto por ROBYT para a reação dos aceptores na síntese de dextrana (76)	39
Figura 7: Esquema do mini-fermentador	58
Figura 8: Esquema do controlador de pH e sistema para adição de substrato durante a fermentação em mini-fermentadores	59
Figura 9: Curva de referência de massa seca versus densidade ótica a 650 nm para o <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512(F)	60
Figura 10: Evolução do pH, crescimento celular (DO e ln(DO)) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> com meio padrão em frascos agitados	62

- Figura 11: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* com meio padrão em frascos agitados para temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35° C64
- Figura 12: Evolução do pH , crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em mini-fermentadores com meio padrão, sem controle de pH. Temperatura = 27° C 76
- Figura 13: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em mini-fermentadores com meio padrão e pH controlado (pH = 6,7 ± 0,3). Temperatura = 27° C77
- Figura 14: Evolução do pH , crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em mini-fermentadores com meio de melão e AMM, sem controle de pH. Temperatura = 27° C78
- Figura 15: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em mini-fermentadores com meio de melão e AMM, com pH controlado a 6,7 ± 0,3. Temperatura = 27° C79
- Figura 16: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em bate-

lada alimentada. Meio padrão, pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C . Solução de adição = sacarose 400 g/l e NaOH 1 N, sem aeração82

Figura 17: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em batelada alimentada. Meio padrão, pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C . Solução de adição = sacarose 400 g/l e NaOH 1 N, com aeração83

Figura 18: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em batelada alimentada. Meio de melaço e AMM. K1- solução de alimentação =sacarose 400 g/l + NaOH 1 N. K2- solução de alimentação =sacarose 400 g/l + K HPO 50 g/l. pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C , aeração = 0,5 VVM86

Figura 19: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição de sacarose. Meio base (melaço = 50 g/l, AMM = 10 g/l, fosfato de potássio = 20 g/l) complementado com 10 g/l de extrato de levedura. pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C , aeração = 0,5 VVM87

Figura 20: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* com adição contínua de sacarose (18 g/l.h). Meio padrão, com 20 g/l no início. pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C , aeração = 0,5 VVM90

- Figura 21: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição de sacarose em meio padrão com variação da concentração inicial de sacarose em 10, 20 e 40 g/l91
- Figura 22: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT), sacarose (SA) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição de melão. Meio base complementado com 10 g/l de extrato de levedura. pH = 6,7 ± 0,3. Temperatura = 27° C, aeração = 0,5 VVM94
- Figura 23: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) para três fermentações com adição contínua de melão. Meio base (melão = 50 g/l, AMM = 10 g/l, fosfato de potássio = 20 g/l). 1 = meio base, 2 = meio base + 10 g/l de E.L., 3 = meio base + 0,5 g/l de cloreto de cálcio. pH = 6,7 ± 0,3. Temperatura = 27° C, aeração = 0,5 VVM95
- Figura 24: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição de melão com interrupção da adição após 6 horas. Meio base, pH = 6,7 ± 0,3. Temperatura = 27° C, aeração = 0,5 VVM96
- Figura 25: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição contínua de melão. Meio base, pH = 6,7 ± 0,3. Temperatura = 27° C, aeração = 0,5 VVM97

RESUMO

A produção de dextrana-sacarase, pelo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F), foi estudada para fermentações em frascos agitados e mini-fermentadores em batelada e batelada alimentada.

Foram testados meios de cultura utilizando melaço, água de maceração de milho, extrato de levedura e sacarose.

Na fermentação em frascos agitados, verificou-se uma baixa produção de enzima, não havendo diferenças significativas para os meios com melaço ou sacarose pura.

Em mini-fermentadores o controle de pH promoveu um aumento de aproximadamente 60% para o meio padrão e 40% para os meios com melaço.

Com fermentações em batelada alimentada a produção de dextrana-sacarase foi aumentada de 3 - 4 vezes. Os melhores resultados foram conseguidos em meio padrão, chegando no final de 10 horas com 95 UDS/ml. Nos meios com melaço e água de maceração de milho (AMM) os melhores resultados foram conseguidos com alimentação contínua de melaço.

Nessas condições a atividade máxima ficou em torno de 80 UDS/ml.

SUMMARY

The production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* in batch and feed batch fermentation was studied. A culture medium containing molasses, corn steep water, yeast-extract and sucrose was tested.

In the batch fermentation system the enzyme production was low, and was not significantly affected by the cultural medium. The pH control in the mini-ferm increased the dextransucrase production by c. 60% for the standard medium and 40% for the molasses medium.

With feed batch fermentation, the enzyme production increased 3-4 fold. The best results were obtained when the standard medium was used and the maximum enzyme activity was 95 DSU/ml after 10 hs. of fermentation. When the medium with molasses and corn steep liquor medium was used, the best result was c. 80 DSU/ml with continuous feeding with molasses.

I. INTRODUÇÃO

Com o avanço da microbiologia nas últimas décadas e, mais recentemente, da biotecnologia, o interesse pelos produtos de origem microbiana tem aumentado de forma significativa. A independência de variações climáticas, a possibilidade de controles automatizados, a disponibilidade de matérias primas renováveis, são alguns dos fatores que motivam a utilização de produtos microbianos em substituição às fontes convencionais ou ainda como novos produtos com características próprias. No setor energético temos um exemplo recente no Brasil, com a substituição parcial da gasolina pelo álcool.

Os polímeros de origem bacteriana, também chamados biopolímeros, têm sido objeto de muitos estudos, em especial os polissacarídeos, devido às suas bem sucedidas aplicações industriais, seja como substitutos de polissacarídeos de origem vegetal ou usos específicos, como é o caso da dextrana. Além dos usos industriais, alguns outros fatores também contribuíram para a ampliação dos estudos sobre essas substâncias. Um desses é a identificação da ação antigênica específica das bactérias com polissacarídeos localizados nas camadas exteriores das células. No caso da dextrana, além do interesse comercial, alguns outros fatos incentivaram bastante a pesquisa. O primeiro relaciona-se aos problemas causados na indústria açucareira, quando os caldos açucarados são contaminados por microorganismos produtores de dextrana. Outro fator é a relação desse polissacarídeo com as cáries dentárias. Neste caso, a dextrana sintetizada por bactérias da flora bucal, se fixa no esmalte dos dentes, servindo como suporte para a formação da placa bacteriana.

O objetivo deste estudo é a produção de dextrana-sacarase, enzima responsável pela síntese da dextrana. A dextrana é um polissacarídeo de origem bacteriana, que inicialmente despertou grande interesse, devido aos problemas causados na indústria açucareira, mas que alcançou grande importância na indústria farmacêutica, ampliando, logo depois, seu uso em outros ramos industriais. Foi o primeiro polímero bacteriano produzido em escala industrial.

O potencial de aplicação da dextrana se estende à indústria farmacêutica, química, petroquímica e à indústria de alimentos. Alguns usos já consagrados há vários anos e outros propostos. Dentre as aplicações que alcançaram sucesso comercial, destacam-se as utilizações na indústria farmacêutica com fins clínicos.

As aplicações da dextrana dependem principalmente do peso molecular. Com peso molecular superior a 25 milhões de daltons, pode ser empregada na extração do petróleo como agente de impermeabilização e viscosidade, ou ainda na recuperação secundária de petróleo (petróleo de alta viscosidade). A dextrana de peso molecular médio é usada na indústria de alimentos como agente de textura, gelificante e estabilizante. Na indústria farmacêutica, como substância de encapsulação e vetor de medicamentos. Na indústria química encontra-se uma importante aplicação, na fabricação de tamis molecular utilizado no isolamento e purificação de produtos biológicos, inclusive enzimas.

A dextrana de baixo peso molecular é usada, há mais de trinta anos, como substituto do plasma sanguíneo, pelo fato de suas propriedades em solução aquosa serem semelhantes às do plasma sanguíneo. O uso é intravenoso. Uma vez no organismo a dextrana é totalmente degradada pelas vias metabólicas normais. Esse produto, além da função de

expansor volumétrico do plasma, contribui para melhor fluidez do sangue, prevenindo a obstrução dos capilares.

Além dos produtos já mencionados, temos alguns derivados da dextrana com importantes aplicações, como a dextrana-sulfato, com propriedades anticoagulantes e a dextrana-ferro, usada no tratamento de anemias em animais e humanos. Vários outros usos têm sido propostos, sendo objeto de grande número de patentes.

Quanto à produção, atualmente existem dois processos industriais distintos, para se produzir dextrana. No primeiro, o polímero é produzido diretamente no meio de cultura contendo o microrganismo e sacarose em excesso. No segundo processo, primeiro se produz a enzima, que após uma etapa de purificação, sintetiza a dextrana "in vitro", utilizando-se sacarose como substrato. Praticamente toda a produção industrial de dextrana se utiliza de linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*, mais especificamente o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512 ou similar. Esse microrganismo apresenta exigências nutricionais bastante caras, e a dextrana-sacarase, nesse caso, não é constitutiva, sendo a sacarose o único indutor conhecido.

Este trabalho avalia a produção de dextrana-sacarase utilizando-se de matérias primas de larga disponibilidade: melão, como fonte de carbono e indutor e água de maceração de milho, como fonte de nitrogênio e vitaminas. Utilizando-se deste meio básico, foram avaliados dois tipos de fermentações batelada e batelada alimentada. Para melhor avaliar as condições de produção foram conduzidas fermentações utilizando-se de meios sintéticos o qual se chamou meio padrão.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ASPECTOS GERAIS

O termo dextrana foi utilizado pela primeira vez em 1874, por SCHEIBER (segundo NEELY, 65), para designar certos polissacarídeos que apresentavam a característica de serem dextro-rotatórios (rotação ótica positiva), isolados de caldos açucarados de indústrias açucareiras européias. SCHEIBER (segundo NEELY, 65) propôs a fórmula empírica $C_6H_{10}O_5$, para a substância isolada, atualmente conhecida como $(C_6H_{10}O_5)_n$.

A preocupação dos pesquisadores nesta época era minimizar as perdas causadas na indústria do açúcar, devido às transformações que ocorriam nos caldos açucarados, acarretando um aumento da viscosidade, formação de películas e aparecimento de sabor amargo. A origem microbiana dessas transformações foi prevista por PASTEUR em 1861 (segundo Jeanes, 96) e em 1878, VAN TIEGHEM (segundo EGAN, 18) isolou o microrganismo responsável, ao qual deu o nome de *Leuconostoc mesenteroides* (18, 36).

HEHRE (1941) e STACEY (1942) (segundo HEHRE, 25) obtiveram pela primeira vez dextrana na ausência de células, utilizando-se de caldo de cultura de *Leuconostoc mesenteroides*, prevendo a síntese enzimática. Sugeriram ainda a reação geral de síntese do polímero a partir da sacarose da seguinte forma: n Sacarose \rightarrow $(Glicose)_n$ + n Frutose, onde as ligações entre as glicoses seriam do tipo alfa (1,6), prevendo também que a síntese se processava sem intermediários fosfo-

rilados ou reações oxidativas (25). A enzima responsável por esta transformação foi denominada dextrana-sacarase por HESTRIN e AVINERI-SHAPIRO em 1944 (segundo NEELY, 65).

Atualmente dextrana é o termo usado pela literatura para descrever uma classe de polissacarídeos, formados por unidades alfa - D - glucopiranosil, contendo em proporções variáveis ligações alfa - (1,6) alfa - (1,2), alfa - (1,3) e alfa - (1,4). A maioria das dextrinas conhecidas têm uma cadeia principal linear, formada por ligações (1,6), apresentando diversidades quanto à proporção das outras ligações e das ramificações, sendo sintetizadas a partir da sacarose (86). A utilização de outros substratos é sugerida, como a dextrina (7, 8) e também a síntese química de dextrana (64), entretanto, toda a dextrana comercial é sintetizada por via enzimática, na presença ou ausência de células, e usando a sacarose como substrato (83).

ASPINALL (3), numa tentativa de classificação dos polissacarídeos, classifica a dextrana como um homopolissacarídeo de origem bacteriana, formado por uma cadeia principal linear, com ligações alfa - (1,6) podendo apresentar outras ligações glicosídicas e graus de ramificação variáveis.

A enzima dextrana-sacarase, por sua vez, é classificada como sendo um membro das transglicosidases recebendo o nome de: (1,6) - D - glucan - D - Frutose - 2 - D - Glicosiltransferase (E.C. 2.4.1.5). Esta especificação indica que a enzima catalisa exclusivamente a síntese de cadeias de unidades alfa - D Glicopiranosil com ligações alfa (1,6) à partir de sacarose. Esta especificação não dá uma descrição completa da enzima. A existência de algumas variedades de dextranas, com diferentes ramificações (segundo SIDEBOTHAM 86), levou alguns au-

tores a proporem a existência de uma família de dextrana-sacarases.

A unidade de dextrana-sacarase (UDS) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana, em uma hora, liberando 0,52 mg de frutose nas condições de teste: temperatura 30° C e pH 5,2 com tampão acetato (26).

Algumas unidades alternativas foram sugeridas. LAWFORD, KLINGERMEN e WILLIAMS (48) expressam a atividade enzimática em microgramas de açúcar redutor produzidos por minuto por mililitro, a pH 5,5 e temperatura de 30° C. ROBYT e WALSETH (74) definiram a unidade dextrana-sacarase, como a quantidade de enzima que incorpora 1 micromole de D - Glucose na cadeia do polissacarídeo em 1 minuto a pH 5,0 e temperatura de 25° C. Principalmente devido à diversidade de condições entre as definições, a equivalência entre elas não pode ser estabelecida.

KABOLI e REILLY (41) definem uma unidade (U), como sendo a quantidade de enzima que libera 1 micromole de açúcar redutor em 1 minuto, a pH 5,2 e temperatura de 30° C. Neste caso, 1U = 20,27 UDS.

A maioria dos trabalhos se baseiam na definição de UDS, sendo que recentemente muitos trabalhos vem utilizando a definição dada por KABOLI e REILLY.

Uma característica importante na síntese de dextrana está no mecanismo de ação catalítica. A reação não envolve intermediários fosforilados, sendo que a energia necessária para a condensação das unidades glicosídicas é fornecida pela hidrólise da ligação entre a glicose e frutose da molécula da sacarose. Este fato constitui uma diferença fundamental com o mecanismo geral de síntese dos polissacarídeos intracelulares, onde um considerável número de intermediários são utilizados, como é o caso do glicogênio e amido (89). Este mecanismo en-

volvendo somente uma enzima, e sem intermediários, permite a síntese "in vitro" com relativa facilidade, bastando isolar a enzima e colocá-la em contato com a sacarose em condições controladas de temperatura e pH.

Outra particularidade bastante útil no processo de produção é que tanto a dextrana como a dextrana-sacarase são exocelulares, facilitando os processos de extração (81).

Inúmeras bactérias produzem dextrana extracelulares. Estas bactérias são agrupadas na família *Lactobacillaceae* e mais especificamente nos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (86). As características da dextrana dependem muito do microrganismo produtor, principalmente quanto ao tipo de ligação existente e o grau de ramificação. A Tabela 1 mostra alguns microrganismos produtores, e a variação da porcentagem das ligações das respectivas dextranas.

Os problemas causados pela dextrana na indústria açucareira ainda persistem e a tentativa de eliminá-los vem estimulando vários estudos, principalmente visando a produção de enzimas que degradem a dextrana, ou seja as dextranases (53, 55).

A presença de microrganismos nas diversas etapas da produção de açúcar causam ainda hoje, perdas consideráveis. As bactérias da espécie *Leuconostoc mesenteroides* são contaminantes usuais, tendo merecido especial atenção por estarem relacionadas com a presença de dextrana nos caldos de cana (4). A atividade desses microrganismos comprometem o rendimento global do processo pelos seguintes motivos: 1) consomem parte do açúcar para se multiplicarem; 2) produzem grandes quantidades de ácidos orgânicos que podem hidrolisar a sacarose, o que além de diminuir o rendimento, aumenta os gastos com hidróxidos na

etapa de neutralização; 3) produzem enzimas capazes de sintetizar polissacarídeos, principalmente dextrana, determinando mais perdas de sacarose (19, 29, 33).

Tabela 1: Porcentagem de ligações alfa entre os resíduos glicosídeos das dextranas de diferentes linhagens de microrganismos (86)

Microrganismo	DEXTRANA			
	% de ligações entre os resíduos D-glicopiranosil			
	1 - 6	1 - 4	1 - 3	1 - 2
L. mesenteroides				
NRRL B - 512	95	-	5	-
B - 523S	93	3	4	-
B - 742S	64	8	28	-
B - 742L	95	4	-	-
B - 1064	95	2	3	-
B - 1299S	56	-	7	36
B - 1299L	49	-	19	32
B - 1355S	53	-	47	-
B - 1375	84,5	1	14,5	-
B - 1415	87	12,5	0,5	-
B - 1416	83	7	10	-
IFO 12370	94	-	6	-
SF4	95	-	5	-
44	71	-	29	-
S. mutans				
OMZ 176	16	-	84	-
Ingbritt A	37	-	62,5	-
S. Sanguis				
804	52	-	48	-
Complexo Tibi	90	1,5	8,5	-

Além da sacarose consumida na sua síntese, a dextrana provoca um aumento da viscosidade do caldo, dificultando etapas de clarificação, filtração e bombeamento (13, 14). A dextrana também interfere na cristalização da sacarose retardando o processo e deformando os cristais pelo alongamento do eixo 'C' (88). O açúcar contendo alto teor de dextrana é considerado de baixa qualidade. Este açúcar é de difícil cristalização, apresentando também uma maior higroscopicidade, dificultando a secagem e armazenamento.

COLL, CLARKE e ROBERTS (13), analisando açúcares de diferentes países mostram que a sacarose produzida no Brasil apresenta um teor elevado de dextrana, quando comparado aos demais, e sua cristalização é bastante difícil.

Outro aspecto adverso da dextrana, que tem despertado o interesse das pesquisas, é a relação desse polissacarídeo com as cáries dentárias. As bactérias da espécie *Streptococcus mutans*, componente da flora bucal humana, têm algumas características que as tornam um dos principais agentes na formação das cáries (63). Esses microorganismos produzem grandes quantidades de ácido láctico e dextrana insolúvel em água. Esta dextrana se fixa no esmalte dos dentes servindo de suporte para as bactérias, formando a chamada placa bacteriana. O ácido produzido pelos microorganismos da placa provocam a desmineralização dos dentes, dando início à cárie dentária. Baseados nesses fatos, alguns pesquisadores têm tentado combater às cáries dentárias através de vacinas à base de dextrana-sacarase de *Streptococcus mutans*, que induz a produção de anticorpos antidextrana-sacarase, impedindo assim a formação de dextrana na cavidade oral (86).

2. DEXTRANA

2.1. PRODUÇÃO

As condições de cultura para produção de dextrana têm sido estudadas com diferentes microorganismos, principalmente os da espécie *Leuconostoc mesenteroides*. WHITESIDE-CARLSON e colaboradores (99, 100, 101) estudaram as exigências vitamínicas para crescimento e produção

de dextrana em diversas linhagens de **Leuconostoc mesenteroides** e **Leuconostoc dextranicum**. GARVIE (21) testou 63 linhagens de **Leuconostoc mesenteroides** quanto à necessidade de vitaminas e aminoácidos.

Alguns fatores de inibição da produção de dextrana foram identificados como a sulfanilamida (100) e um composto semelhante à metionina (24). MAYEUX e COLMER (54) mostraram que o nitrato de sódio em baixas concentrações inibem outras bactérias sem, contudo, afetar o **Leuconostoc mesenteroides**. Esta espécie não necessita de oxigênio para seu crescimento, sendo uma bactéria aeróbica facultativa. Uma aeração leve acelera o crescimento (40), entretanto o oxigênio também pode afetar o metabolismo do **Leuconostoc mesenteroides** (32).

JEANES (35) testou 96 linhagens de **Leuconostoc mesenteroides**, produtores de dextrana, mostrando que além das condições de cultura, as características do produto final dependem do microrganismo.

Apesar de se conhecer inúmeros microrganismos produtores de dextrana, a maioria dos processos industriais utilizam o **Leuconostoc mesenteroides** e mais especificamente a linhagem NRRL B - 512 (83). A produção de dextrana com esta linhagem atualmente é conduzida por dois processos distintos: o método convencional e a síntese enzimática, utilizando enzima purificada.

a) Processo Convencional de Produção de Dextrana

Tradicionalmente a dextrana é produzida durante o crescimento de **Leuconostoc mesenteroides** em meio de cultura contendo sacarose e enriquecido com outros nutrientes. É um processo simples, exigindo poucos controles além da temperatura. As condições de cultura estabelecidas por alguns pesquisadores (34, 37, 38) alcançaram bons rendimentos e têm servido de base para a produção industrial. JEANES (36)

descreve as condições de cultura para a produção de três diferentes dextranas, sendo duas hidrosolúveis (NRRL B-512 e B-1146) e uma insolúvel em água (B - 523).

Para o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512 (36), as condições de cultura são as seguintes:

- Meio de cultura, em gramas por litro de água destilada: sacarose 100, extrato de levedura 2,5, sulfato de magnésio heptahidratado 0,20, fosfato de potássio monobásico 5,0 e pH inicial ajustado em torno de 7,0.
- A temperatura é mantida a 25° C durante toda a fermentação. A oxigenação não se mostrou favorável, bem como a tamponação do meio com carbonato de cálcio (34).
- O pH cai de 7,0 para 4,8, quando a fermentação é interrompida. Este ponto coincide com o pico de máxima viscosidade. O tempo varia de 18 a 30 horas. Para se extrair a dextrana, o meio fermentado é diluído em água, centrifugado para separação das células e em seguida a dextrana é precipitada pela adição de etanol (até 45% v/v). Recuperado por centrifugação, o produto é dissolvido em água e novamente precipitado com álcool. O rendimento, em relação à sacarose inicial chega próximo à 25%. O produto final recebe o nome de dextrana nativa. Nestas condições, a dextrana é um polímero de alto peso molecular, podendo alcançar até cem milhões de daltons. Para os fins clínicos, principal uso de dextrana, a dextrana nativa passa por processos de hidrólise e fracionamento para se chegar no final com um produto de peso molecular baixo e uniforme.

Alguns trabalhos mostram a possibilidade de se produzir, diretamente no meio de cultura, dextrana de baixo peso molecular, alte-

rando algumas condições como a concentração inicial de sacarose, adição de outros açúcares ou oligossacarídeos de baixo peso molecular, inclusive dextrana hidrolisada (64). Variando-se a concentração de sacarose entre 20 e 80% e adição de sacarídeos como glicose, frutose, maltose, oligossacarídeos ou dextrana, é possível produzir diretamente no meio de cultura, dextrana com peso molecular variando de 10 000 a 300 000. A seguinte fórmula foi sugerida por BEHRENS e colaboradores (segundo ALSOP, 2), para calcular a massa molecular do produto final:

$$M1 = M2 (1 + C1 / C2)$$

onde: M1= peso molecular do produto final (dextrana)

M2= peso molecular da dextrana adicionada

C1= concentração inicial de sacarose

C2= concentração do produto final

ALSOP (2) relata as condições industriais utilizadas atualmente para se produzir dextrana. A concentração de sacarose de 17% é a que proporciona o maior rendimento. A temperatura varia durante a fermentação de 25 a 30° C. Nesse caso não é usada a adição de outros açúcares e o produto final é a dextrana nativa. Este trabalho confirma as citações de outros autores (64), nas quais os processos de produção de dextrana não têm sofrido modificações significativas. Apesar de inúmeras patentes terem sido registradas, propondo refinamentos e mudanças no processo, a maioria da dextrana comercial ainda hoje é produzida pelo processo convencional.

b) Produção de Dextrana Via Enzimática

Este processo é conduzido em duas etapas: a produção da enzima e a síntese da dextrana. A síntese da dextrana "in vitro" apresenta um potencial econômico enorme, devido a algumas características da en-

zima: é uma enzima extracelular e para sintetizar dextrana não necessita de energia adicional (28) e além disso, a reação é irreversível. As vantagens desse processo são apontadas por JEANES (38, 39): simplificação do processo de purificação, melhores condições de controle da síntese e maior rendimento.

A síntese "in vitro" vem sendo estudada desde 1941 (46), quando a enzima foi descoberta. O rendimento teórico da síntese é de 100% em relação à glicose. No entanto, em condições industriais o rendimento é menor, diminuindo com o aumento da concentração inicial de sacarose, fornecendo, neste caso, quantidades significativas de produtos secundários. Um detalhe importante é que mesmo utilizando-se da síntese na ausência de células, industrialmente a dextrana produzida é de alto peso molecular, exigindo as etapas de hidrólise e fracionamento para os usos farmacêuticos (2).

A produção mundial de dextrana está estimada em 2000 toneladas anuais (30). Os principais países produtores são: Alemanha Ocidental, Canadá, Estados Unidos, Inglaterra, Holanda, Japão, URSS e Suíça (82, 98).

2.2. PROPRIEDADES

Uma característica comum a toda dextrana é a composição química. A dextrana é um homopolissacarídeo formado por unidades D-glucopiranosil. Os tipos de ligações presentes variam de acordo com o microrganismo produtor. A dextrana produzida pela linhagem NRRL B-512 apresenta somente dois tipos de ligações: alfa (1,6) e alfa (1,3) (65). O polímero é formado por uma cadeia principal com ligações alfa (1,6), com ramificações em alfa (1,3). As cadeias secundárias contêm

poucas unidades, sendo que 40% contêm somente uma, 45% duas e somente 15% contêm mais de duas unidades monoméricas (47). Estas cadeias ligadas à cadeia principal, através de ligações alfa (1,3), são formadas por ligações alfa (1,6), sendo constatadas algumas com até 50 unidades (86).

O tamanho das moléculas pode variar dependendo da temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares durante a reação de síntese (76, 80). A dextrana nativa apresenta em média, um peso molecular entre 40 e 50 milhões de daltons, nas condições industriais atualmente utilizadas.

As propriedades da dextrana em solução são bastante específicas, sendo o que realmente a diferencia dos outros polissacarídeos. POWELL (70) faz um apanhado geral destas propriedades. A dextrana de *Leeuconostoc mesenteroides* (NRRL B-512) é bastante solúvel em água a quente e a frio. Em solução não tem a tendência de adotar uma conformação ordenada, devido à flexibilidade das ligações da cadeia principal. A interação entre as moléculas também é dificultada pelas estruturas das ramificações. Isto faz com que a viscosidade intrínseca seja extremamente baixa. O comportamento viscoso é bastante peculiar e até 5% (p/v) uma solução de dextrana apresenta-se como um fluido newtoniano. A figura 1 mostra esse comportamento comparado com outros polissacarídeos microbianos e alginato de sódio.

Esse fenômeno é atribuído à grande flexibilidade da cadeia principal e à ausência de interações entre as moléculas (69).

Outra característica própria da dextrana é a rotação ótica de aproximadamente +200° em solução aquosa (3 a 10%). Em formaldeído, JEANES (34) mostra que esta característica está relacionada com as li-

gações alfa (1,3). Esta constatação foi feita medindo-se a rotação ótica a 20° C, para dextranas com variadas porcentagens de ligações alfa (1,3).

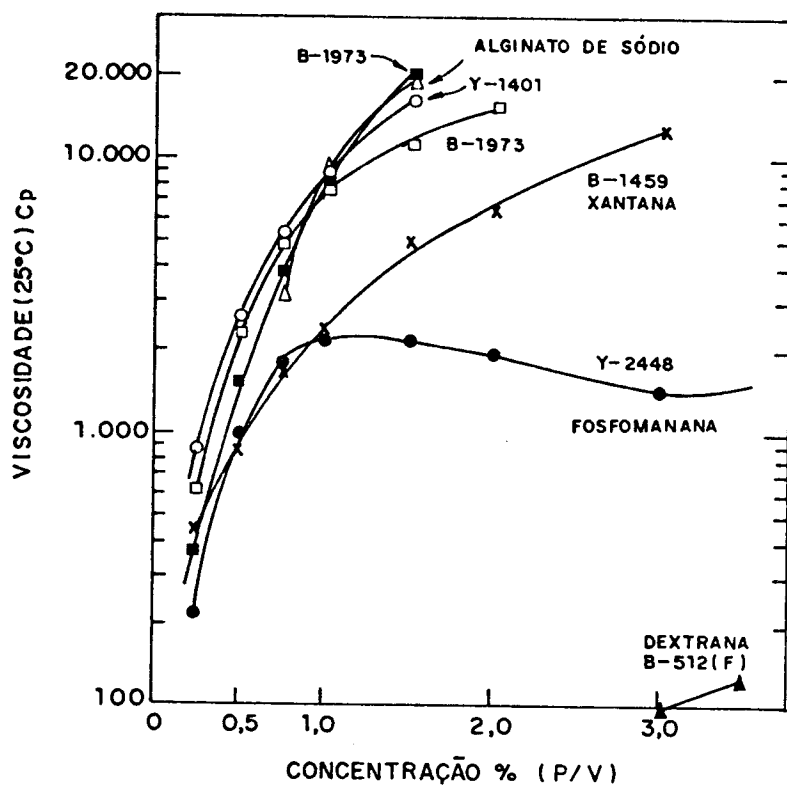


Figura 1: Viscosidade versus concentração das dispersões aquosas de polissacarídeos microbianos e alginato de sódio. Viscosidade medida com viscosímetro Brookfield LVT a 30 rpm (39).

A capacidade de complexar íons metálicos é outra importante propriedade da dextrana, e aparentemente está relacionada com os grupos 3-hidroxil das ramificações (83).

2.3. USOS

O uso dos polissacarídeos, em geral, está baseado na capacidade que estes têm de alterar as propriedades básicas da água, podendo também exercer funções de estabilizantes, emulsificantes, floculantes, lubrificantes, etc (81).

As fontes tradicionais de polissacarídeos são os vegetais e algas. Entretanto, nos últimos anos as fontes microbianas vêm substituindo rapidamente as fontes convencionais (98). A expansão do uso de polissacarídeos microbianos cresceu bastante, devido a um programa desenvolvido por laboratórios americanos, iniciado por volta de 1945, com a finalidade de produzir dextrana para usos clínicos. O programa, concluído na década de 60, trouxe um desenvolvimento significativo na produção de biopolímeros, conseguindo linhagens mais produtivas e ainda a descoberta de novos produtos como a xantana (83).

A dextrana, que já vinha sendo usada na formulação de substitutos de plasma sanguíneo, teve um grande impulso na sua comercialização, surgindo inúmeras patentes propondo diferentes aplicações, algumas com enorme sucesso comercial. A Tabela 2 mostra alguns dos usos da dextrana e a Tabela 3 dos seus derivados.

NEELY (65) dá uma listagem das patentes registradas para dextrana e derivados até 1960. Um grande número de pesquisas foram conduzidas, mostrando os usos potenciais da dextrana, sendo este grupo de polissacarídeos exaustivamente estudado. Apesar deste enorme potencial apontado, somente alguns produtos se desenvolveram, alcançando sucesso comercial (64). Isto se deve ao fato de que os vários polissacarídeos conhecidos apresentam propriedades semelhantes, podendo ser substituídos em muitos casos. Dessa forma, o custo de produção pode determinar

o uso de um determinado produto em detrimento de outro. Por outro lado, algumas características específicas e únicas de uma substância, dificultam sua substituição, garantindo seu espaço nas aplicações industriais. A dextrana, devido às suas particularidades, vem sendo usada em alguns casos, há vários anos com sucesso, onde não se encontram substitutos adequados (98). Alguns usos da dextrana e derivados são mostrados nas Tabelas 2 e 3. Destacaremos a seguir, aqueles de maior importância comercial.

- Indústria Farmacêutica - A dextrana de baixo peso molecular (< 75000) apresenta duas características importantes para os fins clínicos: é completamente metabolizada no organismo e não apresenta efeitos tóxicos ou alérgicos. Estes efeitos aparecem, por outro lado, com a dextrana de alto peso molecular, ou com alto grau de ramificação. Por isso, a dextrana produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512 é a única usada para os fins clínicos, os quais ultrapassam 300 aplicações (64). As aplicações de maior importância comercial na indústria farmacêuticas são as seguintes:

a) Expansor de plasma sanguíneo - Em solução salina isotônica a 6% p/v a dextrana de baixo peso molecular apresenta propriedades coloidais, osmóticas e reológicas, semelhantes às proteínas do plasma. Este produto foi introduzido há mais de trinta anos, como substituto do plasma sanguíneo, nos tratamentos de choque (2). Dois produtos são normalmente usados, um com dextrana de peso molecular médio de 70 000 daltons e o outro de 40 000 (83). Uma infusão de dextrana de 70 000 reduz o hematócrito e deprime o fibrinogênio, por outro lado aumenta a viscosidade e promove uma expansão volumétrica do plasma sanguíneo. A dextrana de 40 000 daltons tem um poder de expansão limitado, mas melhora a

fluidez do sangue, auxiliando a circulação nos vasos capilares (64).

b) Dextrana - Sulfato - Vários produtos, preparados por diferentes rotas, têm sido usados. A característica principal desses produtos é a propriedade anticoagulante, fato bastante útil na medicina (64).

c) Dextrana - Ferro - Vários carboidratos foram usados na tentativa de se produzir soluções de ferro estáveis, que pudessem ser injetadas em seres humanos. O sucesso só veio com a utilização de dextrana. O complexo formado da dextrana com íon Fe^{++} é estável e tem sido utilizado com sucesso no tratamento de anemias em animais e seres humanos (2).

- Indústria Química - Redes moleculares - Gel de dextrana com ligações cruzadas.

Juntamente com os usos farmacêuticos esta é uma das mais bem sucedidas aplicações da dextrana. A reação da dextrana com algum composto, forma um gel insolúvel e hidrofílico, usado na fabricação de redes moleculares. As ligações cruzadas podem ser feitas por produtos como epícloridrina, derivado de epoxi, DEAE, etc (64). Os produtos mais conhecidos são o SEPHADEX e DEAE-DEXTRANA, usados para enchimentos de colunas em cromatografia de exclusão molecular (83).

- Extração de Petróleo - A dextrana é utilizada para compor a lama de perfuração e também na recuperação secundária do petróleo. Neste caso, podem ser utilizados outros polissacarídeos, entretanto, o volume de material utilizado é muito grande com uma tendência de crescimento acentuada (98). Em Cuba, na década de 60, praticamente toda a dextrana produzida era destinada à extração de petróleo (52).

Tabela 2: Usos da dextrana (64)

Produto	Função
I- Indústria Farmacêutica	
. Crioprotetor	. diminui os danos causados pelo congelamento em materiais biológ.
. Raio - X	. agente de suspensão
. Comprimidos	. agente ligante e de solubilização
. Cosméticos	. emulsificante e estabilizante
. Plasma Sintético	. expansão volumétrica
II- Indústria de Alimentos	
. Doces e Xaropes	. inibe a cristalização, promove a homogeneização e espessamento
. Geléias e chicletes	. agente gelificante
. Sorvetes	. inibe a formação de cristais e mantém o volume
. Composição de cobertura (confeitaria)	. agente estabilizante
. Pudim	. espessante
III- Extração de Petróleo	
. Lama de perfuração	. colóide de proteção e lubrificação
. Fluidos de Extração	. evita perda de água
IV_ Outros	
. Produção de alumínio	. agente de sedimentação
. Produção de pó metálico	. evita o crescimento de cristais formando gel precipitante
. Produção de soda	. precipitação de impurezas através de complexos
. Produção de combustível nuclear	. agente complexante

Tabela 3: Usos de derivados da dextrana (64)

Derivados da Dextrana	Função (usos)
- Esteres	
. Triacetato	. composição de filmes para embalagens
. Palmitatos e esteratos	. impermeabilizantes, regeneração de celulose
	. ligantes entre placas metálicas e polietileno
. Sulfato-Dextrana	. tratamento de bócio, úlcera péptica
	. anticoagulante
	. composição de emulsão fotográfica
. Dextrana-Fosfato	. gomas de alta viscosidade
	. inibição de atividade peptídica
. Dextrana-Nitrato ou nitrato-sulfato	. explosivos e propelentes géis
- Benzil-Dextrana	. uso medicinal
- Hidroalquildextrana	. expansor de plasma sanguíneo, com qualidades de estocagem melhoradas
- Carboximetil-Dextrana.	. ligantes em medicamentos (comprimidos)
. Ácido ou sal	. espessamento em xaropes, estabilizante em sorvetes
	. carreador de princípios ativos - antibióticos, pesticidas
	. emulsificante de tintas
	. filmes para embalagem biodegradável
	. gel aquoso e organogéis
	. estabilizante de sucos
	. medicamento de relaxamento com efeito retardado
- Dialdeído-Dextrana	. prolonga a reação de drogas como a novocaína e tubazina
- Iodo-Dextrana	. tratamento de bócio - solúvel em água, não tóxico e não alérgico
- Ferro-Dextrana	. tratamento de anemia

3. DEXTRANA-SACARASE

3.1. PRODUÇÃO

a) Microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F)

Esta bactéria pertence à família *Lactobacillaceae*, gênero *Leuconostoc*, espécie *Leuconostoc mesenteroides* (86). Segundo a classificação proposta por GARVIE (20) pertencente ao grupo VI.

A linhagem NRRL - B 512 foi isolada em 1941 por BENEDICT R. G. em cervejaria (34). As células são esféricas ou achatadas em forma de lentilhas, com dimensões aproximadas de 0,5 - 0,7 μm por 0,7 - 1,2 μm . É gram positiva, aeróbica facultativa e não apresenta características patogênicas. É uma espécie quimiorganotrófica, exigindo um meio bastante rico. Os amino ácidos, valina e ácido glutâmico são essenciais (21). Outros fatores de crescimento também são essenciais: tiamina, ácido pantotênico e ácido nicotínico (2).

A dextrana-sacarase produzida por esta espécie é uma enzima indutiva, e o único indutor conhecido é a sacarose (66), que também serve como fonte de carbono. A utilização de outros açúcares, glicose, frutose, manose, lactose, etc, promove um crescimento vegetativo normal, no entanto não há produção de enzima (49).

b) Condições de Cultura para Produção de Dextrana-sacarase

TSUCHIYA e colaboradores (94), analisaram a influência de diversos fatores na produção de dextrana-sacarase. A concentração de sacarose variando de 0,5 - 5% aumenta a atividade enzimática máxima, de 6 a 120 UDS/ml, no entanto, acima de 2% há uma indesejável produção de dextrana, dificultando a separação das células pelo aumento excessivo da viscosidade. Dessa forma, os autores consideram 2% a concentração

ótima.

Quanto ao nitrogênio, o aumento da atividade enzimática ocorre, quando há um aumento simultâneo da concentração da fonte de nitrogênio e de fosfato. Como fonte de nitrogênio foi utilizado água de maceração de milho, que supre também as necessidades de vitaminas e outros fatores de crescimento. A substituição parcial do nitrogênio por fosfato de amônia resultou numa queda acentuada da atividade enzimática, na medida em que se aumentava a concentração de íons amônio (94).

Os testes de pH mostraram que a produção de dextrana-sacarase é bastante sensível à este parâmetro, sendo o ótimo em torno de 6,7.

Temperaturas acima de 25° C resultaram em atividades baixas.

O meio de cultura foi suplementado com uma solução de sais, denominada 'R' sais (46), de forma que no meio contivesse 0,27% de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,01% de cloreto de sódio, 0,01% de sulfato ferroso e 0,01% de sulfato de manganês. KOEPSEL e TSUCHIYA (45), em condições semelhantes, produziram dextrana-sacarase, atingindo no meio um máximo de 50 UDS/ml.

HEHRE (26), usando o meio básico proposto por TSUCHIYA e variando a concentração de sacarose e de fosfato de potássio entre 2 e 3%, relata atividades entre 90 e 120 UDS/ml com 24 horas de fermentação à 25° C. Como fonte de nitrogênio foi usado extrato de levedura ou água de maceração de milho a 0,5%.

ROBYT e WALSETH (75) estudaram o efeito do cálcio na produção de dextrana-sacarase, mostrando que em concentrações entre 0,001 - 0,1%, a atividade enzimática chegava ao dobro do controle sem cálcio. Concentrações de cálcio acima de 0,1% mostravam um efeito contrário, afetando o crescimento e diminuindo a atividade enzimática.

LOPES (49) observa que a adição de cálcio não influi na produção de enzima. Por outro lado, a estabilidade da enzima purificada é sensivelmente melhorada pela adição de cloreto de cálcio a 0,05%.

TOMCZAK (93) analisa diferentes meios de cultura com relação aos amino ácidos, sais, fonte de nitrogênio e carbono. As condições ótimas relatadas são semelhantes às aquelas relatadas por outros autores, com exceção dos íons amônio, onde o autor mostra que sais de amônia a baixas concentrações aumenta a produção de dextrana-sacarase. De ve-se ressaltar, neste caso, que o autor utilizou outra linhagem, o *Leuconostoc mesenteroides* L.C.M.1.

O fosfato tem sido usado com a função de controlar o pH. Mesmo quando o controle é automático, há a necessidade de uma certa quantidade de fosfato, para evitar oscilações bruscas de pH (49). O consumo de fosfato foi analisado por ROREM (79). Em seu trabalho o autor mostra um maior consumo de fosfato pelas células associadas à produção de polissacarídeos, quando comparadas às células não associadas.

As concentrações de fosfato, usadas na produção de dextrana-sacarase, variam bastante, estando em geral entre 1 - 2 %. LAWFORD, KLINGERMAN, e WILLIAMS (48) mostram que, em condições de pH controlado, a variação do fosfato entre 0,1 e 1% não interfere na produtividade.

A solução de sais proposta por KOEPEL e TSUCHIYA (45), os 'R'sais, têm sido usados por quase todos os pesquisadores. Além desses sais, o cálcio também é adicionado, sendo que alguns trabalhos mostram um aumento na produtividade (74), enquanto outros não encontraram qualquer aumento na produção de dextrana-sacarase com a adição de cálcio (49).

Por outro lado, o efeito estabilizador do cálcio foi consta-

tado por alguns pesquisadores (32, 41). LAWFORD, KLINGERMAN e WILLIAMS (48) relatam que a dextrana-sacarase é irreversivelmente desnaturada, quando incubada por muito tempo na ausência de cálcio. Em recente trabalho, MILLER e ROBYT (57) mostram que o cálcio, em concentrações de até 1 mM, ativa a enzima, aumentando o V_{max} e decrescendo o K_m para a sacarose. Acima de 1 mM o cálcio age como um inibidor competitivo, com $K_I = 59$ mM. Os autores também comprovaram que, apesar de agir como ativador, o cálcio não é necessário na síntese de dextrana. Como resultado deste trabalho, os autores propõem um mecanismo, onde a dextrana-sacarase possui dois sítios, nos quais o cálcio atua: um, onde a presença do cálcio ativa e outro, onde inibe.

O *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria aeróbica facultativa, desenvolvendo bem em anaerobiose. ITO e outros (32), estudando o metabolismo da glicose em *Leuconostoc mesenteroides*, mostram que em aerobiose o consumo de glicose é maior, diminuindo a formação de álcool. Por outro lado, aumenta a produção de acetato e lactato, evidenciando a inibição de alguma enzima. Além disso, a produção de dextrana-sacarase é favorecida pela agitação (94). ALSOP (2) num estudo mais abrangente, mostra que a injeção de oxigênio puro, ou de dióxido de carbono inibe o crescimento, mas quando pequena quantidade de ar é injetada, a produção de dextrana é maior. Sem aeração alguma observa-se um bom crescimento, porém a produção de enzima é um pouco menor.

Os trabalhos desenvolvidos entre 1945 e 1970 estabeleceram as bases de produção de dextrana-sacarase por fermentação descontínua (batelada). A otimização das condições de cultura, estudada através dos trabalhos de pesquisa de HEHRE (25, 26), JEANES (34 a 39) TSUCHIYA (94 a 96) e colaboradores trouxeram um razoável aumento da produtivi-

dade de dextrana-sacarase, entretanto não conseguiram ultrapassar o teto de 120 UDS/ml, ficando em média com 50 a 70 UDS/ml no meio de cultura. A inovação introduzida por LOPES (49) deu um grande salto na produção de dextrana-sacarase. LOPES, utilizando-se de um sistema semi-contínuo com adição contínua de sacarose, conseguiu obter as maiores concentrações de dextrana-sacarase, até então relatadas. O meio de cultura utilizado foi praticamente o mesmo usado por TSUCHIYA e colaboradores (94). A produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides* se dá por indução, observando o autor, que esta só se dava, quando no meio a sacarase estivesse acima de um certo limite. Com a temperatura de 27°C e adição contínua de sacarose, na razão de 20g/l. h, foi atingida uma atividade de 180 UDS/ml no meio de cultura com 10 horas de fermentação, o que representa uma produtividade bem superior às anteriores, relatadas por outros pesquisadores (26, 96, 37).

Baseados nos trabalhos de LOPES (49), outros pesquisadores otimizaram o processo conseguindo praticamente dobrar a produtividade, alcançando no final da fermentação, atividades em torno de 300 UDS/ml (2). O desenvolvimento da fermentação, em condições otimizadas, está apresentado na Figura 2.

De acordo com a literatura (2), as condições ótimas para produção de dextrana-sacarase podem ser assim resumidas:

- Meio de Cultura

- . Extrato de Levedura ou AMM - 20 g/l - serve como fonte de nitrogênio, vitaminas e demais fatores de crescimento.
- . Sacarose - 20 g/l no início, e controlada com adição contínua, de forma a manter uma concentração de 10 - 20 g/l durante a fermentação.

- . Fosfato de Potássio - 20,0 g/l
- . Sulfato de Magnésio - 0,2 g/l
- . Sulfato de Manganês - 0,01 g/l
- . Sulfato Ferroso - 0,01 g/l
- . Cloreto de Sódio - 0,01 g/l
- . Cloreto de Cálcio - 0,05 g/l
- Temperatura - 23 - 27° C.
- pH - 6,7 - controlado pela adição de hidróxido de sódio.
- Aeração - + 0,1 VVM (ar estéril)
- Agitação - 100 - 200 rpm - o suficiente para manter a homogeneidade e evitar a sedimentação.

A produção de dextrana-sacarase por fermentação contínua, tem sido pouco estudada, sendo raras as referências sobre o assunto (2).

LAWFORD e colaboradores (48) estudaram a produção contínua de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512, tendo como substrato limitante a sacarose. Com taxas de diluição abaixo de 0,2/h não se conseguiu nenhuma atividade enzimática no efluente. Acima deste valor, a concentração de enzima aumentou até atingir um máximo de aproximadamente 9,0 UDS/ml com 0,53/h de taxa de diluição. Baseado no fato de que a produção de dextrana-sacarase por esta linhagem é indutiva, os autores concluem, que a fermentação contínua não é o melhor método para se produzir a enzima.

Estes resultados parecem ter desestimulado o estudo com fermentação contínua, entretanto, em recente trabalho PAUL e colaboradores (68), usando a mesma linhagem conseguiram resultados surpreendentes, na produção contínua de dextrana-sacarase. Os resultados deste trabalho, mostraram uma produtividade alta, bem superior à conseguida

por LAWFORD. A concentração máxima de enzima 70 UDS/ml, foi atingida na taxa de diluição de 0,4/h, o que resulta numa produtividade aproximadamente três vezes superior àquelas conseguidas com fermentação semi-contínua (adição contínua de sacarose). As condições de cultura foram semelhantes, havendo, entretanto, algumas diferenças com as condições de LAWFORD, quanto à temperatura e composição do meio de cultura. LAWFORD com $T = 25^{\circ}\text{C}$, fosfato = 1 g/l, sacarose = 10 g/l (51), extrato de levedura = 4 g/l e 10g/l de caseína hidrolizada. PAUL com $T = 25^{\circ}\text{C}$, fosfato = 20 g/l, sacarose = 20 g/l e extrato de levedura = 20 g/l.

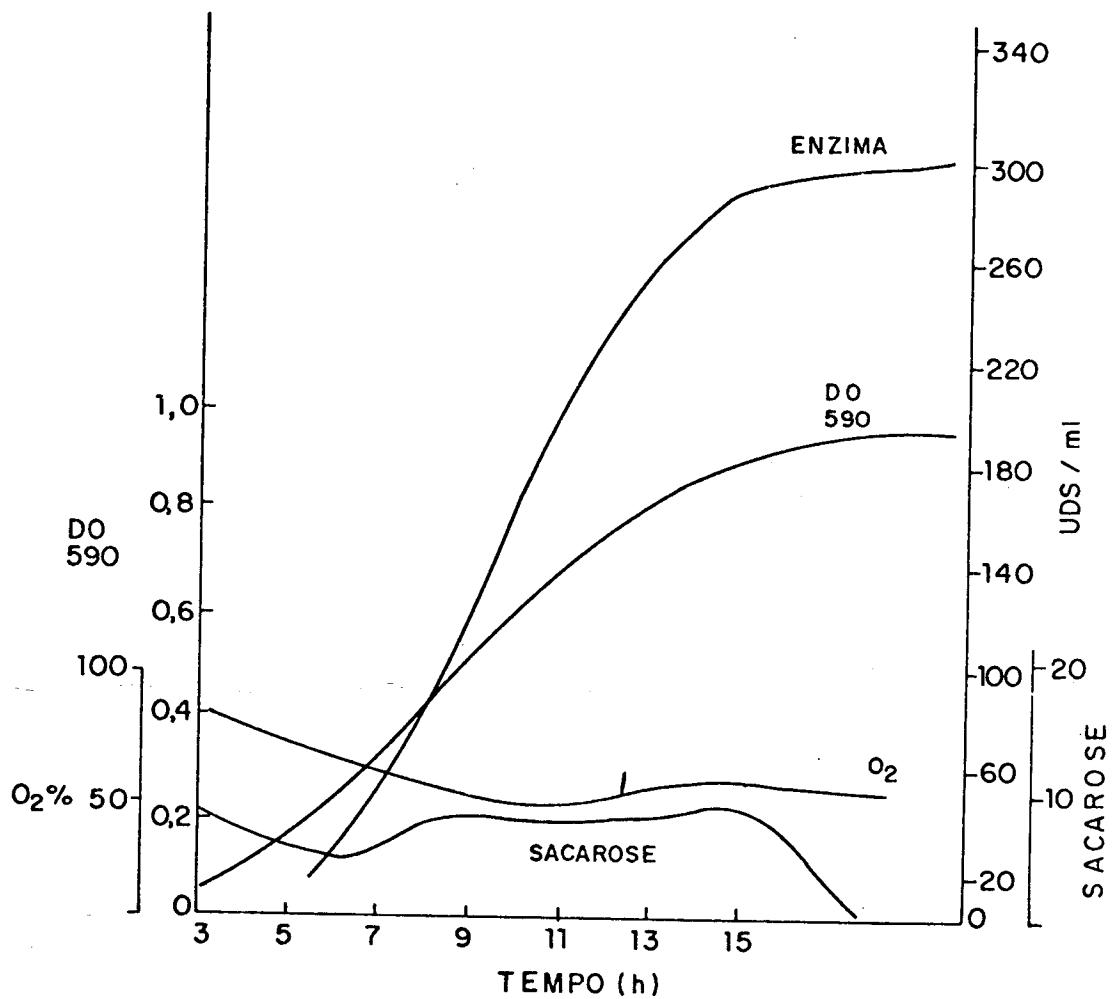


FIGURA 2: Condições ótimas de fermentação para produção em batelada de dextrana-sacarase ($\text{pH} = 6,7$, $T = 23^{\circ}\text{C}$, Aeração = injeção de ar). Evolução da atividade enzimática, crescimento celular, sacarose e concentração de oxigênio durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* NRR B - 512 (F) (2).

Os resultados mostrados por PAUL e colaboradores (68) abrem uma perspectiva animadora para a produção de dextrana-sacarase em condições contínuas.

3.2. PROPRIEDADES

A dextrana-sacarase, dentre as várias enzimas que catalizam a síntese de polissacarídeos, é uma das raras exceções que não exigem a presença de cofatores e intermediários fosforilados de alta energia. A energia necessária à condensação das unidades glicosídicas é obtida da hidrólise da sacarose (81).

A dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* é bastante estudada e suas propriedades estão razoavelmente determinadas, principalmente as da enzima elaborada pela linhagem NRRL B-512.

Quanto à especificidade, durante alguns anos a sacarose era o único substrato conhecido, levando alguns pesquisadores a afirmar que a dextrana-sacarase era absolutamente específica, capaz de polimerizar grupos d-glicosídeos somente à partir de sacarose (26, 27). Estudos recentes mostram que alguns compostos contendo uma ligação alfa-D-glicosídica, com energia similar à da sacarose servem como substrato para a dextrana-sacarase (8). Contudo, a sacarose é o substrato usado para toda produção industrial de dextrana, sendo que praticamente todos os estudos se referem à síntese de dextrana tendo como substrato a sacarose.

A dextrana-sacarase cataliza a síntese de dextrana numa ampla faixa de temperatura, desde valores em torno de 0° C até próximo de 40° C (17, 42, 44), sendo que a atividade máxima ocorre por volta de 30° C (26).

Quanto ao pH a literatura mostra que a enzima é mais ativa na faixa de 5,0 a 6,0, com um ótimo em torno de 5,2. Alguns trabalhos com enzima purificada apresentam valores diferentes para o pH de máxima atividade. KOBAYASHI e MATSUDA (43) mostram que a enzima é ativa na faixa de pH entre 4,0 e 8,0 com o ótimo em 6,0. MILLER, EKLUND e ROBYT (58) apresentam valores próximos, faixa de 4,0 a 7,5, com o ótimo em 5,5. Já outros pesquisadores não observaram mudanças no pH de máxima atividade para a enzima purificada (41).

A concentração de sacarose, influência bastante a velocidade da reação, sendo que a velocidade máxima é atingida em concentrações baixas, próximas de 2 mM, acima desses valores ocorre uma inibição da enzima pelo substrato (17). A figura 3 ilustra o efeito da concentração de sacarose e da temperatura na velocidade da reação.

A energia de ativação da reação, ainda não está bem estabelecida, encontrando-se na literatura valores bastante dispersos, de 5,0 a 11 Kcal/mol, na faixa de temperatura de 15 a 30° C (41).

A enzima crua e liofilizada retém a atividade por vários anos, quando estocada a temperaturas abaixo de 5° C (26). Em solução, vários fatores influenciam na estabilidade da enzima, sendo a temperatura e o pH dois parâmetros fundamentais. Alguns autores mostram que acima de 25° C a enzima, em solução, perde a atividade rapidamente, com um tempo de meia vida de 3 minutos a 35° C, 13 minutos a 30° C e aproximadamente 2 horas a 27° C (12, 41). ROBYT e WALSETH (74), mostram que mesmo a temperatura de 4° C e -15° C, em solução, a enzima é instável, podendo perder 50% da atividade em 2 dias. Entretanto a temperaturas abaixo de 4° C outros pesquisadores relatam que em solução, a enzima apresenta maior estabilidade (49).

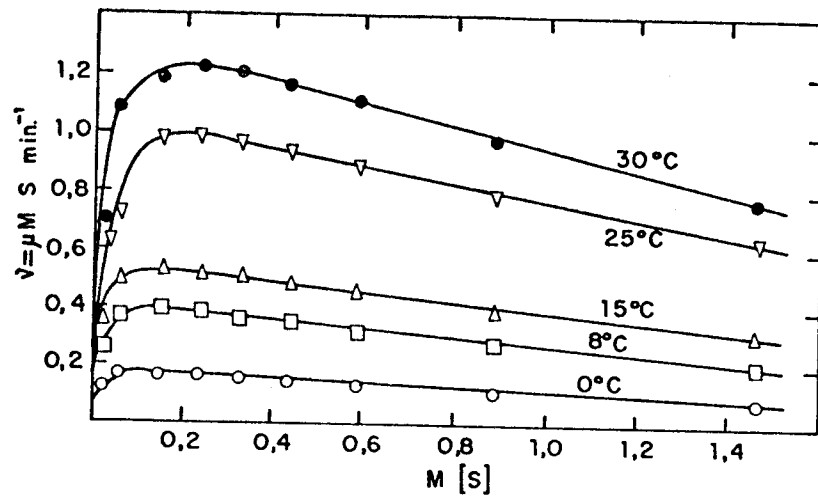


Figura 3: Velocidade inicial da reação de síntese da dextrana versus concentração de substrato à diferentes temperaturas (17).

A sensibilidade da dextrana-sacarase quanto ao pH é bastante grande, apresentando maior estabilidade entre 5,0 e 6,0, coincidindo com a faixa de atividade máxima, sendo rapidamente desnaturada fora desta faixa. Para preparações de enzima purificada alguns autores relatam, que a faixa de estabilidade pode se alterar ligeiramente. KOBAYASHI e MATSUDA (43), mostram que a enzima purificada é mais estável para pHs entre 6,0 e 9,0.

A presença de dextrana aumenta a estabilidade da enzima, além de ativá-la (43, 74). Num trabalho mais abrangente, MILLER e ROBYT (56) mostram que além da dextrana, outros polímeros neutros como o polietileno glicol, metil-celulose e detergentes neutros aumentam significativamente a estabilidade da dextrana-sacarase. O efeito estabilizante dos polímeros neutros é proporcional ao peso molecular. A concentração apresenta um valor crítico, onde começa o efeito estabilizante e outro ponto onde a estabilização é completa. Para a dextrana,

as concentrações exigidas para a completa estabilização , foram bem menores, comparado aos outros polímeros testados.

ITAYA E YAMAMOTO (31), sugeriram ser a dextrana-sacarase uma metaloenzima, exigindo íons metálicos como cofatores, tendo também efeito estabilizante. Trabalhos recentes (57, 69) mostram que a enzima não necessita desses íons para sintetizar a dextrana, entretanto o efeito estabilizante e ativador de alguns íons, tem sido relatado. MILLER e ROBYT (57), mostraram que o cálcio, em concentrações inferiores a 1 mM, aumenta a velocidade da reação, e acima de 1 mM o efeito é inverso. A estabilização da enzima por íons cálcio também foi observada por LOPES (49). Após tratar a dextrana-sacarase com EDTA, alguns pesquisadores (31, 75) observaram que certos íons restauravam a atividade enzimática, sendo que os íons cálcio apresentaram o maior poder de restauração.

A inibição da dextrana-sacarase foi estudada pela equipe de ROBYT (74 a 78). Os resultados mostraram que o EDTA inibe até 50% da atividade enzimática. A tabela 4 mostra o efeito inibidor de alguns íons.

A inibição causada pelos íons de metais pesados, era um fato esperado, pois esses efeitos já foram observados para várias outras enzimas. No caso do zinco, os autores, não previam efeito inibidor. O assunto foi novamente abordado em 1984 por MILLER e ROBYT (56), os quais demonstraram que o zinco é um forte inibidor da dextrana-sacarase, mesmo quando está presente em baixas concentrações (10 mM).

Alguns autores estudando a inibição, causada por compostos químicos em dextrana-sacarases de outras linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*, apresentaram resultados semelhantes àqueles da linhagem NRRL

Tabela 4: Efeito de íons metálicos divalentes sobre a dextrana-sacarase purificada e tratada com EDTA (5 mM) (75).

Íon adicionado (5 mM)	1 atividade rela- tiva (%)	2 atividade rela- tiva (%)
Ca	99	79
Mg	40	74
Mn	40	74
Sr	68	56
Ba	65	78
Zn	00	17
Co	00	65
Ni	00	69
Cd	00	39
Fe	00	30
Hg	00	00
Cu	00	00
Pb	00	00
Controle	56	78

1- Os íons 5 mM foram adicionados após o tratamento da enzima com 5 mM de EDTA. 2- A enzima foi tratada com EDTA 5 mM e depois o EDTA foi retirado por diálise. A porcentagem de atividade foi calculada tomando como 100% a atividade da enzima que não sofreu tratamento com EDTA.

KOBAYASHI, YOKOYAMA e MATSUDA (44) estudaram a dextrana-sacarase da linhagem NRRL B-1416. Neste caso os autores dividem a ação da enzima em duas atividades diferenciadas: atividade sacarase e transferase, as quais correspondem à quebra da sacarose e transferência dos grupos glicosil para a cadeia do polímero em formação. Neste trabalho os autores mostraram que o efeito inibidor ou ativador, de determinada substância, podia ocorrer em uma atividade independentemente da outra e também simultâneo, inibindo ou ativando as duas atividades ou ainda, inibindo uma e ativando outra e vice-versa.

HEHRE (26) mostrou que alguns destes compostos não apresentavam efeito inibidor. Entretanto há uma diferença básica, enquanto HEH-

RE trabalhou com enzima bruta, outros autores (78, 44) trabalharam com enzima purificada, eliminando assim outros compostos que poderiam interferir, inclusive a dextrana que tem efeito estabilizador e ativador da dextrana-sacarase.

A força iônica também é um fator de inibição. LOPES (49) mostrou que a velocidade de reação diminuiu na medida em que se aumentava a molaridade do tampão de 0,01 a 0,5M, na reação da dextrana-sacarase.

O efeito da pressão na cinética da reação foi analisado por GREULICH e LUDWIG (23). Os resultados mostraram que as altas pressões diminuem a atividade da dextrana-sacarase e desnaturam a enzima. A desnaturação entretanto depende da concentração de substrato presente, sendo mais acentuada em baixas concentrações de sacarose. Em condições normais a sacarose inibe a reação a concentrações acima de 200mM (65).

O peso molecular da dextrana-sacarase, não está bem definido ainda. Os primeiros estudos mostraram que a enzima tinha um peso molecular de aproximadamente 280 000 daltons (17). Os estudos mais recentes (43,58), utilizando métodos mais sofisticados, mostram que o peso molecular é menor e ainda que a enzima vem sempre associada com moléculas de dextrana, aparentando um peso molecular maior. Usando uma sequência de passos, incluindo tratamento com dextranases, KOBAYASHI e MATSUDA (43) avaliaram o peso molecular da dextrana-sacarase em 65 000 daltons, contendo 17% de carboidratos.

ROBYT (76) sugeriu que a enzima era uma glicoproteína. Em seu experimento, a enzima purificada foi submetida a hidrólise ácida e a fração de carboidratos era constituída principalmente de manose. Com adição de concavalina A, a enzima era totalmente inativada. Este fato levou os autores a concluírem que a enzima era uma glicoproteína, pois

a concavalina tem a capacidade de complexar com glicoproteínas que contenham resíduos de D - manose.

MILLER e colaboradores (58), usando apuradas técnicas de purificação, conseguiram preparações de dextrana-sacarase com baixos teores de carboidratos, abaixo de 1%. O peso molecular da enzima foi avaliado, mostrando que a enzima tinha duas formas com diferentes pesos moleculares, uma com 177 000 daltons e outra de 158 000 daltons, sendo que a primeira se convertia para a segunda forma, após longo período de estocagem. Os autores colocam em dúvida o fato da enzima ser uma glicoproteína, dado os baixos teores de carboidratos conseguidos nas preparações. Assim sendo, ainda permanece dúvidas quanto a composição química da enzima bem como seu peso molecular.

3.3. MECANISMOS DE AÇÃO CATALÍTICA

A atividade catalítica da dextrana-sacarase é uma combinação de reações envolvendo os sítios ativos da enzima, o substrato e o "acceptor". Duas atividades distintas podem ser consideradas na síntese de dextrana à partir de sacarose: a atividade hidrolítica e a glicosiltransferase. A primeira, responsável pela quebra da ligação entre a frutose e glicose da sacarose, formando o grupo D - Glicosil e a segunda, transfere o grupo glicosil para a cadeia do polímero em formação. KOBAYSHI, YOKOYAMA e MATSUDA (44) comprovaram a distinção dessas duas atividades da dextrana-sacarase, mostrando que algumas substâncias inibem uma, enquanto ativam outra, e vice-versa, havendo também substâncias que ativam ou inibem ambas.

A sacarose é o substrato natural de dextrana-sacarase, sendo, neste caso, bastante específica (17, 45), entretanto, dextranas produ-

zidas por alguns microrganismos utilizando outros substratos são mencionados (6, 7). Em recente trabalho BINDER e ROBYT (8) citam que a dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F), pode produzir dextrana, utilizando-se de outro substrato além da sacarose.

O modo de ação da dextrana-sacarase vem sendo estudado há vários anos, tendo iniciado por volta de 1950, quando alguns pesquisadores estudavam a síntese do amido e glicogênio (2).

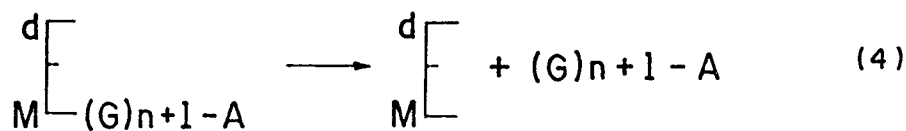
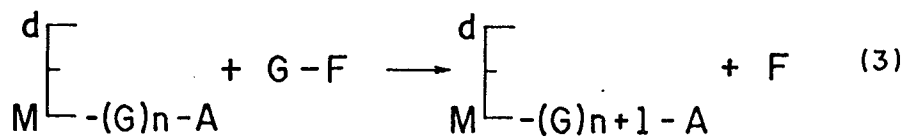
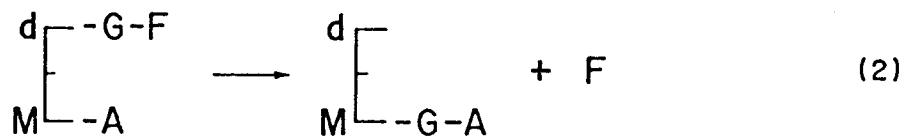
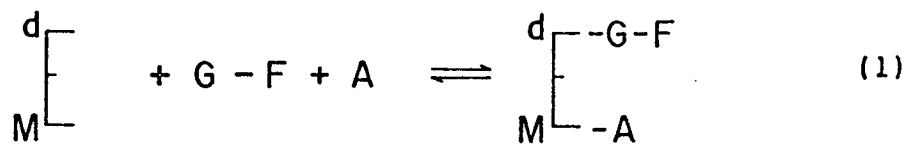
NEELY (65) propôs um mecanismo, onde a enzima teria dois sítios ativos, doador (d) e receptor (M). O crescimento do polissacarídeo se daria a partir da extremidade não redutora, envolvendo as seguintes etapas: 1) Ligação simultânea de duas moléculas de sacarose aos dois sítios ativos d e M. Nesse caso, a molécula ligada ao sítio d seria doadora de resíduos D - glucopiranosil e a outra molécula receptora iniciaria a cadeia. 2) Transferência do grupo D - glucopiranosil da sacarose, ligada a outro d, para a sacarose ligada ao sítio M. Nesta etapa uma molécula de frutose seria liberada ao meio. 3) Sucessivas transferências de grupos D - glucopiranosil do substrato (sacarose) para o final não redutor da cadeia em crescimento, ligado ao sítio M, com formação das ligações alfa (1,6). 4) Dissociação ou inativação do complexo enzima dextranosil, terminando a síntese da molécula de dextrana. A Figura 4 ilustra o mecanismo proposto por NEELY.

O mecanismo proposto por NEELY, explica a formação da cadeia principal, não incluindo, entretanto, as ramificações.

EBERT e SCHENK (17) propuseram outro mecanismo, com algumas diferenças básicas. Eles consideram a hipótese dos dois sítios ativos da enzima, mas assumem que o crescimento se dá pela extremidade redutora da cadeia. A finalização da cadeia, segundo essa hipótese, se da-

ria pela ação de aceptores não específicos.

HEHRM (27), estudando a ação da amilosacarase, observou que na transferência dos grupos D. - glucopiranosil, o crescimento da cadeia se dá pelo final não redutor. Seus experimentos levaram-no a sugerir que a ação da dextrana-sacarase era semelhante, embora considerando exceção, pois de maneira geral as glicosiltransferases acrescentam grupos no final redutor.



M = sítio ativo da enzima, receptor G = glicose

d = sítio ativo da enzima, doador F = frutose

G-F = sacarose doadora de grupos glicosil

A = molécula de glicose iniciadora da cadeia ("Aceptora")

Figura 4: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por NEELY (65).

SIDEBOTHAN (86), em um trabalho de revisão, considera que os mecanismos até então propostos, não apresentavam bases suficientes para definir a direção do crescimento das cadeias formadas pela dextrana-sacarase.

ROBYT e colaboradores (70 a 76), em uma série de trabalhos publicados entre 1974 e 1980, utilizando técnicas de marcadores radioativos e análises cromatográficas, esclareceram diversos pontos no mecanismo de ação catalítica de dextrana-sacarase. Estes estudos permitiram estabelecer um mecanismo para a síntese da dextrana.

O mecanismo proposto pelos pesquisadores foi resumido nos seguintes passos:

A enzima possui dois sítios ativos X1 e X2. Na primeira etapa, dois nucleófilos, localizados nos sítios ativos, fazem um ataque nucleofílico em duas moléculas de sacarose, formando dois grupos glicosil que são ligados aos sítios ativos por ligações covalentes através dos nucleófilos, pelo carbono 1.

No passo seguinte, a hidroxila do carbono 6, de uma das unidades de glicose, faz um ataque nucleofílico à outra glicose formando uma ligação alfa (1,6), liberando um nucleófilo, que ataca outra molécula de sacarose, formando novo grupo glicosil. Em seguida, a hidroxila do carbono 6, do novo glicosil formado, faz um ataque no carbono 1 do isomaltosil formado na etapa anterior. Na presença de sacarose o mecanismo se repete continuamente com os dois grupos catalíticos dos sítios X1 e X2, formando, alternadamente, complexos covalentes com a glicose e a cadeia de dextrana em crescimento, conforme ilustrado na Figura 5.

A finalização ocorre pela expulsão da dextrana do sítio ati-

vo, quando uma unidade de glicose é transferida para a sacarose pelo sítio ativo e inserida entre a enzima e o final redutor da cadeia de dextrana.

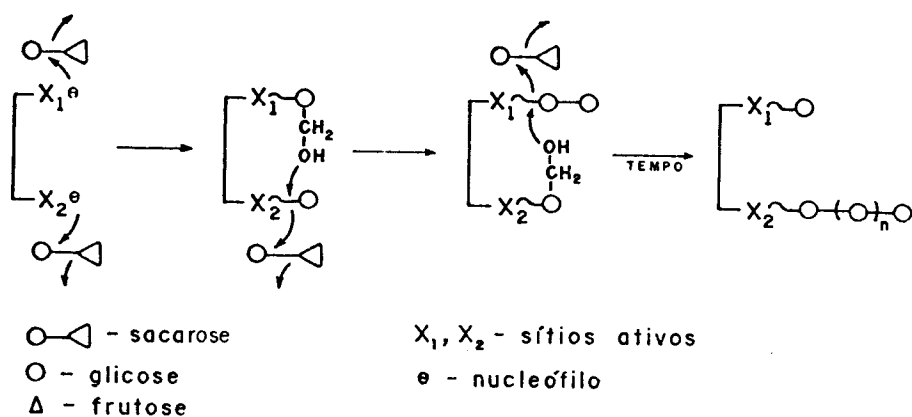


Figura 5: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por ROBYT (71, 77) .

O mecanismo proposto para a ação dos aceptores, considera que os hidroxis dos aceptores fazem um ataque nucleófilo e liberam os grupos glicosil e dextranosil da enzima, desfazendo o complexo, formando ligações glicosídicas, dando como produtos, respectivamente, oligossacarídeos e dextrana (Figura 6 a). Quando reage em presença de sacarose, os grupos glicosil e dextranosil, são continuamente regenerados no sítio ativo e deslocados pelo acceptor, aumentando os rendimentos dos produtos da reação com o acceptor, quando comparado com a reação na ausência de sacarose, ou seja, com outros aceptores. Quando a concentração do primeiro oligossacarídeo se torna suficientemente alta, ele age como acceptor, dando origem a outro oligossacarídeo de maior cadeia, observando-se, nesses casos, uma série de oligossacarídeos homólogos

(Figura 6 b).

A ação dos aceptores na síntese da dextrana tem uma importância fundamental, pois além de alguns aumentarem a velocidade da reação, influem de forma decisiva no peso molecular da dextrana formada. A especificidade da enzima quanto ao acceptor é bem menor, quando comparada ao substrato.

KOEPSSEL e TSUCHIYA (45, 46) mostram que certos açúcares, quando presentes no meio contendo dextrana-sacarase e sacarose, provocam a formação de grande quantidade de oligossacarídeos. Eles sugeriram que a enzima necessitava de um iniciador "primer", ao qual as unidades de glicose se juntavam formando a cadeia do polissacarídeo.

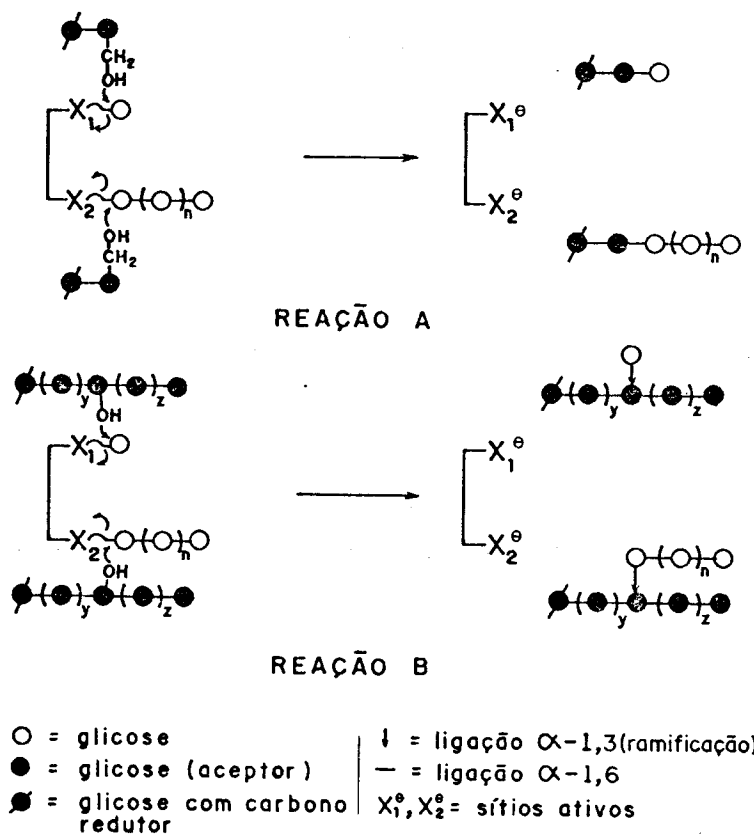


Figura 6: Esquema do mecanismo proposto por ROBYT para a reação dos aceptores na síntese de dextrana (76).

TSUCHIYA e colaboradores (95, 96) também estudaram o efeito de açúcares de baixo peso molecular, mostrando a possibilidade de produzir dextrana clínica de baixo peso molecular. Os autores concordavam com KOEPEL, quanto ao papel iniciador desses açúcares, chamando-os de aceptores.

YAMAUCHI e OHWADA (102), testando diferentes aceptores, mostraram que eles aceleravam a reação, sendo que a maltose e isomaltose, tiveram maior eficiência na ativação da dextrana-sacarase.

EBERT e SCHENK (17) argumentam que no tipo de crescimento de cadeia por inserção, a terminação da cadeia se dá pela quebra da ligação entre a enzima e a cadeia em crescimento. A quebra, no caso, é devida à ação do acceptor, que desfaz o complexo enzima-cadeia, impedindo que se refaça o complexo. A competição do acceptor com o substrato, explica a formação de dextrana de baixo peso na presença de acceptor. A sacarose também age como acceptor, e em altas concentrações induzem também a formação de dextrana de baixo peso molecular.

EBERT e SCHENK (17) conduziram seus experimentos, utilizando aceptores marcados radioativamente. Com esta técnica mostraram também, que os aceptores podiam ser incorporados na dextrana nativa, independentemente do peso molecular. Estudando o peso molecular dos produtos da reação e a cinética, os autores classificaram os aceptores em categorias, de acordo com sua capacidade de ativar a enzima.

ROBYT e WALSETH (72) também investigaram o papel dos aceptores, usando açúcares marcados com carbonos radioativos. Seus experimentos foram conduzidos, preparando o complexo enzima-dextrana pela reação da dextrana-sacarase com sacarose. O complexo foi isolado por cromatografia e depois incubado com aceptores marcados. Os resultados

mostraram que os aceptores foram incorporados à dextrana. Através de análises por hidrólise e redução puderam provar que estes aceptores foram incorporados na extremidade redutora da cadeia. Esses resultados além de confirmarem que o crescimento da cadeia se dá pelo final redutor, mostraram também que a reação com os aceptores ocorre na ausência de sacarose. Outras reações efetivadas na presença de sacarose mostraram que o acceptor compete com a sacarose na reação de polimerização, produzindo dextranas marcadas e também uma série de oligossacarídeos homólogos.

A presença de sacarose não interferiu, quanto à localização dos aceptores (extremidade redutora), pois, neste caso, a adição também se dava pelo final redutor.

ROBYT e EKLUND (77) testaram o efeito de alguns aceptores na reação da dextrana-sacarase, mostrando a eficiência relativa de cada um. Os resultados destes experimentos mostraram também, que a distribuição dos produtos da reação tem uma variação muito ampla, dependendo do acceptor presente.

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a formação das ramificações na cadeia da dextrana. Alguns autores levantaram a hipótese do desenvolvimento de uma segunda enzima, baseados em diferenças na porcentagem de ramificação de dextranas produzidas após tratamentos térmicos da enzima e presença de íon magnésio (5). Apesar disso, o isolamento da suposta enzima não foi conseguido por outros pesquisadores (2).

Estudos realizados com *Leuconostoc mesenteroides* B - 1315, demonstraram que esse microrganismo produz duas dextranas distintas. Uma fração tem características típicas da dextrana produzida pela 11-

nhagem NRRL B - 512, enquanto a outra apresenta ligações alternadas, alfa (1,6) e alfa (1,3). Mesmo neste caso não foi possível confirmar a existência de mais de uma enzima envolvida no processo (15, 16, 60). Assim, a hipótese de que a dextrana é sintetizada por uma só enzima é a mais sustentada (75, 84, 85).

SUZUKI e KOBAYASHI (90) analisando dextranas produzidas por enzimas com diferentes graus de purificação, observaram que quanto maior a purificação menor a porcentagem de ramificações. Baseados nestas observações, sugeriram ser estas ramificações devidas à fatores não enzimáticos. Esta conclusão foi reforçada pelo trabalho de TSUMURAYA e colaboradores (97), que testaram a influência de várias substâncias na formação das ramificações da dextrana.

EBERT e SCHENK (17) propuseram um mecanismo para explicar a formação das ramificações. Sugeriram que a ação de moléculas de dextrana como aceptores originavam as ramificações.

LARM e colaboradores (47), estudando as ramificações da dextrana, mostraram que eram formadas, em sua maioria, por cadeias curtas, onde 40% teriam uma só unidade de glicose, 45% duas unidades e somente 15% das cadeias ramificadas teriam mais de duas unidades.

TAYLOR e outros (91) também estudaram o tamanho das cadeias secundárias, concluindo que cadeias contendo duas ou mais unidades ocorrem na dextrana sintetizada pela dextrana-sacarase do NRRL B-512.

ROBYT e TANIGUCHI (72), estudando o mesmo assunto, propuseram um mecanismo similar àquele proposto por EBERT e SCHENK (17), onde a reação do acceptor seria responsável pela formação das ramificações. Os estudos foram feitos com a enzima purificada e açúcares marcados com radioatividade. As observações experimentais levaram os autores a pro-

porém o seguinte mecanismo: um grupo C -OH do acceptor faz um ataque nucleofílico ao carbono 1 no final redutor do grupo dextranosil, ou glicosil, ligados à enzima. Estes grupos são liberados do sítio ativo formando as ligações alfa (1,3). Nesse caso, o acceptor pode ser uma molécula de dextrana, ou frutose. Com esse mecanismo, as cadeias secundárias podem conter uma ou várias unidades de glicose. Os produtos isolados da reação confirmam este mecanismo (91).

3.4. IMOBILIZAÇÃO

A imobilização de dextrana-sacarase é um assunto recente, que começou a ser estudado, somente há alguns anos atrás.

OGYNO (67) imobilizou a enzima, colocando resinas de troca iônica no meio contendo dextrana-sacarase, utilizando, em seguida, essas resinas na síntese da dextrana.

CHEN e KABOLI (12) estudaram a imobilização em papéis de filtro e sílica porosa. Os melhores resultados foram obtidos com sílica, atingindo uma atividade de 13 UDS por grama de sílica. Os autores relatam uma perda de atividade enorme, quando a enzima entra em contato com o suporte. Continuando na mesma linha, KABOLI e REILLY (41) fizeram um estudo comparativo das propriedades da enzima livre e imobilizada. Os resultados mostram pequenas variações quanto à estabilidade. Também foi analisado o efeito do pH e de presença de cálcio, não sendo observado diferenças significativas entre a enzima imobilizada e livre. Os autores concluem, que a imobilização de dextrana-sacarase em sílica porosa é difícil, com índices de retenção muito baixos. A atividade específica máxima foi de 8 UDS/g de sílica.

MONSAN e LOPES (61) imobilizaram dextrana-sacarase em sílica

porosa, atingindo índices bem mais elevados, com atividade da ordem de 800 UDS/g de sílica. Estes resultados comparados àqueles obtidos por KALOBÍ e RELLY (41), são mais ou menos cem vezes maiores. A área específica da sílica é um parâmetro fundamental. LOPES (49) verificou que a imobilização apresentava bons resultados, com sílica de 6 m² /g. A medida que se aumentava a área específica, a quantidade de enzima imobilizada diminuía.

Dois métodos de purificação também foram testados. A precipitação com etanol dificultava a imobilização, devido a formação de aglomerados. Melhores resultados foram conseguidos, purificando a enzima por ultrafiltração seguida de cromatografia em gel.

A adição de maltose também facilitou a imobilização, principalmente na sílica com poros menores. Neste caso, a reação da maltose (acceptor) com o complexo enzima-dextrana, deixa a enzima livre, facilitando a penetração e ligação com o suporte (49).

A reação de síntese, utilizando a enzima imobilizada, foi testada na presença de dextrana de baixo peso molecular como acceptor. Com esta técnica, MONSAN e LOPES (62) conseguiram o rendimento de praticamente 100% em dextrana de baixo peso.

CHANG e colaboradores (11) também conseguiram excelentes resultados, imobilizando a dextrana-sacarase em fenoxiacetil celulose porosa.

A imobilização é um caminho promissor, para se conseguir maior rendimento e produção contínua de dextrana, aumentando a produtividade. Não se encontra na literatura, referências a processos industriais, que utilizem esta técnica atualmente. Em escala piloto, ALSOP (2), relata a produção de dextrana de forma contínua, utilizando

enzima imobilizada. O autor não detalha as condições e o suporte utilizado. Informa apenas que a atividade específica é de 800 UDS/ml e que com 10 Kg de suporte, converte-se 8 Kg de sacarose em dextrana por hora.

3.5. PARAMETROS QUE AFETAM AS PROPRIEDADES DA DEXTRANA NA SÍNTESE ENZIMÁTICA

Quando a reação se desenvolve nas condições normais, as moléculas de dextranas atingem valores da ordem de cem milhões de daltons. O controle de alguns parâmetros mostra que é possível predeterminar o peso molecular do produto final da reação catalisada pela dextrana-sacarase sobre a sacarose.

O tempo de reação foi avaliado por TSUCHIYA (95), BRASWELL (8) e LOPES (49). TSUCHIYA, trabalhando com enzima semi purificada (precipitação com etanol), observou que, o peso molecular médio não variava ao longo do tempo de reação. BRASWELL, trabalhando com enzima purificada e bruta, notou que com a enzima bruta os resultados se assemelhavam àqueles obtidos por TSUCHIYA, enquanto que com enzima purificada, o peso molecular do polímero variava com o tempo. LOPES confirmou os resultados de BRASWELL, mostrando a distribuição do tamanho das moléculas entre 120 000 e 25 000 000, ao longo de quatro horas de reação. Outro efeito observado foi o aumento da porcentagem de ramificação com o tempo.

A concentração inicial de sacarose, influe no peso molecular e também no rendimento da dextrana produzida pela síntese "in vitro" (95). A Tabela 5 ilustra esses efeitos. Na Tabela 5 podemos observar que acima de 10% de sacarose, há um aumento substancial nas quantida-

des de pequenos sacarídeos, diminuindo o rendimento em dextrana, principalmente de alto peso.

Tabela 5: Variação das frações de carboidratos e dextrana na reação da dextrana sacarase versus a concentração inicial de sacarose (2).

Sacarose % p/v	Monossa- carídeos	Dissaca- rídeos	Dextrana total	Dextrana alto peso	Dextrana de baixo peso
2	52,2	1,9	45,9	45,9	0,0
4	50,0	4,4	45,6	45,6	0,0
5	51,3	4,3	44,4	44,4	0,0
10	51,2	6,8	42,0	39,0	3,0
15	55,5	9,4	35,3	25,3	10,0
20	56,9	11,2	31,9	17,9	14,0
Teórico	52,6	0,0	47,4	47,4	0,0

A temperatura de reação: em recente trabalho, SABATIE e colaboradores (80) mostram que a porcentagem de ramificação cresce na medida em que aumenta a temperatura, no intervalo de 3 a 30° C. Esta influência da temperatura de síntese fora prevista por NEELY (65). O comportamento dos produtos foi avaliado por SABATIE, que observou uma nítida diferença na viscosidade das soluções de dextranas sintetizadas a diferentes temperaturas.

TSUCHIYA (95), analisando o efeito da temperatura de reação no peso molecular da dextrana, observou que na presença de aceptores (1% de dextrana hidrolisada), a porcentagem de dextrana de alto peso molecular é significativamente aumentada com o aumento da temperatura de síntese, sendo 24,7% a 30° C e 1,3% a 4° C. O rendimento global foi ligeiramente favorecido nas baixas temperaturas. Trabalho semelhante, apresentado por MONSAN e LOPES (62) mostrou que a 30° C, 29,4% da dextrana sintetizada tem peso molecular acima de 350 000 d, enquanto que a 4° C, toda a dextrana produzida apresenta peso molecular abaixo des-

se valor.

A adição de acceptor: a presença de alguns açúcares de baixo peso molecular durante a reação da dextrana-sacarase com a sacarose, afeta o produto final, em relação ao seu peso molecular e o seu grau de ramificação, influenciando também no rendimento global do processo. O mecanismo de ação dos aceptores foi bastante estudado por ROBYT e equipe e está explicitado no item referente ao mecanismo de ação da dextrana-sacarase.

O efeito do acceptor depende da sua estrutura físico química e da concentração. A distribuição dos produtos da síntese na presença de diversos aceptores foi estudada por ROBYT e colaboradores (72, 74, 78). Os autores observaram diferenças marcantes na porcentagem dos diferentes produtos de reação e na eficiência relativa de cada um dos aceptores. O rendimento em dextrana, também foi bastante afetado, dependendo do acceptor presente. Para a maltose, por exemplo, o rendimento em dextrana foi de 18% (em relação ao rendimento máximo possível-teórico) com 26,1% de produtos de dp3 (dp = degree of polymerization), enquanto que para a glicose os valores são de 77,9 e 3,4%, respectivamente.,

Outra observação importante é quanto à quantidade de glicose, isomaltose e "leucrose" (O-alfa-D-glicopiranosil-(1,5)- D-frutopirano-se), livres no final da reação. Os autores observaram, neste caso, que praticamente não há nenhuma variação para os diferentes aceptores. A formação de glicose durante a síntese de dextrana pela dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512, aparentemente está associada à ação da água agindo como acceptor, deslocando um grupo D - glicosil do sítio ativo da enzima, resultando numa molécula de glicose

que não pode mais ser incorporada à cadeia de dextrana, (22, 50, 51). A formação de isomaltose e "leucrose" resultam da ação da frutose, como acceptor. Estes fatos explicam em parte a independência da concentração desses açúcares, no final da reação, quanto ao tipo acceptor, dado que a reação se dá em meio aquoso e a frutose é um produto da ação enzimática, e por isso sempre presentes. O efeito da concentração do acceptor, no peso molecular do produto final (dextrana) está mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Efeito da concentração do acceptor sobre o peso molecular da dextrana sintetizada pela dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) (95).

Concentração do Aceptor (p/v)	Dextrana		
	peso molecular médio	%	Rendimento
1	> 126 000	9,8	44,5
	126 000	23,1	
	31 100	10,7	
2	76 000	7,0	57,8
	76 000	25,1	
	27 800	23,3	
3	82 000	25,0	69,8
	82 000	7,4	
	18 400	34,5	

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MICRORGANISMO

Foi utilizado em todos os experimentos o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F). Em nosso laboratório, em trabalhos anteriores, foram testadas outras linhagens, sem contudo alcançar uma produção significativa de dextrana-sacarase. Além desse fato, conforme mostrado na revisão bibliográfica, a linhagem NRRL B-512(F) é a que se mostrou, até o momento, com maior produtividade, sendo esta linhagem usada em praticamente toda produção industrial.

O microrganismo foi conseguido através de convênio do laboratório com o Institut National des Sciences Appliqués de Toulouse - França. A cultura chegou na forma liofilizada, em ampolas de vidro. Para se preparar as culturas estoques, o liofilizado foi dissolvido em solução salina (0,9% de cloreto de sódio), cultivado em meio padrão e após duas repicagens, estocado, em tubos rosqueados, a -15°C , numa solução de glicerol 10%, conforme o esquema abaixo:

Microrganismo liofilizado => Solução salina => cultivo em meio padrão => 1ª repicagem => 2ª repicagem => 5 ml de cultura + 5 ml de solução glicerol 20% => estocagem a -15°C .

Na segunda repicagem, o volume do meio de cultura chegou a 150 ml. A fermentação foi interrompida com 8 horas de cultivo, quando foram retiradas as alíquotas para estocagem. Nesta etapa foram observados rigorosos cuidados com a esterilidade de todo material utilizado, para evitar qualquer tipo de contaminação. A verificação da não contaminação da cultura, foi feita com cultivo em placas e observação ao microscópio.

2. MEIOS DE CULTURA

a- Meio padrão:

. Sacarose:	40	g/l
. Extrato de levedura:	20	g/l
. Fosfato de potássio-di-básico:	20	g/l
. Sulfato de magnésio:	0,2	g/l
. Cloreto de sódio:	0,01	g/l
. Sulfato ferroso:	0,01	g/l
. Sulfato de manganês:	0,01	g/l
. Cloreto de cálcio:	0,02	g/l

Modo de preparar:

Inicialmente, preparam-se as soluções de sais da seguinte forma:

- Solução A - (R sais):

. Sulfato de magnésio:	200	g/l
. Sulfato de manganês:	10	g/l
. Cloreto de sódio:	10	g/l
. Sulfato ferroso:	10	g/l

- Solução B:

. Fosfato de potássio di-básico:	200	g/l
----------------------------------	-----	-----

- Solução C:

. Cloreto de cálcio:	20	g/l
----------------------	----	-----

As soluções A, B e C foram esterilizadas a 121°C por 15 minutos e estocadas a 5° C.

Na preparação de um frasco para fermentação, colocou-se sacarose, extrato de levedura e uma alíquota da solução A. Esterilizou-se a 121° C por 15 minutos e após resfriamento, juntou-se alíquotas das

soluções B e C, de forma a alcançar a concentração desejada.

A necessidade de se esterilizar separadamente o fosfato e o cálcio, se deve ao fato de ocorrer precipitação, quando esses sais são aquecidos junto com outros ingredientes. Este fato foi verificado experimentalmente.

b- Meios Formulados:

Foram preparados diferentes meios de cultura, utilizando-se melão em substituição à sacarose e água de maceração de milho (AMM) em substituição ao extrato de levedura. Ainda foram preparados meios variando a concentração de fosfato. Para os demais sais foi testado a necessidade da adição de cada um, nas concentrações padrões, quando o meio continha melão.

O melão apresenta uma composição bastante complexa, contendo além da sacarose uma grande quantidade de açúcares redutores e um teor relativamente alto de sais (1). Assim sendo, os testes da necessidade de suplementação de sais, no meio com melão, foram realizados com dois pontos: sem adição do sal ou adição na concentração do meio padrão. O melão utilizado apresentava aproximadamente 80% de açúcares totais, sendo 20% açúcar redutor e 60% de sacarose.

3. CONDIÇÕES DE CULTURA

a- Pré-Fermentação.

A pré-fermentação foi feita para todas as fermentações. Erlenmeyers de 250 ml, aletados, contendo 90 ml de meio padrão foram esterilizados a 121° C por 15 minutos. Após resfriamento foram adicionados 10 ml de solução de fosfato, esterilizado da mesma forma. O meio foi inoculado com um tubo de cultura estoque contendo 10 ml. Após ino-

culação, foi incubado à 27° C em "Shaker" (agitador de frascos) a 150 rpm por um tempo de 14 horas.

b- Fermentação em frascos agitados.

Foram utilizados erlenmeyers de 500 ml, aletados, contendo 150 ml de meio. Após esterilização e adição de solução de fosfato e cálcio, foram inoculados com 5% da pré-fermentação. A agitação em todos os casos foi de 150 rpm em agitadores de frascos, em condições idênticas à pré-fermentação. A temperatura foi mantida em 27°C, com exceção dos experimentos, onde o efeito da temperatura foi testado, variando-se esta, em um intervalo de 15 a 35° C.

Os frascos foram preparados com tubos, que desciam até o fundo, para facilitar a retirada de amostras. Durante a fermentação a amostragem foi feita de hora em hora, medindo-se o pH, a atividade enzimática, a concentração de açúcares (substrato) e a concentração de células, pela medida da densidade ótica.

c- Fermentação em Mini-Fermentadores

Foram utilizados mini-fermentadores, modelo M 1000 da Fermentation Design Inc (Figura 7) com capacidade de 1 litro, contendo 700 ml de meio. A esterilização foi feita da mesma forma que nos frascos, com o fosfato esterilizado separadamente. O inóculo de 5% foi preparado conforme descrito anteriormente (pré-fermentação). A temperatura, durante a fermentação, foi mantida a $27 \pm 1^\circ$ C, com aeração de 0,5 VVm e agitação moderada (agitador magnético).

d- Fermentação em Mini-Fermentadores com controle de pH

Neste caso foi utilizado o mesmo sistema descrito em 'c', com uma adaptação para o controle de pH.

Para controlar o pH foi adaptado o sistema controlador de pH

de um fermentador piloto, "Regler controller E - 450 Metrohm Herisau", auxiliado por uma pequena bomba de fluxo regulável. A solução de injeção, NaOH 5N, era bombeada de um frasco depósito, contendo 500 ml, como mostra a Figura 8.

e- Fermentação com adição contínua de substrato.

A adição de substrato foi realizada de três formas distintas:

1- Adição de sacarose combinada com o sistema controlador de pH.

Foram utilizados mini-fermentadores com capacidade de 1000 ml, contendo 700 ml de meio. Após a esterilização e resfriamento, foram inoculados com 5% de inóculo. A adição de substrato foi conduzida, colocando-se no mesmo frasco hidróxido de sódio e sacarose, de forma que a adição de sacarose se dava concomitantemente à adição de base. Assim, a velocidade de adição variava de acordo com a produção de ácidos durante o crescimento. O esquema utilizado está ilustrado na Figura 8, com a diferença que o frasco depósito contém além de base, a sacarose.

2- Adição de sacarose independente do pH.

Mini-fermentadores com capacidade de 1000 ml, contendo 700 ml de meio de cultura, foram esterilizados, resfriados e inoculados com 5% de inóculo. O controle de pH foi feito pelo mesmo sistema do item d. A adição de sacarose, durante a fermentação, foi feita assepticamente com o uso de bombas peristálticas e temporizadores. Nestes casos a velocidade de adição foi constante durante a fermentação. Na Figura 8, este sistema de adição está mostrado em linhas pontilhadas.

3- Adição de melaço.

Os ensaios com adição de melaço foram realizados da mesma forma que a sacarose (item e-1 e e-2), combinada ou não com o sistema

controlador de pH, simplesmente substituindo a sacarose pelo substrato em questão. A concentração do melão nos frascos de adição foi variada, com a finalidade de variar a velocidade de adição nos casos onde esta era dependente do pH.

4. MÉTODOS ANALÍTICOS.

a- Crescimento Celular.

A concentração de células no meio de cultura foi determinada espectrofotometricamente pela leitura de absorvância a 650 nm (Espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch & Lomb), utilizando-se água destilada para calibração do aparelho. A relação da densidade ótica com a massa celular foi determinada com a construção de uma curva padrão de densidade ótica (DO) versus massa seca (Figura 9).

Para a construção da curva foram utilizados meios de cultura com sacarose e glicose. A curva com glicose foi necessária para afastar dúvidas em relação à interferência da dextrana, que é produzida no cultivo com sacarose. As curvas foram construídas, tomando-se caldos fermentados e determinando-se a massa seca após filtração e secagem para diferentes diluições, e ao mesmo tempo, fazendo-se leituras de densidade ótica à 650 nm.

b- Determinação de Açúcares Redutores - Método do DNS (59, 87)

. Reagente DNS

- Misturar:

. 1416 ml de água destilada

. 10,6 g de 3,5 ácido dinitrosalisílico

. 19,8 g de hidróxido de sódio

- Dissolver a quente e adicionar:

. 7,6 ml de fenol (fundido a 50 °C)

- Reação.

O método consiste em misturar 1 ml de amostra convenientemente diluída com 1 ml de reagente DNS e levar em banho-maria à 100 °C por 5 minutos. Resfria-se imediatamente em banho de gelo (0 °C) e adiciona-se 16 ml de tartarato duplo de sódio e potássio 11,25 g/l. A reação de DNS com açúcares redutores produz uma coloração, que vai de amarelo claro a marron escuro, proporcional à concentração de açúcares redutores contidos na amostra. Quanto maior a concentração de açúcares redutores, mais intensa é a coloração marron. O branco é feito, substituindo-se a amostra por 1 ml de água destilada. A leitura da absorbância é feita a 540 nm, em espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch & Lomb. Para converter absorbância em concentração de açúcares redutores, foi necessário a construção de uma curva padrão de Absorbância versus Concentração de açúcares redutores, para cada preparação de reagente.

b.1- Determinação de açúcares totais.

Para a análise de açúcares totais, foi necessário fazer a conversão da sacarose em açúcares redutores. A conversão foi feita através da hidrólise ácida, misturando-se 1 ml da amostra com 1 ml de HCl 2 N, seguido de aquecimento a 100° C, (banho-maria), por 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 1 ml de NaOH 2 N, para neutralizar o ácido da amostra. Após a hidrólise fez-se a determinação dos açúcares redutores pelo método DNS. Neste caso, a curva padrão foi construída com açúcares hidrolisados.

Todas as amostras, antes de sofrerem hidrólise, foram centrifugadas a 12 000 x g para a separação das células.

b.2- Determinação de sacarose.

A avaliação da concentração de sacarose, durante a fermentação foi feita indiretamente, pela diferença de açúcares redutores medidos antes e depois da hidrólise ácida, ou seja, diferenças entre açúcares totais, e açúcares redutores.

c- Determinação da Atividade Enzimática.

Durante a fermentação foram retiradas amostras e centrifugadas a 12 000 x g por 20 minutos a 4° C. Logo após, o pH do sobrenadante foi ajustado para 5 com ácido ortofosfórico concentrado. As soluções enzimáticas foram conservadas em tubos de ensaio a - 15° C. Nessas condições, a atividade se mantém por vários meses. Nos testes de estabilidade, realizados após 3 meses, obteve-se 100% de atividade.

A atividade enzimática da dextrana-sacarase foi determinada, medindo-se a velocidade inicial de produção de frutose, quando a enzima é colocada em contato com a sacarose em condições controladas.

A uma solução enzimática, à pH 5,0 e 30 °C, diluída de forma a apresentar uma atividade menor que 40 UDS, é adicionada uma solução de sacarose 600 g/l, tendo-se no final uma concentração de 100 g/l.

A adição de sacarose dá início a reação. A velocidade de produção de frutose é avaliada, retirando-se de 5 em 5 minutos uma alíquota e determinando-se os açúcares redutores pelo método do DNS, durante 30 minutos, à partir da adição de sacarose.

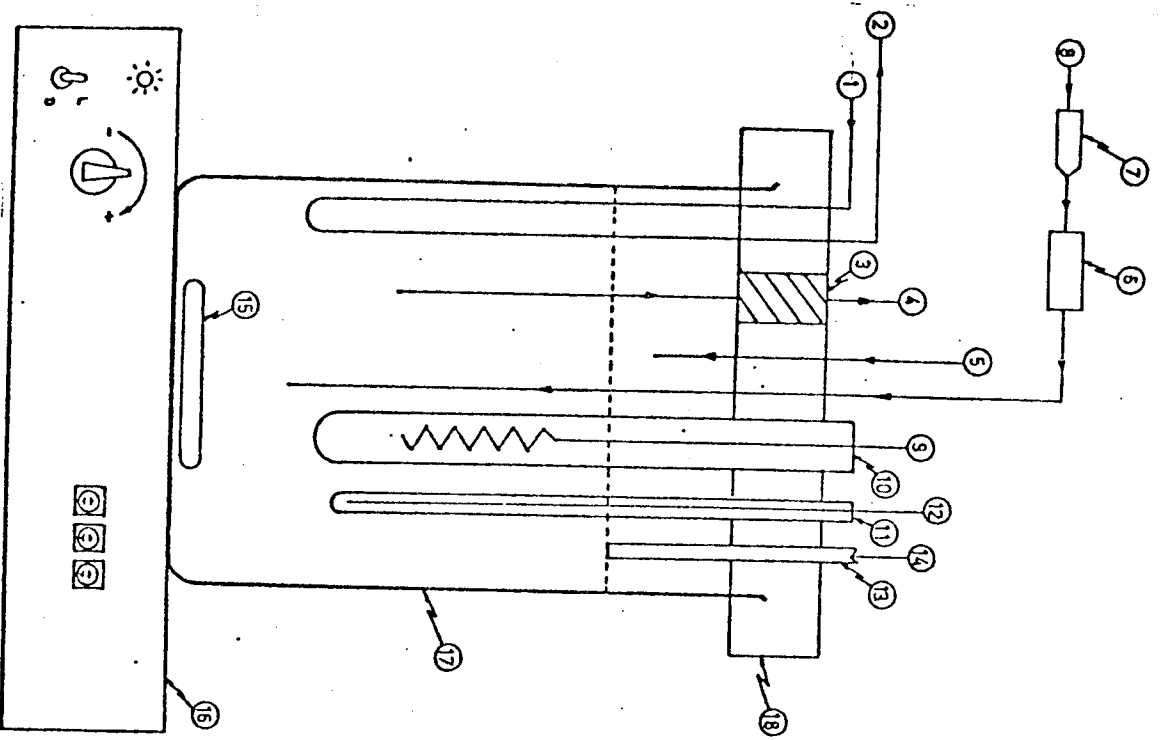
A reação se processa em uma cela de vidro de 25 ml de volume, termostaticada a 30 °C e agitada por um bastão magnético. Dentro da cela coloca-se de 0,1 a 1,0 ml de solução enzimática, 0,25 ml de tampão acetato com 2,5 g/l de cálcio e completa-se o volume para 10 ml. Adiciona-se 2 ml de solução de sacarose 600 g/l. O volume de solução

retirado para dosagem de frutose é escolhido de forma a permitir uma leitura no intervalo de precisão do espectrofotômetro, e quando necessário, fazem-se diluições, completando-se o volume para 1 ml, ao qual é adicionado em 1 ml do reagente de DNS e segue-se o procedimento para a dosagem de açúcares redutores (b).

A evolução da absorbância é graficada em função do tempo. A inclinação da reta permite calcular a velocidade de produção de frutose. Este procedimento gráfico foi substituído por uma solução analítica, fazendo-se uma regressão linear, utilizando-se um micro computador ou calculadora programável.

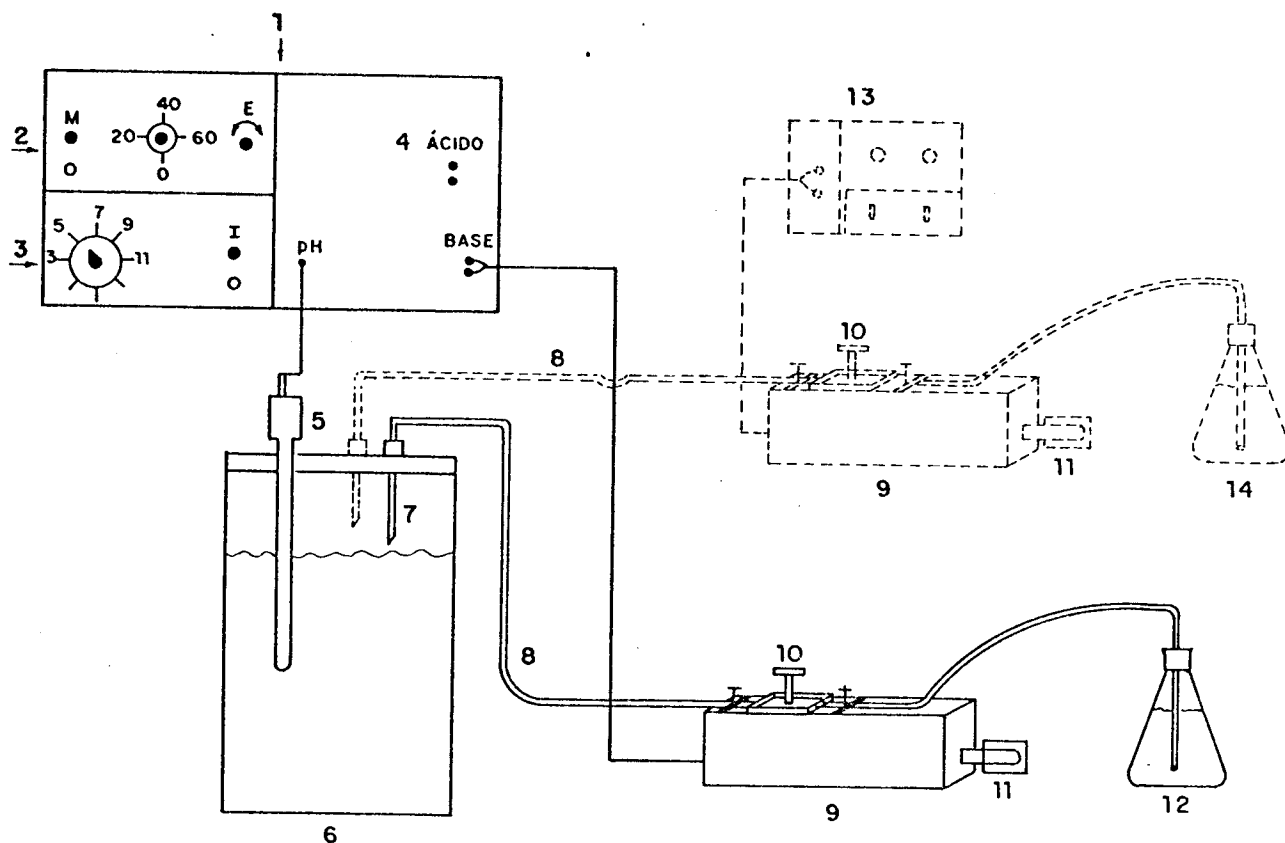
No presente trabalho usamos a unidade de dextrana-sacarase (UDS) definida como a quantidade de enzima que transforma 1 mg de sacarose em dextrana em 1 hora, liberando 0,52 mg de frutose (26).

ESQUEMA DO MINIFERMENTADOR



1. Entrada de água para resfriamento
2. Saída de água do resfriamento
3. Diafragma de borracha para introdução de seringas: inoculação, controle de pH, espuma, retirada de amostra
4. Retirada de amostra através de seringa
5. Entrada de meio (alimentação)
6. Filtro de ar com leito de lã de vidro
7. Rotâmetro
8. Linha de entrada de ar
9. Termostato
10. Tubo pirex para termostato
11. Falso pirex para termômetro
12. Termômetro
13. Falso pirex para saída de meio fermentado
14. Linha de saída de meio fermentado
15. Agitador magnético
16. Base do fermentador
17. Vaso pirex 1000 ml
18. Tampa

Figura 7 - Esquema do mini-fermentador



———— sistema para alimentação conjugada com o pH
 ----- sistema auxiliar para alimentação de substrato independente do pH.

- 1 - Sistema controlador de pH
- 2 - Calibração (pH)
- 3 - Ajuste (pH)
- 4 - Saídas para eletrodo e bombas
- 5 - Eletrodo de pH
- 6 - Mini-fermentador
- 7 - Agulha para injeção de NaOH
- 8 - Mangueira de silicone
- 9 - Bomba
- 10 - Ajuste de pressão
- 11 - Controle de vazão
- 12 - Frasco depósito (NaOH ou NaOH e substrato)
- 13 - Temporizador
- 14 - Frasco depósito (substrato)

Figura 8: Esquema do controlador de pH e sistema para adição de substrato durante a fermentação em minifermentadores.

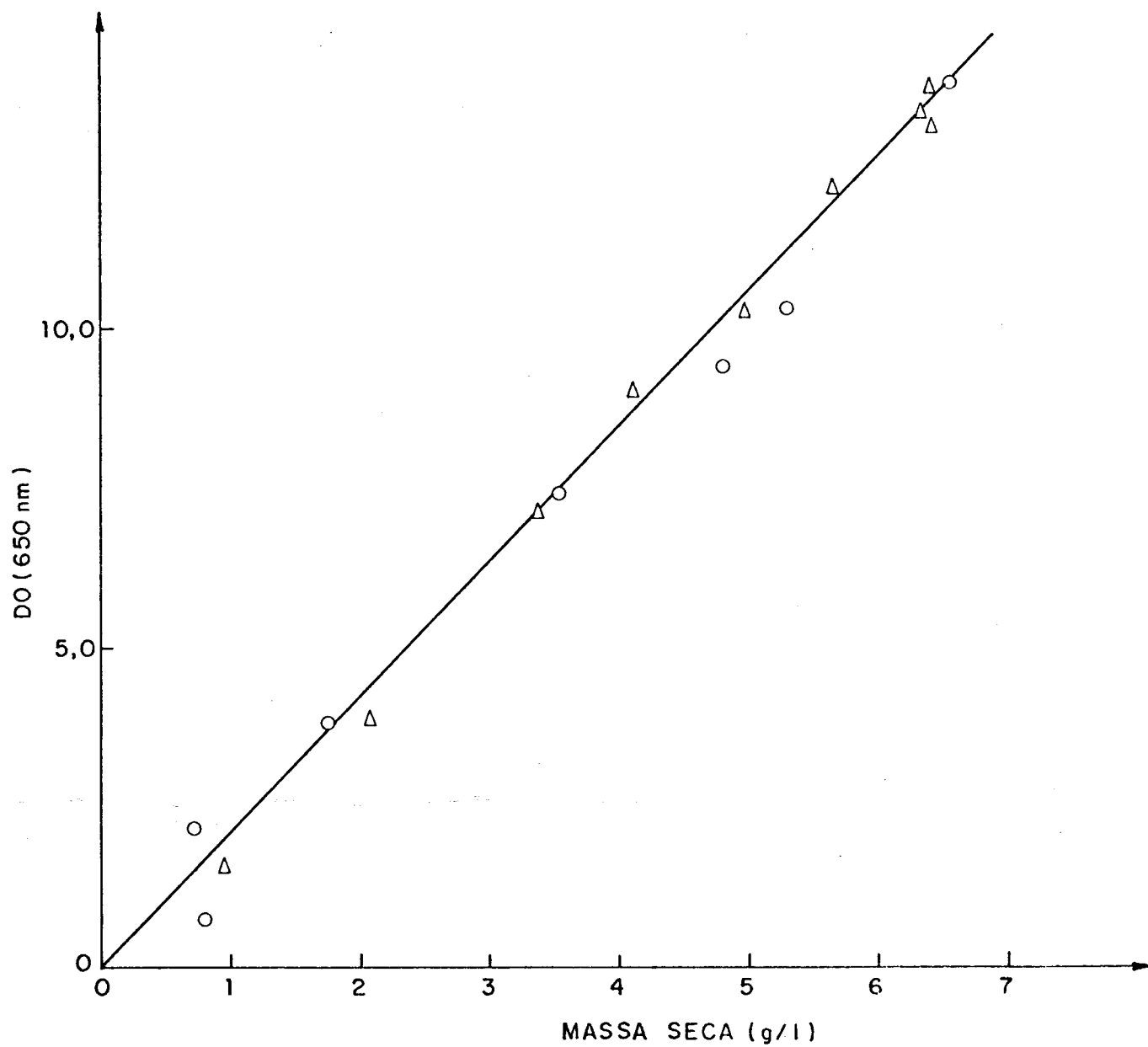


Figura 9: Curva de referência de massa seca versus densidade ótica a 650 nm para o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

1. FERMENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS

a) Condições de referência

Inicialmente foram realizados ensaios, baseados em condições descritas pela literatura (26, 49, 94), com finalidades comparativas. As condições tomadas como referência foram: meio padrão (descrito em materiais e métodos), pH inicial 7,0 e temperatura de 27° C. A Figura 10 mostra a evolução do crescimento celular, da atividade enzimática e do pH, durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512 (F) nas condições de referência.

O inóculo foi de 5%, com uma pré-fermentação de 14 horas. Nestas condições, o crescimento foi rápido, com uma fase de latência desprezível. A fase de crescimento exponencial foi de aproximadamente quatro horas, conforme mostra a curva de $\ln(DO)$ versus tempo (Figura 10). A produção de dextrana-sacarase, conforme mostrado na Figura 10, ocorreu de forma associada com a multiplicação celular. Nestas condições, nos ensaios realizados a atividade enzimática no meio de cultura oscilou entre 15 a 30 UDS/ml. Em condições semelhantes, LOPES (49) relatou que a atividade enzimática oscilou entre 25 a 50 UDS/ml, enquanto TSUCHIYA e colaboradores (94) relataram atividades um pouco maiores, trabalhando a 25° C. ALSOP (2) mostrou que a 23° C, pode-se alcançar maiores concentrações de enzima no meio de cultura, no final da fermentação.

Devido a existência de dúvidas em relação à temperatura ótima para produção de dextrana-sacarase, foram realizados ensaios a diferentes temperaturas.

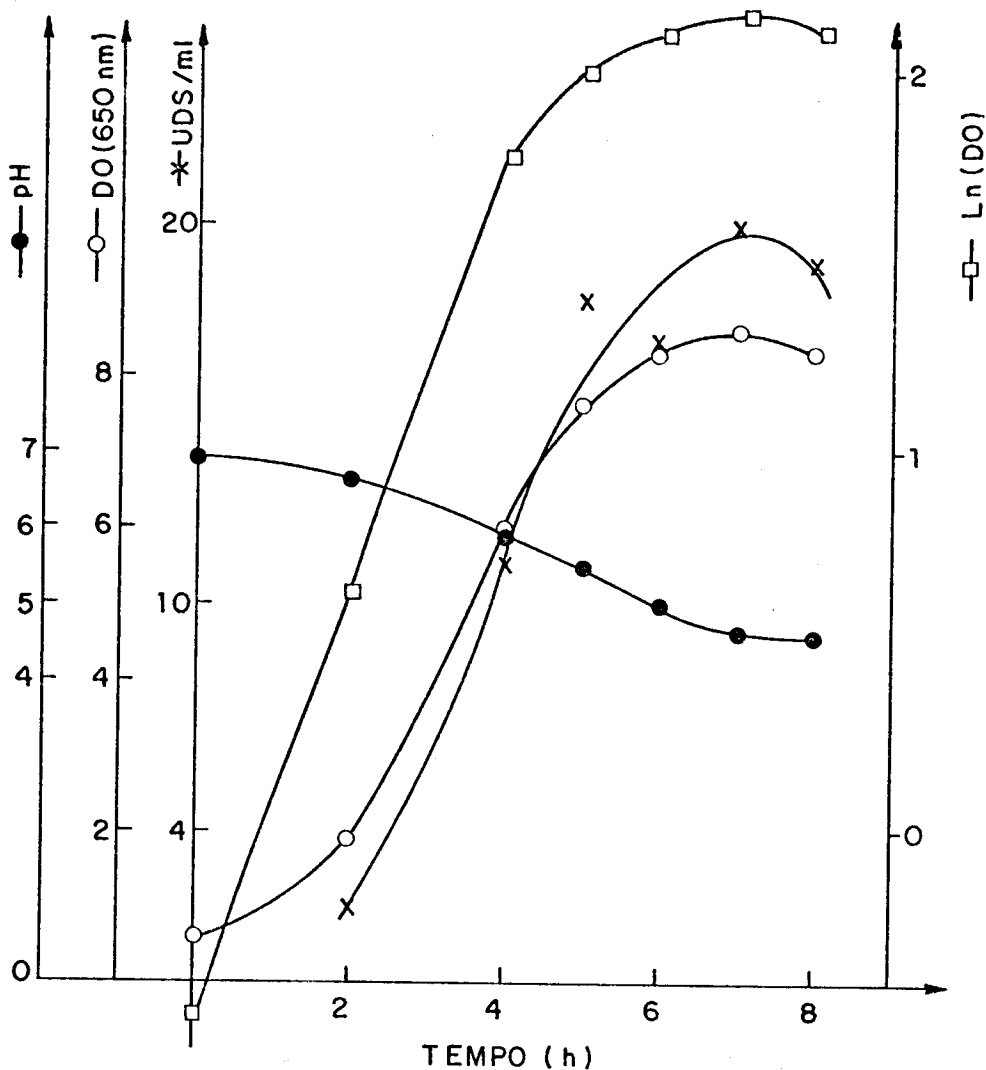


Figura 10: Evolução do pH, crescimento celular (DO e $\ln(\text{DO})$), e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* com meio padrão em frascos agitados.

b) Testes da temperatura de fermentação

Estes testes foram realizados nas mesmas condições do item a, variando somente a temperatura de fermentação.

A tabela 7 mostra a evolução do crescimento celular (DO) e da atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação, para as tempera-

turas testadas.

Para melhor visualização do efeito de temperatura sobre a produção de dextrana-sacarase, a evolução da atividade enzimática para as 5 temperaturas testadas, foram agrupadas na Figura 11.

A 15° C o crescimento celular e a produção de enzima foram muito lentos, o que resultou numa produtividade muito baixa, aproximadamente 3 vezes menor que nas condições de referência. No outro extremo testado, 35° C, o crescimento celular foi rápido e alcançou por volta de 4,5 g/l de células com 6 horas de fermentação. Entretanto, a atividade enzimática não alcançou 5 UDS/ml. A produção de dextrana-sacarase está associada com o crescimento, neste caso, o que aconteceu foi uma rápida desnaturação da enzima produzida, não permitindo o acúmulo. A literatura mostra que a enzima é bastante instável a esta temperatura, com um tempo de meia vida de poucos minutos (12, 41).

Entre 20 e 30° C a concentração máxima de enzima no meio de cultura alcançou o mesmo nível para todos os testes, em tempos diferentes. A 30° C a produção foi rápida, alcançando o máximo em 5 horas, no entanto, a desnaturação foi observada e com 7 horas a atividade era quase um terço da máxima atingida. A 20° C o crescimento ainda foi lento e o máximo de atividade foi atingido com 12 horas, o dobro do tempo a 30° C.

Pela análise desses resultados, decidiu-se trabalhar numa temperatura intermediária entre 25 e 30 °C (27 °C) dado que, este intervalo permitiu atingir níveis razoáveis de atividade num tempo curto. Na maioria dos trabalhos consultados, a temperatura de produção de dextrana-sacarase estava em torno de 25° C.

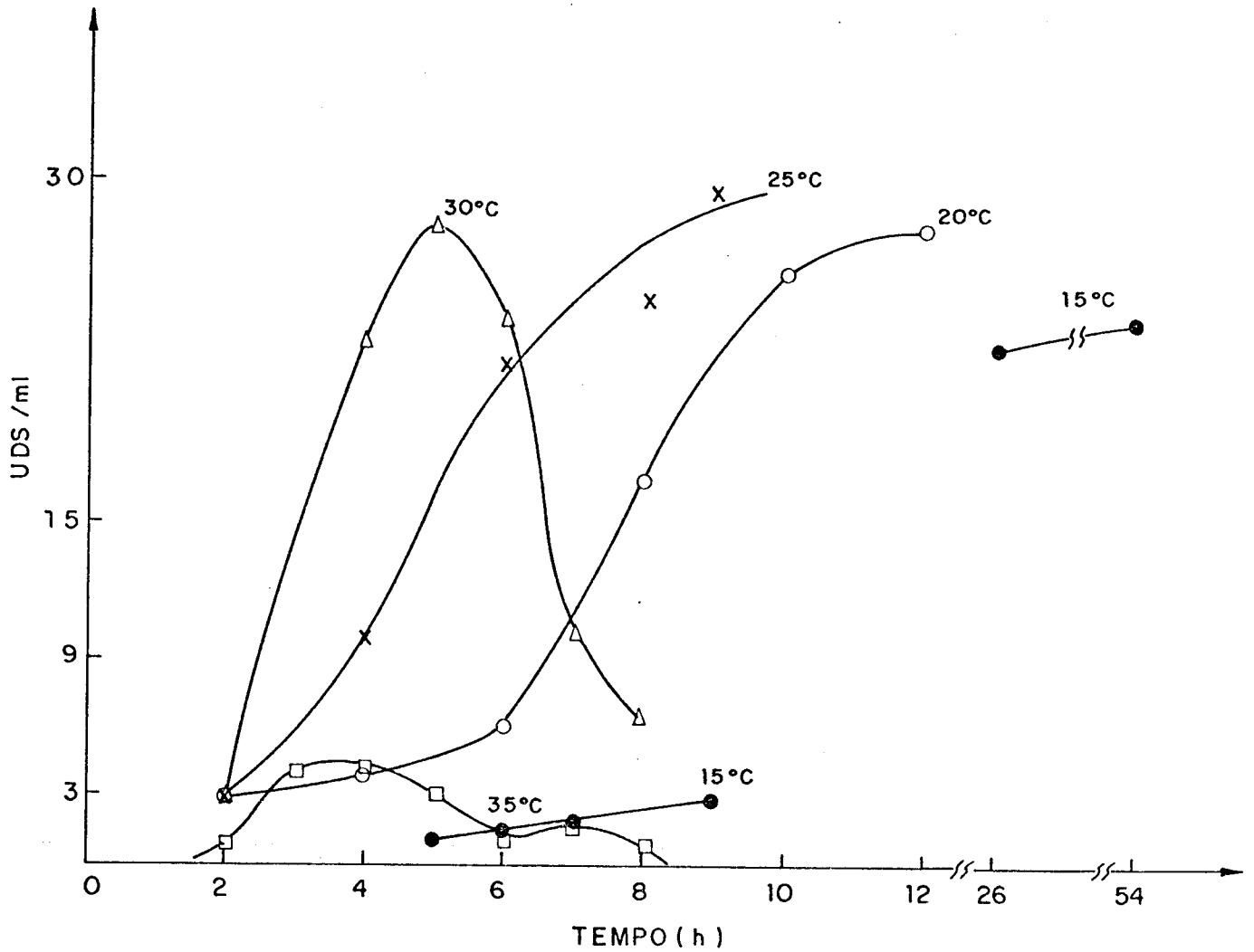


Figura 11: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* com meio padrão, em frascos agitados para temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 °C.

Tabela 7: Evolução do crescimento celular (DO) e atividade de dextrana sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* à diferentes temperaturas, em meio padrão.

T (°C)											
15	Tempo	0	5	7	9	26	54				
	DO	0,4	0,9	1,3	2,4	6,4	7,0				
	UDS/ml	0	1	2	3	23	24				
20	Tempo	0	2	4	6	8	10	12			
	DO	0,9	1,0	1,7	3,4	5,0	6,8	7,4			
	UDS/ml	0	3	4	5	17	25	28			
25	Tempo	0	2	4	6	8	9				
	DO	0,5	0,8	3,6	6,6	7,8	7,9				
	UDS/ml	0	3	10	22	25	29				
30	Tempo	0	2	4	5	6	7	8			
	DO	0,9	2,0	7,4	8,9	9,0	9,2	9,7			
	UDS/ml	0	3	23	28	22	10	7			
35	Tempo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
	DO	0,7	1,1	2,6	6,2	7,7	8,4	8,8	8,8	8,9	
	UDS/ml	0	0	1	4	4	3	1	2	1	

Agitação 150 rpm, pH inicial = 6,9, inóculo = 5%.

2. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

O parâmetro básico, para estes testes, foi a atividade enzimática máxima obtida no meio de cultura. Os meios de cultura foram formulados com base no meio padrão, substituindo-se, em concentrações variadas, as fontes de nutrientes. A utilização de melaço e água de maceração de milho, foi testada, por serem matérias primas de larga disponibilidade e de custos relativamente baixos.

a) Utilização de melaço como fonte de carbono

Tomou-se como base o meio padrão, substituindo a sacarose por melaço. O melaço, além de sacarose, contém outros açúcares, pequenas

quantidades de proteínas, sais minerais e outras substâncias, em quantidades variadas (1). A Tabela 8 mostra a evolução da atividade enzimática durante a fermentação, em meio de cultura com diferentes concentrações de melaço, contendo também extrato de levedura e sais, nas mesmas concentrações do meio padrão.

Conforme mostrado na tabela 8, a produção de dextrana-sacarase foi incrementada na medida em que se aumentou a concentração de melaço de 20 a 60 g/l. Acima desses valores a atividade enzimática, decaiu levemente, mostrando que a concentração ótima de melaço no meio de cultura está por volta de 50 - 60 g/l. Nas condições experimentais testadas, a substituição da sacarose por melaço promoveu um aumento de 25% em relação à produção de enzima no meio padrão.

Tabela 8: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) versus concentração de melaço (g/l) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em frascos agitados. T = 27° C, agitação 150 rpm.

		Atividade enzimática (UDS/ml)								
melaço g/l		20	40	50	60	70	80	100	150	*Ref.
tempo hs										
0		1	1	0	2	0	0	0	2	1
2		1	3	6	4	5	-	3	9	2
4		8	11	15	16	10	10	14	14	9
5		9	14	23	25	17	24	15	12	22
6		16	23	24	29	19	20	19	21	20
7		10	19	26	31	19	24	15	22	21
8		7	13	28	30	20	19	18	23	20
9		9	13	23	17	17	15	18	18	17

*Ref. = Referência = Meio padrão.

Condições de cultura: - Meio : Extrato de Levedura = 20 g/l; fosfato de potássio = 20 g/l; R - sais; melaço - variável.
T = 27° C; pH inicial = 6,9; agitação = 50 rpm; inóculo = 5%

Nos meios com mais de 60 g/l de melação, observou-se um aumento na viscosidade do meio, o que dificultou a separação das células, prejudicando as análises.

Com 60 g/l de melação a concentração de sacarose no meio de cultura ficava próxima de 40 g/l. TSUCHIYA e outros (94) mostraram que a produção de dextrana-sacarase aumentava com o aumento de sacarose até 120 g/l. Nestes ensaios, não se observou aumento de atividade à partir de 60 g/l de melação. Neste caso, porém, não foi aumentada somente a concentração de sacarose, pois devido à composição do melação, também foram aumentadas as concentrações de sais, açúcares redutores e outros elementos. Este fato pode ser a explicação de não conseguirmos maiores atividades com melação acima de 60 g/l.

Baseando-se nestes resultados, adotou-se, para os testes subsequentes, a concentração de 50 g/l de melação.

b) Utilização de água de maceração de milho (AMM) como substituto do extrato de levedura.

Nos testes com AMM, o meio básico foi formulado com melação 50 g/l e demais sais, componentes do meio padrão.

A Tabela 9 mostra os resultados desses testes. A temperatura, agitação e pH inicial foram: 27° C, 150 rpm e 6,9, respectivamente. Estas condições foram as mesmas para todos os testes de meio de cultura.

A substituição do extrato de levedura por AMM, não proporcionou nenhum incremento significativo na produção de dextrana-sacarase. Conforme a tabela 9, a atividade enzimática foi praticamente a mesma do meio de referência (meio padrão).

Tabela 9: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) versus concentração de água de maceração de milho (AMM) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em frascos agitados.

Melaço g/l \ tempo hs	10	20	30	40	50	80	100	*Ref.
0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	2	0	2	0	0	0	3	2
3	10	10	3	2	4	5	4	9
4	15	16	10	10	6	7	12	14
5	18	19	15	17	9	17	20	17
6	20	22	18	20	13	16	21	19
7	18	18	10	12	22	21	20	15
8	18	14	8	11	16	18	16	-

*Ref. = Referência = Meio padrão.

Condições de cultura: - Meio : Melaço = 50 g/l; fosfato de potássio = 20 g/l; R - sais; AMM - variável.
T = 27° C; pH inicial = 6,9; agitação = 50 rpm; inóculo = 5%

O aumento da concentração de AMM no meio de cultura não favoreceu o aumento da produção de dextrana-sacarase. Observou-se que com 10 g/l de AMM, os resultados foram praticamente os mesmos obtidos com 100 g/l.

O uso de AMM, em substituição ao extrato de levedura foi testado por outros pesquisadores e os resultados não diferenciam muito. TSUCHIYA e col. (95) mostraram que o aumento da concentração de AMM no meio de cultura, somente proporcionou um aumento na produção de dextrana-sacarase, quando acompanhado de um aumento simultâneo de fosfato de potássio. Entretanto, todos os resultados se referem a meios de cultura com sacarose pura, enquanto que neste caso utilizou-se melaço.

Pelos resultados expostos na Tabela 9, adotou-se, nos testes seguintes, concentrações de 10 g/l de AMM como ideal.

c) Teste de sais

Foram realizados dois ensaios diferentes, para verificação da necessidade de adição dos sais usados no meio padrão. Considerando que o melaço já continha uma quantidade significativa de sais, os testes foram realizados com a finalidade de verificar, se era necessário alguma complementação, ou se o melaço poderia, sozinho, suprir as necessidades.

No primeiro teste (Tabela 10), deixou-se de colocar um dos sais em cada frasco e acrescentou-se os demais. No segundo teste (Tabela 11), só foi acrescentado um sal em cada frasco.

O meio base foi formulado baseando-se nos testes anteriores e era constituído de: melaço 50 g/l, AMM 10 g/l e fosfato de potássio 20 g/l.

Tabela 10: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em frascos agitados, com variação na composição salina do meio de cultura.

Meio de Cultura								
Tempo (h)	1	2	3	4	5	6	7	8
0	2	1	1	1	2	1	2	0
3	2	5	9	11	5	5	15	5
5	11	18	20	24	18	19	20	17
6	14	18	17	24	22	20	14	19
7	11	18	4	22	21	18	16	21
8	13	19	-	23	16	17	14	19

Meio de Cultura: Meio base = melaço 50 g/l; AMM = 10 g/l; fosfato de potássio = 20 g/l; R - sais: cloreto de cálcio = 0,02 g/l; sulfato ferroso = 0,01 g/l; sulfato de magnésio = 0,2 g/l; cloreto de sódio = 0,01 g/l; sulfato de manganês = 0,01 g/l. T = 27° C.

1- Sem adição de cloreto de cálcio; 2- Sem adição de sulfato ferroso; 3- Sem adição de sulfato de magnésio; 4- Sem adição de cloreto de sódio; 5- Sem adição de sulfato de manganês; 6- Meio base (com todos os sais); 7- Adição de 0,1 g/l de sulfato de manganês; 8- Sem adição de R - sais.

Tabela 11: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em frascos agitados, com variação na composição salina do meio de cultura.

Atividade Enzimática (UDS/ml)							
Tempo (h)	1	2	3	4	5	6	*Ref.
0	0	0	0	1	2	0	2
2	1	1	1	2	2	-	-
4	5	5	5	7	7	6	16
6	17	16	13	16	12	13	15
8	19	18	19	18	12	14	10

*Ref = Referência = meio padrão

Meio de cultura: Meio base: melaço = 50g/l; AMM = 10 g/l; fosfato de potássio = 20 g/l. T = 27° C.

1- Meio base; 2- Meio base + sais (completo nas concentrações do meio padrão); 3- Meio base + cloreto de cálcio 0,01 g/l; 4- Meio base + sulfato de magnésio 0,2 g/l; 5- Meio 2 com 10 g/l de fosfato de potássio; 6- Meio base + cloreto de cálcio 0,01 g/l e sulfato de magnésio 0,2 g/l.

A adição ou omissão de sais não modificou, de forma significativa, a produção de dextrana-sacarase no meio com melaço e AMM. Nos frascos, onde não foi adicionado nenhum sal, a atividade enzimática foi praticamente a mesma daqueles, onde foram adicionados todos os sais, conforme mostram as tabelas 10 e 11. Nesse caso, a precisão do teste é dificultada, devido à composição salina do melaço e da AMM. De qualquer forma, a intenção foi saber se esse meio necessitaria de complementação, e por esses resultados, concluiu-se que o melaço supria as necessidades em sais do *Leuconostoc mesenteroides*, para a produção de dextrana-sacarase, nas condições de fermentação testadas.

Em meios de cultura, preparados com sacarose pura, na maioria dos trabalhos consultados, os pesquisadores utilizaram a complementação de sais proposta por KOEPEL e TSUCHIYA (46), à qual denominaram "R

Salts". Apesar do uso rotineiro destes sais (21, 48, 61, 75), não se encontrou na literatura, praticamente nenhum estudo sobre a necessidade destes na produção de dextrana-sacarase.

No presente trabalho, a comparação fica prejudicada, uma vez que foi utilizado o melaço, e não se encontrou nenhuma referência na literatura da produção de dextrana-sacarase em meios de cultura, preparados com melaço. Por outro lado, sabendo-se que o melaço contém, em proporções variadas, todos os sais em questão (1), era de se esperar que suprisse essas deficiências.

Uma outra observação da Tabela 11 está relacionada à concentração de fosfato de potássio. No meio 5 desta tabela, foi usado a metade do fosfato empregado nos outros frascos, observando-se aí uma rápida queda do pH e níveis levemente inferiores de atividade enzimática. Assim, foi necessário testar a variação desse parâmetro separadamente.

d) Teste de Fosfato de Potássio

O meio base para estes testes continha apenas melaço 50 g/l e AMM 10 g/l. Devido aos resultados do teste anterior (item c), não foram adicionados outros sais no meio de cultura.

A tabela 12 mostra a evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação em frascos agitados, em meios de cultura com diferentes concentrações de fosfato de potássio.

Observa-se na Tabela 12, que houve um nítido aumento na produção de enzima, quando a concentração de fosfato aumentou de 0 até 30 g/l. No frasco onde não foi colocado fosfato, a atividade enzimática no meio de cultura foi muito baixa. Neste caso, observou-se uma queda muito rápida do pH, sendo, talvez, esta uma das razões da baixa ativi-

dade. Uma das funções principais do fosfato, neste tipo de fermentação, é a tamponação do meio, permitindo que o pH permaneça por mais tempo na faixa ótima de produção de dextrana-sacarase. TSUCHIYA e col. (94) observaram que a produção da enzima por *Leuconostoc mesenteroides*, é bastante afetada pelo pH, sendo mais favorável o pH em torno de 6,7.

Tabela 12: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) versus concentração de fosfato de potássio durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides*.

Tempo (h)	Atividade Enzimática (UDS/ml)						
	Concentração de Fosfato de Potássio g/l						
	0	10	20	30	40	20*	20**
0	0,5	1,5	2	3	1,5	2	1
4	1,5	12	16	16	9	7	16
6	2	14	26	33	20	18	23
8	1	13	24	31	26	17	22
9	3	11	23	32	25	18	21
Inóculo	3						

20* - colocado antes da esterilização

20** - adição de 0,20 g/l de sulfato de magnésio.

Meio de cultura: melaço = 50 g/l, AMM = 10 g/l, fosfato de potássio - variável, T = 27° C.

Acima de 30 g/l de fosfato, notou-se uma queda na produção de enzima, como mostra a Tabela 12.

Em um dos frascos, o fosfato foi adicionado ao meio de cultura antes da esterilização. Foi observado, neste caso, uma leve queda na produção da enzima. Isto se deve ao fato de ocorrer precipitação, quando o meio é aquecido juntamente com fosfato, precipitando compostos orgânicos e, principalmente, íon cálcio, que tem função estabilizadora da enzima (41, 61).

Outro teste, mostrado na Tabela 11, foi a adição de sulfato

de magnésio em um dos frascos. Isto foi feito, devido à concentração desse sal, usada no meio padrão ser bastante alta (20 vezes maior que os demais sais, com exceção do fosfato de potássio), e com 50g/l de melão no meio de cultura a concentração de sulfato de magnésio ficaria bem a baixo daquela do meio padrão, baseando-se na sua concentração média no melão, segundo ALMEIDA (1). Observou-se, entretanto, que a adição de sulfato de magnésio não melhorou a produtividade de dextrana-sacarase.

e) Teste de Caldo de Cana (Fresco)

A tabela 13 mostra a evolução da atividade nas fermentações, utilizando caldo de cana como substituto do melão. O caldo de cana continha aproximadamente 150g/l de sacarose e 160g/l de açúcares totais. Foram feitas diluições, de forma a variar a concentração de sacarose no meio entre 20 e 80 g/l.

A utilização de caldo de cana não demonstrou nenhuma vantagem, em termos de produção de dextrana-sacarase, em relação ao melão. Uma das diferenças básicas entre o caldo de cana fresco e o melão é a concentração de açúcares redutores, sendo mínima no caldo de cana onde praticamente todo o açúcar é sacarose. Assim, esperava-se uma maior produção de enzima, devido ao caráter indutivo da dextrana-sacarase. Entretanto isso não ocorreu. Como mostra a Tabela 13, as atividades enzimáticas máximas ficaram abaixo dos ensaios com melão (Tabela 8). Assim sendo, não foram feitos outros testes com caldo de cana.

Tabela 13: Evolução da atividade de destrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em meios formulados com caldo de cana.

Tempo (h)	Atividade Enzimática (UDS/ml)					
	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6
0	0	1	0	0	2	1
4	19	12	10	3	12	13
6	11	20	19	19	18	14
8	15	26	23	14	17	15

Fosfato de Potássio = 20 g/l; AMM = 10 g/l; sulfato de magnésio = 0,2 g/l; sais - R - sais (na concentração do meio padrão)

Meios:

- 1- caldo de cana puro
- 2- caldo diluído (1-4) adição de fosfato, sais e AMM
- 3- caldo diluído (1-4) adição de fosfato, sulfato de magnésio e AMM
- 4- caldo diluído (1-2) adição de fosfato, sulfato de magnésio e AMM
- 5- caldo diluído (1-6) adição de fosfato, sulfato de magnésio e AMM
- 6- caldo diluído (1-6) adição de fosfato e AMM.

3. FERMENTAÇÃO EM MINI-FERMENTADORES - BATELADA

Decidiu-se pela utilização de mini-fermentadores no lugar de frascos agitados, principalmente pela possibilidade de se controlar o pH durante a fermentação. A produção de dextrana-sacarase é bastante afetada pelo abaixamento de pH que ocorre durante a fermentação.

TSUCHIYA e col. (94) mostraram que com o pH controlado, a produtividade aumenta bastante, sendo este recurso usado por grande parte dos pesquisadores na produção de dextrana-sacarase (48, 49, 58, 61, 68, 75).

O esquema utilizado nas fermentações com pH controlado está mostrado na Figura 8, em Materiais e Métodos.

Foram realizados ensaios com e sem controle de pH. As Figuras 12 e 13 mostram os resultados das fermentações com o meio padrão, sendo uma sem controle de pH (Figura 12) e outra com controle (Figura 13).

Como podemos observar, a atividade enzimática na fermentação com pH controlado, atingiu quase o dobro daquela sem controle, alcançando 40 UDS/ml. Nestas condições, TSUCHYIA (96) e KOEPEL (46) conseguiram atingir com 8 horas de fermentação 50 UDS/ml. HEHRE (26) também relata atividades um pouco acima desses valores, enquanto outros autores (41, 48, 75) trabalhando em condições semelhantes obtiveram atividades menores.

A Figura 14, mostra a evolução do pH, crescimento celular (DO), atividade enzimática e substrato (açúcares totais) durante a fermentação em mini-fermentador sem controle de pH e meio de cultura formulado com melão e AMM. Comparada com a fermentação em meio padrão (Figura 12) observou-se que com o melão o pH sofreu uma menor queda e a produção de dextrana-sacarase foi um pouco superior. Neste caso, o efeito tamponante do melão parece ter favorecido a produção. Essas diferenças também foram observadas nas fermentações em frascos agitados.

Nos ensaios, utilizando melão e o pH controlado (Figura 15) a produção de dextrana-sacarase também foi maior, porém com um resultado pouco inferior ao obtido com meio padrão em condições semelhantes, sendo que a concentração inicial de açúcares totais (AT) foi um pouco inferior nos meios com melão, podendo ser este fato uma das causas da menor produção de enzima. De uma forma geral o controle de pH provocou um incremento em torno de 50% na produção da enzima.

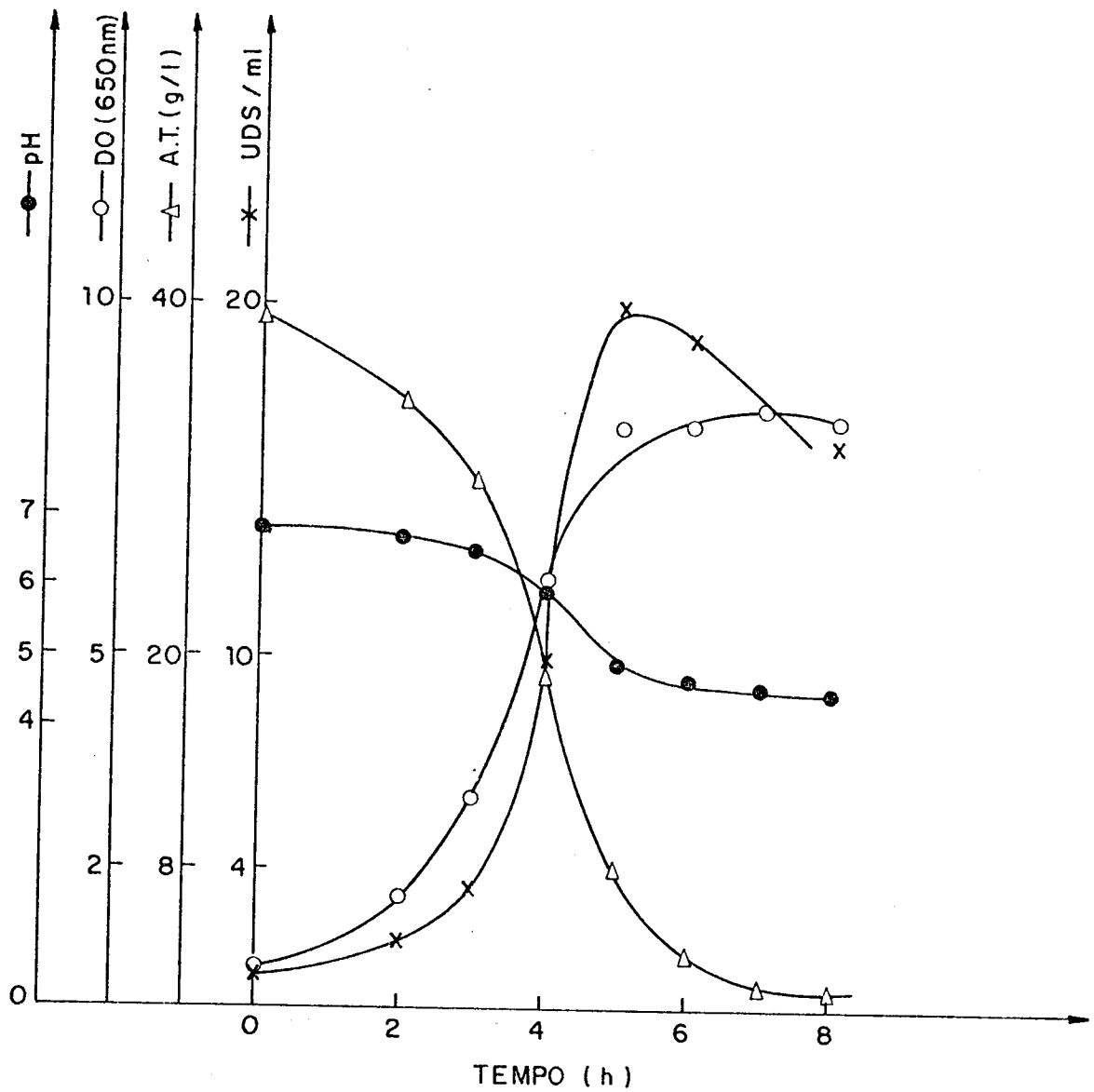


Figura 12: Evolução do pH, crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml), durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em mini-fermentadores com meio padrão, sem controle de pH. Temperatura = 27° C.

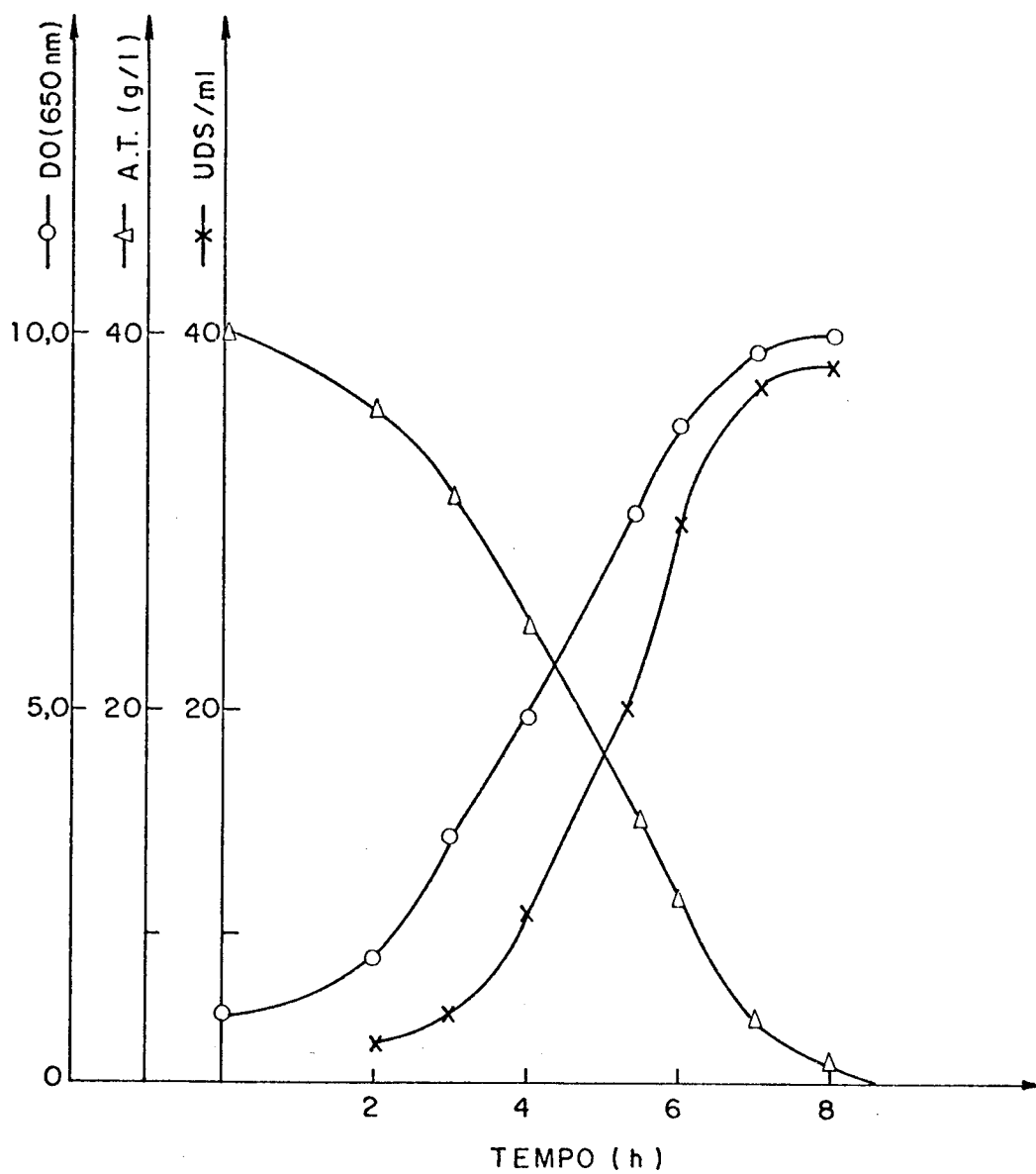


Figura 13: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml), durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em mini-fermentadores com meio padrão e pH controlado (pH = $6,7 \pm 0,3$). Temperatura = 27° C.

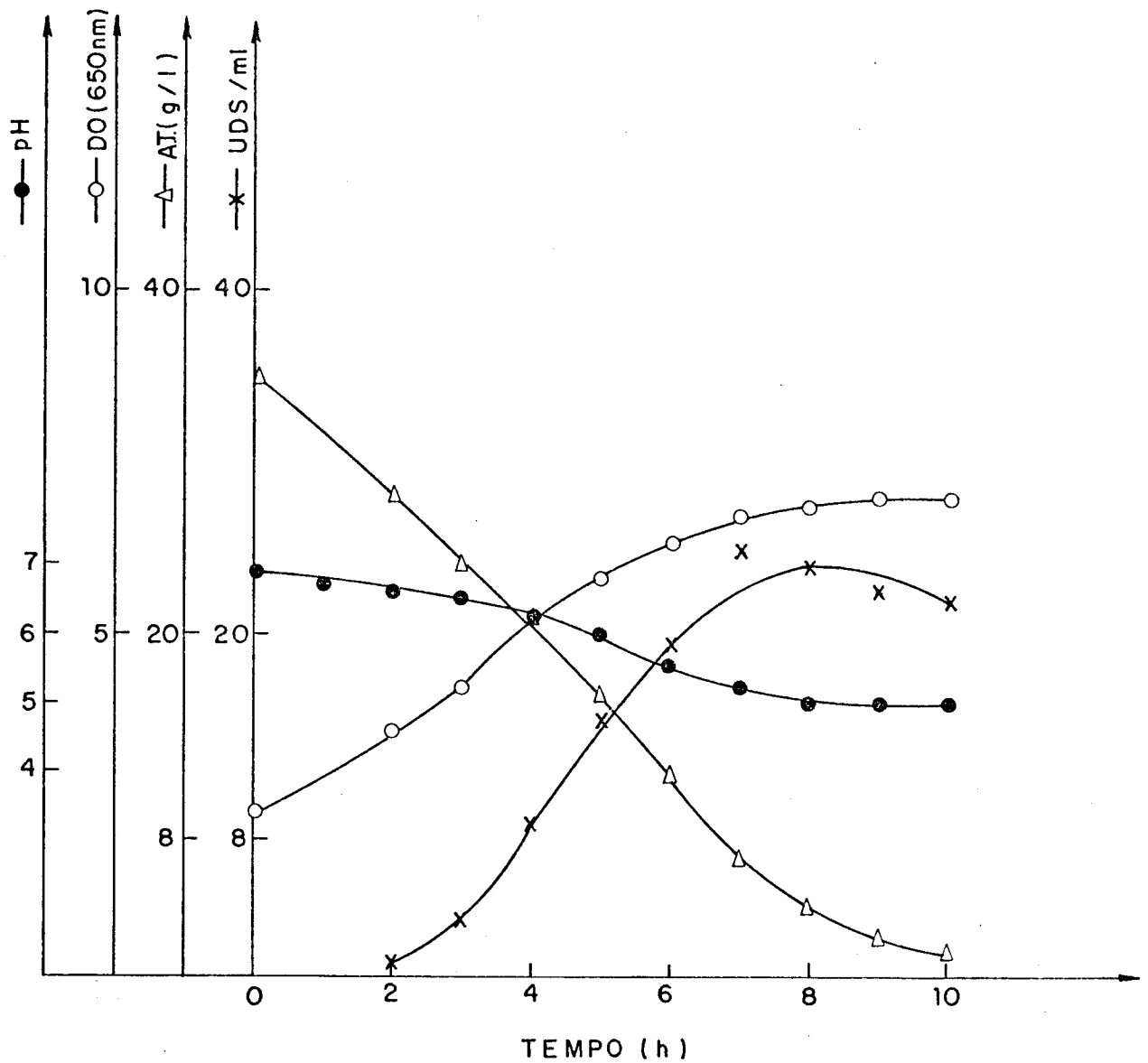


Figura 14: Evolução do pH, crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em mini-fermentadores com meio base de meloço e AMM, sem controle de pH. Temperatura = 27° C.

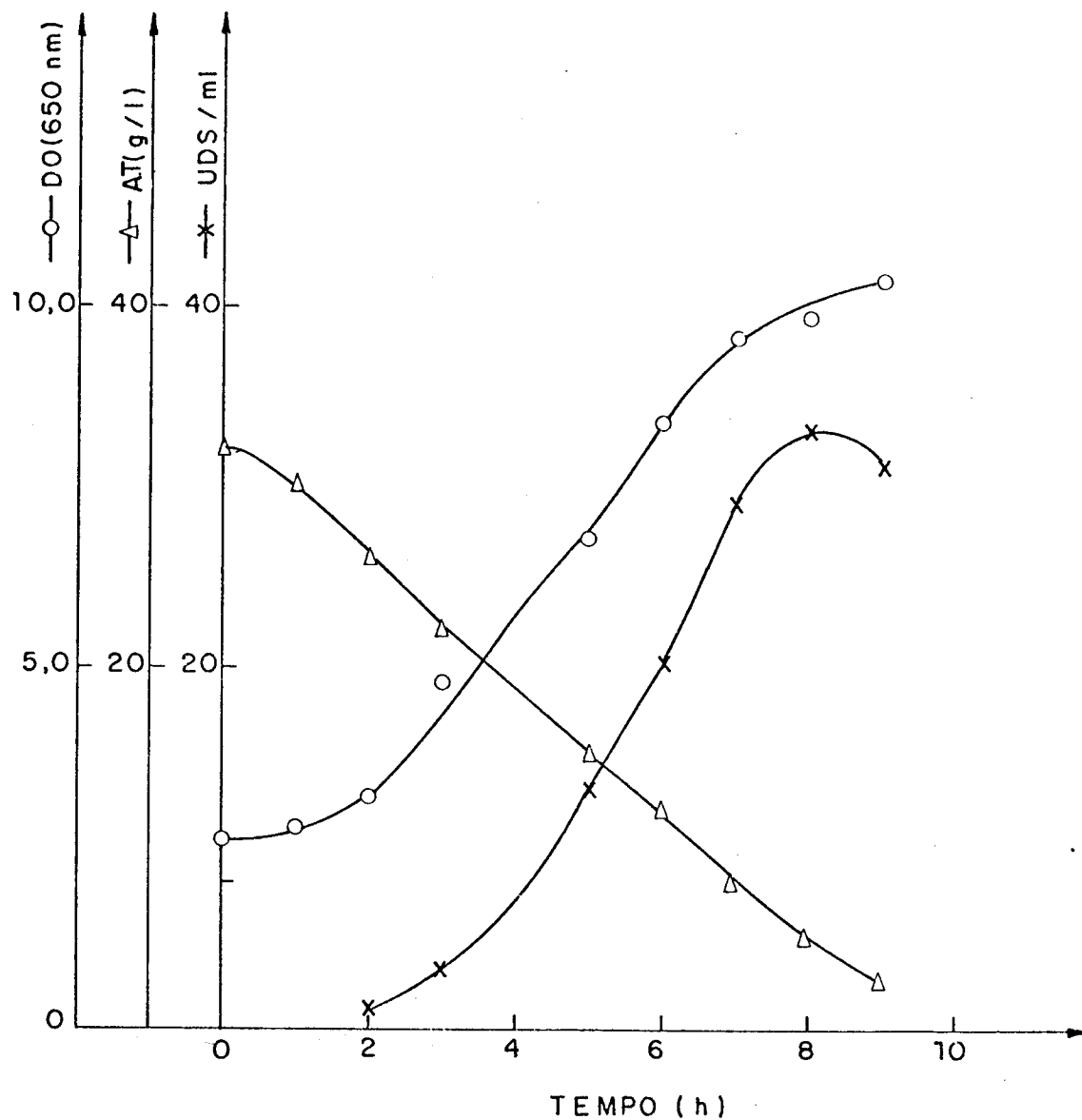


Figura 15: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em mini-fermentadores com meio de melaço e AMM, com pH controlado a $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C .

4. ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA

Nas fermentações em batelada (itens 2 e 3), a produção máxima de enzima foi observada na fase de crescimento, quando no meio de cultura ainda existia certas quantidades de sacarose. Como a produção de dextrana-sacarase pelo *Leuconostoc mesenteroides* obedece um processo de indução com a sacarose (66), é necessário a manutenção de uma concentração mínima deste açúcar, para que ocorra a produção da enzima. Estas observações também foram feitas por outros pesquisadores (2, 49, 61, 68), os quais conseguiram multiplicar a produtividade de dextrana-sacarase em até seis vezes, adicionando sacarose no meio de cultura durante a fermentação. Baseando-se nestas observações, foram testadas duas formas de adição de substrato durante a fermentação, com o objetivo de se conseguir maior produtividade.

4.1. ADIÇÃO DE SACAROSE CONJUGADA COM O SISTEMA CONTROLADOR DE pH

a) Meio padrão

A velocidade de consumo de sacarose varia durante a fermentação. No início é baixa, aumenta nas primeiras horas e depois diminui no final da fermentação. Para manter a concentração de sacarose dentro de um certo limite, é necessário que a velocidade de adição de sacarose seja variável de acordo com a variação da velocidade de consumo. Baseado nestas considerações, montou-se um esquema de alimentação combinado ao controle de pH, colocando no frasco usado como reservatório de NaOH uma solução de NaOH e sacarose, conforme Figura 8. Dessa forma ao injetar a base, para acertar o pH, havia uma injeção simultânea de sacarose. Como podemos observar na Figura 12, a queda do pH mantém certa correspondência com o crescimento e com o consumo de substrato.

O microrganismo, para crescer, consome açúcares e ao mesmo tempo produz ácidos orgânicos que vão baixar o pH.

As Figuras 16 e 17 mostram a evolução do crescimento celular, da concentração de enzima e substrato durante a fermentação com a adição contínua de sacarose em meio padrão. O pH foi controlado em $6,7 \pm 0,3$. No primeiro caso, Figura 16, a fermentação foi conduzida sem aeração e no segundo, Figura 17, com aeração de 0,5 VVM.

Com a adição contínua de substrato o crescimento celular é maior, atingindo por volta de 8 g/l de células (massa seca) com 12 horas. Isto representa um aumento na produção de células de quase 100%.

Quanto à produção de dextrana-sacarase, também houve um aumento de aproximadamente 100%, atingindo cerca de 60 UDS e 50 UDS respectivamente com e sem aeração. A aeração promoveu uma produção de enzima um pouco superior. A partir destes ensaios decidiu-se realizar os demais estudos em condições aeróbicas.

Os resultados obtidos por este método, apesar de apresentarem um incremento na produção de dextrana-sacarase, ficaram um tanto quanto abaixo dos resultados apresentados pela literatura (LOPES, 180 UDS/ml (49) e ALSOP, 200 - 300 UDS/ml (2)).

A velocidade média de adição de sacarose, nos dois casos, ficou entre 12 a 15 g/l.h. A solução de adição continha 400 g/l de sacarose e NaOH 1 N.

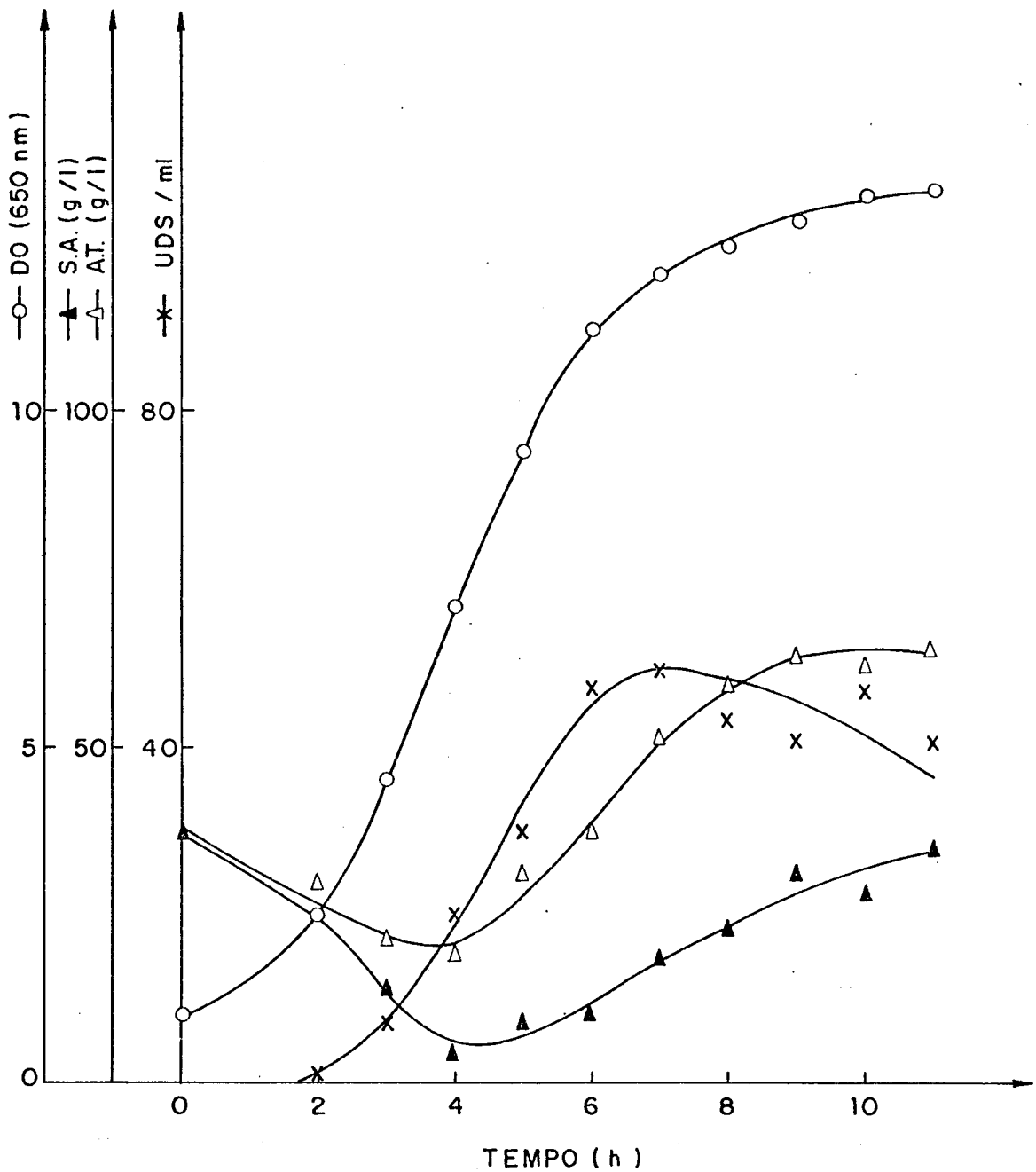


Figura 16: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em batelada alimentada. Meio padrão, pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C . Solução de adição = sacarose 400 g/l e NaOH 1 N, sem aeração.

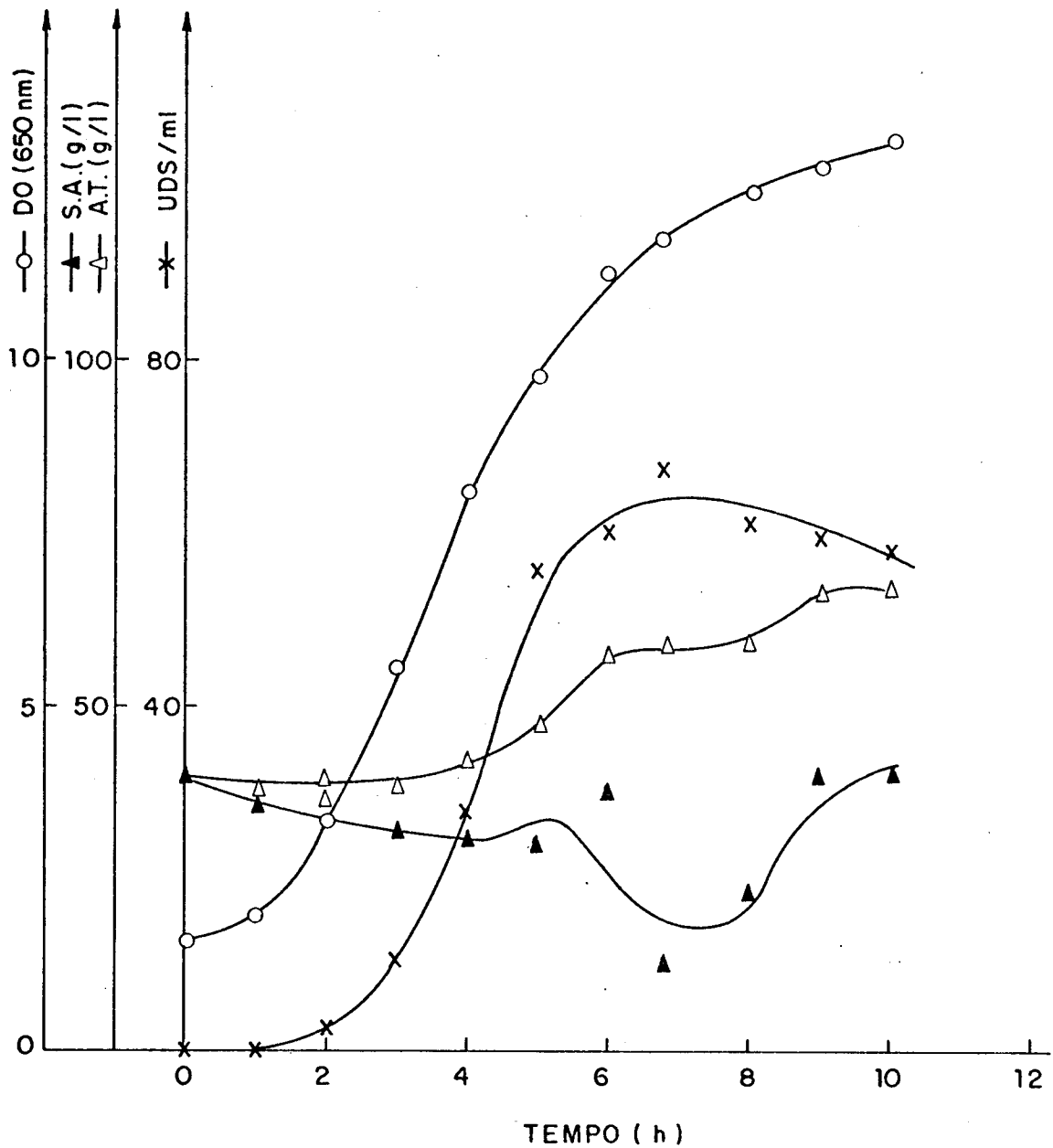


Figura 17: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (AT) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em batelada alimentada. Meio padrão, pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27° C. Solução de adição = sacarose 400 g/l e NaOH 1 N, com aeração.

b) Meios formulados - melaço e AMM

Os ensaios utilizando como meio de cultura, melaço e AMM, foram realizados de forma semelhante aos experimentos com meio padrão. Como já havia sido observado nas experiências anteriores o poder tamponante do melaço, foi necessário variar a concentração da solução a ser adicionada, de forma que a sacarose fosse injetada em quantidades suficientes. Os resultados estão mostrados na tabela 14. Como se observa, esses ensaios não resultaram em nenhum aumento na produção de dextrana-sacarase. O crescimento celular foi baixo, e dessa forma a velocidade de adição de sacarose não passou de 8 g/l.h.

Na tentativa de encontrar alguma explicação para esses resultados foram feitos dois ensaios sem adição de fosfato no início (Figura 18), que assim, diminuindo o poder tamponante do meio incrementaria a adição de sacarose. Em um dos ensaios (K1) a solução de adição continha fosfato e no outro (K2) NaOH. No caso K1, com fosfato na solução, houve uma menor produção de enzima que no outro caso, K2 que atingiu os níveis da fermentação sem adição de sacarose.

Nos dois casos a velocidade média de adição de sacarose foi em torno de 10 g/l.h, um pouco superior ao caso anterior (Tab.14). Como neste caso também não foi observado uma maior produção de dextrana-sacarase, resolveu-se testar outros parâmetros.

A substituição parcial da AMM por extrato de levedura (Figura 19) incrementou o crescimento celular e promoveu um leve aumento na produção de enzima, mostrando provavelmente uma deficiência nutricional do meio base. Estes resultados, em meios com melaço e adição de sacarose combinada com o pH, não foram satisfatórios, preferindo-se portanto abandonar este sistema de adição de substrato.

Tabela 14: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante as fermentações em batelada alimentada em meios com melaço e AMM e alimentação com sacarose, conjugada com o pH.

Tempo (h)	Atividade enzimática (UDS/ml)			
	A1	A2	A3	A4
0	0	0	0	-
1	0	0	0	1
2	0	3	3	2
3	5	4	5	4
4	11	9	15	13
5	16	17	20	20
6	17	17	28	26
7	15	13	26	35
8	15	18	26	32
9	11	13	26	26
10	--	13	28	34

meio de cultura: melaço = 50 g/l, AMM = 10 g/l, K HPO₄ = 20 g/l
T = 27 °C, aeração = 0,5 VVM, pH = 6,7 ± 0,3

- A1 - Solução de adição: sacarose 200 g/l e NaOH 1 N
- A2 - Solução de adição: sacarose 300 g/l e NaOH 1 N
- A3 - Solução de adição: sacarose 400 g/l e NaOH 1 N
- A4 - Solução de adição: sacarose 500 g/l e NaOH 1 N

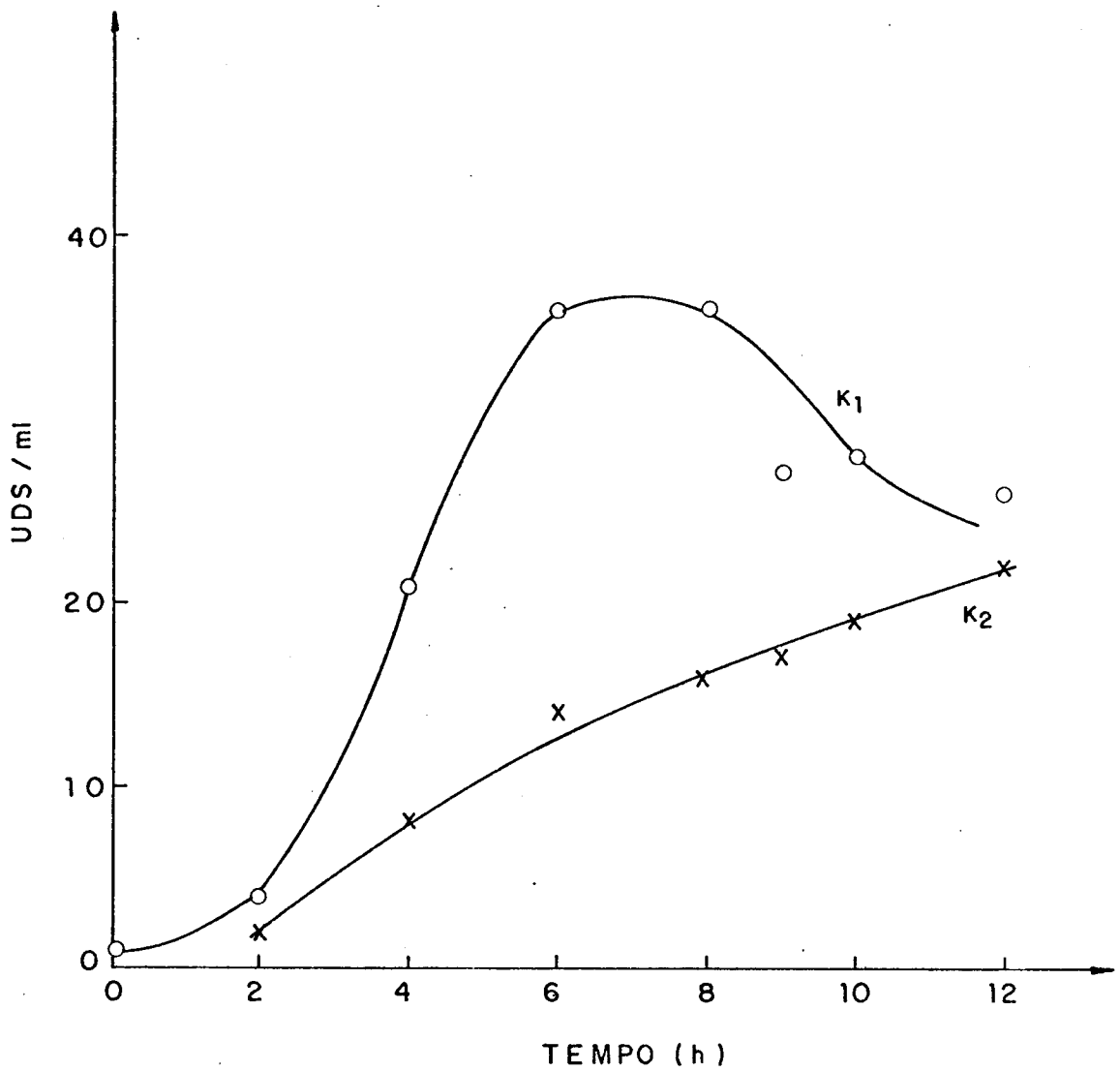


Figura 18: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em batelada alimentada. Meio de melaço e AMM. K1- solução de alimentação =sacarose 400 g/l + NaOH 1 N. K2- solução de alimentação =sacarose 400 g/l + K HPO 50 g/l. pH = 6,7 ± 0,3. Temperatura = 27° C, aeração = 0,5 VVM.

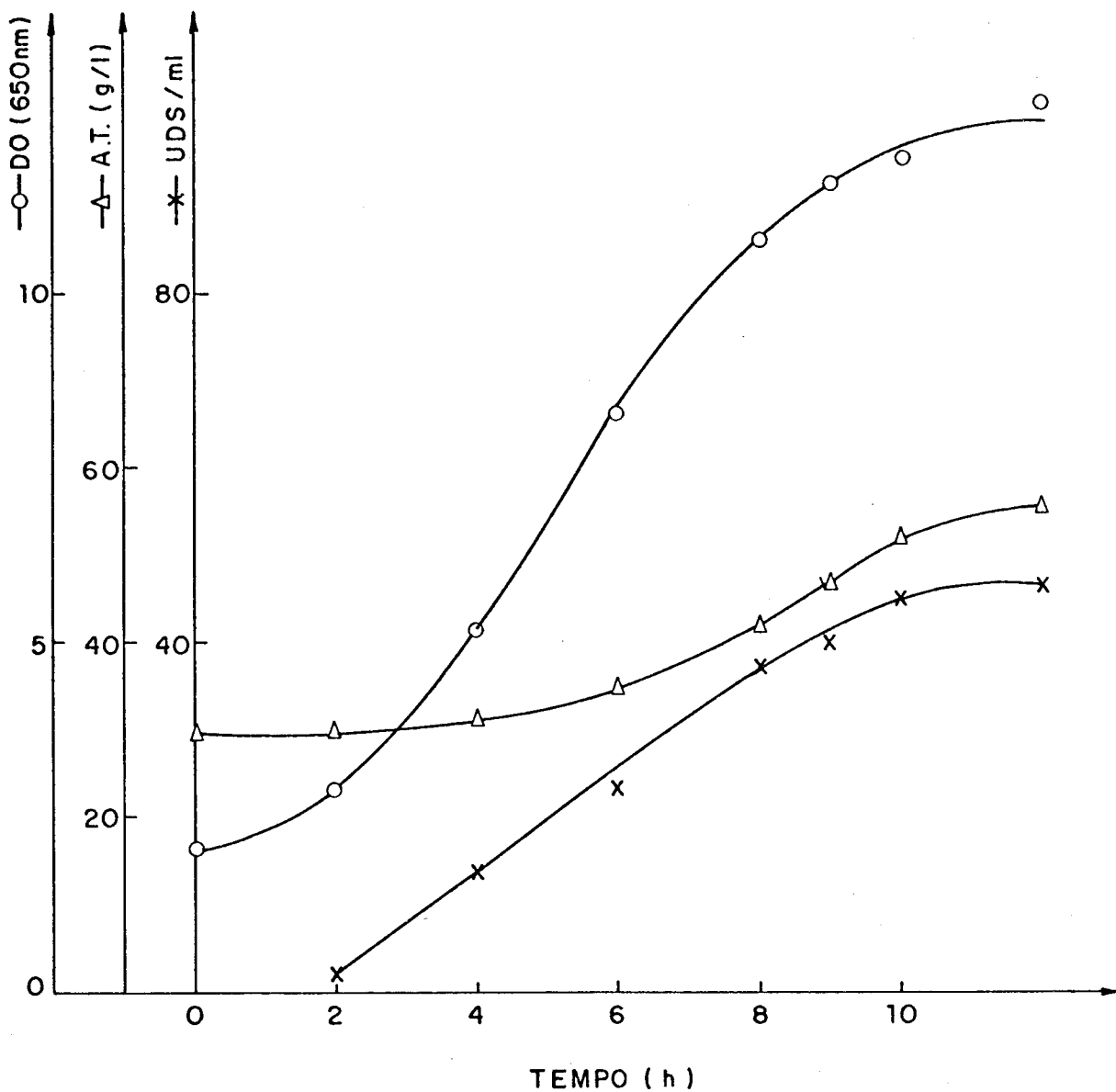


Figura 19: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (A.T.) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição de sacarose. Meio base (melaço = 50 g/l, AMM = 10 g/l, fosfato de potássio = 20 g/l) complementado com 10 g/l de extrato de levedura. pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C , aeração = 0,5 VVM.

4.2. ADIÇÃO DE SUBSTRATO INDEPENDENTE DO pH.

a) Em meio padrão

A Figura 20 mostra a evolução da atividade enzimática (UDS/ml), o crescimento celular e a concentração de substrato durante a fermentação com adição contínua de sacarose na razão de 18 g/l.h., em meio padrão, com 20 g/l de sacarose no meio de cultura no início do processo.

A adição foi realizada por um sistema auxiliar mostrado na Figura 7 (Materiais e Métodos) em linhas pontilhadas, através de uma bomba de fluxo regulável e um temporizador. A velocidade de adição foi escolhida com base na velocidade máxima de consumo de substrato do ensaio, com adição combinada de sacarose em meio padrão (Figura 17). A estimativa da velocidade de consumo foi feita através de um balanço de massa entre os pontos de amostragem, conhecendo-se a quantidade de açúcar adicionada num dado intervalo de tempo , através da pesagem do frasco depósito (figura 8) e a concentração de açúcares de cada amostra, pela medida direta dos açúcares totais.

A Figura 21 mostra a evolução atividade enzimática para três fermentações, variando-se somente a concentração inicial de substrato. Esta variação foi necessária para verificar o efeito do acúmulo inicial, devido à menor velocidade de consumo nas primeiras horas. Os dados da Figura 20 (concentração inicial de 20 g/l de sacarose) foram destacados por terem alcançado os maiores níveis de concentração de dextrana-sacarase no meio fermentado. Os valores máximos de atividade enzimática, obtidos nos três casos, com 10, 20 e 40g/L de sacarose no início da fermentação, foram respectivamente 90, 95 e 60 UDS/ml.

Com adição de sacarose independente do pH, a produção de en-

zima alcançou níveis de produtividade em torno de 3 - 4 vezes superiores às fermentações sem adição, utilizando meio padrão. A concentração inicial de sacarose de 40 g/l, como fora utilizada nos testes anteriores, não favoreceu a produção de dextrana-sacarase em fermentações com adição contínua de sacarose. Conforme mostra a Figura 21, as concentrações de 10 e 20 g/l deram melhores resultados.

b) Em meios com melação e AMM

Nos ensaios com adição de sacarose combinada com NaOH em meios à base de melação e AMM, as velocidades de adição não ultrapassaram 10 g/l.h. Assim, resolveu-se testar velocidades maiores de adição.

Com adição de até 18 g/l.h de sacarose, independente do pH, em meios com melação e AMM, não se conseguiu nenhum aumento na produção de dextrana-sacarase (resultados não mostrados).

Quando se substituiu a AMM por extrato de levedura (Figura 19), foi observado um aumento na produção de enzima. A adição de sacarose não se mostrou favorável tanto quanto a adição de melação na produção de enzima. Assim sendo, decidiu-se conduzir experimentos com adição de melação e testar o enriquecimento do meio com extrato de levedura.

Adicionou-se continuamente melação, utilizando uma solução com 700 g/l de melação, utilizando o sistema da Figura 7 (materiais e métodos), ajustado de forma a injetar 28 g/l.h de solução no meio durante toda a fermentação. Este valor foi estimado em função da velocidade de consumo de substrato nas fermentações sem adição e da concentração da solução de adição. O meio foi complementado com 10 g/l de extrato de levedura.

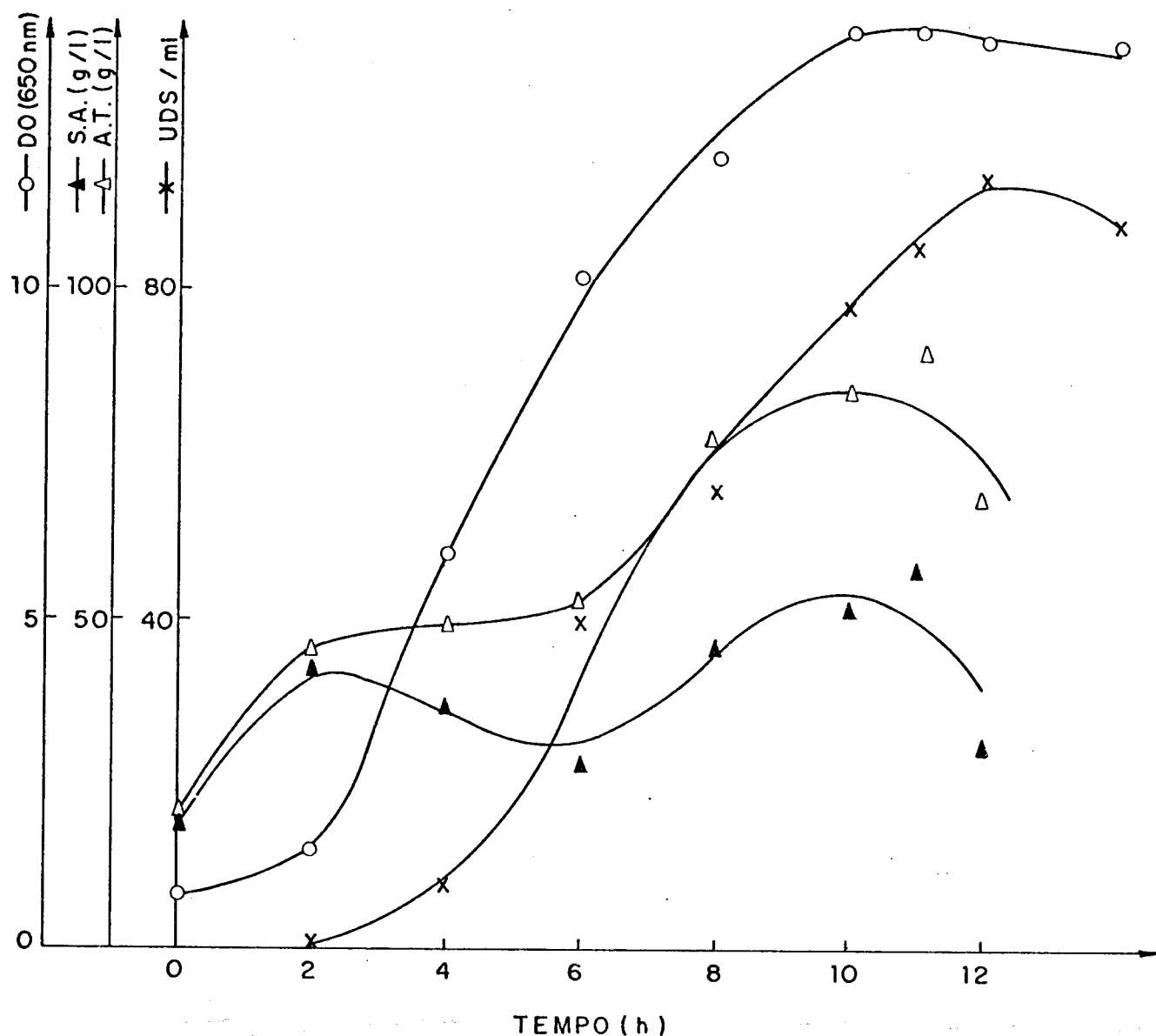


Figura 20: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (A.T.) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* com adição contínua de sacarose (18 g/l.h). Meio padrão, com 20 g/l no início. pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = $27^{\circ}C$, aeração = 0,5 VVM.

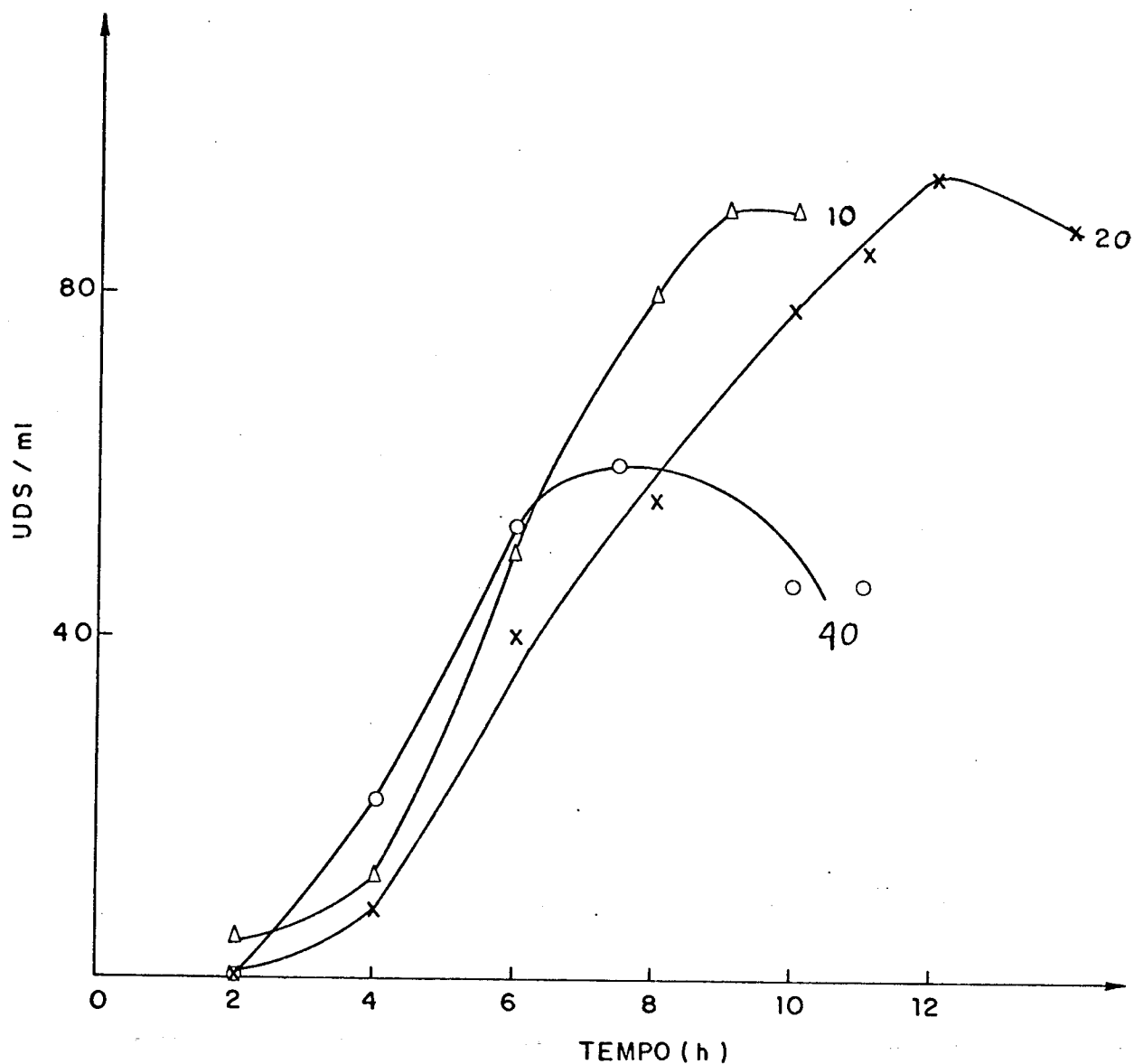


Figura 21: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição de sacarose em meio padrão com variação da concentração inicial de sacarose em 10, 20 e 40 g/l

A figura 22 representa os resultados obtidos neste experimento. Pode-se observar que a produção de dextrana-sacarase atingiu praticamente os mesmos níveis das fermentações em meio padrão com adição de sacarose, com valores em torno de 80 UDS/ml.

A figura 23 reúne comparativamente os resultados obtidos de produção enzimática em três experiências com adição de melaço: na primeira experiência o meio de cultura continha melaço 50g/l, AMM 10 g/l e fosfato de potássio 20 g/l (meio base). Em outra foi acrescentado extrato de levedura 10 g/l e na última foi adicionado uma solução de cloreto de cálcio antes do início da fermentação, devido sua propriedade de agir como estabilizante da enzima. Nos três casos a produção de dextrana-sacarase foi superior àquela em que a adição foi de sacarose pura, nas mesmas condições de cultivo (Figura 19).

A complementação do meio com extrato de levedura favoreceu a produção, aumentando em aproximadamente 20% a atividade enzimática no meio de cultura, após 10 horas de fermentação. O cálcio teve um efeito inibidor, mostrando que a quantidade existente no melaço é suficiente para a estabilização da enzima e que a adição suplementar excedeu a concentração ótima para estabilizar a dextrana-sacarase. A inibição por excesso foi relatada por alguns autores (57).

Segundo ALSOP (2), a interrupção da adição de açúcar e do controle de pH no final da fase de crescimento, favorece a produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Visando verificar este efeito, trabalhou-se em meio com melaço, realizando experiências, onde interrompeu-se a adição de melaço e o controle de pH após 6 horas de fermentação. A Figura 24 mostra os resultados obtidos, tendo a atividade enzimática chegado a 66 UDS/ml após 11 horas de fermentação,

enquanto que a quantidade de açúcares totais é bem baixa, aproximadamente 18 g/l. Como comparação temos a Figura 25, onde a alimentação foi contínua até o final da fermentação. É interessante notar, que neste caso, a atividade final foi de 52 UDS/ml, passando por um máximo de 59 UDS/ml, entretanto, no final de 11 horas ainda restou uma quantidade elevada de açúcar (60g/l). Assim sendo, no caso onde foi interrompida a adição (figura 24) observou-se um leve aumento na produção de enzima e ainda, um menor gasto de substrato.

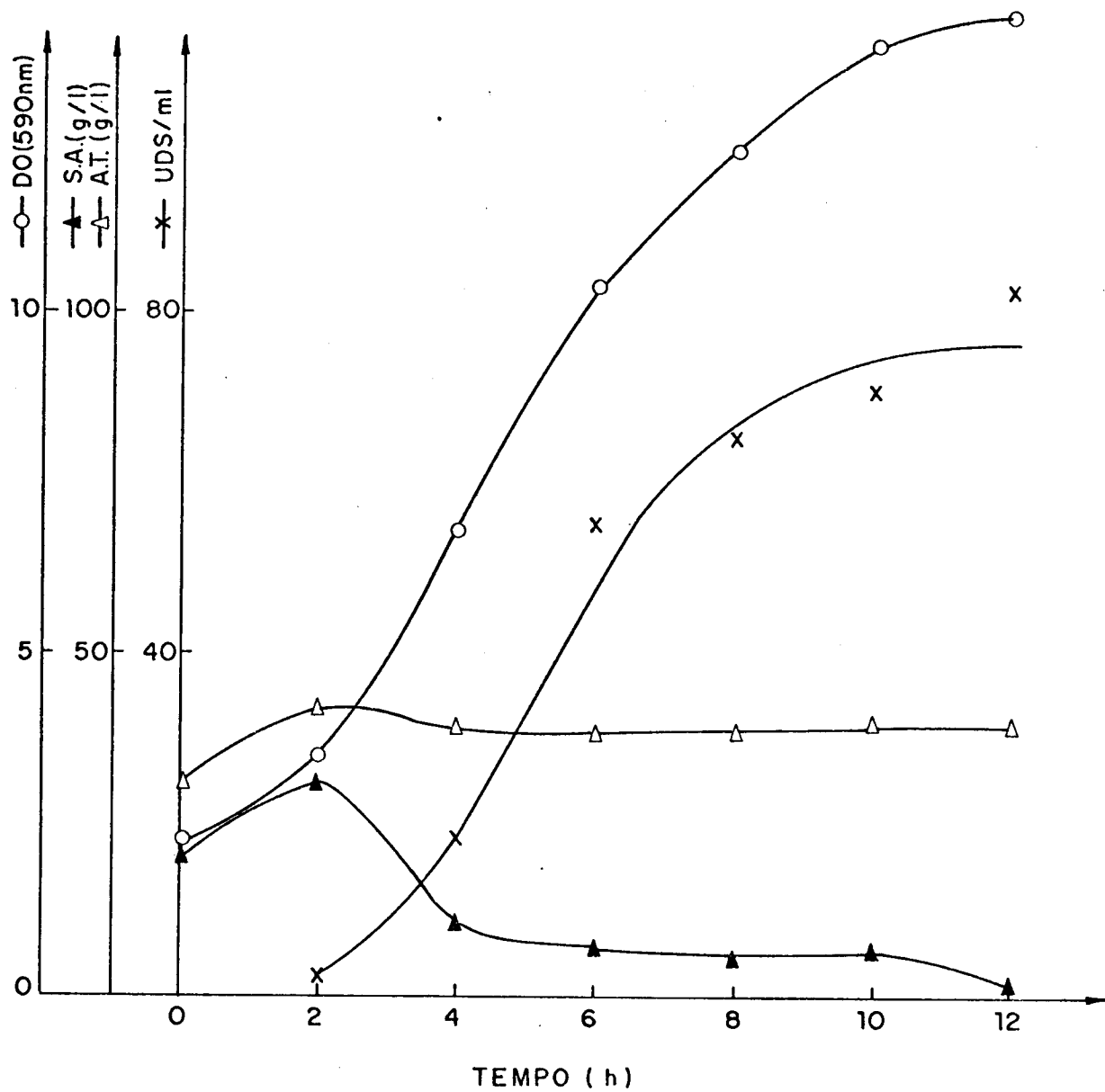


Figura 22: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (A.T.) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição de melaço. Meio base complementado com 10 g/l de extrato de levedura. pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C , aeração = 0,5 VVM.

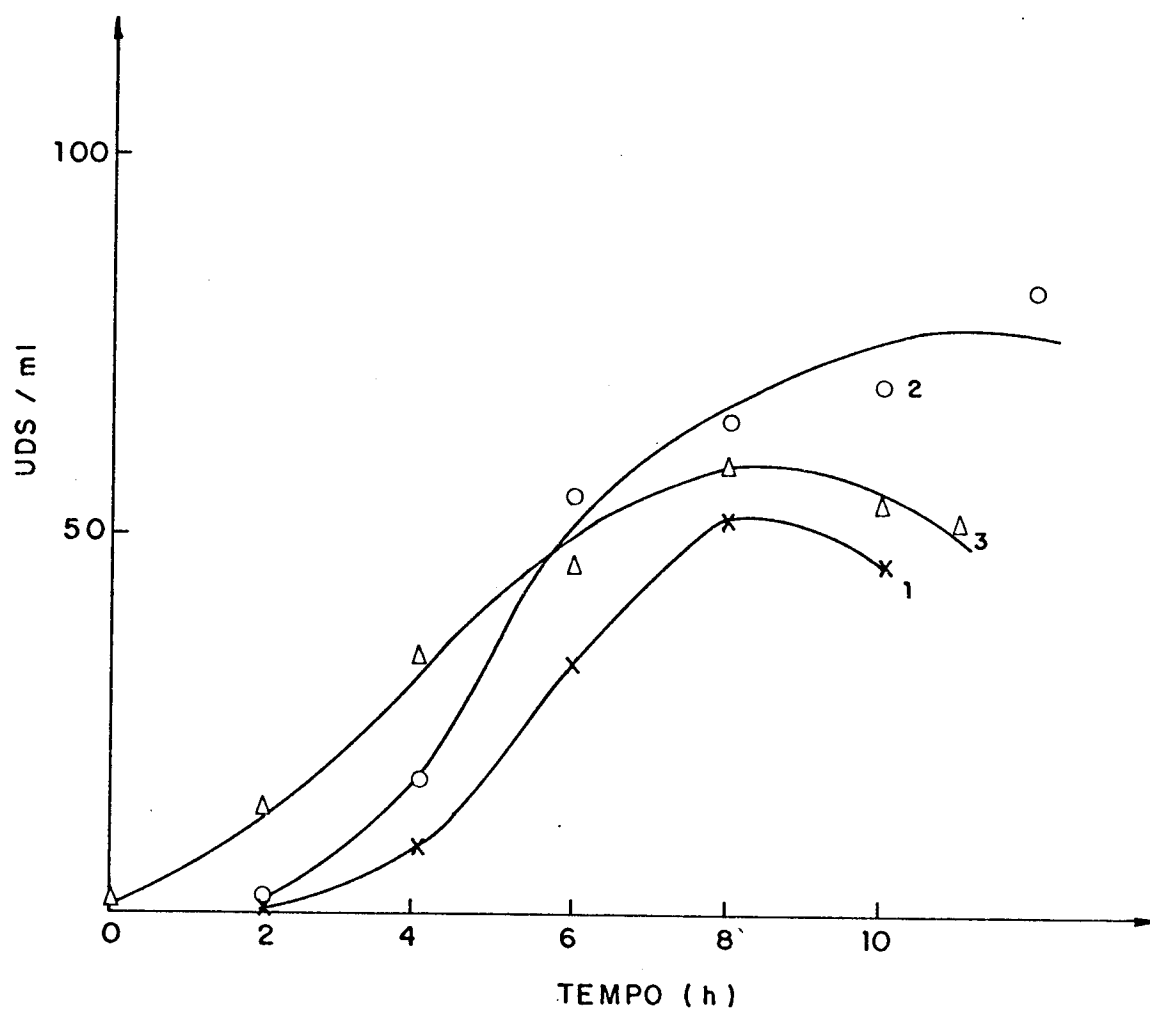


Figura 23: Evolução da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) para três fermentações com adição contínua de melaço. Meio base (melaço = 50 g/l, AMM = 10 g/l, fosfato de potássio = 20 g/l). 1 = meio base, 2 = meio base + 10 g/l de E.L., 3 = meio base + 0,5 g/l de cloreto de cálcio. pH = 6,7 ± 0,3. Temperatura = 27° C, aeração = 0,5 VVM.

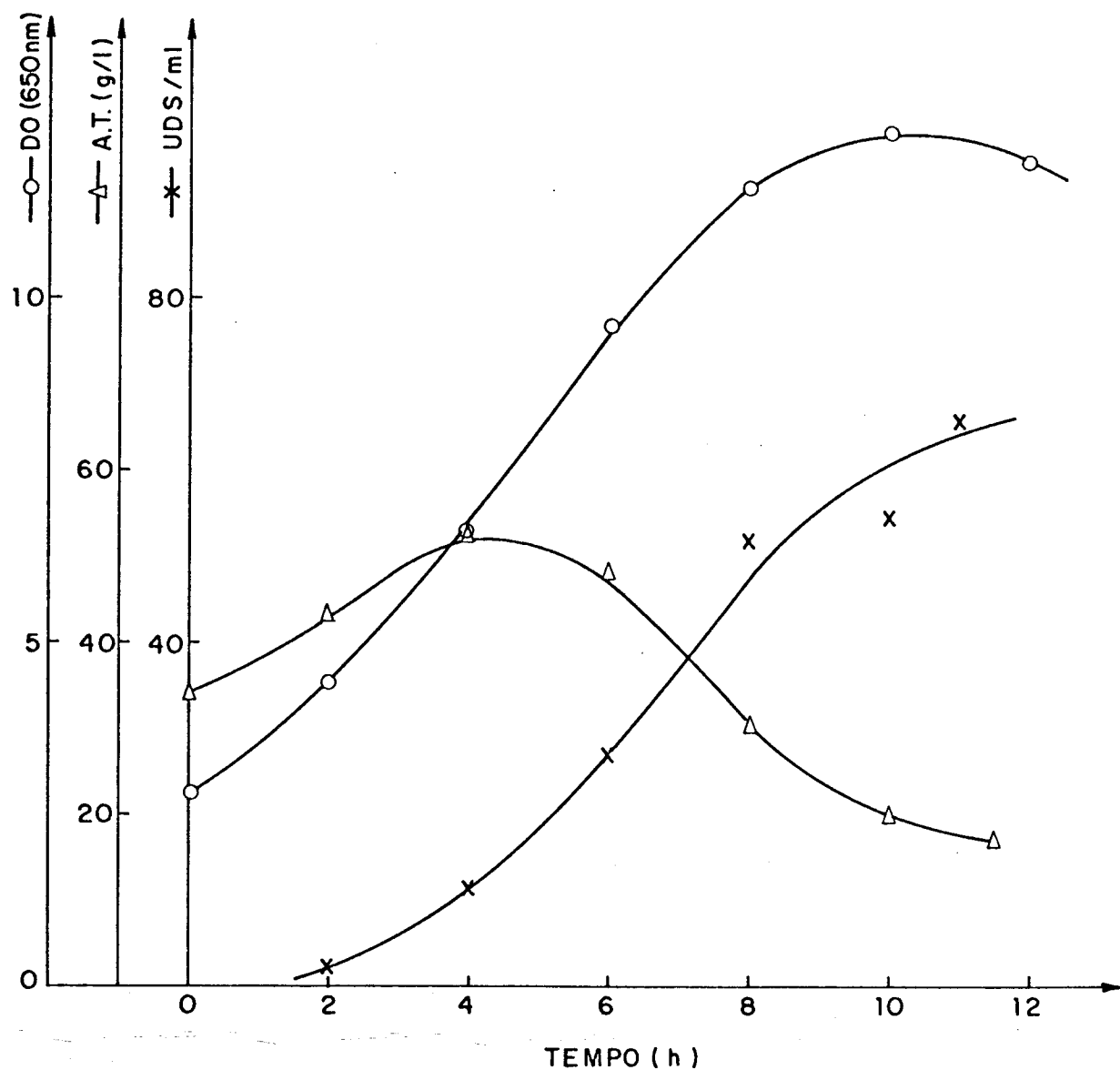


Figura 24: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (A.T.) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição de melaço com interrupção da adição após 6 horas. Meio base, $\text{pH} = 6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C , aeração = 0,5 VVM.

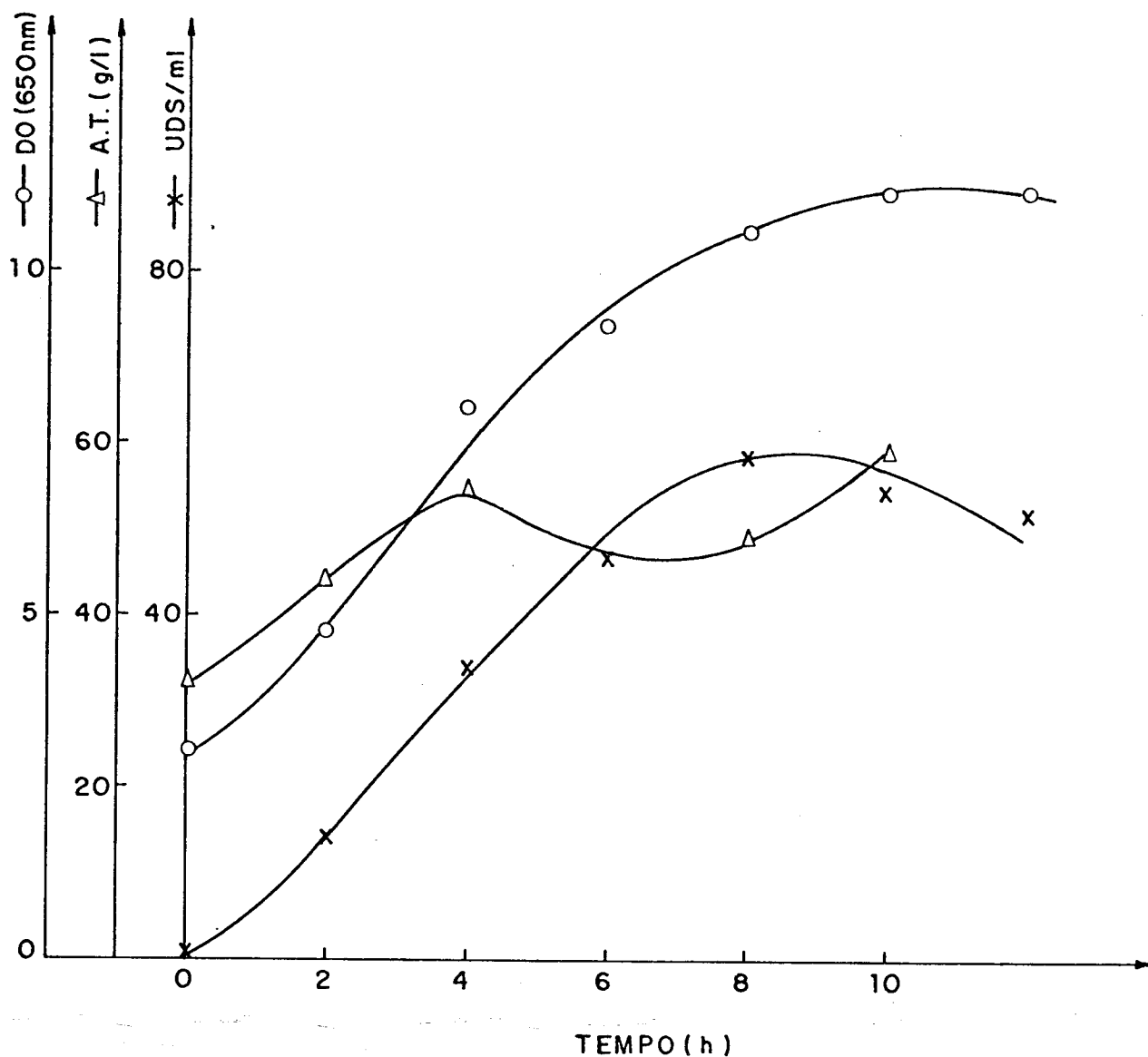


Figura 25: Evolução do crescimento celular (DO), concentração de açúcares totais (A.T.) e atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml) durante a fermentação com adição contínua de melaço. Meio base, pH = $6,7 \pm 0,3$. Temperatura = 27°C , aeração = 0,5 VVM.

4.3. DISCUSSÃO

Nos ensaios com adição contínua, os melhores resultados foram obtidos com meio padrão e adição de sacarose. Quando foi utilizado meio de melação, AMM e extrato de levedura, com adição contínua de melação, obteve-se resultados similares. Por outro lado, quando o meio inicialmente continha melação e AMM, com adição contínua de sacarose, a produção de enzima foi baixa. Ao complementar-se este meio com extrato de levedura, a produção aumentou consideravelmente. Passando-se a alimentar o fermentador com melação ao invés de sacarose, também foi observado um aumento na produção. Isto de certa forma mostrou que o meio base (melação 50 g/l, AMM 10 g/l, fosfato de potássio 20 g/l) continha quantidades insuficientes de algum fator de crescimento, que teve de ser complementado com a adição de melação, ou extrato de levedura, para atingir níveis compatíveis de produção.

Tanto o melação quanto o extrato de levedura são de composição complexa.

O extrato de levedura foi usado por vários autores (49,58, 68, 75) como fonte de vitaminas, aminoácidos e outros fatores nutricionais. Por outro lado, a literatura não trás nenhuma referência sobre a utilização de melação para produção de dextrana-sacarase. MURPHY (64) cita apenas uma referência da utilização de melação para a produção de dextrana pelo método convencional. Portanto, fica difícil avaliar comparativamente os resultados obtidos neste trabalho, usando o meio base.

TSUCHIYA e col. (94) relatam que para fermentações em frascos agitados, a AMM substitui adequadamente o extrato de levedura, o que coincide, de forma geral, com os resultados aqui obtidos. Entretanto,

a fermentação em frascos agitados não resultou numa boa produção, mesmo usando meios mais ricos, o que prejudica uma possível comparação.

Para a fermentação com adição de substrato, a AMM não se mostrou tão eficiente quanto o extrato de levedura.

Os pesquisadores que trabalharam com produção de dextrana-sacarase, em fermentações batelada com alimentação de substrato (2, 49, 61, 68) se utilizaram de meios de cultura similares ao meio padrão. Os resultados obtidos por estes pesquisadores foram superiores aos obtidos no presente trabalho. Isto pode ser devido a um controle menos eficiente do pH, uma vez que a enzima é muito sensível à variação deste. Também a utilização de materiais e reagentes, que entram na composição do meio, de procedências diferentes podem ter influenciado o processo. Um exemplo significativo é o extrato de levedura, que varia sua composição dependendo do fabricante, fato este comprovado em outros trabalhos deste laboratório. Por outro lado, um dos objetivos iniciais fora cumprido, mostrando que utilizando-se de melaço e AMM, é possível se produzir dextrana-sacarase com produtividades próximas dos meios enriquecidos, cujas formulações resulta em custos bastante elevados.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

1- A produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides* em frascos agitados, atingiu os maiores níveis para temperaturas entre 25 e 30° C.

2- Quando se utilizou melaço como fonte de carbono, os resultados indicaram que a concentração ótima para produção de dextrana-sacarase está entre 50 e 60 g/l, e ainda que o melaço nessas concentrações supre as necessidades dos R - sais.

3- O controle de pH durante a fermentação, em torno de 6,7, promove um aumento na produção de enzima.

4- As fermentações em batelada alimentada, promovem um aumento substancial na produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Nesse tipo de fermentação quando o meio base é melaço e AMM, a produção é favorecida pela adição de melaço durante a fermentação.

5- A interrupção da alimentação durante a fermentação permite aumentar a produtividade diminuindo as perdas de açúcares no final da fermentação.

6- Dentre os métodos testados a melhor maneira de se produzir dextrana-sacarase, com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F), é por fermentação em batelada alimentada com pH controlado. A velocidade de alimentação deve ser estimada em função da velocidade de consumo de substrato e regulada de forma a não permitir que a concentração de sacarose no meio de cultura atinja valores baixos (< 10g/L), durante a fermentação.

Quanto ao meio de cultura, o melaço substitui bem a sacarose pura e ainda supre as necessidades em sais; entretanto, a adição de extrato de levedura é benéfica e aumenta a produção de enzima.

RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Considerando todo o trabalho realizado, experimental, estudo bibliográfico e a discussão com outros pesquisadores à respeito da produção de dextrana, durante o curso de mestrado, achamos oportuno algumas sugestões para futuros trabalhos a serem realizados nesta instituição ou em outros centros de pesquisa do país:

1- Estudar a produção de dextrana-sacarase por fermentação contínua. Durante o trabalho experimental, observou-se que praticamente toda a enzima é produzida na fase de crescimento, decaindo rapidamente no final da fermentação. Além do fato da produção ser induzida, parece existir outra relação com o estado fisiológico do microrganismo. A fermentação contínua permite manter determinada concentração de indutor (sacarose) durante a fermentação e ainda manter o microrganismo permanentemente na fase de crescimento. Soma-se a estas vantagens da fermentação contínua a facilidade de automação.

2- Testar o uso de agentes estabilizantes durante a fermentação. A enzima é termolábil sendo desnaturada ao longo da fermentação.

A utilização de polímeros, detergentes neutros, segundo a literatura (56) é uma forma eficiente de se estabilizar a enzima. Isto facilitaria também as medidas de atividade, problema enfrentado em nosso trabalho, onde a atividade era medida numa temperatura superior à de fermentação.

3- Estudar, em conjunto com outros departamentos ou faculdades competentes, a seleção e melhoramento genético do microorganismo por métodos convencionais ou quaisquer outros métodos disponíveis, visando a obtenção de cepas mais produtivas e/ou cepas onde a dextran-sacarase seja constitutiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ALMEIDA, R. J. - "Composição do mel final" in II Semana de Fermentação Alcoólica. Ed. Instituto Zimotécnico - USP - Piracicaba - S.P. - 1, 30 - 68, 1966.
- 02 - ALSOP, L. - "Industrial production of dextran". Progress. in Indust. microbiol., 18, 1 - 44, 1983.
- 03 - ASPINALL, G.O. - "Classification of polysaccharides". in The polysaccharides, 2, 1 - 9, Academic Press, N.Y., 1983.
- 04 - BACIC, A., COVACEVICH, M. T. e RICHARDS, G. N. - "Deterioration in burnt standing cane: A preliminary Survey". Proc. Queensland. Soc. sugar cane technol., 44, 11 - 18, 1977.
- 05 - BAILEY, R. W., BARKER, S. A., BOURNE, E. J., STACEY, M. - "Immunopolysaccharides, VI. The isolation and properties of the dextransucrase of *Betacoccus arabinosaceus* (*Leuconostoc mesenteroides*)". J. Chem. Soc., 3, 3530 - 3536, 1957.
- 06 - BARKER, S. A., BOURNE, E. J., BRUCE, G. T. e STACEY, M. - "Immunopolysaccharides, XI. Structure of an *Acetobacter capsulatum* dextran". J. Chem. Soc., 4, 4414 - 4416, 1958.
- 07 - BARKER, S. A., BOURNE, E. J., NEELY, W. B. e STACEY, M. - "Immunopolysaccharides V. Structure of a modified *Betacoccus arabino-*

saceous dextran". J. Chem. Soc., 3, 2096 - 2099, 1955.

- 08 - BINDER, T. P. e ROBYT, J. F. - "p - nitrophenyl alfa - D - gluco pyranoside a new substrate for glucansucrases". Carbohydr. Res., 124, 287 - 299, 1983.
- 09 - BRASWELL, E., GOODMAN, A. e STERN, K. G. - "Studies on the enzymatic synthesis of dextrans: part II". J. Polym. Sci., 51, 467 - 473, 1959.
- 10 - BROOKER, B. E. - "Electron microscopy of the dextran produced by **Lactic acid bacteria**". Microbial polysaccharides and polysaccharases., Academic Press. N.Y., Cap. 5, 1979.
- 11 - CHANG, H. N., GHIM, Y. S. e CHO, Y. R. LANDIS, D. A., REILLY, P. J. - "Immobilization of **Leuconostoc mesenteroides** dextransucrase to porous phenoxyacetyl cellulose scads". Biotec. Bioeng., 23, 2647 - 2653, 1981.
- 12 - CHEN, Y. E. e KABOLI, H. - "Purification and properties of dextransucrase. in Scale up Study on several enzymatic processes for industrial application". ERI project. 1045., Eng. Res. Inst., Iowa State University, Ames, Iowa, Final Report, 136 - 162, 1976.
- 13 - COLL, E. E., CLARKE, M. A. e ROBERTS, E. J. - "Dextran problems in sugar production". Southern regional Research Center. New Orleans, Louisiana, USA., Techn. Report. 46, 1979.

- 14 - COLL, E. E., ROBERTS, E. J. e CLARKE, M. A. - "Deterioration of sugarcane: levels of dextran and total polysaccharides in process streams at two Louisiana sugar factories". Sugar J., 41, 21 - 25, 1978.
- 15 - COTÉ, G. L. e ROBYT, J. F. - "Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 135S that synthesizes an alternantivly (1,6), (1,3) D - glucan". Carbohyd. Res., 101, 57 - 74, 1982
- 16 - COTÉ, G. L. e ROBYT, J. F. - "Acceptor reaction of alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 135S". Carbohyd. Res., 111, 127 - 142, 1982.
- 17 - EBERT, K. H. e SCHENK, G. - "Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran and Levan". Adv. in Enzimol., 30, 179 - 221, 1968.
- 18 - EGAN, B. T. - "Chemical control of sour storage rot". Proc. Queensland Soc. sugar cane technol., 32, 25 - 30, 1965.
- 19 - FOSTER, D. H., IVIN, P. C. e KING, J. H. - "Measurements of the deterioration of green and burnt mechanically harvested cane". Proc. Queensland Soc. sugar cane technol., 44, 37 - 41, 1977.
- 20 - GARVIE, E. I. - "The genus *Leuconostoc* and its nomenclature". J. Dairy Res., 27, 283 - 292, 1960.

- 21 - GARVIE, E. I. - "The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp nov.) and *Leuconostoc oenos*". J. Gen. Microbiol., 48, 439 - 447, 1967.
- 22 - GOODMAN, A., WEIL, R. M. e STERN, K. G. - "On the mechanism of dextran formation". J. Biol. Chem., 217, 977 - 985, 1955.
- 23 - GREULICH, K. O. e LUDWIG, H. - "High pressure enzyme kinetics of dextransucrase". Biophys. Chem., 6, 87 - 94, 1977.
- 24 - HEATHCOTE, J. G. e PACE, J. - "Inhibition of the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by the toxic factor from Agerized Zein: Reversal by alfa - glutamine". Nature, 166, 355 - 354, 1950.
- 25 - HEHRE, E. J. - "Studies on the enzymatic Synthesis of dextran from sucrose". J. Biol. Chem., 163, 221 - 233, 1946.
- 26 - HEHRE, E. J. - "Polysaccharide Synthesis from disaccharides I dextransucrase". In "Methods in Enzymology", Colowick S. P. e Kaplan N. O., Academic Press., New York, I, 178 - 184, 1955.
- 27 - HEHRE, E. J. - "The direction of propagation in carbohydrase-catalyzed polymerizations". J. Polym. Sci., 23, 239 - 244, 1968.
- 28 - HELLMAN, N. N., TSUCHIYA, H. M., ROGOVIN, S. P. LAMBERTS, B. L., TOBIN, R., GLASS, C. A., STRINGER, C. S., JACKSON, R. W. e SENTI,

- F. R., - "Controlled Enzymatic Synthesis of dextran". Ind. Eng. Chem., 47, 1593 - 1598, 1955.
- 29 - HENDERSON, C. S. - "Cane deterioration and its effects in the racecourse area 1971 season". Proc. Queensland Soc. Sugar Cane Technol., 39, 267 - 273, 1972.
- 30 - HEPNER, L. e MALE, C. in "Handbuch der biotechnologie" (P. PRAVE, U.FAUST, W.SITTIG and D. A. SUKATSCH, eds.), Akademische verlagsgesellschaft, Wiesbaden, 1982.
- 31 - ITAYA, K. e YAMAMOTO, T. - "Dextranucrase as an enzyme associating with alkaline earth metal ions". Agr. Biol. Chem., 34, 1187 - 1192, 1975.
- 32 - ITO, S., KOBAYASHI, T., OHTA, Y. e AKIYAMA, Y. - "Inhibition of glucose catabolism by aeration in *L. mesenteroides*". J. Ferment. Technol., 61, 353 -358, 1983.
- 33 - IVIN, P. C. - "The effect of billet size on the rate of cane deterioration". Proc. Queensland Soc. Sugar Cane Technol., 39, 279 - 280, 1972.
- 34 - JEANES, A. R., WILHAM, C. A. e MIERS, J. C. - "Preparation and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides*". J. Biol. Chem., 176, 603 - 615, 1948.

- 35 - JEANES, A. R., HAYNES, W. C., WILHAM, C. A., RANKIN, J. C., MALVIN, E. H., AUSTIN, M. J., CLUSKEY, J. E., FISHER, B. E., TSUCHIYA, H.M. e RIST. C. E. - "Characterization and classification of dextrans from 96 strains of bacteria". J. Am. Chem. Soc., 76, 501 - 5052. 1954.
- 36 - JEANES, A. R. - "Characterization of dextran from four types of *Leuconoctoc mesenteroides*". J. Bacteriol., 71, 167 - 173, 1956.
- 37 - JEANES, A. R. - "Dextrans" in "Methods in carbohydrate chemistry, ed. Whistler R. L., Academic Press, N.Y., 5, 118 - 132, 1965.
- 38 - JEANES A. R. - "Preparation of dextran from growing *Leuconostoc cultures*". Methods in carbohyd. Chem., 5, 118 - 127, 1965
- 39 - JEANES A. R. - "Extracellular Microbial polysaccharides new hydrocolloides of interest to the food industry". Food Technol., 28(5), 34 - 40, may, 1974.
- 40 - JOHNSON, M. K. e McCLESKY, C. S. - "Studies on the aerobic carbohydrate metabolism of *Leuconoctoc mesenteroides*". J. Bacteriol., Jan., 22 - 25, 1957.
- 41 - KABOLI, H. e REILLY, P. I. - "Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase". Biotechnol. Bioeng., 22 (5), 1055 - 1069, 1980.

- 42 - KOBAYASHI, M. e MATSUDA, K. - "Purification and properties of the extracellular dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 1299". J. Biochem. 79, 1301 - 1308, 1976.
- 43 - KOBAYASHI, M. e MATSUDA, K. - "Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512F"., Biochim. Biophys. Acta, 614 (1), 46 - 62, 1980.
- 44 - KOBAYASHI, M., YOKOYAMA, I. e MATSUDA, K. - "Effectors diferently modulating the dextransucrase activity of *Leuconostoc mesenteroides*". Agri. Biol. Chem., 49 (11), 3189 - 3195, 1985.
- 45 - KOEPESEL, H. J., TSUCHIYA, H. M., HELLMAN, N. N., KAZENKO, A., HOFFMAN, C. A., SHARPE, E. S. e JACKSON, R. W. - "Enzymatic Synthesis of dextran. Acceptor Specificity and chain initiation". J. Biol. Chem., 200, 793 - 801, 1952.
- 46 - KOEPESEL, H. J. e TSUCHIYA, H. M. - "Enzymatic synthesis of dextran". J. Bacteriol., 63, 293 - 295, 1952.
- 47 - LARM, D., LINDBERG, B. e SUENSSON, S. - "Studies on the length of the side chains of the dextran elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512". Carbohydr. Res., 20, 39 - 48, 1971.
- 48 - LAWFORD, G. R., KLINGERMAN, A. e WILLIAMS, T. - "Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of *Leu-*

- conostoc mesenteroides*". Biotech. and Bioeng., 21, 1121 - 1131, 1979.
- 49 - LOPES, A. - "Production, purification et immobilization de la dextran-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides*". Tese de Docteur Ingenieur n° 26, INSA - Toulouse, França, 1979.
- 50 - LUZIO, G. A., PARNAIK, U. A. e MAYER, R. M. - "A D - glucosylated form of dextransucrase: demonstration of partial reaction". Carbohyd. Res., 121, 269 - 278, 1983.
- 51 - LUZIO, G. A. e MAYER, R. M. - "The hidrolysis of sucrose by dextransucrase". Carbohyd. Res., 111, 311 - 318, 1983.
- 52 - MARIBONA, J. L. e BELLO, O. M. - "La dextrana". Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba - Boletim Oficial, 21, 65 - 73, 1966.
- 53 - MARTENS, I. S. H. - "Produção, purificação, caracterização e viabilidade da aplicação da dextranase de *penicillium Sp*". Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos ,UNICAMP, 1986.
- 54 - MAYEUX, J. N. e COLMER, A. R. - "Selective medium for *Leuconostoc* detections". J. Bacteriol., 81(6), 1009 - 1011, 1961.
- 55 - Mc NEIL, K. E. e INKERMAN, P. A. - " Preliminary studies on the deterioration of long-standing burnt cane". Proc. Queensland. Soc. Sugar Cane Technol., 44, 19 - 27, 1977.

- 56 - MILLER, A. W. e ROBYT, J. F. - "Stabilization of dextran-sucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512F by nonionic detergents, polyethylene glycol an high molecular weight dextran". Biochem. Biophys. Acta, 785, N^o 3, 89 - 96, 1984.
- 57 - MILLER, A. W. e ROBYT, J. F. - "Activation and inibition of dextransucrase by calcium". Biochem. Biophys. Acta, 880, N^o 1, 32 - 39, 1986.
- 58 - MILLER, A. W. EKLUND, S. H. e ROBYT, J. F. - "Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512F". Carbohydr. Res., 147, 119 - 133, 1986.
- 59 - MILLER, G. L. - "Use of dinotrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". Anal. Chem., 31 (3), 426 - 428, 1959.
- 60 - MISAKI, A., TORII, M., SAWAI, T. e GOLDSTEIN, I. J. - "Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B - 1355". Carbohydr. Res., 84, 273 - 285, 1980.
- 61 - MONSAN, P. e LOPES, A. - "On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase". Biotech. and Bioeng., 23, 2027 - 2037, 1981.
- 62 - MONSAN, P. e LOPES, A. - "Dextran production by free and immobi-

- lized dextransucrase". Adv. Biotechnol., 1, 679 - 684, 1981.
- 63 - MONTVILLE, T. J., COONEY, C. L. e SINSKEY, A. J. - "Streptococcus mutans dextransucrase: A review". Adv. Appl. microbiol., 24, 55 - 82, 1978.
- 64 - MURPHY, P. T. e WHISTLER, R. L, - "Dextrans" in WHISTLER, R. L. e BEMILLER, J. N. (eds), Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives, 2nd ed., 513 - 542, Academic Press, N.Y., 1973.
- 65 - NEELY, W. B. - "Dextran: sstructure and synthesis". Adv. Carbohyd. Chem., 15, 341 - 369, 1960..
- 66 - NEELY, W. B. e NOTT, J. - "Dextransucrase, an induced enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*". Biochem., 1, 1136 - 1140, 1962.
- 67 - OGYNO, S. - "Formation of the fructose-rich polymer by water-insoluble dextransucrase and presence of a glycogen volve-lowering factor". Agri. Biol. Chem., 34, 1268 - 1271, 1970.
- 68 - PAUL, F., AURIOL, D., ORIOL, E. e MONSAN, P. - "Production and purification of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512F". Enzyme Eng., 7, 267 - 270, 1984.

- 69 - PAUL, F., ORIOL, D., WILLEMOT, R. M. e MONSAN, P. - "Effect of maltose in the reaction of highly purified *Leuconostoc mesenteroides* B - 512F dextranase: kinetic studies and product characterization". Third European Congress on Biotechnology, 383 - 388, 1984.
- 70 - POWELL, D. A. - "Structure, solutions, properties and biological interactions of some microbial extracellular polysaccharides". in microbial polysaccharides and polysaccharases. Cap. 6, Cooday-Ellwood, Academic Press. N. Y.rk, 1979.
- 71 - ROBYT, J. F., KIMBLE, B. K. e WALSETH, T. F. - "The mechanism of dextranase action: direction of dextran biosynthesis". Arch. Biochem. Biophys., 165, 634 - 640, 1974.
- 72 - ROBYT, J. F. e TANIGUCHI, H. - "The mechanism of dextranase action: biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran". Arch. Biochem. Biophys., 174, 129 - 135, 1976.
- 73 - ROBYT, J. F. e CORRIGAN, A. J. - "The mechanism of dextranase action: activation of dextranase from *Streptococcus mutans* OMZ 176 by dextrans and the non existence of the primer requirement for the synthesis of dextran". Arch. Biochem. Biophys., 183, 726 - 731, 1977.
- 74 - ROBYT, J. F. e WALSETH, T. F. - "The mechanism of acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B - 512F dextranase". Car-

bohydr. Res., 61, 443 - 445, 1978.

- 75 - ROBYT, J. F. e WALSETH, T. F. - "Production, purification and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*". Carbohydr. Res., 68, 95 - 111, 1979.
- 76 - ROBYT, J. F. - "Mechanism of action of dextransucrase". Proc. Symp. Mechanisms of saccharide polymerisation and depolymerisation - Miami Beach, 1978. Publ. Academic Press. 43 - 45, 1980.
- 77 - ROBYT, J. F. e EKLUND, S. H. - "Stereochemistry involved in the mechanism of action of dextransucrase in synthesis of dextran and the formation of acceptor products". Bioorg. Chem. 11, 115 - 132, 1982.
- 78 - ROBYT, J. F. e EKLUND, S. H. - "Relative, effect quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512F dextransucrase". Carbohydr. Res. 121, 279 - 286, 1983.
- 79 - ROREM, E. S., - "Uptake of rubidium and phosphate ions by polysaccharides producing bacteria". J. Bacteriol., 40, 1955.
- 80 - SABATIE, J., CHOPLIN, L., MONSAN, P. e PAUL, F. - "The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran". Biotech. Letters, 8, 425 - 430, 1986.

- 81 - SANDFORD, P. A. - "Exocellular microbial polysaccharides" Adv in Carbohydr. Chem. and Biochem., 36, 265 - 313, 1979.
- 82 - SANDFORD, P. A. - "A survey of possible new polysaccharides" in Polysaccharides in Food (J. M. V. BLANSHARD and J. R. MITCHELL eds). Butterworth, London, 251 - 282, 1979.
- 83 - SANDFORD, P. A. e BAIRD, J. "Industrial utilization of polysaccharides". The Polysaccharides, vol 2, Academic Press. N.Y., 412 - 490, 1983.
- 84 - SEYMOUR, F. R., KNAPP, R. D., CHEN, E. C. M., BISHOP, S. H. e JEANES, A. - "Structural analysis of *Leuconostoc* dextran, containing 3 - O - - D - glucosylated - D - glucosyl residues in both linear chain and branch-point positions, or by C-N-M-R. Spectroscopy". Carbohydr. Res., 74, 41 - 62, 1979.
- 85 - SEYMOUR, F. R., JULIAN, R. L., JEANES, A. e LAMBERTS, B. L. - "Structural analysis of insoluble D - glucans by Fourier Transform infrared difference-spectrometry: correlation between structures of dextrans from strains of *Leuconostoc mesenteroides* and of D - glucans from strains of *Streptococcus mutans*". Carbohydr. Res. 86, 227 - 246, 1980.
- 86 - SIDEBOTHAM, R. L. - "Dextrans". Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 30, 371 - 444, 1974.

- 87 - SUMMER, J. B. e HOWEEL, S. F. - "A method for determination of invertase activity". J. Biol. Chem., 108, 51 - 54, 1935.
- 88 - SUTHERLAND, D. N. - "Destran and crystal elonyation". The International Sugar Journal, 70, 9840) 353 - 358, 1968.
- 89 - SUTHERLAND, L. W. - "Microbial exopolysaccharide synthesis" in Extracellular microbial polysaccharides, SANDFORD-LASKIN, ACS Symp. ser. 45. Am. Chem. Soc. Washington, D. C. 1977.
- 90 - SUZUKI, D. e ROBAYASHI, T. - "Purification of Dextranucrase and Branching factor in dextran synthesis". Agr. Biol. Chem., 39 (2), 557 - 558, 1975.
- 91 - TAYLOR, C., CHEETHAM, N. W. M., e WALKER, G. J. - "Application of high - performance liquid chromatografy to a study of branching in dextrans". Carbohyd. Res., 137, 1 - 12, 1985.
- 92 - TILBURY, R. N. - "Dextrans and dextranase". Manufacturing - Processing, ISSCT, 14, 1444 - 1458, 1971.
- 93 - TOMCZAC, E. - "Effect of nutrient composition on the rate of dextranucrase formation in the cultivation of *Leuconostoc mesenteroides* 2C.m.1.". Pr. Nauk. Akad. Ekon. in Oskara Langego Wroclawiv. 167 63 - 75 (pol), 1980. (Chemical Abstracts, vol. 95 pag 529, 1981).

- 94 - TSUCHIYA, H. M., KOEPESELL, H. J., CORMAN, J., BRYANT, G., BOGARD, M. O., FEGER, V. H. e JACKSON, R. W. - "The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*". J. Bacteriol., 64, 521 - 527, 1952.
- 95 - TSUCHIYA, H. M., HELLMAN, N. N., KOEPESELL, H. J., CORMAN, J., STRINGER, C. S., ROGOVIN, S. P., BOGARD, M. O., BRYANT, G., FEGER, V. H., HOFFMAN, C. A., SENTI, F. R. e JACKSON, R. W. - "Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran". J. Amer. Chem. Soc., 77, 2412 - 2419, 1955.
- 96 - TSUCHIYA, H. M., - "Dextransucrase". Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 1777 -1787, 1960.
- 97 - TSUMURAYA, Y., NAKAMURA, N. e KOBAYASHI, T. - "Dextransucrase and the role of metallic ions in the formation of branch links in dextran synthesis". Agr. Biol. Chem., 40 (8), 1471 -1477, 1976.
- 98 - WELLS, J. - "Extracellular microbial polysaccharides - A critical overview". in Extracellular microbial polysaccharides, 299 - 313, Ed by P. SANDFORD and A. LASKIN. ACS. Symp. Series, 45 Ame. Chem. Soc. Washington DC, 1977
- 99 - WHITESIDE-CARLSON, V. e WHITESIDE-CARLSON, W. - "The vitamin requirements of *Leuconostoc* for dextran synthesis". J. Bacteriol., 58, 135 - 141, 1949.

- 100- WHITESIDE-CARLSON, V. e WHITESIDE-CARLSON, W. - "Studies of the effect of para-amino benzoic acid, folic acid and sulfanilamide on dextran synthesis by *Leuconostoc*". J. Bacteriol., 58, 143 - 149, 1949.
- 101- WHITESIDE-CARLSON, V. STARNES, W. R., ROSANO, C. L. e WHITESIDE-CARLSON, W. - "Non-specificity of biotin activity for *Leuconostoc*". Proceed. Sty Exp. Biol. Med., 77, 344 - 348, 1952.
- 102- YAMAUCHI, F. e OHWADA, Y. - "Synthesis of oligosaccharides by growing culture of *Leuconostoc mesenteroides*". Part IV Oligosaccharides formation in the presence of various types of glucobioses as acceptors. Agr. Biol. Chem., 39 (9), 1295 - 1300, 1969.
- 103- YONOHAMA, I., KOBAYASHI, M. e MATSUDA, K. - "Comparison of the multiplicity of dextransucrases from six strains of *Leuconostoc mesenteroides*". Agr. Biol. Chem., 49 (2), 501 - 507, 1985.