



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DESENVOLVIMENTO DE**  
**PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**PRODUÇÃO DE DEXTRANA POR NOVAS LINHAGENS DE BACTÉRIAS**  
**ISOLADAS DA CANA-DE-AÇÚCAR**

**Denise Silva de Aquino**

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Silvio Roberto Andrietta

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo

04/2006

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA I/UNICAMP  
Aq56p  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 71583  
PROC. 16.145-07  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO 11,00  
DATA 07/03/07  
BIB-ID 402182

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Aq53p  
Aq 56p  
Aquino, Denise Silva de  
Produção de dextrana por novas linhagens de bactérias  
isoladas da cana-de-açúcar. / Denise Silva de Aquino.--  
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Silvio Roberto Andrietta  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Dextrana. 2. Polímeros. 3. Enzimas extracelulares. 4.  
Enzimas microbianas. 5. Cana-de-açúcar – Derivados. I.  
Andrietta, Silvio Roberto. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: The dextran production by three new bacteria strains isolated from  
sugar cane

Palavras-chave em Inglês: Dextran, Dextranase, Optimization, Characterization

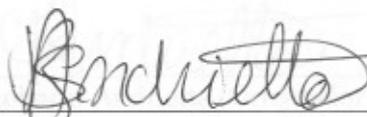
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho, Telma Teixeira Franco

Data da defesa: 28/04/2006

Dissertação de Mestrado defendida por Denise Silva de Aquino e aprovada em 28 de abril de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta (Orientador)



---

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (Titular)



---

Prof. Dra. Telma Teixeira Franco (Titular)

---

Prof. Dra Maria da Graça Stupiello Andrietta (Suplente)

---

Prof. Dr Daniel Ibraim Pires Atala (Suplente)

FORTE

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia  
Química.



---

Silvio Roberto Andrietta (Orientador)

Às meus pais, José e Rita, por serem  
meus maiores exemplos de vida e  
trabalho. Aos meus irmãos, Daniel e  
Caroline, por sua compreensão e amor  
durante todos os momentos da  
minha vida.

À meu namorado, Sérgio, por  
sua compreensão, dedicação e amor durante  
este período, preenchendo os meus dias.

## **Dedicatória**

Aos meus pais, Jair e Elza, aos meus irmãos Danielly e Luiz Fernando e à minha sobrinha Ana Caroline, por todo apoio, compreensão e amor em todos os momentos de minha vida.

Ao meu namorado, Sandro, cujo companheirismo, dedicação e amor, durante este período, preencheram os meus dias.

## **Agradecimentos**

A Deus.

Ao Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta pela orientação, amizade, incentivo e compreensão, durante todo o trabalho.

À Dra Maria da Graça Stupiello Andrietta pelo apoio na área de microbiologia.

À Milene e ao Klauss por toda ajuda, que não foi pouca.

Aos amigos do laboratório da Divisão de Processos Biotecnológicos do CPQBA, Silvio, Graça, Cláudia, Milene, Klauss, Érika, Gisele e Gabriel pelo apoio e principalmente pelos momentos vividos.

Às amigas Ivana, Rílvia e Érika Koroishi que me deram abrigo, orientação e companhia nos primeiros meses em Campinas.

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química e ao Departamento de Processos Biotecnológicos por ter oferecido a oportunidade de dar continuidade à minha formação.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP por proporcionar todas as condições necessárias para o desenvolvimento da minha pesquisa.

E a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente para realização deste trabalho, não somente no aspecto profissional, mas também pessoal através da amizade e companheirismo.

*"Nunca ande apenas pelos caminhos traçados, pois eles conduzem somente até  
aonde os outros já foram."*

*Graham Bel*

## Resumo

Dextranas são polissacarídeos produzidos pela bactéria pertencente à família *Lactobacillae* constituídos de moléculas de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -(1-6) na cadeia principal e ligações  $\alpha$ -(1-4),  $\alpha$ -(1-3) e  $\alpha$ -(1-2) nas ramificações. A enzima dextranase, responsável por sua síntese, é extracelular e tem a sacarose como principal indutor. Este biopolímero possui aplicações nas indústrias farmacêutica, química e de alimentos. Na indústria farmacêutica é que a dextrana tem a sua maior aplicação. A dextrana de baixa massa molecular, dextrana clínica, é utilizada como expansor volumétrico sanguíneo e como facilitador da fluidez do sangue. Este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de produção de dextrana por três novas linhagens de bactérias denominadas 4-03, 4-30 e 4-26 isoladas da cana-de-açúcar, dentro deste objetivo principal estão incluídos a caracterização da estrutura de cadeia destes biopolímeros e a identificação das linhagens das bactérias isoladas. Para a otimização, tanto da produção de dextrana como da produção de dextranase, realizaram-se ensaios em frascos agitados, analisando a influência das seguintes variáveis: concentração de tampão (controle do pH), concentração de substrato (sacarose) e concentração da fonte de nitrogênio (extrato de levedura). Conduziram-se os ensaios de otimização com base em planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta. As linhagens 4-26 e 4-30 apresentaram modelos estatisticamente significativos, portanto, podem ser utilizados na previsão da composição do meio de fermentação para produção da dextranase. Para a otimização da produção de dextrana, somente a linhagem 4-26 mostrou variação significativa estatisticamente das variáveis respostas frente às variáveis estudadas na região avaliada. Realizaram-se ensaios para a obtenção da dextrana a qual teve sua estrutura de cadeia determinada utilizando o método da peroxidação e o método da degradação de Smith. A primeira metodologia consiste em determinar os tipos e as proporções das ligações  $\alpha$ -(1-6),  $\alpha$ -(1-4) e  $\alpha$ -(1-2), e  $\alpha$ -(1-3) por meio do consumo do oxidante e produção de ácido quando as dextranas são sujeitas a uma oxidação com periodato. A segunda metodologia citada, consiste na oxidação do polissacarídeo seguida de redução ao poliálcool correspondente e por fim realiza-se hidrólise ácida gerando fragmentos de D-gliceraldeído, característico de ligações  $\alpha$ -(1,2), D-glicose, característico de ligações  $\alpha$ -(1,3), eritritol, característico de ligações  $\alpha$ -(1,4), glicerol e glicolaldeído, característicos de ligações  $\alpha$ -(1,6) e terminal não-redutor. Quando compara-se os dois métodos de

determinação da estrutura de cadeia da dextrana, a solubilidade em água da dextrana formada pela linhagem 4-03 é confirmada, pois a sua cadeia em ambas as análises apresentou uma maior porcentagem das ligações  $\alpha$ -(1,6), característica contrária a goma produzida pela linhagem 4-30, que apresenta-se de forma insolúvel por ter uma cadeia ramificada. O resultado para o biopolímero formado pela linhagem 4-26, apresentou-se os mesmos valores para as duas metodologias, porém no método da degradação de Smith sua estrutura não aproximou-se da dextrana padrão.

**Palavras-chaves:** dextrana, dextrana-sacarase, otimização, caracterização.

## Abstract

Dextran is a polysaccharide produced by bacteria of the Lactobacillaceae family and it consists of D-glucose monomeric units linked at the position  $\alpha$ -(1,6) in the linear chain and  $\alpha$ -(1-4),  $\alpha$ -(1-3) and  $\alpha$ -(1-2) positions at the branching points. The enzyme dextransucrase, responsible for dextran synthesis, is extracellular and has sucrose as its main inductor. This biopolymer is used by the pharmaceutical, chemistry and the food industry. Dextran has its main application in the pharmaceutical industry. The low molecular weight dextran, the clinical dextran, is used as blood volume expander and blood flow improver. This work had as objective to optimize the dextran production by three new bacteria strains named 4-03, 4-26 and 4-30 isolated from sugar cane, into this main objective are including the characterization the structure of the chain of these bacteria biopolymers and to identification bacteria strains isolated. The influence of the following variable was analyzed for the dextransucrase and dextran production optimization: buffer (pH control), substrate (sucrose) and nitrogen source (yeast extract) concentrations. The experimental assays were performed on the basis of factorial design and response surface techniques. The strains 4-26 and 4-30 presented statically significant models, therefore, these models may be used for predict the optimum composition of the fermentation medium for dextransucrase production. Only strain 4-26 showed statically significant variation of the dependent variables in the evaluated region dextran production optimization. The dextran structure of the three strains was determined by the periodate oxidation and Smith degradation methods. The first methodology consist in to determine the kinds and proportions of the  $\alpha$ -(1,6),  $\alpha$ -(1-2) e  $\alpha$ -(1-4) e  $\alpha$ -(1-3) linkages by the consumption of oxidant and the production of acid when the dextran is subject to periodate oxidation analysis. The second methodology consists in the oxidation of the polysaccharide followed by reduction and hydrolysis with dilute acid which produces characteristic fragments: D-glyceraldehyde, characteristic of the  $\alpha$ -(1,2) linkages, D-glucose, characteristic of the  $\alpha$ -(1,3) linkages, erythritol, characteristic of the  $\alpha$ -(1,4) linkages and glycerol or glycolaldehyde, characteristic of the  $\alpha$ -(1,6) linkages and nonreducing terminal. The results obtained confirmed the high solubility of the dextran produced by strain 4-03 due to its high proportion of the  $\alpha$ -(1,6) linkages in contrast with gum produced by strain 4-

30 that is highly insoluble due to its branched chain. The biopolymer produced by strain 4-26 presented the same values for the both methodologies, however, the Smith degradation result showed that its structure is not close to the standard dextran.

**Key Words:** dextran, dextransucrase, optimization, characterization.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1	Dextrana.....	3
2.1.1	Propriedades.....	3
2.1.2	Estrutura e Caracterização .....	4
2.1.3	Aplicações.....	6
2.2	Dextrana-sacarase .....	7
2.2.1	Propriedades.....	7
2.2.2	Purificação .....	8
2.2.3	Definição de atividade enzimática.....	9
2.2.4	Mecanismo de ação catalítica .....	10
2.3	Produção de dextrana-sacarase e dextrana.....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1	Ativação dos microrganismos e preparo do inóculo.....	17
3.2	Otimização do meio de fermentação para produção da dextrana-sacarase.....	17
3.3	Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana .....	20
3.4	Caracterização da dextrana (estrutura de cadeia).....	23
3.4.1	Método de Perioxidação .....	23
3.4.2	Método da Degradação de Smith.....	25
3.5	Identificação das linhagens.....	25
3.6	Metodologia de Superfície de Respostas .....	26
3.7	Métodos Analíticos .....	30
3.7.1	Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959) .....	30
3.7.2	Determinação da atividade enzimática .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>33</b>
4.1	Otimização da produção de dextrana –sacarase.....	33

4.1.1	Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase utilizando a linhagem 4-03 .....	33
4.1.2	Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase utilizando a linhagem 4-26 .....	38
4.1.3	Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase utilizando a linhagem 4-30 .....	43
4.2	Otimização de meio para a produção de dextrana .....	49
4.2.1	Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana utilizando a linhagem 4-03 .....	49
4.2.2	Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana utilizando a linhagem 4-26 .....	55
4.2.3	Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana utilizando a linhagem 4-30 .....	60
4.3	Caracterização das dextranas .....	65
4.3.1	Método de Perioxidação .....	65
4.3.2	Método de Degradação de Smith.....	66
4.4	Identificação das linhagens.....	67
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cadeia de dextrana linear. ....	3
Figura 2 - Cadeia de dextrana com ramificação na posição $\alpha$ –(1,3). ....	3
Figura 3 - Mecanismo da ação catalítica da enzima dextrana-sacarase. ....	12
Figura 4 - Mecanismo proposto para a biosíntese das ramificações. ....	14
Figura 5 - Gráficos da curva padrão e curva do ensaio. ....	33
Figura 6 - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-03 sobre a variável resposta. ....	34
Figura 7 - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-03 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização. ....	36
Figura 8 - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-03 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato. ....	37
Figura 9- Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-26 sobre a variável resposta. ....	39
Figura 10 - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-26 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização. ....	41
Figura 11 - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-26 em função da a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato. ....	42
Figura 12 - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-30 sobre a variável resposta. ....	45
Figura 13 - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-30 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização. ....	47
Figura 14 - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-30 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato. ....	48

Figura 15 - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-03 sobre a..	51
Figura 16 - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-03 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização.....	53
Figura 17 - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-03 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.....	54
Figura 18 - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-26 sobre a variável resposta. ....	56
Figura 19 - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a linhagem 4-26 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização. ....	58
Figura 20 - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-26 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.....	59
Figura 21 - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-30 sobre a variável resposta. ....	61
Figura 22 - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-30 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização.....	63
Figura 23 - Superfície de resposta e curvas de nível para as linhagem 4-30 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase da linhagem NRRL B-512F. ....	17
Tabela 2 - Valores das variáveis estudadas nos níveis avaliados de acordo com a metodologia do Planejamento fatorial em configuração estrela. ....	18
Tabela 3 - Variáveis do planejamento experimental em configuração estrela com 3 repetições do ponto central. ....	19
Tabela 4 - Meio de fermentação para otimização da produção de dextrana baseado nos resultados de otimização para produção de dextrana-sacarase para as linhagens estudadas. ....	20
Tabela 5 - Valores das variáveis estudadas nos níveis avaliados de acordo com a metodologia do planejamento fatorial em configuração estrela para linhagem 4-03. ...	20
Tabela 6 - Valores das variáveis estudadas nos níveis avaliados de acordo com a metodologia do planejamento fatorial em configuração estrela para linhagem 4-26. ...	21
Tabela 7 - Valores das variáveis estudadas nos níveis avaliados de acordo com a metodologia do planejamento fatorial em configuração estrela para linhagem 4-30. ...	21
Tabela 8 - Variáveis do planejamento experimental em configuração estrela com 3 repetições do ponto central. ....	22
Tabela 9 - Tabela ANOVA para o planejamento experimental com pontos centrais. ....	28
Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-03. ....	33
Tabela 11 - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de enzima da linhagem 4-03. ....	35
Tabela 12 – Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-26. ....	38
Tabela 13 - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de enzima da linhagem 4-26. ....	40
Tabela 14 - Variáveis do planejamento experimental para a segunda batelada de ensaios da	

linhagem 4-30. ....	43
Tabela 15 - Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-30. ....	44
Tabela 16 - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de enzima da linhagem 4-30. ....	46
Tabela 17 - Variáveis do planejamento experimental para a segunda batelada de ensaios da linhagem 4-03. ....	49
Tabela 18 - Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-03. ....	50
Tabela 19 - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de dextrana da linhagem 4-03. ....	52
Tabela 20 - Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-26. ....	55
Tabela 21 - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de dextrana da linhagem 4-26. ....	57
Tabela 22 - Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-30. ....	60
Tabela 23 - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de dextrana da linhagem 4-30. ....	62
Tabela 24 - Porcentagem das ligações das dextranas obtidas pelas três linhagens. ....	65
Tabela 25 - Porcentagem dos fragmentos característicos das dextranas obtidas pelas três linhagens. ....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Devido ao grande avanço que a biotecnologia vem sofrendo nas últimas décadas, vários estudos vêm sendo desenvolvidos para produção de polímero de origem microbiana, também chamado de biopolímero. Dentre as substâncias produzidas destacam-se os polissacarídeos, em particular a dextrana.

O termo dextrana foi primeiramente utilizado por Scheiber, em 1874, o qual havia descoberto que o espessamento apresentado pelos caldos de cana-de-açúcar e de beterraba era causado devido a presença de um carboidrato de fórmula empírica ( $C_6H_{10}O_5$ ), com rotação óptica positiva, ao qual determinou o nome dextrana (ALSOP, 1983). Anteriormente, Pauster em 1861, havia demonstrado que a formação de películas em caldos ricos em sacarose tinha como causa uma ação microbiana sem, no entanto, ter identificado o agente (ALSOP, 1983).

Dextrana é o nome dado a uma classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares compostos por unidades monoméricas de glicose, ligados predominantemente por ligações  $\alpha$ -(1,6), na cadeia principal e  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4) nas ramificações. O grau de ramificação, massa molecular e outras propriedades da dextrana são específicas, variando conforme o microrganismo usado para a obtenção da enzima responsável pela produção do biopolímero. As Figuras 1 e 2 apresentam exemplos de cadeia de dextrana linear e ramificada na posição  $\alpha$ -(1,3), respectivamente.

A dextrana é obtida por processo fermentativo, sendo sintetizada pela enzima dextrana-sacarase a partir da sacarose. A enzima é produzida extracelularmente por uma grande variedade de bactérias, pertencentes a família *Lactobacillaceae* e em particular aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. As principais bactérias produtoras de dextrana pertencem ao gênero *Leuconostoc*, espécies *mesenteroides* e *dextranicum*, sendo a linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F a única com interesse industrial. Em 1948, a dextrana produzida pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F foi o primeiro biopolímero a ser produzido em escala industrial e encontrou algumas aplicações na medicina, nas tecnologias de separações e na biotecnologia (MONCHOIS et. al, 1999).

A diversidade de aplicação da dextrana deve-se principalmente a massa molecular e ao grau de ramificação. São estas características que determinam as suas propriedades reológicas e, conseqüentemente, a sua aplicação na indústria de petróleo, de

alimentos, química e farmacêutica. Sua principal aplicação encontra-se na área médica onde a fração de baixa massa molecular, conhecida como dextrana clínica, é utilizada como expensor do plasma sanguíneo (Dextrana 70) e na prevenção da obstrução dos vasos capilares por melhorar a fluidez do sangue (Dextrana 40). Existem ainda alguns derivados da dextrana com importante aplicação, como a ferro-dextrana, utilizada no tratamento de anemias em animais e humanos e dextrana-sulfato que possui propriedades anticoagulantes.

Este trabalho tem como objetivo otimizar a produção de dextrana por novas linhagens de bactérias isoladas da cana-de-açúcar (VIEIRA, 2003). Dentro deste objetivo principal estão incluídos a determinação da estrutura de cadeia da dextrana e a identificação das linhagens.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Dextrana

#### 2.1.1 Propriedades

Dextranas são polissacarídeos constituídos de moléculas de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -(1,6) na cadeia principal e  $\alpha$ -(1,4),  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,2) nas ramificações. A diversidade dentro desta classe de biopolímero é devido a grande variedade de microrganismos que produzem dextrana, sendo sua propriedade e estrutura determinada pela espécie que a produz.

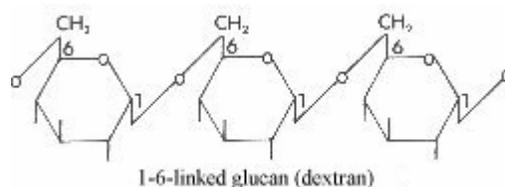


Figura 1 - Cadeia de dextrana linear.

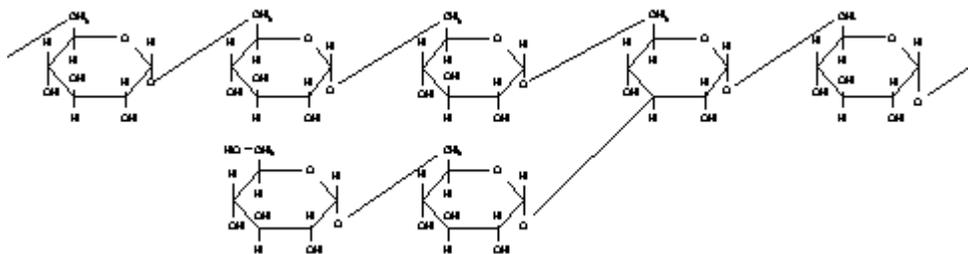


Figura 2 - Cadeia de dextrana com ramificação na posição  $\alpha$ -(1,3).

Poucas propriedades podem ser aplicadas para todas as dextranas, portanto pode-se afirmar de uma maneira geral que todas as dextranas são brancas, insípidas quando sólidas. (JEANES, 1966).

O grau de ramificação afeta a solubilidade em água e outras propriedades reológicas, portanto as dextranas que contém maior proporção de ligações  $\alpha$ -(1,6) são mais solúveis em água e apresenta elevada estabilidade sob condições ácidas e alcalinas (JEANES, 1966).

Larm et al. (citado por DE BELDER, 1993), empregando um procedimento de degradação sequencial, estabeleceu que 40% das ramificações têm uma unidade de glicose, 45% das ramificações têm duas unidades de glicose e apenas 15% das ramificações apresentam mais de duas unidades de glicose.

A dextrana em soluções aquosas (3 a 10%) tem rotação ótica em torno de  $+200^\circ$ , apresentando uma solução clara e bastante estável à esterilização por calor, ao congelamento e descongelamento (JEANES, 1974). Soluções de algumas dextranas apresentam uma coloração levemente amarela esverdeada em luz comum (JEANES, 1966).

O comportamento da viscosidade das soluções de dextrana é bastante característico devido a grande flexibilidade da estrutura desta classe. Uma solução de dextrana com concentração de até 5% (p/v) apresenta comportamento newtoniano. A variação da temperatura de síntese da dextrana difere a sua estrutura e o seu comportamento reológico (SABATIE et al., 1986).

Outra importante propriedade da dextrana é a capacidade de complexar íons metálicos que aparentemente está relacionada com os grupos 3- hidroxil das ramificações  $\alpha$ -(1,3). Em soluções alcalinas, a dextrana forma complexos com composição definida, com muitos íons metálicos, tais como antimônio, cálcio, cobalto, cobre, ferro e urânio (JEANES, 1966).

A massa molecular depende das condições de síntese como temperatura, pH, concentração de sacarose e presença de outros açúcares, no entanto a dextrana produzida pelo método convencional pode atingir de  $9 \cdot 10^6$  a  $50 \cdot 10^8$  Daltons (ROBYT, 1974).

### **2.1.2 Estrutura e Caracterização**

O termo dextrana descreve uma grande classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares constituídos de unidades  $\alpha$ -D-glicopiranosil unidas predominantemente por ligações  $\alpha$ -(1,6). A diversidade dentro da classe de moléculas de dextrana, depende da existência de ligações diferentes das ligações  $\alpha$ -(1,6), conduzindo, portanto, a ramificação da cadeia principal do polímero. As ramificações ocorrem principalmente nas ligações  $\alpha$ -(1,3),  $\alpha$ -(1,4) e  $\alpha$ -(1,2). O tipo, quantidade, comprimento e disposição das ramificações define as diferentes estruturas das dextranas e a influência da solubilidade em água dentre

outras propriedades. (KARTHIKEYAN, 1999).

O procedimento degradativo que utiliza a técnica de perioxidação tem sido utilizado para determinar o tipo e proporção das diferentes ligações dos resíduos D-glicopiranosil em dextranas. Os tipos e proporções destas ligações podem ser medidos pelo consumo de um oxidante e produção de ácidos quando as dextranas estão sujeitas a uma oxidação com periodato. Nesta análise, pelo ácido periódico ou os seus sais, assume-se que para todo mol de ácido produzido na oxidação, uma unidade de anidroglicose ligada somente nas posições 1 e 6 ou em um terminal não redutor (ligado na posição 1) foi oxidada e seu carbono 3 separa-se como ácido fórmico. Uma vez que isto requer a redução de 2 moles de periodato, presume-se que qualquer periodato adicional consumido foi usado na abertura dos anéis de anidriglicose ligados na posição 1 e 4 entre os carbonos 2 e 3 ou na abertura dos anéis ligados na posição 1 e 2 entre os carbonos 3 e 4. Se estas possibilidades não ocorrem para toda dextrana analisada, a diferença é representada por unidades de anidroglicose não oxidada pelo periodato. Tais unidades estão ligadas na posição 1,3. Em unidades onde ambas as posições 2 e 4 estão envolvidas, a oxidação também não ocorreria. Entretanto, parece improvável que as altas proporções de unidades não oxidadas encontradas em algumas dextranas possam ser oriundas somente pela presença de unidades envolvidas em múltiplas ligações. Geralmente, ao lidar com a análise de periodato com as dextranas de alta massa molecular, nenhum desconto é feito para o comportamento dos terminais redutores (SLOAN et al., 1954).

A estrutura de algumas dextranas de *Leuconostoc* e *Streptococcus* foi examinada pela perioxidação por Sidebotham (1974), os resultados mostraram uma interessante característica que foi a incidência de resíduos de D-glicopiranosil não oxidada em todas as dextranas, e pela análise de acetólises indica que estes resíduos são as ligações  $\alpha$ -(1,3).

Segundo Jeanes (1950), a estrutura da dextrana varia com a linhagem do microrganismo empregada na sua produção. Em 1954, Jeanes et al, publicou a classificação e caracterização de 96 linhagens de bactérias utilizando a técnica de perioxidação, além da classificação estrutural eles classificaram as dextranas pela rotação ótica, viscosidade e aparência física após a precipitação com álcool.

Informações mais precisas da estrutura da dextrana podem ser obtidas analisando os fragmentos característicos derivados da dextrana oxidada pelo periodato. Estes

fragmentos podem ser isolados utilizando a Degradação de Smith, o qual controla a degradação pelo seguinte esquema: oxidação com periodato, redução e hidrólise com ácido diluído. Quando este esquema é aplicado para as dextranas, D-gliceraldeído, D-glicose e eritritol torna-se respectivamente os fragmentos característicos das ligações  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4), enquanto que o glicerol e o glicolaldeído pode ser usado para identificar os terminais não reduzidos e as ligações  $\alpha$ -(1,6).

### **2.1.3 Aplicações**

As aplicações da dextrana são baseadas em certas características que diferenciam estes biopolímeros de outros polissacarídeos comerciais. Estas características são afetadas fundamentalmente pela massa molecular e a distribuição da massa molecular, pelo tipo de estrutura, pela solubilidade ou insolubilidade da dextrana em água e se a dextrana ou um derivado da dextrana vai ser utilizado (JEANES, 1966).

Muitas dextranas tem sido examinadas e propostas para aplicações industriais. A dextrana de alta massa molecular pode ser utilizada na recuperação secundária do petróleo, como filme de proteção de sementes, em processos de galvanização de metais e em suturas cirúrgicas (ALSOP, 1983). As dextranas de massa molecular média encontram aplicações na indústria química e de alimentos. Na indústria química, a dextrana é a matéria-prima na fabricação de peneiras moleculares, utilizadas no empacotamento de colunas cromatográficas de permeação em gel. Na indústria de alimentos, o polissacarídeo pode ser usado como inibidor de cristalização e espessante em sorvetes, doces e xaropes.

A mais importante aplicação da dextrana se encontra na indústria farmacêutica como substituto do plasma sanguíneo e facilitador do fluxo sanguíneo. Para esta aplicação, utiliza-se a dextrana de baixa massa molecular, chamada de dextrana clínica. Estas dextranas podem ser utilizadas para fins clínicos, porque são completamente metabolizadas no organismo e não apresenta efeitos tóxicos e alérgicos. Encontram-se disponíveis no mercado dois tipos de dextrana clínica: a Dextrana 70 e a Dextrana 40. A Dextrana 70 possui massa molecular média de  $75.000 \pm 25.000$  Daltons, comercializadas em solução salina a 6% p/v, apresenta propriedades osmóticas e coloidais semelhantes as da proteína do plasma. A solução de dextrana clínica é utilizada nos tratamentos de choques por queimaduras ou hemorragias (DE BELDER, 1993 e ALSOP, 1983). A Dextrana

40 (soluções de 10%), segundo Currello 1993, possui um poder limitado de expansão do volume sanguíneo, mas promove uma melhora no fluxo, auxiliando a circulação nos vasos capilares, podendo ser administrada em indivíduos de qualquer tipo sanguíneo evitando riscos de choques associados a hemoderivados, assim como a possibilidade de contaminação por agentes patogênicos.

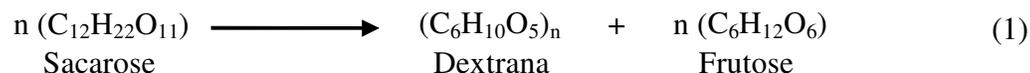
Atualmente várias pesquisas na área farmacêutica vêm sendo desenvolvidas, entre elas se destaca o uso de dextrana em nanoestruturas (SANTOS et al, 2006 e TANG et al., 2006) e em hidrogéis utilizado como veículo para fármacos (MAIA, et al., 2005).

Além das aplicações da dextrana também se destacam as aplicações dos derivados da dextrana como a ferro-dextrana, utilizada para suprir a carência de ferro em animais e humanos e a dextrana-sulfato, usada como agente anticoagulante.

## **2.2 Dextrana-sacarase**

### **2.2.1 Propriedades**

A dextrana-sacarase (EC 2.4.1.5) é uma glicosiltransferase extracelular responsável pela conversão da sacarose em dextrana, segundo a seguinte equação:



A dextrana-sacarase age transferindo o grupo glicosil do doador, a sacarose, para o aceptor, a cadeia de dextrana em formação. A sacarose é o único substrato capaz de induzir a produção da enzima dextrana-sacarase. É uma das poucas enzimas que não requer a presença de cofatores ou intermediários fosforilados de alta energia. A energia requerida para a condensação das duas unidades glicosil é fornecida pela hidrólise da sacarose (ALSOP, 1983 e KARTHIKEYAN, 1999).

A enzima bruta e a enzima purificada com adição de dextrana são mais estáveis que a enzima purificada. A enzima bruta pode ser estocada por vários meses sem perdas significativas da atividade enzimática a pH 5,0 (ALSOP, 1983). A enzima purificada perde atividade rapidamente a 4°C, e mesmo a -15°C, sua atividade diminui 80% em 20 dias (DE BELDER, 1993).

Com objetivo de melhorar a estabilidade enzimática que sofre a influência de vários fatores, foram realizadas diversas pesquisas, sendo verificado que a presença de dextrana, cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), polietileno-glicol, metilcelulose e detergentes neutros, aumentam significativamente a estabilidade da dextrana-sacarase (MILLER e ROBYT, 1986; MILLER e ROBYT, 1984; KABOLI e REILLY, 1980).

Kobayashi e Matsuda (1980) mostraram que a enzima perde atividade na presença de EDTA. O efeito inibitório do EDTA pode ser reduzido pela adição do íon  $\text{Ca}^{+2}$ . No mesmo trabalho eles observaram que a enzima purificada foi inibida pelos íons  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ , esta ordem indica o efeito decrescente de inibição.

Para estabelecer as condições ótimas para produção da dextrana-sacarase é necessário conhecer a dependência do pH e da temperatura de produção, atividade e estabilidade da enzima. O pH ótimo para produção da enzima está na faixa de 6,7 – 7,0, o pH ótimo para atividade enzimática é 5,0 – 5,2, a enzima é mais estável neste mesmo pH e relativamente instável em pH 6,7. Embora o pH 6,7 tem sido mostrado como o pH ótimo para produção da enzima, este valor só é aplicado a temperatura de 23°C. Em temperaturas mais elevadas a inativação a pH 6,7 é extremamente rápida e são obtidos baixos rendimentos (ALSOP, 1983).

A massa molecular da dextrana-sacarase purificada com 17% de carboidratos, obtido por Kobayashi e Matsuda (1977), foi de 65.000 daltons. Miller et al. (1986), em trabalhos posteriores avaliaram a massa molecular em 180.000 daltons, em uma enzima purificada contendo menos de 1% de carboidratos.

### **2.2.2 Purificação**

A espécie *Leuconostoc* pode crescer em uma variedade de carboidratos, mas para produção da dextrana-sacarase, a sacarose deve ser incluída no meio. Devido esta condição, dextrana-sacarase da espécie *Leuconostoc* contém várias proporções de dextrana que dificulta a purificação da enzima (SIDEBOTHAM, 1974). A maioria das dextranas pode ser removida pela adição da endo-dextranase. Entretanto, a adição da endo-dextranase necessita da sua remoção subsequente para obter a dextrana-sacarase purificada (ROBYT, 1995). A remoção da dextrana pelo tratamento com a endo-dextranase constitui uma

importante etapa na purificação da dextrana-sacarase.

Ebert e Schenk, em 1968, foram os primeiros a publicar sobre a purificação da dextrana-sacarase, eles realizaram um extensivo estudo de purificação e produziram dextrana-sacarase que continham relativamente uma pequena proporção de dextrana. A enzima produzida teve atividade de 2.509 UDS/mg de proteína e a massa molecular da enzima foi 280.000 daltons, purificada pelo método de ultrafiltração.

Robynt e Walseth (1979a) desenvolveram um esquema para purificar dextrana-sacarase isenta de dextrana que consiste três etapas: dialisar e concentrar a cultura sobrenadante, tratar o concentrado dialisado com dextranase em um tubo de diálise e realizar cromatografia de permeação em gel para obter a enzima purificada. A atividade específica da enzima purificada por este esquema foi 53 U/mg e o concentrado da cultura sobrenadante obteve um fator de purificação de 240. Mais tarde Miller et.al (1986), combinando tratamento com dextranase, cromatografia de troca iônica e cromatografia por afinidade alcançou o objetivo de diminuir a concentração de carboidrato na solução de dextrana-sacarase purificada sem afetar a alta produção com elevada atividade específica da enzima produzida pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Kim e Robyt (1994a e 1994b) obtiveram um mutante constitutivo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512FMC da *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512FM, a qual facilitou a purificação da dextrana-sacarase. O mutante produziu aproximadamente 1-3 UI/ ml de dextrana-sacarase em um meio contendo glicose. Em 1998, Kitaoka e Robyt, obtiveram uma elevada produção estável do mutante constitutivo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512FMC, que produziu aproximadamente 16 UI/ml de dextrana-sacarase sem a presença de dextrana num meio composto de glicose.

### **2.2.3 Definição de atividade enzimática**

Unidades alternativas para medir a atividade da dextrana-sacarase foram propostas.

Uma unidade de dextrana-sacarase (UDS) é definida como a quantidade de enzima

que converte 1 mg de sacarose em dextrana em 1 hora, liberando 0,52 mg de frutose, a 30°C em pH 5,2 (HEHRE, 1955).

Lawford et al.(1979) expressaram a atividade enzimática por  $\mu\text{g}$  de açúcar redutor produzido por minuto por mililitro a pH 5,5 e temperatura de 30°C. A conversão desta unidade para UDS seria:  $10 \mu\text{g}$  de açúcar redutor / min/ ml = 1,15 UDS/ ml.

Robyt e Walseth (1979a), definiram a atividade enzimática (U) como sendo a quantidade de enzima que incorpora 1  $\mu\text{mol}$  de D-glicose no polissacarídeo em 1 minuto a pH 5,0 e 25°C. Então  $1\text{U} = 20,27 \text{UDS}$ .

Devido as diferentes unidades utilizadas para expressar a atividade enzimática da dextrana-sacarase, torna-se difícil a comparação destas unidades. Para o uso industrial a UDS é a mais conveniente (ALSOP, 1983).

#### **2.2.4 Mecanismo de ação catalítica**

O modo de ação da dextrana-sacarase foi estudado por muitos anos, onde diversos mecanismos foram propostos. O estudo estrutural da dextrana mostra que duas reações são de fundamental importância na síntese da dextrana: a formação da cadeia principal compostas por unidades  $\alpha$ -D-glicopiranosil ligadas na posições  $\alpha$ -(1,6) e a introdução de ramificações nesta cadeia.

#### **Formação da cadeia principal**

A síntese da cadeia principal deve proceder como todas as reações de polimerização controladas por enzimas. Há dois mecanismos de reação o de cadeia única e o de múltiplas cadeias, ambos desenvolve o crescimento da cadeia de dextrana através de uma série de ciclos de crescimento o qual enzimas catalisam a adição de unidades de D-glicopiranosil. Se o mecanismo de múltiplas cadeias opera, o complexo que forma entre a enzima e a cadeia de dextrana irá dissociar no final de cada ciclo de crescimento, permitindo que várias enzimas participem da formação de uma única cadeia principal. No caso do mecanismo de cadeia única, cada cadeia principal será sintetizada por uma única molécula de enzima e a dissociação ou desativação, do complexo enzima-dextrana ocorrerá

ao término da síntese da cadeia após vários ciclos de crescimento (SIDEBOTHAM,1974).

A não detecção de oligossacarídeos e o fato de as dextranas alcançarem altas massas moleculares ( $PM \sim 5 \times 10^5$ ) nos primeiros estágios da síntese da dextrana foi citado como evidência que a formação da cadeia principal da dextrana se dá por um mecanismo de cadeia única (SIDEBOTHAM,1974).

Em 1941, quando a dextrana-sacarase foi descoberta, pesquisadores estudando o mecanismo de formação do glicogênio e do amido, descobriram que a adição de glicose na cadeia em formação era feita a partir do terminal não redutor por uma  $\alpha$ -glicose-1-fosfato. Teorias similares foram formuladas para síntese da dextrana, mas descobriu-se que açúcares fosforilados não estavam envolvidos nesta síntese (ALSOP, 1983).

Há dois possíveis tipos de mecanismo para o biosíntese da dextrana. No primeiro as unidades do monômero são adicionadas seqüencialmente no terminal não redutor da cadeia do polissacarídeo. No segundo, as unidades do monômero são adicionadas seqüencialmente no terminal redutor pela inserção entre a enzima e a cadeia em formação do polímero (ROBYT et al, 1974).

Ebert e Schenk em 1968 foram os primeiros a propor um mecanismo onde o crescimento da cadeia da dextrana ocorreria pelo terminal redutor. A cadeia de dextrana pode crescer por sucessivas inserções de unidades de glicose entre o sítio catalítico da enzima e o terminal redutor do polissacarídeo (citado por MONCHOIS et. al, 1999). Eles ainda concluíram que não são necessários os inicializadores para formação da cadeia do polímero e que a sacarose sozinha pode iniciar a polimerização (citado por KARTHIKEYAN, 1999).

Hehre (citado por ROBYT, 1974), em 1968, argumentou contra o mecanismo de inserção depois de estudar a biosíntese do glicogênio pela amilosacarase da linhagem *Neisseria perflava* utilizando a sacarose como substrato. O trabalho de Hehre foi citado como evidência que o crescimento da cadeia de dextrana ocorreria pela adição de unidades de glicose no terminal não redutor. Entretanto não foi apresentada evidência experimental para a dextrana.

Após anos de estudo, Robyt et al (1974), utilizando técnicas de marcadores radioativos e técnicas cromatográficas, demonstraram que a dextrana se mantinha ligada à enzima, provavelmente por ligações covalentes e que a dextrana era sintetizada



de deslocar a molécula de dextrana em crescimento.

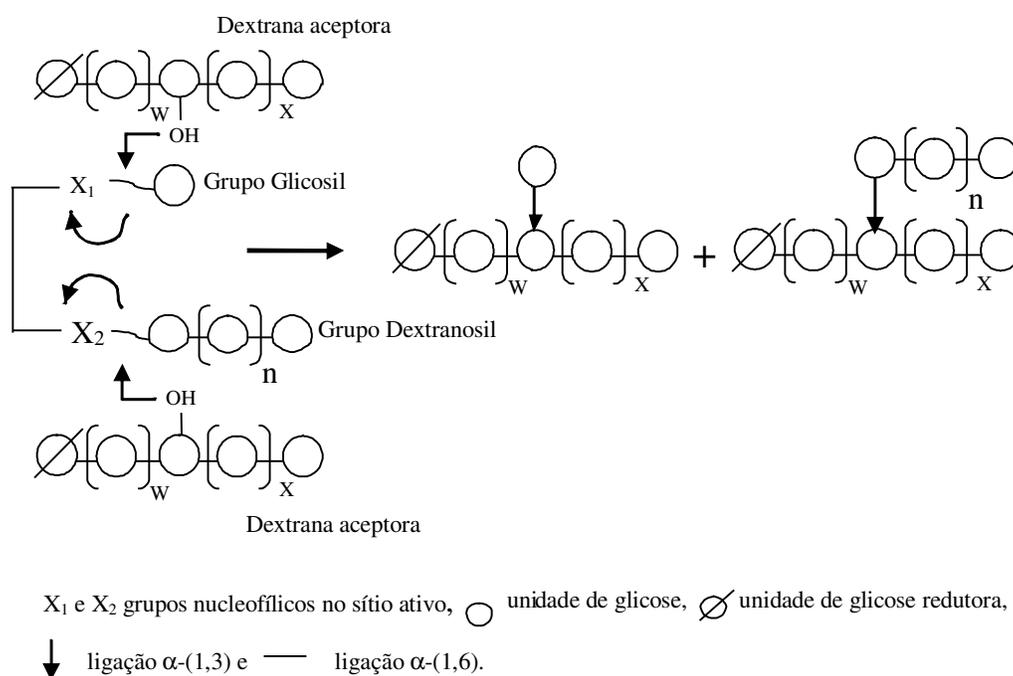
### **Formação das ramificações**

Durante as últimas décadas tem sido estudados alguns mecanismos diferentes para explicar a formação das ramificações.

Em 1959, Bovey (Citado por ROBYT & TANIGUCHI, 1976) propôs que as ramificações consistindo de um único grupo glicopiranosil poderiam ser formadas pela transferência direta do grupo glicosil da sacarose para o grupo hidroxil do C<sub>3</sub> de uma cadeia de dextrana ligada por ligações  $\alpha$ -(1,6). Cadeias laterais maiores poderiam ser formadas a partir de reações de alongamento destas unidades de glicose. Uma segunda hipótese para a formação de cadeias laterais mais longas seria a cisão de uma ligação  $\alpha$ -(1,6) seguida pela transferência do segmento clivado para o grupo hidroxil do C<sub>3</sub> de uma unidade de glicose em outra cadeia de dextrana. Esta transferência seria catalisada por outra enzima que não a dextrana-sacarase, uma enzima de ramificação análoga à enzima de ramificação do glicogênio muscular ou a enzima Q da batata. Entretanto estas enzimas de ramificação nunca foram isoladas. Além disso, a transferência de uma ligação  $\alpha$ -(1,6) para uma ligação  $\alpha$ -(1,3) é um processo energeticamente desfavorável, uma vez que as ligações  $\alpha$ -(1,3) são de maior energia que as ligações  $\alpha$ -(1,6).

Ebert e Brosche (Citado por ROBYT & TANIGUCHI, 1976), em 1967 propôs um outro mecanismo para formação das ramificações, o qual sugere que a molécula de dextrana livre age como acceptor para liberar a dextrana de um complexo dextrana - dextrana-sacarase formando as ramificações. A metodologia consistiu em adicionar cadeias de dextrana de baixa massa molecular marcadas radioativamente num meio sintetizador ativo na presença de sacarose. Seus experimentos, entretanto, não conduziram evidências conclusivas que a formação das ramificações ocorreu pela reação de um acceptor, pelo fato que a reação foi conduzida na presença de sacarose. Além disso, as dextransas de baixa massa molecular, ao invés de agirem como aceptores poderiam ter sido incorporadas às cadeias de dextransas de alta massa molecular como iniciadores nos quais unidades de glicose teriam sido adicionadas ao terminal redutor gerando um produto de alta massa molecular marcada radioativamente.

Em 1976, Robyt e Taniguchi, diante destas não evidências, apresentaram um trabalho que comprova o mecanismo proposto por Ebert e Brosche. A metodologia mostrada neste estudo também foi realizada por espécies marcadas radioativamente que estavam envolvidas na síntese da dextrana. Este estudo descartou a possibilidade da existência de uma enzima específica para formação das ramificações. O mecanismo proposto para a biosíntese das ramificações está apresentado na Figura 4. Um grupo hidroxil do C<sub>3</sub> de uma cadeia livre de dextrana faz um ataque nucleofílico no C<sub>1</sub> de uma unidade glicosil ou dextranosil do complexo enzima – radical para formar uma ligação  $\alpha$ -(1,3) liberando outra glicose ou dextrana da enzima.



**Figura 4** - Mecanismo proposto para a biosíntese das ramificações.

Por este mecanismo, então, podem ser produzidas dextranas com ramificações constituindo de uma única unidade de glicose ou com várias unidades de glicose (ROBYT e TANIGUCHI, 1976).

O mecanismo citado acima com base no mecanismo de aceptor, não explica de forma suficiente a síntese de dextrana altamente ramificada. Cote e Robyt (1984) sugeriram que as ligações nas posições -(1,3) das dextranas altamente ramificadas podem ser

sintetizadas pela transferência do resíduo glicosil do sítio glicosil-enzima diferente dos dois sítios ativos da dextrana (MONCHOIS, 1999).

O grau de ramificação da dextrana B-512 F(M) pode aumentar em temperaturas elevadas e diminuir em temperaturas mais baixas (ROBYT, 1995).

### **2.3 Produção de dextrana-sacarase e dextrana**

Dextrana é produzida na maioria dos países desenvolvidos, principalmente para produtos clínicos. A maioria dos produtores usam a linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F ou NRRL B-512 e empregam o processo em batelada na presença de sacarose. Etanol ou metanol é adicionado para precipitar a dextrana, em seguida é hidrolisada com ácido diluído até alcançar a massa molecular apropriada e isolada por fracionamento (DE BELDER, 1993).

Dextranas são produzidas pela fermentação bacteriana em meio rico em sacarose. O primeiro produto da fermentação na presença de sacarose como substrato não é a dextrana, mas a enzima extracelular dextrana-sacarase.

A dextrana pode ser produzida pela sacarose em meio isento de células, usando a enzima dextrana-sacarase (KARTHIKEYAN, 1999). As principais bactérias produtoras de dextrana-sacarase pertencem ao gênero *Leuconostoc* e *Streptococcus*. A enzima dextrana-sacarase usa sacarose como doador de glicopiranosil de alta energia para a síntese da dextrana. As propriedades da enzima e da dextrana produzida são específicas da linhagem de bactéria que a produz e não pela espécie ou gênero ao qual o microrganismo pertence.

Tradicionalmente a produção da dextrana é realizada diretamente na cultura celular. É um processo simples onde três etapas ocorrem simultaneamente: crescimento celular, produção da enzima e produção de dextrana (ALSOP, 1983).

A proposta de melhorar o processo convencional tem sido feito desde quando a dextrana tornou-se um polímero de interesse industrial. Portanto, uma outra forma de produzir dextrana é pelo processo enzimático, onde ocorre a produção da enzima e produção da dextrana com o caldo enzimático bruto ou purificado após a separação de células (MIBIELLI, 2001). Neste processo cada etapa poder ser otimizada separadamente, pois as condições de processo são distintas.

Devido a reação ser exotérmica a temperatura aumenta alguns graus centígrados e o pH diminuí por causa da produção de produtos ácidos. Desta maneira o pH ótimo para o crescimento celular é por volta de 7, para produção da enzima na faixa o pH deve ser na faixa de 6,0 – 6,9 e para ação da enzima o pH é 5,2 (ALSOP, 1983). A temperatura e pH ideal para produção da linhagem NRRL B-512 são 25°C e 6,7, respectivamente. Para se obter um alto rendimento em enzima é recomendável a presença de sacarose numa concentração acima de 2% (DE BELDER, 1993).

O fosfato é um componente essencial para as atividades metabólicas e crescimento celular. Portanto, Rodrigues et al.(2003) propuseram o aumento da concentração fosfato de 0,1M para 0,3M no meio de fermentação da linhagem *Leuconostoc mesenteroides* B512F. A concentração proposta foi capaz de manter o pH em valores em torno do valor de máxima estabilidade da enzima, bem como foi capaz de estimular o crescimento celular, o que acarretou uma maior produtividade enzimática.

A sacarose é essencial tanto para síntese da dextrana–sacarase quanto para produção da dextrana. Embora a linhagem *Leuconostoc mesenteroides* pode crescer em vários carboidratos como glicose, frutose, maltose e entre outros, a sacarose é o único substrato capaz de induzir a produção da enzima dextrana–sacarase (KARTHIKEYAN, 1999).

A dextrana produzida pela fermentação bacteriana é chamada de dextrana nativa e tem massa molecular na faixa de  $5 \cdot 10^7$  a  $5 \cdot 10^9$ . Geralmente a dextrana nativa é separada das células e precipitada com álcool. A dextrana nativa pode ser submetida a hidrólise ácida para obter a massa molecular desejada, para ser utilizada em aplicações específicas. (KARTHIKEYAN, 1999).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Ativação dos microrganismos e preparo do inóculo

Para a ativação do microrganismo, inoculou-se um Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio estéril de *Man Rogosa Sharpe* (Lactobacili MRS Broth, Difco 0881-17) com tubo de cultura de capacidade de 2ml. Trata-se de cultura estoque conservada em criotubos (em glicerol 20%) a – 20°C. Realizou-se o crescimento em shaker rotatório a 150 rpm temperatura de 28 °C durante 24 horas. Após adicionou-se em um Erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml de MRS líquido, um volume de inóculo que corresponde a 10% do volume de meio contido no frasco. Deixou-se 24 horas a 28°C em shaker rotatório a 150 rpm.

#### 3.2 Otimização do meio de fermentação para produção da dextrana-sacarase

A escolha do meio de fermentação para otimização da produção da enzima dextrana-sacarase, baseou-se no meio otimizado por Guimarães (1997) para produção da dextrana-sacarase da linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F descrito na Tabela 1.

**Tabela 1** - Meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase da linhagem NRRL B-512F.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/l)</b>
Sacarose	50,00
Extrato de levedura	20,00
Fosfato de potássio dibásico	20,00
Sulfato de magnésio	0,20
Sulfato de manganês	0,01
Sulfato ferroso	0,01

Cloreto de cálcio	0,02
Cloreto de sódio	0,01

Utilizou-se a metodologia de planejamento fatorial para determinar a melhor composição do meio, no qual a enzima de cada linhagem apresenta o máximo de atividade enzimática.

Realizou-se o planejamento fatorial de dois níveis em configuração estrela com três repetições do ponto central para determinar a região de máxima atividade enzimática de cada linhagem, segundo metodologia descrita por Barros et al. (2001). As variáveis estudadas foram as concentrações de sacarose, extrato de levedura e fosfato de potássio dibásico. A Tabela 2 mostra os valores das variáveis estudadas para os níveis definidos de acordo com a metodologia de planejamento experimental, tendo como variável resposta a atividade enzimática de cada linhagem.

**Tabela 2** - Valores das variáveis estudadas nos níveis avaliados de acordo com a metodologia do Planejamento fatorial em configuração estrela.

Níveis	-1,682	-1	0	+1	+1,682
Concentração de sacarose (g/L)	33,2	40	50	60	66,8
Concentração de extrato de levedura (g/L)	11,6	15	20	25	28,4
Concentração de fosfato (g/L)	3,2	10	20	30	36,8

Para cada linhagem, realizaram-se 17 ensaios de fermentação em um único bloco. Cada ensaio de fermentação foi realizado em frasco Erlenmeyer de capacidade de 250 ml contendo 90 ml do meio estéril e 10 ml de inóculo, totalizando um volume de fermentado de 100 ml. Preparou-se separadamente na forma concentrada o fosfato de potássio dibásico e esterilizou-se em tubo de ensaio com 10 ml de solução para ser adicionado ao mosto na hora da inoculação. Ensaios anteriores constataram que, quando este sal é autoclavado na presença dos demais componentes do meio de fermentação, ocorre a precipitação no meio (QUEIROZ, 1987). Preparou-se na forma de solução estoque concentrada, os sais a serem adicionados no meio de fermentação. As condições padrões iniciais para a fermentação foram: pH de 6,7-7,0, temperatura de 28°C e rotação de 150 rpm. O tempo de fermentação variou-se de 6 a 8 horas em função das linhagens estudadas determinado por Vieira, 2003.

A Tabela 3 apresenta as condições dos 17 ensaios definidos pelo planejamento experimental para a otimização dos meios de fermentação para a produção de dextrana-sacarase.

**Tabela 3** - Variáveis do planejamento experimental em configuração estrela com 3 repetições do ponto central.

Ensaio	Fatores			Valor (g/L)		
	Nível			Sacarose	Extrato	Fosfato
	Sacarose	Extrato	Fosfato			
1	-1	-1	-1	40	15	10
2	-1	-1	+1	40	15	30
3	-1	+1	-1	40	25	10
4	-1	+1	+1	40	25	30
5	+1	-1	-1	60	15	10
6	+1	-1	+1	60	15	30
7	+1	+1	-1	60	25	10
8	+1	+1	+1	60	25	30
9	-1,682	0	0	33,2	20	20
10	+1,682	0	0	66,8	20	20
11	0	-1,682	0	50	11,6	20
12	0	+1,682	0	50	28,4	20
13	0	0	-1,682	50	20	3,2
14	0	0	+1,682	50	20	36,8
15	0	0	0	50	20	20
16	0	0	0	50	20	20
17	0	0	0	50	20	20

Após a fermentação, ajustou-se o pH do caldo proveniente da fermentação para o ótimo das enzimas produzidas em cada linhagem, com solução 1N de hidróxido de sódio ou solução 1N de ácido clorídrico (VIEIRA, 2003). Retirou-se as células do caldo por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a uma temperatura de 4°C em centrífuga BECKMAN COULTER modelo Avanti™ J-25. Após determinou-se a atividade enzimática do caldo centrifugado. A metodologia para determinar a atividade enzimática está descrita no item 3.5.2.

### 3.3 Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana

A escolha do meio de fermentação para otimização da produção de dextrana, baseou-se no meio otimizado para produção de dextrana-sacarase de cada linhagem. Na Tabela 4 estão apresentados os meios baseados nos resultados de otimização para produção de dextrana-sacarase para as linhagens estudadas. As únicas variáveis alteradas foram a concentração de sacarose no meio que passou a ser 150 g/l e o tempo de fermentação de 20 horas.

**Tabela 4** - Meio de fermentação para otimização da produção de dextrana baseado nos resultados de otimização para produção de dextrana-sacarase para as linhagens estudadas.

<b>Linhagens</b>	<b>4-03</b>	<b>4-26</b>	<b>4-30</b>
<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/l)</b>		
Sacarose	150	150	150
Extrato de levedura	20	20	20
Fosfato de potássio dibásico	20	05	50
Sulfato de magnésio	0,20	0,20	0,20
Sulfato de manganês	0,01	0,01	0,01
Sulfato ferroso	0,01	0,01	0,01
Cloreto de cálcio	0,02	0,02	0,02
Cloreto de sódio	0,01	0,01	0,01

Utilizou-se a metodologia de planejamento fatorial de dois níveis em configuração estrela com três repetições do ponto central para determinar a melhor composição do meio, no qual a dextrana produzida em cada linhagem apresenta o máximo rendimento em relação ao substrato (BARROS et al., 2001). As variáveis estudadas foram as concentrações de sacarose, extrato de levedura e fosfato de potássio dibásico. As Tabelas 5, 6 e 7 mostram respectivamente, os valores das variáveis estudadas para as linhagens 4-03, 4-26 e 4-30 nos níveis definidos de acordo com a metodologia de planejamento experimental fatorial em configuração estrela de 2 níveis para 3 variáveis. A variável resposta foi o rendimento da dextrana em relação ao substrato.

**Tabela 5** - Valores das variáveis estudadas nos níveis avaliados de acordo com a

metodologia do planejamento fatorial em configuração estrela para linhagem 4-03.

<b>Níveis</b>	<b>-1,682</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,682</b>
Concentração de sacarose (g/L)	116,4	130	150	170	183,6
Concentração de extrato de levedura (g/L)	11,6	15	20	25	28,4
Concentração de fosfato (g/L)	3,2	10	20	30	36,8

**Tabela 6** - Valores das variáveis estudadas nos níveis avaliados de acordo com a metodologia do planejamento fatorial em configuração estrela para linhagem 4-26.

<b>Níveis</b>	<b>-1,682</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,682</b>
Concentração de sacarose (g/L)	116,4	130	150	170	183,6
Concentração de extrato de levedura (g/L)	11,6	15	20	25	28,4
Concentração de fosfato (g/L)	0,795	2,5	5,0	7,5	9,2

**Tabela 7** - Valores das variáveis estudadas nos níveis avaliados de acordo com a metodologia do planejamento fatorial em configuração estrela para linhagem 4-30.

<b>Níveis</b>	<b>-1,682</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,682</b>
Concentração de sacarose (g/L)	116,4	130	150	170	183,6
Concentração de extrato de levedura (g/L)	11,6	15	20	25	28,4
Concentração de fosfato (g/L)	33,2	40	50	60	66,8

Realizou-se de forma semelhante aos ensaios feitos para otimização do meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase. Portanto, para cada linhagem, realizaram-se 17 ensaios de fermentação em um único bloco. Cada ensaio de fermentação foi realizado em frasco Erlenmeyer de capacidade de 250 ml contendo 90 ml do meio estéril e 10 ml de inóculo, totalizando um volume final de 100 ml de fermentado. As condições padrões iniciais para a fermentação foram: pH de 6,7-7,0, temperatura de 28°C e rotação de 150 rpm. O tempo de fermentação foi de 20 horas para todas as linhagens estudadas.

A Tabela 8 mostra as condições dos 17 ensaios definidos pelo planejamento experimental para a otimização dos meios de fermentação para a produção de dextrana.

**Tabela 8** - Variáveis do planejamento experimental em configuração estrela com 3 repetições do ponto central.

Ensaio	Fatores			Valores								
	Nível			4-03			4-30			4-26		
	Sac	Ext. Lev	Fosf	Sac	Ext. Lev	Fosf	Sac	Ext. Lev	Fosf	Sac	Ext. Lev	Fosf
1	-1	-1	-1	130	15	2,5	130	15	40	130	15	2,5
2	-1	-1	+1	130	15	7,5	130	15	60	130	15	7,5
3	-1	+1	-1	130	25	2,5	130	25	40	130	25	2,5
4	-1	+1	+1	130	25	7,5	130	25	60	130	25	7,5
5	+1	-1	-1	170	15	2,5	170	15	40	170	15	2,5
6	+1	-1	+1	170	15	7,5	170	15	60	170	15	7,5
7	+1	+1	-1	170	25	2,5	170	25	40	170	25	2,5
8	+1	+1	+1	170	25	7,5	170	25	60	170	25	7,5
9	-1,682	0	0	116,4	20	5,0	116,4	20	50	116,4	20	5,0
10	+1,682	0	0	183,6	20	5,0	183,6	20	50	183,6	20	5,0
11	0	-1,682	0	150	11,6	5,0	150	11,6	50	150	11,6	5,0
12	0	+1,682	0	150	28,4	5,0	150	28,4	50	150	28,4	5,0
13	0	0	-1,682	150	20	0,795	150	20	33,2	150	20	0,795
14	0	0	+1,682	150	20	9,2	150	20	66,8	150	20	9,2
15	0	0	0	150	20	5,0	150	20	50	150	20	5,0
16	0	0	0	150	20	5,0	150	20	50	150	20	5,0
17	0	0	0	150	20	5,0	150	20	50	150	20	5,0

Para cada ensaio realizado, prepararam-se dois frascos idênticos contendo a mesma quantidade de meio de fermentação, inoculando-se apenas um. Utilizou-se o outro para determinar a concentração de sacarose presente no meio depois da esterilização.

Após o término da fermentação, retirou-se alíquota de 20 ml do caldo fermentado de cada ensaio e diluiu-se em 100 ml de água destilada, centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 minutos a uma temperatura de 25°C em centrífuga BECKMAN COULTER modelo

Avanti™ J-25, com o objetivo de precipitar a massa celular contida no fermentado bruto. Transferiram-se os precipitados para pequenas placas de vidro previamente taradas, colocaram-se as placas para secar em estufa com circulação de ar a 40°C por 24 horas. Em seguida, retiraram-se as placas da estufa, resfriaram-se em dessecadores e então pesaram-se cada uma. Utilizou-se a diferença de massa para determinar a concentração de massa celular no material fermentado.

Separou-se a goma produzida presente no caldo de fermentação por precipitação com etanol (92,4%), nas proporções em volume de 1:1 para as linhagens 4-03 e 4-30 e 1:4 para a linhagem 4-26, com o objetivo de recuperar toda a fração de goma produzida. Retirou-se 20 ml do fermentado de cada ensaio e colocou-se em frascos de centrífuga e adicionou-se o etanol. Mantiveram-se os frascos em temperatura ambiente por 24 horas e em seguida centrifugaram-se a 10.000 rpm por 15 minutos a uma temperatura de 25°C em centrífuga BECKMAN COULTER modelo Avanti™ J-25. Lavou-se a goma precipitada com água destilada e precipitou-se por mais duas vezes, transferiu-se para pequenas placas de vidro previamente tarada e secaram-se em estufa com circulação de ar a 40°C por 24 horas. Após a secagem, resfriaram-se as placas e pesaram-se cada uma. Utilizou-se a diferença entre a massa da placa vazia e a massa da placa com a goma para determinar a concentração de biopolímero produzido.

Determinou-se a concentração de açúcares redutores totais do caldo fermentado e do meio de fermentação pelo método de DNS.

Realizou-se um balanço de massa em cada ensaio para determinar o rendimento do produto em relação ao substrato, no qual utilizou-se os resultados das análises, as massa celular e as massas da goma determinada pelas pesagens dos frascos.

### **3.4 Caracterização da dextrana (estrutura de cadeia)**

Determinou-se a estrutura de cadeia da dextrana produzida pelas três linhagens estudadas, utilizando as duas metodologias apresentadas a seguir.

#### **3.4.1 Método de Peroxidação**

Utilizou-se o método de peroxidação, proposto por Jeanes (1954),

para determinar a estrutura de cadeia da dextrana formada pelas três linhagens e da dextrana padrão. Portanto, pesou-se 0,1000 g de dextrana em base seca (24 horas em estufa a 40°C) e dissolveu-se em 50 ml de água destilada em um Erlenmeyer de 250 ml. Em seguida, a solução contendo a dextrana foi autoclavada a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 30 minutos. Envolveu-se o Erlenmeyer totalmente com papel alumínio para impedir a incidência de luz e evitar reações secundárias. Adicionou-se a solução de dextrana 50 ml de solução estoque 0,0374 M de periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>). Manteve-se a solução em refrigeração a 4°C durante 96 horas. Depois deste período, determinou-se a quantidade de ácido fórmico produzido. Em um frasco de 50 ml, adicionou-se 10 ml da solução contendo a dextrana oxidada e 1 ml de etilenoglicol. Utilizou-se o etilenoglicol para reduzir todo o periodato em excesso. Após 10 minutos, adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína (indicador) e titulou-se com solução padrão 0,01 N de hidróxido de sódio (NaOH). Em seguida, determinou-se o periodato consumido. Em um frasco Erlenmeyer de 250 ml adicionou-se 40 ml de água destilada, 3 ml de solução 0,5 N de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2 ml de solução 20% de iodeto de potássio (KI) e 3 ml de solução de amido (Indicador). Resfriou-se a solução em banho de gelo. Após adicionou-se 5 ml da solução contendo a dextrana oxidada e titulou-se imediatamente com solução padrão 0,1 N de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Pela quantidade de ácido fórmico produzido, determinou-se a porcentagem de ligações α-(1,6) da molécula do biopolímero, de acordo com a Equação 2

$$\% \text{ ligações } \alpha\text{-(1,6)} = \text{AFP} \times 100 \quad (2)$$

onde AFP é a quantidade de ácido fórmico produzido.

Determinou-se a porcentagem de ligações α-(1,2) e α-(1,4), pela diferença entre a quantidade de periodato consumido e duas vezes a quantidade de ácido fórmico produzido, conforme apresentado na Equação 3

$$\% \text{ ligações } \alpha\text{-(1,2) e } \alpha\text{-(1,4)} = \text{PC} - 2 \times \text{AFP} \quad (3)$$

onde PC é a quantidade de periodato consumido

E pela subtração da soma das porcentagens das ligações de 100, determinou-se a porcentagem de ligações α-(1,3), mostrada na Equação 4

$$\% \text{ ligações } \alpha\text{-(1,3)} = 100 - (\% \text{ ligações } \alpha\text{-(1,6)} + \% \text{ ligações } \alpha\text{-(1,2) e } \alpha\text{-(1,4)}) \quad (4)$$

Neste método não é possível separar as porcentagens das ligações  $\alpha$ -(1,2) e  $\alpha$ -(1,4).

### **3.4.2 Método da Degradação de Smith**

Realizou-se também a determinação da estrutura da dextrana pela identificação de fragmentos característicos gerados por uma seqüência de reações sofridas pelo polissacarídeo. Determinou-se a estrutura das três linhagens isoladas e da dextrana padrão. A metodologia utilizada foi a descrita a seguir: pesou-se 0,1000 g de dextrana em base seca (24 horas em estufa à 40°C) em um Erlenmeyer de 250 ml e dissolveu-se em 25 ml de água destilada. Em seguida, a solução contendo a dextrana foi autoclavada a 15 lb/in<sup>2</sup> por 30 minutos. Envolveu-se totalmente o Erlenmeyer com papel alumínio para impedir a incidência de luz e evitar reações secundárias. Adicionou-se 25 ml de solução estoque 0,1 M de periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) a solução de dextrana. Manteve-se a solução a temperatura ambiente durante 5 dias para formar polialdeído. Adicionou-se a solução de dextrana 0,5 ml de etilenoglicol, a qual dialisou-se por 3 dias com água deionizada. Após, acrescentou-se 75 mg de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) na solução contendo a dextrana oxidada e realizou-se novamente uma diálise por 3 dias com água deionizada. Por fim, hidrolizou-se a solução de dextrana com 2 ml de solução 0,5 M de ácido sulfúrico a 100°C durante 5 horas (SIDEBOTHAM, 1971).

Determinou-se a qualificação e quantificação dos fragmentos característicos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando uma coluna de troca iônica Dionex CarboPac MA-1.

Logo, os fragmentos característicos gerados foram o D-gliceraldeído, característico de ligações  $\alpha$ -(1,2), a D-glicose, característico de ligações  $\alpha$ -(1,3), o eritritol, característico de ligações  $\alpha$ -(1,4), o glicerol e o glicolaldeído, característicos de ligações  $\alpha$ -(1,6) e terminal não-redutor.

### **3.5 Identificação das linhagens**

As três linhagens envolvidas nesse estudo foram identificadas pela Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP.

Utilizou-se para realizar a identificação das linhagens o sequenciamento e análise filogenética de fragmentos do gene rRNA 16S.

A metodologia consiste na amplificação do DNA ribossomal 16S pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Utilizou-se para a reação de PCR os “primer”(oligonucleotídeos sintéticos) p27f e p140r, homólogos às extremidades conservadas do gene rRNA 16s de bactérias. A seguir purificou-se os fragmentos de rDNA 16S e submeteu-se diretamente ao sequenciamento em equipamento MegaBACE 1000 (GE Health Care). Utilizou-se para o sequenciamento os “primer” p10f, 765f, 782r e p100r. Montou-se em conting (seqüência única combinado os diferentes fragmentos obtidos) as seqüências parciais de rDNA 16S obtidas com os diferentes”primers” e comparou-se com as seqüências de rDNA 16 S de organismos representados nas bases de dados do RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA). Selecionaram-se as seqüências de organismos desconhecidos para realização das análises filogenéticas. Calcularam-se as matrizes de distâncias evolutivas com o modelo de Kimura (1980) e realizou-se pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU e Nei, 1987) a construção da árvore filogenética a partir da distância evolutiva. Utilizou-se o pacote de análise Phlyip disponível no software MEGA 2.1 (KUMAR et. al, 2001).

### **3.6 Metodologia de Superfície de Respostas**

A metodologia de superfície de resposta (ou RSM, de *Response Surface methodology*) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G.E.P. Box na década de 50 e que desde de então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS et. al, 2001).

A metodologia de superfície de resposta tem duas etapas distintas – modelagem e deslocamento -, que são repetidas quantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é realizada ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou com planejamentos fatoriais ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS et. al, 2001).

Quando se estuda a influência de dois ou mais parâmetros na determinação de

uma grandeza, a simples variação de um parâmetro mantendo o outro fixo e vice-versa, não avalia a interação de dois fatores na resposta. Diante disso, pesquisadores, com conhecimentos estatísticos, estabeleceram metodologias de planejamento experimental de forma a minimizar a quantidade de experimentos necessários para avaliar a influência de fatores (variáveis independentes) numa determinada resposta (variáveis dependentes).

Este método consiste em realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Como primeira etapa, normalmente é utilizado um planejamento fatorial de dois níveis (nível inferior e nível superior) para cada variável. Assim, para  $n$  variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é de  $2^n$ . A aplicação do planejamento de experimentos supõe que os erros experimentais são independentes e constantes em toda a região; geralmente são feitos três ensaios no ponto central (nível 0) para permitir o cálculo do erro puro. Uma das vantagens de incluir este ponto é que, replicando-o, pode-se obter o desvio padrão dos experimentos e a partir deste dado, pode-se calcular o desvio padrão dos efeitos.

O desvio padrão dos experimentos utilizando o ponto central é calculado pela seguinte equação:

$$S_{\text{exp}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1} \quad (5)$$

Onde  $S_{\text{exp}}^2$  é o desvio padrão dos experimentos no ponto central,  $n$  é o número de experimentos executados no ponto central,  $y_i$  representa o resultado do experimento  $i$  e  $\bar{y}$  é a média dos resultados dos experimentos.

A variância dos efeitos é dada por:

$$S_{\text{efeito}}^2 = \frac{4 * S_{\text{exp}}^2}{N} \quad (6)$$

Onde  $N$  representa o número de coeficientes do modelo.

Se o modelo linear não apresentar uma boa correlação com os dados experimentais é possível adicionar ao planejamento fatorial inicial pontos axiais resultando no

planejamento fatorial chamado “estrela”, a fim de se obter o modelo de 2ª. ordem (quadrático).

O cálculo dos valores codificados nos pontos axiais dos ensaios do planejamento “estrela” é obtido pela seguinte expressão:

$$\alpha = (2^n)^{1/4}, \text{ onde } n \text{ é igual ao número de variáveis independentes estudadas.}$$

O método mais utilizado para avaliar a qualidade do ajuste de um modelo é a Análise da Variância (ANOVA) do planejamento experimental, apresentada na Tabela 9. Esta tabela fornece os dados para calcular a falta de ajuste.

**Tabela 9** - Tabela ANOVA para o planejamento experimental com pontos centrais.

Fonte de Variação	Soma Quadrática SQ	Graus de liberdade GI	Média Quadrática MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub> *
Regressão (R)	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{ni} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p-1	$MQ_R = SQ_R / (p-1)$	$F = \frac{MQ_R}{MQ_r}$	$F_{p-1, n-p}$
Resíduos (r)	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_i - \hat{y}_i)^2$	n-p	$MQ_r = SQ_r / (n-p)$		
Falta de ajuste (FA)	$SQ_{FA} = \sum_i^m \sum_j^{ni} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m-p	$MQ_{FA} = SQ_{FA} / (m-p)$	$F = \frac{MQ_{FA}}{MQ_{EP}}$	$F_{m-p, n-1}$
Erro puro (EP)	$SQ_{EP} = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n-m	$MQ_{EP} = SQ_{EP} / (n-m)$		
Total (T)	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_{ij} - \bar{y})^2$	n-1			

(\*) F<sub>tabelado</sub> com % de confiança escolhida (usualmente 95 %).

$$\% \text{ de variação explicada} = SQ_R / SQ_T$$

$$\% \text{ máxima de variação explicável} = (SQ_T - SQ_{EP}) / SQ_T$$

onde:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r, \quad SQ_r = SQ_{FA} + SQ_{EP},$$

p é o número de parâmetros do modelo,

$n$  é número total de observações,

$m$  é o número de variáveis distintas,

$\bar{y}$  é a média global,

$\hat{y}_i$  é valor previsto do modelo,

$y_i$  é o valor observado,

$\bar{y}_i$  é media das respostas observadas no nível  $i$ ,

$(\hat{y}_i - \bar{y})$  representa o afastamento da previsão do modelo para o ponto questão,  $\hat{y}_i$ , em relação a média,

$(y_i - \hat{y}_i)$  é a diferença entre o valor observado e o valor previsto,

$(\hat{y}_i - \bar{y}_i)$  depende do modelo e será tanto maior quanto mais estimativas para um dado nível,  $\hat{y}_i$ , se afastarem do valor médio das respostas determinadas nesse nível,  $\bar{y}_i$ . Este termo fornece uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas.

Para analisar se os modelos empíricos obtidos através da regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, pode-se usar um teste F da razão  $MQ_{FA}/MQ_{EP}$ . Valores altos de  $MQ_{FA}/MQ_{EP}$  significam falta de ajuste do modelo, o valor desta razão deve ser menor do que o valor do ponto da distribuição F tabelado, com seus respectivos graus de liberdade e nível de significância desejado.

Através da realização do teste F, ou seja, comparando o valor estimado para F a partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência, é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O fundamento do teste F consiste em verificar se existe ou não relação entre as variáveis e a resposta. Segundo BARROS NETO et al. (2001), quando não há relação entre a resposta e a variável, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (falta de ajuste mais erro puro)  $MQ_R/MQ_r$  segue uma distribuição F (hipótese nula). Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi exclusivamente devido a fatores

aleatórios. A hipótese nula pode ser testada comparando o valor efetivamente calculado para  $MQ_R/MQ_r$  com o valor de F tabelado. Se as variações nas respostas observadas experimentais apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para duvidar da hipótese nula.

Por outro lado, se a razão  $MQ_R/MQ_r$  for maior que F tabelado, pode-se afirmar que a equação é estatisticamente significativa e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto. Deste modo BARROS NETO et al. (1995), sugerem que, para que a regressão seja estatisticamente significativa e preditiva, o valor da razão  $MQ_R/MQ_r$  deve ser no mínimo 3 a 5 vezes superior ao valor de F tabelado.

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre a resposta, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo algébrico simples, correlacionando as variáveis e as respostas. Estes efeitos são calculados segundo a Equação 4:

$$Efeito = \frac{\sum \text{respostas para nível (+1)} - \sum \text{respostas para nível (-1)}}{\text{número de respostas no nível (+1)}} \quad (7)$$

Quanto maior o valor absoluto do efeito, maior será a influência na resposta. Este tipo de análise pode ser realizado porque os efeitos são independentes entre si. Isto é garantido graças à propriedade chamada de ortogonalidade. Em alguns casos os efeitos são tão grandes que se pode considerar o fator como importante. Em outros casos, os efeitos são tão pequenos que o fator poderá ser descartado.

Neste trabalho utilizou-se o software *Statística* versão 7.0 como ferramenta computacional para analisar o planejamento fatorial executado.

### **3.7 Métodos Analíticos**

#### **3.7.1 Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959)**

O método de Miller (1959), consiste na reação da amostra com o reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) a 100°C durante 5 minutos, sendo este um método

colorimétrico onde a concentração dos açúcares redutores após a reação com DNS é proporcional a absorbância no espectro visível a  $\lambda = 540 \text{ nm}$ .

Utilizou-se a proporção de 1ml de DNS para 1 ml da amostra adicionados a tubos de ensaio. Depois da reação colocaram-se os tubos em banho de gelo para resfriar e diluiu-se em 10 ml de água destilada. Após realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Determinaram-se as concentrações de açúcares na amostra utilizando uma curva padrão de concentrações conhecida de açúcar redutor versus absorbância (faixa de 0,2 a 2,0 g/l). Para construção da curva padrão, prepararam-se as soluções padrões em balão volumétrico de 10 ml utilizando solução de 10 g/l de glicose, nas seguintes concentrações: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 e 2.0. Retirou-se alíquotas de 1 ml de cada solução padrão e colocou-se para reagir com 1 ml de DNS. Aqueceu-se a mistura a 100°C por 5 minutos e resfriou-se posteriormente em banho de gelo. Após atingir a temperatura ambiente, diluiu-se a mistura com 10 ml de água destilada e realizou-se a leitura da absorbância. Assim, obteve-se pontos de concentrações conhecidas versus absorbância.

### **3.7.2 Determinação da atividade enzimática**

Realizou-se a determinação da atividade enzimática da dextrana-sacarase pela medida da velocidade inicial de liberação de frutose na síntese da dextrana em solução a 10% de sacarose. As condições padrão para o ensaio foram as descritas por Hehre (1955). Realizaram-se os experimentos em tubos de ensaios, nos quais adicionou-se: 4 ml de solução de 300 g/l de sacarose, 0,5 ml de solução estoque 20 mM de acetato de sódio com 1,2 g/l de cloreto de sódio e 6,5 ml de água destilada. Ajustou-se o pH antes do ensaio com solução de 1N hidróxido de sódio ou solução 1N de ácido clorídrico. Manteve-se a temperatura no ponto ótimo de cada enzima através de um banho termostatizado. Os valores de pH e temperatura ótima de cada linhagem foram determinados por Vieira (2003).

Iniciou-se a marcação de tempo, quando adicionou-se 1 ml do caldo enzimático ao tubo. Para obter dados cinéticos da liberação da frutose, retirou-se alíquotas de 1 ml com o auxílio de uma pipeta automática no tempo de 12 minutos. Colocou-se as alíquotas

amostradas em tubos contendo 1 ml de DNS e levou-se a banho-maria durante 5 min, para promover a inativação da enzima e a reação do reagente com açúcares redutores. Após resfriou-se e adicionou-se 10 ml de água destilada em cada tubo contendo o DNS (mesmo fator de diluição da curva de calibração). Homogeneizaram-se os tubos realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em um espectrofotômetro. Para cada amostra realizou-se três repetições.

Realizou-se o cálculo da atividade enzimática utilizando seguinte dedução:

Sabendo que,

$$UDS = \text{mg de sacarose consumida} / \text{hora} \quad (8)$$

Sendo  $UDS = \text{mg de frutose produzida} / (0,52 \text{ mg de frutose} / \text{mg de sacarose})$

Logo a equação (8), torna-se,

$$UDS = \frac{\left( \frac{\text{mg de frutose} * 60 \text{ min}}{\text{min}} * \frac{1}{\text{hora}} \right)}{0,52} \quad (9)$$

Da curva padrão temos,

$$\text{Massa de açúcares redutores (mg)} = \alpha \cdot \text{ABS} \quad (10)$$

E da curva do ensaio temos,

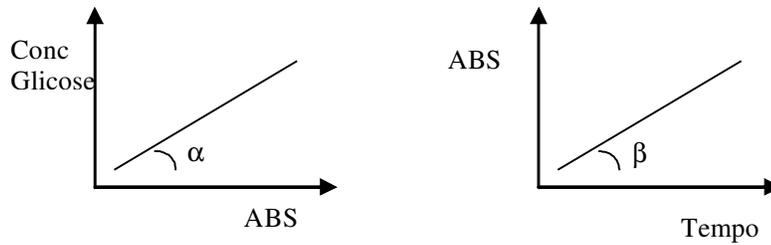
$$\text{ABS} = \beta \cdot t \text{ (min)} \quad (11)$$

Substituindo as Equações 10 e 11 na Equação 9, obtemos

$$UDS = \frac{\left( \frac{\text{mg de açúcar redutor} * \text{ABS} * 60 \text{ min}}{\text{ABS} * \text{min}} * \frac{1}{\text{hora}} \right)}{0,52} = \frac{(\alpha * \beta * 60)}{0,52} \quad (12)$$

Multiplicando pela diluição (d) do caldo, logo a atividade enzimática será calculada pela seguinte equação

$$UDS / ml = \frac{\alpha \cdot \beta \cdot 60 \cdot d}{0,52} \quad (13)$$



**Figura 5** - Gráficos da curva padrão e curva do ensaio.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Otimização da produção de dextrana –sacarase

Para determinar a composição do meio de fermentação de máxima atividade enzimática, realizaram-se experimentos utilizando a técnica de planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis com três repetições do ponto central (BARROS et. al., 2001).

#### 4.1.1 Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase utilizando a linhagem 4-03

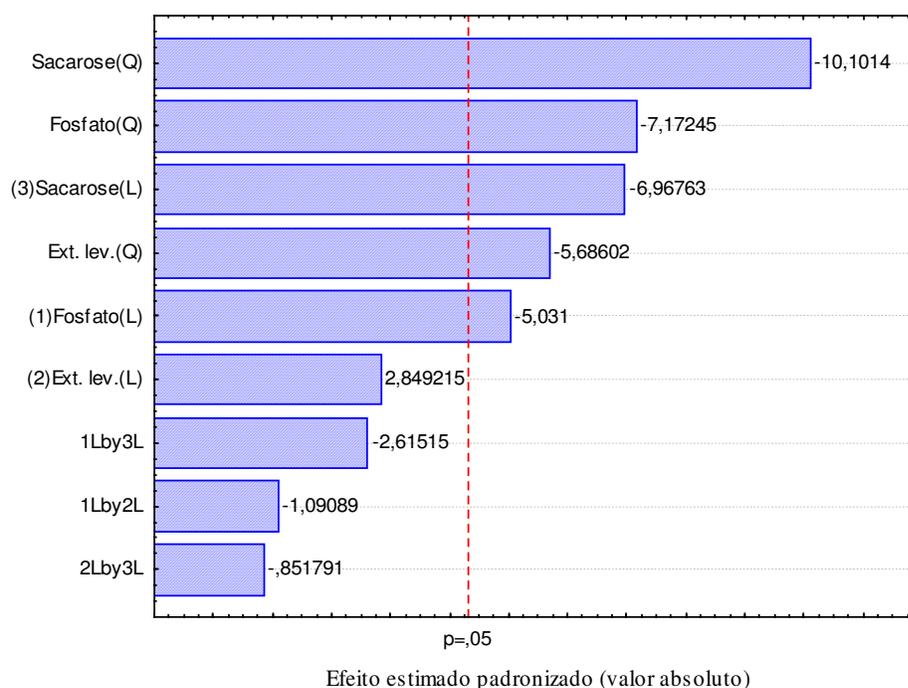
Utilizou-se a ferramenta estatística de planejamento de experimentos para otimizar o meio de fermentação para a produção da enzima dextrana-sacarase da linhagem 4-03. A Tabela 10 mostra a matriz do planejamento fatorial em configuração estrela para três variáveis, tendo como variável resposta a atividade enzimática da dextrana-sacarase.

**Tabela 10** – Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-03.

Ensaio	Sacarose	Extrato de Levedura	Fosfato	Atividade Enzimática (UDS)
--------	----------	---------------------	---------	----------------------------

1	-1	-1	-1	62,47
2	-1	-1	+1	70,39
3	-1	+1	-1	84,15
4	-1	+1	+1	86,33
5	+1	-1	-1	62,47
6	+1	-1	+1	51,11
7	+1	+1	-1	76,58
8	+1	+1	+1	57,88
9	-1,682	0	0	123,21
10	+1,682	0	0	96,08
11	0	-1,682	0	116,85
12	0	+1,682	0	116,04
13	0	0	-1,682	131,87
14	0	0	+1,682	60,63
15	0	0	0	116,96
16	0	0	0	124,76
17	0	0	0	114,32

A Figura 6 apresenta o efeito estimado padronizado de cada termo do modelo empírico.



**Figura 6** - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-03 sobre a variável resposta.

Sendo  $p$  igual a 0,05 a probabilidade de significância.

Pela Figura 6, pode-se observar que o gráfico de pareto está dividido em duas

áreas pela linha tracejada. As barras que passaram pela linha tracejada e atingiram a área que está a direita, foram as variáveis que influenciaram de forma significativa nos resultados da otimização da composição do meio de fermentação para produção da dextrana-sacarase. O termo do efeito linear do extrato de levedura e as interações dos efeitos das variáveis estudadas não foram estatisticamente significativos para o intervalo de confiança de 95%.

Realizou-se a análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial em configuração estrela com o intuito de verificar se o modelo obtido é válido para a faixa de estudo considerada. A Tabela 11 apresenta a análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial em configuração estrela para três variáveis.

**Tabela 11** - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de enzima da linhagem 4-03.

	<b>Soma Quadrática (SQ)</b>	<b>Número de Grau de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática (MQ)</b>	<b>F Calculado</b>	<b>F Tabelaado *</b>
Regressão	6350,18	9	705,58	0,827	3,68
Resíduos	5974,58	7	853,51		
Falta de Ajuste	5915,65	5	1183,13	40,154	19,30
Erro Puro	58,93	2	29,47		
Total	12324,76	16			

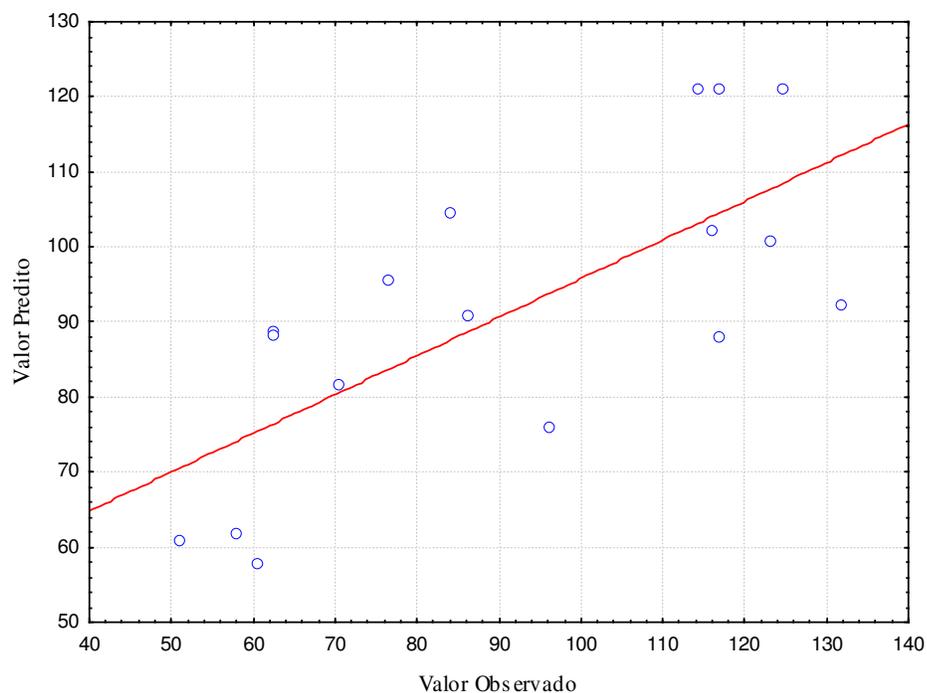
\*95% de confiança

$$R^2 = 0,5152$$

% de máxima variação explicada = 99,52

Para esta linhagem, no nível de confiança de 95%, calculou-se o valor de  $F \left( \frac{MQ_{REG}}{MQ_{RES}} \right)$  que foi cerca de 4 vezes menor do que o  $F_{0,95; 9,7}$  tabelado e o valor de  $F \left( \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \right)$  que foi cerca de 2 vezes maior que o  $F_{0,95; 5,2}$  tabelado, indicando que o modelo não é significativo e apresenta falta de ajuste. Além disso, através do valor do  $R^2$ , observa-se que a porcentagem de variação explicada pelo modelo está próxima de 52%, confirmando que o modelo para a

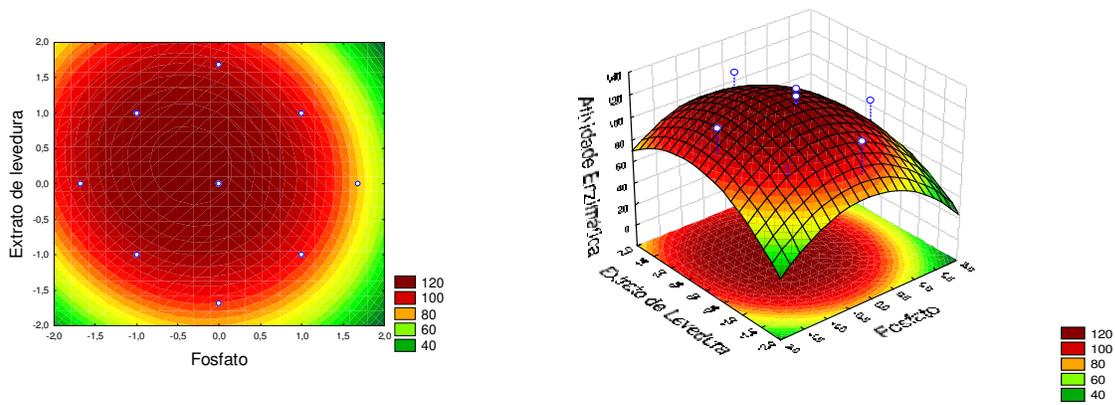
linhagem em questão não foi estatisticamente significativo. A pouca precisão do modelo pode ser visualizada na Figura 7, onde estão apresentados os valores observados experimentalmente plotados contra os valores previsto pelo modelo obtido.



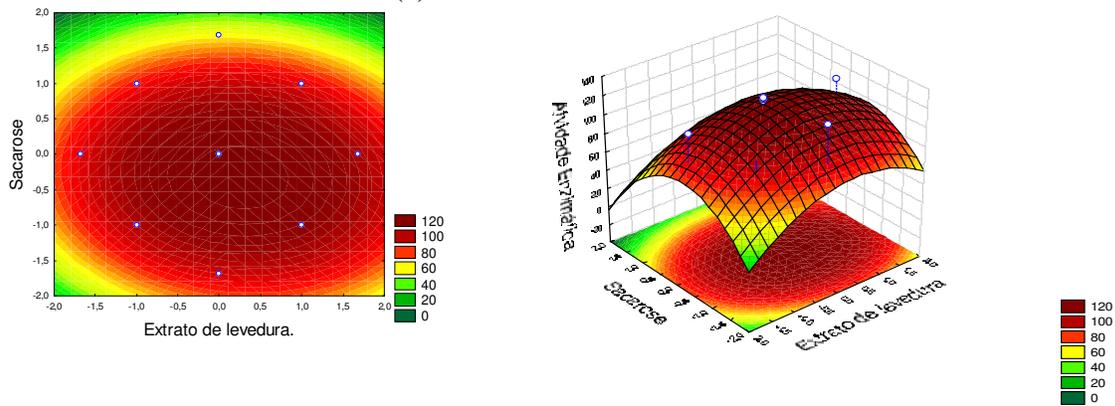
**Figura 7** - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-03 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização.

Observa-se pela Figura 7 que os dados gerados pelo modelo não se ajustaram de forma satisfatoriamente os dados experimentais. Portanto, o modelo empírico obtido para esta linhagem não pode ser considerado para a previsão da composição do meio de fermentação para a máxima produção desta enzima.

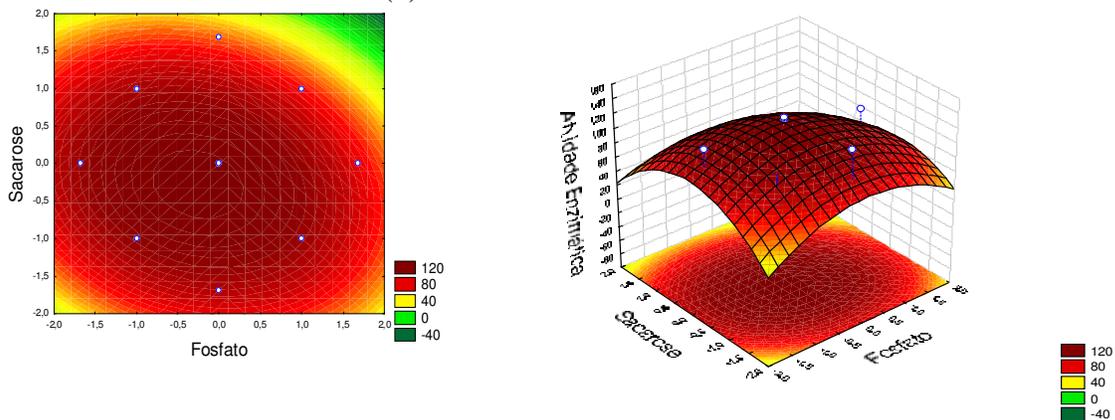
A Figura 8 mostra as superfícies de resposta e curvas de níveis do modelo codificado obtido para a linhagem 4-03, com seus respectivos valores experimentais.



(a) Extrato de levedura e fosfato



(b) Sacarose e extrato de levedura



(c) Sacarose e fosfato

**Figura 8** - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-03 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.

Nota-se pela Figura 8 que a máxima atividade enzimática foi obtida quando as variáveis estudadas estavam no ponto central. Portanto, o meio utilizado para esta linhagem

é a composição do ponto central.

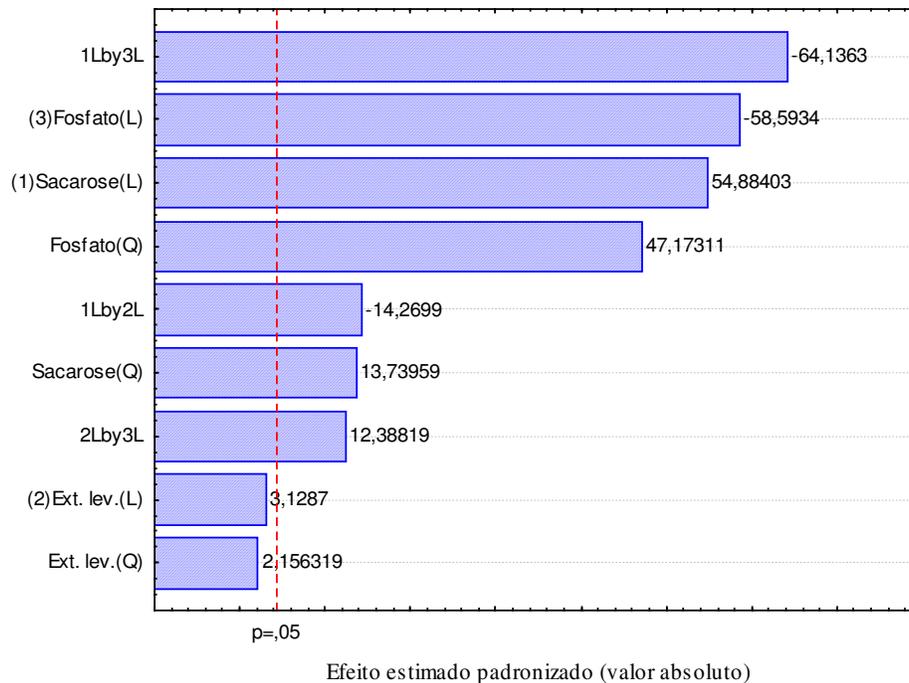
#### **4.1.2 Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase utilizando a linhagem 4-26**

Para otimizar o meio de fermentação para a produção da enzima dextrana-sacarase da linhagem 4-26, realizaram-se ensaios utilizando a metodologia de planejamento fatorial ampliado em configuração estrela. A Tabela 12 mostra a matriz do planejamento fatorial e as respostas dos ensaios de otimização.

**Tabela 12** – Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-26.

<b>Ensaio</b>	<b>Sacarose</b>	<b>Extrato de Levedura</b>	<b>Fosfato</b>	<b>Atividade Enzimática (UDS)</b>
<b>1</b>	-1	-1	-1	14,41
<b>2</b>	-1	-1	+1	21,98
<b>3</b>	-1	+1	-1	18,26
<b>4</b>	-1	+1	+1	35,13
<b>5</b>	+1	-1	-1	72,72
<b>6</b>	+1	-1	+1	24,77
<b>7</b>	+1	+1	-1	63,29
<b>8</b>	+1	+1	+1	27,03
<b>9</b>	-1,682	0	0	22,11
<b>10</b>	+1,682	0	0	26,06
<b>11</b>	0	-1,682	0	24,11
<b>12</b>	0	+1,682	0	22,37
<b>13</b>	0	0	-1,682	66,74
<b>14</b>	0	0	+1,682	25,17
<b>15</b>	0	0	0	22,38
<b>16</b>	0	0	0	23,04
<b>17</b>	0	0	0	23,57

A Figura 9 mostra o efeito estimado padronizado de cada uma das variáveis estudada bem como a interação entre elas.



**Figura 9-** Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-26 sobre a variável resposta.

Observa-se pela Figura 9 que os efeitos significativos no intervalo de confiança de 95% foram os termos de interação entre a concentração de sacarose e a concentração de fosfato, os termos lineares da concentração de fosfato e de sacarose e o termo quadrático de sacarose. O efeito devido aos termos de concentração de extrato de levedura não foi significativo. O efeito da concentração de sacarose foi positivo tanto para o termo linear quanto para o quadrático.

O modelo codificado utilizado para gerar as superfícies de resposta foi:

$$\text{Atividade} = 4,9014 S^2 + 17,7895 S + 0,7691 E^2 + 1,0142 E + 16,8289 F^2 - 18,9920 F - 6,0430 SE - 27,1615 SF + 5,2465 EF + 22,9120$$

Onde S representa a variável codificada, concentração de sacarose, E representa a variável codificada, concentração de extrato de levedura e F representa a variável codificada, concentração de fosfato.

A Tabela 13 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para os ensaios de otimização do meio de produção de dextrana-sacarase para a linhagem 4-26.

**Tabela 13** - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de enzima da linhagem 4-26.

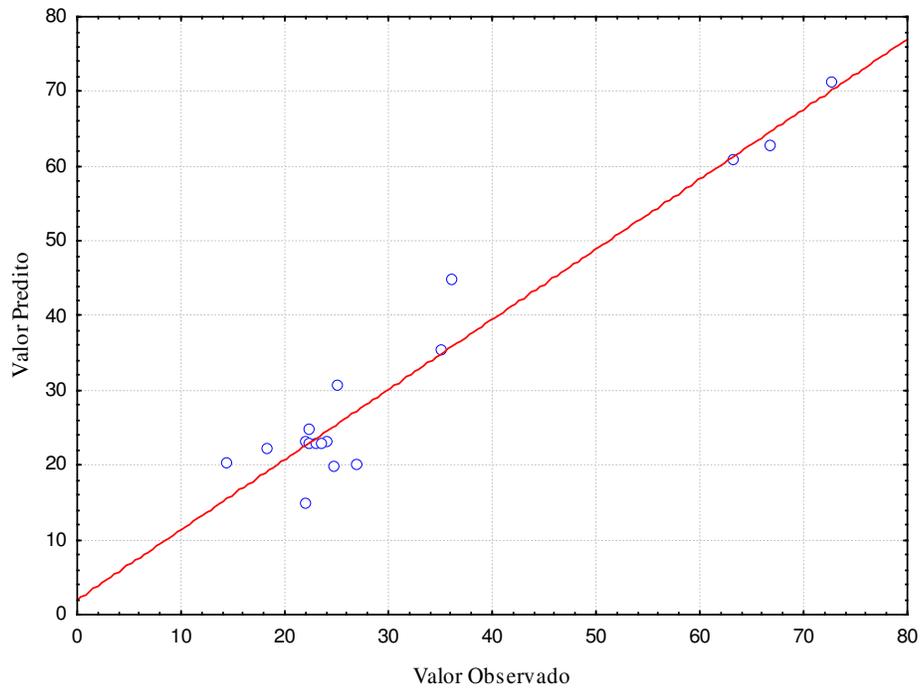
	<b>Soma Quadrática (SQ)</b>	<b>Número de Grau de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática (MQ)</b>	<b>F Calculado</b>	<b>F Tabelado*</b>
Regressão	4767,90	9	529,77	11,565	3,68
Resíduos	320,65	7	45,81		
Falta de Ajuste	313,476	5	62,70	17,488	19,30
Erro Puro	7,170	2	3,59		
Total	5088,550	16			

\*95% de confiança

$$R^2 = 0,9370$$

% de máxima variação explicada = 99,86

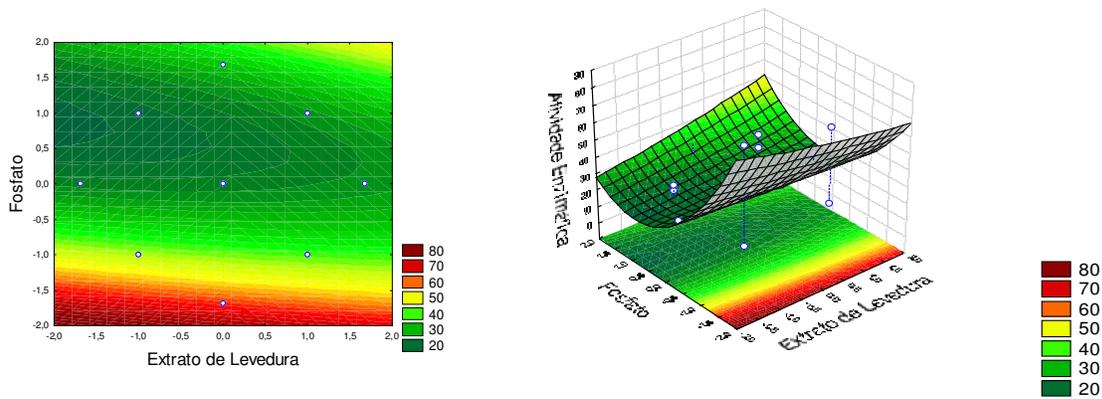
No caso da linhagem 4-26, a porcentagem de variação explicada pelo modelo é alta, maior que 93% . Obteve-se que o valor de  $F \left( \frac{MQ_{REG}}{MQ_{RES}} \right)$  foi 3 vezes maior que o valor tabelado de  $F_{0,95; 9,7}$  a 95% de confiança e o que o valor de  $F \left( \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \right)$  foi menor que o valor tabelado de  $F_{0,95; 5,2}$  . Devido a este fato, pode-se afirmar que o modelo obtido foi significativo e que se ajustou aos dados experimentais. Esta precisão pode ser confirmada através da Figura 10, onde são apresentados os valores observados experimentalmente plotados contra os valores previsto pelo modelo obtido.



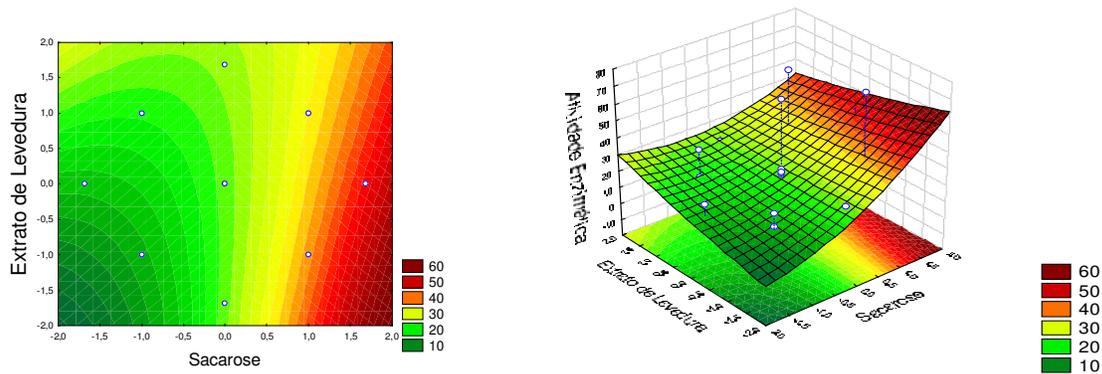
**Figura 10** - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-26 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização.

Observa-se pela Figura 10 que o resultado gerado pelo modelo empírico mostrou bom ajuste com os dados experimentais. Logo, o modelo empírico pode ser utilizado para prever a composição do meio de fermentação para produção da dextrana-sacarase obtida por esta linhagem.

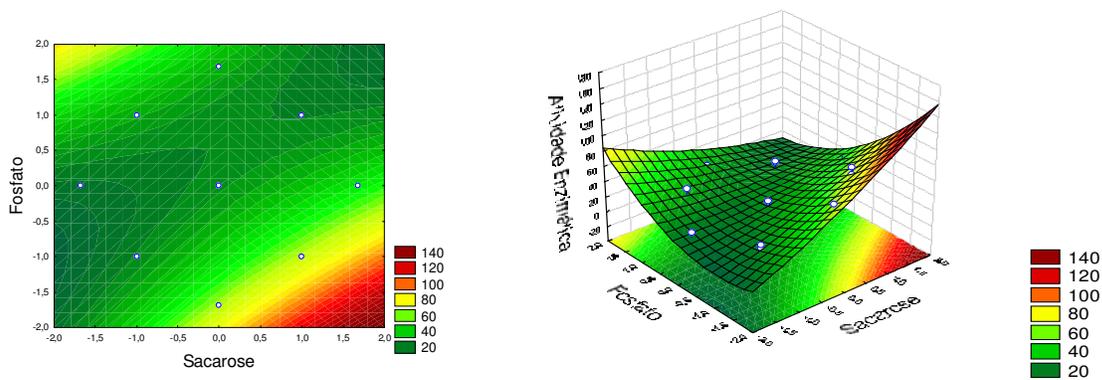
A Figura 11 mostra as superfícies de resposta e curvas de níveis do modelo codificado obtido para a linhagem 4-26, com seus respectivos valores experimentais.



(a) Extrato de levedura e fosfato



(b) Sacarose e extrato de levedura



(c) Sacarose e fosfato

**Figura 11** - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-26 em função da a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.

Observa-se pela Figura 11, que a concentração de extrato de levedura não interfere significativamente na produção da dextrana-sacarase. No entanto, um aumento na concentração de sacarose mostrou um efeito positivo sobre a produção de enzima, fato que também foi confirmado pela Figura 9.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 11 e modelo obtido ser estatisticamente significativo, determinou-se que o meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase encontra-se otimizado utilizando a seguinte composição: 66,73 g/l de concentração de sacarose, 19,98 g/l de concentração de extrato de levedura e 5,05 g/l de concentração de fosfato de potássio dibásico.

#### **4.1.3 Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase utilizando a linhagem 4-30**

Realizaram-se dois planejamentos fatoriais ampliados em configuração estrela para esta linhagem, visto que no primeiro planejamento realizado obteve-se uma tendência de aumento de produção de enzima quando aumenta a concentração de sacarose e fosfato. Deslocou-se a área de estudo, com o objetivo de atingir o ponto de máximo, no sentido crescente da concentração de fosfato, tornando seu nível +1 em ponto central (0). Não alteraram-se os níveis de concentração de extrato de levedura, pois, esta não apresentou efeito significativo sobre a variável resposta. Devido esta linhagem apresentar uma elevada produção de goma em altas concentrações de sacarose, o que acarreta problemas na purificação da enzima, não alterou-se o valor da concentração de substrato. A Tabela 14 apresenta os novos valores das variáveis para o segundo planejamento da linhagem 4-30.

**Tabela 14** - Variáveis do planejamento experimental para a segunda batelada de ensaios da linhagem 4-30.

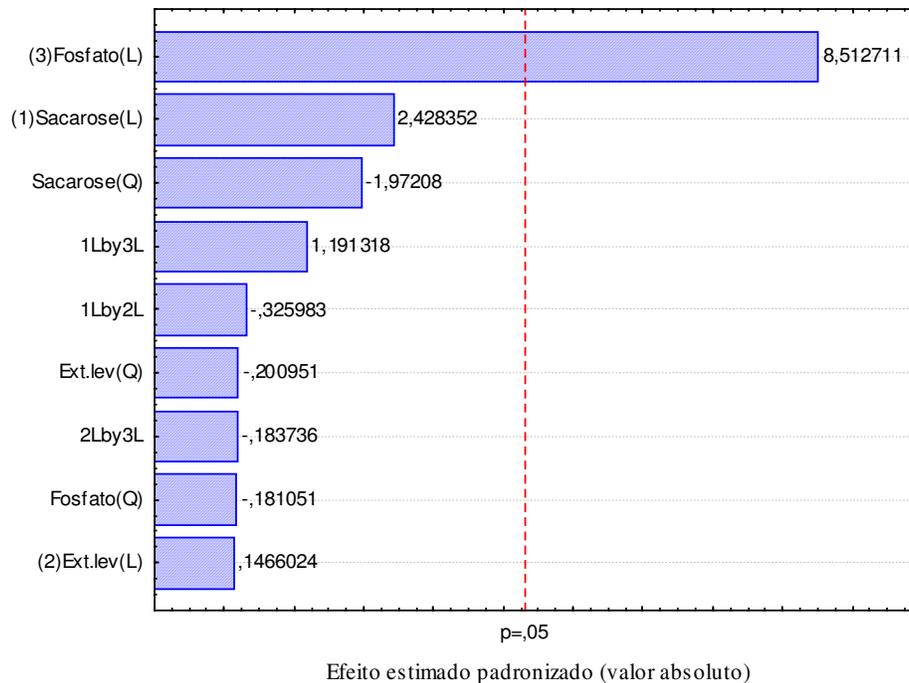
<b>Níveis</b>	<b>-1,682</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,682</b>
Concentração de sacarose (g/L)	33,2	40	50	60	66,8
Concentração de extrato de levedura (g/L)	11,6	15	20	25	28,4
Concentração de fosfato (g/L)	13,2	20	30	40	46,8

A Tabela 15 mostra a matriz do planejamento fatorial e as respostas dos ensaios de otimização.

**Tabela 15** - Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-30.

<b>Ensaio</b>	<b>Sacarose</b>	<b>Extrato de Levedura</b>	<b>Fosfato</b>	<b>Atividade Enzimática (UDS)</b>
<b>1</b>	-1	-1	-1	57,35
<b>2</b>	-1	-1	+1	85,24
<b>3</b>	-1	+1	-1	59,93
<b>4</b>	-1	+1	+1	86,19
<b>5</b>	+1	-1	-1	65,37
<b>6</b>	+1	-1	+1	107,41
<b>7</b>	+1	+1	-1	64,69
<b>8</b>	+1	+1	+1	104,15
<b>9</b>	-1,682	0	0	66,73
<b>10</b>	+1,682	0	0	78,57
<b>11</b>	0	-1,682	0	83,33
<b>12</b>	0	+1,682	0	86,19
<b>13</b>	0	0	-1,682	49,32
<b>14</b>	0	0	+1,682	120,47
<b>15</b>	0	0	0	75,99
<b>16</b>	0	0	0	91,63
<b>17</b>	0	0	0	87,55

A Figura 12 mostra o efeito estimado padronizado de cada variável estudada sobre a variável resposta e as interações entre as variáveis para o segundo planejamento realizado para esta linhagem.



**Figura 12** - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-30 sobre a variável resposta.

Observa-se, pelos resultados contido na Figura 12, que o único efeito significativo sobre a variável resposta no intervalo de confiança de 95%, é o termo linear da concentração de fosfato. Nenhum termo de interação foi significativo, indicando que não existe dependência entre as variáveis estudadas. As variáveis que correspondem a concentração de sacarose e de extrato de levedura não apresentaram efeito significativo sobre a produção de enzima nesta faixa estudada.

O modelo codificado utilizado para gerar as superfícies de resposta foi:

$$\text{Atividade} = - 3,9101 S^2 + 17,0220 S - 8,7368 E^2 + 1,6520 E - 1,7124 F^2 + 39,4859 F + 2,6083 SE + 5,4393 SF + 3,7183 EF + 61,7722$$

Onde S representa a variável codificada, concentração de sacarose, E representa a variável codificada, concentração de extrato de levedura e F representa a variável codificada, concentração de fosfato.

A Tabela 16 mostra os resultados da análise de variância para o segundo ensaio de otimização do meio de produção de dextrana sacarase para a cepa 4-30.

**Tabela 16** - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de enzima da linhagem 4-30.

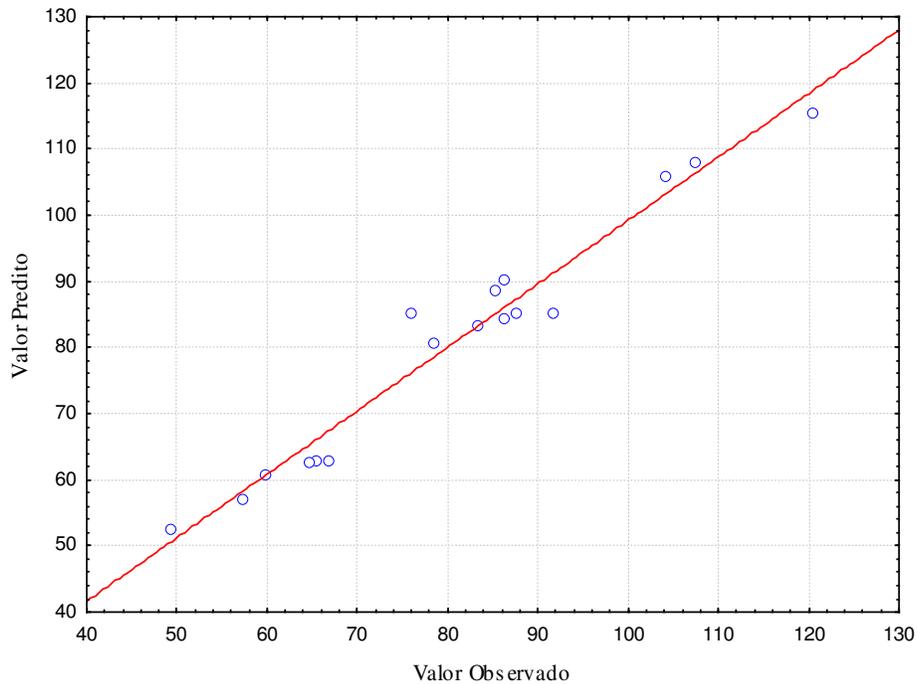
	<b>Soma Quadrática (SQ)</b>	<b>Número de Grau de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática (MQ)</b>	<b>F Calculado</b>	<b>F Tabelaado*</b>
Regressão	5539,76	9	615,53	18,402	3,68
Resíduos	234,15	7	33,45		
Falta de Ajuste	102,415	5	20,48	0,311	19,30
Erro Puro	131,731	2	65,87		
Total	5773,902	16			

\*95% de confiança

$$R^2 = 0,9594$$

% de máxima variação explicada = 97,72

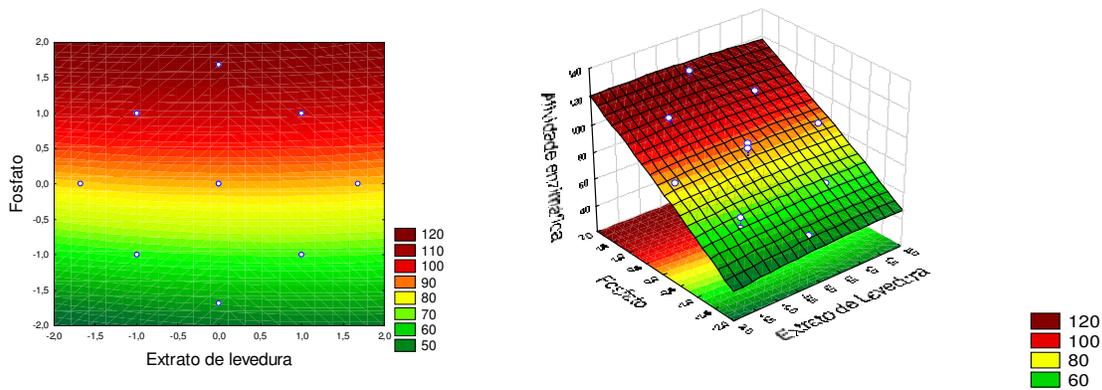
Para esta linhagem, a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de 97,72%. O valor de  $F \left( \frac{MQ_{REG}}{MQ_{RES}} \right)$  foi de 18,402, 5 vezes maior do que o valor tabelado de  $F_{0,95; 9,7}$  (3,68) a 95% de confiança e  $F \left( \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \right)$  foi de 0,31098, sendo este valor menor que o valor tabelado de  $F_{0,95; 5,2}$  (19,30). Com isso, pode-se confirmar a validade do modelo empírico obtido, sendo este possível de ser utilizado para a previsão da composição do meio de fermentação para produção da dextrana-sacarase. Esta boa precisão pode ser confirmada através da Figura 13, onde são apresentados os valores observados experimentalmente plotados contra os valores previsto pelo modelo obtido.



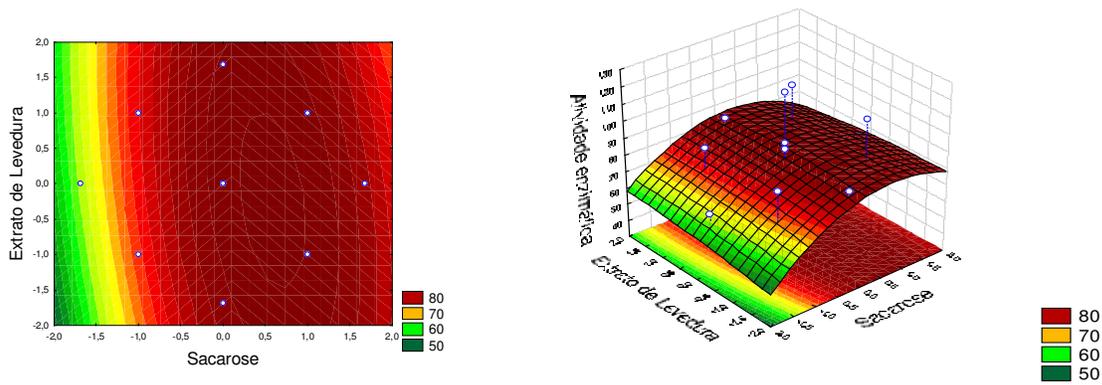
**Figura 13** - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-30 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização.

Assim como para a linhagem 4-26, os dados gerados pelo modelo empírico obtido para a linhagem 4-30 mostraram um bom ajuste aos dados experimentais, conforme mostrado pela figura 13.

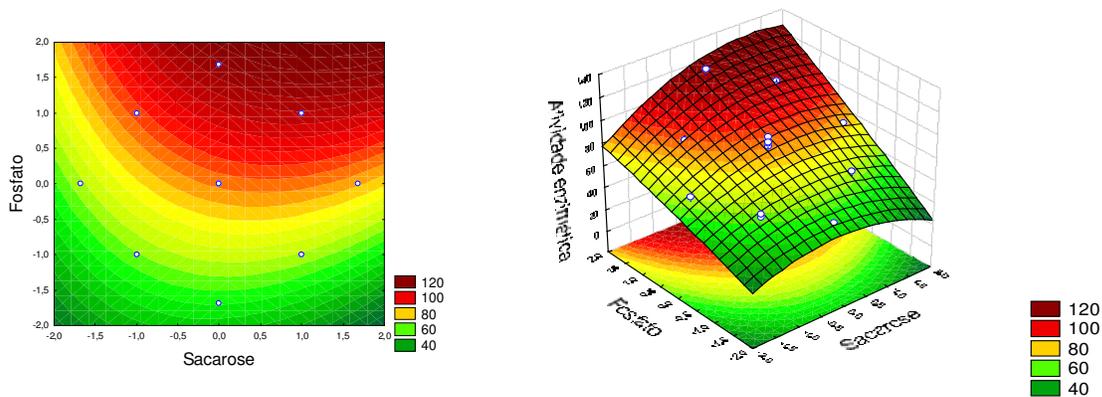
A Figura 14 mostra as superfícies de resposta e as curvas de níveis do modelo codificado obtido para a linhagem 4-30, com seus respectivos valores experimentais.



(a) Extrato de levedura e fosfato



(b) Sacarose e extrato de levedura



(c) Sacarose e fosfato

**Figura 14** - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-30 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.

Observa-se pela Figura 14 que a concentração de extrato de levedura e de sacarose não interfere significativamente na quantidade de enzima produzida. Já um aumento na concentração de fosfato no meio afeta positivamente a produção de enzima. Fato este que comprova a resultado apresentado na Figura 12.

De acordo com os resultados apresentados acima, como o bom ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais e com as superfícies de resposta mostrada na Figura 14, determinou-se que o meio de fermentação para produção de dextrana-sacarase encontra-se otimizado utilizando a seguinte composição: 49,55 g/l de concentração de sacarose, 20,03 g/l de concentração de extrato de levedura e 46,68 g/l de concentração de fosfato de potássio dibásico.

## **4.2 Otimização de meio para a produção de dextrana**

Utilizou-se a metodologia de planejamento fatorial em configuração estrela, descrita por Barros et. al.(2001), para determinar a composição do meio de fermentação de máxima produção dextrana em relação ao substrato.

### **4.2.1 Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana**

#### **utilizando a linhagem 4-03**

Para otimizar o meio de fermentação da produção de enzima dextrana-sacarase da linhagem 4-03, utilizou-se a ferramenta estatística de planejamento de experimentos.

Após exaustivas tentativas de otimizar o meio de fermentação utilizando a linhagem 4-03, observou-se que nos frascos dos ensaios que continham as maiores concentrações de fosfato de potássio dibásico, não apresentavam nenhuma formação de goma depois de 20 horas de fermentação, mas houve um início de produção de goma nos frascos pertencentes aos ensaios que continham as menores concentrações de fosfato. Devido a este fato alterou-se os níveis da variável correspondente a concentração de fosfato. A Tabela 17 apresenta os novos valores da concentração de fosfato para o segundo planejamento da linhagem 4-03.

**Tabela 17** - Variáveis do planejamento experimental para a segunda batelada de ensaios da linhagem 4-03.

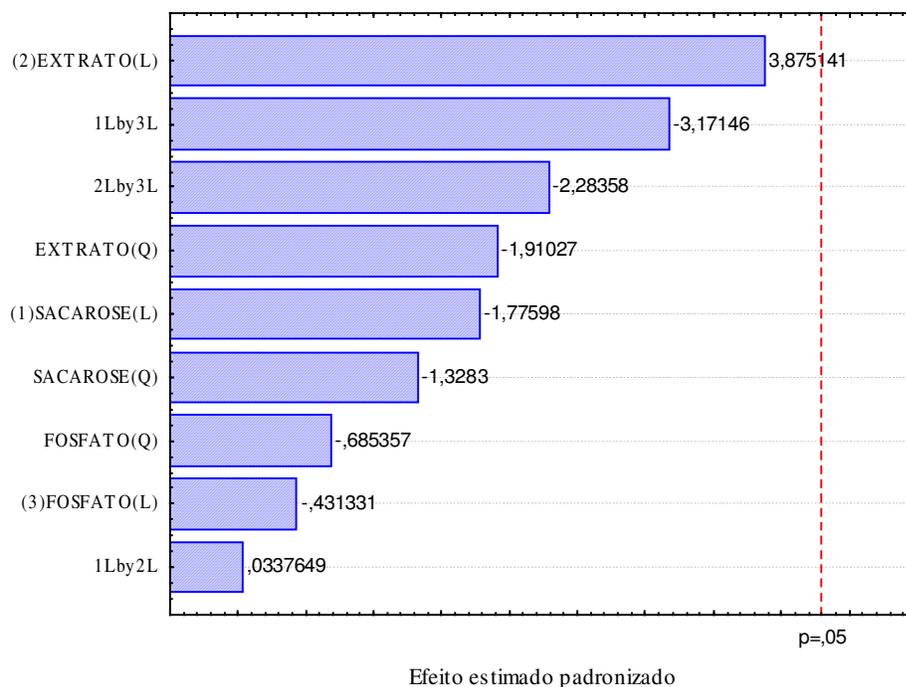
<b>Níveis</b>	<b>-1,682</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,682</b>
Concentração de sacarose (g/L)	116,4	130	150	170	183,6
Concentração de extrato de levedura (g/L)	11,6	15	20	25	28,4
Concentração de fosfato (g/L)	0,795	2,5	5,0	7,5	9,2

A Tabela 18 mostra a matriz do planejamento fatorial em configuração estrela para três variáveis, tendo como variável resposta o rendimento do produto em relação ao substrato ( $Y_{P/S}$ ).

**Tabela 18** - Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-03.

<b>Ensaio</b>	<b>Sacarose</b>	<b>Extrato de Levedura</b>	<b>Fosfato</b>	<b>Yp/s</b>
<b>1</b>	-1	-1	-1	0,350
<b>2</b>	-1	-1	+1	0,428
<b>3</b>	-1	+1	-1	0,427
<b>4</b>	-1	+1	+1	0,404
<b>5</b>	+1	-1	-1	0,411
<b>6</b>	+1	-1	+1	0,363
<b>7</b>	+1	+1	-1	0,452
<b>8</b>	+1	+1	+1	0,375
<b>9</b>	-1,682	0	0	0,450
<b>10</b>	+1,682	0	0	0,376
<b>11</b>	0	-1,682	0	0,349
<b>12</b>	0	+1,682	0	0,457
<b>13</b>	0	0	-1,682	0,413
<b>14</b>	0	0	+1,682	0,436
<b>15</b>	0	0	0	0,407
<b>16</b>	0	0	0	0,447
<b>17</b>	0	0	0	0,431

A Figura 15 apresenta o efeito estimado padronizado de cada termo do modelo empírico.



**Figura 15** - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-03 sobre a variável resposta.

Observa-se pela Figura 15 que nenhuma variável apresentou efeito significativo sobre a produção de dextrana na faixa estudada para o intervalo de confiança de 95%, pois todas as barras do gráfico de pareto mostrado na Figura 13 não atingiram a área que está à direita da linha tracejada.

A Tabela 19 mostra os resultados da análise de variância para os ensaios de otimização do meio de produção de dextrana para a linhagem 4-03.

**Tabela 19** - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de dextrana da linhagem 4-03.

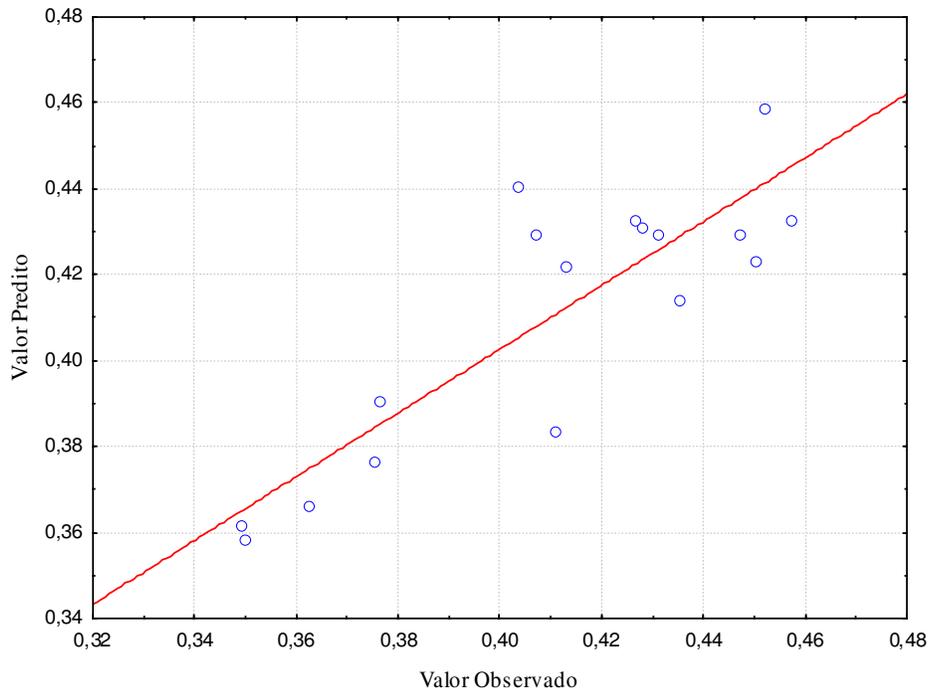
	<b>Soma Quadrática (SQ)</b>	<b>Número de Grau de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática (MQ)</b>	<b>F Calculado</b>	<b>F Tabelado*</b>
Regressão	0,0153216	9	0,0017024	2,238	3,68
Resíduos	0,0053252	7	0,0007607		
Falta de Ajuste	0,0045172	5	0,0009034	2,236	19,30
Erro Puro	0,0008080	2	0,0004040		
Total	0,0206468	16			

\*95% de confiança

$$R^2 = 0,7421$$

% de máxima variação explicada = 96,09

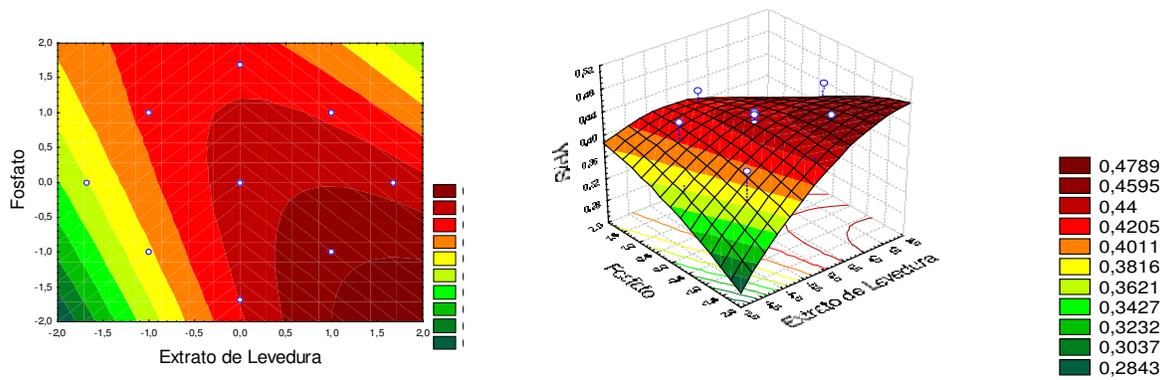
O modelo em estudo obteve um valor de  $R^2$  igual a 0,74208, o que significa que somente 74,20% das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico. O valor obtido de  $F \left( \frac{MQ_{REG}}{MQ_{RES}} \right)$  foi de 2,238, menor que o valor  $F_{0,95; 9,7}$  (3,68) tabelado no intervalo de 95% de confiança, assim o modelo para esta linhagem não é estatisticamente significativo. O valor obtido para  $F \left( \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \right)$ , que é 11 vezes menor que o valor tabelado de  $F_{0,95; 9,7}$  a 95% de confiança, indica que o modelo está bem ajustado aos dados experimentais. A pouca precisão do modelo pode ser visualizada na Figura 16, onde são apresentados os valores observados experimentalmente plotados contra os valores previsto pelo modelo obtido.



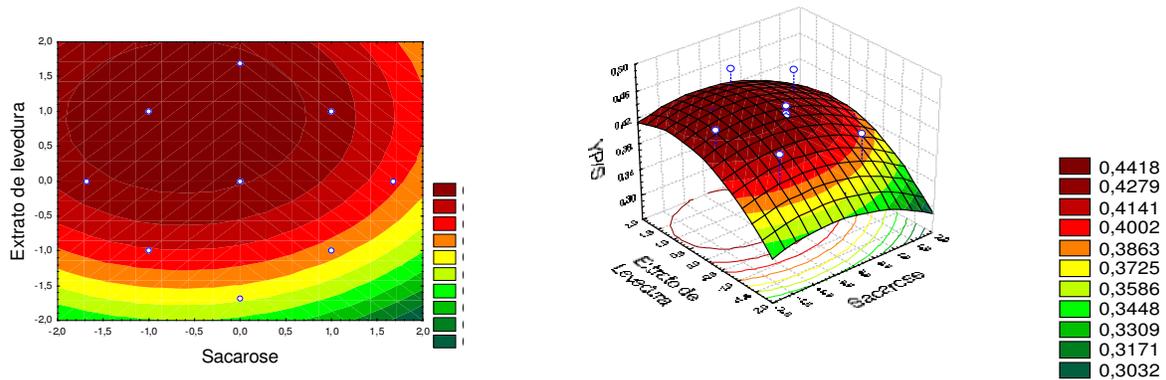
**Figura 16** - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-03 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização.

Observa-se pelos dados contidos na Figura 16 que os resultados gerados pelo modelo empírico obtido para a linhagem 4-03 não se ajustam adequadamente aos dados experimentais, observando um afastamento dos pontos da reta diagonal.

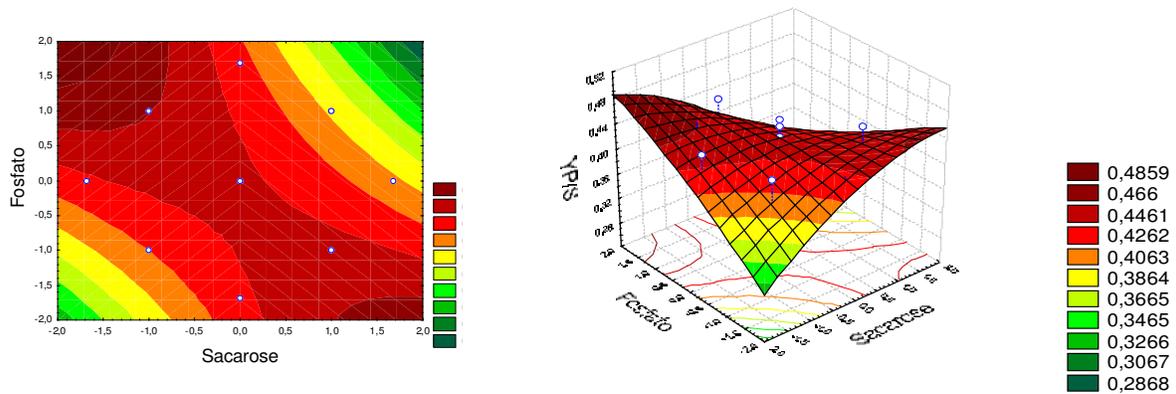
A Figura 17 mostra as superfícies de resposta e as curvas de níveis do modelo codificado obtido para a linhagem 4-03, com seus respectivos valores experimentais.



(a) Extrato de levedura e fosfato



(b) Sacarose e extrato de levedura



(c) Sacarose e fosfato

**Figura 17** - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-03 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.

Observa-se na Figura 17 que nenhuma variável na faixa estudada apresenta efeito significativo na produção da dextrana, confirmando os dados apresentados na Figura 13.

A análise estatística dos resultados mostra que o modelo não é significativo e pelas Figuras 15 e 17 nota-se que nenhuma das variáveis nas faixas estudadas influenciou

significativamente no rendimento em dextrana. Portanto o meio utilizado para esta linhagem é a composição do ponto central.

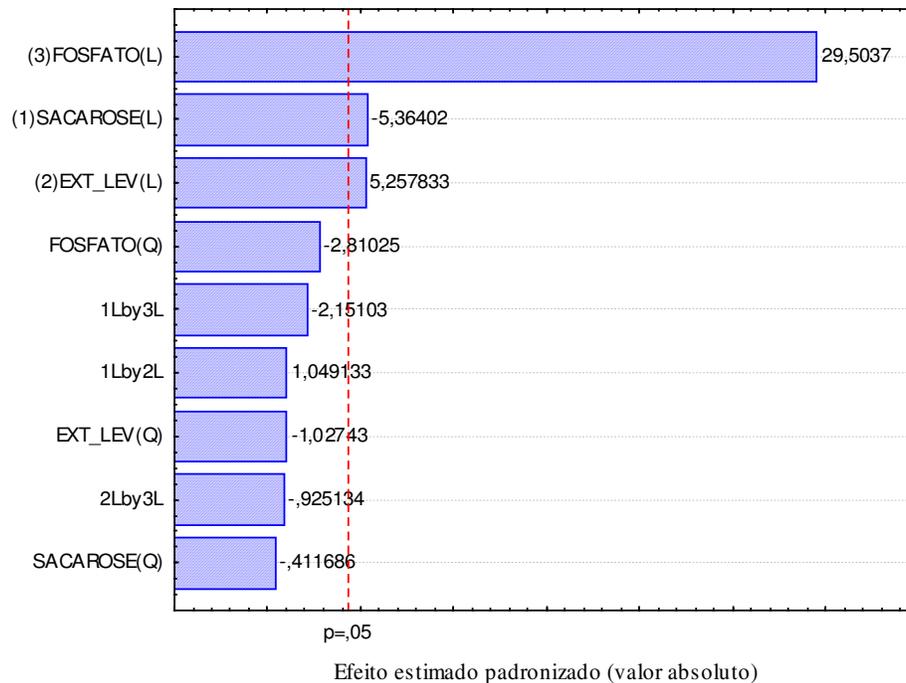
#### 4.2.2 Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana utilizando a linhagem 4-26

Realizaram-se ensaios utilizando a metodologia de planejamento fatorial ampliado em configuração estrela, para otimizar o meio de fermentação para a produção de dextrana utilizando a linhagem 4-26. A Tabela 20 apresenta a matriz do planejamento fatorial e as respostas dos ensaios de otimização, utilizou-se como variável resposta o rendimento em produto em relação ao substrato ( $Y_{P/S}$ ).

**Tabela 20** - Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-26.

Ensaio	Sacarose	Extrato de Levedura	Fosfato	Yp/s
1	-1	-1	-1	0,102
2	-1	-1	+1	0,407
3	-1	+1	-1	0,142
4	-1	+1	+1	0,424
5	+1	-1	-1	0,073
6	+1	-1	+1	0,328
7	+1	+1	-1	0,133
8	+1	+1	+1	0,371
9	-1,682	0	0	0,318
10	+1,682	0	0	0,238
11	0	-1,682	0	0,228
12	0	+1,682	0	0,312
13	0	0	-1,682	0,068
14	0	0	+1,682	0,426
15	0	0	0	0,266
16	0	0	0	0,261
17	0	0	0	0,290

A Figura 18 mostra o efeito estimado padronizado de cada termo do modelo empírico.



**Figura 18** - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-26 sobre a variável resposta.

Nota-se pela Figura 18 que a variável estudada que mais influenciou o rendimento em dextrana para a linhagem 4-30 foi o termo linear da concentração de fosfato. A concentração de sacarose e extrato de levedura, apesar de serem estatisticamente significativas, tiveram um efeito menos acentuado. Nenhum termo de interação foi significativo, indicando que não existe dependência entre as variáveis estudadas.

O modelo codificado utilizado para gerar as superfícies de resposta foi:

$$Y_{P/S} = -0,003781 S^2 - 0,044761 S - 0,009436 E^2 + 0,043875 E - 0,025811 F^2 + 0,246197 F + 0,011438 SE - 0,023452 SF - 0,010087 EF + 0,273772$$

Onde S representa a variável codificada, concentração de sacarose, E representa a variável codificada, concentração de extrato de levedura e F representa a variável codificada, concentração de fosfato.

A Tabela 21 mostra os resultados da análise de variância para os ensaios de otimização do meio de produção de dextrana para a linhagem 4-26.

**Tabela 21** - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de dextrana da linhagem 4-26.

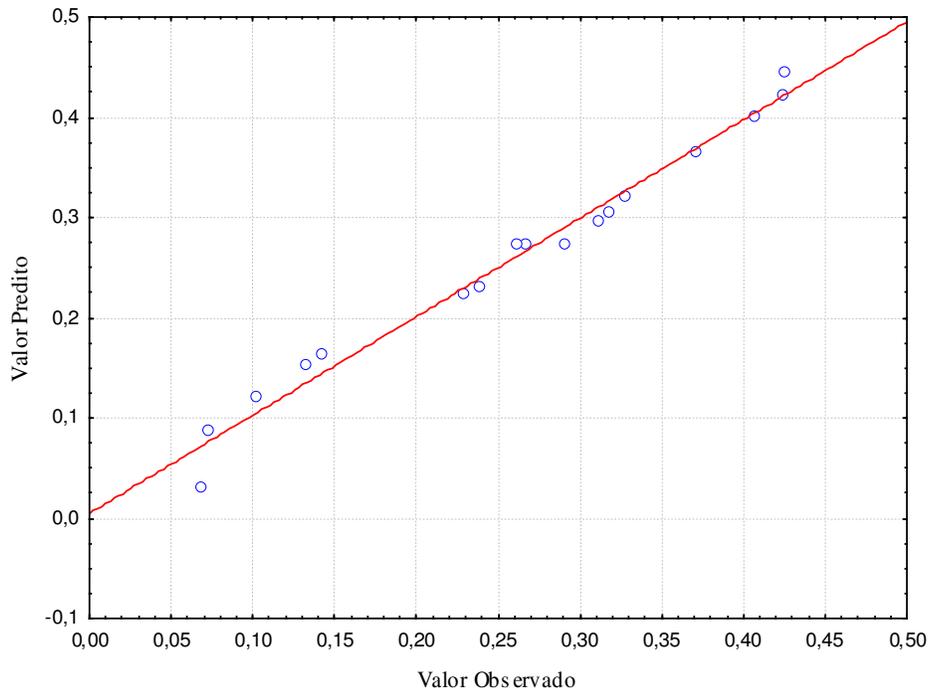
	<b>Soma Quadrática (SQ)</b>	<b>Número de Grau de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática (MQ)</b>	<b>F Calculado</b>	<b>F Tabelaado *</b>
Regressão	0,2238706	9	0,0248745	41,247	3,68
Resíduos	0,0042214	7	0,0006031		
Falta de Ajuste	0,0037459	5	0,0007492	3,151	19,30
Erro Puro	0,0004755	2	0,0002377		
Total	0,2280920	16			

\*95% de confiança

$$R^2 = 0,9815$$

% de máxima variação explicada = 99,79

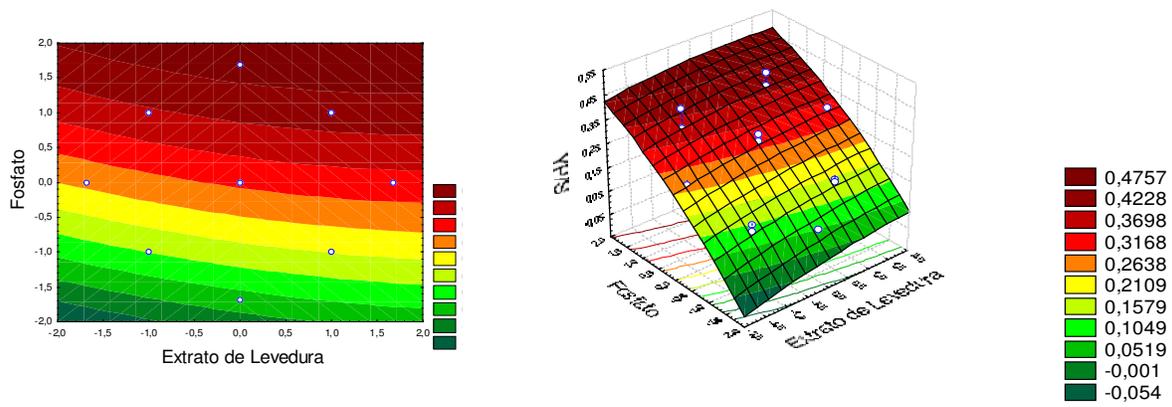
Para esta linhagem, a porcentagem de variação explicada pelo modelo empírico foi de 98,15%. O valor obtido de  $F \left( \frac{MQ_{REG}}{MQ_{RES}} \right)$  foi 11 vezes maior que o valor  $F_{0,95; 9,7}$  tabelado no intervalo de 95% de confiança e o valor obtido para  $F \left( \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \right)$  foi menor que o valor tabelado de  $F_{0,95; 9,7}$  (19,30) a 95% de confiança. Pelos testes F pode ser confirmando foi estatisticamente significativo e que está bem ajustado aos dados experimentais. A boa precisão do modelo pode ser visualizada na Figura 19, onde são apresentados os valores observados experimentalmente plotados contra os valores previsto pelo modelo obtido.



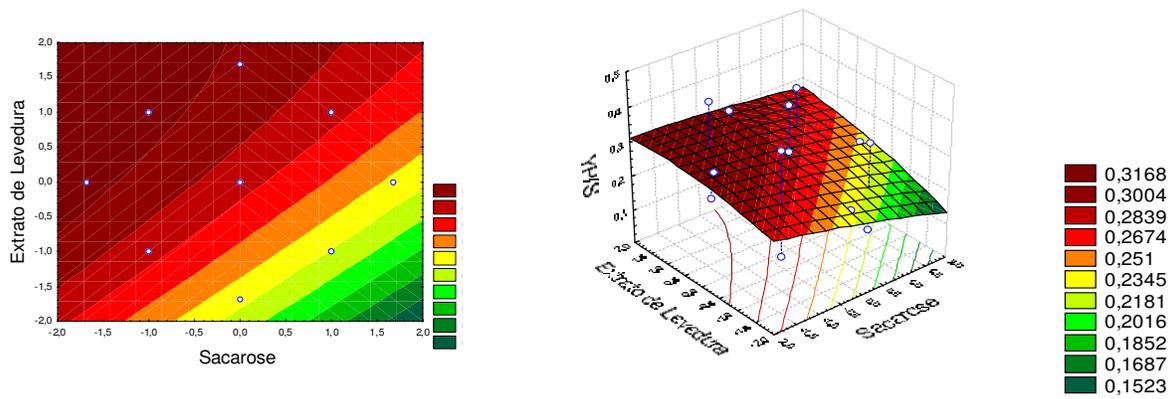
**Figura 19** - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a linhagem 4-26 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização.

Observa-se pelos dados contidos na Figura 19, o bom ajuste dos dados gerados pelo modelo empírico obtido para a linhagem 4-26 com os dados obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização de meio. Nota-se que os pontos se agrupam ao longo da reta perpendicular.

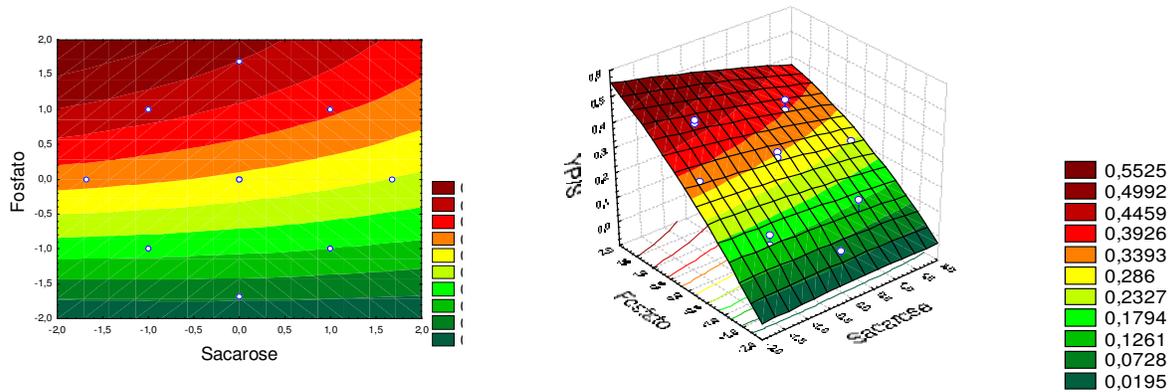
A Figura 20 mostra as superfícies de resposta e curvas de níveis do modelo codificado obtido para a linhagem 4-26, com seus respectivos valores experimentais.



(a) Extrato de levedura e fosfato



(b) Sacarose e extrato de levedura



(c) Sacarose e fosfato

**Figura 20** - Superfície de resposta e curvas de níveis para as linhagem 4-26 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.

Com base nos resultados apresentados na Figura 20, observa-se que o aumento na concentração de fosfato de potássio dibásico influencia positivamente na produção de dextrana em relação ao substrato.

De acordo com análise estatística dos resultados o modelo empírico foi significativo

e se ajustou aos dados obtidos nos ensaios de otimização, portanto determinou-se que o meio de fermentação para produção de dextrana encontra-se otimizado utilizando a seguinte composição: 130,95 g/l de concentração de sacarose, 25,38 g/l de concentração de extrato de levedura e 8,91 g/l de concentração de fosfato de potássio dibásico.

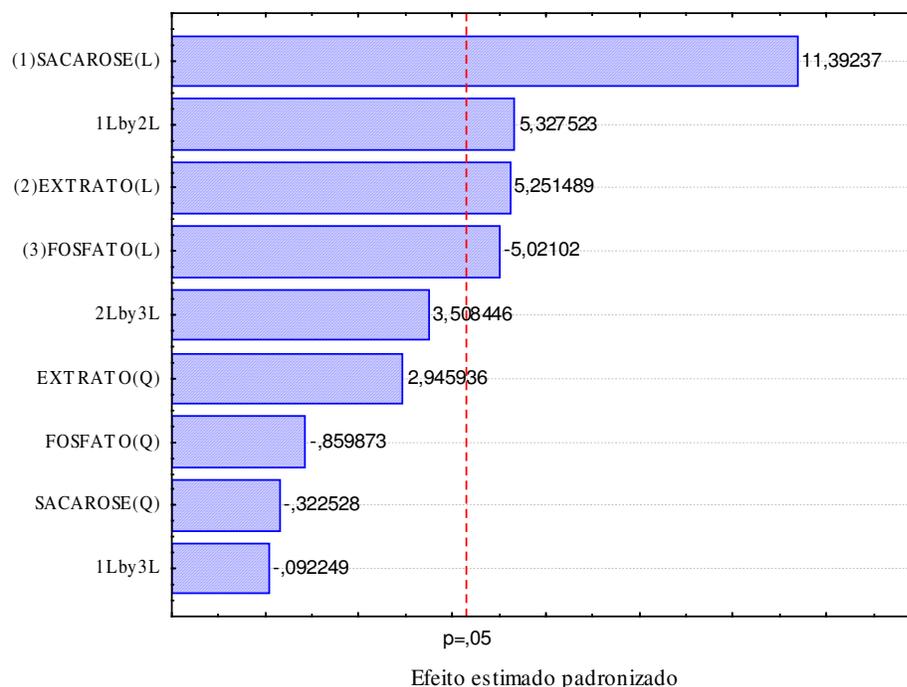
#### 4.2.3 Otimização do meio de fermentação para produção de dextrana utilizando a linhagem 4-30

Utilizou-se a metodologia de planejamento fatorial em configuração estrela, para otimizar o meio de fermentação para a produção de dextrana utilizando a linhagem 4-30. A Tabela 22 apresenta a matriz do planejamento fatorial e as respostas dos ensaios de otimização, utilizou-se como variável resposta o rendimento em produto em relação ao substrato ( $Y_{P/S}$ ).

**Tabela 22** - Matriz do planejamento fatorial em configuração estrela em dois níveis para três variáveis para a linhagem 4-30.

Ensaio	Sacarose	Extrato de Levedura	Fosfato	Yp/s
1	-1	-1	-1	0,231
2	-1	-1	+1	0,155
3	-1	+1	-1	0,172
4	-1	+1	+1	0,201
5	+1	-1	-1	0,306
6	+1	-1	+1	0,257
7	+1	+1	-1	0,391
8	+1	+1	+1	0,389
9	-1,682	0	0	0,283
10	+1,682	0	0	0,318
11	0	-1,682	0	0,315
12	0	+1,682	0	0,370
13	0	0	-1,682	0,349
14	0	0	+1,682	0,239
15	0	0	0	0,290
16	0	0	0	0,263
17	0	0	0	0,263

A Figura 21 mostra o efeito estimado padronizado de cada termo do modelo empírico.



**Figura 21** - Efeito de cada termo do modelo empírico obtido para linhagem 4-30 sobre a variável resposta.

Observa-se pela Figura 21 que a variável estudada que mais influenciou o rendimento em dextrana para a linhagem 4-30 foi o termo linear da concentração de sacarose. A interação da concentração de sacarose com a concentração de extrato de levedura e os termos lineares da concentração de extrato de levedura e de fosfato, apesar de serem estatisticamente significativas, tiveram um efeito menos acentuado. Os demais termos de interação não foram significativos indicando que não existe dependência entre estas variáveis, assim como os termos quadráticos da concentração de sacarose, de extrato de levedura e de fosfato.

A Tabela 23 apresenta os resultados da análise de variância para os ensaios de otimização do meio de produção de dextrana para a linhagem 4-30.

**Tabela 23** - Análise de variância para os ensaios de otimização de meio para produção de dextrana da linhagem 4-30.

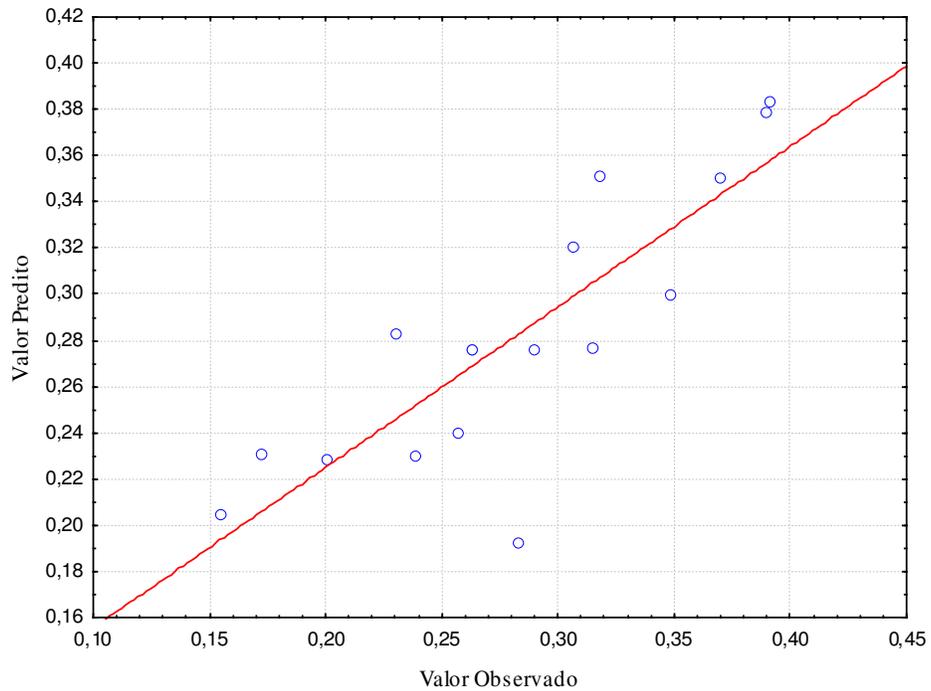
	<b>Soma Quadrática (SQ)</b>	<b>Número de Grau de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática (MQ)</b>	<b>F Calculado</b>	<b>F Tabelado*</b>
Regressão	0,0551976	9	0,0061331	1,769	3,68
Resíduos	0,0242658	7	0,0034665		
Falta de Ajuste	0,0237979	5	0,0047596	20,347	19,30
Erro Puro	0,0004678	2	0,0002339		
<b>Total</b>	<b>0,0794634</b>	<b>16</b>			

\*95% de confiança

$$R^2 = 69,47$$

% de máxima variação explicada = 99,41

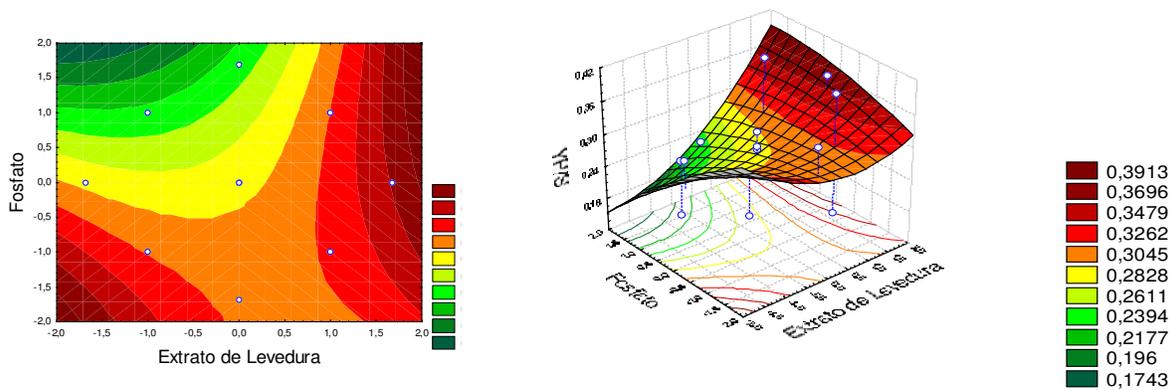
O modelo em estudo obteve um valor de  $R^2$  igual 0,6946, o que significa que somente 69,46% das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico. O valor obtido de  $F \left( \frac{MQ_{REG}}{MQ_{RES}} \right)$  foi menor que o valor  $F_{0,95; 9,7}$  tabelado no intervalo de 95% de confiança, assim o modelo para esta linhagem não é estatisticamente significativo e o valor obtido para  $F \left( \frac{MQ_{fij}}{MQ_{ep}} \right)$  foi maior que o valor tabelado de  $F_{0,95; 9,7}$  (19,30) a 95% de confiança, confirmando que o modelo não está adequadamente ajustado aos dados experimentais. A pouca precisão do modelo pode ser visualizada na Figura 22, onde são apresentados os valores observados experimentalmente plotados contra os valores previsto pelo modelo obtido.



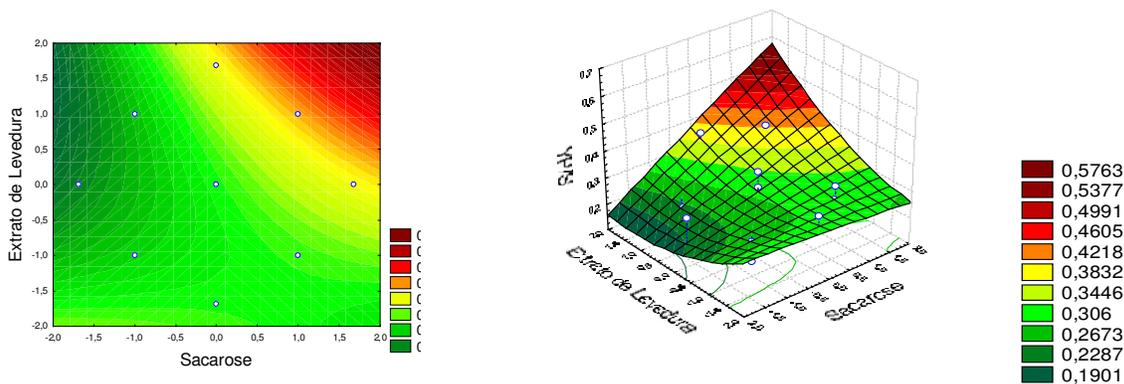
**Figura 22** - Relação entre os valores preditos pelo modelo empírico obtido para a cepa 4-30 e os valores obtidos experimentalmente nos ensaios de otimização.

Observa-se pelos dados contidos na Figura 22 que os resultados gerados pelo modelo empírico obtido para a linhagem 4-30 não se ajustam adequadamente aos dados experimentais, observando um afastamento dos pontos da reta diagonal.

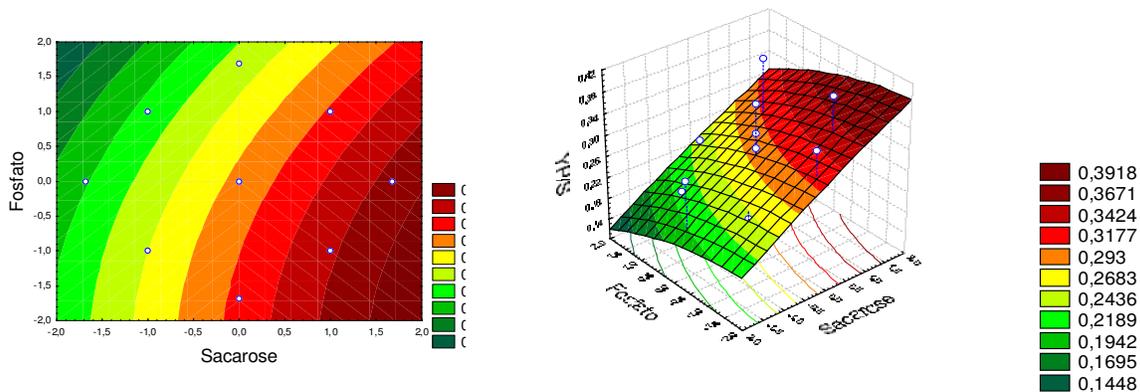
A Figura 23 mostra as superfícies de resposta e as curvas de níveis do modelo codificado obtido para a linhagem 4-30, com seus respectivos valores experimentais.



(a) Extrato de levedura e fosfato



(b) Sacarose e extrato de levedura



(c) Sacarose e fosfato

**Figura 23** - Superfície de resposta e curvas de nível para as linhagem 4-30 em função a) concentração de fosfato e extrato de levedura, b) concentração de sacarose e extrato de levedura e c) concentração de sacarose e fosfato.

A análise estatística dos resultados mostra que o modelo não é significativo. Portanto, o meio utilizado para esta linhagem é a composição do ponto central.

### 4.3 Caracterização das dextranas

Caracterizou-se estruturalmente a cadeia dos biopolímeros produzidos pelas três linhagens estudadas, as duas metodologias utilizadas estão apresentadas a seguir.

#### 4.3.1 Método de Perioxidação

Realizou-se a caracterização das gomas obtidas pelas três linhagens, utilizando a metodologia de perioxidação. A Tabela 24 mostra a caracterização das dextranas formadas pelas três linhagens estudadas.

**Tabela 24** - Porcentagem das ligações das dextranas obtidas pelas três linhagens.

	% ligação $\alpha$ -(1,6)	% ligação $\alpha$ -(1,2) e $\alpha$ -(1,4)	% ligação $\alpha$ -(1,3)
<b>Dextrana padrão</b>	90,22	9,76	0,02
<b>Linhagem 4-03</b>	87,73	10,11	2,17
<b>Linhagem 4-26</b>	86,37	11,51	2,12
<b>Linhagem 4-30</b>	71,13	11,25	17,63

OBS: A metodologia aplicada para essa caracterização não é capaz de distinguir entre as ligações  $\alpha$ -(1,2) e  $\alpha$ -(1,4).

Observa-se que as gomas obtidas pelas linhagens 4-03 e 4-26 são bastante similares entre si, mostrando uma alta porcentagem de ligações  $\alpha$ -(1,6) o que indica que as cadeias das mesmas são lineares e que estas gomas possuem uma elevada solubilidade em água.

No caso da goma produzida pela linhagem 4-30 foi observada uma maior ramificação na cadeia o que a caracteriza como uma goma de baixa solubilidade em água. Nota-se pela Tabela 24 que este biopolímero apresentou uma elevada porcentagem de ligações  $\alpha$ -(1,3) e baixa quantidade de ligações  $\alpha$ -(1,6).

As dextranas formadas pelas linhagens 4-03 e 4-26 apresentaram estruturas semelhantes a cadeia da dextrana padrão, principalmente na quantidade das ligações  $\alpha$ -(1,6),  $\alpha$ -(1,2) e  $\alpha$ -(1,4).

### 4.3.2 Método de Degradação de Smith

Utilizou-se o método de degradação de Smith para caracterizar a estrutura de cadeia das dextranas produzidas pelas linhagens isoladas. A Tabela 25 apresenta as porcentagens dos fragmentos característicos das dextranas produzidas pelas três linhagens estudadas.

**Tabela 25** - Porcentagem dos fragmentos característicos das dextranas obtidas pelas três linhagens.

<b>Ligações</b>	<b>% <math>\alpha</math>-(1,6)</b>	<b>% <math>\alpha</math>-(1,2)</b>	<b>% <math>\alpha</math>-(1,4)</b>	<b>% <math>\alpha</math>-(1,3)</b>
<b>Fragmento característico</b>	<b>Glicerol</b>	<b>Gliceraldeído</b>	<b>Eritritol</b>	<b>Glicose</b>
<b>Dextrana padrão</b>	96,147	1,165	0,873	1,814
<b>Linhagem 4-03</b>	94,066	2,516	2,212	1,206
<b>Linhagem 4-26</b>	88,617	6,209	2,692	2,482
<b>Linhagem 4-30</b>	81,730	2,243	3,271	12,756

O biopolímero obtido pela linhagem 4-30 apresenta uma maior ramificação na cadeia o que caracteriza como uma dextrana de baixa solubilidade em água. Devido a insolubilidade deste polissacarídeo, foi necessário autoclavar esta suspensão de dextrana para aumentar a hidratação das partículas e produzir uma solubilidade parcial. Todas as amostras foram autoclavadas para garantir que as dextranas ficariam dissolvidas a temperatura ambiente.

Nota-se que a goma produzida pela linhagem 4-03 é bastante similar à estrutura da dextrana padrão, mostrando uma alta porcentagem de ligações  $\alpha$ -(1,6) o que indica que as cadeias das mesmas são lineares e que ambas apresentam alta solubilidade em água.

Neste método o polissacarídeo formado pela linhagem 4-26 apresentou uma menor porcentagem das ligações  $\alpha$ -(1,6). Portanto, a estrutura desta dextrana não foi semelhante a cadeia da dextrana padrão.

Foi realizado balanço de massa na etapa da hidrólise ácida para garantir que não houve perda de massa durante as 5 horas. A hidrólise foi conduzida em recipiente fechado.

Os perfis das amostras e do padrão nos dois métodos de caracterização da estrutura da cadeia são similares. Sendo que o método da degradação de Smith apresenta resultados

mais precisos por gerar os fragmentos característicos.

#### **4.4 Identificação das linhagens**

As três linhagens identificadas são pertencente ao gênero *Leuconostoc*. O isolado 4-03 é pertencente à espécie *citreum* com similaridade de 99% quando comparado ao banco de dados consultado. Os isolados 4-26 e 4-30 apresentam entre 98 e 99% de similaridade com seqüências de rDNA 16 de linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*, disponíveis nas bases de dados

Esse resultado era esperado, uma vez que essas bactérias são isoladas de ambiente de industria sucroalcooleira, que é um celeiro desse tipo de microrganismo.

## 5 CONCLUSÕES

As linhagens 4-26 e 4-30 apresentaram modelos estatisticamente significativos, portanto podem ser utilizados na previsão da composição do meio de fermentação para produção da dextrana-sacarase. Para linhagem 4-03, o modelo empírico apresentou falta de ajuste aos dados experimentais, logo a composição do meio otimizado para produção de enzima dextrana-sacarase foi a composição do ponto central.

Somente a linhagem 4-26 apresentou um bom ajuste dos dados gerados pelo modelo empírico com os dados obtidos, experimentalmente, pelos ensaios de otimização do meio de fermentação da produção de dextrana, utilizando a técnica de planejamento experimental. Os modelos das linhagens 4-03 e 4-30, não foram estatisticamente significativos, portanto a composição do meio otimizado para estas linhagens foi a composição do ponto central de cada uma.

A solubilidade em água é uma característica que está associada ao grau de ramificação da cadeia e a massa molecular do biopolímero, portanto quanto mais ramificada é a cadeia, menos solúvel é a dextrana.

As gomas obtidas pelas linhagens 4-03 e 4-26 apresentaram estruturas bastante similares a estrutura da dextrana padrão, quando utilizou-se a metodologia de perioxidação. Estas gomas apresentaram uma elevada porcentagem de ligações  $\alpha$ -(1,6) o que indica que as cadeias das mesmas são lineares e que estas dextranas apresentam alta solubilidade em água. No caso do biopolímero produzido pela linhagem 4-30 observou-se uma maior ramificação na cadeia o que a caracteriza como uma goma de baixa solubilidade em água.

Quando realizou-se a caracterização da dextrana pelo método de degradação de Smith, a goma produzida pela linhagem 4-03 apresentou estrutura próxima da dextrana padrão, o que revela que a cadeia desta linhagem é predominantemente linear, pois ambas apresentaram uma elevada proporção de ligações  $\alpha$ -(1,6). O polissacarídeo formado pela linhagem 4-26 não apresentou estrutura similar a dextrana padrão, contendo uma menor porcentagem das ligações  $\alpha$ -(1,6). E o biopolímero obtido pela linhagem 4-30 apresentou novamente uma maior ramificação na cadeia, fato que caracteriza esta goma como uma dextrana pouco solúvel em água.

De acordo com a literatura, a metodologia de degradação de Smith apresenta

informação estrutural da cadeia da dextrana mais exata, sendo o método de perioxidação indicado quando se deseja realizar um estudo inicial da estrutura de cadeia, o qual mostra de forma menos precisa a estrutura do biopolímero, pois o método titulométrico depende somente do ácido produzido e do periodato consumido.

Quando compara-se as duas metodologias de caracterização estrutural dos biopolímeros estudados, confirma a alta porcentagem das ligações  $\alpha$ -(1,6) e uma estrutura semelhante a dextrana padrão, o que indica a alta solubilidade em água da dextrana formada pela linhagem 4-03, característica contrária a goma formada pela linhagem 4-30, que apresentou-se de forma insolúvel por ter uma cadeia ramificada, principalmente no que diz respeito a elevada porcentagem das ligações  $\alpha$ -(1,3). Já o polissacarídeo produzido pela linhagem 4-26, apresentou os mesmos valores numéricos dos dois métodos empregados para avaliar a estrutura de cadeia.

As três linhagens identificadas são pertencentes ao gênero *Leuconostoc*. O isolado 4-03 pertence a espécie *citreum*. As linhagens isoladas 4-26 e 4-30 apresentaram entre 98 e 99% de similaridade com seqüências de rDNA 16 de linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*, disponíveis nas bases de dados consultadas.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES**

De forma a complementar o trabalho realizado da caracterização da estrutura de cadeia dos biopolímeros, deve-se realizar um estudo das propriedades reológicas destes polissacarídeos, pois de acordo com a literatura as diferentes estruturas resultam em diferentes comportamentos reológicos (SABATIE, 1986; TIRTAATMADJA, 2001).

Além de otimizar o processo de produção da enzima dextrana-sacarase, deve-se realizar a purificação da enzima. Deverão ser estudadas diferentes metodologias para a purificação da enzima de modo que se obtenha boa pureza e a metodologia seja viável industrialmente. Uma metodologia a ser avaliada é a concentração por ultrafiltração seguida do tratamento do caldo enzimático com dextranase e após realizar cromatografia de permeação em gel, obtendo a enzima purificada (ROBYT e WALSETH, 1979).

Analisar por eletroforese em gel, a enzima purificada e verificar se o microrganismo produz uma ou mais enzimas do tipo glicosiltransferase e determinar o peso molecular da proteína.

Avaliar o potencial da linhagem produtora de goma insolúvel 4-30, em produzir oligossacarídeos não digeríveis. A enzima glicosiltransferase desta linhagem produz polímeros com alto grau de ramificação. A insolubilidade é um indicativo de que as ligações glicosídicas, responsáveis por estas ramificações, são mais resistentes ao ataque das enzimas digestivas. A síntese de oligossacarídeos é conseguida pela adição de aceptores no meio de cultivo na presença de sacarose (doador).

Otimizar o processo de produção de dextrana ou oligossacarídeos pelo processo enzimático, com a enzima bruta (caldo centrifugado) e a enzima purificada.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSOP, R. M. Industrial production of dextrans. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 18, p. 1-44, 1983.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 401 p.
- CURRALERO, I. C. B., **Estudo da produção de dextrana de baixo peso molecular por via enzimática, para obtenção da ferro-dextrana**. 164 f. Tese (Mestrado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993
- DE BELDER, A.N. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. 3<sup>a</sup> ed. edited by Whistler, R.L. and BeMiller, J.N., 1993. Cap.14: Dextran, 399-425.
- EBERT, K. H.; SCHENK, G. Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran and levan. **Adv. Enzymol.**, v. 30, p. 179-221, 1968.
- GUIMARÃES, D. P., **Otimização das condições de síntese e hidrólise ácida de dextrana**. Campinas, 1997 34p. 1ºRelatório de Iniciação Científica (FAPESP), processo 96/07436-1. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- HEHRE, E. J., Polysaccharide Synthesis from Disaccharides In: **Methods in Enzymology**, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., v I, 179-184, 1955.
- JEANES, A. Dextran In: **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**, John Wiley & Sons Inc., v.4, p. 805-824,1966.
- JEANES, A. Extracellular Microbial Polysaccharides - New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, 28 (5), 34-40, 1974.
- JEANES, A.; WILHAM, C. A.; Periodate Oxidation of Dextran. **J. Amer. Chem. Soc.**, p. 2655-2657, 1950.
- JEANES, A. et al. Characterization and Classification of Dextrans from Ninety-six Strains of Bacteria. **J. Amer. Chem. Soc.**, p. 5041-5052, 1954.
- KABOLI, H.; REILLY, P.J.; Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides*

- dextran* sucrose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XXII, p. 1055 – 1069, 1980.
- KARTHIKEYAN, R. S.; SWAMINATHAN, T.; BARADARAJAN, A.; “Dextran, Microbial production methods” In **Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation**, Flickinger, M.C, and Drew, S.W (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. p. 803-821, 1999.
- KIM, D.; ROBYT, J. F.; Production and Selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrase. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 659-664, 1994a.
- KIM, D.; ROBYT, J. F.; Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextran sucrose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 1010-1015, 1994b
- KITAOKA, M.; ROBYT, J. F.; Use of microtiter plate screening method for obtaining *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucansucrase. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 22, p. 527-531, 1998
- KOBAYASHI, M; MATSUDA, K.; Characterization of the multiple forms and main component of dextran sucrose from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 614, p. 46 – 62, 1980.
- KUMAR, S; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M.; MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, p. 1244-1245, 2001.
- LAWFORD, G. R.; KLIGERMAN, A.; WILLIAMS, T. Dextran Biosynthesis and Dextran sucrose Production by Continuous Culture of *Leuconostoc mesenteroides*. **Biotech. And Bioeng.**, v. XXI, p. 1121-1131, 1979.
- MAIA, J. et al. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. **Polymer**, v. 46, p. 9604 – 9614, 2005
- MIBIELLI, G.M. **Síntese do processo de obtenção de dextrana clínica e frutose a partir de sacarose**. 88f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar **Anal Chem**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MILLER, A. W.; EKLHND, S. H.; ROBYT, J. F.; Milligram to gram scale purification and

- characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate research**, v. 147, p. 119-133, 1986.
- MILLER, A. W.; ROBYT, J. F.; Stabilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by nonionic detergents, poly(ethylene glycol) and high-molecular-weight dextran. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 785, p. 89 – 96, 1984.
- MILLER, A. W.; ROBYT, J. F.; Activation and inhibition of dextransucrase by calcium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 880, p. 32 – 39, 1986.
- MONCHOIS, V.; WILLEMOT, R.; MONSAN, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. **FEMS Microbiol Rev**, v. 23, p. 131-151, 1999.
- QUEIROZ, J. H. **Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides***. 118 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.
- RANKIN, J. C.; JEANES, A. Evaluation of the Periodate Oxidation Method for Structural Analysis of Dextran. **J. Amer. Chem. Soc.** p. 4435 – 4431, 1954.
- ROBYT, J. F. Mechanism in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 51, p. 133-168, 1995.
- ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, T. F. The mechanism of Dextransucrase Action: Direction of Dextran Biosynthesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 165, p.634-641, 1974.
- ROBYT, J. F. and TANIGUCHI, H. The Mechanism of dextransacrase action – Biosynthesis of linkages by acceptor reactions with dextran **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 174, p.129-135, 1976.
- ROBYT, J. F. and WALSETH, T. F. Production, Purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate research**, v. 68, p.95-111, 1979a.
- ROBYT, J. F. and WALSETH, T. F. The Mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 61,

- p.433-445, 1979b.
- RODRIGUES, S.; LONA, L. M. L.; FRANCO, T. T., Effect of phosphate concentration on the production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, p. 57- 62, 2003
- SABATIE, J.; CHOPLIN, L.; PAUL, F.; MONSAN, P. The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran. **Biotechnol. Lett.** n° 6, v. 8, p 425-430,
- SAITOU, N.; NEI, M.; The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SANTOS, H. A. et al. Preparation of nanostructures composed of dextran sulfate/ruthenium nanoparticles and their interaction with phospholipid monolayers at a liquid–liquid interface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, p. 1 – 9, 2006
- SIDEBOTHAM, R. L. Dextrans. **Adv. Carbohydr.Chem.Biochem**, v. 30, p. 371- 444, 1974.
- SIDEBOTHAM, R. L. and WEIGEL, H. Studies on Dextrans and Dextranses: Part IX Dextrans Elaborated by Cariogenic organisms. **Carbohydr Res.**, v. 19, p. 151-159, 1971
- SLOAN, J. W.; et al. Determination of Dextran Structure by Periodate Oxidation Techniques. **J. Amer. Chem. Soc.** p. 4429-4434, 1954.
- TANG, M.; DOU, H.; SUN, K. One-step synthesis of dextran-based stable nanoparticles assisted by self-assembly. **Polymer**, v. 47, p. 728-734, 2006
- TIRTAATMADJA, V.; DUNSTAN, D.E.; BOGER, D.V. Reology of dextran solutions. **J. Non-Newtonian Fluid Mech**, v. 97, p. 295-301, 2001.
- VIEIRA, E.D. **Seleção de linhagens produtoras de goma isoladas da cana-de-açúcar**. 69 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.