



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE

**AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO DE LEVANA
POR *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 UTILIZANDO
FONTES DE CARBOIDRATOS REGIONAIS E DE BAIXO CUSTO**

MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA

MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA



**LONDRINA - PR
2005**



Universidade
Estadual de Londrina

MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO DE LEVANA POR
Zymomonas mobilis ATCC 31821 UTILIZANDO FONTES DE
CARBOIDRATOS REGIONAIS E DE BAIXO CUSTO

Londrina
2005

MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO DE LEVANA POR
Zymomonas mobilis ATCC 31821 UTILIZANDO FONTES DE
CARBOIDRATOS REGIONAIS E DE BAIXO CUSTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA:

Prof^a Dr^a Maria Antônia Pedrine Colabone Celligoi.

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr.: Rui Sérgio Santos Ferreira da Silva.

Londrina
2005

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48a Oliveira, Marcos Roberto de.
Avaliação estatística da produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 utilizando fontes de carboidratos regionais e de baixo custo / Marcos Roberto de Oliveira. – Londrina, 2005.
78f. : il.

Orientadora : Maria Antônia Pedrine Colabone Celligoi.
Co-Orientador: Rui Sérgio Santos Ferreira da Silva.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2005.
Bibliografia: f.32-36

1. Fermentação – Teses. 2. Engenharia bioquímica – Teses. 3. Bacteriologia industrial – Teses. 4. Cana-de-açúcar – Teses. 5. Levana – Estatística – Teses. 6. *Zymomonas mobilis* – Teses. I. Celligoi, Maria Antonia Colabone. II. Silva, Rui Sérgio Santos Ferreira da. III. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.
CDU 663.1

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO DE LEVANA POR
Zymomonas mobilis ATCC 31821 UTILIZANDO FONTES DE
CARBOIDRATOS REGIONAIS E DE BAIXO CUSTO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Maria Antônia Pedrine Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. João Batista Buzzato
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 13 de junho de 2005.

*Morder o fruto amargo e não cuspir
mas avisar aos outros quanto é amargo,
cumprir o trato injusto e não falhar
mas avisar aos outros quanto é injusto,
sofrer o esquema falso e não ceder
mas avisar aos outros quanto é falso;
dizer também que são coisas mutáveis...
E quando em muitos a noção pulsar
— do amargo e injusto e falso por mudar —
então confiar à gente exausta o plano
de um mundo novo e muito mais humano.*

Tarefa - Geir Campos

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ajudar a transpor mais esta etapa.

Ao Profª. Drª. Maria Antonia P. C. Celligoi, pela confiança e força em todas as etapas deste trabalho.

A minha família, pela confiança e motivação, em especial a minha esposa.

Aos professores do Curso que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao colega de curso Doumit Camilios Neto incentivador e companheiro de bancada.

Ao técnico do laboratório Néelson Janeiro Rodriguez por ser atencioso e prestativo.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

OLIVEIRA, Marcos Roberto. **Avaliação estatística da produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 utilizando fontes de carboidratos regionais e de baixo custo.** 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A utilização de substratos alternativos regionais e de baixo custo torna-se muito interessante, pois além da facilidade de aquisição apresenta um custo relativamente baixo. Neste estudo analisou-se através de instrumentos estatísticos a produção do exopolissacarídeo levana pelo microrganismo *Zymomonas mobilis* ATCC 31821, variando-se a fonte de carbono (sacarose comercial, caldo e melão de cana-de-açúcar) e os constituintes do meio de fermentação. No meio de melão ocorreu uma queda na produção de levana ($2,533 \text{ g.L}^{-1}$) quando comparado aos meios de sacarose comercial ($21,685 \text{ g.L}^{-1}$) e caldo ($15,456 \text{ g.L}^{-1}$). No meio de sacarose comercial o extrato de levedura e o fosfato de potássio foram significativos na produção de levana e no meio de caldo o extrato de levedura e o sulfato de magnésio. Embora o caldo de cana-de-açúcar produza em torno de 28,724% a menos de levana em comparação à sacarose comercial, a produção de biomassa no caldo é 2,76 vezes maior que na sacarose comercial ($0,857 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,366 \text{ g.L}^{-1}$) o que poderia justificar uma produção acoplada de levana e biomassa de *Zymomonas mobilis*. No emprego de substratos alternativos e complexos em biotecnologia, são necessários estudos para avaliar a composição destes meios, evitando a suplementação desnecessária com vitaminas e sais minerais, quando utiliza-se as formulações dos meios definidos para os meios complexos.

PALAVRAS-CHAVE: *Zymomonas mobilis*, levana, caldo de cana-de-açúcar, melão de cana-de-açúcar, planejamento estatístico.

OLIVEIRA, Marcos Roberto. **Statistical study of levan production by *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 using regional low-cost carbohydrate sources**. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Londrina Stat University – Londrina.

ABSTRACT

The use of alternative regional low-cost substrates has become very interesting because in addition to the ease of acquisition it presents a relatively low cost. In this study using statistical instruments, the exopolysaccharide levan production by the *Zymomonas mobilis* microorganism was analyzed varying the carbon source (commercial sucrose, molasses and sugar cane syrups) and the fermentation medium constituents. There was a decrease in levan production in the molasses medium (2.533 gL^{-1}) when compared to the commercial sucrose (21.685 gL^{-1}) and syrup (15.456 gL^{-1}) media. Yeast extract and KH_2PO_4 were significant in the commercial sucrose medium for levan production and in the syrup medium the yeast extract and MgSO_4 were significant. Although sugar cane syrup up produced about 28.724% less levan compared to commercial sucrose, biomass production in the syrup was 2.76 times greater than in commercial sucrose (0.857 gL^{-1} and 2.366 gL^{-1}) that could justify joint levan and *Z. mobilis* biomass production. Studies are needed on the use of alternative substrates and complexes in biotechnology to assess the composition of these media, avoiding unnecessary supplementation with vitamins and minerals salts, when using the formulations of the mediums defined for the complex mediums.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, levan, sugar cane molasses, sugar cane syrups, factorial planning.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	04
2.1 Objetivo Geral.....	04
2.2 Objetivos Específicos.....	04
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3.1 Exopolissacarídeos.....	05
3.2 Levana.....	06
3.3 Microrganismo produtor: <i>Zymomonas mobilis</i>	08
3.4 Produção de levana.....	13
3.5 Substratos: caldo e melaço de cana-de-açúcar.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Materiais.....	19
4.1.1 Microrganismo.....	19
4.1.2 Meios de cultura.....	19
4.1.2.1 Meio de preservação.....	19
4.1.2.2 Meio de obtenção de inóculo.....	19
4.1.2.3 Meio de fermentação de sacarose.....	20
4.1.2.4 Meio de fermentação de caldo de cana de açúcar.....	20
4.1.2.5 Meio de melaço de cana de açúcar.....	20
4.2 Métodos.....	21
4.2.1 Planejamento estatístico.....	21
4.2.1.1 Planejamento estatístico: 1ª Etapa.....	21
4.2.1.2 Planejamento estatístico: 2ª Etapa.....	22
4.2.1.3 Planejamento estatístico 3ª Etapa.....	23
4.2.2 Preservação do microrganismo.....	25
4.2.3 Inóculo.....	26
4.2.4 Processo fermentativo.....	25
4.2.5 Determinação da biomassa.....	27
4.2.6 Determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais (ART).....	27
4.2.7 Separação de levanas.....	28

4.2.8 Determinação do teor de levana	28
4.2.9 Determinação de atividade da levanasacarase	28
4.2.10 Determinação de atividade da invertase	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	37
ANEXO A – Normas para submissão do artigo científico	37
ANEXO B – Artigo submetido ao Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	42
ANEXO C – Resultados complementares	63

1 INTRODUÇÃO

Levana é um exopolissacarídeo também conhecido como frutoligosacarídeo, formado por polímeros de frutose ligados através de ligações frutofuranosídicas, sendo produzida a partir da reação de transfructolização catalisada pela enzima levanasacarase (β 2,6-frutose; D-glicose-1-frutossiltransferase, E.C. 2.4.1.10). São produzidas por diversos microrganismos como: *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Erwinia herbicola*, *Streptococcus salivarius* e *Zymomonas mobilis*.

A levana possui uma grande variedade de aplicações importantes. Na medicina pode ser utilizada como agente hipo-colesterolêmico, agente anti-tumoral, imunomodulador, antiinflamatório e substituto de plasma. Na área de alimentos, possui diversas aplicações como: fonte de di-frutofuranoses, frutose e frutooligossacarídeos, agente emulsificante, agente encapsulante, carreador de cores e sabores e substituto de gorduras.

A produção biotecnológica de levana através de processos fermentativos utilizando a bactéria *Z. mobilis* tornou-se atraente e promissora com os avanços nos conhecimentos sobre fisiologia, bioquímica e metabolismo desta bactéria. Diversos autores destacam-na como promissora candidata a produção em larga escala.

A bactéria *Z. mobilis* é um bastonete gram-negativo, que ocorre geralmente aos pares e não forma esporos, cápsula, lipídios intracelulares ou glicogênio. São organismos anaeróbios facultativos que utilizam somente glicose, frutose e sacarose como fonte de carbono. Na fermentação da sacarose por *Z. mobilis*, esta é hidrolisada predominantemente por duas enzimas extracelulares, uma levanasacarase de baixa atividade específica (SacB) e uma sacarase de alta atividade específica (SacC), enquanto que a formação de levanas é catalisada exclusivamente pela levanasacarase (SacB).

A enzima levanasacarase pode estar ligada diretamente a parede celular da bactéria ou livre no meio de fermentação. As reações catalisadas pela enzima levanasacarase (liberação de frutose, formação de oligossacarídeo e formação de levana) são diferentemente afetadas pelas condições do meio de fermentação (temperatura, concentração de sacarose e osmolaridade salina).

Com a intenção de se diminuir custos de produção e utilizar fontes alternativas de substratos têm-se empregado caldo de cana-de-açúcar, melação de cana-de-açúcar, açúcar de beterraba, melação de açúcar de beterraba, silagem de arroz e soro de leite, na obtenção de produtos de interesse biotecnológico. O caldo de cana-de-açúcar e o melação de cana-de-açúcar são substratos complexos com uma alta concentração de sacarose com uma grande variedade de sais que são necessários para produção de metabólitos de interesse industrial. Na fermentação por *Z. mobilis*, a osmolaridade do meio é um fator essencial para a produção de sorbitol e levana. Os sais de sódio e potássio levam a um aumento na síntese de sorbitol e levanas devido ao efeito de osmoproteção da célula.

A utilização de instrumentos estatísticos como o planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta têm sido utilizados por diversos autores na área de biotecnologia. O planejamento experimental permite aprimorar e aperfeiçoar produtos e processos, reduzindo os custos de desenvolvimento e produção, pois permite diminuir o número de ensaios na etapa de desenvolvimento, e possibilita o estudo de um número considerável de fatores ao mesmo tempo. Pode-se avaliar as interações entre estes fatores e obter os níveis ótimos de produção, com isso conseguir uma maior precisão dos resultados e otimização da produção.

Considerando que:

- o Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar, o que gera substratos como a sacarose, o caldo e melaço de cana de açúcar com altos teores de sacarose, de fácil aquisição e baixo custo;

- a levana possui importantes aplicações em áreas de grande interesse econômico;

- a *Z. mobilis* apresenta um metabolismo promissor para a produção de levana;

Este trabalho visou avaliar através de instrumentos estatísticos a utilização destes substratos (sacarose comercial, caldo de cana de açúcar e melaço) e os constituintes do meio de fermentação para a produção do exopolissacarídeo levana pelo microrganismo *Z. mobilis* ATCC 31821.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar através de instrumentos estatísticos a produção do exopolissacarídeo levana pelo microrganismo *Z. mobilis* ATCC 31821, variando-se a fonte de carbono (sacarose comercial, caldo de cana de açúcar e melaço) e os constituintes do meio de fermentação.

2.2 Objetivos Específicos

- Definir estatisticamente a melhor concentração de açúcares e o tempo de cultivo para a produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821 em meio de sacarose.

- Avaliar a utilização de sacarose, caldo e melaço de cana-de-açúcar como fontes de carbono e a influência dos constituintes do meio de fermentação para a produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821.

- Avaliar por metodologia estatística o efeito das variáveis: tempo de fermentação, concentração de açúcares e constituintes do meio de fermentação na produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Exopolissacarídeos

Um grande número de microrganismos, incluindo, bactérias, algas, leveduras e fungos, podem produzir exopolissacarídeos (biopolímeros extracelulares de sacarídeos) (SAUDE; JUNTER, 2002) que estão diretamente relacionados aos processos de infecção, adaptação ambiental (WEI et al., 1996), adesão e proteção celular dos microrganismos (MURALIDHARAN; JAYACHANDRAN, 2003; MONSAN et al., 2001). Constituem-se, na verdade, de uma bem sucedida estratégia evolutiva permitindo a sobrevivência dos microrganismos em condições ambientais adversas e extremas (SELBMANN et al., 2002).

A exploração comercial dos exopolissacarídeos depende de suas características reológicas (MURALIDHARAN; JAYACHANDRAN, 2003), estando estas características intimamente ligadas às suas atividades biológicas (JUNG et al., 1997; KULICKE; LETTAU; THIELKING, 1997). As características reológicas dos exopolissacarídeos dependem do seu tamanho molecular, carga, composição dos monossacarídeos, grau de ramificação e tipo de ligação glicosídica (KORAKLI et al., 2000), além dos meios de crescimento e do tipo de microrganismo que os produzem (FRANZ, 1989; OOI; LIU, 2000).

Nas últimas décadas vários exopolissacarídeos vêm sendo pesquisados devido a suas características e campos de aplicação (JANG et al., 2001), tornando-se gradualmente competitivos economicamente com as gomas naturais de origem vegetal e de algas (MURALIDHARAN; JAYACHANDRAN, 2003), uma vez que não dependem de condições sazonais para a produção e são de fácil recuperação e purificação (SEVIOUR et al., 1992).

3.2 Levana

Descrita na literatura em 1930 por Hibert e Tipson (HIBERT; TIPSON, 1930), a levana é um exopolissacarídeo constituído por um polímero de frutose ligado através de ligações frutofuranosídicas, produzida pela reação de transfructolização catalisada pela enzima levanasacarase (β -2,6 frutana: D-glicose-frutosil transferase, EC. 2.4.1.10). A cadeia principal é composta de resíduos de β -D-frutofuranosil ligados por ligações β (2-6) e ramificações com ligações β (2-1), possuindo provavelmente uma estrutura dendrítica formando uma macromolécula de forma globular (SIMMS; BOKYO; EDWARDS; 1990), na Figura 1 é mostrada a estrutura química da levana.

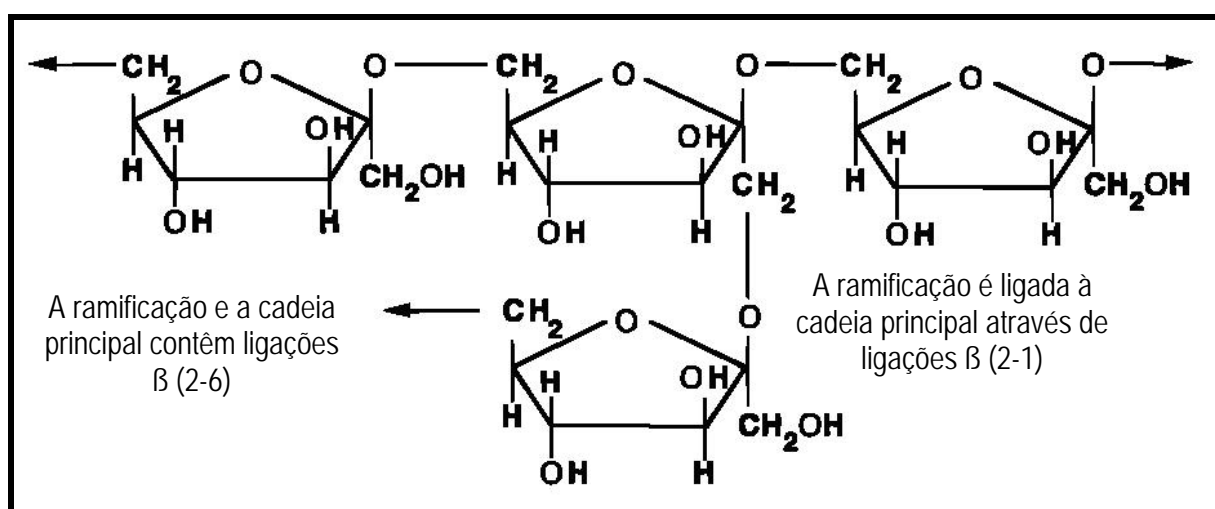


Figura 1 - Estrutura química da levana (SIMMS, BOKYO, EDWARDS 1990).

O processo de biossíntese da levana é extracelular e utiliza somente a sacarose como substrato específico, sendo a enzima levanasacarase, uma glicosil-transferase, responsável pela síntese deste polímero (VUYST; DEGEEST, 1999). A levanasacarase (SacB / LevU) atua como uma hidrolase da sacarose e como uma frutosil-polimerase, para a formação de levana (OSEGUERA; GUERECA; LOPEZ-MUNGUIA, 1996; CHAMBERT; PETIT-GLATRON, 1993; SANGILIYANDI et al., 1999). Geralmente são encontradas ligadas à parede celular e ou livres no meio de cultura (CHAMBERT; PETIT-GLATRON, 1993). A enzima levanasacarase também possui atividade hidrolítica

sobre a levana, sendo esta atividade interrompida nos pontos de ramificação (CHAMBERT; PETIT-GLATRON, 1993).

A levana provavelmente funciona como fonte de armazenamento de carboidratos para os microrganismos, quando as fontes de carboidratos intracelulares e extracelulares tornam-se baixas e inadequadas para a célula bacteriana, a enzima levanase pode hidrolisar a levana presente no meio, formando frutose e frutooligossacarídeo (MIASNIKOV, 1997; YUN, 1996) que são utilizados para obtenção de energia pela célula bacteriana (BERGERON; MOROU-BERMUDEZ; BURNE, 2000).

Embora a levana resulte de metabolismo microbiano, polímero similar é produzido por vegetais superiores, servindo como reserva de carboidratos e presumidamente aumenta a propriedade de resistência dos vegetais ao congelamento e ressecamento (PONTIS; DELL CAMPILLO, 1985). O grau de ramificação e o peso molecular dependem de sua origem. Levana de baixo peso molecular com o mínimo de ramificação pode ser encontrada em gramíneas, em contraste, à produzida por bactérias, é caracterizada por um alto peso molecular, o qual pode exceder a 10^7 kDa, correspondendo aproximadamente a 60.000 resíduos de frutose (MURO et al., 2000; CLARKE et al., 1990).

Diversas bactérias pertencentes a diferentes gêneros são descritas como produtoras de levana quando crescem em meio contendo sacarose. Dentre estas bactérias têm-se: *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Erwinia herbicola*, *Streptococcus salivarius* e *Zymomonas mobilis* (MIANISKOV, 1997), sendo a bactéria *Z. mobilis*, considerada uma promissora candidata a produção industrial em larga escala (ANANTHALAKSMY; GUNASEKARAN, 1999a).

A levana possui diversas aplicações industriais e alimentícias (HAN; CLARKE, 1990) tais como: produção de Di-frutofuranoses (SONG et al., 2000); separação e purificação de líquidos biológicos (CHUNG et al., 1997); agente anti-tumoral (CALAZANS et al., 1997; YOO et al., 2004); agente emulsificante; coadjuvante de formulações; agente encapsulante; carreador de cores e sabores (ILAN, 1990); agente hipo-colesterolêmico (YAMAMOTO et al., 1999); agente emulsificante e substituto de gorduras (VIJN; SMEEKENS, 1999).

O interesse na produção industrial de levana tem aumentado nos últimos anos, sendo que novas metodologias de produção estão sendo pesquisadas e desenvolvidas (AMMAR et al., 2002); a dificuldade de se obter longas cadeias e complexos ramificados de frutana e levana tem limitado as suas aplicações (VIJN; SMEEKENS, 1999). Levana e frutoligossacarídeo podem ser produzidos como subprodutos de valor agregado, nas destilarias de álcool utilizando a sacarose como substrato (BEKERS et al., 2002).

3.3 Microrganismo produtor: *Zymomonas mobilis*

Z. mobilis é uma bactéria em forma de bastonetes, gram negativos com 2 a 6 μm de comprimento por 1 a 1,4 μm de largura (Figura 2), geralmente ocorrem aos pares e não formam esporos, cápsulas, lipídeos intracelulares ou glicogênio. Possuem mobilidade através de flagelos polares (que podem ser em número de 1 a 4), sendo que a mobilidade pode ser perdida espontaneamente. São microrganismos anaeróbicos que suportam ambientes microaerófilos. Foram inicialmente isoladas como contaminantes de bebidas alcoólicas como vinho de palmeiras africanas, polque mexicano e cerveja em países europeus (SHIMMWELL, 1937).

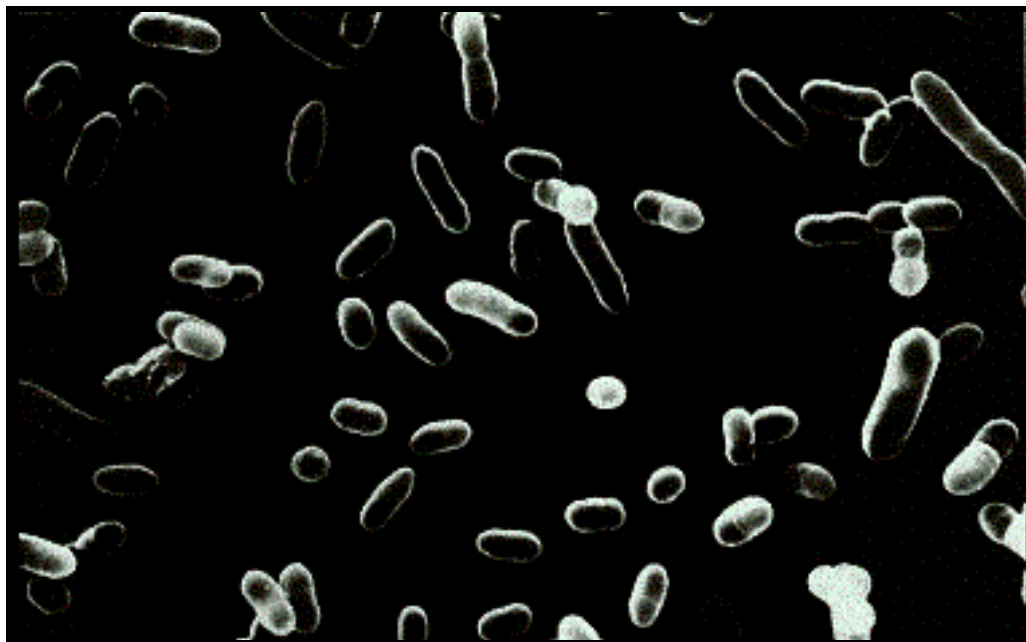


Figura 2 – Microscopia eletrônica de células de *Z. mobilis* ATCC 31821 (PALHA et al. 2002).

São bactérias etanologênicas que produzem diversos subprodutos quando crescem no meio contendo sacarose como: levana, sorbitol, ácido glucônico e fruto-oligossacarídeo (BEKERS et al., 2001; SPRENGER, 1996). Estes subprodutos causam uma significativa diminuição na eficiência na produção de etanol, perda de sacarose e problemas de filtração em equipamentos (VUYST; DEGEEST, 1999; SANGILYANDI; GUNASEKARAN, 1998).

Utilizam como fonte de carbono somente os açúcares glicose, frutose e sacarose (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999b; MURO et al., 2000) e possuem tolerância a altas concentrações de açúcar (400 g/L) e etanol (SPRENGER, 1996). No processo de fermentação alcoólica, *Z. mobilis* é capaz de converter os substratos glicose e frutose em quantidades equimolares de etanol e dióxido de carbono. *Z. mobilis* mantém além de sua capacidade fermentativa, funções da cadeia transportadora de elétrons crescendo bem em ambientes microaerófilos (SPRENGER, 1996).

O gênero *Zymomonas* constitui o único gênero de bactérias que, em condições anaeróbias, utilizam a via de Entner-Doudoroff, uma via que é exclusiva de microrganismos aeróbios (KERSTERS; DE LEY, 1968). A via de Entner-Doudoroff é uma via mais primitiva do que a via de Embden-Meyerhof-Parnas, possuindo igual importância no fornecimento de precursores metabólicos para as vias de biosíntese; a via de Entner-Doudoroff envolve a clivagem de 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato (KDGP), através da enzima KDGP aldolase para a formação de gliceraldeído-3-fosfato, após a etapa de clivagem, a via segue as mesmas etapas da via de Embden-Meyerhof-Parnas (CONWAY, 1992).

O metabolismo da sacarose em *Z. mobilis* está relacionado a três enzimas sacarases: levanasacarase extracelular (SacB / InvU), sacarase extracelular (SacC / InvB) e sacarase intracelular (SacA / InvA); no Quadro 1 estão relacionadas as localizações e funções das três enzimas sacarases de *Z. mobilis* (SANGILYANDI; RAJ; GUNASEKARAN, 1999a ; AÏT-ABDELKADER et al., 2000 ; KANNAN; SANGILYANDI; GUNASEKARAM, 1997 ; SPRENGER, 1996).

Na fermentação da sacarose por *Z. mobilis*, esta é hidrolisada predominantemente pelas duas enzimas extracelulares, uma levanasacarase de baixa atividade específica (SacB / LevU) e uma sacarase de alta atividade específica (SacC / InvB), enquanto que a formação de levana é catalisada exclusivamente pela levanasacarase (SacB / LevU) (O'MULLAN; SZAKACS-DOBOZI; EVELEIGH, 1991).

Enzima	Localização	Função
Sacarase SacA (InvA)	Intracelular	Ainda não compreendida, nunca se evidenciou o transporte de sacarose para dentro da célula, possivelmente um ancestral em comum perdeu o mecanismo de transporte da sacarose.
Levansacarase SacB (LevU)	Extracelular	Hidrólise da sacarose com baixa atividade específica, formando glicose, frutoligosacarídeo e levana.
Sacarase SacC (InvB)	Extracelular	Hidrólise da sacarose com alta atividade específica.

Quadro 1 – Localização e função das 3 sacarases de *Z. mobilis* que participam do metabolismo da sacarose (SANGILYANDI; RAJ; GUNASEKARAN, 1999a ; AÏT-ABDELKADER et al., 2000 ; KANNAN; SANGILYANDI; GUNASEKARAM, 1997 ; SPRENGER, 1996).

A bactéria *Z. mobilis* quando cresce em meio de sacarose consome preferencialmente glicose, fazendo com que ocorram acúmulos significativos de frutose no meio de fermentação que levam à conversão da frutose em levana através da levansacarase (PARKER et al., 1997). Estudos do mecanismo enzimático da utilização de sacarose por *Z. mobilis* demonstraram que durante o crescimento do microrganismo em meio contendo sacarose ocorre a formação de levana, com um baixo crescimento celular, sensivelmente menor do que em concentrações equivalentes de glicose e frutose, e que a bactéria produz levana a partir de sacarose, mas não a partir de glicose e ou frutose (DAWES et al., 1966). Existe uma correlação entre produtividade específica de levana e concentração de ATP em *Z. mobilis*, provavelmente significando que altos níveis de energia no metabolismo são favoráveis para a produção de levana (VIGANTS; ZIKMANIS; BEKERS, 1996).

O conhecimento do metabolismo celular e das necessidades nutricionais fundamentais das células são fatores importantes para a elaboração de meios de cultura que assegurem a sobrevivência e crescimento das células microbianas e promovam a formação de produtos com interesse biotecnológico. No caso da bactéria *Z. mobilis*, o meio além de ter de fornecer

sacarose como fonte de açúcar que possa ser convertida em levana, deverá fornecer também os nutrientes necessários para o crescimento celular. No Quadro 2 estão indicadas as principais necessidades nutricionais da *Z. mobilis*, algumas funções e limitações dos nutrientes (ANDRADE, 2000).

Composto	Fonte	Funções	Limitações
C, H e O.	Glicose, frutose, ou fontes complexas de carboidratos, como: melações de beterraba e da cana-de-açúcar.	Estes elementos essenciais para a constituição celular, sendo essenciais para o crescimento das células.	Em excesso podem inibir o crescimento celular.
N	Peptídeos, aminoácidos, uréia, e sais de amônia.	A utilização de peptídeos e aminoácidos produz altos rendimentos na produção de etanol. Pode-se utilizar uréia como fonte de N devido ao seu baixo custo.	Os nitritos e nitratos não são assimilados pelas <i>Z. mobilis</i> . É preciso ter uma atenção especial com relação à variação de pH provocada pela adição de algumas fontes de N. Ex: a utilização do NH_4SO_4 leva à formação de H_2SO_4 . Quando se utiliza uréia é necessário se adicionar biotina para que esta possa ser rapidamente assimilada.
S	Sulfatos, sulfitos, metionina, tiamina e pequenas quantidades de cisteína.	50% do enxofre que constitui as células provém dos sulfatos e da metionina, enquanto que a origem do restante é desconhecida.	-
PO_4^{3-}	H_3PO_4 e KH_2PO_4	Os íons fosfato facilitam o catabolismo das células. Utilizar o KH_2NH_4 fornece também potássio.	A limitação de íons fosfato pode implicar em uma redução de 20% na atividade catabólica das <i>Z. mobilis</i> . Concentrações muito elevadas de KH_2PO_4 inibem o crescimento destas bactérias.
Íons metálicos	MgCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, e outros	Os íons Mg^+ são importantes na prevenção da degradação do RNA e no prolongamento da viabilidade celular das <i>Z. mobilis</i> . Com concentrações elevadas de íons magnésio verifica-se um aumento da fase exponencial de crescimento das células.	A adição de numerosos compostos metálicos estimula o crescimento dos microorganismos, contudo em concentrações muito elevadas podem diminuir a velocidade de crescimento. A adição em excesso de NaCl pode inibir o crescimento das células.
Vitaminas e fatores de crescimento	Acido pantotênico, biotina e ocasionalmente outros fatores de crescimento.	As vitaminas e fatores de crescimento são necessários em pequenas quantidades para o funcionamento normal do metabolismo celular. Para as <i>Z. mobilis</i> , a adição em excesso destes compostos não é tóxica.	As necessidades das <i>Z. mobilis</i> , em vitaminas e fatores de crescimento, dependem muito das cepas e da idade das culturas.

Quadro 2 - Necessidades nutricionais da *Z. mobilis* (ANDRADE, 2000).

3.4 Produção de levana

A produção de levana tem sido amplamente estudada em *Bacillus subtilis* e *Z. mobilis* (SANGILYANDI; RAJ; GUNASEKARAN, 1999b), sendo que o processo de fermentação mais utilizado é em batelada, que tem a vantagem de acelerar a taxa de crescimento celular e facilitar a recuperação do produto (VIKARI, 1986; BEKERS et al., 2001; ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 2001; CALAZANS et al., 2000). A produção de levana por *Z. mobilis* ocorre na ausência ou baixa taxa de crescimento celular (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999c) e está sempre relacionada a baixas produtividades de etanol, sendo considerada um produto indesejado que contribui para a diminuição da produção de etanol a partir da sacarose (FALCÃO DE MORAES et al., 1993).

A temperatura e o pH desempenham um papel importantíssimo na formação de produtos em processos fermentativos. Na fermentação de sacarose por *Z. mobilis*, esta formação de produtos está intimamente relacionada à taxa de hidrólise da sacarose que depende da temperatura do processo fermentativo e pH (LOPES et al., 1991; LYNESS; DOELLE, 1981; LYNESS; DOELLE, 1983). A temperatura ótima para o processo fermentativo de produção de levana tem sido descrito como 25 °C (ANANTHALAKSHMY, GUNASEKARAN, 1999b), sendo que acima de 30 °C, a síntese de levana é substancialmente inibida. Diversos autores relatam que o pH ótimo para a produção de levana é 5,0, com pouca formação em pH 6,5 quando a taxa de hidrólise de sacarose é alta (DOELLE et al., 1993).

Segundo Bekers e colaboradores (2002) para a produção de levana a concentração de sacarose do meio de fermentação e a temperatura do processo fermentativo são os dois fatores mais importantes que regulam a atividade da levanasacarase e conseqüentemente a

síntese de levana. A presença de sacarose no meio de cultura é um fator essencial para que ocorra a produção de levana, não sendo observada a produção em meios contendo somente glicose e ou frutose como fonte de carbono (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999c).

Doelle e colaboradores (1993) afirmam que a produção de levana é notadamente diminuída quando ocorre a adição de glicose ao meio de cultura, pois a levanasacarase é drasticamente inibida. Entretanto a adição de levana de baixo peso molecular aumenta a taxa de síntese de levana por agir como um iniciador de cadeia. A formação de levana durante a fermentação, depende da razão de hidrólise da sacarose, ou seja, dos níveis de sacarose, glicose e frutose no meio; uma alta taxa de hidrólise de sacarose com acúmulo de açúcares monoméricos conduz a uma baixa produção de levana (VIAKARI; GISLER, 1986).

Outros fatores podem influenciar a produção de levana como: presença de levana pré-formadas, força iônica e constante dielétrica do meio de reação (CHAMBERT; PETIT-GLATRON, 1993). A produção de levana é aumentada quando condições limitantes de crescimento são aplicadas ao microrganismo, como a ausências de biotina, ácido pantotênico e ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no meio de cultura (MURO et al., 2000).

A osmolaridade do meio é um outro fator extremamente essencial para a produção de levana, os sais de sódio e potássio levam a um aumento na síntese de levana e sorbitol, possivelmente devido a um efeito de osmoproteção da célula (BEKERS et al., 2001), Singh e Fett (1995) descreveram que o aumento na osmolaridade do meio de fermentação estimulou a produção de levana em linhagens de *Pseudomonas* (SINGH; FETT, 1995)

Vigants e colaboradores (1998) estudaram o efeito do cloreto de sódio sobre a atividade de levanasacarase de *Z. mobilis* e observaram que a adição de NaCl e KCl, ao meio de cultivo estimula a síntese de levana, sendo que este estímulo pode ser devido a diversos fatores como: influência direta dos sais na ativação do gene da levanasacarase, estímulo à secreção de levanasacarase no meio de cultura e ativação direta da levanasacarase pelo NaCl e KCl. A ativação direta da enzima levanasacarase pelo NaCl e KCl é maior em baixas concentrações de substrato sacarose (VIGANTS et al., 1998).

3.5 Substratos: Caldo e melão de cana-de-açúcar.

Diversos autores nos últimos anos têm dado enfoque à produção de metabólitos biotecnológicos utilizando fontes alternativas de substratos procurando reduzir custos de produção e impactos ambientais no caso desses substratos serem resíduos agroindustriais. Dentre alguns substratos utilizados podemos citar: caldo de cana-de-açúcar (HAN; WATSON, 1992), melão de cana-de-açúcar (CAZZETA et al., 2005), melão de beterraba (BEKERS et al., 2001), silagem de arroz (BEKERS, 2002) e soro de leite (MACEDO et al., 2002).

Para a produção de levana autores descrevem a utilização de substratos alternativos. Han e Watson (1992) utilizaram *Bacillus polymyxa* em caldo de cana-de-açúcar e melão de beterraba, observando que a produção de levana poderia ser aumentada com a adição de peptona. Bekers e colaboradores (2001a) utilizaram como substrato alternativo xarope de beterraba observando que a suplementação com extrato de levedura e minerais estimulavam o crescimento e a síntese de levana. Porém ao utilizarem suco e xarope de beterraba sem adição de vitaminas ou sais, obtiveram uma baixa produção de levana.

O caldo e o melaço de cana-de-açúcar são substratos complexos com uma alta concentração de sacarose com uma grande variedade de sais que são necessários para produção de metabólitos de interesse industrial. A produção mundial de cana-de-açúcar está diretamente relacionada com a produção de açúcar e encontra na beterraba açucareira seu grande competidor mundial. A produção mundial situou-se, entre 1993 e 1995, na faixa de 112 milhões de toneladas, destacando-se como principais produtores Brasil, Tailândia, Austrália, Cuba, Índia e CEE (beterraba). O Brasil possui uma posição privilegiada na produção de cana-de-açúcar (Tabela 1) e conta com uma avançada tecnologia de produção de álcool anidro a partir da cana-de-açúcar. Tem o menor custo de produção do mundo e ainda possui potencial de expansão de área plantada e de produtividade (PESSOA, 2000).

Tabela 1- Produção de cana-de-acúcar no Brasil, por Região, 1995/2000 (PESSOA, 2000).

Estados/Anos	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Var % a.a
Paraná	19.350	21.000	23.000	24.500	26.000	28.000	7,7
São Paulo	174.180	180.000	185.000	190.000	195.000	200.000	2,8
Minas Gerais	16.726	17.000	18.000	19.000	19.500	20.000	3,6
Centro-oeste	19.267	21.000	24.000	27.500	31.000	34.000	12,0
Alagoas/Pernambuco	42.314	35.000	36.000	37.500	39.000	40.000	1,1
Outros	49.014	50.000	52.000	53.500	55.000	56.500	2,9
Total Brasil	320.851	324.000	338.000	352.00	365.500	378.500	3,4

*Produção em milhões de toneladas

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto do refino do açúcar, é um líquido escuro viscoso que contém uma alta quantidade de açúcares que não podem ser cristalizados por métodos convencionais. No Brasil, o melaço é enviado as destilarias como substrato para a produção de etanol. O meio de fermentação para a produção de etanol normalmente é uma mistura de caldo e melaço de cana-de-açúcar (FALCÃO DE MORAIS et al., 1993). Na Tabela 2 é mostrada a composição média do melaço de cana-de-açúcar (CURTIN, 1983).

Tabela 2 - Composição do melaço de cana-de-açúcar (CURTIN, 1983).

COMPOSIÇÃO DO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR		TEOR
Concentração de sólidos – Brix (°B)		79,5
Sólidos totais (%)		75,0
Açúcares totais (%)		46,0
Proteínas (%)		3,0
Extrato livre de nitrogênio (%)		63,0
Lipídios totais (%)		0,0
Fibras totais (%)		0,0
Cinzas (%)		8,1
MINERAIS		
Cálcio (%)		0,8
Fósforo (%)		0,08
Potássio (%)		2,4
Sódio (%)		0,2
Cloro (%)		1,4
Enxofre (%)		0,5
MINERAIS TRAÇO		
Cobre (mg/Kg)		36,0
Ferro (mg/Kg)		249,0
Manganês (mg/Kg)		35,0
Zinco (mg/Kg)		13,0
VITAMINAS		
Biotina (mg/Kg)		0,36
Colina (mg/Kg)		745,0
Ácido pantotênico (mg/Kg)		21,0
Riboflavina (mg/Kg)		1,8
Tiamina (mg/Kg)		0,9

O caldo de cana-de-açúcar é uma fonte renovável e relativamente barata de sacarose, que é obtida a partir do esmagamento da cana-de-açúcar. No Brasil é o principal substrato para a produção de etanol e açúcar. Na Tabela 3 é mostrada a composição do caldo de cana-de-açúcar (COPERSUCAR, 2005).

No emprego de substratos alternativos e complexos em processos fermentativos, como o caldo de cana-de-açúcar ou o melaço, são necessários estudos para avaliar a composição destes meios, evitando a suplementação desnecessária destes meios complexos com vitaminas e sais minerais, quando se adapta as formulações de meios definidos aos meios complexos.

Tabela 3 - Composição média da cana-de-açúcar (COPERSUCAR, 2005)

COMPOSIÇÃO MÉDIA DA CANA-DE-AÇÚCAR	
COMPOSIÇÃO:	TEOR
Água	65 - 75
Açúcares	11 - 18
Fibras	8 - 14
Sólidos solúveis	12 - 23
PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA CANA-DE-AÇÚCAR	
CONSTITUINTES:	SÓLIDOS SOLÚVEIS (%)
Açúcares	75 a 93
Sacarose	70 a 91
Glicose	2 a 4
Frutose	2 a 4
Sais:	
- de ácidos inorgânicos	1,5 a 4,5
- de ácidos orgânicos	1,0 a 3,0
Proteínas	0,5 a 0,6
Amido	0,001 a 0,05
Ceras e graxas	0,05 a 0,15
Corantes	3 a 5

Considerando o amplo campo de aplicação da levana, a capacidade produtora da bactéria *Z. mobilis*, a possibilidade de utilização de substratos regionais e de baixo custo e a necessidade da otimização destes meios de fermentação alternativos. Este trabalho visou analisar através de instrumentos estatísticos a produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821, através do estudo das variáveis: tempo de fermentação, concentração de açúcares, tipos de substratos e constituintes do meio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 *Microorganismo*

O microrganismo utilizado para os experimentos foi a bactéria *Z. mobilis* ATCC 31821, cedida pelo Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP - Rio Claro.

4.1.2 *Meios de cultura*

4.1.2.1 *Meio de preservação*

Constituinte	Concentração em g/L
Sacarose	20
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,5
Ágar (Meio sólido)	20

4.1.2.2 *Meio de obtenção de inóculo*

Constituinte	Concentração em g/L
Sacarose	100
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,5

4.1.2.3 Meio de fermentação de sacarose (CALAZANS et al., 1997).

Constituinte	Concentração em g/L
Sacarose	150
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	2
(NH ₄)SO ₄	1
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,5

4.1.2.4 Meio de fermentação de caldo de cana-de-açúcar

O caldo de cana-de-açúcar foi previamente autoclavado, filtrado e os açúcares redutores totais (ART) foram quantificados pelo método do Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A partir dessa dosagem correções foram realizadas com sacarose comercial até atingir a concentração desejada de 250 g/L de ART. Este meio suplementado com os constituintes do meio de fermentação de sacarose (4.1.2.3).

Constituinte	Concentração em g/L
Caldo de cana-de-açúcar	250*
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,5

* concentração em g/L de ART.

4.1.2.5 Meio de melação de cana-de-açúcar

O melação de cana-de-açúcar foi previamente pré-diluído, autoclavado, filtrado e os açúcares redutores totais foram quantificados pelo método do Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A partir dessa dosagem correções foram realizadas com diluições até atingir a concentração desejada de 250 g/L de ART. Este meio foi suplementado com os constituintes do meio de fermentação de sacarose (4.1.2.3).

Constituinte	Concentração em g/L
Melaço de cana-de-açúcar	250
Extrato de levedura	2
KH_2PO_4	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
$\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	0,5

* concentração em g/L de ART.

4.2 Métodos

4.2.1 Planejamento estatístico

A análise estatística foi realizada em três etapas:

- 1ª Etapa:

Otimização da concentração de sacarose e tempo para a produção de levana.

- 2ª Etapa:

Avaliação dos efeitos dos sais constituintes do meio na fermentação em sacarose, para a produção de levana.

- 3ª Etapa:

Avaliação das fontes de carbono complexas (caldo de cana-de-açúcar e melaço de cana-de-açúcar) e suplementações com os constituintes do meio, para a produção de levana.

4.2.1.1 Planejamento estatístico: 1ª Etapa.

Para esta etapa utilizou-se o meio de fermentação de sacarose descrito em 4.1.2.3, onde se variou a concentração de sacarose (variável independente X_1) e tempo de fermentação (variável independente X_2), utilizando-se para a otimização o delineamento estatístico fatorial completo do tipo 3^2 com duas repetições verdadeiras no ponto central, totalizando 11 experimentos; o qual é mostrado na Tabela 4 com as variáveis codificadas e decodificadas.

Tabela 4 - Delineamento fatorial completo do tipo 3^2 com duas repetições verdadeiras no ponto central para avaliar o efeito da concentração de sacarose e tempo de fermentação na produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821.

ENSAIOS*	VARIÁVEIS CODIFICADAS		VARIÁVEIS DECODIFICADAS	
	X ₁	X ₂	Concentração de Sacarose (g/L)	Tempo de Fermentação (H)
01	-1	-1	150	12
02	-1	0	150	18
03	-1	1	150	24
04	0	-1	250	12
05	0	0	250	18
06	0	1	250	24
07	1	-1	350	12
08	1	0	350	18
09	1	1	350	24
10	0	0	250	18
11	0	0	250	18

*Ensaios aleatorizados.

4.2.1.2 Planejamento estatístico: 2ª Etapa

Nesta etapa foram avaliados os efeitos dos constituintes do meio de fermentação de sacarose descrito em 4.1.2.3, na produção de levana por *Z. mobilis*, onde variou-se a presença (+1) e ausência (-1) dos sais. O tempo de fermentação (24 h) e a concentração de sacarose (250 g/L) foram fixadas a partir dos resultados obtidos na 1ª etapa do planejamento estatístico. Para a 2ª etapa foi utilizado o planejamento estatístico fatorial fracionado de resolução IV do tipo 2^{4-1} totalizando 8 experimentos, que é mostrado na Tabela 5 em variáveis codificadas e decodificadas.

Tabela 5 - Planejamento fatorial fracionado de resolução IV do tipo 2^{4-1} , para avaliar os efeitos dos sais do meio de fermentação na produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821.

ENSAIOS*	VARIÁVEIS CODIFICADAS				VARIÁVEIS DECODIFICADAS			
	Extrato Levedura	KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄	Extrato Levedura (g.L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	MgSO ₄ (g.L ⁻¹)
01	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0
02	1	-1	-1	1	2	0	0	0,5
03	-1	1	-1	1	0	2	0	0,5
04	1	1	-1	-1	2	2	0	0
05	-1	-1	1	1	0	0	1	0,5
06	1	-1	1	-1	2	0	1	0
07	-1	1	1	-1	0	2	1	0
08	1	1	1	1	2	2	1	0,5

*Ensaio aleatorizados.

4.2.1.3 - Planejamento estatístico 3ª Etapa

Na 3ª etapa avaliou-se a produção de levana por *Z. mobilis* utilizando-se as fontes de carbono complexas: caldo de cana-de-açúcar e melão de cana-de-açúcar, como variáveis qualitativas. Avaliaram-se também os efeitos dos constituintes dos meios de fermentação de caldo de cana-de-açúcar e melão de cana-de-açúcar descrito respectivamente em 4.1.2.2 e 4.1.2.3.

O tempo de fermentação (24 h) e a concentração de açúcares (250 g.L⁻¹) foram fixados a partir dos resultados obtidos na 1ª etapa do planejamento estatístico. Para a 3ª etapa foi utilizado o planejamento estatístico fatorial completo do tipo 2^5 totalizando 32 experimentos que é mostrado na Tabela 6 em variáveis codificadas e decodificadas.

Tabela 6 - Planejamento fatorial completo do tipo 2⁵ totalizando 32 experimentos, para avaliar os efeitos das fontes de carbono (caldo de cana-de-açúcar e melação de cana-de-açúcar) e sais constituintes dos meios de fermentação na produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821.

Ensaio*	VARIÁVEIS CODIFICADAS					VARIÁVEIS DECODIFICADAS				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Fonte de Carbono	Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	MgSO ₄ (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	1	Melaço	0	0	0	0,5
2	1	-1	-1	-1	-1	Caldo	0	0	0	0
3	-1	1	-1	-1	-1	Melaço	2	0	0	0
4	1	1	-1	-1	1	Caldo	2	0	0	0,5
5	-1	-1	1	-1	-1	Melaço	0	2	0	0
6	1	-1	1	-1	1	Caldo	0	2	0	0,5
7	-1	1	1	-1	1	Melaço	2	2	0	0,5
8	1	1	1	-1	-1	Caldo	2	2	0	0
9	-1	-1	-1	1	-1	Melaço	0	0	1	0
10	1	-1	-1	1	1	Caldo	0	0	1	0,5
11	-1	1	-1	1	1	Melaço	2	0	1	0,5
12	1	1	-1	1	-1	Caldo	2	0	1	0
13	-1	-1	1	1	1	Melaço	0	2	1	0,5
14	1	-1	1	1	-1	Caldo	0	2	1	0
15	-1	1	1	1	-1	Melaço	2	2	1	0
16	1	1	1	1	1	Caldo	2	2	1	0,5
17	1	1	1	1	-1	Caldo	2	2	1	0
18	-1	1	1	1	1	Melaço	2	2	1	0,5
19	1	-1	1	1	1	Caldo	0	2	1	0,5
20	-1	-1	1	1	-1	Melaço	0	2	1	0
21	1	1	-1	1	1	Caldo	2	0	1	0,5
22	-1	1	-1	1	-1	Melaço	2	0	1	0
23	1	-1	-1	1	-1	Caldo	0	0	1	0
24	-1	-1	-1	1	1	Melaço	0	0	1	0,5
25	1	1	1	-1	1	Caldo	2	2	0	0,5
26	-1	1	1	-1	-1	Melaço	2	2	0	0
27	1	-1	1	-1	-1	Caldo	0	2	0	0
28	-1	-1	1	-1	1	Melaço	0	2	0	0,5
29	1	1	-1	-1	-1	Caldo	2	0	0	0
30	-1	1	-1	-1	1	Melaço	2	0	0	0,5
31	1	-1	-1	-1	1	Caldo	0	0	0	0,5
32	-1	-1	-1	-1	-1	Melaço	0	0	0	0

* Ensaios aleatorizados.

4.2.2 Preservação do microrganismo

O microrganismo *Z. mobilis* foi preservado no meio descrito em 4.1.2.1 com a concentração de sacarose a 20 g.L⁻¹. O repique das culturas foi realizado a cada quatro semanas e conservado em câmara fria a 4°C. A cada repique foi realizado o teste de Gram para verificar a pureza da cultura.

4.2.3 Inóculo

O inóculo foi obtido através do cultivo da bactéria *Z. mobilis* no meio de obtenção de inóculo (item 4.1.2.2), mantido por 24 h a 28°C em frascos Erlenmeyers de 125mL com um volume de trabalho de 25 mL . No final do cultivo o meio foi centrifugado por 20 min a 5000xg, o sobrenadante descartado e as células foram assepticamente re-suspensas em solução salina (NaCl 0,9%), posteriormente calculou-se a concentração de células em comprimento de onda de 605nm, sendo o inóculo padronizado em 0,2g/L de células para todos os experimentos.

4.2.4 Processo fermentativo

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL com um volume de meio de 25 mL, mantidas estaticamente em uma temperatura de 25°C, conforme os delineamentos estatísticos (Tabelas 4, 5 e 6). Para cada fermentação foram realizadas as análises de biomassa, açúcar consumido, levana, atividade de levanasacarase e atividade de invertase, conforme diagrama esquemático demonstrado na Figura 3.

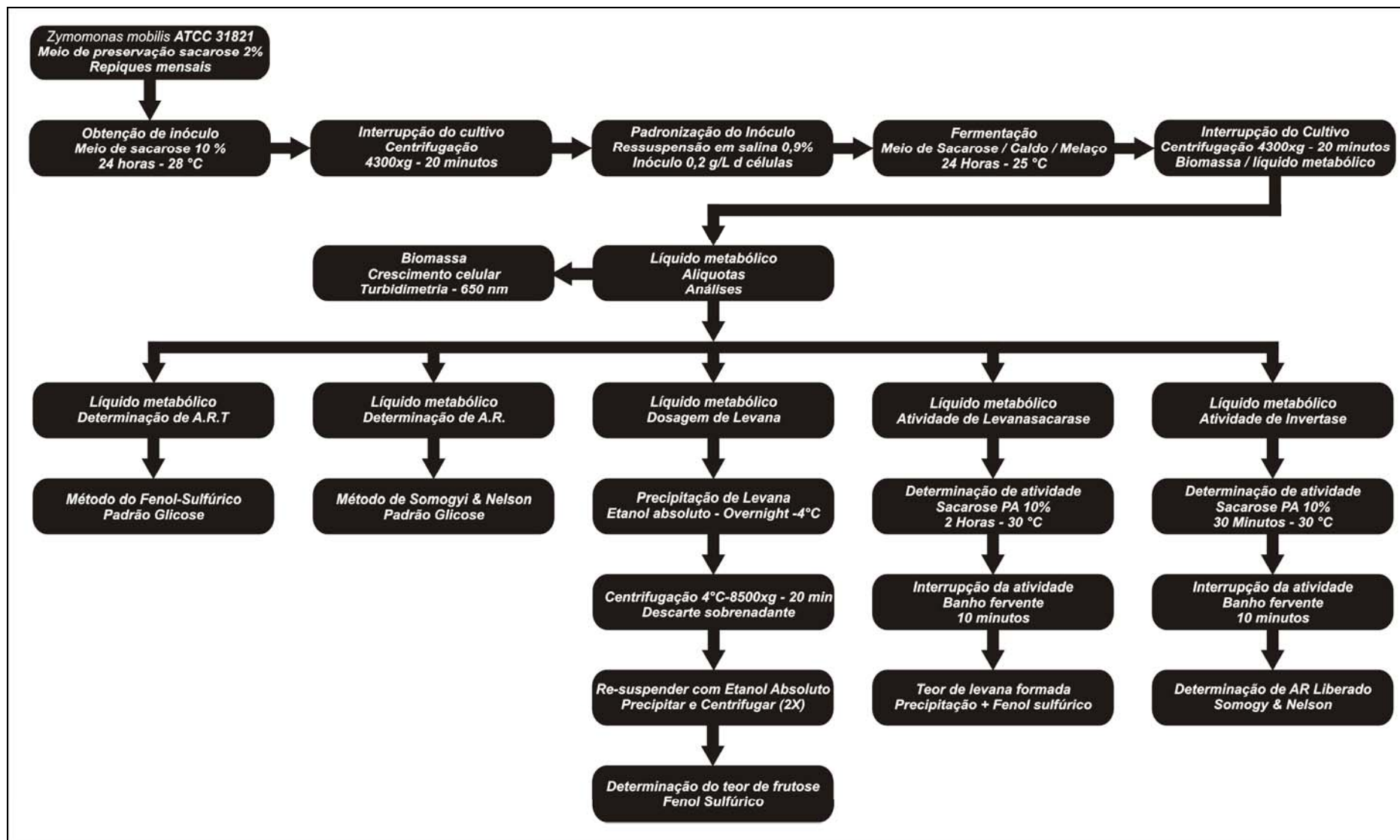


Figura 3 – Fluxograma do desenvolvimento dos experimentos e determinações realizadas no líquido metabólico e biomassa.

4.2.5 Determinação da biomassa

Os meios de cultivos foram centrifugados a 4300xg por 20 min, as células obtidas foram re-suspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v), 3 alíquotas de 1 mL foram transferidas para frascos previamente tarados e submetidos a secagem até atingirem peso constante.

Paralelamente uma das alíquotas deste cultivo sofreu uma série de diluições para a obtenção de leituras de absorvância que variem entre 0,1 a 0,7 em comprimento de onda de 605 nm. Em seguida foram plotados em gráfico os valores das absorvâncias das alíquotas correspondentes ao seu peso seco. Esta curva foi utilizada como padrão para acompanhamento do crescimento celular.

4.2.6 Determinação de Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART)

A determinação de ART foi realizada pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Na confecção da curva padrão foi utilizada glicose P.A. variando-se a concentração de 0 a 100 µg/mL e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm.

A determinação de AR foi realizada pelo método de Somogy & Nelson (NELSON, 1944; SOMOGY, 1945). Na confecção da curva padrão foi utilizada glicose P.A. variando-se a concentração de 0 a 100 µg/mL e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm.

4.2.7 Separação de levanas

A separação da levana foi realizada através da centrifugação (5000xg, 4°C por 20 min) para retirada das células do meio de fermentação, a levana posteriormente foi precipitada através da adição de etanol absoluto em baixa temperatura (5 +/- 1 °C) com a relação álcool:sobrenadante de 3:1 (v/v); após a precipitação, procedeu-se a uma nova centrifugação sendo o precipitado re-suspenso em H₂O destilada e repetido o processo de precipitação por duas vezes.

4.2.8 Determinação do teor de levana

A levana submetida ao procedimento 4.2.7 (separação de levana) foi quantificada pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS, et al., 1956). Na confecção da curva padrão foi utilizada frutose P.A. variando-se a concentração de 0 a 100 µg/mL e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm.

4.2.9 - Determinação de atividade da levanasacarase

O meio de fermentação foi centrifugado a 5000xg por 20 min a 4°C para a retirada de células, sendo o sobrenadante utilizado para fonte da enzima levanasacarase; a atividade da levanasacarase foi determinada incubando-se 9 mL de solução de sacarose PA 10% (p/v) dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 com 1 mL da solução sobrenadante incubando-se a 30°C por 2 h, posteriormente a reação foi interrompida em banho-maria a 100 °C por 10 min.

A atividade de levanasacarase foi determinada através da concentração de levana formada presente no meio de reação, utilizando os mesmos procedimentos descritos em 4.2.7 e 4.2.8 (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999c). Uma unidade de atividade da levanasacarase foi expressa como a quantidade de enzima requerida para produzir $1\mu\text{mol}$ de levana (expressa em unidade de frutose) por ml por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

4.2.10 - Determinação de atividade da invertase

O meio de fermentação foi centrifugado a $5000xg$ por 20 min a 4°C para a retirada de células, sendo o sobrenadante utilizado para fonte da enzima invertase; a atividade da invertase foi determinada incubando-se 9 mL de solução de sacarose PA 10% (p/v) dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 com 1 mL da solução sobrenadante incubando-se a 30°C por 30 min, posteriormente a reação foi interrompida em banho de água fervente por 10 min.

A atividade de invertase foi determinada através da concentração de açúcares redutores liberados no meio de reação, os açúcares redutores foram determinados pelo Método de Somogy & Nelson (NELSON, 1944; SOMOGY, 1945). Uma unidade de atividade da invertase foi expressa como a quantidade de enzima requerida para liberar $1\mu\text{mol}$ de açúcar redutores (expressa em unidade de glicose) por ml por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999c).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados na forma de artigo, o qual foi elaborado de acordo com as normas da revista *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (ISSN: 1367-5435), que são mostradas no Anexo A.

O artigo intitulado "Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources" é apresentado no Anexo B, tendo sido submetido ao *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* na data de 12 de maio de 2005.

Os resultados complementares deste trabalho estão descritos no Anexo C, os quais mostram a cinética das fermentações e atividades enzimáticas (levanasacarase e invertase) de todos os experimentos realizados.

6 CONCLUSÕES

- Na primeira etapa da otimização da concentração de sacarose e tempo de fermentação verificou-se que as melhores condições para produção de levana foram sacarose a 250 g/L e tempo de fermentação de 24 horas onde a produção atingiu 21,685 g/L de levana.

- Quanto à influência e interação dos sais no meio de sacarose os resultados mostraram que o extrato de levedura e o fosfato de potássio foram significativos para a produção de levana.

- O caldo de cana-de-açúcar foi mais adequado para a produção de levana quando comparado ao melaço que inibiu a produção.

- Comparando as fontes de carbono testadas quanto a produção de levana, os melhores resultados foram: 21,685 g/L, 15,423 g/L e 5,234 g/L nos meios de sacarose, caldo de cana-de-açúcar e melaço respectivamente.

- Embora o caldo de cana-de-açúcar produza em torno de 28,724% a menos de levana em comparação a sacarose comercial, a produção de biomassa no caldo é 2,76 vezes maior que na sacarose comercial (0,857g/L e 2,366 g/L) o que poderia justificar uma produção acoplada de levana e biomassa de *Z. mobilis*, como fonte protéica de possível aplicação alimentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AÏT-ABDELKADER, N. et al. The intracellular sucrose (SacA) of *Zymomonas mobilis* is not involved in sucrose assimilation. *Biotechnology Letters*, v.22, p.461–467, 2000.
- AMMAR, T.B. et al. Characterization of a thermo stable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of production high molecular weight levan high temperature. *Journal of Biotechnology*, v.23, n. 99, p. 111-119, 2002.
- ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.42, n.3, p.291-297, 1999a.
- ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 87, n.2, p.214-217, 1999b.
- ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned sacB gene. *Enzyme and Microbial Technology*, v.25, p.109–115, 1999c.
- ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by in vitro mutagenesis and elevated temperature. *Process Biochemistry*, v.36, p.543-548, 2001.
- ANDRADE, I.D. Monitorização de um processo de fermentação alcoólica em contínuo. Universidade de Coimbra - Faculdade de Ciências e Tecnologia - Departamento de Engenharia Química, 2000.
- BEKERS, M. et al. The effect of osmo-induced stresses on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, n. 55, p.147-150, 2001.
- BEKERS, M. et al. Sugar beet juice fermentation by *Zymomonas mobilis* attached to stainless steel wire spheres. *Acta Biotechnol.*, v.21, p. 89-96, 2001a.
- BEKERS, M. et al. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase, *Process Biochemistry*, n.38, p.701-706, 2002.
- BERGERON, L.J.; MOROU-BERMUDEZ, E.; BURNE, R.A. Characterization of the Fructosyltransferase Gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. *Journal of Bacteriology*, v.182, n.13, p.3649–3654, 2000.
- CALAZANS, G.M.T., et al. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.27, p.245–247, 2000.
- CALAZANS, G.M.T.; et al. Antitumoural activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, v.19, n.1, p.19-21, Jan. 1997.
- CAZETTA, M.L., et al. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochemistry*, v.40, p.747-751, 2005.

- CHAMBERT, R.; PETIT-GLATRON, M.F. Immobilization of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydrate Research*, v.244, p.129-136, 1993.
- CHUNG, B.H. et al. Novel polyethylene glycol/levan aqueous two-phase system for protein partitioning. *Biotechnology Techniques*, v.11, n.5, p.327-329, 1997.
- CLARKE, M.A. et al. Polyfructose: a new microbial polysaccharide. *Carbohydrates as Organic Raw Materials*, New York, v.8, p.169-182, 1990.
- CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Reviews*, n.103, p.1-28, 1992.
- COPERSUCAR. Cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.copersucar.com.br/institucional/academia/cana_acucar.asp>. Acesso em: 04 abr. 2005.
- CURTIN, L.V. Molasses - General considerations. *Molasses in Animal Nutrition*. National Feed Ingredients Assoc., West Des Moines, 1983.
- DAWES, E.; RIBBONS, D.; REES, D.A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of levan. *Biochemical Journal*, v.98, p.804-812, 1966.
- DOELLE, H. W.; KIRK, L; CRITTENDEN, R.; HSEIN T. *Zymomonas mobilis* – Science and Industrial Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.13, n.1, p.57-98, 1993.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.* n.9, p.77-103, 1956.
- FALCÃO DE MORAES, J. O. et al. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. *Journal of Biotechnology*. v.31, p.75-91, 1993.
- FRANZ, G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med.*, n.55, p.493-497, 1989.
- HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. Production and characterization of microbial levan. *Journal of Agric. Food Chemical*, New Orleans, v.38, 393-396, 1990.
- HAN, Y.W.; WATSON, M.A. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology*, v.9, p.257-260, 1992
- HIBERT, H.; TIPSON, R. S. The structure of gum levan. *Pulp and Paper Research Institute*, v.52, p.25-82, 1930.
- ILAN, Y. W. Microbial levan. *Advanced Applied Microbiology*, n.35; p.171-194, 1990.
- JANG, K.H. et al. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.23, p.339-344, 2001.
- JUNG, I.C. et al. Cultural condition for the mycelial growth of *Phellinus igniarius* on chemically defined medium and grains. *Korean J. Mycol.*, n.25, p.133-142, 1997.

- KANNAN, T.R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAM, P. Influence of intra- and extra cellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by-product formation. *Biotechnology Letters*, v.19, n.7, p.661-664, 1997.
- KERSTERS, K.; DE LEY, J. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *J. Microbiol. Serol.*, v.34, p.393-408, 1968.
- LOPES, C.E. et al. On the effect of temperature and pH on the setting behavior of a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.13, p.34-46, 1991.
- LYNESS, E.W.; DOELLE, H.W. Fermentation pattern of sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, v.23, p.1449-1460, 1981.
- LYNESS, E.W.; DOELLE, H.W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.5, p.345-350, 1983.
- KORAKLI, J. et al. Sucrose metabolism exopolysaccharides production in wheat and rye by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal Agriculture Food Chemical*, v.49, p. 5194-5200, 2000.
- KULICKE, W.M.; LETTAU, A.I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1→3) β-D-glucans. *Carbohydr. Res.*, n.297, p.135-43, 1997.
- MACEDO, M.G. et al. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate., *International Dairy Journal*, v.12, p.419-426, 2002.
- MIASNIKOV, A. N. Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp. L7. *FEMS Microbiology Letters*, v. 154, p.23-28, 1997.
- MONSAN, P. et al. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v.11, p.675-685, 2001.
- MURALIDHARAN, J.; JAYACHANDRAN, S. Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Process biochemistry*, n.38, p.841-847, 2003.
- MURO, A.C. et al. Levan production using mutants strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. *Biotechnology Letters*, v.22, p.1639-1642, 2000.
- NELSON, N., A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry*, v.84, p. 375-380, 1944.
- O'MULLAN, P., SZAKACS-DOBOZI, M.; EVELEIGH, D.E. Identification of saccharolytic enzymes by *Zymomonas mobilis* CP4. *Biotechnology Letters*, v. 13, p.137-142, 1991.
- OOI, V.E.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr. Méd. Chem.*, v.7, p.715-729, 2000.
- OSEGUERA, M.A.; GUERECAL, L.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.45, p. 465-471, 1996.

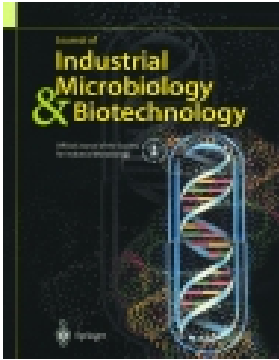
- PALHA, M.A.P.F. et al. The influence of centrifugation on *Zymomonas mobilis* aggregation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.5, p.272-278, 2002.
- PARKER, C. et al. Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.3519-3525, 1997.
- PESSOA, A. Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/economia/agric/producao/cana/apresent.htm>>. Acesso em: 04 abr. 2005.
- PONTIS, H.G.; DELL CAMPILLO, E. *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, Academic Press, New York, p.205-227, 1985.
- SANGILYANDI, G. et al. Separation of levan-formation and sucrose-hydrolysis catalyzed by Levansucrase of *Zymomonas mobilis* using in vitro mutagenesis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.42, n.7, p.575-579, 1999.
- SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. A simple method for purification of thermostable levansucrase of *Zymomonas mobilis* from a recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, v.33, p.153–156, 1998.
- SANGILYANDI, G.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Elevated temperature and chemical modifications selectively abolishes levan forming of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.21, p.179-182, 1999a.
- SANGILYANDI, G.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Elevated temperature and chemical modifications selectively abolishes levan forming of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.21, p.179-182, 1999b.
- SAUDE, N.; JUNTER, G.A. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter inelandii*. *Process Biochemistry*, n.37, p.895–900, 2002.
- SELBMANN, L. et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Research in Microbiology*, v.153, p.585-592, 2002.
- SEVIOUR, R.J. et al. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Crit. Rev. Biotechnology*, v.12, p.279-298, 1992.
- SHIMMWELL, J.L. Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobicum* sp. nov.) producing alcoholic fermentation of glucose. *Journal of Institute Brewing*. v.43, p.507-509, 1937.
- SIMMS, P.J.; BOKYO, W. J.; EDWARDS, J. R. The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v.208, p.193-198, 1990.
- SINGH, S; FETT, W.F. Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent *Pseudomonads* in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity. *FEMS Microbiology Letters*, v.130, p.130-301-306, 1995.
- SOMOGY, M.A, A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry*, v.160, p.61-68, 1945.

- SONG, K.B. et al. Characteristics of levan fructotransferase from *Arthrobacter ureafaciens* K203 and difructose anhydre IV formation from levan. *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, p.212-218, 2000.
- SPRENGER, G.A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis* a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 146, p.301-307, 1996.
- VIGANTS, A.; ZIKMANIS, P.; BEKERS, M. Sucrose medium osmolality as a regulator of anabolic and catabolic parameters in *Zymomonas* culture. *Acta Biotechnology*, v.16, n.4, p.321-327, 1996.
- VIIKARI, L.; GISLER,R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.23, p.240-244, 1986.
- VIJN, I.; SMEEKENS,S. Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate?. *Plant Physiology*, v.120, p.351-359, 1999.
- VUYST, L.D.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v.23, p. 153-177, 1999.
- WEI, G. et al. Structural studies of extracellular polysaccharide produced by *Rhizobium fredii* Tu6, a polysaccharide with monosaccharide repeating units. *Bot. Bull. Acad. Science.*, n. 37, p.127-131, 1996.
- YAMAMOTO, Y., et al. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *Journal Nutritional Biochemistry*, v.10, p.13–18, 1999.
- YOO, S., et al. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microbiology*, v.19, p.107-117, 1996.

ANEXO A

Normas para submissão do artigo para a revista *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (ISSN: 1367-5435), disponível em:

- <http://www.springeronline.com/journal/10295/submission>.



Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology
 Official Journal of the Society for Industrial Microbiology
 Editor-in-Chief: J.J. Cooney
 ISSN: 1367-5435 (print version)
 ISSN: 1476-5535 (electronic version)
 Journal no. 10295
 Springer Berlin Heidelberg

Description:

The Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (JIM&B) builds bridges between academia and industry whilst keeping you informed of the most important developments. On a truly international basis, JIM&B covers all aspects of the industrial applications of biotechnology, fermentation, environmental microbiology, biodegradation, biodeterioration, genomics, bioinformatics, quality control and other areas of applied microbiology. A publication of the Society of Industrial Microbiology & Biotechnology.

Impact factor: 1.195 (2003)

Section "Biotechnology & applied microbiology": Rank 67 of 132

Abstracted/Indexed in: BIOSIS, Chemical Abstracts Service, Current Awareness in Biol. Sci., Current Contents, Current Contents/ Life Sciences, EMBASE, Index Medicus, Research Alert, Science Citation Index, SciSearch

Instructions for authors

Manuscript submission

Manuscripts should be submitted in quadruplicate with four sets of illustrations to the Editor-in-Chief. Each manuscript is returned to the corresponding author so that (s)he may deal with the comments of the editor and reviewers. When a revised manuscript is returned to the editor handling it, it should be accompanied by a computer disk containing the text, references and tables in one file and, if possible, figures in a separate file. Acceptable manuscripts will not be forwarded to the publisher without such a disk. Be sure to include your e-mail address and your telephone and fax numbers. Please do not submit electronic data to the editor until you submit your final revision or until your paper is accepted. Submit electronic data to the publisher only upon request.

The journal accepts manuscripts for the following sections:

- Original papers should normally not exceed 16 printed pages (one printed page corresponds to approximately: 850 words text, or 3 illustrations with their legends, or 55 references);
- Short communications should provide a concise preliminary report and should not exceed 3 printed pages;
- Letters to the editor should not exceed 2 printed pages;
- Review papers should be critical reviews on subjects interest to industrial and applied microbiologists. The length of the article will depend on the subject.
- Authors considering preparation of a review should contact the Editor-in-Chief in advance to determine the suitability of the topic.

Editorial Office

Dr. J.J. Cooney,
 Environmental, Coastal and Ocean Sciences Program,
 University of Massachusetts,
 100 Morrissey Blvd.,
 Boston, MA 02125-3393, USA
 Tel: +1 508 747 1816
 Fax: +1 508 747 2230
 e-mail: jjc@capecod.net

Legal requirements Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract, or as part of a published lecture, or thesis); that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities -

tacitly or explicitly - at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

The "Copyright Transfer Statement" has to be signed and faxed to the publisher together with the corrected proofs (see below) with which it will be provided by the publisher shortly after the manuscript has been accepted for publication.

Manuscript preparation

All manuscripts are subject to peer review and copy editing. Manuscripts must be written in English and should be typed in double-line spacing throughout with at least 2.5 cm (1 inch) margins.

Use a normal, plain font (e.g., Times New Roman) for text.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

For indents use tab stops or other commands, not the space bar.

Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.

All manuscripts must conform to the CBE Style Manual for Biological Editors (6th edition).

Abbreviations:

All abbreviations should be indicated parenthetically in the text when the term first appears, except for standard physiological and biochemical abbreviations.

Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

Please arrange your manuscript as follows:

Title page

Including name(s) of author(s), a concise and informative title, affiliation(s) of the author(s), e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author.

Abstract

Each paper must be preceded by an abstract presenting the questions being addressed or the hypothesis being tested, the general methods used (e.g. liquid chromatography and mass spectroscopy) and the most important results and conclusions in generally 250 words or less.

Key words

Up to 5 key words should be supplied after the Abstract for indexing purposes.

Introduction

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature. It should conclude with a concise statement of the author's objectives.

Materials and methods

The Materials and methods section should follow the introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work. The name of suppliers or sources of equipment and chemicals should be given parenthetically with the city, state or county, and country. This information need not be given for common equipment found in most laboratories (balances, pH meters, spectrophotometers) or common chemicals (sodium chloride) the source of which is not crucial to repetition of the work. The grade of chemicals should be stated where they are important to repetition of the work.

Results

Present your findings, stating the major trends shown by data in figures or tables, but do not repeat in the text data that are obvious from the figures or tables. The number of replicates involved and the number of independent repetitions of the experiment or measurement should be stated here or as a footnote to a table.

Discussion

State your conclusions from the data and discuss how they compare with previous published information on the subject. If appropriate, suggest theoretical implications and propose future studies. It is appropriate to combine Results and Discussion, particularly where the results of one experiment are the basis for the next experiment reported in this paper.

Acknowledgements

These should be as brief as possible. Any grant that requires acknowledgement should be mentioned. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citations in the text should be identified by numbers in square brackets.

References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, etc. is added to the year both in the text and in the list of references.

*Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

Example:

Chander M, Arora DS, Bath HK (2004) Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. J Ind Microbiol Biotechnol 31:94-97

If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question.

Example:

Lindberg LE, Willför SM, Holmbom BR (2004) Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s10295-004-0132-y

*Single contributions in a book:

name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers

Example:

Heeschan W, Hahn G (1982) Quality control of media for *Lactobacillus* and *Streptococcus*. In: Corry JE (ed) *Culture media*. GIT-Verlag, Darmstadt, pp 109-119

*Book:

name and initial(s) of all authors; year; title; publisher; place of publication

Example:

Schwarze FW, Engels J, Mattheck C (2000) *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*. Springer, Berlin Heidelberg New York

Tables and figures

Tables

must be numbered consecutively with arabic numerals and submitted separately from the text. They should have a heading explaining any abbreviation used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters.

Illustrations

must be restricted to the minimum needed to clarify the text. All figures (photographs, graphs or diagrams) should be cited in the text, and numbered consecutively throughout. Figure parts should be identified by lower-case roman letters (a, b, etc.). If illustrations are supplied with uppercase labeling, lower-case letters will still be used in the figure legends and citations.

Figure

legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text. Submit all figures on separate sheets, each bearing the figure number and the author's names, and do not integrate them within the text.

Line drawings

Inscriptions should be legible, with initial capital letters and appropriately scaled to the size of the drawing. Letters 2 mm high are recommended. Scanned line drawings should be digitized with a resolution of 800 dpi relative to the final figure size.

Computer drawings

Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings (minimum resolution of 300 dpi). Computer-drawn curves and lines must be smooth. Lettering must be of high quality; Helvetica is the preferred font. Lettering fonts must be consistent within and among all figures.

Half-tone illustrations

(black and white and color) Sharp, well-contrasted photographic prints trimmed at right angles and in the desired final size should be submitted. Magnification should be indicated by scale bars. For scanned half-tone illustrations, a resolution of 300 dpi is usually sufficient, TIFF is the preferred file format.

Color

illustrations

The authors will be expected to make a contribution (485 €, US \$ 534, per paper, plus 16% VAT) towards the extra costs of color reproduction and printing. Save color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format. Plates Several figures or figure parts should be grouped in a plate on one page.

Vector graphics

Fonts used in the vector graphics must be included. Please do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (i.e., 0.567 pt) relative to the final size. EPS is the preferred file format. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure.

Size of figures

The figures, including legends, should either match the column width (86 mm) or the print area of 176 x 236 mm. In case reduction is absolutely necessary, please state the alternative scale desired. The publisher reserves the right to reduce or enlarge illustrations.

General information on data delivery

Please send your accepted manuscript, preferably a zip file (text and illustrations in separate files, unencoded) to the Editor-in-Chief either:
by e-mail (only suitable for small file sizes)

or on any of the following media:

- On a diskette [you may use .tar, .zip, .gzip (.gz), .sit, and compress (.Z)]
- On a ZIP cartridge
- On a CD-ROM

Please save your file in two different formats:

RTF (Rich Text Format) or Microsoft Word compatible formats

PDF (a single PDF file including text, tables and figures)

In case you have not sent electronic files of your manuscript together with the accepted version, you should send your data, preferably a zip file (text and illustrations in separate files, unencoded) to Springer-Verlag either:

Via ftp.springer.de (to our ftp.server; log-in "anonymous"; password: your e-mail address; further information in the readme file on the server)

or by e-mail (only suitable for small volumes of data)

Please always supply the following information with your data: journal title, manuscript number, operating system, word processing program, drawing program, image processing program, compression program.

The file name should be memorable (e.g., author name), have no more than 8 characters, and include no accent or special symbols. Use only the extensions that the program assigns automatically.

Electronic Supplementary Material Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal provided the material is:

- submitted in electronic form together with the manuscript
- accepted after peer review

ESM may consist of: Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format) information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc. large quantities of original data that relate to the paper, e.g. additional tables, large numbers of illustrations (color and black & white), etc. Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc. After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference will be given in the printed version.

Proofreading

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the paper.

Online First

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can already be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Offprints

Twenty-five offprints of each contribution are supplied free of charge. If you wish to order additional offprints you must return the order form which is provided with the proofs and return it together with the corrected proofs. When ordering additional offprints, an author is entitled to receive, upon request, a pdf file of the article for own personal use

ANEXO B

Artigo submetido em 12/05/2005 para a revista:

- Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (ISSN: 1367-5435).

Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional
low-cost carbohydrate sources

Marcos Roberto de Oliveira ^a, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi ^a, João Batista Buzato ^a, Rui
Sérgio Santos Ferreira da Silva ^b.

^a Department of Food Technology, ^b Department of Biochemistry, Londrina Stat University,
Post-Box 6001, 86051-990 Londrina, Parana Stat, Brazil

Email: macelligoi@uel.br

Phone: +43-3371-4000 - Phax:+43-3328-4440

Abstract

The use of alternative regional low-cost substrates has become very interesting because in addition to the ease of acquisition it presents a relatively low cost. In this study using statistical instruments, the exopolysaccharide levan production by the *Zymomonas mobilis* microorganism was analyzed varying the carbon source (commercial sucrose, molasses and sugar cane syrups) and the fermentation medium constituents. There was a decrease in levan production in the molasses medium (2.533 gL⁻¹) when compared to the commercial sucrose (21.685 gL⁻¹) and syrup (15.456 gL⁻¹) media. Yeast extract and KH₂PO₄ were significant in the commercial sucrose medium for levan production and in the syrup medium the yeast extract and MgSO₄ were significant. Although sugar cane syrup up produced about 28.724% less levan compared to commercial sucrose, biomass production in the syrup was 2.76 times greater than in commercial sucrose (0.857 gL⁻¹ and 2.366 gL⁻¹) that could justify joint levan and *Z. mobilis* biomass production. Studies are needed on the use of alternative substrates and complexes in biotechnology to assess the composition of these media, avoiding unnecessary supplementation with vitamins and minerals salts, when using the formulations of the mediums defined for the complex mediums.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, levan, molasses sugar cane, sugar cane syrups.

I - Introduction

The levan is exopolysaccharide that have a wide variety of applications. The levan can be used in medicine as a hypo-cholesterol [1], antitumor [2], immune modulator [3], anti-inflammatory [4] and plasma substitute [5] agent. It is used in foods as a source of di-fructofuranoses [6], fructose and fructooligosaccharides [7] and as an emulsifying and encapsulating agent, color and flavor vehicle [8] and fat substitute [9].

The *Z. mobilis* bacterium is considered a potential candidate for large scale levan production [10]. It is produced from the catalyzed transfructolization reaction by the levansucrase enzyme (β -2,6 frutan:D-glucose-fructosyltransferase, EC. 2.4.1.10) that uses sucrose as substrate. Levan can be produced as economically valuable sub-products in alcohol distilleries using sucrose as substrate [11].

Sugar cane syrup and sugar cane molasses are complex substrates with a high concentration of sucrose and a great variety of salts that are necessary for metabolite production of industrial interest. The osmolarity of the medium is an essential factor for levan and sorbitol production by *Z. mobilis*, the sodium and potassium salts lead to an increase in the levan and sorbitol synthesis due to the effect of cell osmoprotection [12]. Sugar cane syrup [13], sugar cane molasses [14], sugar beets [15], wheat extract [16], whey [17] have been used in attempts to reduce production costs and use alternative substrate sources.

The use of statistical instruments, such as factorial experimental planning associated to the surface response methodology, have been used by various authors in biotechnology [18,19,20,21]. Experimental planning permits product and process implementation and optimization, reducing development and production costs, because it promotes decrease in the number of experiments at the development stage, so that a considerable number of factors can be studied at the same time. The interaction among these factors can be assessed and optimum production levels obtained and hence greater precision in the results and production optimization [22]. The response-surface methodology is a set of experiment planning and analysis techniques used in the mathematical modeling of responses

that can be applied, for example, in pharmacology [23], food sciences [24] and optimization of fermentative processes [25].

The present study assessed, using statistical methodology, the effects of the carbohydrates sources (commercial sucrose, sugar cane syrups and sugar cane molasses), sugar concentration, fermentation time and the influence of the medium constituents in levan production by *Z. mobilis*.

II - Materials and methods

Microorganism and culture conditions

The *Z. mobilis* bacteria was maintained in culture medium containing in gL⁻¹: sucrose 20, yeast extract 2.5, KH₂PO₄ 1, (NH₄)₂SO₄ 1 and MgSO₄(7H₂O) 0.5. Media were autoclaved at 121°C for 15 min. The cultures were kept at 4°C and renewed every three weeks. The inoculum medium contained sucrose at 100 gL⁻¹ and salts described previously. The cell concentration was standardized to 0.2 gL⁻¹. The cell concentration was determined by turbidimetry at 605 nm. Batch fermentations were carried out, in 125ml erlenmeyer flasks with 25 ml fermentation culture medium at 25°C.

Culture media

Three culture media were used, commercial sucrose, sugar cane syrups and sugar cane molasses. The commercial sucrose medium containing in gL⁻¹: sucrose 150, 250 and 350; yeast 2.5 extract, KH₂PO₄ 1, (NH₄)₂SO₄ 1 and MgSO₄(7H₂O) 0.5. The sugar cane syrups medium was centrifuged, filtered and autoclaved. Commercial sucrose was added until a total sugar concentration of 250 gL⁻¹ was reached and the others constituents of the commercial sucrose medium were added. The sugar cane molasses medium was centrifuged, filtered and autoclaved, sugar cane molasses was diluted to a total sugar concentration of 250 gL⁻¹, added to the constituents of the sucrose medium.

Analytical methods

After each fermentation, the culture was centrifuged (4,0000xg for 15 min) and cell growth determined by turbidimetry at 605 nm relating it to a biomass with a dry matter calibration curve. The reducing sugars were quantified according to Somogy [26] and Nelson [27] using glucose as standard. The total reducing sugars were quantified by the Phenol-Sulfuric Acid Method [28]. The levan produced was precipitated by the addition of ethanol to 75 % (v/v) at low temperature (5 ± 1 °C) and quantified in fructose units [29].

Factorial planning

Three successive factorial planning were used to assess the sugar concentration, fermentation time, carbon sources and the constituents of the medium. The first factorial planning was carried out to optimize the sucrose concentration (independent variable x_1) and fermentation time (independent variable x_2) for levan production, using the complete factorial planning of the 3^2 type with two true replications at the central point (Table 1). In the second factorial planning the effects of medium constituents of the sucrose medium on levan production were assessed. The fermentation time (24 h) and sucrose concentration (250 gL^{-1}) were defined from the results obtained in the first planning. Fractioned factorial statistical planning of IV resolution of the 2^{4-1} type was used (Table 2). In the third factorial planning, the sugar cane molasses and sugar cane syrups carbon sources and constituents of medium were assessed for levan production, and the complete factorial planning of the 2^5 type was used totaling 32 experiments (Table 5). The Statistica 5.0 software by Statsoft was used to carry out the planning and the analysis of the responses obtained.

III - Results and discussion

- Assessment of the sucrose concentration and fermentation time: first factorial planning

Levan production by *Z. mobilis* occurs when this bacteria grown in high sucrose concentrations [30]. The complete factorial 3^2 design was used to determine the optimal concentration of sucrose and

fermentation time for levan production by *Z. mobilis*, where the sucrose concentration (x_1) and the fermentation time (x_2) were assessed. The temperature of the fermentative process was fixed at 25°C [31] in the conditions described previously. Table 1 presents the design used and the responses obtained in the first stage of statistical planning.

Table 1.

Table 2 presents the analysis of variance, where it can be observed that the two factors selected (x_1 and x_2) were significant ($p < 0.05$) for levan production. Levan production was modeled by the quadratic equation: $Z = 17.651 - 1.355x_1 - 7.267x_1^2 + 4,880x_2 - 1,855x_2^2$

Table 2.

The optimum conditions for levan production (Table 1) were 250 gL⁻¹ sucrose concentration and a fermentation time of 24 h. Under these conditions production reached 21.685 gL⁻¹. The results show that an increase in fermentation time caused an increase in the levan production at all concentrations of sucrose tested. However, the sucrose concentration at its upper (350 gL⁻¹) and lower (150 gL⁻¹) limits reduced levan production. An increase in fermentation time leads to an increase in consumption of the sugar present in the medium and to an increase in the levan production in all the experiments.

Low biomass production (Table 1) is normally observed in *Z. mobilis* whose cell growth and fermentation are not linked [32]. This occurs because *Z. mobilis* uses the Entner–Doudoroff via for carbon catabolism and produces only 1 mol ATP per mol of glucose consumed and that result for *Z. mobilis* in one of the lowest molar growths described for bacteria [33].

The surface-response (Figure 1) showed sub-regions more suitable to high levan production values with the variable $x_1 = \text{zero}$ and the variable $x_2 = +1$ in codified values.

Figure 1.

The experimental values obtained are close to the values reported by other authors [34]. The different variations in production described by the various authors are explained by the different conditions and strains used. For the next factorial planning, therefore, the conditions were fixed at

25°C, 250 gL⁻¹ total sugars and 24 h fermentation.

Effect of the culture medium constituents: second factorial planning

Having fixed the sugar concentration and fermentation time, the effects of the fermentation medium constituents on levan production were assessed using the fraction factorial planning of IV resolution of the 2⁴⁻¹ type. The responses obtained in this design are presented in Table 3.

Table 3.

Table 3 shows that cell growth was very low in experiment 1 where the medium consisted of only the carbon source without the presence of the other constituents that was reflected in a low levan production (2.127 gL⁻¹). The highest levan contents obtained were 20.202 gL⁻¹; 16.382 gL⁻¹; 16.211 gL⁻¹ and 12.325 gL⁻¹ in experiments 8, 2, 4 and 6, respectively, all in the presence of yeast extract. The analysis of variance (Table 4) shows that the yeast extract was significant for levan production (p=0.000) and that the model explains 90.75% of the experimental data.

Table 4.

The effect of yeast extract has been described [35, 36] as a source of vitamins (pantothenic acid, nicotinic acid, biotin, thiamine and pyridoxine) essential for cell growth and as a stimulating factor for levan synthesis [37]. The KH₂PO₄ was significant for levan production (p=0.037), but the greatest levan contents occurred when the KH₂PO₄ was associated to yeast extract. Bekers and co-workers [38] reported that sodium and potassium salts have a stimulating effect on levan synthesis.

The surface-response (Figure 2) illustrates the estimated results and indicated that yeast extract in association with KH₂PO₄ at higher levels increased levan production.

Figure 2.

MgSO₄ and (NH₄)₂SO₄ were not statistically significant for levan production, that was confirmed by experiment 5 (Table 3) where the levan value was only 4.563 gL⁻¹ even at the highest levels experimented. According to some authors, the ammonium salts may influence negatively in the

production of some biopolymers [39].

Study of the influence of the carbon source and the interactions with the culture medium constituents: third factorial planning

Levan production by *Z. mobilis* was assessed at this stage using sugar cane molasses and sugar cane syrups as qualitative variables and the effects of the fermentation medium constituents. The fermentation time (24 h) and the sugar concentration (250 gL^{-1}) were fixed from the results obtained in the first factorial planning. The responses obtained are shown in Table 5 and the analysis of variance in Table 6.

Table 5.

Figure 3 was constructed from the results presented in Table 5 where two distinct groups for levan production can be observed. In the first group there were lower levan contents and sugar cane molasses was used as carbon source and in the second group there were higher levan contents and sugar cane syrup was used as carbon source. The low levan values obtained when molasses was used may be due to the presence of potassium, chloride, sulfur, calcium and sodium salts [40, 41] or trace metals such as iron, zinc, copper and magnesium [42] that inhibited cell growth and metabolites production.

Table 6.

Figure 3.

The analysis of variance (Table 6) showed that yeast extract and MgSO_4 were significant for levan production ($p= 0.000$ and $p = 0.026$, respectively), in experiment 4 (Table 5) when sugar cane syrup was used as carbon source and the two constituents were associated where the highest levan production was obtained of 15.456 gL^{-1} with 0.664 gL^{-1} yield. This value is similar to the described in the literature [43, 44], but the comparison of the values is hindered by the different conditions used by each author.

Levan production with sugar cane syrup reached values of more than 15 gL^{-1} , lower values than

those obtained when sucrose was used as carbon source [45, 46], but if the biomass production in sugar cane syrup (Table 1) and commercial sucrose (Table 1) are compared, the biomass production in the sugar cane syrup culture medium (Table 1) is greater that would justify joint production of two products, levan and biomass as a protein source with possible nutritional application.

This demonstrates that sugar cane syrup, a cheap substrate widely available in Brazil, has potential for use. In addition to the substrate, the current industrial park could be used [47] (alcohol distilleries), to amplify production of new products with greater aggregate value and with different industrial applications.

IV - Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES-Brazil for funds to development this work.

V - References

1. Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi H (1999) In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J. Nutr. Biochem.* 10:13–18.
2. Calazans GMT, Lopes CE, Lima RMOC, França FP (1997) Antitumoural activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, 19:19-21.
3. Yoo SH, Yoon EJ, Cha J, Lee HG (2004) Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules* 34:37–41.
4. Vigants A, Hicke HG, Marx SP (2001) A simple and efficient method for the purification of membrane bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Current. Microbiol*, 42: 415-418.
5. Liepa V, Zakenfelds G, Valpe E, Koronova Z, Lapsa R, Laivenieks M, Bekers M, Pospishil I (1993) Levan prolongs the lifespan of tumor-bearing or irradiated mice and enhances the antitumor activity of leukocytes. *Proc Latv Acad Sci B*, 5:59-64.
6. Song KB, Bae KS, Lee YB, Lee KY, Rhee SK, (2000) Characteristics of levan fructotransferase

- from *Arthrobacter ureafaciens* K2032 and difructose anhydride IV formation from levan. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:212–218.
7. Kang JE, Lee SO, Lee JD, Lee, TH (1999) Purification and characterization of a levanbiose producing levanase from *Pseudomonas* sp, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29:263-268.
 8. Han YW (1990) Microbial levan. *Advances in Applied Microbiology* 35:171 -194.
 9. Vijn I, Smeekens S. (1999) Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate?. *Plant Physiology*, 120:351-359.
 10. Ananthalakshmy VK, Gunasekaran, P (1999) Optimization of Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42:291-297.
 11. Bekers M, Laukevics J, Upite D, Kaminska E, Vigants A, Viesturs U, Pankova L, Danilevics A (2002) Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase, *Process Biochemistry*, 38:701-706.
 12. Bekers M, Vigants A, Laukevics J, Toma M, Rapoport A, Zikmanis P (2000) The effect of osmo-induced stresses on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, 55:147-150.
 13. Han YW, Watson MA (1992) Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses, *J. Ind. Microbiol.* 9: 257-260.
 14. Cazetta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS, Silva RSF (2005) Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochemistry*, 40:747–751.
 15. Bekers M, Linde R, Upite D, Kaminska E, Viesturs U (2001) Sugar beet juice fermentation by *Zymomonas mobilis* attached to stainless steel wire spheres, *Acta Biotechnol.* 21:89-96.
 16. Macedo MG, Lacroix C, Gardner NJ, Champagne CP (2002) Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate, *Int. Dairy J.* 12:419-426.
 17. Javad B, Bazzaz BSF, Zohreh S (2003) Optimization of dextran production by *Leuconostoc*

- mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen, Biotechnol. Appl. Biochem. 38:267-269.
18. Ratnam BVV, Narasimha RM, Damodar RM, Subba RS, Ayyanna C (2003) Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. World J. Microbiol. Biotechnol. 19:523-526.
 19. Kimmel SA, Roberts RF, Ziegler GR (1998) Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* RR grown in a semi defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 64:659-664.
 20. Sreekumar O, Chand N, Basappa S (1999) Optimization and interaction of media components in ethanol production using *Zymomonas mobilis* by response surface methodology, J. Biosci. Bioeng. 88:334-338.
 21. Vasconcelos AND, Barbosa AM, Dekker RFH, Scarmino IS, Rezende MI (2000) Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. Proc. Biochem. 35:1131-1138.
 22. Bonduelle G M, (2000) Experimental planning application in the hardboard panels making. Cerne, 6:001-010.
 23. Tallarida RJ, Stone DJ, McCary JD, Raffa RB (1999) Response surface analysis of synergism between morphine and clonidine. J Pharmacol Exp Ther, 289:8-13.
 24. Matulis RJ, McKeith Fk, Sutherland JW, Brewer MS (1995) Sensory characteristics of frankfurters as affected by salt, fat, soy protein and carrageenan. J Food Sci, 60:48-54.
 25. Sreekumar O, Chand N, Basappa SC (1999) Optimization and interaction of media components in ethanol production using *Zymomonas mobilis* by response surface methodology. J Biosci Bioeng, 88:334-338.
 26. Somogyi MA (1944) A new reagent for determination of sugar, J. Biol. Chem., 160:61-68.
 27. Nelson NA (1945) A photometric adaptation of the somogyi method for determination of glucose, Biochem. 153:375-380.

28. Dubois M, Gilles KA, Roberts PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.* 25:350-356.
29. Vikari, L (1984) Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *App Microbiol Biotechnol*, 19:252-255
30. Sprenger GA (1996) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes, *Fems Microbiol. Lett.* 145:301-307.
31. Ananthalakshmy VK, Gunasekaran, P (1999) Optimization of Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42:291-297.
32. Parker C, Peekhaus N, Zhang X, Conway T. (1997) Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol* , 63:3519–3525.
33. Diez JC, Yokoya F, Carvalho PR (1991) Produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis*. *Arq Biol Tecnol*, 34:375–380.
34. Ananthalakshmy VK, Gunasekaran P (1999) Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42:291-297.
35. Han YW (1990) Microbial Levan. *Advances in Applied Microbiology*, 35:171-194.
36. Bekers M, Grube M, Vulfa L, Upite D, Kaminska E, Scherbaka R, Vigants A, Danilevich A (2002) Stillage as a Source of Growth Promoting Biofactors and a Stimulator of Levan and Extracellular Levansucrase Synthesis for *Zymomonas mobilis*. *Food Technol. Biotechnol.*, 40:305-310.
37. Swings J, De Ley J (1977) The biology of *Zymomonas mobilis*. *Bacteriol. Rev.* 41: 1–46.
38. Bekers M, Vigants A, Laukevics J, Toma M, Rapoport A, Zikmanis P (2000) The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, 55:147–150.
39. Sutherland IW (1982) Biosynthesis of microbial exopolysaccharide. *Adv. Microb. Physiol.* 23:79–146.

40. Cazetta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS, Silva RSF (2005) Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochemistry*, 40:747–751.
41. Kirk LA, Doelle HW (1992) The effects of potassium and chloride ions on the ethanolic fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis* 2716. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37:88-93.
42. Ikram-ul H, Sikander A, Qadeer MA, Javed I (2002) Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5: 125-132.
43. Ananthalakshmy VK, Gunasekaran P (1999) Optimization of Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Technology*, 42:291-297.
44. Bekers M, Linde R, Upite D, Kaminska E, Viesturs U (2001) Sugar Beet Juice Fermentation by *Zymomonas mobilis* Attached to Stainless Steel Wire Spheres. *Acta Biotechnol.* 1:89-96.
45. Hangit YW, Clarke MA (1990) Production and Characterization of Microbial Levan. *J. Agric. Food Chem.* 38:393-396.
46. Han YW (1990) Microbial Levan. *Advances in Applied Microbiology*, 35:171-194.
47. Bekers M, Laukevics J, Upite D, Kaminska E, Vigants A, Viesturs U, Pankova L, Danilevics A (2002) Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38:701-706.

Tables

Table 1: Factorial 3² designed to investigate the effects of the sucrose concentration and fermentation time on levan production.

Runs	Coded levels		Responses		
	x ₁	x ₂	Biomass (gL ⁻¹)	Consumption of TRS (gL ⁻¹)	Levan (gL ⁻¹)
01	-1	-1	0.754	22.547	5.231
02	-1	0	0.891	37.612	12.154
03	-1	+1	1.012	51.324	14.123
04	0	-1	0.654	29.847	9.523
05	0	0	0.724	41.856	18.241
06	0	+1	0.857	49.576	21.685
07	+1	-1	0.366	14.258	3.457
08	+1	0	0.481	21.789	8.231
09	+1	+1	0.558	29.234	11.687
10	0	0	0.785	40.587	17.853
11	0	0	0.745	41.687	17.245

Variables		Real levels		
		-1	0	+1
x ₁	Sucrose initial (g/L)	150	250	350
x ₂	Culture time (h)	12	18	24

TRS = Total reduction sugars

Table 2: Analysis of variance showing the effects of concentration of sugars and time fermentation on the levan production by *Z. mobilis* ATCC 31821

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean Square	F - test	P
Sucrose initial (L)	11.024	1	11.024	43.740	0.022
Sucrose initial(Q)	133.796	1	133.796	530.858	0.001
Time fermentation (L)	142.925	1	142.925	567.080	0.001
Time fermentation (Q)	8.725	1	8.725	34.618	0.027
Lack-of-Fit	5.766	4	1.441	5.720	0.154
Pure error	0.504	2	0.252		
Total	333.270	10			

L = linear effect Q = quadratic effect

% of explained variance = 98.118. % of maximum explained variance = 96.864.

Table 3: 2^{4-1} fractioned factorial design to investigate the influence of the culture medium constituents on levan production, with 250 g.L^{-1} TRS, 24 h fermentation at 25°C .

Runs	Variables				Responses		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Biomass (g.L^{-1})	Consumption of TRS (g.L^{-1})	Levan (g.L^{-1})
01	-1	-1	-1	-1	0.211	22.238	2.127
02	+1	-1	-1	+1	0.833	65.234	16.382
03	-1	+1	-1	+1	0.273	29.211	7.325
04	+1	+1	-1	-1	0.392	59.231	16.211
05	-1	-1	+1	+1	0.315	8.758	4.563
06	+1	-1	+1	-1	0.668	39.437	12.325
07	-1	+1	+1	-1	0.264	50.592	7.230
08	+1	+1	+1	+1	0.620	40.831	20.202

Variables		Real levels	
		-1	+1
X ₁	Yeast extract (g.L^{-1})	0	2
X ₂	KH_2PO_4 (g.L^{-1})	0	2
X ₃	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g.L^{-1})	0	1
X ₄	MgSO_4 (g.L^{-1})	0	0.5

TRS = Total reduction sugars

Table 4: Analysis of variance showing the effects on the influence of the constituents of the culture medium for levan production by *Z. mobilis* ATCC 31821.

Source of variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean squares	F-test	P
Yeast extract	240,627	1	240.627	62.766	0.000
KH_2PO_4	30,307	1	30.307	7.905	0.037
Pure error	19,168	5	3.833		
Total	290,102	7			

% of explained variance = 93,393. % of maximum explained variance = 90,750.

Table 5: Complete 2^5 factorial design to investigate the influence of sugar cane molasses and sugar cane syrup and culture medium constituents on levan production.

Runs	Variables					Responses		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Biomass (g/L ⁻¹)	Consumption of TRS (g/L ⁻¹)	Levan (g/L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	+1	0.337	24.654	1.850
2	+1	-1	-1	-1	-1	1.770	59.824	12.321
3	-1	+1	-1	-1	-1	0.502	34.564	5.234
4	+1	+1	-1	-1	+1	2.366	77.263	15.456
5	-1	-1	+1	-1	-1	0.494	31.452	2.546
6	+1	-1	+1	-1	+1	2.022	64.568	13.451
7	-1	+1	+1	-1	+1	0.390	26.311	4.325
8	+1	+1	+1	-1	-1	2.533	85.423	15.324
9	-1	-1	-1	+1	-1	0.429	32.154	0.542
10	+1	-1	-1	+1	+1	1.984	67.566	14.895
11	-1	+1	-1	+1	+1	0.441	29.254	3.845
12	+1	+1	-1	+1	-1	2.514	85.432	13.270
13	-1	-1	+1	+1	+1	0.402	27.546	2.789
14	+1	-1	+1	+1	-1	1.888	64.187	11.854
15	-1	+1	+1	+1	-1	0.487	33.145	4.785
16	+1	+1	+1	+1	+1	2.223	79.546	15.423
17	+1	+1	+1	+1	-1	1.916	66.213	15.211
18	-1	+1	+1	+1	+1	0.542	35.456	5.234
19	+1	-1	+1	+1	+1	1.906	60.123	12.385
20	-1	-1	+1	+1	-1	0.321	21.512	1.234
21	+1	+1	-1	+1	+1	2.222	75.423	12.954
22	-1	+1	-1	+1	-1	0.506	33.456	3.574
23	+1	-1	-1	+1	-1	1.984	68.549	13.458
24	-1	-1	-1	+1	+1	0.334	21.354	3.214
25	+1	+1	+1	-1	+1	2.414	79.546	14.235
26	-1	+1	+1	-1	-1	0.620	41.325	4.012
27	+1	-1	+1	-1	-1	2.026	69.574	13.254
28	-1	-1	+1	-1	+1	0.328	23.016	3.854
29	+1	+1	-1	-1	-1	2.320	79.546	12.854
30	-1	+1	-1	-1	+1	0.507	34.236	3.210
31	+1	-1	-1	-1	+1	1.906	67.584	14.985
32	-1	-1	-1	-1	-1	0.308	19.124	0.395

Variables	Real levels	
	-1	+1
X ₁ Carbon source	Sugar cane molasses	Sugar cane syrup
X ₂ Yeast extract (g/L ⁻¹)	0	2
X ₃ KH ₂ PO ₄ (g/L ⁻¹)	0	2
X ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L ⁻¹)	0	1
X ₅ MgSO ₄ (g/L ⁻¹)	0	0.5

Table 6: Analysis of variance of the influence of the carbon sources sugar cane molasses, sugar cane syrup and the culture medium constituents on levan production by *Z. mobilis* ATCC 31821.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F-test	p
Carbon source	903,639	1	903,639	1190,574	0,000
Yeast extract	22,040	1	22,040	29,039	0,000
MgSO ₄	4,203	1	4,203	5,539	0,026
1*2*3	4,090	1	4,090	5,390	0,028
2*3*4	6,044	1	6,044	7,964	0,009
Purê error	19,733	26	0,759		
Total	959,753	31			

% of explained variance = 97,944. % of maximum explained variance = 97,548.

1*2*3 = interaction $x_1.x_2.x_3$ 2*3*4 = interaction $x_2.x_3.x_4$

Figures

Figure 1: Surface-response for independent variables x_1 and x_2 for levan production by *Z. mobilis* ATCC 31821.

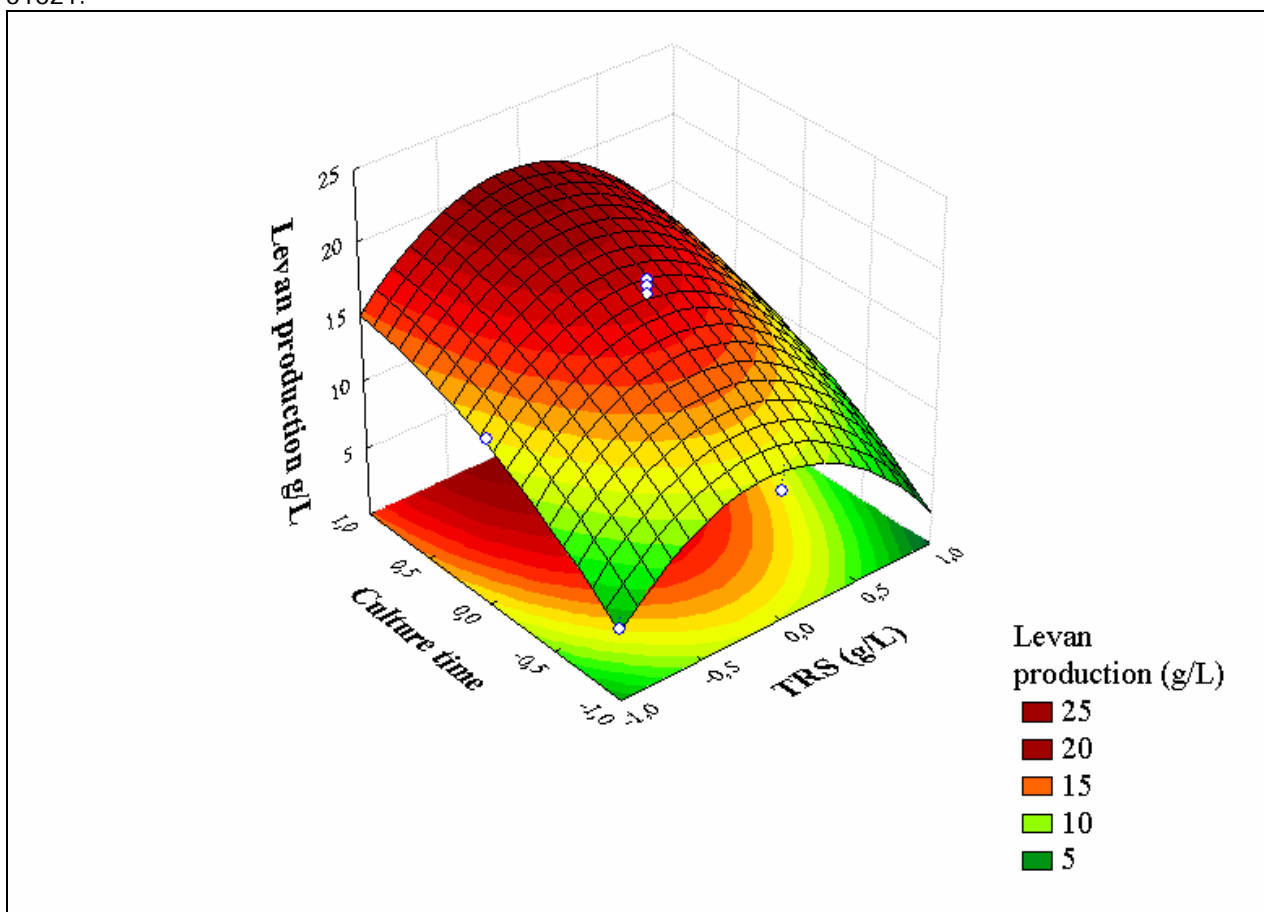


Figure 2: Surface-response for the factors x_1 and x_2 for levan production by *Z. mobilis* ATCC 31821. The other factors were fixed at level -1.

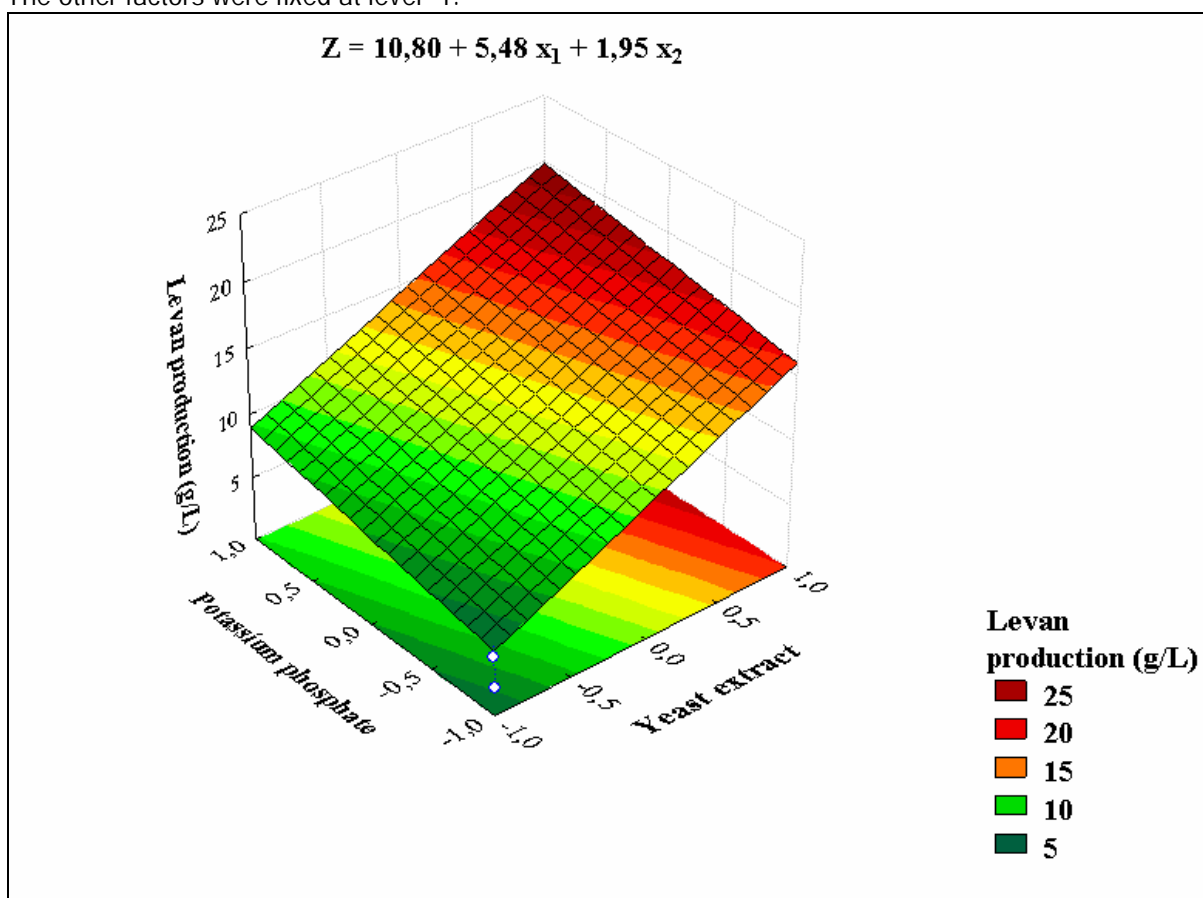
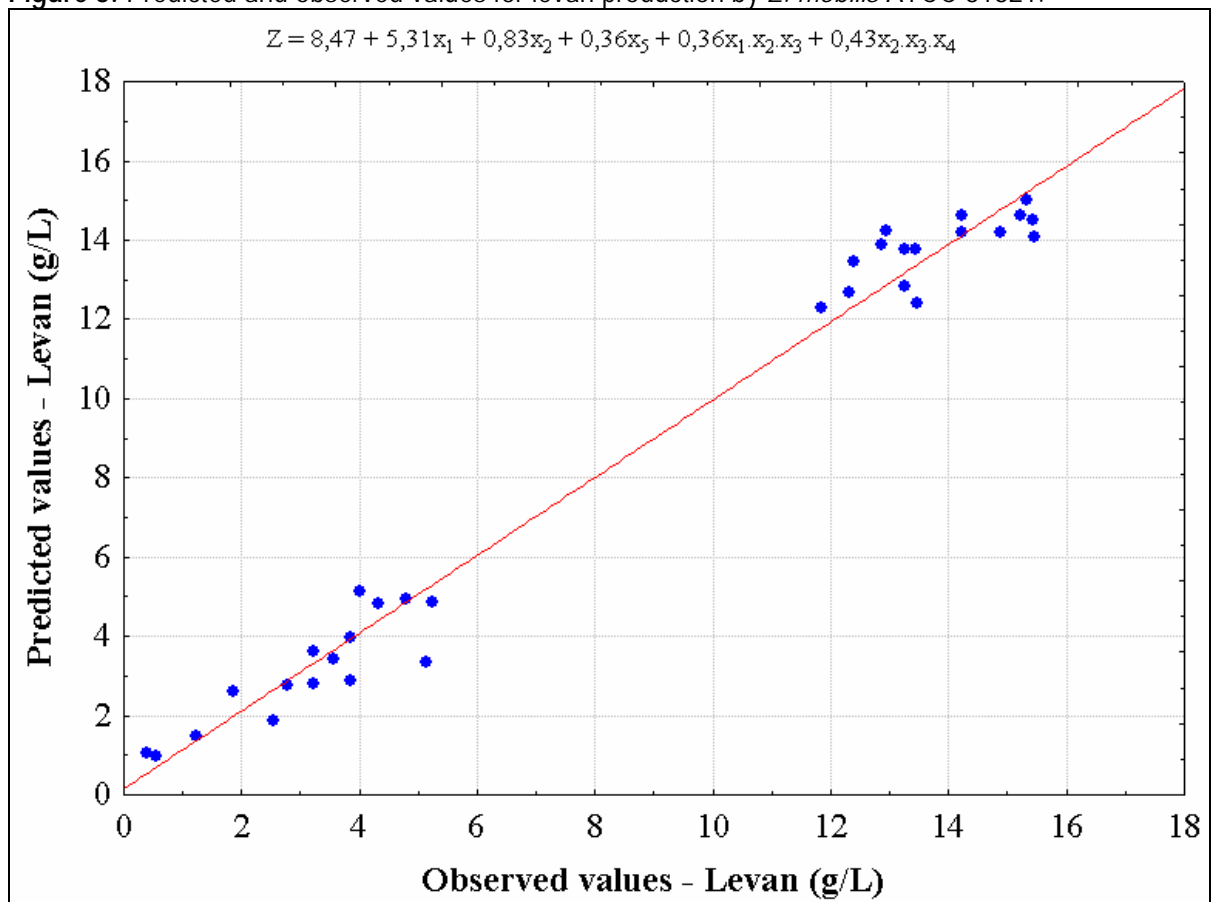


Figure 3: Predicted and observed values for levan production by *Z. mobilis* ATCC 31821.



ANEXO C

Resultados complementares dos experimentos, onde estão demonstradas as análises de rendimento ($Y_{p/x}$), eficiência de conversão ($Y_{p/s}$), produtividade ($Y_{p/L.h}$) e produção específica ($Y_{p/x.h}$) e as atividades enzimáticas de levanasacarase e invertase.

RESULTADOS COMPLEMENTARES

1 - Análise da 1ª etapa:

Planejamento fatorial completo do tipo 3² para a otimização da concentração de sacarose e tempo de cultivo para a produção de levanas por *Z. mobilis* ATCC 31821.

A produção de levana por *Z. mobilis* ocorre quando esta bactéria cresce em altas concentrações de sacarose. Visando otimizar o processo de produção em meio de sacarose, foram realizados os cultivos com *Z. mobilis* ATCC 31821 utilizando o meio de fermentação de sacarose descrito em 4.1.2.3, onde variou-se a concentração de sacarose em 150, 250 e 350 g.L⁻¹ (variável independente x₁) e tempo de fermentação em 12, 18 e 24 h (variável independente x₂), sendo que a temperatura do processo fermentativo foi fixada em 25°C.

Os resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo 3² com duas repetições verdadeiras no ponto central para se otimizar a concentração de sacarose e tempo de fermentação para a produção de levanas estão representados na Tabela 1 e 2 e nas Figuras 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Resultados obtidos na otimização da concentração de sacarose e tempo para a produção de levanas.

Ensaio	Concentração de Sacarose (g.L ⁻¹)	Tempo de Fermentação (h)	Biomassa Final (g.L ⁻¹)	ART Consumido (g.L ⁻¹)	Levana (g.L ⁻¹)	Atividade Levanasacarase (uMol/ml/min)
01	150	12	0,754	22,547	5,231	0,625
02	150	18	0,891	37,612	12,154	1,358
03	150	24	1,012	51,324	14,123	1,874
04	250	12	0,654	29,847	9,523	1,125
05	250	18	0,724	41,856	18,241	2,025
06	250	24	0,857	49,576	21,685	2,458
07	350	12	0,366	14,258	3,457	0,498
08	350	18	0,481	21,789	8,231	0,895
09	350	24	0,558	29,234	11,687	1,245
10	250	18	0,785	40,587	17,853	1,953
11	250	18	0,745	41,687	17,245	1,901

Tabela 2 – Resultados obtidos na otimização da concentração de sacarose e tempo para a produção de levanas.

Ensaio	Rendimento: $Y_{p/x}$	Eficiência conversão: $Y_{p/s}$	Produtividade: $Y_{p/L.h}$	Produção específica: $Y_{p/x.h}$
01	6,938	0,232	0,218	0,289
02	13,641	0,323	0,506	0,568
03	13,956	0,275	0,588	0,581
04	14,561	0,319	0,397	0,607
05	25,195	0,436	0,760	1,050
06	25,303	0,437	0,904	1,054
07	9,445	0,242	0,144	0,394
08	17,112	0,378	0,343	0,713
09	20,944	0,400	0,487	0,873
10	22,743	0,440	0,744	0,948
11	23,148	0,414	0,719	0,964

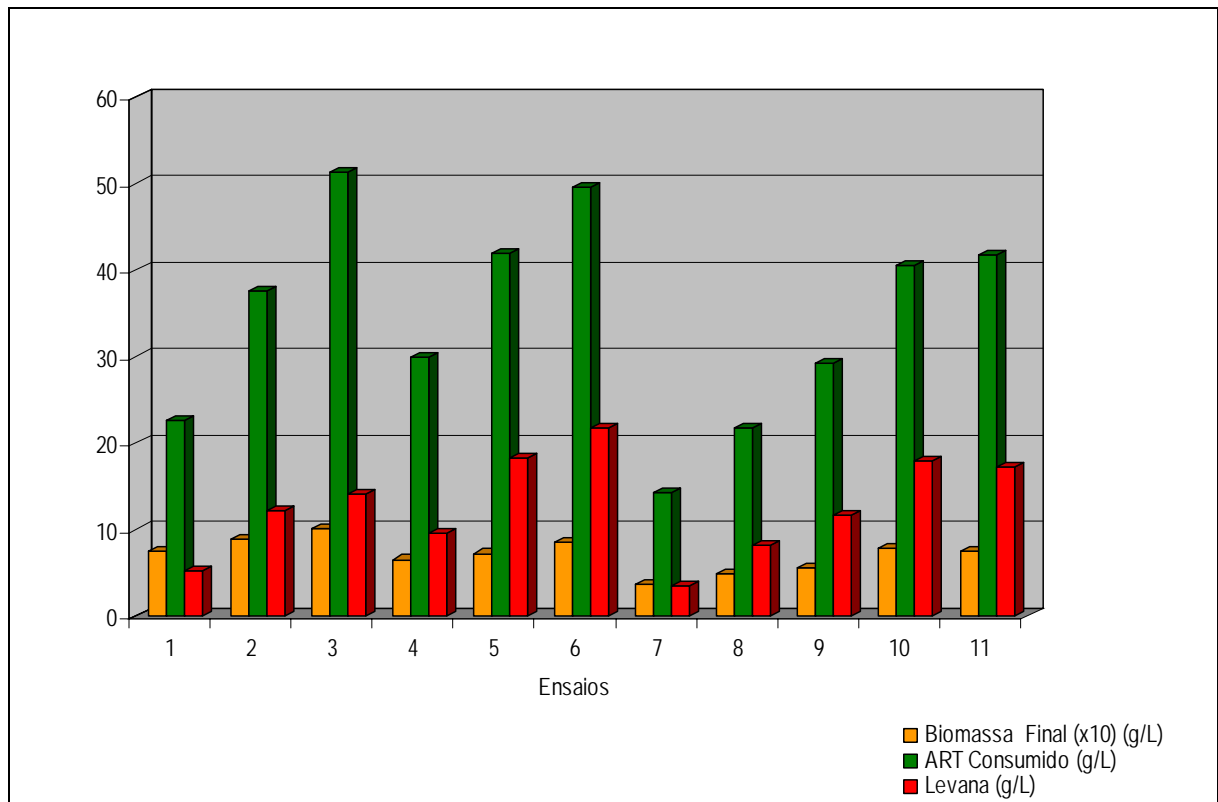


Figura 1 - Produção de biomassa, consumo de ART e produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821 em meio de sacarose.

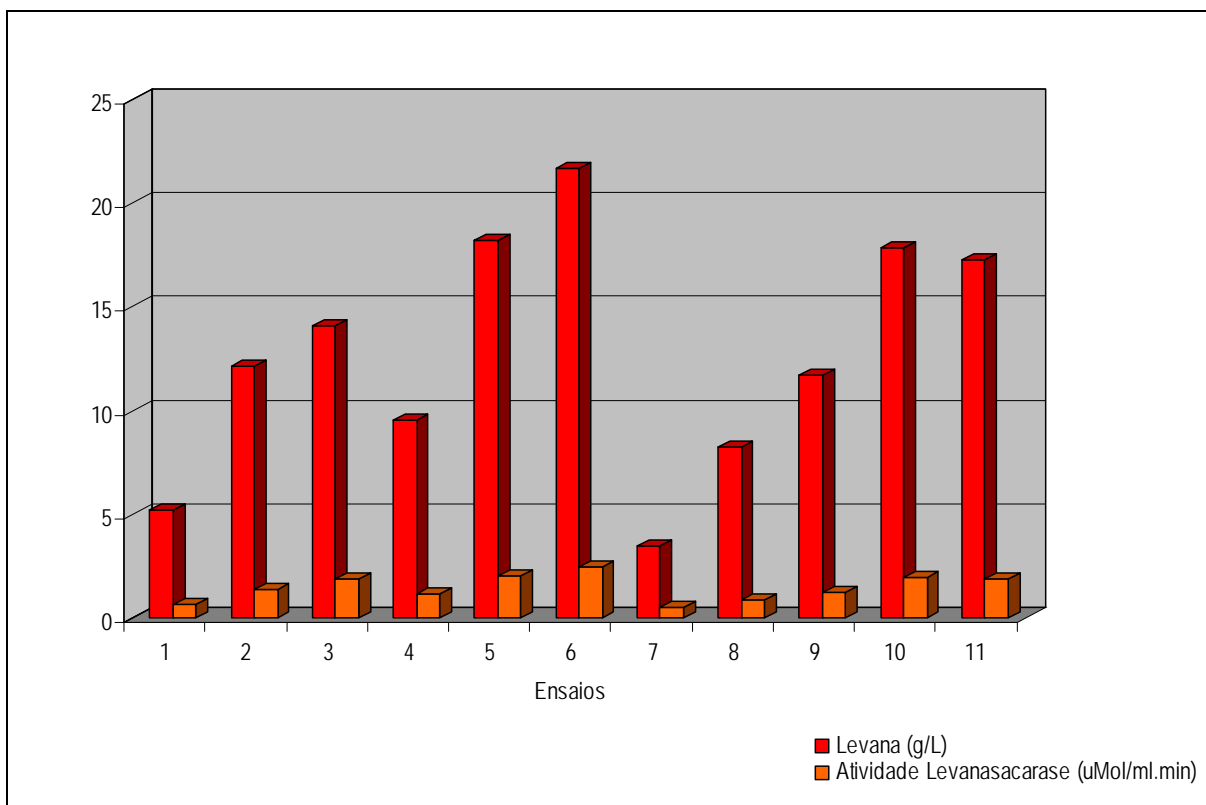


Figura 2 - Produção de levana e atividade de levansucrase de *Z. mobilis* ATCC 31821 em meio de sacarose.

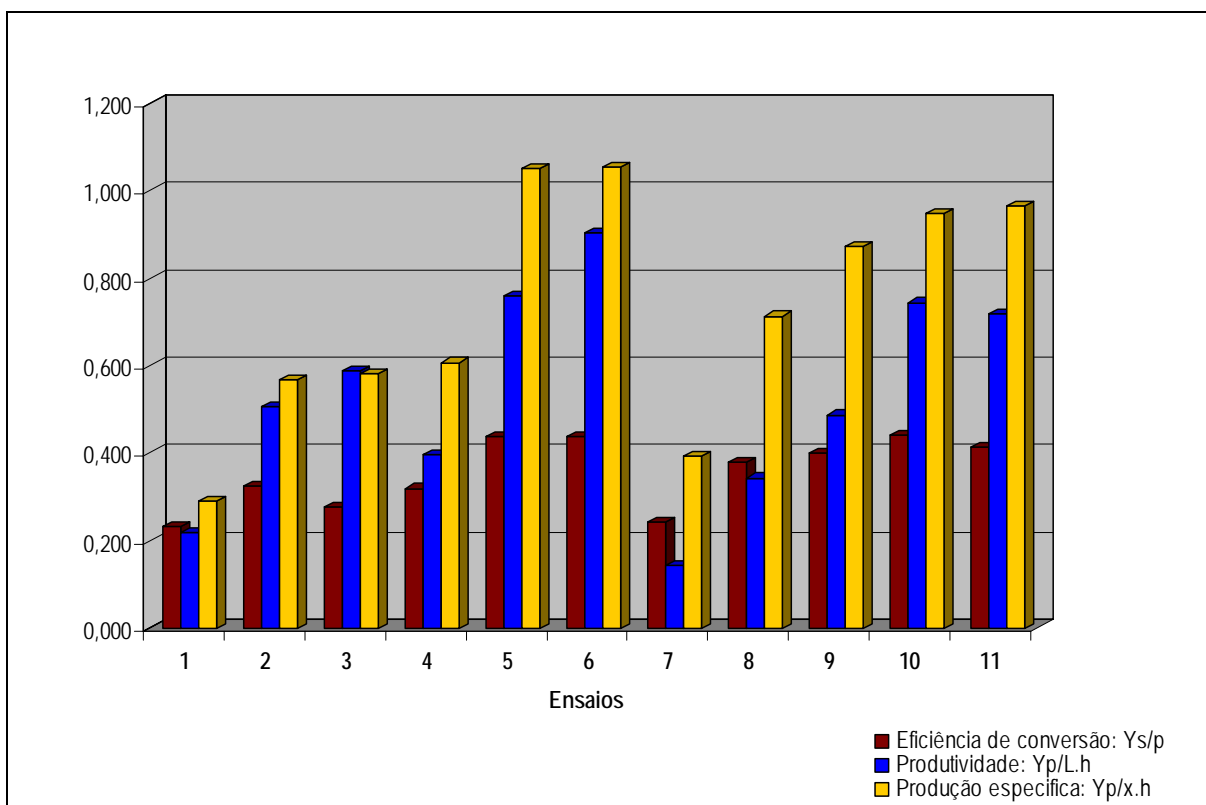


Figura 3 - Eficiência de conversão, produtividade e produção específica de levana de *Z. mobilis* ATCC 31821 em meio de sacarose.

Na Tabela 1 e Figura 1 estão demonstrados os respostas obtidas da 1ª etapa do planejamento estatístico onde as condições ótimas para a produção de levana foram: a concentração de sacarose de 250 g.L⁻¹ e o tempo de fermentação de 24 h, nesta condição a produção atingiu 21,695 g.L⁻¹. Pode-se observar pelos resultados que um aumento no tempo de fermentação provoca um aumento na produção de levana em todas as concentrações de sacarose testadas. Porém a concentração de sacarose em seus limites superiores (350 g.L⁻¹) e inferiores (150 g.L⁻¹) diminuem a produção de levana.

Um aumento do tempo de fermentação leva a um aumento no consumo de açúcares presentes no meio e a um aumento da produção de levana em todos os ensaios. A atividade de levanasacarase mostra uma correlação direta com a maior atividade, no ensaio 6 a atividade foi de 2,458 uMol/ml/min o que corresponde a máxima produção de levana de 21,685 g/L, a Figura 2 relaciona estas atividades e a produção de levana.

Quando se analisa as respostas obtidas da Tabela 2 e Figura 3 pode-se observar que a melhor produtividade ($Y_{p/L.h}$) foi de 0,904 (ensaio 6) que coincide com a melhor produção de levana. A eficiência de conversão é semelhante nos ensaios 5, 9, 10 e 11. Analisando-se a biomassa final, a eficiência de conversão ($Y_{p/s}$) e o rendimento ($Y_{p/x}$) pode-se observar que a produção é desacoplada do crescimento celular.

Nesta 1ª etapa do planejamento estatístico conclui-se que a concentração de sacarose de 250 g.L⁻¹ e o tempo de fermentação de 24 h, foram as melhores condições para a produção de levana; sendo assim optou-se por estas condições para as próximas etapas.

2 – Análise da 2ª Etapa:

Avaliação dos efeitos dos sais constituintes do meio na fermentação em sacarose, para a produção de levanas.

Tendo sido definido na 1ª na etapa a concentração ótima de sacarose em 250 g.L⁻¹ e o tempo de fermentação de 24 h, estes parâmetros foram fixados e nesta etapa avaliou-se os efeitos dos constituintes do meio de fermentação de sacarose descrito em 4.1.2.3, na produção de levanas *por Z. mobilis*. Variando-se a presença (+1) e ausência (-1) dos sais. Para a 2ª etapa foi utilizado o planejamento estatístico fatorial fracionado de resolução IV do tipo 2⁴⁻¹ totalizando 8 experimentos, que é mostrado na Tabela 3 em variáveis codificadas e decodificadas. Os resultados obtidos nesta etapa estão demonstrados na Tabela 3 e 4 e nas Figuras 4, 5 e 6.

Tabela 3 – Resultados obtidos da avaliação da presença e ausência de sais do meio de sacarose para a produção de levanas por *Z. mobilis* ATCC 31821.

Ensaio	Extrato De Levedura	Fosfato de Potássio	Sulfato de Amônio	Sulfato de Magnésio	Biomasssa Final (g.L ⁻¹)	ART Consumido (g.L ⁻¹)	Levana (g.L ⁻¹)	Atividade Levanasacarase (uMol.ml ⁻¹ .min ⁻¹)
01	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,261	22,238	2,127	0,254
02	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,833	65,234	16,382	1,785
03	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,273	29,211	7,325	0,698
04	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,392	59,231	16,211	1,865
05	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,315	8,758	4,563	0,298
06	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,668	39,437	12,325	1,458
07	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,264	50,592	7,230	0,789
08	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,620	40,831	20,202	2,351

Tabela 4 – Resultados obtidos da avaliação da presença e ausência de sais do meio de sacarose para a produção de levanas por *Z. mobilis* ATCC 31821.

Ensaio	Produção específica: Y _{p/x}	Eficiência conversão: Y _{p/s}	Produtividade: Y _{p/L.h}	Produção específica: Y _{p/x.h}
01	0,815	0,096	0,089	0,034
02	1,967	0,251	0,683	0,082
03	2,683	0,251	0,305	0,112
04	4,135	0,274	0,675	0,172
05	1,449	0,521	0,190	0,060
06	1,845	0,313	0,514	0,077
07	2,739	0,143	0,301	0,114
08	3,258	0,495	0,842	0,136

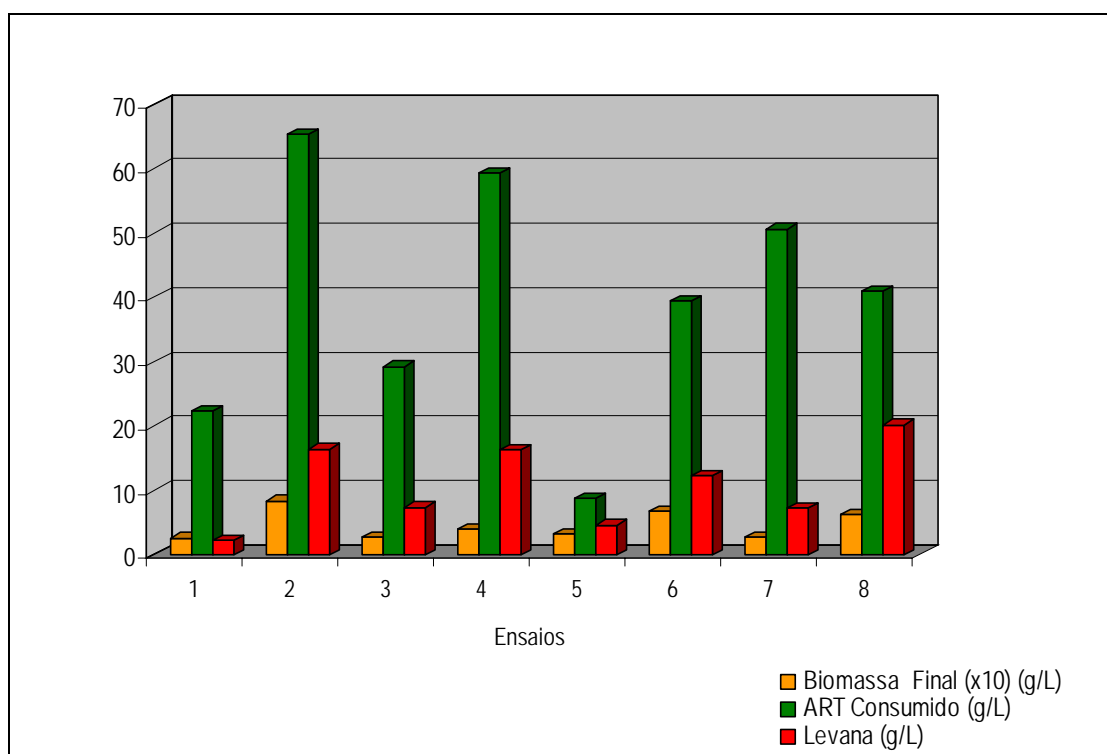


Figura 4 - Produção de biomassa, consumo de ART e produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821 em meio de sacarose na presença e ausência de sais .

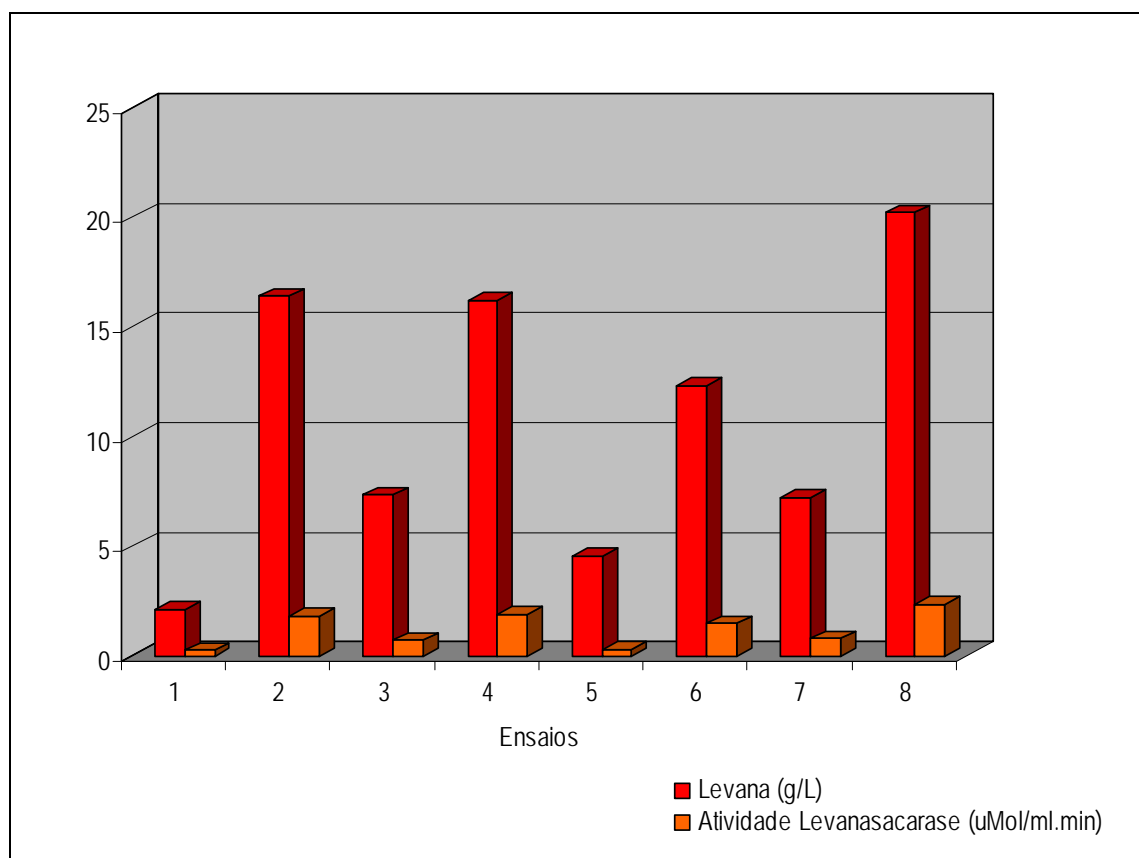


Figura 5 - Produção de levana e atividade de levanosacarase de *Z. mobilis* ATCC 31821 em meio de sacarose na presença e ausência de sais.

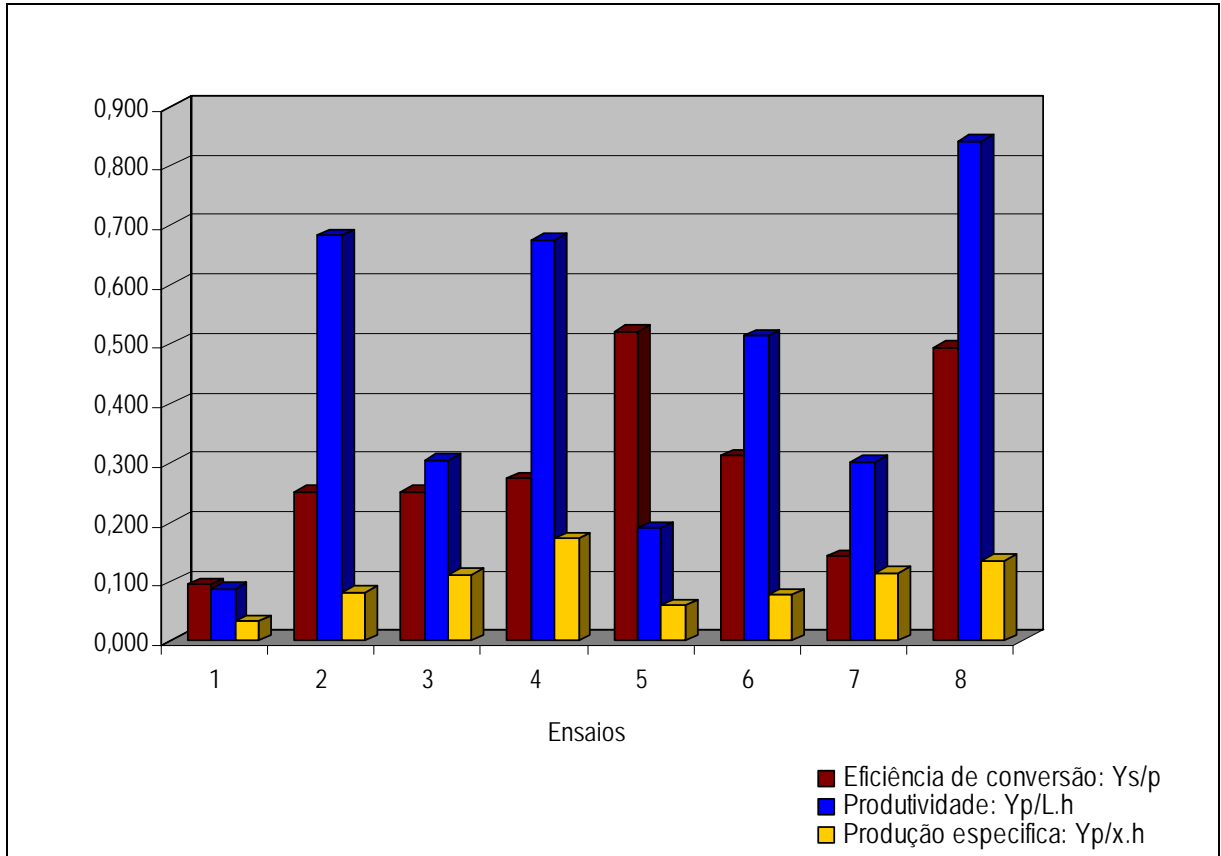


Figura 6 - Eficiência de conversão, produtividade e produção específica de levana de *Z. mobilis* ATCC 31821 em meio de sacarose.

Através da análise da Tabela 3 e a Figura 4 os resultados demonstram que a alteração dos sais no meio de fermentação altera significativamente a produção de levana e que a melhor produção de levana foi de $20,202 \text{ g.L}^{-1}$ (onde estão presentes todos os sais).

O extrato de levedura influencia positivamente na produção de levana quando se compara os ensaios 8 (presença de extrato de levedura) e 5 (ausência de extrato de levedura) onde as produções foram respectivamente $20,202 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,563 \text{ g.L}^{-1}$. O extrato de levedura e o fosfato de potássio se mostraram estatisticamente significativos na produção de levana ($p < 0,05$). As melhores produtividades ($Y_{p/L.h}$) apresentadas pela Tabela 4 e Figura 6 são dos experimentos 2, 4 e 8 os quais apresentam extrato de levedura em sua composição.

Esta 2ª etapa foi realizada com o objetivo de se verificar a influência e interações dos sais na fermentação, para que na 3ª etapa onde serão utilizados substratos complexos (caldo e melação) os efeitos desses sais possam ser analisados e explicados. Análises estatísticas prévias demonstram que níveis mais elevados de extrato de levedura e fosfato de potássio tendem a aumentar a produção de levana.

3 – Análise da 3ª Etapa:

Avaliação das fontes de carbono complexas (caldo de cana-de-açúcar e melaço de cana-de-açúcar) e suplementação com sais, para a produção de levanas.

Nesta etapa avaliou-se a produção de levanas por *Z. mobilis* utilizando caldo de cana-de-açúcar e melaço de cana-de-açúcar (fontes de carbono complexas) como variáveis qualitativas na concentração açúcares fixada em 250 g.L⁻¹, e os efeitos e interações dos constituintes do meio de fermentação descritos respectivamente em 4.1.2.3. O tempo de fermentação de 24 h e a concentração de açúcares (250 g.L⁻¹) foram fixados a partir dos resultados obtidos na 1ª etapa do planejamento estatístico. Os resultados obtidos nesta etapa estão demonstrados na Tabela 5 e 6 e nas Figuras 7, 8 e 9.

Tabela 5 - Resultados obtidos na avaliação da influência das fontes de carbono complexas e dos sais constituintes do meio de fermentação de sacarose.

Ensaio	Fonte de Carbono	Extrato De Levedura	Fosfato de Potássio	Sulfato de Amônio	Sulfato de Magnésio	Biomassa Final (g.L ⁻¹)	ART Consumido (g.L ⁻¹)	Levana (g.L ⁻¹)	Atividade Levanasacarase (uMol.ml ⁻¹ .min ⁻¹)
1	Melaço	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,337	24,654	1,850	0,194
2	Caldo	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1,770	59,824	12,321	1,658
3	Melaço	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,503	34,564	5,234	0,695
4	Caldo	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	2,366	77,263	15,456	1,925
5	Melaço	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,494	31,452	2,546	0,321
6	Caldo	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	2,022	64,568	13,451	1,854
7	Melaço	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,390	26,311	4,325	0,542
8	Caldo	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	2,533	85,423	15,324	2,140
9	Melaço	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,430	32,154	0,542	0,074
10	Caldo	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	1,985	67,566	14,895	2,021
11	Melaço	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,442	29,254	3,845	0,432
12	Caldo	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	2,514	85,432	13,270	1,765
13	Melaço	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,402	27,546	2,789	0,364
14	Caldo	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1,889	64,187	11,854	1,458
15	Melaço	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,487	33,145	4,785	0,524
16	Caldo	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	2,224	79,546	15,423	1,985
17	Caldo	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1,916	66,213	15,211	2,074
18	Melaço	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,542	35,456	5,234	0,654
19	Caldo	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	1,907	60,123	12,385	1,654
20	Melaço	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,322	21,512	1,234	0,154
21	Caldo	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	2,222	75,423	12,954	1,754
22	Melaço	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,506	33,456	3,574	0,523
23	Caldo	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1,985	68,549	13,458	1,895
24	Melaço	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,335	21,354	3,214	0,521
25	Caldo	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	2,414	79,546	14,235	1,958
26	Melaço	2 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,620	41,325	4,012	0,520
27	Caldo	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	2,027	69,574	13,254	1,754
28	Melaço	0 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,329	23,016	3,854	0,521
29	Caldo	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	2,321	79,546	12,854	1,854
30	Melaço	2 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	0,508	34,236	3,210	0,454
31	Caldo	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	1,907	67,584	14,985	1,954
32	Melaço	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0 g.L ⁻¹	0,308	19,124	0,395	0,054

Tabela 6: Resultados obtidos da avaliação da presença e ausência de sais do meio de sacarose para a produção de levanas por *Z. mobilis* ATCC 31821.

Ensaio	Produção específica: $Y_{p/x}$	Eficiência conversão: $Y_{s/p}$	Produtividade: $Y_{p/L.h}$	Produção específica: $Y_{p/x.h}$
01	5,486	0,075	0,077	0,229
02	6,961	0,206	0,513	0,290
03	10,410	0,151	0,218	0,434
04	6,531	0,200	0,644	0,272
05	5,150	0,081	0,106	0,215
06	6,652	0,208	0,560	0,277
07	11,090	0,164	0,180	0,462
08	6,049	0,179	0,639	0,252
09	1,262	0,017	0,023	0,053
10	7,505	0,220	0,621	0,313
11	8,707	0,131	0,160	0,363
12	5,278	0,155	0,553	0,220
13	6,938	0,101	0,116	0,289
14	6,276	0,185	0,494	0,261
15	9,821	0,144	0,199	0,409
16	6,936	0,194	0,643	0,289
17	7,939	0,230	0,634	0,331
18	9,650	0,148	0,218	0,402
19	6,495	0,206	0,516	0,271
20	3,837	0,057	0,051	0,160
21	5,829	0,172	0,540	0,243
22	7,058	0,107	0,149	0,294
23	6,781	0,196	0,561	0,283
24	9,600	0,151	0,134	0,400
25	5,896	0,179	0,593	0,246
26	6,467	0,097	0,167	0,269
27	6,539	0,191	0,552	0,272
28	11,721	0,167	0,161	0,488
29	5,539	0,162	0,536	0,231
30	6,324	0,094	0,134	0,263
31	7,859	0,222	0,624	0,327
32	1,281	0,021	0,016	0,053

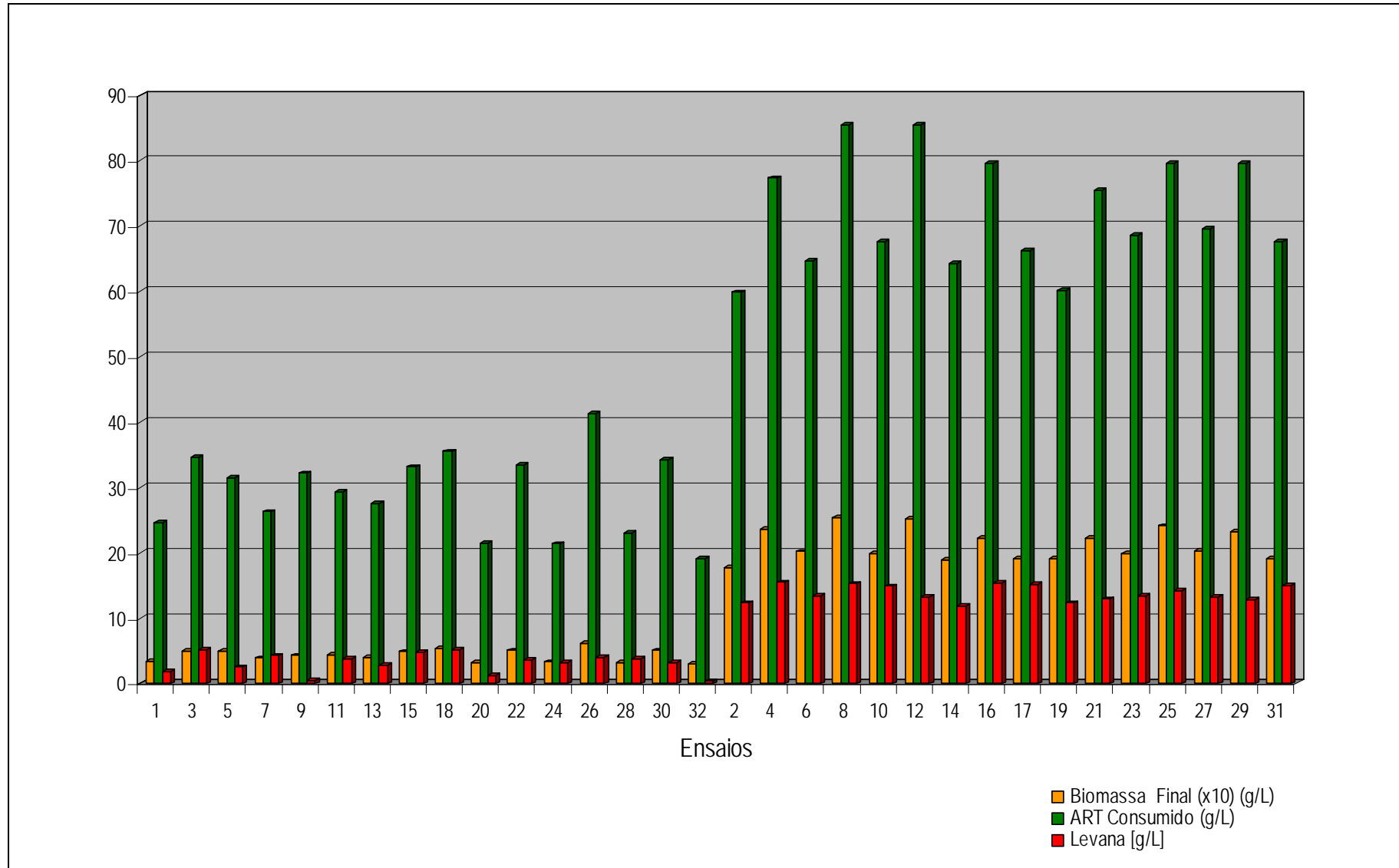


Figura 7 - Produção de biomassa, ART consumido e produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821 utilizando das fontes de carbono complexas e ausência e presença dos sais constituintes do meio.

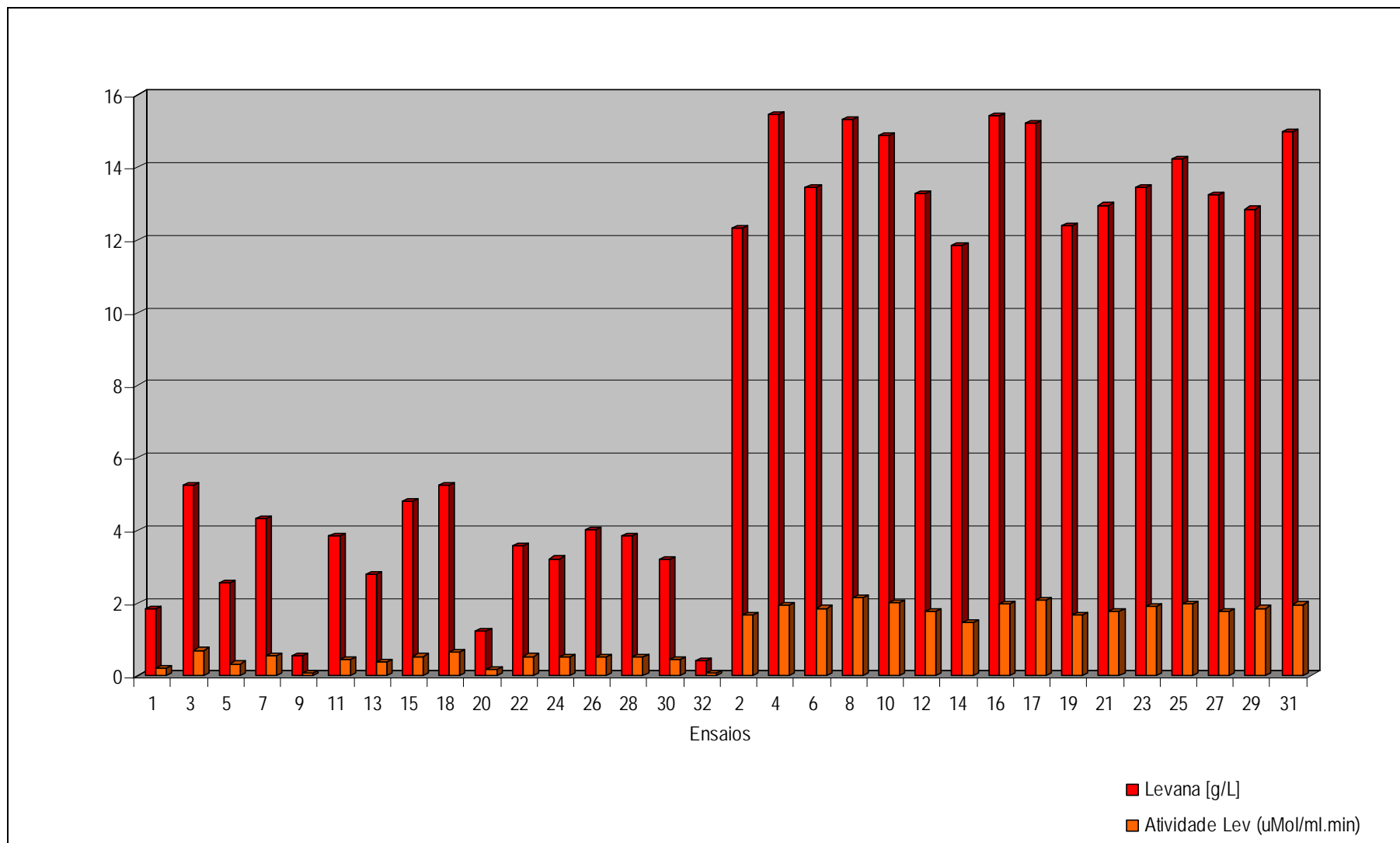


Figura 8 - Produção de levana e atividade de levansacarase de *Z. mobilis* ATCC 31821 utilizando das fontes de carbono complexas e ausência e presença dos sais constituintes do meio.

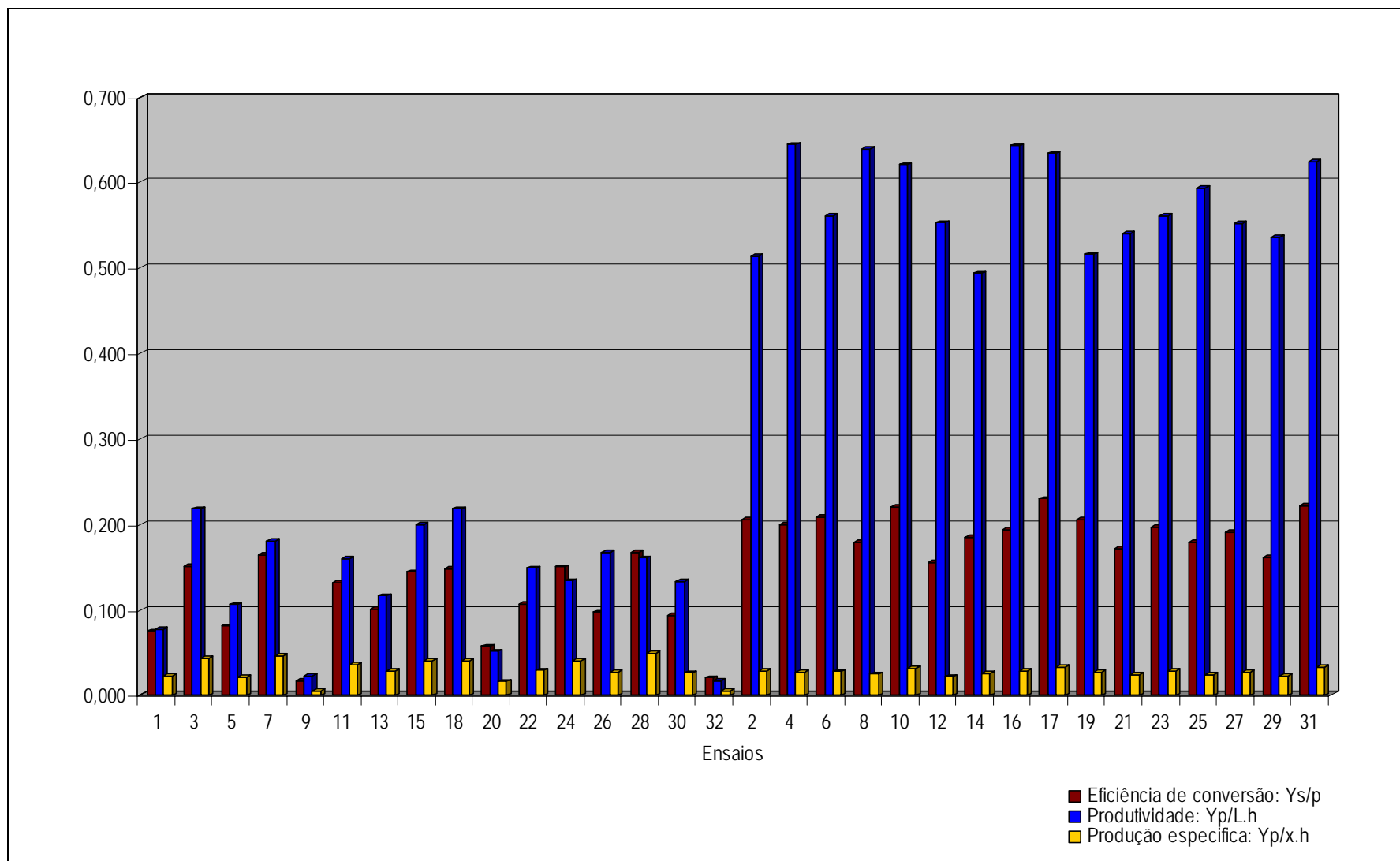


Figura 12 - Eficiência de conversão, produtividade e produção específica de levana de *Z. mobilis* ATCC 31821 utilizando das fontes de carbono complexas e ausência e presença dos sais constituintes do meio.

Comparando-se os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6 e Figuras 7 e 9 pode-se concluir que o caldo é o melhor substrato do que o melaço. O melaço inibe todos os parâmetros analisados (Figuras 7, 8 e 9 e Tabela 5 e 6). O extrato de levedura apresentou um efeito positivo quando adicionado ao caldo, maiores níveis de extrato de levedura tendem a aumentar a produção de levana. Análises estatísticas prévias mostram que o sulfato de magnésio foi significativo para a produção de levana.