



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SILIANE DENISE BERTÉ

LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633:
PRODUÇÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
FERMENTAÇÃO UTILIZANDO METODOLOGIA DE
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA PARCIAL

Londrina
2009

SILIANE DENISE BERTÉ

LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633:
PRODUÇÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
FERMENTAÇÃO UTILIZANDO METODOLOGIA DE
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA PARCIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito final para à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Londrina
2009

SILIANE DENISE BERTÉ

**LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633: PRODUÇÃO
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito final para à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Antonia P. C. Celligoi.
UEL –Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Inês Conceição Roberto
USP – São Paulo – SP

Prof^a. Dr^a. Maria de L. C. C. da Silva
UNESP – Marília –SP

Londrina, 5 de março de 2009.

DEDICATÓRIA

*Pelo amor eterno
dedico este trabalho
aos meus pais, José e Loiri*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

Reconheço a todos que estiveram presentes no período de realização do trabalho e expresso todo meu agradecimento:

À professora e orientadora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, pela ajuda competente e pelos exemplos éticos, possibilitando o desenvolvimento e concretização do trabalho.

À professora e co-orientadora Mara Lucia Luiz Ribeiro, pela disposição, dedicação, que foram imprescindíveis para realização do estudo.

Ao professor Dionísio Borsato pela dedicação e ajuda profissional.

Aos meus irmãos e sustento da minha vida, Miriam e Juliano pelo apoio e pelo amor incondicional.

Rafael, pelo carinho, aconchego e apoio.

João, Giovana e Tati pelos risos, pela amizade durante esses dois anos, e pela força nos momentos mais difíceis na minha vida.

Às minhas amigas Sandra e Naissara, que nem pela distância, deixaram de me confortar.

À Flávia, Patrícia, Thiago, Thais, Gisela, Patrick, Elaine e Ismael pela ajuda profissional, companheirismo e descontração nas horas de nervosismo.

Aos professores do mestrado em Biotecnologia e funcionários do Departamento de Bioquímica (em especial ao Nelson) pelo apoio e auxílio prestado.

Ninguém sabe completamente o que um homem
pode conseguir até que,
motivado pela vontade,
ele reúne suas forças e decide que nada irá
derrotá-lo.

Germaine St. Cloud

BERTÉ, Siliane Denise. **Levanasacarase de *Bacillus subtilis* ATCC 6633:** produção em diferentes condições de fermentação utilizando metodologia de superfície de resposta e caracterização bioquímica parcial. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Levanasacarase (E.C.2.4.1.10) é uma enzima extracelular que sintetiza levana a partir da sacarose. Muitos microrganismos são produtores da levanasacarase, entre eles o *Bacillus subtilis* tem sido estudado na produção da enzima e na síntese de levana, em diferentes condições de fermentação. Os fatores utilizados nos processos podem afetar a produção de levanasacarase e o planejamento estatístico auxilia na redução dos custos e tempo no processo, maximizando o rendimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração de açúcar, pH, tempo de cultivo e agitação no meio de fermentação para a produção de levanasacarase por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, através da metodologia da superfície de resposta. Inicialmente, foi aplicado um planejamento 2^4 onde as variáveis foram: concentração de açúcar (X_1), pH (X_2), tempo de cultivo (X_3) e agitação (X_4). Um segundo planejamento fatorial fracionado 3^{3-1} foi conduzido visando otimizar a produção da enzima. Os resultados indicaram que a condição ótima de fermentação para produção de levanasacarase foi 300 gL^{-1} de sacarose, pH 6,0, 24 horas e 180 rpm, atingindo a atividade de 6,57 UA e nestas condições a produção de levana foi de $18,94 \text{ gL}^{-1}$. A análise de variância (ANOVA) mostrou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9816, certificando um ajuste do modelo aos dados experimentais. Na condição ótima de produção, os parâmetros cinéticos (pH, temperatura e concentração de substrato) da levanasacarase do extrato bruto livre de células foram avaliados. Os parâmetros definidos como ótimos indicaram pH 6,0, temperatura 50°C , concentração de substrato 1,5M.

Palavras-chave: Levanasacarase. *Bacillus subtilis*. Delineamento fatorial. Levana.

BERTÉ, Siliane Denise. **Levansucrase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633**: production in different conditions of fermentation using surface response methodology and partial biochemical characterization. 2009. 96f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Levansucrase (E.C.2.4.1.10) is an extracellular enzyme which synthesizes levan from the sucrose. Many microorganisms are producers of levansucrase; among them, the *Bacillus subtilis* has been studied in the production of the enzyme and in the synthesis of levan in different fermentation conditions. The factors used in the process can interfere the production of levansucrase, and the statistic design can help the reduction in costs, and time of process, maximizing the production. The aim of this study was to evaluate through the surface response methodology, the production of levansucrase per *Bacillus subtilis* ATCC 6633 varying the concentration of sucrose in the fermentation, pH, time of culture and agitation. Initially, it was applied a planning of 2^4 where the variables were: sucrose concentration (X_1), pH (X_2), culture time (X_3), and agitation (X_4). The second fractional factorial planning 3^{3-1} was lead aiming at to optimize the production of the enzyme. The results indicated that the great condition of the fermentation to the production of the levansucrase was 300 gL^{-1} of sucrose, pH 6.0, 24 hours and 180 rpm, reaching the activity of 6.57 UA. The variance analysis (ANOVA) showed a coefficient of determination (R^2) of 0.9816, certifying a adjust of the experimental data model. In best conditions of production, the kinetic parameters (pH, temperature, concentration of substrate) of levansucrase from the cell-free extract were evaluated. The parameters defined as optimum, indicated pH 6.0, temperature of 50°C , concentration of substrate 1.5M.

Keywords: Levansucrase. *Bacillus subtilis*. Factorial design. Levan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Reações catalisadas pela levanasacarase para formação de trioses e levana	17
Figura 2 –	Estrutura química da cadeia principal de levana e sua ramificação.....	21
Figura 3 –	Estrutura química da Levanbiose.....	22
Figura 4 –	Bacillus subtilis B - 1 formando cadeias longas	28
Figura 5 –	Perfil cromatográfico das amostras de levana obtidas dos ensaios 14, 15 e 16 (Etapa 1)	90
Figura 6 –	Perfil cromatográfico da amostra de levana obtida do ensaio 6 (Etapa 2)	90
Figura 7 –	Perfil cromatográfico dos padrões de levana de Leuconostoc mesenteroides. Massa molar de 670.000, 410.000 e 50.000	90
Figura 8 –	Relação entre produção de levana e crescimento celular (Etapa 1) por B. subtilis.....	93
Figura 9 –	Relação entre produção de levana e consumo de açúcares (Etapa 1) por B. subtilis.....	93
Figura 10 –	Relação entre produção de levana e crescimento celular (Etapa 2) por B. subtilis.....	96
Figura 11 –	Relação entre produção de levana e consumo de açúcares (Etapa 2) por B. subtilis.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Tipos e proporções de ligações glicosídicas encontradas na molécula de levana de <i>B. polymyxa</i>	22
Tabela 2	– Aplicações industriais da levana	24
Tabela 3	– Microrganismos produtores de levana	26
Tabela 4	– Meio de preservação para <i>B. subtilis</i>	30
Tabela 5	– Meio de inoculo	31
Tabela 6	– Meio de fermentação	31
Tabela 7	– Delineamento fatorial completo do tipo 24 com duas repetições verdadeiras no ponto central para avaliar a concentração de sacarose, pH, tempo de cultivo e agitação na atividade da levanasacarase de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 a 37°C	33
Tabela 8	– Delineamento fatorial do tipo 33-1 com duas repetições verdadeiras no ponto central para avaliar a concentração de sacarose, pH e agitação na atividade da levanasacarase de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 em 24 horas de cultivo a 37°C.....	34
Tabela 9	– Produção, produtividade de levana, biomassa e consumo de açúcares obtidas no modelo experimental fatorial completo 24 (Etapa 1) por <i>B. subtilis</i>	92
Tabela 10	– Produção de levana, biomassa e consumo de açúcares obtidas no modelo experimental fatorial fracionado 33-1 (Etapa 2) por <i>B. subtilis</i>	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	LEVANASACARASE	15
3.2	PRODUÇÃO, EFEITO DE CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NA ATIVIDADE DA LEVANASACARASE E PRODUÇÃO DE LEVANA	17
3.3	LEVANA	20
3.4	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE LEVANA	25
3.5	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAL	30
4.1.1	Microrganismo	30
4.1.2	Meios de Cultura	30
4.1.2.1	Meio de preservação	30
4.1.2.2	Meio de inóculo	31
4.1.2.3	Meio de fermentação	31
4.2	MÉTODOS	31
4.2.1	Preservação do Microrganismo	31
4.2.2	Planejamento Estatístico	32
4.2.2.1	Etapa 1 - Efeito da concentração de sacarose, pH, tempo de cultivo e agitação na atividade da levanasacarase	32
4.2.2.2	Etapa 2 - Otimização da produção levanasacarase por <i>B. subtilis</i>	33
4.2.3	Processo Fermentativo	35
4.2.3.1	Inóculo	35
4.2.3.2	Fermentações	35
4.2.4	Métodos Analíticos	36
4.2.4.1	Determinação da biomassa	36

4.2.4.1.1	<i>Curva de biomassa</i>	36
3.2.4.1.2	<i>Quantificação da biomassa</i>	36
4.2.4.2	Determinação dos açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) das fermentações	36
4.2.4.3	Atividade da levanasacarase	37
4.2.4.4	Quantificação de levana	37
4.2.5	Fermentação para Obtenção do Extrato Bruto de Levanasacarase	38
4.2.6	Caracterização Bioquímica da Levanasacarase	38
4.2.6.1	Efeito do pH e temperatura na atividade da levanasacarase	38
4.2.6.2	Especificidade da enzima com o substrato sacarose	39
4.2.7	Estimativa da Massa Molar das Maiores Produções de Levana nas Etapas 1 e 241	39
4.2.8	Análise Estatística	40
5	REFERÊNCIAS	41
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1	Artigo A - Statistical optimization of levansucrase production from <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 using response surface methodology	48
6.2	Artigo B - Caracterização parcial da levanasacarase produzida por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	64
7	CONCLUSÕES	75
	ANEXOS	76
ANEXO A	Normas para submissão do Artigo A para revista <i>Process Biochemistry</i>	77
ANEXO B	Normas para submissão do Artigo B para revista <i>Enzyme and Microbial Technology</i>	83
ANEXO C	RESULTADOS COMPLEMENTARES	89
I -	Estimativa da massa molar das maiores produções de levana nas Etapas 1 e 2	89
II -	Produtividade, produção de levana, crescimento celular e consumo de açúcares no primeiro modelo experimental fatorial completo 24 (Etapa 1)	91
III -	Produção de levana, crescimento celular e consumo de açúcares no segundo modelo experimental fatorial fracionado 33-1 (Etapa 2)	94

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, o estudo de biopolímeros vem despertando a atenção dos pesquisadores pelas aplicações potenciais nos diferentes campos industriais como farmacêutico cosmético e alimentício (BELGHITH et al., 1996). Dentre os biopolímeros promissores industrialmente destaca-se a levana, um exopolissacarídeo de frutose, que devido as suas características físico-químicas tem potencial aplicação nesses campos industriais. A levana pode ser produzida por diferentes microrganismos, pela ação da enzima levanasacarase através de processo fermentativo (HAN; CLARCKE 1990; SHIH et al., 2005).

Dentre os microrganismos são produtores de levana e levanasacarase, o *Bacillus subtilis* tem sido estudado por degradar a sacarose e catalisar a formação de levanas, que podem ser de alta e baixa massa molar, refletindo na sua característica físico-química, de acordo com as condições de fermentação ensaiadas (EUZENAT et al., 1997).

A levanasacarase (SacB) de *B. subtilis* realiza três reações características: síntese da levana a partir da sacarose pela reação de transfructosilação com liberação da glicose; hidrólise da levana em frutose e uma terceira reação que é mudança de resíduos de glicose na molécula introduzindo ramificações na molécula de levana (BEINE et al., 2008). A levana resultante consiste de resíduos de frutofuranosil ligados predominantemente por β -(2 \rightarrow 6) e com extensivas ramificações por ligações β -(2 \rightarrow 1) (AMMAR et al., 2002). Os dois tipos de ligações são produzidos pela mesma enzima, a levanasacarase (HETTWER et al., 1995).

A levanasacarase sintetiza levana a partir da sacarose, pelas funções de hidrolase e polimerase, que ocorrem em baixas e altas concentrações de sacarose respectivamente. Pela função de hidrolase a levanasacarase é classificada na família 68 das hidrolases glicosídicas (GH) (MENG; FÜTTERER 2003). Entretanto, em altas concentrações de sacarose, a enzima tem atividade de polimerase, adicionando unidades frutossil em um monossarídeo, dissacarídeo ou frutoligossacarídeos, polimerizando a cadeia de levana (MENG; FÜTTERER, 2008).

A produção de levana bacteriana é diretamente influenciada pela fonte de carbono e sua concentração, fonte de nitrogênio, oxigenação do meio de

fermentação, temperatura, variação de pH e sais presentes no meio. Esses fatores influenciam diretamente o crescimento celular (ERNANDES; CRUZ, 2005), e as produções de levana e de levanasacarase (AHAMED et al., 2005).

Para estudar os diferentes fatores que afetam a produção compostos de interesse biotecnológico, o uso da metodologia estatística reduz o número de experimentos ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados. Isto significa uma sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e custo final (RODRIGUES; IEMMA, 2005). O principal objetivo dos pesquisadores na utilização do planejamento estatístico é verificar a relação entre variáveis e a resposta que é o produto de interesse (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). A metodologia de planejamento fatorial associada à análise de superfícies de respostas (RSM) é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnica de tentativa e erro (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 1995). Esses métodos têm sido empregados com sucesso em análises de bioprocessos como: produção de exopolissacarídeos (OLIVEIRA et al., 2007) produção de enzimas (RAHULAN et al., 2009) e dos constituintes dos meios de fermentação na produção de levana (BABU et al., 2008; ESAWY et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar através de planejamento estatístico, a produção da levanasacarase por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 variando as diferentes condições de fermentação e caracterizar parcialmente a enzima do extrato bruto livre de células.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir por metodologia de superfície de resposta as condições ótimas de cultivo (concentração de sacarose, tempo de cultivo, pH e agitação) para atividade da levanasacarase de *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- Produzir levanasacarase na condição otimizada e avaliar os parâmetros cinéticos no extrato bruto (pH, temperatura, concentração de sacarose, concentração de enzima estabilidade térmica).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEVANASACARASE

A levanasacarase (sacarose: 2,6- β -D-frutana-2,6- β -D-frutossiltransferase, E.C.2.4.1.10) é uma enzima extracelular que sintetiza levana a partir da sacarose, pela seguinte reação:



Como aceptores de resíduos frutosil, para síntese de levana podem ser usados a sacarose, água, álcoois e mono ou oligossacarídeos. Estudos cinéticos sobre a levanasacarase de *B. subtilis* demonstraram que, um mecanismo de reação do tipo ping pong está envolvido na estabilidade e um intermediário covalente da enzima com resíduos frutosil ocorre durante a reação de transfructosilação (AMMAR et al., 2002). O mecanismo ping pong, onde o aminoácido aspartato da enzima tem uma ação nucleofílica e forma a estabilidade do complexo frutosil com a enzima. A atividade catalítica é fortemente influenciada pelos aminoácidos do sítio ativo, Asp-Glu-Asp, que definidos por cristalografia de raio-X estão nas posições 86, 342, 247 na levanasacarase do *B. subtilis* (SEIBEL et al., 2006).

Estudos efetuados em baixas concentrações de sacarose na atividade da levanasacarase descrevem a função principal da enzima como uma hidrolase, que de acordo com a classificação de enzimas ativas em carboidratos, são classificadas na família 68 das hidrolases glicosídicas (GH) (MENG; FÜTTERER, 2008), entretanto, em altas concentrações de sacarose a enzima tem atividade de polimerase, adicionando unidades frutosil em um monossacarídeo, dissacarídeo ou frutoligossacarídeos, polimerizando a cadeia de levana. (MENG; FÜRTERER, 2003; MONSAN, et al., 2001; SANGILYANDI, et al., 1999).

A seletividade da levanasacarase de agir como transferase ou hidrolase é também dependente da fonte da enzima, temperatura e solventes orgânicos miscíveis em água, presentes no meio de reação (CASTILLO; MUNGUÍA, 2004).

Ammar et al. (2002) reportaram que a atividade da levanasacarase está envolvida com uma variedade de processos, entre eles, sobrevivência da bactéria no solo (*Bacillus subtilis*), fitopatogênese (*Erwinia* e *Pseudomonas*) ou simbiose (*Bacillus polymixa*).

Beine et al. (2008) descrevem que a levanasacarase (SacB) de *B. subtilis* realiza três reações características: síntese da levana a partir da sacarose pela reação de transfructosilação e com liberação da glicose; hidrólise da levana em frutose e uma terceira reação que é mudança de resíduos de glicose na molécula introduzindo ramificações. A levana resultante consiste de resíduos de frutofuranosil ligados predominantemente por β -(2→6) e com extensivas ramificações por ligações β -(2→1) (AMMAR et al., 2002). Os dois tipos de ligações são produzidos pela mesma enzima, a levanasacarase (HETTWER et al., 1995).

Muitos microrganismos são produtores da levanasacarase, entre eles o *Bacillus subtilis* tem sido estudado por degradar a sacarose e catalisar a formação de levanas, que podem ser de alta e baixa massa molar de acordo com as condições testadas. (EUZENAT et al., 1997)

Estudos sobre levanasacarase de *B. subtilis* têm mostrado reações de formação de frutoligossacarídeos (FOS) a partir da sacarose. Essas substâncias apresentam com propriedades prebióticas destacando-se a cestose e nistose. Apresentam unidades de frutose β -(2→1) ou β -(2→6) ligadas a uma molécula de glicose através da ligação α -(1→2). (BEINE et al., 2008).

Martínez-Fleites et al. (2005) estudando a síntese das frutanas confirmaram que o processo de formação de levana inicia-se pela reação de transfructosilação, na qual uma molécula de sacarose faz o papel de doador de frutosil e com uma segunda molécula de sacarose a aceptora inicial da metade frutosil. O tamanho da cadeia, o tipo de ligação e as ramificações variam de acordo com a enzima e o organismo e em bactérias, a biossíntese de frutana ocorre por uma única enzima multifuncional, a levanasacarase. A levanasacarase pode catalisar as reações de formação dos trissacarídeos, via O1 para formar 1-cestose (1-cestotriose, isocestose; a base da ligação é β -(2→1) como as inulinas) ou via O6 para formar a ligação β -(2→6) ligada ao frutooligossacarídeo 6-cestose. Essas reações ocorrem via o mecanismo de ping pong, envolvendo a formação de um intermediário frutosil covalentemente ligado a enzima. O intermediário 6-cestose e

os resíduos frutossil da hidrólise da sacarose através de reações de polimerização formam a levana (Figura 1).

A levanasacarase do *B. subtilis* catalisa principalmente a formação de levanas de alta massa molar, sem acúmulo de oligofrutanas intermediárias, o que difere das Gram-negativas que sintetizam e acumulam grandes concentrações de frutoligossacarídeos pelas mesmas reações (Figura 1) (MARTÍNEZ-FLEITES et al., 2005).

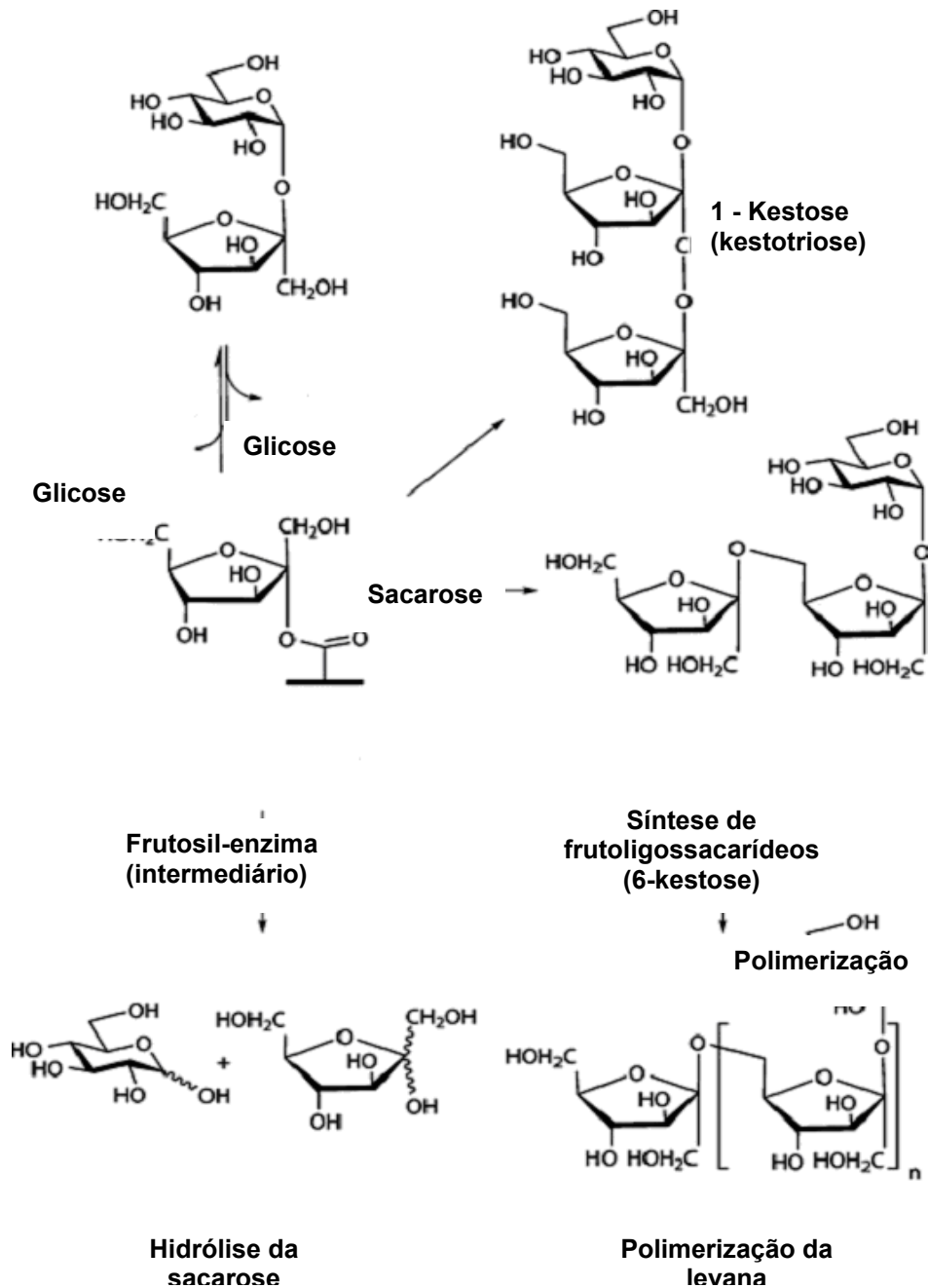


Figura 1 – Reações catalisadas pela levanasacarase para formação de trioses e levana

Com relação a estrutura, Lebrun e Rapenbusch em 1980 determinaram a estrutura terciária da levanasacarase de *Bacillus subtilis*, a uma resolução de 3,8 Å, através de difração de Raios-X, o mapa de densidade eletrônica sugeriu que a molécula de levanasacarase, possui uma forma alongada elipsóide, com dimensões total de 26 x 32 x 117 Å, com massa molar em torno de 49.900 Da, sendo que a enzima é constituída de uma cadeia polipeptídica simples desprovida de aminoácidos cisteína.

Recentes estudos sobre a estrutura cristalina da levanasacarase de *B. subtilis* revelaram que resíduos ácidos (Asp¹³⁵, Asp³⁰⁹ e Glu⁴⁰¹) de aminoácidos localizados no sítio ativo são importantes para o reconhecimento do substrato. A cadeia da enzima é formada por cinco porções em conformação β que é fundamental para a atividade catalítica das enzimas da família das hidrolases 68 (MARTÍNEZ-FLEITES et al., 2005).

A base de dados das enzimas com atividade em carboidratos (CAZY, [HTTP://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html](http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html)) classifica a levanasacarase e a invertase dentro da família *GH 68* que são as hidrolases glicosídicas (GH). Essas hidrolases pertencem a uma diversidade de proteínas, que atuam sobre substratos específicos e com dois requerimentos catalíticos para sua atividade, resíduos ácidos atuando como um doador de prótons e uma base geral ou nucleofílica (MENG; FÜRTERER, 2003).

3.2 PRODUÇÃO, EFEITO DE CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NA ATIVIDADE DA LEVANASACARASE E PRODUÇÃO DE LEVANA

O efeito das diferentes condições de fermentação, na produção de levana e de levanasacarase tem sido objeto de estudo de diferentes autores, considerando as importantes aplicações. Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) estudaram diferentes condições de fermentação na produção de levana e levanasacarase de *Zymomonas mobilis* e concluíram que a máxima produção de levana foi a pH 5,0; 25°C e 150 gL⁻¹ de sacarose e que a atividade da levanasacarase e a produção de levana diminuiu quando a temperatura aumentou de 25 para 40°C, e nestas condições ocorreu a diminuição da produção de levana.

Ahmed et al. (2005) avaliaram a produção de levanasacarase de *B. subtilis* NRC33a usando sacarose e glicose como fontes de carbono. A produção ótima da levanasacarase foi a 30°C com 0,5 gL⁻¹ de MgSO₄ e a adição de 2% levedura de panificação, como fonte de nitrogênio. As variáveis testadas favoreceram a atividade da levanasacarase. Os autores estudaram a síntese enzimática da levana e indicaram que o aumento da concentração da enzima, aumentou a produção de levana.

Empregando resíduos agroindústrias como: casca de laranja, resíduos de limão, banana, pó de serra e trigo como substratos Ahmed (2008) estudou a produção de levanasacarase de *Bacillus megaterium* em fermentação em estado sólido sob condições estáticas. A máxima produção da enzima foi 140,54 U/g por substrato sólido de serrilha com 50 mL do meio de produção, pH de 6,0; 72 horas e 30°C.

O estudo das condições do meio na atividade das enzimas é de grande importância para conhecer a sua função. As enzimas sofrem os mesmos efeitos estruturais observados com as proteínas globulares pela variação de pH e de temperatura. Mudanças extremas de pH podem alterar a estrutura da enzima, devido a uma repulsão entre as cargas elétricas. Mudanças mais brandas de pH podem levar a uma dissociação das cadeias das enzimas oligoméricas, o que acarretaria alteração na sua função. As enzimas apresentam pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática (WILLIAMS; JONES, 1976).

A influência da temperatura na estabilidade da levanasacarase da *Bacillus subtilis* foi investigada por Ammar et al. (2002) e Esawy et al. (2008) que encontraram resultados similares, onde, a 50°C a enzima é estável por 60 minutos de incubação. Quando a temperatura foi a 60°C a atividade da levanasacarase permaneceu em 50%, durante 30 minutos de incubação. Porém a 70°C a enzima perdeu sua atividade em 100%.

Hettwer et al. (1995) estudaram a influência de diferentes pH (2-9) na atividade da levanasacarase extracelular, produzida por *Pseudomonas syringae*. A enzima teve seu pH ótimo em 6,2 usando sacarose a 10% e temperatura de 37°C. Ammar et al. (2002) confirmaram 100% de atividade da levanasacarase de *Bacillus* sp. em pH 6, e um decréscimo na atividade da enzima aumentando ou diminuindo os valores de pH (maior que 9,0 e menor que 3,0).

Levanasacarase de outros microrganismos mostraram atividade máxima na faixa de pH entre 5 e 6,5 (BELGHITH et al., 1996; HERNANDEZ et al., 1995). Esawy et al. (2008) estudaram o efeito de vários valores de pH na atividade da levanasacarase de *B. subtilis* e obtiveram maior atividade em pH 5,5 para levanasacarase imobilizada e levanasacarase livre.

A temperatura é um dos fatores que influenciam na atividade das enzimas. Cada enzima possui uma temperatura ótima, onde a reação atinge seu máximo e uma faixa onde atua sem sofrer desnaturação. Hettwer et al. (1995) avaliaram a atividade da levanasacarase variando a temperatura entre 0 e 100°C e encontraram atividade entre 4 a 82°C. Sendo que, o ótimo de atividade de levanasacarase foi obtido a 18°C para formação de levana e 60°C para quebra de sacarose. Diferentes resultados foram descritos por Esawy et al., (2008) demonstrando que a temperatura ótima de atividade da levanasacarase de *B. subtilis* foi de 35°C, para enzima livre e imobilizada.

A concentração de substrato é um outro fator que atua sobre a atividade da enzima, podendo ser uma resposta negativa ou positiva na capacidade catalítica. Ammar et al. (2002) demonstraram que a 50°C, a concentração de 36% de sacarose na reação enzimática, resultou em uma maior formação de levana (200 mg/mL) pela levanasacarase de *B. subtilis*. Hetter et al. (1995) comprovaram que 750 mM de sacarose é a melhor concentração de substrato para a atividade de formação de levana pela levanasacarase in vitro.

3.3 LEVANA

Smith e Steele em 1911 foram os primeiros autores a descreverem uma nova goma, obtida a partir de soluções de sacarose inoculadas com *Bacillus levaniformans*, a qual deu o nome de levana e fizeram um estudo químico demonstrando que a levana quando hidrolisada liberava levulose.

A levana produzida por uma espécie de *Bacillus* em solução possui uma rotação específica $[\alpha]_D -40$, com o ponto de fusão de 200 ° C, não sofrem redução em solução de Fehling e não é precipitada na presença de acetato (TAGGART, 1911).

Hibbert e Tipson (1930) determinaram e descreveram a estrutura da goma levana, formada através da ação do *Bacillus mesentericus* em caldo de cana de açúcar. A estrutura da levana foi determinada após hidrólise, seguida de acetilação e metilação e concluíram que a cadeia principal de levana era composta de resíduos de frutofuranosídeos polimerizados, unidos por ligações $\beta(2\rightarrow6)$.

Em 1984 Rolf e Gray realizaram a análise das posições das ligações entre as unidades D-frutofuranosídicas, pelo método de clivagem reductiva, utilizando como modelo, levanas produzidas por *Aerobacter levanicum*, demonstrando que a levana é uma D-frutana de alta massa molar composta de resíduos D-frutofuranosídicas, unidas por ligações $\beta(2\rightarrow6)$, com algumas ramificações em $\beta(2\rightarrow1)$.

Simms, Boyko e Edwards (1990) determinaram a estrutura das levanas produzidas por *Streptococcus salivarius* SS2, através de análises de oxidação por periodato, metilação, clivagem-reductiva, e posterior análise por cromatografia gasosa, espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear de C^{13} . Os autores concluíram que as levanas são constituídas por uma cadeia principal de resíduos de β -D-frutofuranosídicas, ligados por ligações $\beta(2-6)$ em aproximadamente 70% do polissacarídeo; e ramificações com ligações $\beta(2-1)$ em torno de 30% (Figura 2), provavelmente o polímero de levana possuem uma estrutura dendrítica, produzindo uma macro-molécula de forma globular.

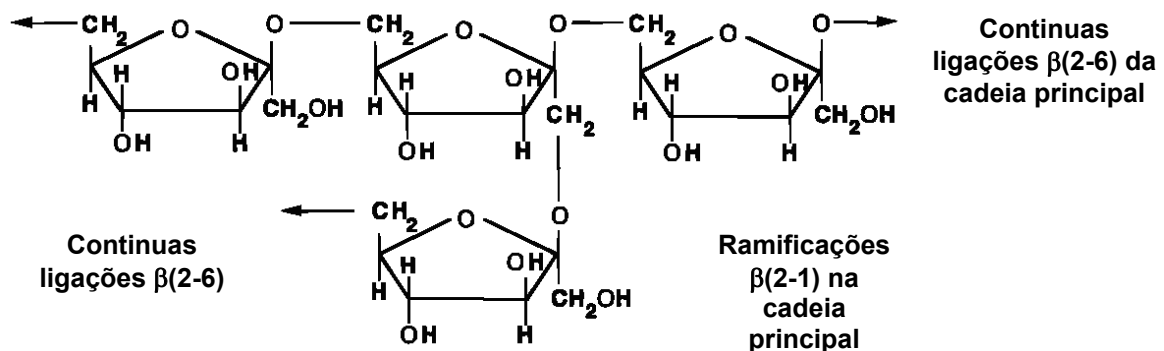


Figura 2 – Estrutura química da cadeia principal de levana e sua ramificação

Han e Clarke (1990) caracterizaram as levanas produzidas por *Bacillus polymyxa*, através de espectroscopia de massa, ressonância magnética

nuclear de C¹³, cromatografia líquida de alta eficiência e análise por metilação como um polímero composto por 98% de unidades frutofuranosídicas, dispostas por ligações glicosídicas e possuía os tipos de ligações entre os resíduos frutossil (Tabela 1).

Tabela 1 – Tipos e proporções de ligações glicosídicas encontradas na molécula de levana de *B. polymyxa*.

Tipo de ligação	%
Cadeia principal - β -(2-6)	71
Ramificações -C1, C2 e C6	12
Grupos terminais -C1 e C2	13
Hexoses livres	4

Fonte: Han e Clarke (1990).

French (1988) publicou os primeiros estudos sobre a análise conformacional da levana e inulina. Utilizou modelos computacionais e através do cálculo dos ângulos e comprimento das ligações entre os anéis de β -D-frutofuranose determinaram a variação angulares estão entre 0 ° a 360 °.

Liu e Waterhouse (1992) realizaram a análise conformacional através de estudo computacional da levanbiose (Frutofuranosil- β (2 \rightarrow 6) Frutofuranose). Os autores concluíram que a conformação espacial das levanas são as mesmas de cada monômero de levanbiose (Figura 3).

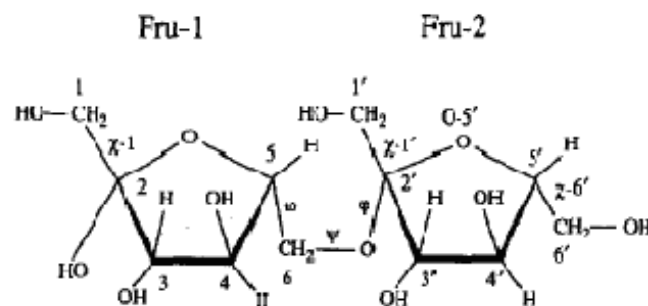


Figura 3 – Estrutura química da Levanbiose.

A levana serve como fonte de armazenamento de carboidratos em microrganismos, que pela ação das levanases é hidrolisada fornecendo carboidratos quando as fontes de carboidratos intracelulares tornam-se escassas. (BERGERON; MOROU-BERMUDEZ; BURNE, 2000).

As características da molécula de levana, como, o tamanho e grau de ramificação contribuem para definir a sua aplicação. As condições de fermentação podem interferir no grau de polimerização da molécula de interesse. Dentre os fatores o qual tem demonstrado contribuir para a alteração da massa molar é o pH, que tem sido estudado por alguns autores. Destaca-se Shu e Lung (2004) que estudaram o fungo basidiomiceto *Antrodia camphorata* em diferentes valores de pH e observaram a variação da massa molar. Os autores concluíram que os EPS de alta massa molar, porém com baixa produção, se concentraram em pH mais baixo e os EPS de baixa massa molar nos valores de pH mais altos. A média da massa molar dos EPS foi $2,18 \times 10^5$ Da.

Batista (2006) estudando a distribuição da massa molar de levana de *Zymomonas mobilis* em caldo de cana de açúcar comprovou estatisticamente, que levanas de alta massa molar (maiores que $6,7 \times 10^5$ Da) foram produzidas em pH 5, após 24 horas de cultivo e que a concentração de açúcar inicial no meio de cultivo não teve efeito significativo.

Cabral de Melo et al. (2007) estudaram a produção e distribuição da massa molar de levana de *B. subtilis* em caldo de cana de açúcar usando delineamento fatorial. Análise estatística confirmou que o tempo de fermentação de 48 horas favoreceu a produção de levana de alta massa molar ($1,4 \times 10^6$ Da).

Ahmed et al. (2005) estudaram a síntese da levana e de frutoligossacarídeos pela levanasacarase de *B. subtilis* usando sacarose e glicose como fontes de carbono. A síntese da levana indicou que a concentração da sacarose foi um dos fatores efetivos, no controle da massa molar da levana, as massas molares mais altas foram atingidas quando utilizou 5% de sacarose na mistura da reação, e que concentrações acima diminuem a massa molar. Os autores também constataram que variações de temperatura e tempo de reação influenciaram na massa molar da levana de *B. subtilis*. A maior massa molar foi de 58,52 KDa na temperatura de 15 °C e gradualmente decresceu em temperaturas mais altas.

Shih e Yu (2005) estudaram *Bacillus subtilis* (natto) em meio de sacarose a 20% e analisaram a produção e caracterização da levana. Quanto à massa molar a levana produzida, apresentou duas frações, com diferentes massas molares (1794 e 11KDa). Essa distribuição foi fortemente afetada pelo tempo de fermentação que após 7 horas foi observado uma maior produção de levanas de alta massa molar.

Euzenat et al. (1997) investigaram a produção de levanas de alta e baixa massa molar de *Bacillus subtilis* C4, em diferentes concentrações de sacarose e variando as temperaturas. Os resultados demonstraram que levanas de alta e baixa massa molar aparecem simultaneamente com o consumo de açúcar pelo microrganismo, entretanto, houve maiores concentrações de levanas de baixa massa molar durante o experimento.

Por suas características químicas e estruturais, a levana tem despertado grande interesse, por apresentar aplicações em diversas áreas como saúde, industrial e alimentação humana (GHALY et al., 2007) (Tabela 2).

Tabela 2 – Aplicações industriais da levana.

Aplicação	Uso	Referências
Industrial	Promover viscosidade	Shih et al., (2005)
	Capacidade de ligar água e a compostos químicos	Ramsay, (1987)
	Agente tamponante	Gabitto et al., (2001)
Médico/farmacêutico	Substituto do plasma sanguíneo	Shih et al., (2005) e Kirk et al., (1991)
	Agente hipocolesterolêmico	Ammar et al., (2002)
	Modificação da membrana celular (células tumorais)	Shih et al., (2005) e Ahmed et al., (2005)
Alimentos	Substância aglutinante	Ammar et al., (2002), Shih et al., (2005) e Ahmed et al., (2005)
	Adoçante	Kirk et al., (1991)
	Substituto da goma arábica	Kirk et al., (1991)
Outras	Agente volumoso	Shih et al., (2005)
	Emulsificante	Shih et al., (2005)
	Agente encapsulante	Shih et al., (2005)
	Cosméticos	Han, (1990) e Ammar et al., (2002)

Fonte: Ghaly et al. (2007)

Na área da saúde, o efeito imunomodulador e antitumoral tem sido estudado por diversos autores. Calazans et al., (2000) estudaram levana de *Zymomonas mobilis* e *Aerobacter levanicum* quanto à atividade antitumoral e concluíram que a levana de *Z. mobilis*, de massa molar em torno de 460.000 Da, apresentaram a maior atividade.

Yoo et al. (2004) caracterizaram as levanas de *Gluconobacter xylinus*, *Microbacterium laevaniformes*, *Rahnella aquatilis* e *Zymomonas mobilis*. Apenas *G. xylinus* mostrou fraca atividade antitumoral e os autores consideraram que isto está relacionado à sua menor massa molar (40.000 Da), enquanto que às levanas produzidas pelos outros microrganismos variaram de 710.000 a 380.000 Da e apresentaram maior atividade.

Ainda quanto à aplicação dos exopolissacarídeos (EPS) na área de saúde, vários estudos revelam que o padrão de ramificação e o grau de polimerização são a base das aplicações farmacêuticas como: substituto do plasma sanguíneo, imunomodulador, prolongador do efeito de certas drogas e hipocolesterolêmicas. (DOELLE et al., 1993, BEKERS et al., 2001 e SHU; LUNG, 2004).

A levana também tem sido promissora para a indústria alimentícia. Aquela de maior massa molar possui uma maior viscosidade, característica desejável para utilização como espessantes e estabilizantes alimentares. Pode ser usada na elaboração de produtos dietéticos por ter propriedade de não cariogênico e ser prebióticos (HAN; CLARKE, 1990).

3.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LEVANA

Diversos microrganismos são capazes de sintetizar levana, em meios ricos em sacarose, por apresentarem a enzima levanasacarase. Ghaly et al., (2007) compilaram em seus estudos os diferentes microrganismos produtores de levana com sua fonte de referência (Tabela 3).

Tabela 3 – Microrganismos produtores de levana.

Microrganismo	Fonte
<i>Acetobacter acetigenum</i>	Loewenberg; Reese, (1957)
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Loewenberg; Reese, (1957)
<i>Actinomyces viscosus</i>	Pabst et al., (1977)
<i>Achromobacter</i> sp.	Han et al., (1990)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Srinivasan; Quastel, (1958)
<i>Aerobacter levanicum</i>	Evans; Hibbert, (1946)
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Han et al., (1990)
<i>Azotobacter chroococum</i>	Hestrin; Goldblum, (1953)
<i>Bacillus asterosporus</i>	Hestrin; Goldblum, (1953)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Han et al., (1990)
<i>Bacillus megaterium</i>	Evans; Hibbert, (1946)
<i>Bacillus mesentericus</i>	Han et al., (1990)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Han et al., (1989)
<i>Bacillus subtilis</i>	Shih et al., (2005)
<i>Bacillus subtilis</i> Natto	Yamamoto et al., 1999.
<i>Corynebacterium levaniformans</i>	Han et al., (1990)
<i>Corynebacterium beticola</i>	Han et al., (1990)
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Han et al., (1990)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Han et al., (1990)
<i>Micbacterium laevaniformans</i>	Han et al., (1990)
<i>Odontomyces viscosus</i>	Han et a., (1990)
<i>Phytomonas pruni</i>	Han et al., (1990)
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Fuchs et al., (1956)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Fuchs et al., (1956)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fuchs et al., (1956)
<i>Rothis dentocariosa</i>	Han et al., (1990)
<i>Streptococcus</i> sp.	Han et al., (1990)
<i>Streptococcus salivarius</i>	Fuchs et al., (1956)
<i>Xanthomonas</i> sp.	Han et al., (1990)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Dawes, et al., (1966)
<i>Aspergillus sydawi</i>	Loewenberg; Reese, (1957)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Loewenberg; Reese, (1957)

Fonte: Ghaly et al. (2007).

Além dos microrganismos listados na Tabela 3, outros microrganismos produtores de levana são encontrados, destacando *Actinomyces naeslundii* encontrado na flora bucal como grande produtor de levana. São bactérias gram-positivas, anaeróbicas facultativas, e estão envolvidas na patogênese da cárie dentária e doenças periodontais. A produção de levana neste caso se dá, pela grande proporção de sacarose na dieta, que aumenta a produção de ácidos, e também por serem antígenos independentes de células T. Conseqüentemente, pode contribuir para a inflamação nas doenças do periodontais. (BERGERON; MOROU-BERMUDEZ; BURNE, 2000).

Pseudomonas syringae var. *glycinea* e *P. syringae* var. *phaseolicola* produzem vários EPS de alta massa molar, incluindo alginato e levanas, os quais são fatores de virulência para as plantas, causando manchas nas folhas de feijão e soja e que levam ao desenvolvimento de lesões com necroses (HETTWER, et al., 1998).

Uma bactéria que tem se destacado na produção de levana é a *Zymomonas mobilis*, que quando cresce em meio contendo altas concentrações de sacarose, o seu metabolismo é direcionado para a formação de polímeros de frutose extracelular, levana, com uma redução significativa na produção de etanol (VUYST; DEGEEST, 1999; SPRENGER, 1996; OLIVEIRA et al., 2007; BORSARI et al., 2006).

Bacillus subtilis tem sido amplamente estudado por produzir concentrações elevadas de levana, em substratos ricos em sacarose, com vantagens na alta produção e nas características do produto que pode ser aplicado industrialmente (SHIH; YU, 2005; AHAMED et al., 2005).

As bactérias do gênero *Bacillus* possuem a forma de bastonetes, são Gram-positivas, aeróbias formadores de esporos e dispõem-se em cadeias longas (Figura 4). A maioria dos membros desse gênero consiste em microrganismos saprófitas, que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação, como o *B. subtilis* (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

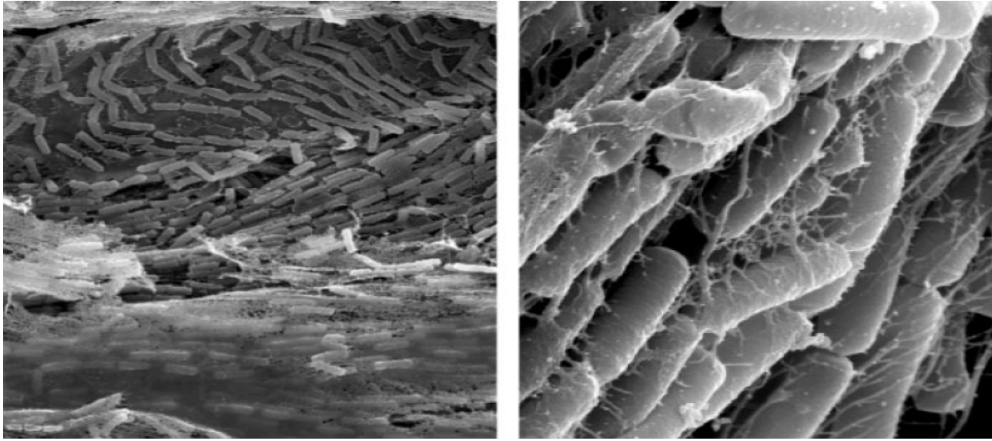


Figura 4 – *Bacillus subtilis* B - 1 formando cadeias longas.
Fonte: Morikawa et al. (2006).

Os *B. subtilis* são organismos atrativos industrialmente por várias razões, entre estas é possível citar: o rápido crescimento celular, o que leva à diminuição do tempo de fermentação e a sua capacidade de secretar proteínas e outros produtos no meio extracelular (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). Microrganismo produtor de frutoligossacarídeos (FOS) e outros compostos, o *Bacillus subtilis* tornou-se alvo de pesquisas. Sua capacidade de formar levana foi bem demonstrada por Tanaka e Yamamoto desde 1979.

3.5 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O principal objetivo dos pesquisadores para o planejamento de experimentos é caracterizar a relação entre variáveis independentes e as respostas em um conjunto de fatores de interesse. Isso pode ser executado através da construção de um modelo que descreva a variação da resposta em função dos valores dos fatores estudados (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A metodologia do planejamento fatorial associada à análise de superfícies de respostas é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

Modelagem e deslocamento são etapas que constituem a metodologia de superfície de resposta, e serão repetidas até o alcance da região ótima. A modelagem normalmente é realizada ajustando-se os modelos lineares e quadráticos aos resultados experimentais, obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento segue ao longo do caminho da máxima inclinação (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

Melo et al. (2007) otimizaram a produção de levana de *Zymomonas mobilis* por planejamento fatorial 2^{4-1} , incluindo ponto central, variando quatro fatores no meio de fermentação: concentração inicial de sacarose em gL^{-1} (150, 200 e 250); temperatura (20, 25 e 30°C); concentração inicial de extrato de levedura gL^{-1} (2, 3,5 e 5) e agitação em rpm (50, 75 e 100). Os experimentos mostraram que o extrato de levedura não foi significativa para a produção de levana, porém, a concentração de sacarose, temperatura e agitação são fatores que influenciaram na produção de levana e a maior concentração de levana foi de $14,67 \text{ gL}^{-1}$.

Borsari et al. (2006) estudaram a influencia das fontes de carbono na produção de levana por *Zymomonas mobilis* através de modelo fatorial 2^3 totalizando 8 experimentos. Os fatores estudados foram processo de fermentação, concentração de caldo de cana de açúcar e de sacarose em gL^{-1} como substratos e suas interações. Os resultados demonstraram que a variável caldo de cana teve um efeito positivo nas respostas. A melhor produção foi de $40,14 \text{ gL}^{-1}$ em 150 gL^{-1} de sacarose em fermentação batelada.

A metodologia de superfície de resposta vem sendo empregada nos processos de otimização de produção de enzimas. Rahulan et al. (2009) concluíram através de um delineamento central composto as melhores condições de fermentação para a produção de uma peptidase de *Streptomyces gedanensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Microrganismo

A bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633, foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais (Fundação André Tosello), Campinas-SP.

4.1.2 Meios de Cultura

4.1.2.1 Meio de preservação

Tabela 4 – Meio de preservação para *B. subtilis*.

Componentes	Concentração (gL⁻¹)
Peptona	50
Extrato de carne	30
Ágar	30

4.1.2.2 Meio de inóculo

Tabela 5 – Meio de inóculo

Componentes	Concentração (gL⁻¹)
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

Tabela 6 – Meio de fermentação

Componentes	Concentração (gL⁻¹)
Sacarose	*
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,6
MnSO ₄	0,2

* As concentrações de sacarose estão descritas nas tabelas dos modelos experimentais.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preservação do Microrganismo

O *Bacillus subtilis* foi crescido no meio descrito no item 4.1.2.1 a 37°C por 24 horas e mantido a 4°C em câmara refrigerada. A renovação foi realizada a cada quatro semanas e a verificação da pureza por coloração de gram.

4.2.2 Planejamento Estatístico

O planejamento estatístico para otimização da produção da levanasacarase foi realizado em duas etapas:

4.2.2.1 Etapa 1 Efeito da concentração de sacarose, pH, tempo de cultivo e agitação na atividade da levanasacarase.

Nessa primeira etapa foi realizado um modelo experimental 2^4 com duas repetições no ponto central, totalizando 19 experimentos. Foi utilizado o meio de fermentação descrito no item 4.1.2.3, variando a concentração de sacarose (X_1) em 100, 200 e 300 gL^{-1} ; o pH (X_2) em 4,0, 5,0 e 6,0; o tempo de cultivo (X_3) em 24, 36 e 48 h e agitação (X_4) em 100, 140 e 180 rpm.

As variáveis codificadas e decodificadas estão mostradas na tabela 7, e as respostas obtidas foram: atividade da levanasacarase em UA (Y_1); produção de levana em gL^{-1} ; produtividade de levana em g/L/h ; biomassa em gL^{-1} e consumo de açúcares em %.

Tabela 7 – Delineamento fatorial completo do tipo 2^4 com duas repetições verdadeiras no ponto central para avaliar a concentração de sacarose, pH, tempo de cultivo e agitação na otimização da atividade da levanasacarase de *B. subtilis* ATCC 6633 em 37°C.

Variáveis codificadas					Variáveis decodificadas			
Ensaio*	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1	X_2	X_3	X_4
					Sacarose (gL ⁻¹)	pH	Tempo de cultivo (h)	Agitação (rpm)
01	-1	-1	-1	-1	100	4,0	24	180
02	1	-1	-1	-1	300	4,0	24	180
03	-1	1	-1	-1	100	6,0	24	180
04	1	1	-1	-1	300	6,0	24	180
05	-1	-1	1	-1	100	4,0	48	180
06	1	-1	1	-1	300	4,0	48	180
07	-1	1	1	-1	100	6,0	48	180
08	1	1	1	-1	300	6,0	48	180
09	-1	-1	-1	1	100	4,0	24	100
10	1	-1	-1	1	300	4,0	24	100
11	-1	1	-1	1	100	6,0	24	100
12	1	1	-1	1	300	6,0	24	100
13	-1	-1	1	1	100	4,0	48	100
14	1	-1	1	1	300	4,0	48	100
15	-1	1	1	1	100	6,0	48	100
16	1	1	1	1	300	6,0	48	100
17	0	0	0	0	200	5,0	36	140
18	0	0	0	0	200	5,0	36	140
19	0	0	0	0	200	5,0	36	140

*Ensaio aleatorizados

4.2.2.2 Etapa 2 - Otimização da produção levanasacarase por *B. subtilis*.

A partir os resultados obtidos na etapa 1, um segundo modelo experimental foi elaborado, objetivando otimizar a atividade da levanasacarase. As variáveis que foram significativas no primeiro modelo foram submetidas a um

delineamento fatorial fracionado 3^{3-1} totalizando 11 experimentos, com duas repetições verdadeiras do ponto central.

As variáveis avaliadas foram concentração de sacarose (X_1) em 250, 300 e 350 gL^{-1} ; pH (X_2) em 5,0, 6,0 e 7,0 e a agitação (X_3) em 160, 180 e 200 rpm. O tempo de cultivo foi fixado em 24 horas e foi utilizado o meio de fermentação descrito no item 4.1.2.3.

As variáveis codificadas e decodificadas estão mostradas na Tabela 8, e as respostas obtidas foram: atividade da levanasacarase em UA (Y_2); produção de levana em gL^{-1} ; biomassa em gL^{-1} e consumo de açúcares em %.

Tabela 8 – Delineamento fatorial do tipo 3^{3-1} com duas repetições verdadeiras no ponto central para avaliar a concentração de sacarose, pH e agitação na atividade da levanasacarase de *B. subtilis* ATCC 6633 em 24 horas de cultivo a 37°C.

Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas		
Ensaio*	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
				Sacarose (gL^{-1})	pH	Agitação (rpm)
01	-1	-1	-1	250	5,0	160
02	-1	0	1	250	6,0	200
03	-1	1	0	250	7,0	180
04	0	-1	1	300	5,0	200
05	0	0	0	300	6,0	180
06	0	1	-1	300	7,0	160
07	1	-1	0	350	5,0	180
08	1	0	-1	350	6,0	160
09	1	1	1	350	7,0	200
10	0	0	0	300	6,0	180
11	0	0	0	300	6,0	180

*Ensaio aleatorizados

4.2.3 Processo Fermentativo

4.2.3.1 Inóculo

O inóculo foi obtido através de fermentação em batelada, em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio de inóculo descrito no item 4.1.2.2, durante 48 horas a 37 °C. Após o tempo de cultivo, o meio foi centrifugado por 10 minutos, a 9000 rpm e as células foram ressuspensas assepticamente em solução salina (NaCl 0,9%). Posteriormente foram realizadas leituras de absorvância a 400 nm, e estas foram correlacionadas com sua respectiva curva de biomassa em gL^{-1} . Todas as fermentações foram padronizadas com inóculo de $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de células.

4.2.3.2 Fermentações

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio descrito no item 4.2.2.3 a 37°C. A concentração de sacarose, pH, tempo de cultivo e agitação dos meios foram variados conforme a tabela 7 e tabela 8 (tempo de cultivo fixado em 24 horas).

Os ensaios foram realizados em triplicatas e a interrupção dos cultivos foi realizada por centrifugação a 9000 rpm por 15 min a 4°C. Do precipitado de células foi medida a concentração de biomassa e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima para testar a atividade da levanasacarase, produção de levana e consumo de açúcares pelo microrganismo.

4.2.4 Métodos Analíticos

4.2.4.1 Determinação da biomassa

4.2.4.1.1 Curva de biomassa

Para confeccionar a curva de biomassa um cultivo foi realizado em sacarose e a biomassa obtida após centrifugação, lavagem com água destilada e ressuspensa em salina (0,9%). Uma alíquota de 1 mL foi submetida a uma série de diluições para a obtenção de leituras de 0,1 a 0,7 de absorvância em $\lambda = 400$ nm. Paralelamente, 3 alíquotas de 1 mL foram distribuídas em cadinhos, previamente tarados e levados à estufa (70°C), até atingir peso constante. Em seguida, foi plotado o gráfico relacionando absorvância x peso seco gL^{-1} .

4.2.4.1.2 Quantificação da biomassa

Ao final das fermentações, os meios de cultivo foram centrifugados a 9000 rpm por 15 minutos a 4°C e do sedimento celular ressuspenso em solução salina (0,9%) foi determinada a concentração de biomassa a $\lambda = 400$ nm. Os valores obtidos foram relacionados à curva de biomassa, obtendo os valores em gL^{-1} .

4.2.4.2 Determinação dos açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) das fermentações

Os açúcares redutores do início e do final das fermentações foram dosados pelo método de Somogyi, (1952) e Nelson, (1944) e as absorvâncias foram medidas a $\lambda = 540$ nm. Os açúcares totais das fermentações foram dosados pelo

método fenol-sulfúrico (DUBOIS, et al., 1956), e as absorvâncias medidas a $\lambda = 490$ nm. Para as curvas de calibração foram utilizados padrões de glicose variando concentrações de 0 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.2.4.3 Atividade da levanasacarase

A atividade da levanasacarase foi determinada do sobrenadante, imediatamente após interrupção do cultivo pela medida de formação de levana. Utilizou-se, 0,25 mL do sobrenadante (fonte de enzima) reagindo com 0,25 mL de uma solução de sacarose 1M em 0,5 mL de tampão acetato pH 5,0, incubada por 2 horas a 30°C conforme Ananthalakshmy; Gunasekaran, (1999).

Após o tempo de reação, a atividade foi estimada pela produção de levana, quantificada conforme o item 4.2.4.4. A atividade de formação da levana foi expressa em $1 \mu\text{Mol}$ de levana formada em mL por minuto nas condições experimentais (μMol de açúcar redutor/min).

4.2.4.4 Quantificação da levana

Para determinar a produção de levana das fermentações e a formação de levana na atividade enzimática foi utilizado etanol absoluto a 4°C na proporção de 3:1 (etanol: sobrenadante) para a precipitação, deixado em repouso por 12 horas a 4°C . Após este tempo foram centrifugados a 14000 rpm por 20 min, em centrífuga refrigerada a 4°C . A levana foi lavada com mais 3 volumes de etanol absoluto gelado e centrifugado novamente. A levana foi ressuspensa em 1mL HCl 0,1N e hidrolisada por uma hora a 100°C , resfriada e neutralizada com 0,1mL de NaOH 2N segundo Ananthalakshmy & Gunasekaran (1999), com algumas modificações.

A concentração de levana foi estimada por açúcares redutores utilizando frutose como padrão, em concentrações de 0 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ segundo

Somogyi, (1952) e Nelson, (1944). As leituras das absorvâncias foram realizadas em $\lambda = 540$ nm.

4.2.5 Fermentação para Obtenção do Extrato Bruto de Levanasacarase

Após definir as melhores condições de produção de levanasacarase através de metodologia estatística, foram realizados novos cultivos para obtenção do extrato bruto, fonte de levanasacarase para caracterização bioquímica. As fermentações foram realizadas em 6 frascos Erlenmeyers de 1 L, contendo 250 mL do meio de fermentação, nas condições experimentais otimizadas de produção de levanasacarase na etapa 2 da otimização. As fermentações foram centrifugadas a 9000 rpm e o sobrenadante, ou seja, o extrato livre de células (ELC) foi utilizado como fonte de levanasacarase.

4.2.6 Caracterização Bioquímica Parcial de Levanasacarase

A caracterização bioquímica parcial da levanasacarase do ELC foi realizada e a atividade foi determinada conforme o procedimento descrito no item 4.2.4.3 (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999).

4.2.6.1 Efeito do pH e temperatura na atividade da levanasacarase

O pH ótimo do ELC para a formação de levana foi determinado entre 3,0 e 8,0, com incubação por 2 horas. A temperatura ótima foi determinada entre 4 e 70°C em pH 6,0, definido anteriormente. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade de levanasacarase em função de pH ou temperatura, respectivamente.

4.2.6.2 Especificidade da enzima com o substrato sacarose

O efeito da concentração de sacarose de 0,1 a 2,0 M na atividade da levanasacarase foi determinado nas condições ótimas de reação definidas neste trabalho de pH 6,0, 50°C e 0,4 mL de ELC. Os resultados foram expressos como unidade de atividade de levanasacarase, ou seja, μMol de açúcar redutor/min.

Os valores de K_m e V_{\max} foram determinados pelo método de Lineweaver-Burke conforme descrito por (MARZOCCO; TORRES, 1999).

4.2.7 Estimativa da Massa Molar de Levana por Cromatografia de Exclusão em Gel

As três melhores produções de levana obtidas no modelo estatístico (etapa 1) e a levana produzida na condição otimizada da levanasacarase (etapa 2), foram submetidas à cromatografia de exclusão em gel, como acompanhamento, para estimar a massa molar do exopolissacarídeo. As 4 amostras foram precipitadas do sobrenadante com etanol absoluto, e deixadas em estufa por 24 horas a 60°C para evaporação total do álcool, e após liofilizadas.

Foi utilizada uma coluna de Sepharose 6B (Sigma), com agarose na concentração 6%, partículas de diâmetro de 45-165 μm e com intervalo de fracionamento para polissacarídeos de 1×10^4 - 1×10^6 Da (COLLINS, 1988). Como eluente foi utilizado tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 deaerado em kitassato a vácuo por 24 horas.

A coluna cromatográfica foi de 1,6 cm de diâmetro X 40 cm comprimento, com volume total de 80,43 mL. O fluxo do eluente foi de 14 mL/h, controlada por bomba peristáltica. Para cálculo do volume morto, foi usado blue dextrana (1mg/mL) e os volumes coletados foram de 3,5 mL. A quantificação da levana eluída foi determinada por fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

Os padrões usados foram dextranas de *Leuconostoc mesenteroides*, com pesos moleculares de 50000, 410000 e 670000 Da na concentração de 1 mg/mL (Sigma). Amostras de 0,5 mL da solução de levana (preparadas com a

levana liofilizada e tampão fosfato 50 mM, pH 7,0) foram submetidas à coluna de exclusão na concentração de 4 mg/mL.

4.2.8 Análise Estatística

A resposta atividade da levanasacarase em UA (Y), obtida dos modelos experimentais descritos nas Tabelas 7 e 8, foram analisadas pelo programa STATISTICA 6.0 para análise de variância (ANOVA) com a probabilidade de 5% de confiança e metodologia de superfície de resposta (MRS) para otimização da produção de levanasacarase.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A. Optimization of production and extraction parameters of *Bacillus megaterium* levansucrase using solid-state fermentation. **Journal of Applied Sciences Research**, v.10, p.1199-1204, 2008.
- AHMED, A. F.; MAHMOUND, D. A. R.; ESAWY, M. A. T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzymic Synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. **Current Microbiology**, v.51, p.402-407, 2005.
- AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; LIZUKA, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA, N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**, v.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, p.291-297, 1999.
- BABU, I.S.; RAMAPPA, S.; MAHESH, D.G.; KUMARI, K.S.; KUMARI, K.S.; RANGAIAH, G.S. Optimization of medium constituents for the production of fructosyltransferase (Ftase) by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. **R. J. Microb.**, v. 3, p.114-121, 2008.
- BARROS, B.; SCARMINO, S. I.; BRUNS, E. R. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Unicamp, 1995. p.229.
- BEINE, R.; MORARU, R.; NIMTZ, M.; NA'AMNIEH, S.; PAWLOWSKI, A.; BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. **Journal of Biotechnology**, v.138, p.33-41, 2008.
- BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPIDE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, v.36, p.979-986, 2001.
- BELGHITH, H.; SONG, K.; KIM, C.; RHEE, S. Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. **Biotechnology Letters**, v. 18, p.467-472, 1996.
- BERGERON, L. J.; MOROU-BERMUDEZ, E.; BURNE, R. A. Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. **Journal of Biotechnology**, v.182, n.13, p.3649-3654, 2000.
- BIEDENDIECK, R.; BEINE, R.; GAMER, M.; JORDAN, E.; BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J.; DIJKHUIZEN, L.; MALTEN, M.; JAHN, D. Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. **Journal of Biotechnology**, v.74, p.1062-1063, 2007.

BORSARI, R. R. J.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, p.604-609, 2006.

BOX, G. E. P.; HUNTER, S. W.; HUNTER, J. S. **Statistic for experiments and introduction to design. Data analysis and model building**. New York: Jonh Wiley, Inc., 1976. p.653.

BROOKS, G. F; BUTEL, J S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.158.

CABRAL de MELO F. C. B.; MALI, S.; BUZATO, J.; CELLIGOI, M. A. P. C. Production and distribution mass molar of levan of *Bacillus subtilis* by sugar cane juice fermentation using factorial design. **Book of Abstracts II International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology** (BioMicroWord2007) Seville (Spain). p.430, 2007.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, p.245-247, 2000.

CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANÇA, F. P. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v.19, p.19-21, 1997.

CASTILLO, E.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Synthesis of levan in water miscible organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v.114, p.209-217, 2004.

CAZY. Disponível em: <<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>> Acesso em: 3 dez. 2008.

DEGEEST, B; VUYST L. Indications that the nitrogen source influences both amount and size of exopolisaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modeling of the bacterial growth and production in a complex medium. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999.p.2863-2870.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; HSEIN T. *Zymomonas mobilis*-Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, p.57-98, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.

EUZENAT, O.; GUILBERT A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v.32, p.237-243, 1997.

ESAWY, M. A.; MAHMOUND, D. A. R.; FATTAH, A. F. A. Immobilization of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.25, p. 237-246, 2008.

- FRENCH, A. D. Accessible conformation of the β -D-(2-1) linked fructans inulin and levan. **Carbohydr. Res.** v.176, 17-29, 1988.
- GHALY, A. E.; ARAB, F.; MAHMOUND, N. S.; HIGGINS, J. Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage Structures. **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v.3, p.47-54, 2007.
- HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. production and characterization of microbial levan. **J. Agric. Food Chem.**, v.38, p.393-396, 1990.
- HETTWER, U.; JAECKEL, F. R.; BOCH, J.; MEYER, M.; RUDOLPH, K.; ULLRICH, M. S. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Syringae* pv. *Glycinea* and *Syringae* pv. *phaseolicola*. **Appl. Environ. Microbiol.**, n.9, v.64, p.3180-3187, 1998.
- HETTWER, U.; GROSS, M.; RUDOLPH, K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p.2834-2839, May. 1995.
- HERNANDEZ, L.; ARRIETA, J.; MENENDEZ, C.; et al. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. **Biochemical Journal**, v.309, p.113-118, 1995.
- HIBBERT, H.; TIPSON, R. S. The structure of gum levan. **Pulp and Paper Research Institute**, v.52, p.25-82, 1930.
- KIM, J. K.; OH, B. R.; SHIN, H. J.; EOM, C. Y.; KIM, S. W. Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. **Process Biochemistry**, v.43, p.1308-1312, 2008.
- KIM, D.; ROBYT, J. F.; LEE, S. Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. M. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMCM dextran sucrase. **Carbohydrate Research**, v.338, p. 1183-1189, 2003.
- LIU, J.; WATERHOUSE, A. L. Conformational analysis of levanbiose by molecular mechanics. **Carbohydr. Res.**, v.232, p.1-15, 1992.
- MARSHALL, K; WIEGEL, H. Relative molecular masses and structure of some levans elaborated by strains of *Streptococcus salivarius*. **Carbohydrate Research**, v.80, p.373-377, 1980.
- MARTÍNEZ-FLEITES, C.; ORTÍZ-LOMBARDÍA, M.; PONS, T.; TARBOURIECH, N.; TAYLOR, E. J.; ARRIETA, J. G.; HERNÁNDEZ, L.; DAVIES, G. J. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biochem. J.**, n.390, p.19-27, 2005.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.78, 1999.

- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 488.
- MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; CALAZANS, G. M. T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.45-51, 2007.
- MENG, G.; FÜTTERER, K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. **BMC Structural Biology**, n.8, v.16, 2008.
- MENG, G.; FÜTTERER, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. **Nature Structural Biology**, v.10, p.953-941, 2003.
- MONSAN, P.F.; BOZONNET, S.; ALBENNE, C.; JOUCLA, G.; WILLEMOT, R.M.; REMAUD-SIMEON, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Int. Dairy J.**, v.11, p.675-685, 2001.
- MORIKAWA, M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.1, p.1-8, 2006.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v.84, p.375-380, 1944.
- OLIVEIRA, M. R. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.177-183, 2007.
- PARK, E. H.; PARK, N. H.; KIM, M. J.; LEE, T. H.; LEE, H. J.; YANG, J. Y.; CHA, J. Enzymatic synthesis of fructosil oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformis* ATCC 15953. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.820-827, 2003.
- PARKER, C.; PEEKHAUS, N.; ZHANG, X.; CONWAY, T. Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose metabolism by *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3519-3525, 1997.
- RAHULAN, R.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; NAGY, V.; PANDEY, A.; Statistical optimization of L-Leucine amino peptidase production from *Streptomyces gedanensis* IFO 13427 under submerged fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, p.64-71, 2009.
- RODRIGUES, M. I. IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005.
- PHAM, P. L.; DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G.; CERNING, J. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus rhamnosus* and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, p.2302-2310, 2000.

SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. A simple method for purification or 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, 1999.

SEIBEL, J.; MOMARU, R.; GÖTZE, S.; BUCHHOLZ, K.; NA'AMMIEH, S.; PAWLOWSKI, A.; HECHT, H. J. Synthesis of sucrose analogues and mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). **Carbohydrate Research**, n.341, p.2335-2349, 2006.

SHIH, I. L.; YU, Y. T.; SHIEH, C. J.; HSIEH, C. Y. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.8211-8215, 2005.

SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharides by *Antrodia camphorata* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v.39, p.931-937, 2004.

SIMMS, P.; BOYKO, W.; EDWARDS, J. The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. **Carbohydrate Research**, v.208, p.193-198, 1990.

SIMS I.M.; CARINS A. J.; FURNEAUX R. H. Structure of levans from excised leaves of New Zealand flax. **Phytochemistry**, v.57, p.661-668, 2001.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **Microbiology Letters**, v.146, p.301-307, 1996.

SOMOGY, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, v.160, p.61-68, 1945.

SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, n.11, p.663-674, 2001.

TAGGART, W. G. The occurrence of levan in sugar. **J. Ind. and Eng. Chem.**, 1911.

WILLIAMS, M.; JONES, J. H.; WATTING, K. J. Biochemical characterization of the enantiomers of the novel ergoline dopamine agonist 6-ethyl-9-oxaergoline (EOE). **Drug Development Research**, v.3, p.573-579, 1976.

VAN HIJUM, S. A. F. T., et al. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* 121 and characterization of the levan produced. **FEMS Microbiol Lett.**, n.205, p.323-328, 2001.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. **Process Biochemistry**, v.41, p.241-243, 2006.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. p.191-527.

YOO, S.H.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H. J. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **Biological Macromolecules**, n.34, p.37-41, 2004.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de dois artigos (Artigo A e Artigo B). Os artigos foram elaborados de acordo com as normas da revista Process Biochemistry para o Artigo A (ANEXO A) e normas da revista Enzyme and Microbial Technology para o Artigo B (ANEXO B).

Os resultados complementares deste trabalho estão descritos no ANEXO C.

Artigo A - Otimização estatística da produção de levanasacarase por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 usando metodologia de superfície de resposta

Artigo B - Caracterização parcial da levanasacarase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC6633

6.1 ARTIGO A

**Otimização estatística da produção de levansacarase por *Bacillus subtilis*
ATCC 6633 usando metodologia de superfície de resposta**

Siliane D. Berté^{a,*}, Dionisio Borsato^b, Maria Antonia P.C. Celligoi^a

^aDepartamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brazil.

^bDepartamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brazil.

* Autor para correspondência. Tel.: +55 43 33714270; fax: +55 43 33714054.

Endereço de Email: silianeberte@yahoo.com.br.

Resumo

Metodologia de superfície de resposta (MRS) baseado em um planejamento fatorial foi aplicado para otimizar as condições de fermentação na produção da levanasacarase de *Bacillus subtilis* ATCC 6633. As condições testadas foram a concentração de sacarose (100-350 g/L), pH (4.0-7.0), tempo de cultivo (24-48 horas) e agitação (100-200 rpm). Os resultados mostraram que a condição ótima de produção de levanasacarase foi em 300 g/L de sacarose, pH 6.0, 24 horas de tempo de fermentação e 180 rpm de agitação, atingindo 6.57 UA de atividade. A análise de variância (ANOVA) mostrou um coeficiente de determinação (R^2) de 0.9816, certificando um ajuste do modelo aos dados experimentais.

Palavras-chave: Metodologia de superfície de resposta. Levanasacarase. *Bacillus subtilis*. Levana. Fermentação. Sacarose

1. Introdução

Nos últimos anos, o estudo de biopolímeros vem despertando a atenção dos pesquisadores pelas aplicações potenciais nos diferentes campos industriais como farmacêutico, cosmético e de alimentos [1]. Este polímero é muito interessante como derivado biológico e aplicação como commodity. Polímeros derivados biologicamente são biocompatíveis para aplicações biomédicas [2].

Dentre os biopolímeros promissores industrialmente destaca-se a levana, um exopolissacarídeo de frutose, que devido as suas características físico-químicas tem potencial aplicação nos diferentes campos industriais. A levana pode ser produzida por diferentes microrganismos através do processo fermentativo pela ação da enzima levanasacarase [3-4-5].

A levanasacarase (sacarose: 2,6- β -D-frutana-2,6- β -D-frutosiltransferase, E.C.2.4.1.10) é uma enzima extracelular que sintetiza levana a partir da sacarose pelas funções de hidrolase, em baixas concentrações de sacarose e tendo a água como acceptor, e pela função de polimerase, que ocorre em altas concentrações de sacarose, adicionando unidades frutosil em um monossacarídeo, dissacarídeo ou frutoligossacarídeos aceptores, polimerizando a cadeia de levana [6-7-8]. Devido a sua função de hidrolase a levanasacarase é classificada na família 68 das hidrolases glicosídicas (GH) [6-9].

Muitos microrganismos são produtores da levanasacarase, entre eles destaca-se o *Bacillus subtilis* que apresenta rápido crescimento celular e alta capacidade metabólica de secreção dessa enzima [5-10-11]. A produção de levana e levanasacarase bacteriana é diretamente influenciada pela fonte de carbono, fonte de nitrogênio, oxigenação do meio de fermentação, temperatura, variação de pH e sais [11-12]. O estudo desses fatores na produção da levanasacarase por *B. subtilis* pode ser um novo conceito.

Para estudar os diferentes fatores que afetam a produção de compostos biotecnológicos, a aplicação da metodologia estatística é importante porque define os efeitos de vários fatores e suas interações que levam a otimização do processo. A metodologia de superfície de resposta (MRS) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que tem sido usada na modelagem de diversos processos industriais, minimizando o empirismo que envolve o método

de tentativa e erro [13-14]. Este instrumento tem sido usado na biotecnologia por alguns autores na produção de levana [15-16], produção de levanasacarase [10] entre outros metabólitos no meio de fermentação [17-18-19-20].

O presente estudo teve como o objetivo avaliar através de metodologia estatística a produção de levanasacarase por *B. subtilis*, variando a concentração de sacarose, o tempo, a agitação e o pH no processo de fermentação.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismo e meio de manutenção

O cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi utilizada. Esta cepa foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais (Brazil). A bactéria foi mantida em meio de cultura contendo em g/L: peptona 50, extrato de carne 30 e ágar 20. Meio foi autoclavado a 121°C por 15 min. As culturas foram mantidas a 4°C e renovadas a cada 4 semanas.

2.2 Preparação do inóculo

Inóculo foi preparado para ativação da cultura usando frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio de inóculo, contendo em g/L: sacarose 100; extrato de levedura 2; KH_2PO_4 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 e $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 0.5. Após incubação, o inóculo foi centrifugado por 20 min a 4000xg. As células foram decantadas e ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0.9g/%). A concentração celular foi padronizada a 0.2 g/L para todas as fermentações. A concentração de células foi determinada por turbidimetria a 400 nm.

2.3 Condições de fermentação

O meio de fermentação consistia em g/L: extrato de levedura 2; KH_2PO_4 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3; $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 0.6; MnSO_4 0.2 e sacarose. O tempo de fermentação, pH, agitação (rpm) e concentração de sacarose das fermentações foram variadas conforme os planejamentos fatoriais apresentados na Tabela 1 e 3.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL a 37°C.

2.4 Fonte de enzima e ensaio

As fermentações foram centrifugadas a 4000xg a 4°C por 20 min. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima. Atividade da levanasacarase foi estimada pela formação de levana, incubando a mistura de reação contendo o extrato enzimático (250 µL), sacarose 1M (250 µL) e tampão acetato (500 µL, pH 5.0) a 30°C por 2 horas [21]. A levana formada foi estimada após precipitação da mistura de reação com etanol absoluto gelado e hidrólise ácida. A atividade da levanasacarase foi mensurada por açúcar redutor pelo método de Somogyi [22] e Nelson [23] usando frutose como padrão. Uma unidade de atividade (UA) foi definida pela formação de 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

2.5 Determinação de levana

A concentração de levana foi determinada de todas as fermentações após centrifugação a 4000xg a 4°C por 20 min. Levana formada foi estimada por açúcar redutor pelo método de Somogyi [22] e Nelson [23] após precipitação do sobrenadante com etanol absoluto gelado e hidrólise ácida.

2.6 Planejamento fatorial

Dois sucessivos planejamentos fatoriais foram aplicados para avaliar a produção de levanasacarase, variando a concentração de sacarose, o pH, o tempo de fermentação e a agitação nas fermentações. O primeiro planejamento fatorial foi conduzido utilizando as variáveis, concentração de sacarose (X_1), pH (X_2), tempo de fermentação (X_3) e agitação (X_4) na produção de levanasacarase, usando um planejamento fatorial completo 2^4 com três repetições no ponto central, totalizando 19 experimentos (Tabela 1). Baseado nos resultados obtidos, um segundo planejamento fatorial fracionado 3^{3-1} com três repetições no ponto central foi

conduzido variando a concentração de sacarose (X_1), pH (X_2) e agitação (X_3) na produção de levanasacarase, totalizando 11 experimentos (Tabela 3). A variável dependente estudada (Y) foi a produção de levanasacarase e os resultados foram analisados pelo aplicativo STATISTICA 7.0 (regressão múltipla) incluindo análise de variância (ANOVA).

3. Resultados e discussão

3.1 Avaliação da concentração de sacarose, pH, tempo de fermentação e agitação na produção de levanasacarase: Primeiro planejamento fatorial 2^4 .

O primeiro delineamento foi com o objetivo de definir os fatores estatisticamente significativos: concentração de sacarose (X_1), pH (X_2), tempo de fermentação (X_3) e agitação (X_4) na produção de levanasacarase por *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os resultados desse delineamento fatorial (Tabela 1) evidenciam que a concentração de sacarose, o pH e a agitação da fermentação foram significativos e positivos ($p < 0.05$) (Tabela 2). O aumento dos níveis das variáveis (X_1 , X_2 e X_4) levou a um aumento da produção da levanasacarase, porém, o tempo (X_3) não foi significativo e teve efeito negativo. As melhores produções de levanasacarase foram de 5.42 UA (300 g/L, pH 6.0, 24 horas e 180 rpm) e 4.63 UA (300 g/L, pH 6.0, 48 horas e 180 rpm). Esses resultados evidenciam que altas concentrações de sacarose (300 g/L), influenciaram na produção da levanasacarase. Nesta condição o tempo foi de 24 horas, assim, esse tempo foi fixado no segundo modelo experimental, propondo uma redução de tempo de fermentação, com uma economia no processo.

Tabela 1 – Delineamento fatorial completo 2^4 para estudo dos fatores: concentração de sacarose, tempo de fermentação, pH e agitação na produção de levanasacarase por *B. subtilis*.

Ensaio	Variáveis				Resposta (Y ₁)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Produção de levanasacarase (UA)	Levana g/L
1	-1	-1	-1	-1	2.08	5.13
2	1	-1	-1	-1	2.23	13.88
3	-1	1	-1	-1	2.31	5.10
4	1	1	-1	-1	3.66	12.56
5	-1	-1	1	-1	2.06	7.39
6	1	-1	1	-1	1.31	13.73
7	-1	1	1	-1	2.93	13.88
8	1	1	1	-1	3.02	15.47
9	-1	-1	-1	1	2.76	5.57
10	1	-1	-1	1	3.25	10.73
11	-1	1	-1	1	4.03	9.85
12	1	1	-1	1	5.42	11.16
13	-1	-1	1	1	2.95	3.45
14	1	-1	1	1	3.47	20.62
15	-1	1	1	1	2.93	17.93
16	1	1	1	1	4.63	17.69
17	0	0	0	0	2.43	10.67
18	0	0	0	0	2.71	6.10
19	0	0	0	0	2.40	8.11

		Níveis reais		
		-1	0	1
X ₁	Concentração de sacarose (g/L)	100	200	300
X ₂	pH	4.0	5.0	6.0
X ₃	Tempo de fermentação (h)	24	36	48
X ₄	Agitação (rpm)	100	140	180

Nos estudos de Abdel-Fattah et al. [11] a elevada concentração de sacarose também influenciou na produção da levanasacarase de *B. subtilis* NCR33a. Babu et al. [10] empregando delineamento fatorial e metodologia de superfície de resposta, constataram que os fatores mais importantes na produção de frutossiltransferase por *B. subtilis* foram a concentração e as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de fermentação.

A melhor produção de levana (20,62 g/L) foi no ensaio 14, onde a concentração de sacarose foi no nível superior ($X_1 = 300$ g/L). Diferentes autores estudaram parâmetros para otimizar a produção de levana e levanasacarase, dentre eles destacam-se [24] e [15] que aplicando delineamento fatorial para produção de levana por *Zymomonas mobilis*, confirmaram o efeito positivo, da alta concentração inicial de sacarose (250 g/L) para a produção de levana.

A partir da análise estatística dos resultados foi confirmada a significância estatística em nível de 5% das variáveis X_1 , X_2 , X_4 e as interações X_1X_2 e X_1X_4 de acordo com a Tabela 2 de análise de variância (ANOVA). O modelo matemático (eq. 1) obtido para a produção da levanasacarase possibilitou a confecção da equação de primeira ordem (Eq. 1), a partir dos coeficientes.

$$Y_1 = 3,06 + 0,308x_1 + 0,553x_2 - 0,153x_3 + 0,614x_4 + 0,257x_1x_2 + 0,204x_1x_4 \quad (\text{eq. 1})$$

na qual Y_1 é a atividade prevista da produção de levanasacarase, e x_1 , x_2 , x_3 e x_4 são os valores codificados de concentração de sacarose em g/L, pH, tempo de cultivo (h) e agitação (rpm), respectivamente.

O valor observado para produção de levanasacarase de 5.42 UA é próximo ao previsto de 5.15 UA, considerando que a variabilidade das respostas são explicadas pelo modelo em pelo menos 91%.

Tendo fixado o tempo em 24 horas e considerando que as variáveis concentração de sacarose (X_1), pH (X_2) e agitação (X_4) foram significativas e positivas foi proposto um segundo modelo fatorial fracionado 3^{3-1} adicionado de duas repetições no ponto central, com o objetivo de verificar a máxima produção de levanasacarase.

Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA) demonstrando os efeitos da concentração de sacarose, pH, tempo de fermentação e agitação na produção de levansacarase por *B. subtilis*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F-valor	p
Curvatura	0.770	1	0.770	26.456	0.035*
X ₁	1.521	1	1.521	52.235	0.018*
X ₂	4.893	1	4.893	167.982	0.005*
X ₃	0.378	1	0.378	12.977	0.069
X ₄	6.046	1	6.046	207.576	0.004*
X ₁ X ₂	1.061	1	1.061	36.427	0.026*
X ₁ X ₄	0.669	1	0.669	22.985	0.040*
Falta de ajuste	1.420	9	0.157	5.420	0.165
Erro puro	0.058	2	0.029		
Total	16.819	18			

X₁: concentração de sacarose, X₂: pH, X₃: tempo de fermentação, X₄: agitação.

$R^2 = 0.9120$, R^2 (aj) = 0.8560.

*Significância ($p < 0.05$).

3.1 Avaliação da concentração de sacarose, pH e agitação na produção de levansacarase: Segundo planejamento fatorial fracionado 3^{3-1} .

Um segundo planejamento fatorial fracionado foi realizado utilizando a melhor resposta do primeiro delineamento como ponto central ($X_1 = 300$ g/L, $X_2 = 6.0$ e $X_3 = 180$ rpm) e novos níveis de variação foram propostos para comprovar o resultado ótimo obtido no primeiro modelo experimental. Esse planejamento e suas respostas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Delineamento fatorial fracionado 3^{3-1} para o estudo dos fatores: concentração de sacarose, pH e agitação na produção de levanasacarase por *B. subtilis*.

Ensaio	Variáveis			Resposta (Y ₂)	
	X ₁	X ₂	X ₃	Produção de levanasacarase (UA)	Levana g/L
1	-1	-1	-1	3.57	18.98
2	-1	0	1	4.07	13.59
3	-1	1	0	3.87	20.89
4	0	-1	1	3.22	13.76
5	0	0	0	5.93	8.54
6	0	1	-1	3.54	30.09
7	1	-1	0	3.33	13.84
8	1	0	-1	4.36	24.79
9	1	1	1	4.26	19.07
10	0	0	0	6.57	10.32
11	0	0	0	6.50	8.96

		Níveis reais		
		-1	0	1
X ₁	Concentração de sacarose (g/L)	250	300	350
X ₂	pH	5.0	6.0	7.0
X ₃	Agitação (rpm)	160	180	200

A melhor produção de levanasacarase foi 6.57 UA no ensaio 10 (300 g/L de sacarose; pH 6.0 e 180 rpm), esse resultado confirma que a escolha das variáveis no primeiro modelo experimental já tinha sido adequada para a produção da enzima.

Através da análise estatística do segundo modelo experimental a equação (Eq. 2) foi modelada:

$$Y_2 = 6,33 + 0,243x_1 - 0,454x_1^2 + 0,258x_2 - 1,289x_2^2 + 0,098x_3 - 1,663x_3^2 + 0,989x_1x_2 \quad (\text{eq. 2})$$

Onde, Y₂ é a resposta prevista de produção de levanasacarase, x₁, x₁², x₂, x₂², x₃ e x₃² são os valores lineares e quadráticos codificados de concentração de sacarose em g/L (x₁ e x₁²), pH (x₂ e x₂²) e agitação (x₃ e x₃²), respectivamente.

As características do modelo confirmam que este pode ser utilizado eficientemente. Através da análise de variância (Tabela 4) o modelo teve um alto R^2 com um valor de 0.9816, o que explica 98% da variabilidade das respostas e que o modelo está adequado. A interação X_1X_2 foi significativa em nível de 5% ($p= 0.049$) e as variáveis pH e agitação foram significativas a nível de 6% ($p=0.054$ e $p=0.059$) respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise da variância (ANOVA) demonstrando os efeitos da concentração de sacarose, pH e agitação na produção de levanasacarase por *B. subtilis*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F-valor	p
X_1 L+Q	0.517	2	0.258	2.098	0.322
X_2 L+Q	4.304	2	2.152	17.463	0.054
X_3 L+Q	3.935	2	1.967	15.966	0.058
X_1X_2	2.298	1	2.298	18.651	0.049*
Falta de ajuste	0.043	1	0.043	0.351	0.613
Erro puro	0.246	2	0.123		
Total	15.775	10			

X_1 : concentração de sacarose, X_2 : pH, X_3 : agitação.

L: efeito linear, Q: efeito quadrático.

$R^2 = 0.98163$, R^2 (adj) = 0.93876.

*Significância ($p < 0.05$).

A Fig. 1 apresenta os valores preditos e observados da produção de levanasacarase. O ponto central apresentou os valores mais elevados, sendo que os valores observados foram 6.57 e 6.5 UA, muito próximos do valor previsto de 6.33 UA, com uma porcentagem de variação de apenas 2% ($R^2 = 0,9816$). Observe uma correlação satisfatória entre os valores observados e previstos da produção de levanasacarase por *B. subtilis*.

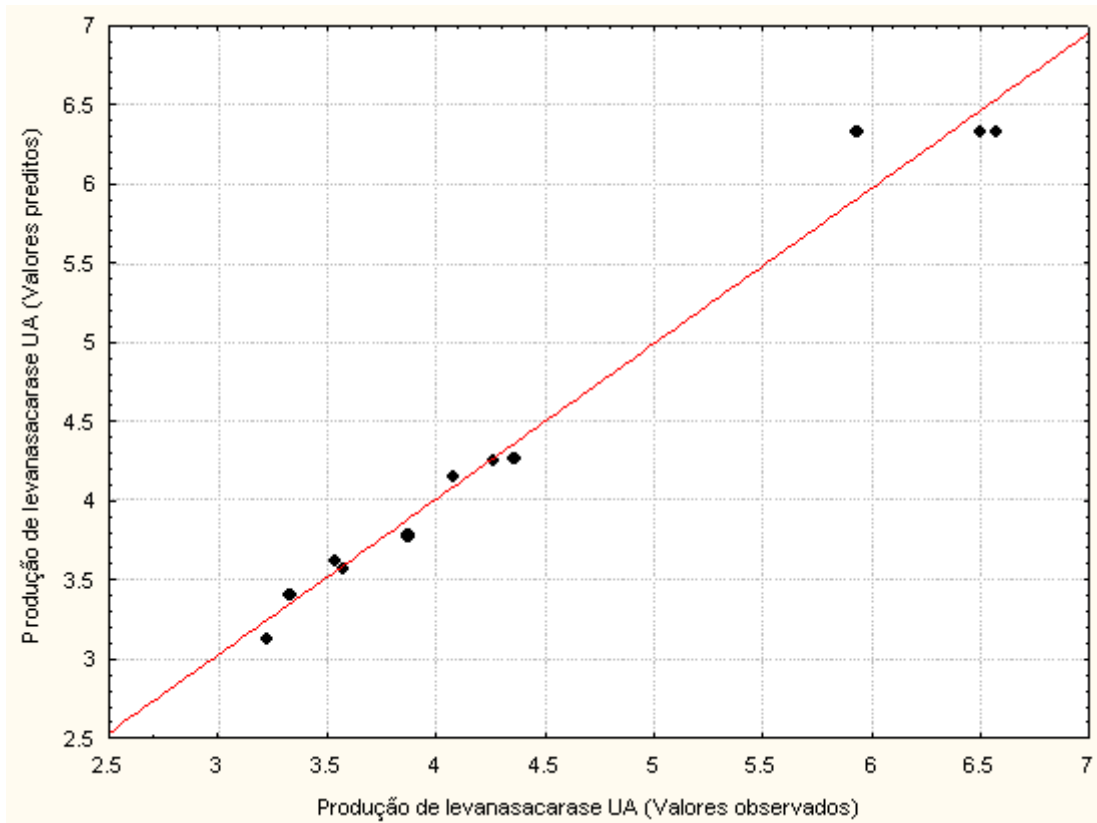


Figura 1 – Gráfico de Parity demonstrando os valores preditos e observados para produção de levansacarase por *B. subtilis*.

A superfície de resposta tridimensional e o gráfico de contorno foram graficamente representados através equação de regressão. As três superfícies de resposta e contorno para produção de levansacarase facilitam o entendimento da interação entre os três fatores, mantidos no nível zero.

Os gráficos demonstram a produção de levansacarase relacionando a concentração de sacarose e pH (Fig. 2.A), concentração de sacarose e agitação (Fig 2.B) e pH e agitação (Fig 2.C). A produção máxima de levansacarase (6.57 UA) foi próxima do ponto central como observado nas três superfícies da Figura 2. Quando as três variáveis (X_1 , X_2 e X_3) estão nos níveis superiores (+1) ou inferiores (-1) ocorre uma redução na produção da levansacarase.

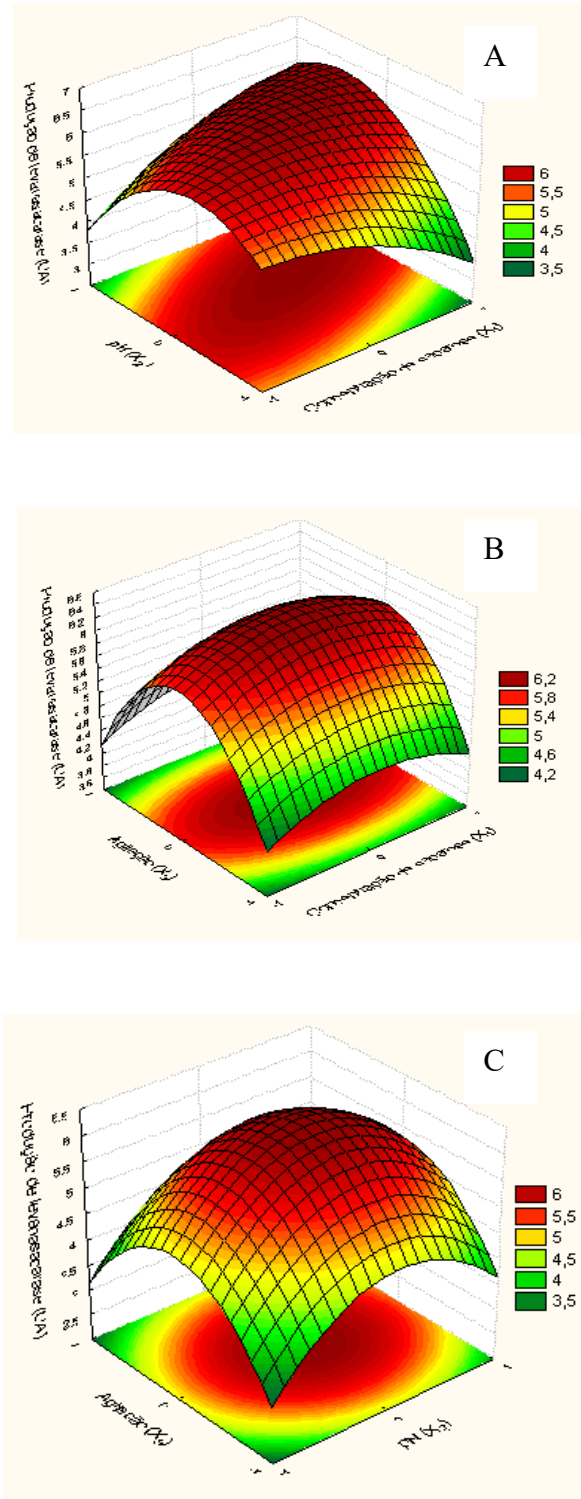


Figura 2 – Gráfico de superfície e contorno demonstrando o efeito das variáveis independentes, concentração de sacarose, e agitação na produção de levansacarase por *B. subtilis*. (A) concentração de sacarose e pH, (B) concentração de sacarose e agitação e (C) pH e agitação. Os fatores foram fixados no nível 0.

O uso de ferramentas estatísticas na produção de produtos biotecnológicos vem sendo bem estudado por fornecer informações seguras sobre o processo, minimizando o número de experimentos, possibilitando um ganho de tempo. Kim et al. [18] em seus estudos, otimizou a sacarificação enzimática e a fermentação do etanol e reportam que esta técnica é mais eficiente do que os métodos tradicionais de otimização. Rahulan et al. [25] na produção de L-leucina amino peptidase por *Streptomyces gedanensis* IFO 13427 utilizou metodologia estatística, e otimizou a produção de enzima variando as concentrações de substrato através da superfície de resposta.

Conclusões

No presente estudo, utilizando delineamento fatorial e metodologia de superfície de resposta foi possível determinar as condições ideais de concentração de sacarose, tempo de fermentação, pH e agitação na produção de levanasacarase por *B. subtilis*. Uma alta similaridade foi observada entre os resultados previstos e observados, que reflete em uma boa aplicabilidade da metodologia de superfície de resposta na otimização do processo de produção de levanasacarase. A melhor produção de levanasacarase (6.57 UA) foi atingida em 300 g/L de sacarose, pH 6.0 e 180 rpm de agitação. A melhor produção de levana foi 30.09 g/L e não houve correlação com a produção de levanasacarase. A metodologia foi um modelo adequado para otimização do bioprocessamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- [1] Belghith H, Song KB, Kim CH, Rhee SK. Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnol Lett* 1996;18:467-472.
- [2] Barone JR, Medynets M. Thermally processed levan polymers. *Carbohydrate Polymers* 2007;69:554-561.
- [3] Han YW. Microbial levan. *Adv Appl Microbiol* 1990;35:171-194.
- [4] Jang KH, Song KB, Kim CH, Chung BH, Kang SA, Chun UH, Choue RW, Rhee SK. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett* 2001;23:339-344.
- [5] Shih IL, Yu YT, Shieh CJ, Hsieh CY. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. *J Agric Food Chem* 2005;53:8211-8215.
- [6] Meng G, Fütterer K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct Biol* 2008;8:16.
- [7] Monsan PF, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot RM, Remaud-Simeon M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 2001;11:675-685.
- [8] Sangillyandi G, Raj KC, Gunasekaran P. Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett* 1999;21:179-182.
- [9] Meng G, Fütterer K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol* 2003;10:935-941.
- [10] Babu IS, Ramappa S, Mahesh DG, Kumari KS, Kumari KS, Rangaiah GS. Optimization of medium constituents for the production of fructosyltransferase (Ftase) by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *Research Journal of Microbiology* 2008;3:114-121.
- [11] Abdel-Fattah AF, Mahmoud DAR, Esawy MAT. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC33a and Enzymic Synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology* 2005;51:402-407.
- [12] Ernandes, FMPG, Garcia-Cruz, CH. Bacterial Levan: technological aspects, characteristics and production. *Semina: Ciências Agrárias* 2005;26:71-82.
- [13] Neto BB, Scarminio IS, Bruns, RE. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2nd ed. São Paulo: Editora Unicamp; 2002;p.251.
- [14] Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for Experiments*. New York: Wiley; 1978.

- [15] Oliveira RO, Silva RSSF, Buzato JB, Celligoi MAPC. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal* 2007;37:177-183.
- [16] Borsari RRJ, Celligoi MAPC, Buzato JB, Silva RSSF. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006;26:604-609.
- [17] Cazetta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology* 2007;98:2824-2828.
- [18] Kim JK, Oh BR, Shin HJ, Eom CY, Kim SW. Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochem* 2008;43:1308-1312.
- [19] Skowok M, Fiedurek J. Optimization of fermentation conditions by *Aspergillus niger* using simplex and classical method. *Food Technol Biothechnol* 2004;42:141-146.
- [20] Vignoli JA, Celligoi MAPC, Silva RSF. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochem* 2006;41:240-243.
- [21] Ananthalakshmy VK, Gunasekaran P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 1999; 42:291-297.
- [22] Somogy MA. A new reagent for determination of sugar. *J Biol Chem* 1944;160:61-68.
- [23] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry* 1945;153:375-380.
- [24] Melo IR, Pimentel MF, Calazans GMT. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2007;38:45-51.
- [25] Rahulan R, Nampoothiri KM, Szakacs G, Nagy V, Pandey A. Statistical optimization of L-leucine amino peptidase production from *Streptomyces gedanensis* IFO 13427 under submerged fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 2009;43:64-71.

6.2 ARTIGO B

**Caracterização parcial da levanasacarase produzida por *Bacillus subtilis*
ATCC6633**

Siliane D. Berté^{a,*}, Patricia Bittencourt^a, Mara L. L. Ribeiro^a, Maria Antonia P.C.
Celligoi^a

^aDepartamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brazil.

* Autor para correspondência. Tel.: +55 43 33714270; fax: +55 43 33714054.
Endereço de Email: silianeberte@yahoo.com.br.

Resumo

Bacillus subtilis ATCC 6633 é uma bactéria hábil na produção da exoenzima levanasacarase (E.C.2.4.1.10) que forma levana a partir da sacarose. A levana é um biopolímero promissor nas indústrias de alimento, farmacêutica e cosmética. As condições de fermentação afetam a produção de levana e da levanasacarase e a atividade da enzima é influenciada pela fonte e concentração de substrato, o pH e temperatura. O objetivo deste trabalho foi caracterizar parcialmente a levanasacarase do extrato bruto de células produzida por *Bacillus subtilis*, em sua melhor condição de cultivo (300 g/L, pH 6,0, 180 rpm e 24 horas de fermentação). As condições ótimas de reação da enzima foram de pH 6,0 e 50°C. O K_m e V_{max} da enzima para sacarose foi de 0,1055 M e 0.648 μ M de açúcar redutor/min, respectivamente.

Palavras-chave: Levana. Levanasacarase. *Bacillus subtilis*. Fermentação. Síntese enzimática. Sacarose.

1 Introdução

A levanasacarase (E.C.2.4.1.10) apresenta duas atividades catalíticas, hidrolase e polimerase, hidrolisando a sacarose e transferindo resíduos frutossil para formar a levana. Estas atividades dependem da concentração do substrato doador de frutossil, que em baixas concentrações promove a hidrólise da sacarose em glicose e frutose tendo a água comoceptor de frutossil, e em concentrações mais altas de substrato a atividade de polimerase ocorre através de sucessivas transferências de unidades frutossil da sacarose, com a produção de levana [1]. A levanasacarase pertence à Família 68 das hidrolases glicosídicas (GH), de acordo com a classificação de enzimas ativas em carboidratos [2]. Essas funções são esclarecidas pelo estudo da estrutura de levanasacarases de *B. subtilis* [3-4] e *Gluconacetobacter diazotrophicus* [5].

A formação de levana a partir da levanasacarase tem sido estudada em diferentes microrganismos [6-7-8-9-10] devido ao grande interesse comercial, que este biopolímero têm nos diferentes campos industriais como cosmético, alimentício e farmacêutico [11-12]. O *B. subtilis*, uma bactéria presente no solo e produz levana para a sua sobrevivência, como uma resposta a situações de estresse [13]. Em laboratório, destaca-se por produzir elevadas concentrações de levana com reduzido tempo de fermentação e grande facilidade de manipulação em relação a outros microrganismos.

Considerando a importância da aplicação da levana nos diferentes campos industriais, os fatores que influenciam na atividade de formação de levana pela levanasacarase têm sido estudados. Variações de pH, temperatura, concentração de substrato, concentração de enzima, estabilidade da enzima, entre outras afetam diretamente a atividade da enzima [7-8-10].

Assim, esse trabalho teve como objetivo caracterizar parcialmente a levanasacarase do extrato bruto livre de células (ELC) produzido por *B. subtilis*, variando o pH, a temperatura e a concentração de substrato.

2 Materiais e métodos

2.1 Microrganismo e meio de preservação

A cepa ATCC 6633 de *Bacillus subtilis* foi utilizada. Esta cepa foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais (Brasil). A bactéria foi mantida em meio de cultura contendo em g/L: peptona 50, extrato de carne 30 e ágar 20. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 min. As culturas foram armazenadas a 4°C e renovadas a cada 4 semanas.

2.2 Preparação do inóculo

Inóculo foi preparado para ativar a cultura usando frascos Erlenmeyer de 125 mL do meio de inóculo, contendo em g/L: sacarose 100, extrato de levedura 2, KH_2PO_4 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 e $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 0,5. Após incubação por 48 horas a 37°C o inóculo foi centrifugado por 20 min a 9000 rpm. As células decantadas foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9%). A concentração de células foi padronizada a 0,2 g/L para todas as fermentações. A concentração celular foi determinada por turbidimetria a 400 nm e relacionada a uma curva padrão.

2.3 Produção da enzima

O meio de fermentação para produção da levanasacarase consistia em g/L: extrato de levedura 2, KH_2PO_4 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 0.6, MnSO_4 0,2 e sacarose 300. As fermentações foram incubadas por 24 horas, pH 6,0 em de 180 rpm agitação. Essas condições foram predefinidas por metodologia estatística em estudos anteriores (dados não apresentados). As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 250 mL do meio de

fermentação a 37°C. As fermentações foram interrompidas por centrifugação a 9000 rpm, e o ELC foi utilizado como fonte de enzima para posteriores análises.

2.4 Ensaio enzimático

A atividade da levanasacarase do ELC foi determinada utilizando a sacarose como substrato, conforme procedimento descrito por [14]. Neste procedimento, a mistura contendo 0,25 mL da enzima e 0,25 mL de sacarose 1M em 0,5 mL de tampão acetato pH 5,0 foi incubada por 2 horas a 30°C. A atividade da levanasacarase foi interrompida por fervura a 100°C por 10 min. A levana formada foi estimada após precipitação da reação de mistura com etanol absoluto gelado e hidrólise ácida. A atividade da levanasacarase foi estimada por açúcar redutor pelo método de Somogyi [15] e Nelson [16] usando frutose como padrão. Uma unidade de atividade (UA) foi definida pela quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições do ensaio.

2.5 Caracterização bioquímica parcial de levanasacarase

A caracterização bioquímica parcial da levanasacarase do ELC foi realizada e a atividade foi determinada conforme o procedimento descrito anteriormente por [14].

2.5.1 Efeito do pH e temperatura na atividade da levanasacarase

O pH ótimo do ELC para a formação de levana foi determinada entre 3.0 e 8.0, com incubação por 2 horas. A temperatura ótima foi determinada entre 4 e 70°C em pH 6.0, definido anteriormente. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade de levanasacarase em função de pH ou temperatura, respectivamente.

2.5.2 Efeito da concentração de sacarose na atividade de levanasacarase

O efeito da concentração de sacarose de 0,1 a 2,0 M na atividade da levanasacarase foi determinado nas condições ótimas de reação definidas neste trabalho de pH 6,0 e 50°C. Os resultados foram expressos como unidade de atividade de levanasacarase, ou seja, μMol de açúcar redutor/min.

Os valores de K_m e V_{\max} foram determinados pelo método de Lineweaver-Burke conforme descrito por [17].

3 Resultados e discussão

Através dos ensaios enzimáticos com a levanasacarase do extrato bruto livre de células produzido por *B. subtilis* foram determinadas as condições ótimas de pH, temperatura e concentração de sacarose. Estudos similares para caracterização de levanasacarase de diferentes microrganismos têm sido bem relatados [7-10-18-19-20].

3.1 Efeito do pH e temperatura na atividade da levanasacarase

Os efeitos de pH e temperatura na atividade de formação de levana pela levanasacarase estão apresentados na Figura 1 e 2. O pH ótimo da enzima foi observado em torno de 6,0. Valores de pH menores e maiores que 6,0 reduziram a atividade da levanasacarase, e nos pH de 5,0 e 8,0 observou-se uma redução de aproximadamente 40% de atividade. No pH 7,0 a enzima perdeu 20% da atividade e a formação de levana foi diminuída (Fig. 1). O pH ótimo de 6,0 foi similar ao descrito por [21] que estudaram levanasacarase livre e imobilizada de *B. subtilis*. Muitas levanasacarases são retratadas com pH ótimo entre 5,0 e 6,5 [7-22-23]

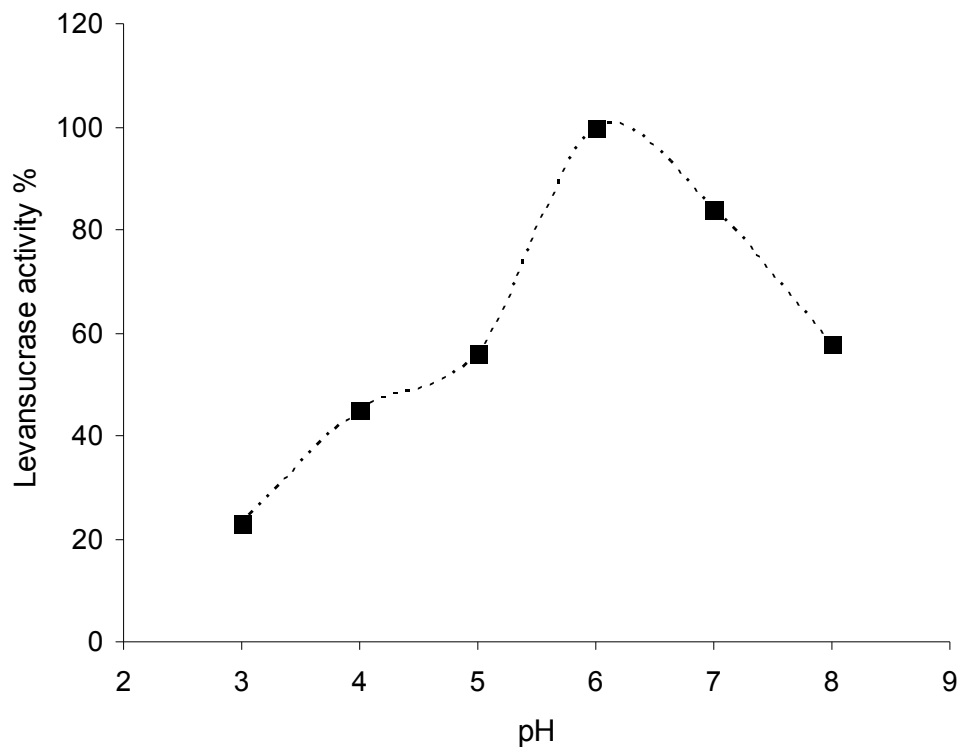


Figura 1 – Efeito do pH na atividade da levansacarase. A atividade da enzima foi realizada a 30°C por 2 horas nos pH indicados

A temperatura ótima de reação da enzima para formação de levana foi de 50°C (100%) e a 20°C a enzima apresentou-se com 80% de atividade (Fig. 2). Este resultado foi semelhante ao obtido por [7] quando estudaram a levansacarase produzida por *Bacillus* sp. Entretanto, [10] e [23] observaram temperaturas ótimas distintas, de 18 e 30°C para a levansacarase purificada de *Pseudomonas syringae* e *Microbacterium laevaniformans*, respectivamente.

As atividades de hidrólise da sacarose e formação de oligossacarídeos foram descritas por [23] e as máximas atividades de levansacarase de *Zymomonas mobilis* foram em 45°C e em temperaturas superiores a atividade cai rapidamente, como de uma proteína desnaturada.

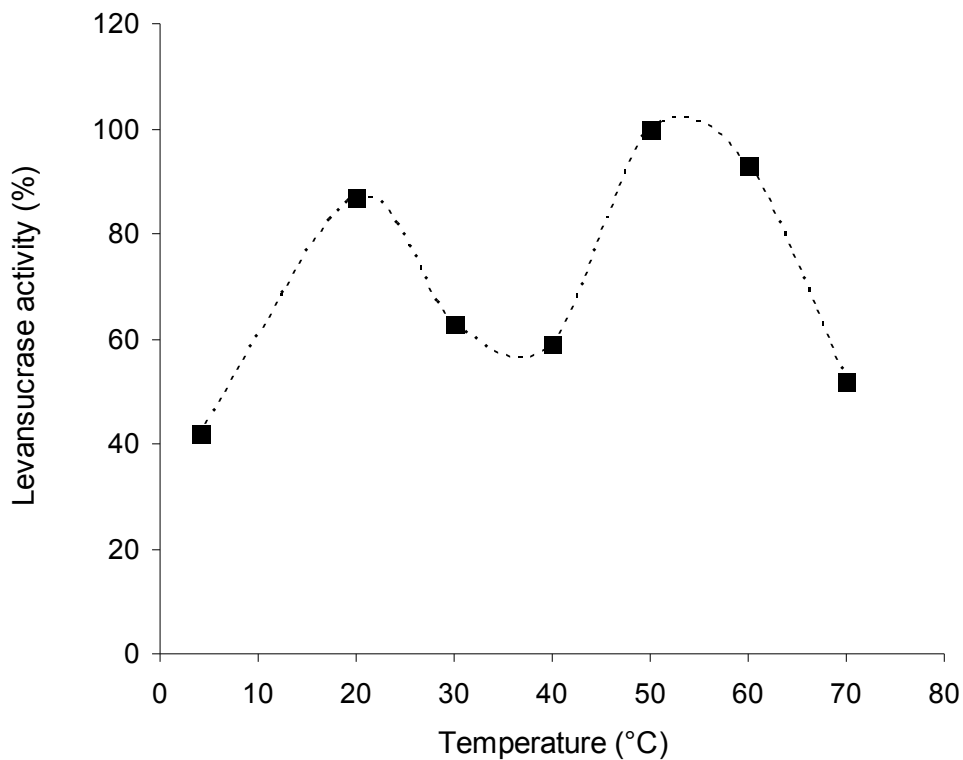


Figura 2 – Temperatura ótima para a atividade da levansacarase. A atividade da levansacarase foi mensurada nas diferentes temperaturas por 2 horas em pH 6,0.

3.4 Efeito da concentração de sacarose na atividade da levansacarase

O efeito da concentração de sacarose (0,1-2M) na atividade de formação de levana pela levansacarase de *B. subtilis* está demonstrado na Fig. 3. A concentração ótima de sacarose na mistura de reação de atividade da levansacarase foi 1,5M. Concentrações menores e maiores que 1.5M afetaram a atividade da enzima e a formação de levana foi diminuída em 13 % (Fig. 3). [23] demonstraram que concentrações de sacarose superiores a 1M diminuem a atividade de formação de levana pela levansacarase.

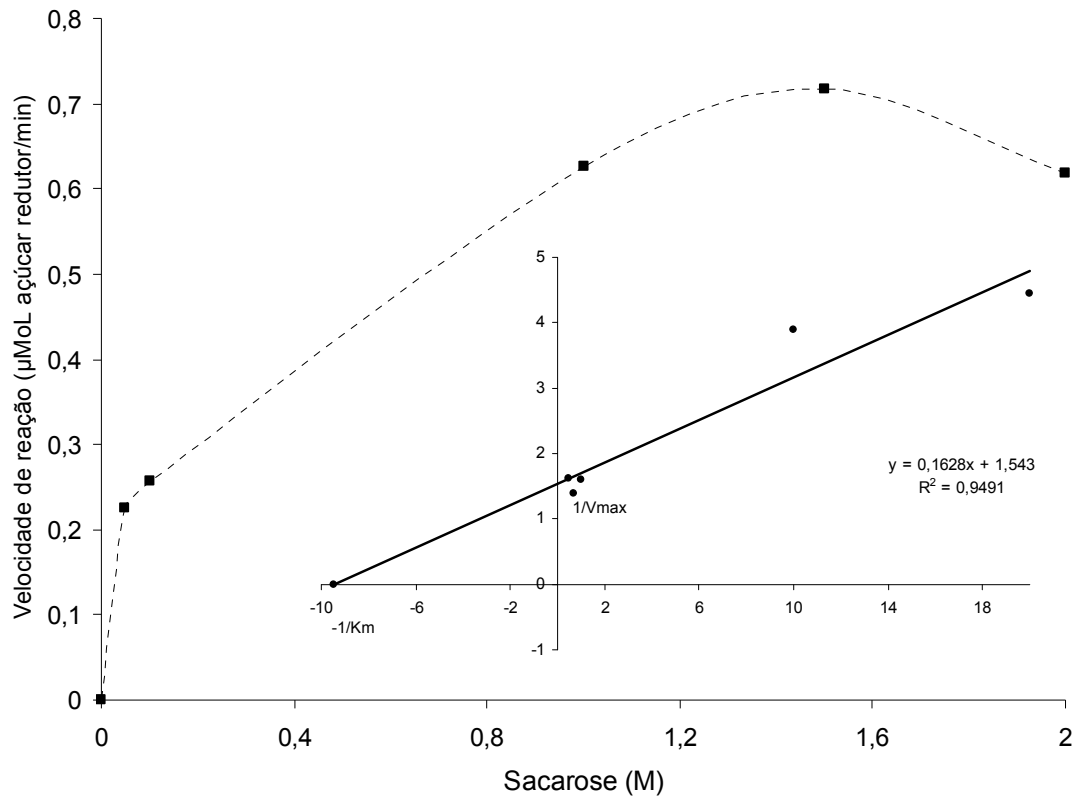


Figura 3 – Velocidade de reação da levansacarase usando extrato livre de células de *B. subtilis* em diferentes concentrações de sacarose por 2 horas em pH 6,0.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) de reação em pH 6,0 e 50°C foram de 0,1055M e 0.648 µM, respectivamente, indicando a baixa especificidade de reação para sacarose nas condições estudadas.

4. Conclusão

O estudo dos parâmetros bioquímicos da levansacarase de *B. subtilis* foram avaliados como uma ferramenta para eventual aplicação do exopolissacarídeo levana. As condições ótimas da levansacarase foram definidas em: pH 6,0, temperatura 50°C, concentração de substrato 1,5M. O K_m e V_{max} da levansacarase foram de 0.1055 M e 0.648 µM, respectivamente.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES-Brasil pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] Dedonder R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* 1966;86:500-505.
- [2] CAZY – Carbohydrate-active enzymes [<http://www.cazy.org>]
- [3] Meng G, Fütterer K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct Biol* 2008;8:16.
- [4] Meng G, Fütterer K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol* 2003;10:935-941.
- [5] Martínez-Fleitez C, Ortiz-Lombardía M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta Jg, Hernández L, Davies GJ. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J* 2005;390:19-27.
- [6] Andersone I, Auzina L, Vigants A, Mutere O, Zikmanis P. Formation of levan from raffinose by levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Eng Life Sci* 2004;4:56-59.
- [7] Ammar YB, Matsubara T, Ito K, Izuka M, Limpanseni T, Pongsawasdi P, Minamiura N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology* 2002;99:111-119.
- [8] Abdel-Fattah AF, Mahmoud DAR, Esawy MAT. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC33a and Enzymic Synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology* 2005;51:402-407.
- [9] Bergeron LJ, Burne RA. Roles of fructosyltransferase and levansucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism. *Infect Immun* 2001;69:5395-5402.
- [10] Park HE, Park NH, Kim MJ, Lee TH, Lee HG, Yang JY, Cha J. Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformis* ATCC 15953. *Enzyme and Microbiol Technology* 2003;32:820-827.
- [11] Han YW. Microbial levan. *Adv Appl Microbiol* 1990;35:171-194.
- [12] Jang KH, Song KB, Kim CH, Chung BH, Kang SA, Chun UH, Choue RW, Rhee SK. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett* 2001;23:339-344.

- [13] Hernandez L, Arrieta J, Menendez C. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemical Journal* 1995;309; 13-118.
- [14] Ananthalakshmy VK, Gunasekaran P. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. *Enzyme and Microbial Technology* 1999;25:109-115.
- [15] Somogy MA. A new reagent for determination of sugar. *J Biol Chem* 1944;160:61-68.
- [16] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry* 1945;153:375-380.
- [17] Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
- [18] Crittenden RG, Doelle HW, Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). *Appl Microbiol Biothechnol* 1994;41:302-308.
- [19] Sangiliyandi G, Raj KC, Gunasekaran P. Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett* 1999;21:179-182.
- [20] Lyness EW, Doelle HW. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett* 1983;5:345-350.
- [21] Esawy MA, Mahmoud DAR, Fattah, AFA. Immobilization of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2008;25:237-246.
- [22] Belghith H, Song KB, Kim CH, Rhee SK. Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnol Lett* 1996;18:467-472.
- [23] Hettwer U, Gross M, Rudolph K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology* 1995;177:2834-2839.

7 CONCLUSÕES

A produção de levanasacarase por *B. subtilis* foi fortemente influenciada pela concentração de sacarose, pH e agitação, enquanto a produção de levana pela concentração de sacarose e tempo de fermentação.

A maior produção de levanasacarase (6,57 UA) foi na condição de: 24 h, 300 gL⁻¹ de sacarose, 180 de agitação e pH 6,0, de fermentação e a melhor produção de levana 30,09 gL⁻¹ nas seguintes condições: 300 gL⁻¹ de sacarose, 160 de agitação e pH 7,0.

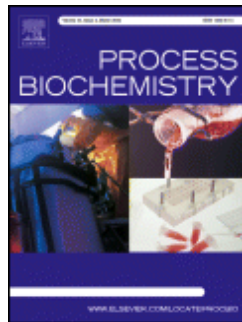
A levana produzida em 300 gL⁻¹ apresentou duas massas molares: 410.000 e 50.000 Da, enquanto a levana produzida em 100 gL⁻¹ de sacarose apresentou somente massa molar de 410.000 Da.

Sob condições otimizadas foi possível produzir a levanasacarase por *B. subtilis* e o estudo dos parâmetros bioquímicos foram avaliados como uma ferramenta para eventual aplicação do exopolissacarídeo levana nos campos industriais. As condições ótimas de atividade da levanasacarase do extrato bruto livre de células foram definidas em: pH 6,0, temperatura 50°C, concentração de substrato 1,5M. O Km e a V_{max} da levanasacarase foram de 0.1055 M e 0.648 μM, respectivamente.

ANEXOS

ANEXO A – Normas para Submissão do Artigo A para Revista Process Biochemistry
(Issn: 1359-5113). Disponível em:

< http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/422857/authorinstructions>



Impact factor: 2.336

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules or elements, and living organisms ("Cell factory" concept). These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds. Within the segment "from the raw material(s) to the product(s)", it integrates tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest are the food, drink, healthcare, energy and environmental industries and their underlying biological and engineering principles.

Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application:

- Fermentation, biochemical and bioreactor engineering
- Biotechnology processes and their life science aspects
- Biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation
- Downstream processing
- Modeling, optimization and control techniques.

Particular aspects related to the processes, raw materials and products, also include:

- Quantitative microbial physiology, stress response, signal transduction
- Genetic engineering and metabolic engineering
- Proteomics, functional genomics, metabolomics, and bioinformatics
- Chiral compounds production, cell free protein system, high-throughput screening, in-vivo/in-vitro evolution, enzyme immobilization, enzyme reaction in non-aqueous media
- Mass transfer, mixing, scale-up and scale-down, bioprocess monitoring, bio-manufacturing
- Cell, tissue and antibody engineering: animal and plant cells/tissues, algae, micro-algae, extremophile, antibody screening and production

- Environmental biotechnology: biodegradation, bioremediation, wastewater treatment, biosorption and bioaccumulation
- Bio-commodity engineering: biomass, bio-refinery, bio-energy
- Bioseparation, purification, protein refolding.
- Other new bioprocess and bioreactor related topics especially on application to healthcare sectors

Guide for Authors

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules or elements, and living organisms ("Cell factory" concept). These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds. Within the segment "from the raw material(s) to the product(s)", it integrates tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest are the food, drink, healthcare, energy and environmental industries and their underlying biological and engineering principles. Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application: fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; downstream processing; modeling, optimization and control techniques.

Submission of manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/prbi/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

A cover letter should be submitted on line by authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to PRBI, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least two independent referees (up to five, outside their own institution) with their email addresses. But, the selection of the referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by two referees. Manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by one editor, generally it should not be resubmitted to another editor in its original version, and should be, unless specific problem, resubmitted after appropriate modifications, to the same editor. It is up to the discretion of the editors to reconsider such revised manuscripts as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a revised

manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays. Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press.

Format and type of manuscripts

Process Biochemistry Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews. The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: the first page includes the title, the authors' first and last names [with the corresponding author indicated by an asterisk*], addresses [with a superscript letter to indicate a different address], and corresponding author's fax and email; the second page includes the abstract and six key words; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), and References. Tables and figures are included after References with a separate page for each. For experimental design results, as they are scientifically non exploitable, 3D figures are generally discouraged. Indicate then only the pertinent data in 2D diagrammes. Page numeration starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted.

Full length articles (FLA) should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Short communications (SCO) should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables.

Reviews (REV) should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables.

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should then clearly motivate the reasons of the accelerated way in the cover letter.

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words for Short Communications and 150-200 words for Full Length Articles and Reviews, reporting concisely on the purposes and results of the paper, and also six keywords. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Colour illustrations in the print version are reproduced at the author's expense. The publisher will provide the author with a cost estimate upon receipt of the accepted paper. Colour illustrations in the online version are always at no cost to the authors.

References: References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private communications **AND WEBSITE ADDRESSES** should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

[1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.

[2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494

[3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.

[4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. 10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.

[5] Curtin CD. Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.

[6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. Jpn. Patent. JP 05260-966. 92.03.24.

[7] Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.

[8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Language Polishing: For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Proofreading

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

Twenty-five offprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at the prices shown on the price list which will be sent by the publisher to the author together with the offprint order form upon receipt of the accepted manuscript.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal homepage at <http://www.elsevier.com/locate/prbi>. The journal homepage also

provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Online manuscript tracking

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature. For more information, visit <http://www.elsevier.com/trackarticle>. **Process Biochemistry has no page charges.**

ANEXO B – Normas para submissão do Artigo B para revista Enzyme and Microbial Technology (ISSN: 41-0229), disponível em:

<http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/525004/authorinstructions>



Impact factor: 1.969

Enzyme and Microbial Technology is an international, peer-reviewed journal publishing original research and reviews, of biotechnological significance and novelty, on basic and applied aspects of the use of enzymes, micro-organisms, animal cells and plant cells. We especially encourage submissions on:

- Biotechnology of Renewable Resources, Biomass, and Biofuels
- New Imaging Techniques, Biosensors, and Analytical Biotechnology
- Biocatalysis, especially with Complex or Multienzyme Systems
- Biotechnological Production of New Materials and Biopharmaceuticals

Manuscripts which report isolation, purification, immobilization or utilization of organisms or enzymes which are already well-described in the literature are not suitable for publication in EMT, unless their primary purpose is to report significant new findings or approaches which are of broad biotechnological importance. Similarly, manuscripts which report optimization studies on well-established processes are inappropriate. EMT does not accept papers dealing with mathematical modeling unless they report significant, new experimental data.

Guide for Authors

Biotechnology Research and Reviews

Enzyme and Microbial Technology is an international, peer-reviewed journal publishing original research and reviews on basic and applied aspects of the use of enzymes and microorganisms, including bacteria, fungi, algae, protozoa, viruses, animal cells and plant cells.

Submission of Manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/enzmictec>. After registration, authors will be asked to upload their

article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence. A cover letter must be submitted on line by authors together with the manuscript. The cover letter must address the following points:

- 1) All authors agree to submit the work to EMT,
- 2) The work has not been published/submitted or being submitted to another journal,
- 3) The novelty and significant contribution of the submitted work must be briefly described,
- 4) The transfer of copyright from the author to the publisher,
- 5) Suggestions for reviewers.

The primary criteria for judging the acceptability of a manuscript are its scientific and biotechnological significance and its novelty. Upon receipt, submissions are initially screened by the Editors and the Advisory Board, and manuscripts lacking in these respects will be declined, even if the experimental work appears to be technically sound. After initial screening, all submissions are reviewed by referees whose names are not normally disclosed to authors. On acceptance for publication papers are subject to editorial amendment. Authors are invited to provide the names, addresses, phone numbers and e-mail addresses of up to six potential reviewers. It is not appropriate to nominate individuals that have had any input into the manuscripts submitted or any recent collaboration with the authors. The Editors may or may not take these suggestions into account during the reviewing process.

Manuscripts which report isolation, purification, immobilization or utilization of organisms or enzymes which are already well-described in the literature are not suitable for publication in EMT, unless their primary purpose is to report significant new findings or approaches which are of broad biotechnological importance. Similarly, manuscripts which report optimization studies on well-established processes are inappropriate. EMT does not accept papers dealing with mathematical modeling unless they report significant, new experimental data.

Format and type of manuscripts

Contributions are classified as *Research Papers*, *Rapid Communications* or *Reviews*. *Research Papers* should be a record of significant, original research and should not normally exceed 6000 words in length.

Rapid Communications should be short accounts of research of unusual urgency and significance and should not exceed a total of eight manuscript pages, including tables and figures. A letter stating the reasons for wishing the submission to be considered as a Rapid Communication must accompany the manuscript. At the discretion of the Editors, manuscripts in this category will receive accelerated handling. Authors are urged to ensure careful adherence to the guidelines for the preparation of manuscripts set out below since manuscripts requiring extensive editing or modification cannot be

considered for expedited handling. *Reviews* are normally invited by the Editors but unsolicited review articles of up to 10,000 words are welcome. Authors should send a brief outline to one of the Editors before the manuscript is drafted. The manuscript must be accompanied by copies of all relevant papers published elsewhere by the authors and by copies of relevant manuscripts that are in press or under editorial consideration. If any tables or illustrations have been published elsewhere the editorial office must be informed so that permission to reproduce can be obtained from the original publishers. Manuscripts should be typed in double spacing throughout with a margin of 30mm at the top and bottom on both sides. Papers must be arranged in the following order of presentation: title of paper; names of the authors; address of the place at which the work was carried out; an abbreviated title for use as a running headline; a self-contained synopsis of the paper (100-200 words in length); body of the manuscript; tables, each on a separate page; captions to figures; figures, each on a separate page. Submissions not conforming to these guidelines may be returned to the authors.

Language Polishing

Authors who require information about language editing and copyediting services pre-and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Illustrations

It is the author's responsibility to provide artwork for all illustrations, both line and halftone. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white figures corresponding to all the colour illustrations. Each figure must be accompanied by a caption, which consists of the title of the figure and sufficient explanatory details to make the figure easily understood.

Tables

Tables should be submitted on separate sheets together with a suitable caption at the top of each table. Column headings should be kept as brief as possible, and units of measure indicated in

parentheses. Footnotes to tables should be placed at the bottom of the table to which they refer.

References

Number all references to the literature in a single sequence in the order in which they appear in the text, using Arabic numerals. Full citation should be given for all authors. Titles of articles, as well as titles of chapters in books, should be included. Abbreviate journal titles in accordance with Bibliographic Guide for Editors and Authors (American Chemical Society). References should take the following form:

1. Rijken DC, Hoylaerts J, Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue) plasminogen activator. *J Biol Chem* 1982;257:2920-2925.
2. Thomas K, Gimenez-Gallego G, DiSalvo J, Linemeyer D, Kelly L, Menke J, Mellin T, Gusch R. Structure and activities of acidic fibroblast growth factor. In: *Angiogenesis Mechanisms and Pathobiology* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1987, 9-12.

Units, Abbreviations and Nomenclature

SI units should be used: the foot-pound-second (fps) or other equivalent should be given in parentheses afterwards if necessary. On graphs, if values are recorded in non-SI units then additional scales in SI units should be used. If a large number of symbols is used, it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings. Biochemical nomenclature should conform to that recommended by the IUPAC-IUB Commission, and enzymes should be given their EC numbers and systematic names.

Citations in the text: Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not allowed in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for (at least on-line) publication.

Citing and listing of Web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-934) (see also http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that

Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received. Authors can keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway.

Special Subject Repositories

Certain repositories such as PubMed Central ("PMC") are authorized under special arrangement with Elsevier to process and post certain articles such as those funded by the National Institutes of Health under its Public Access policy (see <http://www.elsevier.com> for more detail on our policy). Articles accepted for publication in an Elsevier journal from authors who have indicated that the underlying research reported in their articles was supported by an NIH grant will be sent by Elsevier to PMC for public access posting 12 months after final publication. The version of the article provided by Elsevier will include peer-review comments incorporated by the author into the article. Because the NIH "Public Access" policy is voluntary, authors may elect not to deposit such articles in PMC. If you wish to "opt out" and not deposit to PMC, you may indicate this by sending an e-mail to mailto: NIHauthorrequest@elsevier.com.

Reprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

ANEXO C – Resultados complementares dos experimentos, onde estão demonstrados:

- I - Estimativa da massa molar das maiores produções de levana nas Etapas 1 e 2.
- II - Produtividade, produção de levana, crescimento celular e consumo de açúcares no primeiro modelo experimental fatorial completo 2^4 (Etapa 1).
- III - Produção de levana, crescimento celular e consumo de açúcares no segundo modelo experimental fatorial fracionado 3^{3-1} (Etapa 2).

I - Estimativa da massa molar das maiores produções de levana nas Etapas 1 e 2

As maiores produções de levana da etapa 1 foram 20,62; 17,93 e 17,69 gL⁻¹ nos ensaios 14, 15 e 16 respectivamente, e na etapa 2 foi 30,09 gL⁻¹ no ensaio 6. Esses cultivos foram escolhidos para avaliação da distribuição da massa molar da levana produzida. O estudo da distribuição da massa molar é importante para definir a aplicação do exopolissacarídeo (SUTHERLAND, 2001).

A figura 9 ilustra os perfis cromatográficos das três amostras de levana (ensaios 14, 15 e 16) da etapa 1. Os picos foram comparados aos picos dos padrões de levana. As amostras 14 e 16 exibiram dois picos de eluição correspondentes às massas molares (410.000 e 50.000 Da), enquanto que a amostra 15 está apresentou apenas o pico de 410.000 (Figura e). A concentração de sacarose, nas amostras 14 e 16 foi de 300 gL⁻¹ e a amostra 15 foi obtida do meio contendo 100 g.L⁻¹ de sacarose mostrando que em baixas concentrações de sacarose não forma levanas de baixa massa molar.

Ahamed et al. (2005) investigaram a massa molecular de levana produzida por *B. subtilis* em diferentes concentrações de sacarose, obtendo uma maior massa molecular, 60 KDa em 10% de concentração de sacarose. Observaram também uma queda na massa molecular de levana quando a concentração de sacarose ultrapassou 20% na reação.

A figura 10 mostra o perfil cromatográfico da amostra 6 (etapa 2) com dois picos de eluição com massas molares de 410.000 e 50.000 Da, sendo

semelhante aos resultados anteriores confirmando o que o aumento da concentração de sacarose leva a uma produção de levana de menor massa molar (50.000 Da).

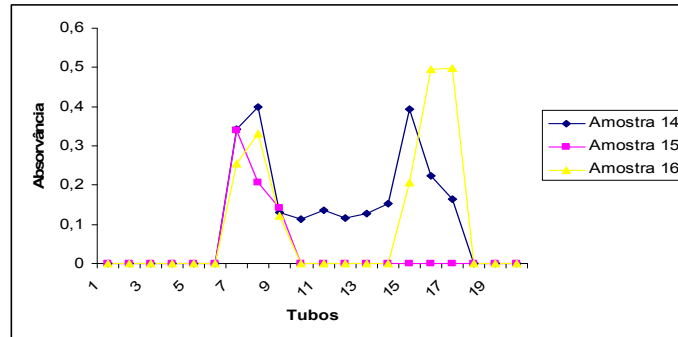


Figura 5 – Perfil cromatográfico das amostras de levana obtidas dos ensaios 14, 15 e 16 (Etapa 1).

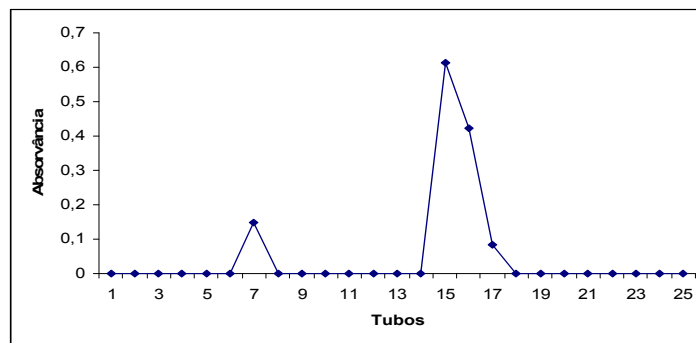


Figura 6 – Perfil cromatográfico da amostra de levana obtida do ensaio 6 (Etapa 2).

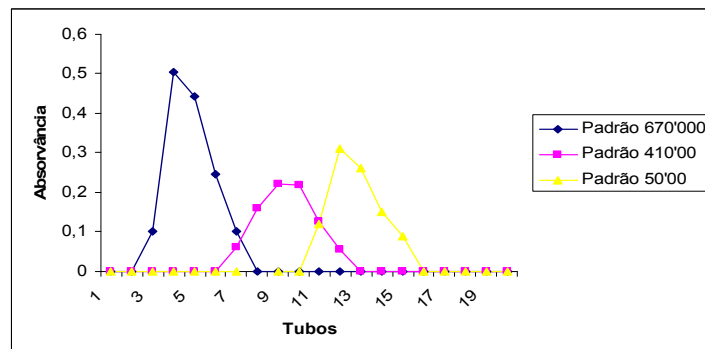


Figura 7 – Perfil cromatográfico dos padrões de levana de *Leuconostoc mesenteroides*. Massa molar de 670.000, 410.000 e 50.000.

II - Produtividade, produção de levana, crescimento celular e consumo de açúcares no primeiro modelo experimental fatorial completo 2⁴ (Etapa 1).

Os resultados de produtividade, produção de levana, crescimento celular e consumo de açúcares no primeiro modelo experimental 2⁴ (Etapa 1) estão apresentados na Tabela 9.

As maiores produtividades de levana foram observadas nos ensaios 2 e 4, onde as condições de fermentação foram em 300 gL⁻¹ de sacarose, 24 horas de tempo de cultivo, 100 rpm e pH 4,0 e 6,0 respectivamente. Entretanto, a melhor produção de levana foi no ensaio 14 (300 gL⁻¹, pH 4,0, 48 horas de fermentação e 180 rpm). Uma alta concentração de células foi observada nos ensaios 14, 15 e 16 que foram em 48 horas de tempo de fermentação e 180 rpm. Nestes ensaios também ocorreram as três maiores produções de levana (20,62, 17,93 e 17,69 gL⁻¹). Estes resultados podem ser visualizados na Figura 8, que relaciona a produção de levana e biomassa.

A figura 9 relaciona a produção de levana e consumo de açúcares por *B. subtilis* e uma alta produção de levana foi observada, mesmo onde o consumo foi baixo mostrando que a síntese de levana pode ser desacoplada do consumo de açúcares pelo microrganismo.

Tabela 9 – Produção, produtividade de levana, biomassa e consumo de açúcares obtidas no modelo experimental fatorial completo 2^4 (Etapa 1) por *B. subtilis*.

Ensaio*	Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas				Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁ Sacarose (gL ⁻¹)	X ₂ pH	X ₃ Tempo de cultivo (h)	X ₄ Agitação (rpm)	Produtividade (gL ⁻¹ /h)	Levana (gL ⁻¹)	Biomassa (gL ⁻¹)	Consumo de açúcares (%)
01	-1	-1	-1	-1	100	4,0	24	100	0,214	5,13	0,43	26,18
02	1	-1	-1	-1	300	4,0	24	100	0,578	13,88	3,51	25,67
03	-1	1	-1	-1	100	6,0	24	100	0,213	5,1	0,48	40,39
04	1	1	-1	-1	300	6,0	24	100	0,523	12,56	1,59	44,09
05	-1	-1	1	-1	100	4,0	48	100	0,154	7,39	0,35	17,96
06	1	-1	1	-1	300	4,0	48	100	0,286	13,73	2,34	34,29
07	-1	1	1	-1	100	6,0	48	100	0,289	13,88	7,56	47,79
08	1	1	1	-1	300	6,0	48	100	0,322	15,47	6,23	41,72
09	-1	-1	-1	1	100	4,0	24	180	0,232	5,57	1,81	10,33
10	1	-1	-1	1	300	4,0	24	180	0,447	10,73	11,87	15,16
11	-1	1	-1	1	100	6,0	24	180	0,410	9,85	0,25	46,61
12	1	1	-1	1	300	6,0	24	180	0,465	11,16	9,43	27,05
13	-1	-1	1	1	100	4,0	48	180	0,072	3,45	0,27	24,02
14	1	-1	1	1	300	4,0	48	180	0,430	20,62	12,45	25,54
15	-1	1	1	1	100	6,0	48	180	0,374	17,93	17,67	45,17
16	1	1	1	1	300	6,0	48	180	0,369	17,69	14,97	34,08
17	0	0	0	0	200	5,0	36	140	0,296	10,67	2,52	34,9
18	0	0	0	0	200	5,0	36	140	0,169	6,1	2,67	39,15
19	0	0	0	0	200	5,0	36	140	0,225	8,11	2,51	38,41

*Ensaio aleatorizados

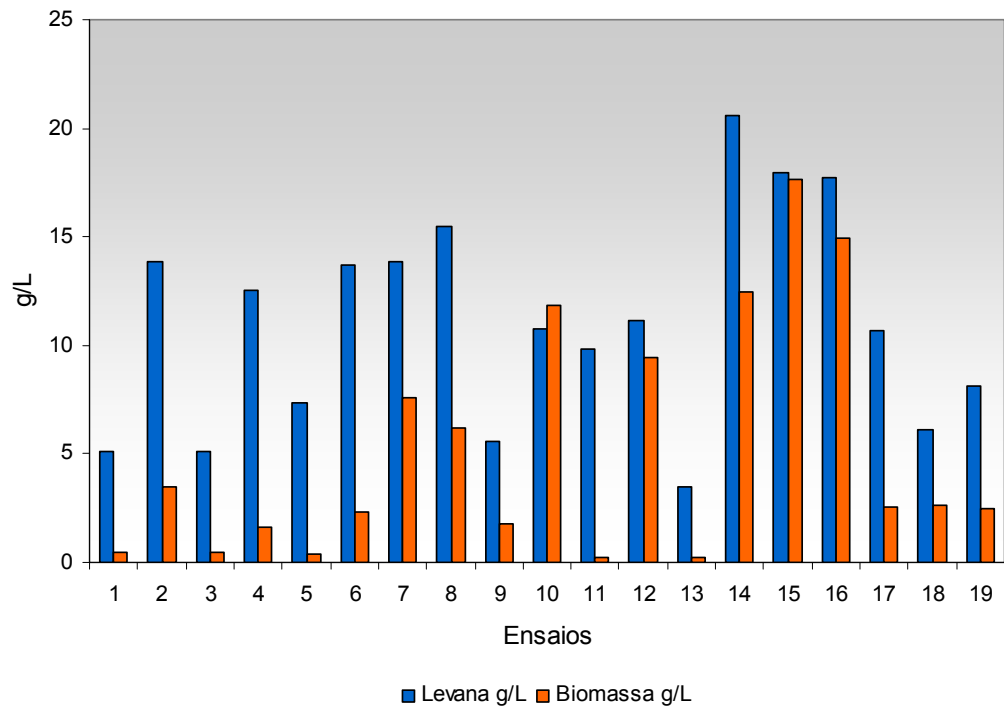


Figura 8 – Relação entre produção de levana e crescimento celular (Etapa 1) por *B. subtilis*.

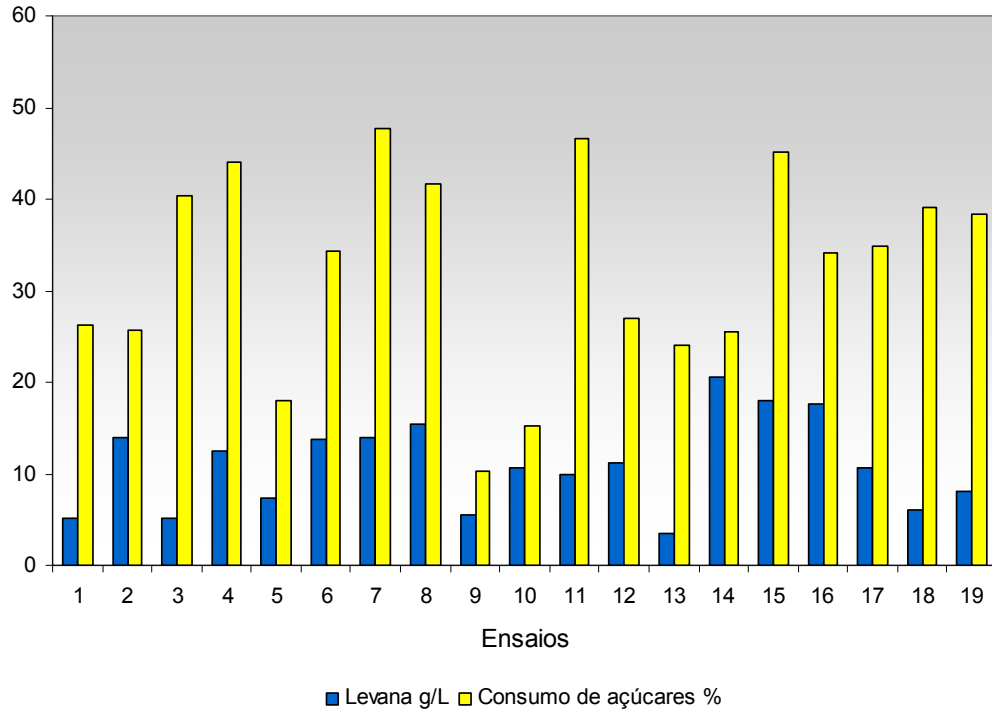


Figura 9 – Relação entre produção de levana e consumo de açúcares (Etapa 1) por *B. subtilis*.

III - Produção de levana, crescimento celular e consumo de açúcares no segundo modelo experimental fatorial fracionado 3^{3-1} (Etapa 2).

Neste segundo modelo, a variável tempo de cultivo foi fixada em 24 h e as respostas obtidas estão descritas na Tabela 10. No ensaio 6, uma alta concentração de levana foi observada ($30,09 \text{ gL}^{-1}$), onde as condições de fermentação foram de 300 gL^{-1} de sacarose, pH 7,0 e 180 rpm. Neste ensaio também houve a maior concentração celular ($14,34 \text{ gL}^{-1}$). Entretanto, a Figura 10 demonstra que o crescimento celular não acompanhou a produção de levana por *B. subtilis* na maioria dos ensaios.

Tabela 10 – Produção de levana, biomassa e consumo de açúcares obtidas no modelo experimental fatorial fracionado 3^{3-1} (Etapa 2) por *B. subtilis*.

Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas			Respostas			
Ensaio*	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	Levana	Biomassa	Consumo de
				Sacarose (g L^{-1})	pH	Agitação (rpm)	(g L^{-1})	(g L^{-1})	açúcares (%)
01	-1	-1	-1	250	5,0	160	18,98	4,98	45,02
02	-1	0	1	250	6,0	200	13,59	3,44	34,98
03	-1	1	0	250	7,0	180	20,89	10,56	54,78
04	0	-1	1	300	5,0	200	13,76	9,7	42,34
05	0	0	0	300	6,0	180	8,54	5,76	45,65
06	0	1	-1	300	7,0	160	30,09	14,34	55,65
07	1	-1	0	350	5,0	180	13,84	5,39	32,34
08	1	0	-1	350	6,0	160	24,79	12,01	39,12
09	1	1	1	350	7,0	200	19,07	12,89	57,32
10	0	0	0	300	6,0	180	10,32	12,03	49,90
11	0	0	0	300	6,0	180	8,96	11,95	53,48

***Ensaio aleatorizados**

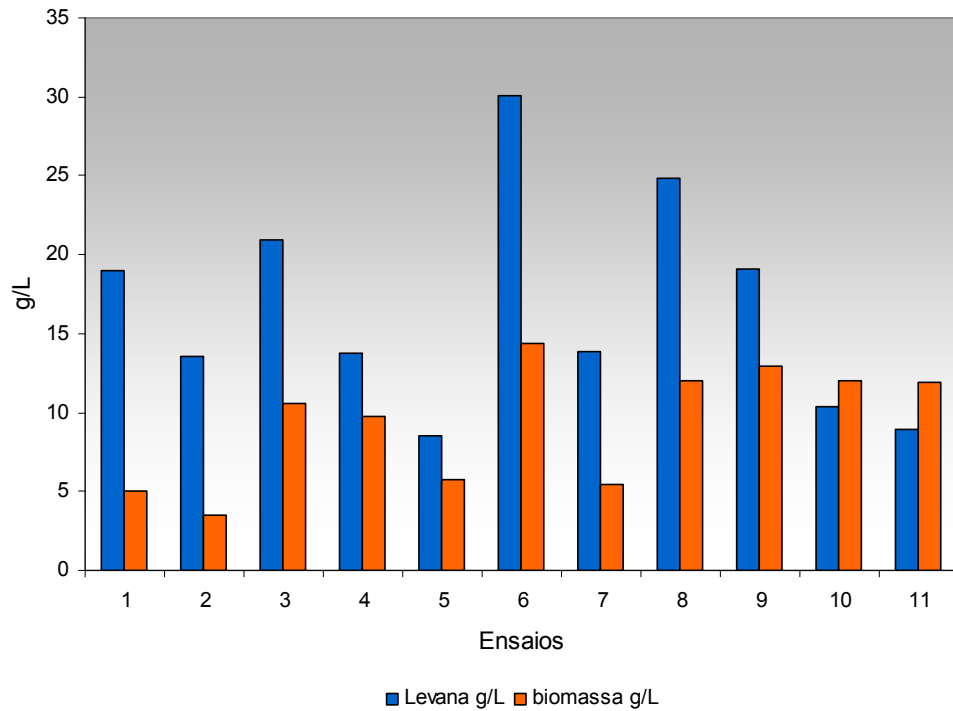


Figura 10 – Relação entre produção de levana e crescimento celular (Etapa 2) por *B. subtilis*.

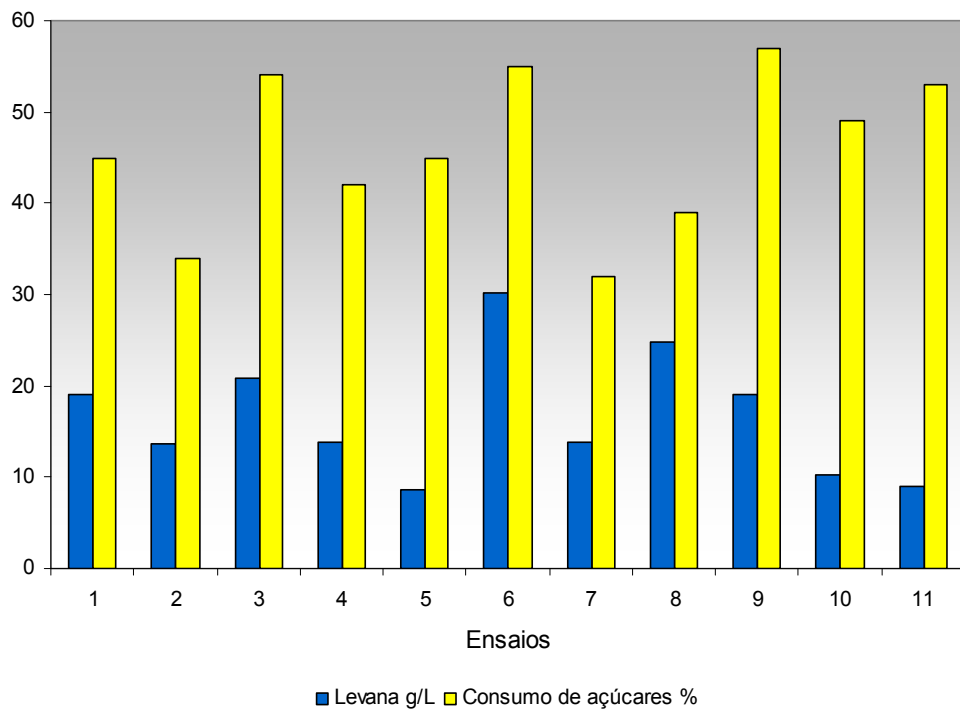


Figura 11 – Relação entre produção de levana e consumo de açúcares (Etapa 2) por *B. subtilis*.