



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BRUNA CAROLINE MARQUES GONÇALVES

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE  
LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* Natto**

BRUNA CAROLINE MARQUES GONÇALVES

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE  
LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* Natto**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Maria Antonia Pedrine  
Colabone Celligoi

Co- Orientadora: Dra. Mara Lúcia Luiz  
Ribeiro

Londrina  
2012

BRUNA CAROLINE MARQUES GONÇALVES

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE  
LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* Natto**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine  
Calabone Celligoi  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva  
USP – São Paulo - SP

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall’Antonia  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 14 de fevereiro de 2012.

*Dedico este trabalho  
aos meus pais, familiares e amigos  
que, incondicionalmente, me apoiaram,  
e a Deus,  
por tê-los colocado em minha vida  
e por permitir que as coisas aconteçam.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, orientadora, e à Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro, co-orientadora, pelos conselhos, ensinamentos, orientação e pelo bom convívio durante a construção deste trabalho, possibilitando a sua concretização.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida, fato este que possibilitou a viabilização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, pela contribuição na construção do biossensor e nas análises eletroquímicas.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, pelas contribuições nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Maria Eugenia Duarte, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelas contribuições nas análises de RMN.

A todos os professores do mestrado em Biotecnologia e funcionários do Departamento de Bioquímica pelo apoio e auxílio prestados.

Ao Nelson e à Silvia, pela competência profissional e atenção.

Aos queridos amigos de mestrado Franciele, Gesiele, Leonardo, Lucas, Paulo, Patrícia e Valéria, pela companhia na conclusão dos créditos, apresentação de seminários e viagens.

Aos queridos amigos de laboratório Bott, Danielle, Danilo, Dieyssi, Flávia, Janaina, Jaqueline e Karita pelo compartilhamento de materiais e experiências, apoio, suporte emocional e contribuição neste trabalho.

Aos meus pais, Meire e Abilio pelo amor, suporte financeiro e, principalmente, emocional e ao meu tio Mauro pela compreensão e palavras de carinho..

A todos aqueles que se fizeram presentes, foram solidários e torceram por mim.

“Nós devemos ser a mudança que desejamos para o mundo”.

Gandhi

MARQUES-GONÇALVES, Bruna Caroline. **Produção, caracterização e imobilização de levanasacarase de *Bacillus subtilis* Natto**, 2012. 134 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

A levanasacarase é uma frutossiltransferase de grande interesse biotecnológico por sintetizar levana, um exopolissacarídeo bacteriano formado por unidades de frutose, com potenciais aplicações na área terapêutica e nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos. A levanasacarase é produzida por diversos microorganismos, entre eles o *Bacillus subtilis* Natto, em presença de sacarose como fonte de carbono. Neste estudo a produção de levanasacarase foi otimizada empregando metodologia de superfície de resposta, avaliando a influência da concentração de sacarose, pH e agitação. A produção de levana foi acompanhada paralelamente e a enzima foi parcialmente caracterizada. A partir da condição otimizada para produção da levanasacarase, novos cultivos foram realizados para avaliar a influência dos sais NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em diferentes concentrações, na produção da enzima, na síntese de levana, e no crescimento da biomassa. A influência dos sais NaCl, KCl, ZnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> foi avaliada na atividade da levanasacarase. Foram determinados a temperatura e o pH ótimos da enzima, a estabilidade térmica e a constante de Michaelis-Menten. A levanasacarase foi imobilizada em pasta de carbono e utilizada para a construção de um biossensor, que foi aplicado para detecção de sacarose em refrigerante e suco de abacaxi industrializado. A condição otimizada para a produção da enzima foi 300 g L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 7,5 e 160 rpm, com atividade de 8,57 UA mL<sup>-1</sup>. A maior produção de levana observada foi 205,92 g L<sup>-1</sup>. Os três sais testados na fermentação aumentaram a produção de enzima e de levana e reduziram a proliferação da biomassa; com destaque para o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que aumentou 100% a atividade da enzima, 200% a produção de levana e reduziu em 80% o crescimento do *B. subtilis* Natto. Dos sais avaliados na atividade enzimática, KCl, ZnCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram indutores, NaCl não influenciou a atividade da enzima e os demais sais foram inibidores. O pH e a temperatura ótimos observados foram 6,0 e 50°C, a enzima se demonstrou termoativa e termoestável a 30° e com baixa afinidade pelo substrato sacarose (K<sub>m</sub> = 313 mM). O pH ótimo da enzima imobilizada foi 6,0, coincidindo com o da forma livre, e o K<sub>m</sub> aparente (K<sub>m ap</sub> = 833 mM) indicou redução na afinidade da levanasacarase pela sacarose após a imobilização. A detecção de sacarose em refrigerante e suco de abacaxi foi bem sucedida e os resultados indicaram ser um método comparável ao colorimétrico. Conclui-se que a cepa estudada é uma potencial produtora de levana e que a adição do sal Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ao meio de cultivo é favorável para a produção da enzima e da levana, facilitando a sua obtenção, pois reduziu a proliferação da biomassa. Características como termo-estabilidade e termo-atividade tornam interessante a manipulação industrial desta enzima. O biossensor se demonstrou uma alternativa rápida e eficiente para a detecção de sacarose.

**Palavras chave:** Levanasacarase. *Bacillus subtilis* Natto. Biossensor.

MARQUES-GONÇALVES, Bruna Caroline. **Production, characterization and immobilization of *Bacillus subtilis* Natto levansucrase**, 2012. 134 f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Estadual University of Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

Levansucrase fructosyltransferase is a great biotechnological interest enzyme to synthesize levan, a fructan bacterial exopolysaccharide with potential applications in therapeutic and in food, cosmetic and pharmaceutical industries. Levansucrase is produced by many microorganism, for example *Bacillus subtilis* Natto, on sucrose fermentation. This paper describe levansucrase production optimization using response surface methodology to evaluate the influence of sucrose concentration, pH and agitation. Levan production was monitored on fermentations and enzyme obtained was partially characterized. New fermentations to evaluate the influence of NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> different concentrations salts on enzyme production from optimized condition was performed to analyse the influence on enzyme production, levan synthesis and biomass. NaCl, KCl, ZnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> influence were evaluated on levansucrase activity. Optimal temperature and pH value, thermal stability and Michelis-Mentes were investigated. Biosensor construction required levansucrase immobilized in carbon paste wich was used for the sucrose detection of refrigerant and industry pinneple juice. The optimized condition for enzyme production was 300 g L<sup>-1</sup> sucrose, pH 7,5, 160 rpm with 8,57 UA mL<sup>-1</sup> activity. The highest levan production was observed 205,92 g L<sup>-1</sup>. All salts tested during fermentation increased enzyme and levan production and decreased biomass, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is an important salt that increased 100% enzymic activity, 200% levan production and decreased 80% *B. subtilis* Natto growing. Nine salts influence were evaluated on levansucrase activity. KCl, ZnCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were activity inducers and the remaining metal ions were inhibitors, except NaCl wich didn't influence the enzyme activity. The optimum temperature and pH were 6,0 and 50°C, respectively, the enzyme was completely stable and activied at 30° and K<sub>m</sub> of levansucrase was 313 mM (low substrate affinity). Immobilized optimum pH enzyme was 6,0, coinciding with free form, and K<sub>m ap</sub> = 833 mM showed a reduction in the immobilized enzyme sucrose affinity. Refrigerant and industry pinneple juice sucrose determination were successful and the results are comparable with colorimetric method. Results indicated that the strains is a potencial levan producing and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fermentation addition salt in the medium is favorable for levansucrase and levan production, making it easier to obtain, for reducing biomass proliferation. Featur such as thermal stability and thermal activity makes enzyme industry manipulation interesting. Biosensor demonstrated a fast and efficient alternative for sucrose detection.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* Natto. Levansucrase. Biosensor.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Propriedades cinéticas das levanasacarases de diferentes micro-organismos.....	22
<b>Tabela 2</b> – Delineamento Box e Behnken 2 <sup>3</sup> para avaliar a influência das variáveis independentes: (X1) concentrações de sacarose, (X2) pH, e (X3) agitação na atividade da levanasacarase de <i>B. subtilis</i> Natto e na produção de levana. As fermentações foram realizadas por 24 h, a 37° C.....	45
<b>Tabela 3</b> - DCCR 22 para avaliar a influência das variáveis independentes: (X1) pH e (X2) temperatura na atividade de polimerização da levanasacarase de <i>B. subtilis</i> Natto. ....	47
<b>Tabela 4</b> – Composição dos eletrodos de pasta de carbono modificados com levanasacarase. Para variação do pH foi utilizado Tampão Mc Ilvanes. Os picos de densidade de corrente anódicos foram determinados para o potencial de 0,3 V. A quantidade de CG foi mantida constante em 150 mg e de OM em 50 µL.....	51
<b>Tabela 5</b> – DCCR 22 para avaliar a influência das variáveis independentes: (X1) volume de EB e (X2) concentração do substrato na sensibilidade do biossensor. ....	52

### Artigo A

<b>Tabela 1</b> – Produção de LS e LV pelo <i>B. subtilis</i> Natto utilizando o Delineamento Box e Behnken 2 <sup>3</sup> para avaliar a influência da concentração de sacarose, pH e agitação na atividade da LS e produção de LV .....	63
<b>Tabela 2</b> – Análise de variância para a atividade da LS de <i>B. subtilis</i> Natto.....	64
<b>Tabela 3</b> – Atividade da LS de <i>B. subtilis</i> Natto por DCCR 2 <sup>2</sup> , com 2 repetições no ponto central, para avaliar a influência do pH e da temperatura.....	66
<b>Tabela 4</b> – Efeito de diferentes sais na atividade da LS.....	70

## Artigo B

<b>Tabela 1</b> – Picos de densidade de corrente para eletrodo de LS em diferentes valores de pH e concentração de enzimas, na presença e na ausência de sacarose, determinados no potencial de 0,3 V.....	85
<b>Tabela 2</b> – Delineamento Composto Central Rotacional $2^2$ para avaliar a influência das variáveis independentes: ( $x_1$ ) concentração do substrato e ( $x_2$ ) volume de EB na sensibilidade do biossensor. Os resultados foram obtidos no potencial de 0,3 V.....	86
<b>Tabela 3</b> – Análise de variância e efeitos para o DCCR $2^2$ .....	86

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Reações catalisadas pela levanasacarase para formação de trioses e levana .....24
- Figura 2** – Mecanismo de ação de polimerização de levana pela levanasacarase. (a) Coordenação da sacarose no sítio ativo da enzima. (b) Liberação da D-glicose, formação de um íon reativo oxocarbanio e ataque pelo resíduo Asp 86 da enzima. (c) Complexo covalente frutossil-enzima, substituído pelo acceptor para formar um análogo de sacarose. (c) Coordenação do análogo da sacarose no sítio ativo da enzima.....25
- Figura 3** – Sítio ativo da levanasacarase: (a) visão superior da enzima (b) distância interatômica entre os resíduos do sítio ativo. As distâncias são representadas pelas linhas descontínuas e as pontes de hidrogênio pelas contínuas. (c) Contato entre a sacarose e a levanasacarase. As moléculas de água são representadas por asteriscos e observa-se a interação putativa da GLU342 com sacarose.....26
- Figura 4** – Estrutura química de molécula de levana formada por ligações  $\beta$ -(2-6) na cadeia principal e ligações  $\beta$ -(2-1) nas ramificações. ....32
- Figura 5** – Métodos de imobilização enzimática: (a) aprisionamento, (b) micro-encapsulação, (c) suporte sólido, (d) ligação cruzada. As enzimas estão respresentadas pelos círculos pequenos. ....37
- Figura 6** – Biocomponentes e transdutores empregados na construção de um biossensor. ....40
- Figura 7** – Esquema do biossensor de pasta de carbono modificado com levanasacarase .....49
- Figura 8** – Célula eletroquímica utilizada nas caracterizações. Á esquerda se observa o eletrodo de trabalho descrito (1), ao centro o contra-eletrodo de platina (2) e à direita, o eletrodo de referência Ag/AgCl (3). Os eletrodos estão imersos em Tampão Mc Ilvanes. ....49

## Artigo A

<b>Figura 1</b> – Superfícies de resposta para atividade da LS (a) e para a produção de LV (b).....	64
<b>Figura 2</b> – Efeito dos sais NaCl, KCl e Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> no crescimento do <i>B. subtilis</i> Natto (linhas contínuas) produção de LS (linhas tracejadas) e produção de LV (linhas pontilhadas) durante a fermentação .....	66
<b>Figura 3</b> – Superfície de resposta para atividade da LS de <i>B. subtilis</i> Natto para pH na faixa 3.3 a 8.8 e temperatura na faixa 29 a 71°C.....	68
<b>Figura 4</b> – Estabilidade térmica da LS de <i>B. subtilis</i> Natto em diferentes temperaturas em (a) 16 horas de incubação e (b) 10 dias de incubação .....	69
<b>Figura 5</b> – Determinação da Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) da LS de <i>B. subtilis</i> Natto .....	71

## Artigo B

<b>Figura 1</b> – Curva de calibração para determinação de sacarose .....	83
<b>Figura 2</b> – Voltamograma cíclico para avaliar a ordem de adição dos componentes da pasta de carbono .....	84
<b>Figura 3</b> – Superfície de resposta para densidade de corrente em função do volume de EB e concentração de substrato .....	87
<b>Figura 4</b> – Densidade de corrente para diferentes concentrações de enzima incorporada na pasta de carbono para construção do eletrodo de LS.....	87
<b>Figura 5</b> – Determinação do $K_m$ da levansacarase imobilizada .....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CG</b>	carbono grafite
<b>EB</b>	extrato bruto
<b>LV</b>	levana
<b>LS</b>	levanasacarase
<b>OM</b>	óleo mineral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	20
3.1	LEVANASACARASE: PROPRIEDADES, FUNÇÕES E ATIVIDADES	20
3.2	PRODUÇÃO DE LEVANASACARASE	27
3.3	CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LEVANASACARASE	29
3.4	PRODUÇÃO DE LEVANA POR LEVANASACARASE	31
3.5	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS MICROBIANOS UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL	34
3.6	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	36
3.7	BIOSSENSOR ENZIMÁTICO	39
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	43
4.1	MATERIAL	43
4.1.1	Micro-Organismo	43
4.1.2	Meios de Cultivo	43
4.1.3	Biossensor	43
4.2	MÉTODOS	44
4.2.1	Fermentação	44
4.2.1.1	Preservação do micro-organismo	44
4.2.1.2	Preparo do inóculo	44
4.2.1.3	Otimização da produção da levanasacarase	45
4.2.1.4	Interrupção dos cultivos	45
4.2.1.5	Efeito de sais na produção de levanasacarase	46
4.2.2	Determinações Bioquímicas	46
4.2.2.1	Atividade da levanasacarase	46
4.2.2.2	Quantificação da levana	46
4.2.2.3	Determinação da biomassa	47

4.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LEVANASACARASE .....	47
4.3.1	Determinação das Condições Ótimas de pH e Temperatura.....	47
4.3.2	Determinação da Estabilidade Térmica .....	48
4.3.3	Efeitos dos Sais na Atividade da Levanasacarase .....	48
4.3.4	Avaliação da Especificidade da Levanasacarase pelo Substrato Sacarose .....	48
4.4	BIOSSENSOR ENZIMÁTICO.....	48
4.4.1	Imobilização da Levanasacarase.....	50
4.4.2	Avaliação do pH na Eficiência do Biossensor.....	50
4.4.3	Avaliação da Eficiência do Biossensor .....	51
4.4.4	Caracterização Eletroquímica do Eletrodo Modificado com Levanasacarase .....	52
4.4.5	Aplicação do Biossensor .....	52
4.4.6	Medidas Eletroanalíticas.....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
	<b>ARTIGO A – APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA PRODUÇÃO DE LEVANASACARASE DE BACILLUS SUBTILIS NATTO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....</b>	<b>55</b>
	<b>Resumo .....</b>	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>2</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
2.1	MICRO-ORGANISMO, MEIO DE CULTIVO E INÓCULO .....	59
2.2	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LS E LN .....	59
2.3	EFEITO DE SAIS NA PRODUÇÃO DA LS .....	60
2.4	BIOMASSA .....	60
2.5	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LS .....	60
2.5.1	Determinação da Temperatura e pH Ótimos .....	60
2.5.2	Estabilidade Térmica .....	60
2.5.3	Efeito de Diferentes Sais na Atividade da LS .....	61

2.5.4	Especificidade da LS pelo Substrato Sacarose .....	61
2.6	DETERMINAÇÃO DE LV .....	61
2.7	ATIVIDADE DA LS .....	61
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>62</b>
3.1	PRODUÇÃO DE LS E LV .....	62
	<b>Conclusões</b> .....	<b>72</b>
	<b>Referências</b> .....	<b>73</b>
	<b>ARTIGO B – NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE SACAROSE POR BIOSENSOR DE LEVANASACARASE</b> .....	<b>77</b>
	<b>Resumo</b> .....	<b>78</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>78</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>80</b>
2.1	EQUIPAMENTOS E ELETRODOS .....	80
2.2	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	81
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>81</b>
3.1	OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA LEVANASACARASE .....	81
3.2	COMPOSIÇÃO DA PASTA DE CARBONO .....	81
3.3	AVALIAÇÃO DO PH NA EFICIÊNCIA DO BIOSSENSOR .....	82
3.4	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LEVANASACARASE E SUBSTRATO NA EFICIÊNCIA DO BIOSSENSOR .....	82
3.5	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA LEVANASACARASE .....	82
3.6	APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR .....	83
3.7	MEDIDAS ELETROANALÍTICAS .....	84
	<b>Resultados e Discussões</b> .....	<b>84</b>
	<b>Conclusões</b> .....	<b>89</b>
	<b>Referências</b> .....	<b>90</b>
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>92</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93
<b>ANEXOS</b> .....	101
ANEXO A – Relatório Técnico: Identificação de micro-organismos.....	102
ANEXO B – Fluxograma de trabalho .....	106
ANEXO C – Normas para submissão do Artigo A: Revista Carbohydrate Polymers .....	108
ANEXO D – Normas para submissão do Artigo B: Revista Biosensors and Bioelectronics.....	121

## 1 INTRODUÇÃO

A levanasacarase (E.C. 2.4.1.10) é uma frutossiltransferase e, segundo a base de dados das enzimas com atividade em carboidratos (CAZY), pertence à família glicosil hidrolase 68 (*GH 68*). Atua em substrato específico e possui dois requerimentos catalíticos para sua atividade: um resíduo ácido doador de prótons e uma base geral ou nucleofílica. Desempenha três atividades em presença da sacarose: *hidrolase*, pela quebra da molécula de sacarose em frutose e glicose; *transfrutosilação*, pela transferência do resíduo frutossil gerado pela hidrólise da sacarose para um aceptor, e *polimerização*, quando ocorre a síntese de levana.

Esta enzima é produzida por bactérias gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus reuteri*, gram-negativas como *Zymomonas mobilis*, *Halomonas* sp., *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* e *P. chlororaphis* e pelos fungos *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus mutans*. Os micro-organismos mais estudados para a produção de levanasacarase são *Z. mobilis* e *B. subtilis*, por serem capazes de produzi-la na forma induzida em meio contendo sacarose como substrato, e secretá-la no meio extracelular, o que facilita a sua obtenção. As espécies do gênero *Bacillus* vêm sendo utilizadas em processos biotecnológicos, como na produção de enzimas e fermentação de alimentos. O *B. subtilis*, comumente encontrado no solo, é uma bactéria com potencial aplicação industrial, pois apresenta crescimento rápido, tempo de fermentação reduzido, e é capaz de excretar seus produtos no meio extracelular. A variedade Natto é responsável pela fermentação da soja para a obtenção do natto, tradicional alimento japonês, e apresenta altas produções de levana de diversas massas moleculares.

A levana é um homopolissacarídeo extracelular de massa molecular de aproximadamente  $10^7$  Da, o que corresponde a cerca de 60.000 unidades de frutose unidas por ligações  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6). Pode ser encontrada na forma linear ou ramificada, e as ramificações ocorrem a partir da hidroxila do carbono 1, em graus variáveis, e se unem à cadeia principal por ligações  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1). Devido a suas diversas características químicas e físicas e propriedades biológicas é amplamente empregada em vários seguimentos industriais e na medicina.

O estudo das diversas condições de fermentação para a produção da levanasacarase tem sido realizado empiricamente, o que demanda muito tempo devido ao grande número de experimentos. Uma alternativa muito empregada para

reduzir o número de experimentos é a metodologia de superfície de resposta (MSR), que torna possível a determinação de uma resposta ótima dentro de uma faixa específica de condições experimentais e que foi a proposta deste trabalho, sendo o primeiro estudo de produção desta enzima utilizando esta ferramenta estatística.

A imobilização da levanasacarase em suportes inertes por ligação iônica e covalente, aprisionamento em alginato de cálcio ágar e agarose e adsorção em resinas, para produção de levana, tem sido descrita. A adsorção em carbono grafite oferece vantagens devido à facilidade e rapidez no preparo da pasta de carbono e pode ser empregada para a construção de biossensores para determinações analíticas.

A dificuldade da análise de açúcares pelos métodos padrões, como HPLC, UPLC, que são demorados, necessitam de pessoal qualificado, equipamentos de alto custo e pré-tratamento da amostra, e a pouca precisão, podendo apresentar sensibilidade à presença de interferentes na solução.

Os biossensores são capazes de monitorar substâncias em práticas biotecnológicas, como a produção de bebidas e doces, possibilitando a otimização e o controle de processos. O emprego na determinação de substâncias, principalmente de substratos enzimáticos como a sacarose, vem sendo muito explorado, devido a sua precisão, seletividade e rapidez, superando os

Considerando as aplicações industriais da levana e as possibilidades de imobilização da levanasacarase de *Bacillus subtilis* Natto, este estudo se justifica como uma nova alternativa biotecnológica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Produzir, caracterizar e imobilizar levanasacarase de *B. subtilis Natto*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir levanasacarase de *B. subtilis Natto* variando pH, concentração da sacarose e agitação, utilizando como ferramenta a metodologia de superfície de resposta e acompanhar paralelamente a produção de levana nos meios de fermentação.
- Caracterizar bioquimicamente a levanasacarase presente no sobrenadante.
- Imobilizar fisicamente a levanasacarase em pasta de carbono e construir um biossensor enzimático.
- Aplicar o biossensor para determinação de sacarose em refrigerante e suco de abacaxi industrializado.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LEVANASACARASE: PROPRIEDADES, FUNÇÕES E ATIVIDADES

A levanasacarase (EC 2.4.1.10) é classificada como uma frutossiltransferase, pois catalisa a transferência do grupo terminal  $\beta(2\rightarrow1)$ -D-frutossil para um mono ou oligossacarídeo substituinte do oxigênio 1 de um resíduo de frutose da sacarose para o oxigênio 6 do seu resíduo de glicose, sintetizando a maior parte da levana microbiana (VELÁZQUEZ-HERNANDEZ et al., 2009). Segundo a base de dados das enzimas com atividade em carboidratos (CAZY), esta enzima pertence à família glicosil hidrolase 68 (*GH 68*), pois, assim como as demais proteínas desta família, atua em substrato específico e possui dois requerimentos catalíticos para sua atividade: um resíduo ácido doador de prótons e uma base geral ou nucleofílica (MENG; FURTTTERER, 2003).

Existem três enzimas responsáveis pela hidrólise da sacarose durante a fermentação: sacarase intracelular (SacA ou InvA), levanasacarase extracelular (SacB ou InvC) e sacarase extracelular (SacC ou InvB). SacA e SacC são enzimas tipicamente responsáveis pela hidrólise da sacarose, enquanto SacB possui ambas as atividades, hidrólise de sacarose e formação de levana, portanto a hidrólise da sacarose é feita predominantemente pelas enzimas extracelulares, SacB e SacC, enquanto a formação da levana é exclusivamente catalisada pela SacB (PASCAL et al., 1971; ANANTHALAKSHMY; GUANASEKARAN, 1999a, 1999b).

Segundo Sangiliyandi e Gunasekaran (2001) a enzima SacA é um monômero de peso molecular igual a 58 kDa. Na ausência de um mecanismo de transporte para sacarose, o papel da sacarase intracelular em *Z. mobilis* não é claro. A sacarase extracelular (SacC ou InvB) de *Z. mobilis* tem uma alta atividade específica para a hidrólise de sacarose. Esta enzima contribui com 60% da atividade de sacarase extracelular, mas não catalisa a polimerização de frutose em levana, nem a degradação de polifrutoses como levana ou inulina. Assim, esta enzima é diferente da sacarase extracelular de *Bacillus subtilis*, que mostra a atividade levanase além de hidrólise de sacarose. A enzima SacB de *Z. mobilis* Z6c apresentou a massa molecular de 56 kDa.

A levanasacarase extracelular de *B. subtilis*, e as demais proteínas secretadas, emergem através da membrana e encontram a parede celular, uma

macromolécula semiporosa altamente reticulada composta de peptidoglicano e ácido teicóico. A translocação subsequente através da parede celular exige uma dobradura rápida e eficiente e em sua conformação nativa, a fim de impedir a ação proteolítica das proteases associadas à parede celular e minimizar as interações com os seus componentes (BABÉ; SCHMIDT, 1998; CHAMBERT; PETIT-GLATRON, 1999).

Estudos de Mantsala e Puntala (1982) apontaram que levanasacarase de *B. subtilis* é produzida durante a fase de crescimento microbiano e a mutação no gene *SacU<sup>h</sup>* pode afetar a sua produção. Cerca de 1 a 2% do total de levanasacarase sintetizada permanece associada à membrana celular, e essa associação pode ser um passo intermediário na sua secreção. Fouet et al. (1984) caracterizaram a forma precursora da levanasacarase de *B. subtilis* e identificaram três genes estruturais, especificamente induzidos pela sacarose. Um deles, *sacB*, codifica a levanasacarase extracelular e dentre os cinco *loci* regulatórios conhecidos, quatro controlam a expressão de *sacB*.

A estrutura protéica consiste em um polipeptídeo de forma elipsóide compacta e embora a maioria se apresente na forma monomérica, com massa molecular entre 46-73 kDa, pode se apresentar na forma dimérica, com massa molecular entre 90 e 120 kDa, como as produzidas por *Rahnella. quatis* JCM-1683 e *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FCM. A faixa de pH ótimo da levanasacarase sintetizada pela maioria dos micro-organismos varia entre 2,6 e 5,0, porém algumas espécies apresentam outras faixas de pH, e os valores de Km variam entre 4,0 e 160,0 mmol<sup>-1</sup>. As propriedades cinéticas gerais da enzima de alguns micro-organismos produtores estão descritos na Tabela 1 (GONZY-TREBOUL; CHAMBERT; DEDONDER, 1975; MANTSALA; PUNTALA, 1982; VELÁZQUEZ-HERNANDEZ et al., 2009).

Muitos micro-organismos são produtores de levanasacarase, entre estes o *B. subtilis* tem sido estudado por degradar a sacarose e catalisar a formação de cadeias de levana de alta e baixa massa molecular, de acordo com as condições experimentais (EUZENAT et al., 1997). Segundo Bekers et al., 2003 os micro-organismos produtores de levanasacarase mais estudados têm sido *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis*, devido à capacidade de sintetizá-la na forma induzida e secretá-la no meio extracelular, diferente do *Aerobacter levanicum*, cuja enzima é constitutiva e intracelular.

**Tabela 1** – Propriedades cinéticas das levanasacarases de diferentes micro-organismos.

Organismo	Sub†	Produto‡	M <sub>m</sub> (kDa)	T§ (°C)	pH§	Km Sac <sup>γ</sup>	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	Sac	Len	75,0	30	5,5	4,0	Gay et al., 1983; Van Hijun et al., 2000 Abdel-Fattah et al., 2005
			56	50	6,0	16,7	Ammar et al., 2002
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Sac	Len, 1-k	nd	30	nd	Nd	Bezzate et al., 2000
<i>Bacillus megaterium</i>	Sac	Len, 1-k, 6-k, nis, blastose neoquestose	52,0	45	nd	6,6	Homann et al., 2007
<i>Erwinia amylovora</i>	Sac	Len	46,0	28	4,0	Nd	Geier e Geider, 1993
<i>Gluconobacter diazotrophicus</i>	Sac	Len, 1-k, nis	58,0	30	5,5	11,8	Hernández et al., 1995
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Sac	Len, 1-k	73,0	35	nd	13,1	Tieking et al., 2005
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Sac	Len	90,0	30	nd	36,7	Morales-Arrieta et al., 2006
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Sac	Len	103,0	30	nd	26,6	Kang et al., 2005
<i>Pseudomonas s. phaseolicola</i>	Sac	Len	45,0	18	3,5	160,0	Hettwer et al., 1995
<i>Rahnella aquatilis</i>	Sac	Len	120,0	60	nd	50,0	Ohtsuka et al., 1992
<i>Zymomonas mobilis</i>	Sac	Len	56,0	50	2,6	122,0	Yanase et al., 1992
			58,0	50	5,5	Nd	Yanase et al., 1995
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Sac, raf	Len	63,8	50	nd	21,0	Van Hijum et al., 2004
	Sac		90,0	nd	nd	7,0	Van Hijum et al., 2001

**Fonte:** Velázquez-Hernandez et al. (2009) modificado.

\* Lev, levanasacarase

† Sub, substrato; Sac, sacarose; raf, rafinose

‡ Len, levana; 1-k, 1-kestose; 6-k, 6-kestose; nis, nistose

§ T e pH indicam valores ótimos de temperatura e pH

γ Os valores de Km são expressos em mmol L<sup>-1</sup>

Nd, não demonstrado

Ammar et al. (2002) e Gorrec et al. (2002) reportaram que a atividade da levanasacarase está envolvida em uma variedade de processos, como sobrevivência da bactéria no solo (*B. subtilis*), fitopatogênese (*Erwinia* e *Pseudomonas*) ou simbiose (*B. polymyxa*) e que esta enzima possui três atividades: frutossiltransferase, hidrolase e polimerase, produzindo frutose, glicose, 1-kestose, fruto-oligossacarídeos (FOS) e levana por reação de transfrutossilacção com liberação de resíduo de glicose.

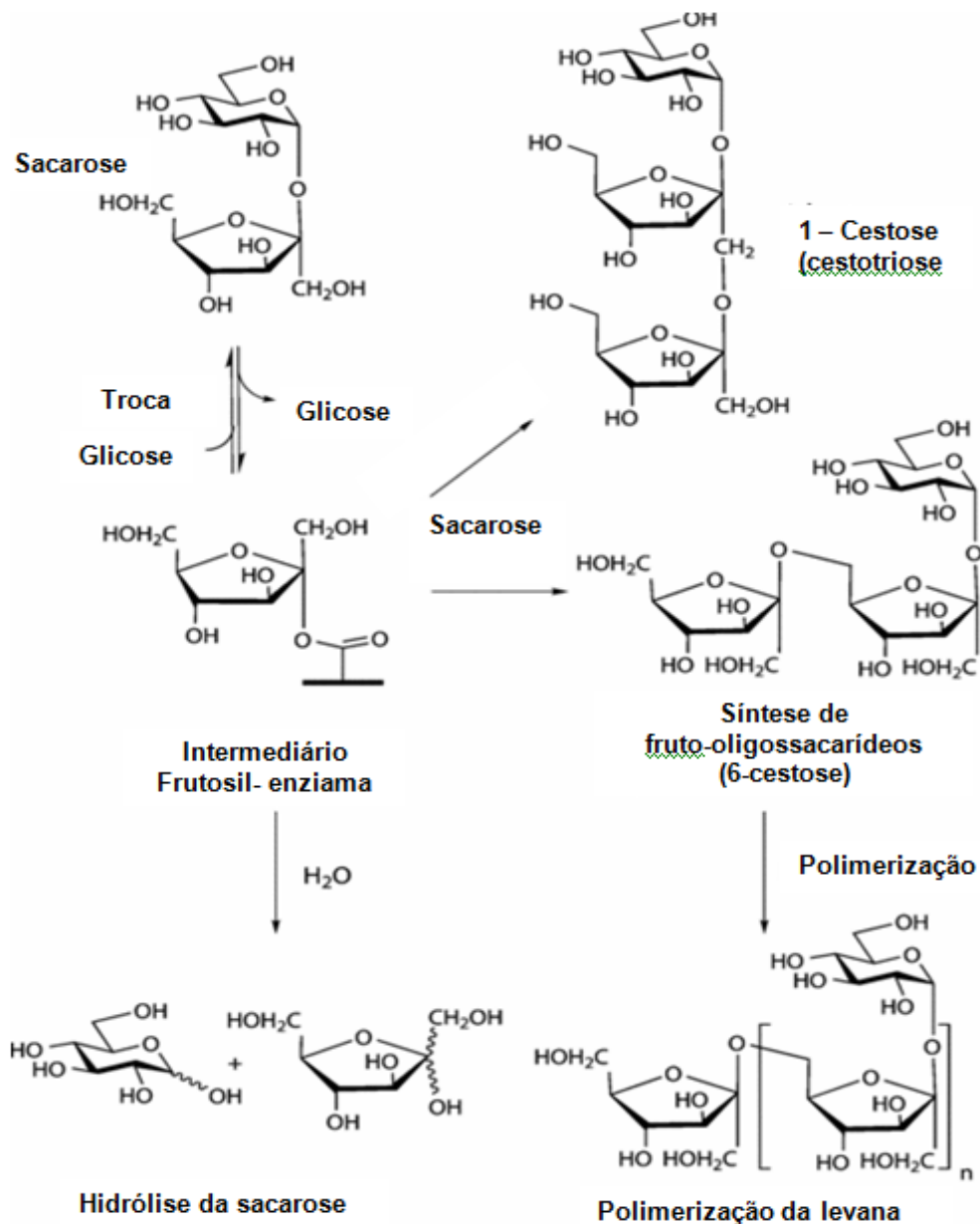
A atividade frutossiltransferase é caracterizada pela transferência de resíduos frutossil da sacarose para uma variedade de aceptores que, de acordo com as condições experimentais adotadas, podem ser: água, durante a hidrólise da sacarose; glicose, promovendo a troca de [ $^{14}\text{C}$ ]glicose na reação frutose-2,1-glicose + [ $^{14}\text{C}$ ]glicose a frutose-2,1-[ $^{14}\text{C}$ ]glicose + glicose; sacarose, durante a síntese de mono-, di-, oligossacarídeos ou levana, durante a reação de polimerização e alcoóis (MARTINEZ-FLEITZ et al., 2005).

Dedonder (1966) estudou a especificidade da levanasacarase considerando a transferência de resíduos, doadores e aceptores. Os resíduos de frutose normalmente são transferidos por todas as levanasacarases, no entanto, a enzima do *B. subtilis*, produzida na forma induzida e secretada no meio extracelular, é capaz de transferir L-sorbose ou D-xilulose, propriedade não encontrada na levanasacarase de *Aerobacter levanicum*, produzida de forma constitutiva e endocelular. Somente as moléculas dotadas de um grupo frutossil não substituído ligado a um grupo aldose pela mesma ligação glicosídica como a sacarose pode atuar como um doador. Sacarose e rafinose foram os primeiros doadores conhecidos para levanasacarase. Na molécula de sacarose, o resíduo de glicose pode ser substituído por D-xilose, L-arabinose, D-galactose, lactose, ácido, melibiose, ácido glucurônico. Substâncias com grupos alcoólicos podem agir como aceptores de metanol e glicerol, para oligossacarídeos como a trealose ou cestosos. No entanto, cadeias de levana são iniciadas apenas por compostos que possuem frutose não reduzida como resíduo terminal, com sua hidroxila livre no carbono 6. No início da polimerização da levana séries de trifrutosídeos são *primers* eficientes, e o grau de eficiência do *primer* aumenta com o grau de polimerização.

As atividades hidrolase e polimerase da levanasacarase também foram estudadas por este autor através da catálise da reação de transfrutosilação da sacarose ou rafinose para água ou para a levana, respectivamente, em meio aquoso. Sob as condições usuais da transformação da sacarose, a taxa da atividade polimerase é menor do que a atividade de hidrolase e na presença de sacarose a sua ação sempre leva à formação de frutose na forma livre ou polimerizada a oligossacarídeos e levana. A levanasacarase apresenta a atividade de hidrólise frente a cadeias pequenas de levana e esta ação hidrolítica é finalizada quando a enzima atinge os pontos de ramificação.

A síntese de levana tem início com a reação de transfrutossilação, onde a molécula de sacarose desempenha o papel de doador de frutossil e uma segunda molécula de sacarose, de acceptor inicial do resíduo de frutossil. O ataque da sacarose pode ocorrer via oxigênio 1, sintetizando 1-cestose ou via oxigênio 6, sintetizando 6-cestose. A 6-cestose é formada por pontes  $\beta(2\rightarrow6)$ , e pode ser polimerizada a levana (Figura 1) (MARTINEZ-FLEITZ et al., 2005).

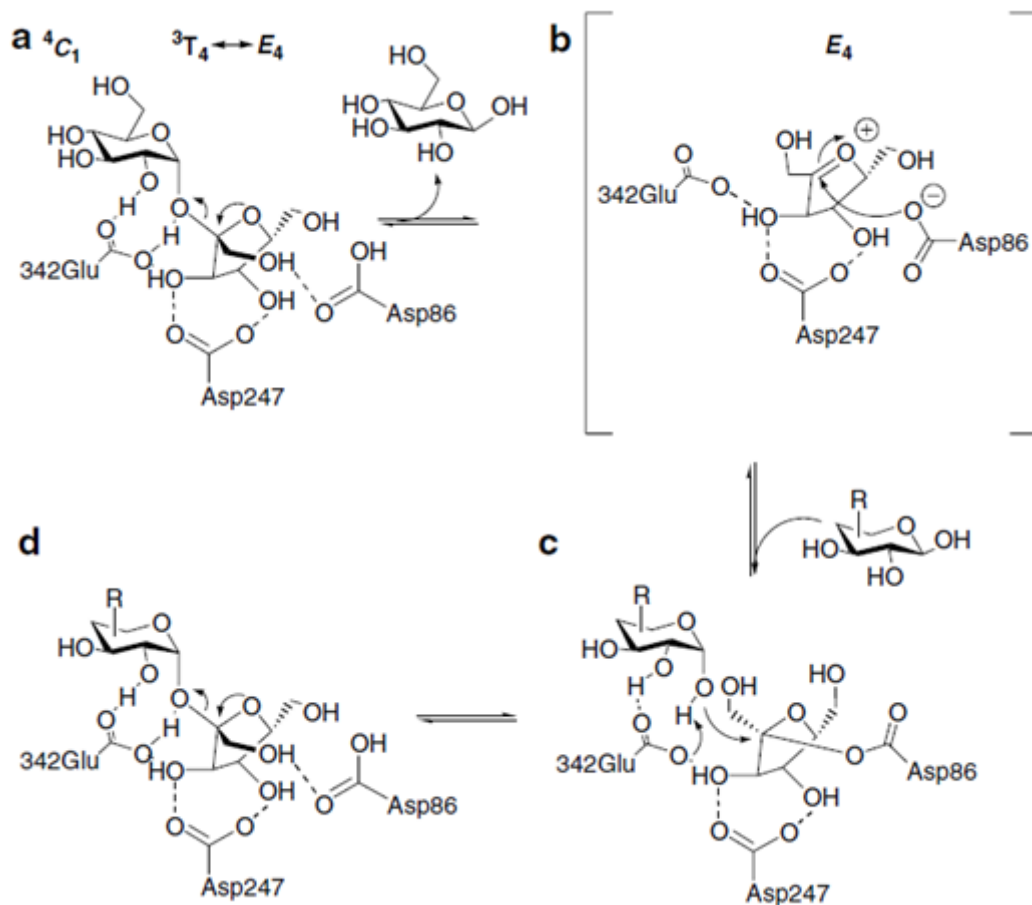
**Figura 1** – Reações catalisadas pela levanasacarase para formação de trioses e levana



Fonte: Martinez-Fleitz et al. (2005).

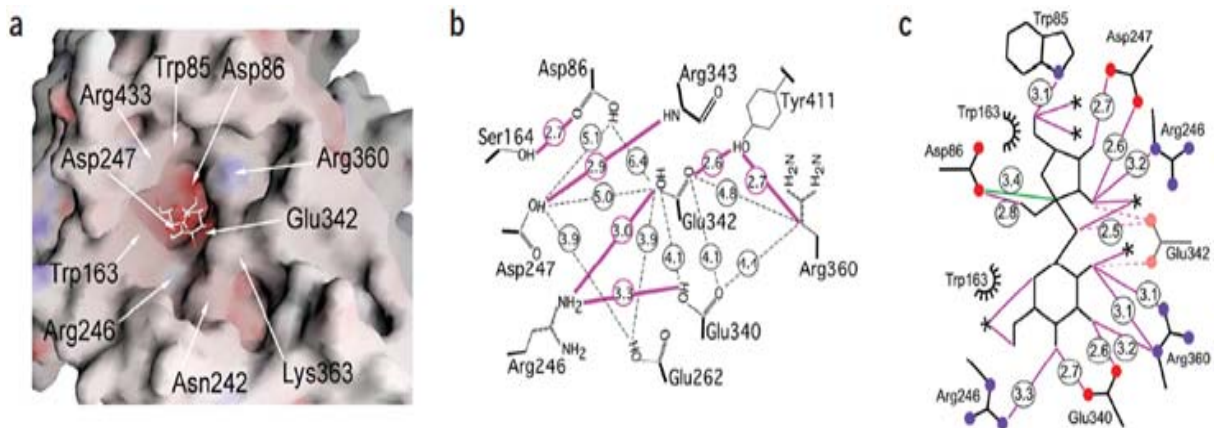
Estudos de Chambert e Gonzy-Tréboul (1974, 1976) sobre o mecanismo de ação da levanasacarase confirmaram a hipótese do mecanismo Ping-Pong e o envolvimento de um complexo intermediário formado entre a enzima e o resíduo frutossil. Estes autores deduziram a partir do mecanismo Ping-Pong, a cinética das atividades de transferase e hidrolase, de forma que a alta energia da ligação glicosídica da sacarose é preservada no intermediário frutossil-enzima (Figura 2). O estudo da dependência da temperatura pelas constantes de frutossilização e desfrutossilização da enzima mostraram que a entropia de ativação para as duas etapas de desfrutossilização é quase a mesma, entretanto a entalpia de ativação para a etapa de transfrutossilização para a água é maior do que para a glicose.

**Figura 2** – Mecanismo de ação de polimerização de levana pela levanasacarase. (a) Coordenação da sacarose no sítio ativo da enzima. (b) Liberação da D-glicose, formação de um íon reativo oxocarbanio e ataque pelo resíduo Asp 86 da enzima. (c) Complexo covalente frutossil-enzima, substituído pelo acceptor para formar um análogo de sacarose. (c) Coordenação do análogo da sacarose no sítio ativo da enzima.



Os estudos de Martínez-Fleites et al. (2005) sobre a estrutura cristalina da levanasacarase de *B. subtilis* revelaram que resíduos ácidos de aminoácidos localizados no sítio ativo são importantes para o reconhecimento do substrato. A cadeia da enzima é formada por cinco porções em conformação  $\beta$  que é fundamental para a atividade catalítica das enzimas membros da família das hidrolases 68. A estrutura do complexo sacarose-levanasacarase sugere que Asp86 e Glu342 formam um par essencial ao sítio ativo, característico da maioria das glicosil hidrolases, enquanto Asp 247, embora seja necessária para a catálise, não parece estar diretamente envolvida no mecanismo da reação química. A análise química da reação de clivagem do intermediário indica que o resíduo aspartil forma uma ligação covalente com o resíduo frutossil ligado à enzima. O mecanismo de reação canônico demonstra que Asp86 e Glu242 precisam estar em diferentes estágios de protonação durante a ligação com o substrato (MENG; FUTTERER, 2003). Na Figura 3 observa-se o sítio ativo da levanasacarase e as interações entre os aminoácidos e a sacarose.

**Figura 3** – Sítio ativo da levanasacarase: (a) visão superior da enzima (b) distância interatômica entre os resíduos do sítio ativo. As distâncias são representadas pelas linhas descontinuas e as pontes de hidrogênio pelas contínuas. (c) Contato entre a sacarose e a levanasacarase. As moléculas de água são representadas por asteriscos e observa-se a interação putativa da GLU342 com sacarose.



Fonte: Meng e Futterer (2003)

Estudos de Vigants et al. (1996) comprovaram que a adição de NaCl e KCl ao meio de cultivo contendo sacarose estimula a biossíntese de levana devido a influência direta do sal na ativação gênica, com um aumento na síntese de

levanasacarase. Vigantes et al. (1998) observaram que ocorreu o estímulo da síntese de levana pelo NaCl na fermentação da sacarose com *Z. mobilis*. A ativação da reação catalisada pela enzima foi inversamente proporcional a concentração do substrato quando o sal estava presente, concluindo que os sais de sódio e potássio foram ativadores heterotrópicos em concentrações baixas de sacarose.

### 3.2 PRODUÇÃO DE LEVANASACARASE

O efeito de diferentes condições de fermentação na produção da levanasacarase tem sido objeto de estudo de vários autores, considerando as importantes aplicações. O primeiro estudo de produção e purificação de levanasacarase de *B. subtilis* encontrado foi publicado em 1966, por Dedonder. Na década de 80, Lyness e Doelle (1980, 1981, 1983) realizaram uma série de estudos relacionados a produção de levanasacarase por *Z. mobilis* e os resultados demonstraram que a taxa de hidrólise de sacarose foi dependente da temperatura, concentração de sacarose e pH. Cote (1988) investigou a produção de levanasacarase por *Erwinia herbicola* NRRL B-1678 e testou o efeito de várias fontes de carbono (sacarose, glicose, frutose, sorbitol e manitol) e fontes de nutrientes industrializadas (caldo nutriente desidratado e milhocina) na secreção da enzima. Os resultados indicaram que este micro-organismo apresentou crescimento reduzido quando foi empregado frutose como fonte de carbono, e conseqüentemente uma redução da produção de levanasacarase. Quando foi utilizada glicose, a atividade da levanasacarase atingiu o valor máximo após o a fase estacionária, e no fim da fermentação a atividade chegou a zero. As demais fontes de carbono apresentaram comportamento parecido, mas o declínio da atividade não foi tão acentuado quanto para a glicose. Os maiores níveis de levanasacarase foram produzidos em meio de cultivo composto por milho macerado e sorbitol, com atividade de aproximadamente  $0,7 \text{ U mL}^{-1}$ , seguido do meio composto por frutose em caldo nutriente ou milho macerado, com atividade de cerca de  $0,30$  e  $0,35 \text{ U mL}^{-1}$  respectivamente. A produção de levanasacarase foi idêntica em presença de manitol e sorbitol. A sacarose não foi necessária para a secreção extracelular de enzimas.

Abdel-Fattah, Mahmoud e Esawy (2005) estudaram a produção de levanasacarase extracelular na forma induzida e constitutiva de *B. subtilis* NRC33a usando sacarose e glicose como fonte de carbono, obtendo atividades de  $14,5$  e

14,1 U mL<sup>-1</sup> respectivamente. A produção da enzima, na ausência de levana, evitando o aumento de viscosidade do meio de cultivo foi melhor quando utilizado glicose na concentração de 10%. A temperatura ótima para a produção de levanasacarase foi de 30° C. Dentre as diferentes fontes de nitrogênio testadas (soja, milho macerado, levedura de panificação, trigo, peptona, caseína, uréia e sulfato de amônio), o meio de cultura contendo levedura de panificação apresentou a maior produção de levanasacarase extracelular. A maior atividade (17,5 U mL<sup>-1</sup>) foi encontrada quando empregado levedura de panificação. A adição de 0,02% de N<sub>2</sub>, aumentou a atividade para 18 U mL<sup>-1</sup> e de 0,15 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> e 5,0 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, para 19,5 U mL<sup>-1</sup>. A massa molecular da levana produzida apresentou variações entre 49,91 e 56,8 KDa com o aumento da concentração de enzimas de 5 para 1000 µg mL<sup>-1</sup>. A massa molecular do polissacarídeo também sofreu influência da concentração de sacarose, apresentando redução com o aumento da concentração de sacarose até 40%, e da temperatura, sendo que as cadeias de levana com maior massa molecular foram sintetizadas a 15° C (58,52 kDa), reduzindo com o aumento de temperatura. O tempo de reação não influenciou a massa molecular da levana.

O uso de resíduos agrícolas também foi avaliado para a produção da enzima. Ahmed (2008) estudou a produção de levanasacarase por *Bacillus megaterium* por fermentação em estado sólido, utilizando como substratos cascas de laranja e de limão e resíduos de serragem, banana e farelo de trigo. A produção máxima de enzima foi de 140,54 U g<sup>-1</sup> de substrato sólido seco, obtida a partir de 5 g de serragem umedecida com 55 mL do meio de cultivo com pH inicial 6,0, após 72 h de incubação a 30 °C em condição estática. Para extrair a enzima da biomassa fermentada foram testados: água destilada, água de torneira, soluções de sais inorgânicos (cloridrato de potássio, magnésio, cálcio e sódio) em diferentes concentrações (0,025; 0,05; 0,075; 0,1 e 0,125 %) e solventes orgânicos (glicerol, metanol, etanol e acetona) a 5%, variando a temperatura entre 20 e 60°C e o tempo de extração entre 30 e 180 min, na ausência e na presença de agitação (160 rpm). A máxima extração da enzima foi alcançada com água destilada, correspondendo a 10 mL g<sup>-1</sup> de biomassa após 90 min de imersão a 40 °C e 160 rpm.

El-Refai, Abdel-Fattah e Mostafa (2009) produziram levanasacarase de *Bacillus circulans* em meio composto por levedura de panificação, sacarose e sais de magnésio e fosfato, pH 5,2 e incubação por 72 h a 30° C, em mesa agitadora

orbital. A enzima, parcialmente purificada, apresentou atividade específica de 16,82 U mg<sup>-1</sup> de proteína e após a imobilização em lã, por adsorção física, houve um aumento da massa molar da levana produzida, apresentando variação entre 35,5 e 38,5 kDa, com o aumento da concentração de enzimas adicionadas ao meio reacional. Na maior concentração de sacarose (32%) houve a produção de levana com massa molecular mais baixa, cerca de 5 kDa, e na menor (5%) a levana obtida apresentou massa molecular superior a 35 kDa. A temperatura e o tempo foram considerados fatores importantes, uma vez que a levana de maior massa molecular (38 kDa) foi obtida a 30° C, havendo um decréscimo gradual com o aumento de temperatura, e entre 6 h e 24 h houve um aumento na massa molar de 10 para 38 kDa. Após 24 h, o tempo de reação não teve influência na massa molar da levana produzida.

Esawy, et al. (2011) isolaram seis cepas de *B. subtilis* a partir de amostras de mel e testaram quanto a produção de levanasacarase variando concentração de sacarose (8 a 12%), temperatura (37 a 40 °C), tempo (24 a 28 h), agitação (50 a 100 rpm), pH (6,0 a 7,0) e NaCl (0 a 4%). Foi determinada a massa molecular da levana produzida e testada a sua atividade antiviral. As maiores atividades foram 62 e 59 U mL<sup>-1</sup> e produções de levana, 11 e 16,25 g L<sup>-1</sup>. A presença do sal aumentou a produção da enzima por todas as cepas em até 3 vezes, mas reduziu a de levana em 40 a 50%. A massa molecular da levana variou entre 14.200 e 154.638 KDa e apresentou atividade antiviral.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LEVANASACARASE

O estudo das condições de fermentação na atividade das enzimas é de grande importância, pois as enzimas sofrem os mesmos efeitos estruturais observados nas proteínas globulares devido a variações do pH e da temperatura. Alterações extremas de pH podem influenciar a estrutura da enzima, devido a uma repulsão entre as cargas elétricas, enquanto alterações mais brandas podem levar a uma dissociação das cadeias das enzimas oligoméricas, influenciando a sua função. As enzimas apresentam pH e temperatura ótimos para desempenhar a sua atividade (WILLIAMS; JONES; WATTING, 1976)

Segundo Dedonder (1966) e Tanaka, et al. (1978) o pH ótimo descrito para atividade da levanasacarase de *B. subtilis* está em torno de 6,0. A faixa

de estabilidade da enzima situa-se em pH entre 3,5 e 7,5. A velocidade de reação cai 50% nos pHs 4,4 e 7,5.

Lynes e Doelle (1983) purificaram parcialmente levanasacarase de *Z. mobilis*, a partir de extrato livre de células tratado com sulfato de protamina por cromatografia de troca iônica em DEAE-trisacryl, obtendo um rendimento de 11%. A enzima foi totalmente inibida por glicose a 30 mM e etanol a 1,6 M.

Chambert e Petit-Glatron (1989) estudaram o efeito de solventes orgânicos na síntese de levana e na hidrólise de sacarose pela levanasacarase de *B. subtilis*. Os resultados indicaram que a enzima é mais ativa em meio reacional com restrição de água pela adição de solventes como acetona, acetonitrila, dimetilsulfóxido e 1,4-dioxano do que em meio aquoso. Neste meio reacional, quando usada sacarose ou rafinose como doadores de frutossil, a enzima não apresentou atividade hidrolase, somente polimerase, produzindo levana de cerca de  $10^6$  Da.

Yanase et al. (1992) purificaram levanasacarase extracelular de *Z. mobilis* Z6C. A enzima foi precipitada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  entre 0 e 50% de saturação, dissolvida em tampão fosfato pH 7,0 e dialisada. A solução enzimática foi submetida à cromatografia em coluna DEAE-Toyopearl 650 M e equilibrada com o mesmo tampão e eluída com NaCl de 0 a 0,5 M. As frações com maior atividade foram reunidas e purificadas em coluna Toyopearl 55 W, equilibrada com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 6,0 suplementada com 0,2 M NaCl. A homogeneidade foi obtida por PAGE nativa e SDS-PAGE. O massa molecular da enzima foi estimado em 94.000 por filtração em gel em Sephadex G-200 e 56.000 por SDS-PAGE. O pH ótimo para atividade enzimática foi em torno de 5,0 e a temperatura ótima 50° C. A enzima se manteve estável entre os pHs 3,5 e 6,0 em 24 h a 30° C.

Vigants, Hicke e Marx (2001) purificaram levanasacarase de *Z. mobilis* ligada a membrana após precipitação com 0,1  $\text{MnCl}_2$  e purificação por ultra-filtração e cromatografia de troca aniônica. A enzima nativa formou agregados com massa molecular de  $10^6$  Da, e a SDS-PAGE desnaturante forneceu uma massa molecular de 50 kDa por unidade.

Devido às diferentes origens, as levanasacarases descritas até o momento diferem amplamente quanto a suas características e propriedades. Algumas são termoativas, como as provenientes do *Zymomonas mobilis*, *Rahnella aquatilis* JCM-1683 e *Pseudomonas syringae*, entretanto a temperatura ótima para

produção de levana não é tão alta quanto à necessária para atividade de hidrólise. A temperatura ótima para atividade da levanasacarase termoestável de *Bacillus* sp TH4-2 estudado por Ammar et al. (2002), foi 60° C, enquanto a temperatura para a produção de levana foi 50° C .

Vigants et al. (2003) purificaram levanasacarase extracelular de *Z. mobilis* adicionando ao meio de cultivo, após o período de fermentação, um preparado comercial de enzimas capazes de clivar polímeros de frutose (Fructozyme) por 48 h, levando a formação de agregados e precipitação da levanasacarase. Os agregados foram redissolvidos em solução de uréia 3 M. As impurezas foram removidas por cromatografia de exclusão (Sephacryl S-300) e a pureza foi confirmada por SDS-PAGE, onde a enzima apresentou massa molecular de 48 kDa. A maior atividade da levanasacarase foi observada durante a fase logarítmica de crescimento (15 - 19 h de fermentação).

El Refai, Abdel-Fattah e Mostafa (2009) estudaram a estabilidade da levanasacarase de *B. circulans* nas formas nativa e modificada por glicosilação. A enzima glicosilada apresentou cerca de 56,87% da atividade específica da enzima ativa. O pH ótimo para ambas as enzimas foi de 5,2. A temperatura ótima variou para as duas formas, sendo 35° C o valor ótimo para enzima nativa e 40° C para a conjugada, que apresentou 30% da atividade quando incubada a 60° C, enquanto a enzima nativa foi completamente inibida.

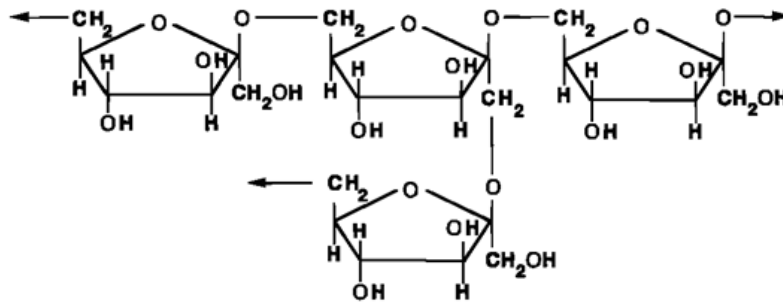
### 3.4 PRODUÇÃO DE LEVANA POR LEVANASACARASE

A levana foi identificada pela primeira vez pelos pesquisadores Greig - Smith em 1901 através de observações de soluções contendo sacarose, como caldo-de-cana, onde um micro-organismo do gênero *Bacillus* produzia uma goma, deixando o meio viscoso. Esta goma recebeu o nome de levana, por desviar o plano da luz polarizada para a esquerda, em analogia a dextrana, uma goma já conhecida na época.

É um exopolissacarídeo formado de unidades de frutose unidas por ligações frutofuranosídicas  $\beta$ -(2→6) na cadeia linear (Figura 4), podendo apresentar diversos graus de ramificação com ligações  $\beta$ -(2→1) e diferentes massas moleculares, reguladas pela força iônica do meio (Tanaka, Oi, & Yamamoto, 1979). É produzida por bactérias específicas, como *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*,

*Erwinia herbicola*, *Streptococcus salivarius* e *Zymomonas mobilis*, que crescem em meio de sacarose pela reação de transfrutoseilação da levanasacarase (AMMAR et al., 2002; TANAKA et al., 1978; ANANTHALAKSHMY; GUANASEKARAN, 1999a, 1999b). Corresponde ao maior subproduto na fermentação da sacarose por *Z. mobilis* (BEKERS et al., 2003).

**Figura 4** – Estrutura química de molécula de levana formada por ligações  $\beta$ -(2-6) na cadeia principal e ligações  $\beta$ -(2-1) nas ramificações.



**Fonte:** Simms; Bokyo; Edwards (1990)

Propriedades reológicas da levana como solubilidade em água, baixa viscosidade intrínseca ( $\eta = 0,17 \text{ dL g}^{-1}$ ) e alta força de tensão de 991 psi tornam-na um polímero muito compacto que pode ser responsável pela agregação celular, tolerância ao *stress* osmótico e dessecação (VELÁZQUEZ-HERNANDES et al., 2011).

Segundo Bekers et al. (2005), características como viscosidade, solubilidade em água e óleo, propriedades de suspensão e reológica, compatibilidade com sais e surfactantes, estabilidade ao calor, a ácidos e a bases, capacidade de formação de filme, de retenção de água e de produtos químicos, propriedades biológicas para ser utilizada como agente estabilizador, emulsificante, espessante, encapsulante, osmoregulator e crioprotetor tornam a levana atraente para aplicação em muitos campos. A massa molecular da levana obtida por síntese microbiana ou enzimática é estimada em cerca de  $2,5 \times 10^6 \text{ Da}$ , variando de acordo com o micro-organismo produtor e as condições de produção. Na área terapêutica tem sido utilizada devido a sua ação antiviral (Esawy et al. 2011), atividade antidiabética (Dahech et al., 2011) e antitumoral (Leibovici et al., 1975, Yoo et al., 2004), que está relacionada a massa molecular da cadeia (Calazans et al., 2000). Para obter levana preparação para médicos uso, é necessário purificar o sedimento

levana e investigar sua estabilidade frente a diferentes valores de pH e temperaturas.

Tanaka et al. (1978) investigaram o efeito de diferentes concentrações de sacarose (1, 5 10 e 20%) na síntese de levana pela levanasacarase de *B. subtilis* a 4° C por 10 dias. A síntese de levana foi mais eficiente nas maiores concentrações. Temperaturas mais baixas favoreceram a síntese de levana e temperaturas mais altas, a hidrólise de sacarose.

Ananthalakshmy e Guanasekaran (1999b) isolaram dois mutantes de *Z. mobilis* B4286 superprodutores de levana, ZML1 e ZML2 e compararam com a cepa parental. Nas primeiras 8 h de fermentação, a velocidade de hidrólise de sacarose foi alta para as três cepas (cerca de 13 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e a velocidade de produção de levana foi baixa: 0,58 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para ZML1; 0,40 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para ZML2 e 0,18 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para a cepa parental. Entre 8 e 16 h de fermentação, a velocidade de hidrólise de sacarose diminuiu para 2,38 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e a velocidade de produção de levana dos mutantes alcançou valores de 1,72 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 1,68 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, enquanto a cepa parental produziu somente 0,69 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. A produção máxima de levana pelos mutantes foi atingida com 24 h de fermentação, correspondendo a 21,6 e 20,0 g L<sup>-1</sup>, com atividade de levanasacarase de 30,6 e 36,0 U mg<sup>-1</sup> e atividade de hidrólise de 68,0 e 71,0 U mg<sup>-1</sup>, enquanto a cepa parental produziu 16 g L<sup>-1</sup> com atividade de 12,6 e 55,7 U mg<sup>-1</sup>.

Abdel-Fattah, Mahmoud e Esawy (2005) analisaram o efeito da concentração de enzimas na produção de levana ou oligossacarídeos. Concentrações maiores de enzima produziram maiores quantidades de levana, onde a conversão de frutose em levana sofreu um aumento de 84% quando usados 1000 µg mL<sup>-1</sup> de enzimas.

Bekers et al. (2005) estudaram a estabilidade da levana produzida por *Z. mobilis* 113 "S" durante o estoque de culturas líquidas em diferentes valores de pH e temperatura. A levana foi estável na cultura líquida durante 120 h, entre 25 e 30° C e pH acima de 3,7. Nas temperaturas entre 55 e 60° C, durante 120 h de estocagem, cerca de 90% da levana foi degradada em pH 3,95 e 70% em pH 4,5, logo o grau de degradação foi inversamente proporcional ao pH. A partir do estudo concluíram que a degradação da levana, em cultura líquida a altas temperaturas, é resultado da hidrólise ácida a partir dos ácidos orgânicos produzidos pelo *Z. mobilis*,

que reduzem o pH e em baixas temperaturas a levana pode ser utilizada como fonte de carbono.

Matulová et al., 2011 incubaram *Bacillus* sp. 3B6 em meio de sacarose para produção de exopolissacarídeo (EPS). O meio de cultivo foi dialisado e o tampão e o meio de cultivo após a diálise foram analisados por cromatografia de exclusão. Segundo as análises de RMN realizadas para a caracterização do EPS foram observados levana, FOS e inulina com diferentes graus de polimerização (dp 2-7), além de frutose e glicose (9:1). A levana produzida apresentou massa molecular de 3.500 e 100 kDa na proporção de 2,3:1 e as frações de dissacarídeo continham anidrido de difrutose, os trissacarídeos 1-cestose, 6-cestose e neocestose foram identificados na proporção de 2:1:3 e as frações com dp 4-7 eram misturas de FOS e inulina.

Calazans et al. (2000) estudaram a atividade antitumoral de levana produzida por *Z. mobilis* frente ao sarcoma 180, concluindo que a atividade é dependente de sua massa molecular e talvez de uma massa molecular específica.

A massa molecular da levana é alterada pela temperatura de incubação da enzima. Estudos de Ammar et al. (2002) demonstraram que a levanasacarase termoestável produziu levana de 8 kDa quando incubada a 50° C, e de 660 kDa e 6 kDa a 30° C .

### 3.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS MICROBIANOS UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL

A necessidade crescente da otimização de processos biotecnológicos minimizando custos e tempo e maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Estudos de produção de levana por *Z. mobilis* através de planejamento fatorial tem sido realizados por diversos autores. Borsari et al. (2006) analisaram a influência de diferentes substratos (caldo de cana: 50; 100 e 150 g L<sup>-1</sup> e sacarose: 0; 75 e 100 g L<sup>-1</sup>) e processos fermentativos (batelada e batelada alimentada) na produção de levana por delineamento fatorial completo 2<sup>3</sup>. A melhor condição para produção de levana foi 50 g L<sup>-1</sup> de caldo de cana e 150 g L<sup>-1</sup> de

sacarose por fermentação em batelada, obtendo 35,58 g L<sup>-1</sup> de levana, valor semelhante ao predito, 35,08%. Em um segundo experimento foi utilizada a fermentação em batelada, variando as concentrações de caldo de cana de açúcar: 0; 25 e 50 g L<sup>-1</sup> e sacarose: 50; 100 e 150 g L<sup>-1</sup>, e a maior produção de levana foi 40,14 g L<sup>-1</sup> com 150 g L<sup>-1</sup> de sacarose e fermentação em batelada, a adição de caldo de cana aumentou a biomassa, bem como a produção de etanol e sorbitol.

Oliveira et al. (2007) produziram levana empregando três delineamentos fatoriais. Para otimizar a concentração de açúcar (150; 250 e 350 g L<sup>-1</sup>) e o tempo de fermentação (12; 18 e 24 h) foi utilizado o planejamento fatorial completo 3<sup>2</sup>. Em um segundo planejamento 2<sup>4-1</sup> foram avaliados os efeitos dos constituintes do meio de cultivo (g L<sup>-1</sup>): extrato de levedura (0; 1 e 2), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0; 1 e 2); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0; 0,5 e 1) MgSO<sub>4</sub> (0; 0,25 e 0,5), fixando-se os parâmetros obtidos através do primeiro delineamento (tempo de fermentação: 24 h e concentração de sacarose: 250 g L<sup>-1</sup>). Em um terceiro planejamento 2<sup>5</sup> foram avaliadas a influência das fontes de carbono: melaço de cana e xarope de cana. Houve um decréscimo da produção de levana no meio contendo melaço (2,533 g L<sup>-1</sup>) quando comparado ao meio contendo sacarose comercial (21,685 g L<sup>-1</sup>) e xarope de cana (15,456 g L<sup>-1</sup>). Extrato de levedura e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foram significantes no meio contendo sacarose comercial e no meio contendo xarope, extrato de levedura e MgSO<sub>4</sub> foram significativos.

Melo et al. (2007) otimizaram a produção de levana empregando um fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup> para analisar a influência da concentração inicial de sacarose (150; 200 e 250 g L<sup>-1</sup>), temperatura (20, 25 e 30°C), concentração inicial de extrato de levedura (2,0; 3,5 e 5,0 g L<sup>-1</sup>), e agitação (50; 75 e 100 rpm), tendo como variáveis resposta levana, etanol e biomassa. A melhor produção de levana foi 14,67 g L<sup>-1</sup> nas condições 250 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 20 °C e 100 rpm e extrato de levedura variando entre 2,0 e 5,0 g L<sup>-1</sup>.

Borsari et al. (2010) utilizaram as variáveis independentes: ácido pantotênico (0,005 e 0,01 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (4 e 8 g L<sup>-1</sup>), cloreto de sódio (0,2 e 0,6 mol L<sup>-1</sup>) e técnicas de permeação em um planejamento 2<sup>4-1</sup> para a obtenção das variáveis resposta: levana, etanol, sorbitol e biomassa. A condição celular foi a variável que mais contribuiu para a síntese da levana, a formação de biomassa e etanol foram afetadas pelo cloreto de sódio e pela a condição celular e a permeabilização celular afetou significativamente a síntese de sorbitol.

Para otimizar a atividade da nattoquinase de *B. subtilis* Natto, Wang et al. (2009) realizaram um estudo preliminar, a partir de diferentes fontes de nitrogênio (farelo de soja, peptona de soja, glutamato de sódio, fosfato de amônio e extrato de levedura), carbono (açúcar cristal, maltose, sacarose, glicerol e glicose) e sais inorgânicos ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Foram selecionadas as fontes de nitrogênio e carbono: extrato de levedura, glicose e maltose e os sais inorgânicos  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , e empregados em um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  como primeiro passo para a otimização. Com base nos resultados  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e glicose foram empregados para encontrar a condição ótima. Através da análise da superfície de resposta, as condições ótimas das variáveis foram glicose: 0,065%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 0,0016% e  $\text{MgSO}_4$ : 0,0016% e a máxima atividade da nattoquinase encontrada foi 12,34 FU mL<sup>-1</sup>.

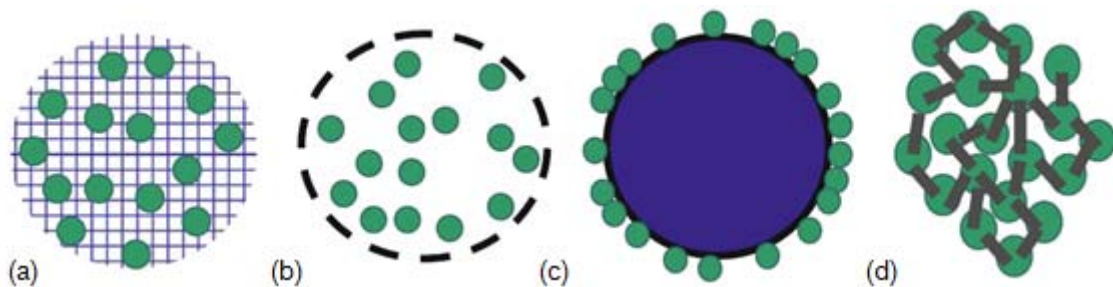
Vignoli et al. (2010) empregaram o planejamento fatorial completo no estudo da variação da produção de sorbitol relacionada com a concentração de sacarose, concentração de maltose e tempo de cultivo. Embora a adição de açúcares em concentrações de até 300 g L<sup>-1</sup> tenha aumentado a produção de sorbitol, valores maiores inibiram sua produção. O aumento do tempo de fermentação foi significativo na produção de sorbitol, entretanto pequenos acréscimos foram observados após 36 h.

### 3.6 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização é definida como a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico e tem se mostrado uma ferramenta muito útil e capaz de melhorar a maior parte das propriedades enzimáticas, como a atividade e seletividade (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009). A imobilização pode ser física, proporcionando interações fracas entre o suporte e as enzimas, como aprisionamento (a), microencapsulação com membrana sólida ou líquida (b), adsorção (física ou iônica) em uma matriz insolúvel em água (c), contenção de uma enzima dentro de um reator com membrana, formação de filmes enzimáticos Langmuir-Blodgett, ou químicas, conferindo interações fortes entre o suporte e as enzimas, como ligação covalente em uma matriz insolúvel em água (d), reticulação com utilização de um reagente multifuncional de baixa massa molecular e co-reticulação com outras substâncias neutras, como proteínas (MELLO; KUBOTA,

2002; BRADY; JORDAN, 2009). Alguns destes métodos estão ilustrados na Figura 5.

**Figura 5** – Formas de imobilização enzimática: (a) aprisionamento, (b) micro-encapsulação, (c) suporte sólido, (d) ligação cruzada. As enzimas estão representadas pelos círculos pequenos.



**Fonte:** Brady; Jordaan (2009)

Muitas enzimas com aplicações biotecnológicas têm sido imobilizadas para seu reaproveitamento em vários ciclos de produção. A quitosana tem sido um dos suportes mais estudados, porém outros materiais estão sendo investigados.

Chambert e Petit-Glatron (1993) imobilizaram levanasacarase de *B. subtilis* em matriz de hidroxiapatita como um possível modelo para o comportamento da enzima *in vivo* quando associada a matrizes como a parede celular da bactéria. Os autores estudaram suas propriedades catalíticas e demonstraram que houve um acréscimo na atividade polimerase e a produção de levana atingiu 85%, com aumento do  $K_{cat}$  e o  $K_m$  não sofreu alteração, o que permite a produção em grande escala de levana de cadeia ramificada e de alto peso molecular. A hidroxiapatita é uma boa matriz para imobilização da levanasacarase que é fortemente adsorvida sobre este gel de fosfato e é estruturalmente semelhante ao ácido teicóico, um polímero aniônico fosfatado presente na parede celular de bactérias Gram-positivas.

Jang et al. (2001) imobilizaram levanasacarase de *Z. mobilis* expressa em *E. Coli* em superfície de magnetita. A estabilidade térmica da enzima imobilizada foi maior do que a forma livre, entretanto apresentou uma atividade de polimerização menor na formação da levana, fornecendo um produto de baixa massa molecular. A levanasacarase imobilizada deteve 61% da atividade original após 5 medições.

Santiago-Hernández et al. (2006) imobilizaram em Avicel (celulose cristalina) uma invertase extracelular de *Z. mobilis* geneticamente modificada super expressa por *E. coli*. O pH ótimo para ambas as enzimas, imobilizada e livre foi o mesmo, mas a temperatura ótima e o  $K_m$  observados para a enzima imobilizada foram menores do que para a forma livre.

Tan, et al. (2008) prepararam um hidrogel com nanopartículas de bromelina imobilizada em carboximetilquitosana ácido linoléico modificada e constataram melhora na estabilidade da enzima frente ao calor e ao armazenamento.

Esawy, Mahmoud e Fattah (2008) imobilizaram levanasacarase de *B. subtilis* NRC33a parcialmente purificada em diferentes suportes, a partir de diferentes métodos. Para a imobilização por ligação iônica e adsorção física os autores empregaram como suportes: triacetato de celulose, DEAE-celulose-53, Dowex-IXD, Sephadex A-50, Alumina, asbestos, álcool polivinílico e quitosana e as maiores taxas de imobilização foram em DEAE-celulose-53 (72,55%) e Sephadex A-50 (55,11%). Para a imobilização por aprisionamento foram empregados ágar, agarose e alginato de cálcio. Os autores notaram que o aumento gradual da concentração do suporte envolvido resultou em decréscimo da eficiência do aprisionamento, provavelmente devido a redução da porosidade e do limite de difusão e a melhor taxa de imobilização foi em agarose (cerca de 40%). A maior taxa de imobilização foi conseguida em quitosana e glutaraldeído 3%, por ligação covalente (81,51%). Os estudos apontaram também decréscimos na atividade enzimática após a imobilização.

El-Refai, Abdel-Fattah e Mostafa (2009) imobilizaram levanasacarase de *B. circulans* por adsorção física em lã. A atividade relativa da enzima imobilizada foi de 55,20%  $g^{-1}$  de suporte e a atividade específica, calculada com base nas proteínas ligadas, foi de 78,12% em relação às enzimas livres (solúveis). Comparando com a forma livre, a enzima imobilizada revelou temperatura ótima de reação mais elevada, baixa energia de ativação,  $K_m$  mais alto e  $V_{max}$  reduzido. A preparação enzimática demonstrou termoestabilidade e resistência à desnaturação química.

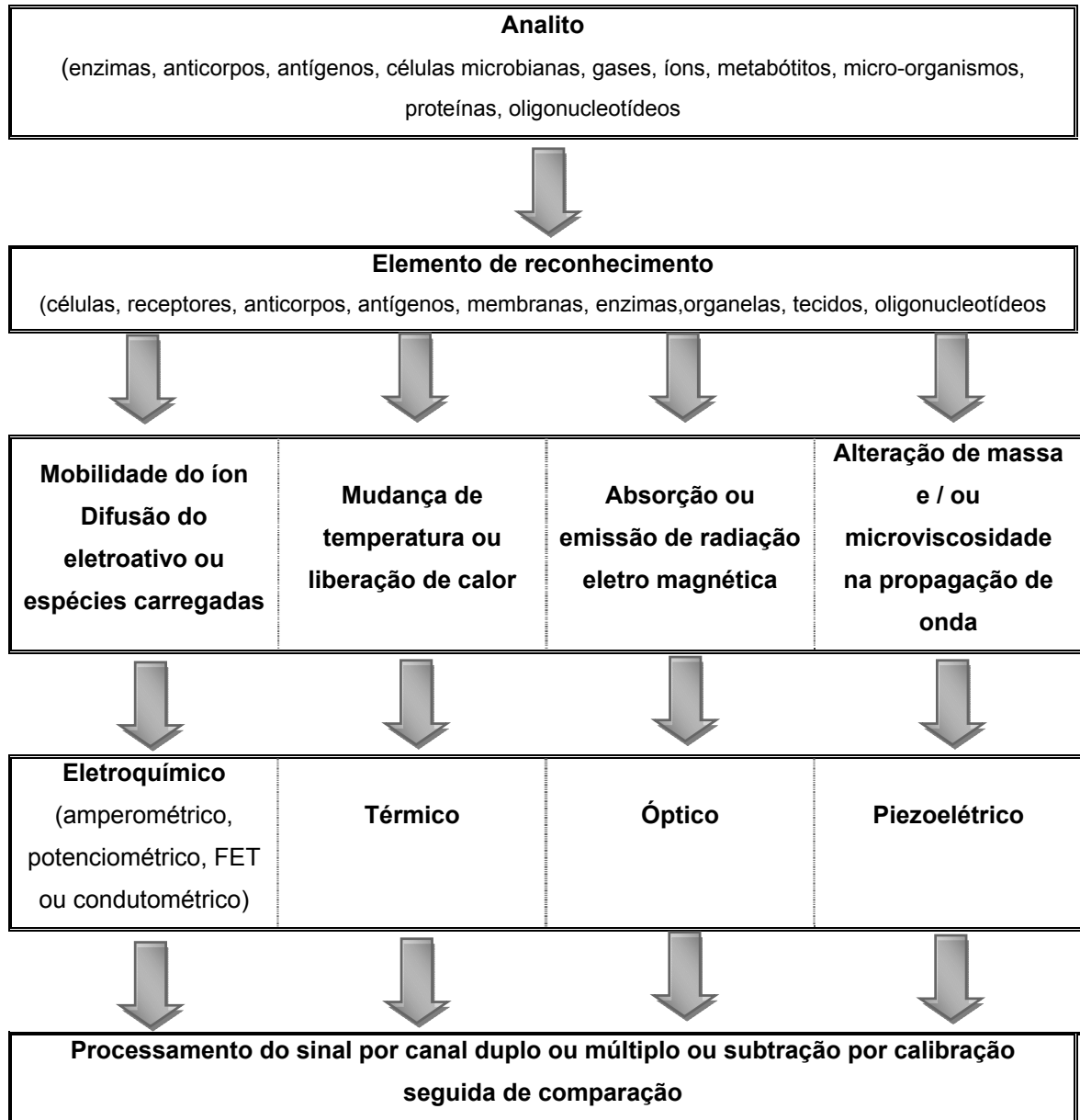
### 3.7 BIOSENSOR ENZIMÁTICO

Os biossensores são um sub-grupo de sensores químicos, construídos pela integração de sistemas de detecção biológica acoplados a um transdutor. Quando o sistema de detecção biológica corresponde a uma enzima, o biossensor é denominado biossensor enzimático e neste caso as enzimas obtêm um sinal químico produzido pela interação entre o sistema biológico e a substância e o transforma em uma resposta mensurável (Figura 6). Em princípio, devido a alta seletividade e especificidade enzimática e a sensibilidade do biossensor, qualquer material alvo pode ser adaptado, quer sejam substratos ou inibidores da enzima, além do mais a sua determinação é realizado sem preparo especial da amostra. O custo para a construção e o armazenamento de um biossensor é relativamente baixo e graças à procura pela praticidade, eficácia e portabilidade de dispositivos analíticos, os biossensores enzimáticos têm um enorme potencial como ferramentas úteis na medicina, na monitoração do meio ambiente *in situ* e em tempo real, controle de bioprocessos e gêneros alimentícios e em análises biomédicas e farmacêuticas e controle de qualidade de produtos do gênero alimentício (MELLO; KUBOTA, 2002; KRAJEWSKA, 2004).

Os métodos de imobilização (adsorção, microencapsulação, ligação covalente, entrecruzamento) permitem o contato entre o componente biológico e o transdutor, para um correto funcionamento do biossensor (FREIRE, DURÁN, KUBOTA, 2001). No mecanismo de imobilização por adsorção, vários tipos de carbono são usados como eletrodos, como carbono vítreo, fibras de carbono, espuma de carbono e várias formas de grafite. O grafite em pó, em especial, pode ser utilizado na preparação de materiais compósitos, aglutinado por polímeros, óleos não condutores e parafinas.

Materiais compósitos são comumente formados por duas fases: uma condutora (no caso o grafite em pó) e uma não condutora (o óleo mineral), que são colocadas em contato, junto ao agente biológico modificador, constituindo um eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM). Essa classe de eletrodos é frequentemente utilizada, principalmente por ser facilmente preparada, pouco custosa e pelo fato de poder ter a sua superfície facilmente renovada por polimento ou corte, aumentando sua durabilidade (SEGNINI, 2003).

**Figura 6** – Biocomponentes e transdutores empregados na construção de um biossensor.



Fonte: Mello; Kubota (2002)

O grafite em pó deve possuir uma alta pureza química, uma baixa absorção de oxigênio e impurezas que podem vir a intervir na caracterização eletroquímica, além de possuir uma granulometria uniforme, para garantir uma melhor reprodutibilidade nas determinações analíticas. O óleo mineral deve ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível em água, apresentar baixo teor de impurezas, e ser pouco volátil. Sob essas condições o componente não condutor é capaz de exercer sua função de conferir consistência a mistura e preencher os interstícios entre os grãos de grafite (LEITE, 2002).

Para aumentar a durabilidade da enzima em biossensores, é necessário que esta se mantenha em sua forma estável e que as suas propriedades biológicas sejam conservadas após a imobilização na superfície condutora (WILKOLAZKA; RUZGAS; GORTON, 2004). Os eletrodos modificados com enzimas podem ser caracterizados através do uso de técnicas eletroquímicas, tais como voltametria cíclica, voltametria de pulso normal e diferencial. Dentre essas técnicas a voltametria cíclica é preferencial, principalmente para a determinação de alguns parâmetros fundamentais, como potencial de óxido-redução, dependência da velocidade de varredura com a magnitude da corrente, a corrente residual, o limite de detecção do analito de interesse, entre outros (LEITE, 2002).

A voltametria cíclica é um método simples e rápido para se obter informações a cerca do processo eletroquímico que envolve um eletrodo, como o potencial formal de uma reação, quando as formas oxidadas e reduzidas da mesma são estáveis por tempo suficiente para se obter um voltamograma. O potencial de trabalho do eletrodo varia linearmente em função do tempo, partindo de potenciais nos quais não ocorrem processos de redox no eletrodo, seguindo em direção de potenciais nos quais ocorrem as reações das espécies de interesse para a análise. Em seguida a direção da varredura linear de potencial é invertida, para que possa ser possível a detecção das reações de intermediários e de produtos formados pela varredura. Para essa técnica eletroquímica, um eletrólito suporte deve ser utilizado (como o cloreto de potássio), para evitar a migração dos reagentes, e dos produtos em direção dos eletrodos, assim como também para controlar a força iônica, e melhorar o transporte de carga na solução. A voltametria cíclica é caracterizada por alguns parâmetros, tais quais: potenciais de pico anódico ( $E_{pa}$ ) e catódico ( $E_{pc}$ ); correntes de pico anódica ( $I_{pa}$ ) e pico catódica ( $I_{pc}$ ), potencial de meio-pico anódica ( $E_{p/2}$ ) e potencial de meia-onda ( $E_{1/2}$ ) (DA SILVA, 2006).

O primeiro biossensor de pasta de carbono foi proposto em 1988, onde a enzima glicose-oxidase, utilizada como o elemento biológico modificador do biossensor, foi diretamente misturada com a pasta de carbono, composta de grafite e óleo de silicone (LEITE, 2002). Louzada, Luccas e Magalhães (2004) construíram e caracterizaram um biossensor potenciométrico de pasta de carbono com extrato bruto de inhame para a determinação de piragolol, um composto fenólico que pode afetar o gosto e o cheiro de águas potáveis e peixes, podendo ser tóxico para animais e humanos. O tempo de vida obtido pela caracterização analítica do

eletrodo foi de 30 a 33 dias e histerese com tempo de recuperação de 7 horas. O biossensor foi aplicado na determinação da concentração de fenóis em amostras de tintura de cabelo, apresentando resultados satisfatório.

Oliveira e Vieira (2006) construíram biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de jiló (*Solanum gilo*) e o melhor resultado foi obtido após a imobilização em quitosana após reticulação com glutaraldeído, epícloridrina. O biossensor apresentou tempo de vida de 6 meses (cerca de 300 determinações).

Lima e Nunes (2007) construíram um biossensor enzimático para a detecção de fungicidas ditiocarbamatos e estudaram a cinética da enzima aldeído desidrogenase imobilizada em pasta de prata e grafite. A enzima apresentou grande afinidade pelo substrato e o biossensor proposto foi uma ferramenta extremamente prática para a detecção da variedade de fungicidas estudada, baseada na inibição irreversível da enzima por esse contaminante.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Micro-organismo

Foi utilizado o *Bacillus subtilis* Natto, isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Fundação André Tosello (Anexo A).

#### 4.1.2 Meios de Cultivo

O meio de preservação para o *B. subtilis* Natto foi composto por (g/L): peptona, 50; extrato de carne, 30; ágar, 20.

O meio de inóculo foi composto por (g/L): sacarose, 100; extrato de levedura, 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1;  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ , 0.5 (CALAZANS et al., 2000).

As fermentações foram realizadas em batelada em meio de cultivo contendo (g/L): extrato de levedura, 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3;  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ , 0,6;  $\text{MnSO}_4$ , 0,2; citrato de amônio, 0,25 (EUZENAT, GUIBERT, COMBES, 1997 modificado). A concentração de sacarose variou entre 200 e 300 g L<sup>-1</sup>, de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 2).

#### 4.1.3 Biossensor

As medidas de voltametria cíclica foram obtidas utilizando um potenciostato PalmSens e célula de vidro.

Os eletrodos de trabalho utilizados foram construídos a partir da imobilização da levanasacarase em uma seringa de plástico de 1 mL (seringa clínica para insulina), modificada com um fio de cobre acoplado ao êmbolo e ligado a uma secção de grafite para o contato externo. O contato entre o fio de cobre e a secção de grafite foi melhorado pela aplicação de uma tinta condutiva (Condumax plus). O contra-eletrodo usado foi de platina e o de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 M).

Para a construção dos biossensores foram utilizados pó de carbono grafite (CG), Fluka, e óleo mineral comercial (OM), Nujol, União Química.

Para a determinação de sacarose foram utilizados refrigerante do tipo guaraná envasado em embalagem de alumínio e suco de abacaxi a base de soja, envasado em embalagem tetra pak.

## 4.2 MÉTODOS

O fluxograma com as etapas do trabalho está apresentado na forma de anexo. (Anexo B)

### 4.2.1 Fermentação

Foram realizadas fermentações em batelada utilizando frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de volume de trabalho incubados em mesa agitadora orbital a 37°C.

#### 4.2.1.1 Preservação do micro-organismo

O *B. subtilis* Natto foi crescido em meio de preservação descrito no item 4.1.2 a 37°C durante 48 h, e mantido a 4°C em câmara refrigerada. O repique das células foi realizado a cada 45 d. A verificação da pureza foi observada por coloração de gram.

#### 4.2.1.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir do meio de inóculo descrito no item 4.1.2 durante 48 h a 150 rpm. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (10 min, 8000 g) e as células foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9 %). As leituras ocorreram a 400 nm em espectrofotômetro. Os valores obtidos foram correlacionados com a curva de biomassa em  $\text{g L}^{-1}$  e o inóculo foi padronizado em  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ .

#### 4.2.1.3 Otimização da produção da levanasacarase

Para otimizar a produção de levanasacarase foi utilizado um delineamento segundo Box e Behnken (Tabela 2) para avaliar a influência das variáveis independentes: ( $X_1$ ) concentrações de sacarose (200 a 300 g L<sup>-1</sup>), ( $X_2$ ) pH (5,5 a 9,5), e ( $X_3$ ) agitação (160 a 240 rpm) e as respostas: ( $Y_1$ ) atividade da levanasacarase de *B. subtilis* Natto e ( $Y_2$ ) produção de levana. As fermentações foram realizadas em 24 h e os cultivos foram interrompidos segundo o item 4.2.1.4. A atividade da levanasacarase foi determinada segundo o item 4.2.2.1 e a produção de levana dos meios de cultivo, segundo o item 4.2.2.2.

**Tabela 2** – Delineamento Box e Behnken 2<sup>3</sup> para avaliar a influência das variáveis independentes: ( $X_1$ ) concentrações de sacarose, ( $X_2$ ) pH, e ( $X_3$ ) agitação na atividade da levanasacarase de *B. subtilis* Natto e na produção de levana. As fermentações foram realizadas por 24 h, a 37° C.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	pH	Agitação (rpm)
1	-	-	0	200	5,5	200
2	+	-	0	300	5,5	200
3	-	+	0	200	9,5	200
4	+	+	0	300	9,5	200
5	-	0	-	200	7,5	160
6	+	0	-	300	7,5	160
7	-	0	+	200	7,5	240
8	+	0	+	300	7,5	240
9	0	-	-	250	5,5	160
10	0	+	-	250	9,5	160
11	0	-	+	250	5,5	240
12	0	+	+	250	9,5	240
13	0	0	0	250	7,5	200
14	0	0	0	250	7,5	200
15	0	0	0	250	7,5	200

Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA 7.0 para análise de variância com índice de confiança de 0,05 e metodologia de superfície de resposta (STATISTICA Inc. Tulsa - USA, 2006).

#### 4.2.1.4 Interrupção dos cultivos

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (9050 x g, 15 min, 4°C), a biomassa foi ressuspensa em solução salina (NaCl 0,9%) e medida por turbidimetria. O sobrenadante (extrato bruto [EB]) foi utilizado para determinar a

produção de levana e a atividade da levanasacarase, e como fonte de enzima para caracterização e imobilização.

#### 4.2.1.5 Efeito de sais na produção de levanasacarase

A partir da condição otimizada para produção de levanasacarase de *B. subtilis* Natto, definida através do delineamento Box e Behnken, foram realizadas novas fermentações para avaliar a influência dos sais NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 a 0,8 mol L<sup>-1</sup>) na produção da enzima através da atividade enzimática (item 4.2.2.1). A produção de levana (item 4.2.2.2) e a biomassa (item 4.2.2.3) também foram determinados paralelamente.

#### 4.2.2 Determinações Bioquímicas

##### 4.2.2.1 Atividade da levanasacarase

Foram pipetados 250 µL do EB e 250 µL de sacarose 1 mol L<sup>-1</sup> em 500 µL de tampão acetato 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0 e incubados em Eppendorf por 2 h, a 30° C. A levana resultante foi quantificada segundo o item 4.2.2.2. Uma unidade de atividade de formação de levana é expressa pela quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 µmol de frutose em 1 min sob as condições experimentais (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN 1999a).

##### 4.2.2.2 Quantificação da levana

A levana produzida pelo *B. subtilis* Natto durante as fermentações foi precipitada a partir do EB com etanol absoluto (3:1) durante 12 h, a 4° C, centrifugada a 18620 x g (20 min, 4° C) e o precipitado foi submetido a hidrólise ácida com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 1 h, a 100° C (VIIKARI e GISLER, 1986). A solução foi neutralizada com NaOH 2 mol L<sup>-1</sup> e a frutose resultante foi quantificada por açúcares redutores segundo Somogyi (1952) e Nelson (1944).

#### 4.2.2.3 Determinação da biomassa

A biomassa foi obtida após a interrupção dos cultivos (item 4.2.1.4), ressuspensa em solução salina (NaCl 0,9%) e determinada por turbidimetria a 400 nm em espectrofotômetro.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LEVANASACARASE

Foi realizada uma nova fermentação com 2 L de meio de cultivo nas condições definidas pela otimização, utilizando 4 frascos Erlenmeyers de 2 L com 500 mL de volume de trabalho. Os cultivos foram interrompidos segundo item 4.2.1.4 e a levanasacarase presente no sobrenadante foi caracterizada.

#### 4.3.1 Determinação das Condições Ótimas de pH e Temperatura

Para a determinação do pH e da temperatura ótimos a mistura reacional (item 4.2.2.1) foi modificada utilizando tampões em diferentes valores de pH e incubada em diferentes temperaturas durante 2 h, segundo o DCCR descrito na Tabela 3. Foi avaliada a influência das variáveis independentes: ( $X_1$ ) pH (3,2 a 8,8) e ( $X_2$ ) temperatura (29 a 71 °C) na resposta ( $Y_1$ ) atividade da levanasacarase de *B. subtilis* Natto. Foram utilizados tampão citrato, 50 mmol L<sup>-1</sup>, e tampão tris aminometano, 50 mmol L<sup>-1</sup>.

**Tabela 3** – DCCR 2<sup>2</sup> para avaliar a influência das variáveis independentes: ( $X_1$ ) pH e ( $X_2$ ) temperatura na atividade de polimerização da levanasacarase de *B. subtilis* Natto.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	$X_1$	$X_2$	pH	temperatura (°C)
1	-	-	4,0	35
2	-	+	4,0	65
3	+	-	8,0	65
4	+	+	8,0	35
5	-1,41	0	3,2	50
6	+1,41	0	8,8	50
7	0	-1,41	6,0	29
8	0	+1,41	6,0	71
9	0	0	6,0	50
10	0	0	6,0	50
11	0	0	6,0	50

#### 4.3.2 Determinação da Estabilidade Térmica

Para determinar a estabilidade térmica da levanasacarase de *B. subtilis* Natto foram realizados dois experimentos. Inicialmente foram incubados 5 mL do EB em triplicata durante 16 h nas temperaturas de 30, 50, 70 e 90° C e alíquotas de 250 µL foram retiradas nos tempos 1, 2, 5, 8, 12 e 16 h para determinação da atividade da levanasacarase (item 4.2.2.1). Em um segundo experimento, foram incubados 5 mL do EB em triplicata por 10 d nas temperaturas de 30 e 50 °C e alíquotas de 250 µL foram retiradas nos tempos 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 d para determinação da atividade da levanasacarase (item 4.2.2.1).

#### 4.3.3 Efeitos dos Sais na Atividade da Levanasacarase

O efeito de diferentes sais foi avaliado na atividade da levanasacarase. A mistura reacional (item 4.2.2.1) foi modificada pela solubilização dos sais NaCl, KCl, ZnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> nas concentrações 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mol L<sup>-1</sup> no tampão acetato, separadamente. Após incubação por 2 h a 30 °C, a atividade da levanasacarase foi determinada.

#### 4.3.4 Avaliação da especificidade da Levanasacarase pelo Substrato Sacarose

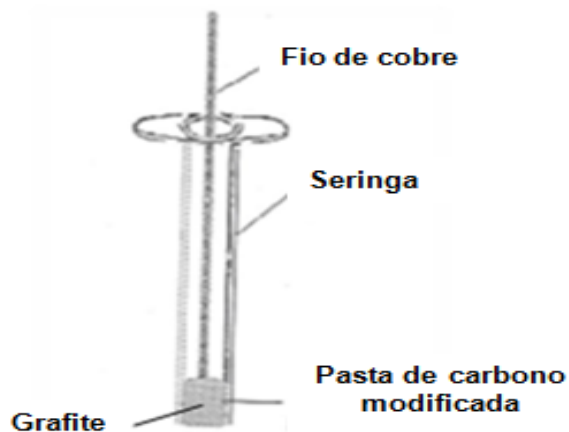
A especificidade da levanasacarase pelo substrato sacarose foi estudada variando a concentração da solução de sacarose da mistura reacional (item 4.2.2.1) entre 0,1 a 2,0 mol L<sup>-1</sup> e utilizando tampão citrato pH 6,0. A mistura reacional foi incubada durante 2 h a 50 °C e a partir dos resultados foi determinada a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) pelo método de Lineweaver-Burk.

### 4.4 BIOSENSOR ENZIMÁTICO

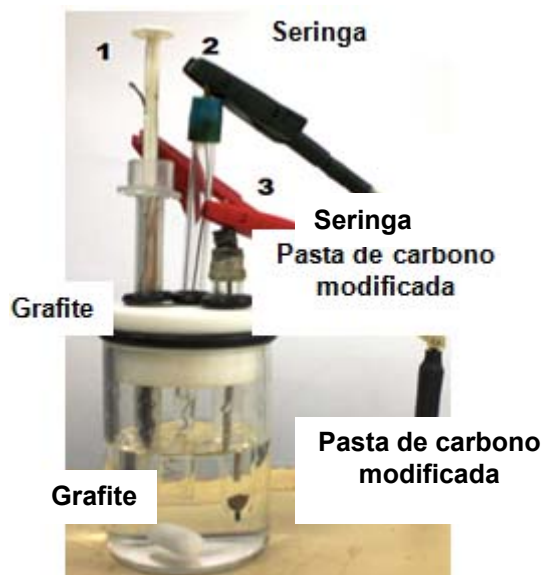
Para a construção do biossensor, a levanasacarase foi imobilizada em pasta de carbono e colocada na extremidade de uma seringa de plástico de 1 mL modificada com um fio de cobre acoplado ao êmbolo e ligado a uma secção de grafite para o contato externo. O contato entre o fio de cobre e a secção de grafite foi melhorado pela aplicação de uma tinta condutiva (ConduMax plus), conforme a

Figura 7. Os eletrodos construídos a partir das pastas de carbono foram empregados como eletrodos de trabalho para determinar sacarose por voltametria cíclica, empregando uma célula eletroquímica conforme a Figura 8, utilizando como eletrodo de referência Ag/AgCl ( $3 \text{ mol L}^{-1}$ ) e um contra-eletrodo de platina.

**Figura 7** – Esquema do eletrodo de trabalho de pasta de carbono modificado com levanasacarase



**Figura 8** – Célula eletroquímica utilizada nas caracterizações. À esquerda se observa o eletrodo de trabalho descrito (1), ao centro o contra-eletrodo de platina (2) e à direita, o eletrodo de referência Ag/AgCl (3). Os eletrodos estão imersos em Tampão Mc Ilvanes.



#### 4.4.1 Imobilização da Levanasacarase

Foram realizados dois testes para definir a ordem de adição dos componentes da pasta de carbono. No primeiro experimento, a pasta de carbono foi preparada através da maceração em grau de 150 mg de carbono grafite (CG) e 50  $\mu$ L do óleo mineral comercial (OM) com pistilo por 10 min, seguido da adição de 200  $\mu$ L de EB e maceração por mais 20 min. No segundo experimento a ordem de adição foi trocada, 150 mg de CG foram macerados durante 10 min com 200  $\mu$ L de EB, adicionados 50  $\mu$ L de (OM) e maceração por 20 min.

As pastas adquiriram uma consistência adequada e homogênea após a maceração e foram colocadas na extremidade da seringa imediatamente após o seu preparo. As determinações foram realizadas na presença e na ausência da sacarose (100 mM) solubilizada no tampão.

#### 4.4.2 Avaliação do pH na Eficiência do Biossensor

Para o estudo do pH e da concentração da levanasacarase de *B. subtilis* Natto e do substrato sacarose na funcionalidade do biossensor foram realizados 18 ensaios variando o volume de EB incorporado ao CG entre 100 e 300  $\mu$ L e o pH entre 5,0 e 7,0, na ausência e na presença da sacarose dissolvida em tampão Mc Ilvanes (Tabela 4). A massa do CG e o volume de OM foram mantidos constantes em 150 mg e 50  $\mu$ L.

**Tabela 4** – Composição dos eletrodos de pasta de carbono modificados com levanasacarase. Para variação do pH foi utilizado tampão Mc Ilvanes. Os picos de densidade de corrente anódicos foram determinados para o potencial de 0,3 V. A quantidade de CG foi mantida constante em 150 mg e de OM em 50  $\mu$ L.

Ensaio	EB	pH	Sacarose (mM)
1	100	5,0	100
2			0
3		6,0	100
4			0
5		7,0	100
6			0
7	200	5,0	100
8			0
9		6,0	100
10			0
11		7,0	100
12			0
13	300	5,0	100
14			0
15		6,0	100
16			0
17		7,0	100
18			0

#### 4.4.3 Avaliação da Eficiência do Biossensor

Para avaliar a influência da concentração da levanasacarase de *B. subtilis* Natto e da sacarose na eficiência do biossensor foi realizado um DCCR 2<sup>2</sup> com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais conforme descrito na Tabela 5, com as variáveis independentes: ( $X_1$ ) volume de EB (50, 100 e 150 mM) e ( $X_2$ ) concentração do substrato (50, 100 e 150  $\mu$ L) em tampão Mc Ilvanes pH 6,0.

Uma vez que a concentração do substrato na atividade da levanasacarase imobilizada não foi significativa em nível de 5%, foi avaliada a influência das concentrações de agente biológico em 50, 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu$ L de EB na sensibilidade do biossensor, mantendo constante o pH em 6,0 e a concentração do substrato em 100 mM.

**Tabela 5** – DCCR 2<sup>2</sup> para avaliar a influência das variáveis independentes: (X<sub>1</sub>) volume de EB e (X<sub>2</sub>) concentração do substrato na sensibilidade do biossensor.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	EB (µL)	Substrato (mM)
1	-	-	50	50
2	-	+	50	150
3	+	-	150	50
4	+	+	150	150
5	-1,41	0	29,5	100
6	+1,41	0	170,5	100
7	0	-1,41	100	29,5
8	0	+1,41	100	170,5
9	0	0	100	100
10	0	0	100	100
11	0	0	100	100

#### 4.4.4 Caracterização Eletroquímica do Eletrodo Modificado com Levanasacarase

Para verificar a especificidade da levanasacarase pela sacarose as concentrações de sacarose em tampão Mc Ilvanes pH 6,0 variaram entre 10 e 500 mM. A constante de Michaelis-Menten aparente ( $K_m$  ap) foi determinada utilizando as densidades de corrente obtidas em  $E = 0,3$  V utilizando o método de Lineweaver-Burk.

#### 4.4.5 Aplicação do Biossensor

O biossensor contendo a levanasacarase imobilizada foi utilizado na determinação de sacarose em refrigerante tipo guaraná e suco de abacaxi a base de soja. Alíquotas de 150 µL de guaraná e 200 µL de suco de abacaxi foram transferidas para a célula contendo 20 mL da solução tampão Mc Ilvanes pH 6,0.

Os dados nutricionais fornecidos pelo fabricante nas embalagens destacam somente o valor dos açúcares contidos nos líquidos. Para determinar a quantidade de sacarose, os açúcares totais e os açúcares redutores foram quantificados através dos métodos Dubois et al. (1956) e Somogyi (1952) e Nelson (1944) respectivamente. A diferença correspondeu à quantidade de sacarose, e esse valor foi confrontado com o obtido pela análise com o biossensor.

#### 4.4.6 Medidas Eletroanalíticas

As medidas voltamétricas foram realizadas em célula de vidro contendo 20 mL de tampão Mc Ilvanes pH 6,0 em um intervalo de potencial 0 a 1,0 V. Os testes foram realizados com velocidade de varredura de  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de levanasacarase por *B. subtilis* Natto é induzida pela presença de sacarose, dissacarídeo utilizado como fonte de carbono pelo micro-organismo e substrato pela enzima para a síntese de levana. Diversos fatores influenciam a produção desta enzima, dentre eles a composição do meio de cultivo, o pH e oxigenação. A composição correta do meio de cultivo é de grande importância para a produção de produtos biotecnológicos, e neste caso, os trabalhos de Calazans et al. (2000) e Euzenat, Guilbert e Combes (1996) foram uteis para fornecer tais conformações.

Apesar de existirem estudos de otimização da produção de levana, a obtenção da levanasacarase tem sido realizada de forma empírica. O estudo convencional da influência de vários fatores na obtenção de produtos biotecnológicos demanda tempo e várias análises são necessárias, e para explorar simultaneamente todos esses fatores foi empregada a metodologia de superfície de resposta, uma ferramenta estatística.

### **Os resultados estão apresentados na forma de artigos científicos:**

**Artigo A** – “Produção e caracterização de levanasacarase e levana de *Bacillus subtilis* Natto”. Será submetido à revista “Carbohydrate Polymers” (normas de publicação no Anexo B).

**Artigo B** – “Construção de biossensor potenciométrico de levanasacarase para detecção de sacarose”. Será submetido à revista “Biosensors and Bioelectronics” (normas de publicação no Anexo C).

**ARTIGO A****APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA  
PRODUÇÃO DE LEVANASACARASE DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO E  
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

**Bruna C. M. Gonçalves; Janaina Mantovan; Siliane D. Berté; Maria E. R. Duarte;  
Dionísio Borsato ; Mara L. L. Ribeiro; Maria A. P. Colabone-Celligoi\***

## APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA PRODUÇÃO DE LEVANASACARASE DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

**Bruna C. M. Gonçalves<sup>1</sup>; Janaina Mantovan<sup>a</sup>, Siliane D. Berté<sup>2</sup>, Maria E. R. Duarte<sup>b</sup>, Dionísio Borsato<sup>3</sup>, Mara L. L. Ribeiro<sup>a</sup>, Maria A. P. Colabone-Celligoi<sup>a\*</sup>**

### **Resumo**

A levanasacarase é uma frutossiltransferase que utiliza a sacarose como substrato para a síntese de levana, um biopolímero com ampla aplicação industrial. Este é o primeiro trabalho que relata a otimização da produção de levanasacarase utilizando metodologia de superfície de resposta. A produção de levana das fermentações foi acompanhada paralelamente à produção da enzima, com obtenção de até 205 g/L de exopolissacarídeo, rendimento mais alto do que o observado por outros autores, e com potencial otimização. A levanasacarase se demonstrou termo-estável e termo-ativa a 30°C. A temperatura e o pH ótimos para a atividade foram 50°C e 6.0 e o  $K_m$  = 313 mM, indicando baixa especificidade pelo substrato. O  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  adicionado ao cultivo inibiu o crescimento do micro-organismo e aumentou a atividade da enzima e a produção de levana. Também estimulou a atividade da enzima. Este estudo revela uma cepa potencial produtora de levana e uma enzima com características interessantes para aplicações industriais.

**Palavras-chave:** Levana. Levanasacarase. Superfície de resposta. Exopolissacarídeo. *Bacillus subtilis* Natto. Caracterização.

### **1 INTRODUÇÃO**

A levanasacarase (LS) é produzida por bactérias gram-positivas, como *B. subtilis* (Dedonder, 1966), *Lactobacillus reuteri* (Van Hijum et al. 2001), e gram-negativas, como *Zymomonas mobilis* (Dawes, Ribbons, & Rees, 1966), *Halomonas* sp. (Poli et al., 2009), *Erwinia amylovora* (Ordax et al., 2010), *Pseudomonas syringae* e *P. chlororaphis* (Visnapuu et al., 2011) e alguns fungos, como *Streptococcus mutans* (Carlsson, 1970) e *Actinomyces viscosus* (Pabst, 1977). O *B. subtilis* tem sido preferencialmente empregado na obtenção da levanasacarase, pois é uma bactéria encontrada naturalmente no solo, sendo considerado um

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil. \*Contato autor: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Caixa Postal 6001, Brasil. Tel.: +55 43 3371 4513 E-mail: macelligoi@uel.br (M. A. P. C. Celligoi).

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

modelo de estudo para bactérias gram-positivas, devido ao grande conhecimento das suas características genéticas e fisiológicas e por não apresentar patogenicidade, não colonizar tecidos e possuir boa capacidade de formação de esporos (Harwood, 1992). Nos campos industrial e biotecnológico o emprego do *B. subtilis* tem sido muito atrativo por seu grande potencial de multiplicação e de sua capacidade de secretar proteínas no meio extracelular (Brooks, Butel, & Morse, 2000). A variedade *B. subtilis* Natto é comumente utilizada no preparo do natto, um alimento fermentado a base de soja, típico da culinária japonesa há mais de 1000 anos (Wei & Chang, 2004).

Devido às várias aplicações da levana (LN), um exopolissacarído produzido pela enzima levanasacarase, estudos empíricos relacionados à produção desta enzima têm sido desenvolvidos. Este tipo de estudo é demorado e requer um número grande de experimentos, pois devem ser avaliadas várias condições de fermentação, uma vez que a síntese desta enzima pelo micro-organismo é afetada sinergicamente por uma série de fatores. Uma alternativa bastante promissora e que vem sendo empregada para a otimização da produção de enzimas (Théodore & Panda, 1995; Wang, Chiu, & Hsieh, 2009), e polissacarídeos como a LN (Borsari et al., 2006; Melo et al., 2007) é a metodologia de superfície de resposta (MSR), uma ferramenta estatística que visa estudar, de maneira conjunta, diferentes condições em um número reduzido de experimentos (Fleuri & Sato, 2008).

O primeiro estudo de produção e purificação de LS de *B. subtilis* disponível foi publicado em 1966, por Dedonder. Na década de 80, Lyness e Doelle (1980, 1981, 1983) avaliaram a produção da enzima por *Z. mobilis* e os resultados demonstraram que a taxa de hidrólise de sacarose é dependente da temperatura, concentração de sacarose e pH. Cote (1988) investigou a produção de levanasacarase por *Erwinia herbicola* NRRL B-1678 e testou o efeito de várias fontes de carbono (sacarose, glicose, frutose, sorbitol e manitol) e fontes de nutrientes industrializadas (caldo nutriente desidratado e milhocina) na secreção da enzima, observando redução do crescimento do micro-organismo e da produção da enzima em presença de frutose, já em presença de glicose, a atividade da levanasacarase atingiu o valor máximo após o a fase estacionária. Os maiores níveis de levanasacarase foram obtidos em meio de cultivo composto por milho macerado e sorbitol, seguido do meio composto por frutose em caldo nutriente ou milho macerado, e a sacarose não foi necessária para a secreção extracelular da

enzima. Estudos recentes relatam que a variação das fontes de carbono e nitrogênio adicionadas ao meio de cultivo também levou a variações na produção da enzima, possibilitando o controle da quantidade de exopolissacarídeo sintetizado, reduzindo a viscosidade do meio de cultivo e facilitando a purificação da enzima (Abdel-Fattah, Mahmoud, & Esawy, 2005). A atividade da LS pode ser inibida por glicose e temperaturas acima de 45°C (Donot et al., 2012). Apesar da maioria dos trabalhos publicados empregarem a fermentação submersa para a produção da LS, Ahmed (2008) obteve sucesso na produção desta enzima por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agrícolas como substrato (cascas de laranja e de limão e resíduos de serragem, banana e farelo de trigo) com altos rendimentos.

A LN é polimerizada a partir de resíduos de frutose unidos por ligações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) na cadeia linear, e por ligações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) nas ramificações, que podem apresentar diversos graus. Possui aplicações na área terapêutica, devido a sua ação antiviral (Esawy et al., 2011), atividade antidiabética (Dahech et al., 2011) e antitumoral (Yoo et al., 2004). A atividade antitumoral está relacionada à massa molecular da sua cadeia (Calazans et al., 2000), e o tamanho da cadeia pode ser regulado pela força iônica do meio (Tanaka, Oi, & Yamamoto, 1979). Nas indústrias de alimentos é empregada como fonte de frutose, na produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) (Kang et al., 1999), agente estabilizante e encapsulante, fixador de cores e sabores (Calazans et al., 1997, Bekers et al., 2002), entre outros. Uma das principais funções da levana para o micro-organismo produtor é atuar como reserva energética e em mecanismos de proteção, pois em condições limitantes as levanas são ativadas e hidrolisam o polímero; o produto da quebra atua como fonte de carbono para substituir as fontes intracelulares escassas (Bergeron, Morou-Bermudez, & Burne, 2000).

Neste trabalho foi realizada a otimização da produção de LS de *B. subtilis* Natto através do delineamento Box e Behken, acompanhando paralelamente a produção de levana nos ensaios. A partir da condição otimizada foi avaliada a influência dos sais KCl, NaCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na produção da enzima, com acompanhamento da produção da levana e biomassa. A enzima foi parcialmente caracterizada quanto a temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica, efeito dos sais na atividade e o K<sub>m</sub> foi determinado.

## 2 MÉTODOS

## 2.1 MICRO-ORGANISMO, MEIO DE CULTIVO E INÓCULO

*B. subtilis* Natto foi isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Fundação André Tosello e preservado em meio de cultivo contendo (g/L): peptona, 50; extrato de carne, 30; ágar, 20 e incubado a 37 °C durante 48 h e estocado a 4 °C. O inóculo foi preparado por fermentação em batelada em meio de cultivo composto por (g/L): sacarose, 100; extrato de levedura, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 0.5 (Calazans et al., 2000), em frascos Erlenmeyer de 150 mL com 25 mL de meio. Os meios de cultivo foram autoclavados a 1 atm durante 15 min e inoculados com *B. subtilis* Natto, incubado a 37°C, 150 rpm durante 48 h. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação 9050 x g durante 15 min a 4°C. As células separadas foram ressuspensas em NaCl 0,9 % (p/v) e utilizadas na concentração de 0.2 g/L para todas as fermentações.

## 2.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LS E LN

Para otimizar a produção da LS foi utilizado o modelo estatístico Box e Behnken 2<sup>3</sup>, variando as condições de fermentação: concentração de sacarose (200 a 300 g/L), pH (5.5 a 9.5) e agitação (160 a 240 rpm) (Tabela 1).

As fermentações foram realizadas em batelada em meio de cultivo contendo (g/L): extrato de levedura, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 0,6; MnSO<sub>4</sub>, 0,2; citrato de amônio, 0,25 (Euzenat, Guibert, & Combes, 1997 modificado) em frascos Erlenmeyer de 150 mL contendo 25 mL de meio e autoclavados a 1 atm durante 15 min. As fermentações seguiram as condições apresentadas na Tabela 1. Os cultivos foram interrompidos após 24 h por centrifugação 9050 x g durante 15 min a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado como fonte de LS e para determinação de LN.

As variáveis respostas estudadas Y<sub>1</sub> (atividade da LS) e Y<sub>2</sub> (produção de levana) foram analisadas com o programa STATISTICA 7.0 com intervalo de confiança de 5%.

### 2.3 EFEITO DE SAIS NA PRODUÇÃO DA LS

A partir da condição otimizada de produção da LS foram realizados novos cultivos para avaliar a influência dos sais NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.2 a 0.8 M) na produção da enzima.

### 2.4 BIOMASSA

A biomassa obtida após a interrupção dos cultivos foi ressuspensa em solução salina (NaCl 0.9%), determinada por turbidimetria a 400 nm e relacionada com a curva de biomassa em g/L.

### 2.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LS

A LS foi caracterizada quanto a temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica, efeito dos sais na atividade enzimática e o  $K_m$  foi determinado.

#### 2.5.1 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E PH ÓTIMOS

Para a determinação da temperatura e do pH ótimos foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> com 4 pontos axiais e 2 repetições no ponto central (Tabela 3). A mistura reacional foi incubada com tampão citrato e tampão tris aminometano variando os valores de pH entre 3.2 e 8.8 e as temperaturas entre 29 e 71°C. As atividades foram determinadas segundo item 2.7.

#### 2.5.2 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da LS foi avaliada incubando a enzima em diferentes temperaturas (30, 50, 70 e 90°C) por 16 h e 30 e 50°C por 10 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata, as atividades foram determinadas segundo item 2.7 e os resultados expressos em porcentagem de atividade residual.

### 2.5.3 Efeito de Diferentes Sais na Atividade da LS

O efeito dos sais NaCl, KCl, ZnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> (0.2 a 0.8 M) na atividade da LS foi determinado pela solubilização do sal no tampão utilizado na mistura reacional com incubação durante 2 h a 30°C. As atividades foram determinadas segundo item 2.7.

### 2.5.4 Especificidade da LS pelo Substrato Sacarose

A especificidade da LS pelo substrato sacarose foi estudada variando a concentração da solução de sacarose da mistura reacional entre 0.1 a 2.0 M em pH 6.0 a 50 °C durante 2 h de incubação. A partir dos resultados foi determinada a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) pelo método de Lineweaver-Burk.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DE LV

A levana foi precipitada do sobrenadante com 3 volumes de etanol absoluto por 12 h a 4 °C, centrifugada 18060 x g por 20 min a 4°C e hidrolisada com HCl 0.1 M durante 1 h a 100°C (Viikari & Gisler, 1986). A solução resultante foi neutralizada com NaOH 2 M e os açúcares redutores foram determinados de acordo com Somogyi (1952) e Nelson (1944).

## 2.7 ATIVIDADE DA LS

A atividade da levanasacarase foi determinada pela formação de levana através da mistura reacional contendo 250 µL de sobrenadante, 250 µL de sacarose 1 M e 500 µL de tampão acetato (50 mM, pH 5) e incubada a 30 °C durante 2 h (Ananthalakshmy & Gunasekaran, 1999). A levana foi estimada após precipitação com etanol absoluto e hidrolisada segundo item 2.5. Uma unidade de atividade (UA) foi expressa como a quantidade de enzimas necessária para polimerizar 1 µmol de açúcar redutor em 1 min nas condições experimentais.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 PRODUÇÃO DE LS E LV

De acordo com a Tabela 1, as atividades da LS de *B. subtilis* Natto variaram de 1.20 a 8.53 UA/mL e as maiores atividades observadas foram 8.45, 8.47 e 8.53 UA/mL nos ensaios 5 (200 g/L, pH 7.5, 160 rpm), 8 (300 g/L, pH 7.5, 240 rpm) e 6 (300 g/L, pH 7.5 e 160 rpm), respectivamente. A análise dos ensaios 6 e 8 indica um aumento de somente 1% da atividade com a redução da velocidade de agitação de 240 para 160 rpm. Atividades mais altas para LS de *B. subtilis* foram observadas por Abdel-Fattah, Mahmoud &, Esawy (2005) que estudaram a produção da enzima utilizando sacarose e glicose como fonte de carbono para o micro-organismo, obtendo 14.5 e 14.1 UA/mL, respectivamente, em incubadora estática a 30°C durante 24 h. Cote (1988) investigou a produção LS por *Erwinia herbicola* NRRL B-1678, avaliando o efeito de várias fontes de carbono e de nutrientes industrializadas e a maior produção de LS foi em meio de cultivo composto por milho macerado e sorbitol, com atividade de 0,7 U mL<sup>-1</sup>, valor 92% mais baixo do que os observadas neste estudo. O pH 7.5 foi o mais favorável neste estudo para a produção da enzima e as menores produções foram observadas em pH 9.5, concordando com o estudo de Lyness & Doelle (1983) e Doelle & Greenfield (1985), que relatou que valores de pH acima de 8.0 inibem a produção de LS por *Z. mobilis*. Por outro lado Castillo & Lopez-Mungia (2004) relatam que a LS é produzida em ambiente extracelular com pH ácido, contrariando este estudo, e além de afetar a produção da enzima, o pH também influencia as atividades hidrolase e polimerase, pois em valores abaixo de 6.0 predomina a síntese de levana, e acima de 7.0, a hidrólise da sacarose e síntese de FOS (Goldman et al., 2008).

**Tabela 1** – Produção de LS e LV pelo *B. subtilis* Natto utilizando o Delineamento Box e Behnken 2<sup>3</sup> para avaliar a influência da concentração de sacarose, pH e agitação na atividade da LS e produção de LV.

Ensaio	Níveis			Respostas	
	Sacarose (g/L)	pH	Agitação (rpm)	AE (UA/mL)	Produção Levana (mg/mL)
1	200	5.5	200	6.06	133.33
2	300	5.5	200	4.66	188.74
3	200	9.5	200	1.20	20.23
4	300	9.5	200	1.36	26.67
5	200	7.5	160	8.45	101.63
6	300	7.5	160	8.53	195.51
7	200	7.5	240	5.56	93.40
8	300	7.5	240	8.47	194.71
9	250	5.5	160	6.65	180.75
10	250	9.5	160	2.62	28.46
11	250	5.5	240	7.35	205.92
12	250	9.5	250	1.61	78.64
13	250	7.5	200	7.48	162.12
14	250	7.5	200	7.31	157.93
15	250	7.5	200	7.21	144.38

Os resultados experimentais foram analisados utilizando o programa STATISTICA 7.0 e, a partir da análise da regressão para atividade enzimática, foi possível definir o modelo polinomial de segunda ordem:

$$Y = 7.33 + 0.22x_1 - 2.24x_2 - 0.41x_3 - 0.41x_1^2 - 3.60x_2^2 + 0.83x_3^2 \quad (\text{Eq 1})$$

onde Y é a atividade enzimática (UA/mL),  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são as variáveis concentração de sacarose, pH e agitação.

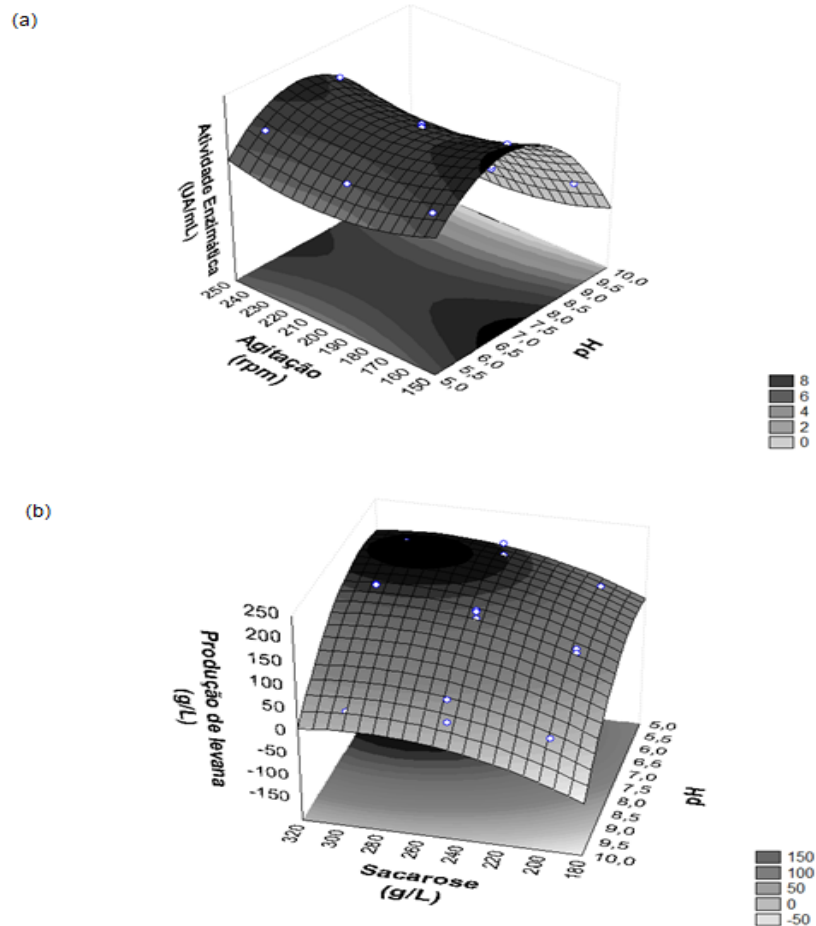
O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi 0.97, indicando que a equação pode ser utilizada para fins preditivos. Na Tabela 2 é possível observar que os valores de  $F$  calculado para os termos lineares e quadráticos, na produção de LS de *B. subtilis* são aproximadamente 5 vezes maior do que os de  $F$  tabelado para a distribuição de  $F$ , com os seus respectivos graus de liberdade em nível de 5%, indicando que o modelo está ajustado e descreve as respostas em função das variáveis analisadas. A melhor condição para a produção de levanasacarase foi 300 g/L de sacarose, pH 7.5 e 160 rpm, com atividade predita de 8.53 UA/mL refletindo em uma alta produção de levana (195.51g/L).

**Tabela 2** – Análise de variância para a atividade da LS de *B. subtilis* Natto.

	GL	SQ	QM	Fcal	Ftab 5%
<b>Regressão</b>	9	102.9204	11.4356	16.4840	4.77
<b>Linear</b>	3	41.8968	13.9656	20.1301	5.41
<b>Quadrático</b>	3	51.1539	17.0513	24.5788	5.41
<b>Interação</b>	3	9.8697	3.2899	4.7423	5.41
<b>Erro experimental</b>	5	3.4687	0.69374		
<b>Total SQ</b>	14				

A Figura 1a apresenta a superfície de resposta, gerada a partir dos resultados da Tabela 1 pelo modelo polinomial, podendo observar que existem dois ótimos de produção da LS influenciados apenas pela agitação.

Para a produção de LV as variáveis significativas ( $p = 5\%$ ) foram sacarose ( $p = 0.016484$ ), e pH ( $p = 0.000608$ ). O modelo pode ser utilizado para fins preditivos, uma vez que a falta de ajuste não foi significativa ( $p = 0.077$ ). A partir dos dados foi possível gerar a superfície de resposta relacionando sacarose e pH apresentada na Figura 1b.

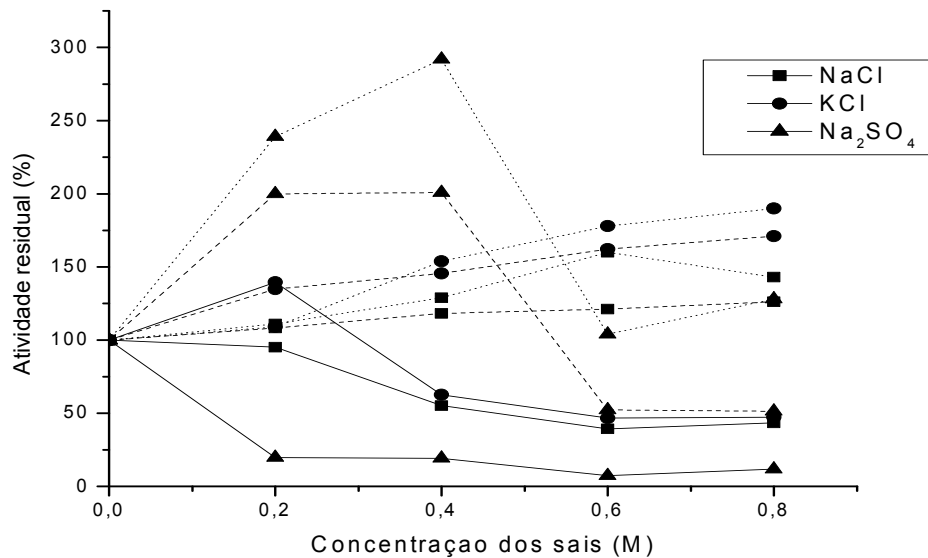
**Figura 1** – Superfícies de resposta para atividade da LS (a) e para a produção de LV (b).

As produções de LV pela LS variaram entre 20.23 e 205.92 g/L (Tabela 1) e as maiores produções foram 180.75, 188.74, 194.71, 195.51 e 205.92 g/L, obtidas nos ensaios 9 (250 g/L, pH 5.5, 160 rpm), 2 (300 g/L, pH 5.5, 200 rpm), 8 (300 g/L, pH 7.5, 240 rpm), 6 (300 g/L pH 7,5, 160 rpm) e 11 (250 g/L de sacarose, pH 5.5 e 240 rpm), respectivamente. As maiores produções foram nas concentrações de sacarose mais altas e nos valores de pH mais baixos utilizados, evidenciando a influência positiva da sacarose e do pH ácido na produção deste biopolímero. Esta cepa de *B. subtilis* Natto é promissora para a produção de LV, pois apresentou desempenho superior às demais cepas testadas por outros autores. Shih et al. (2005), obtiveram 50 g/L de LV de *B. subtilis* Natto em meio de cultivo contendo 200 g/L de sacarose, e Shih, Chen, & Wu (2010) obtiveram 86.3 g/L de LV utilizando células imobilizadas de *B. subtilis* natto em alginato de cálcio e apesar do rendimento ter sido aumentado após a imobilização das células do micro-organismo, foram respectivamente 75% e 60% menores do que os observados neste estudo. O *B. subtilis* também demonstrou melhor desempenho quando comparado ao *Z. mobilis*, que produziu 14.67 g/L de LV em estudo de Melo et al. (2007) e 40.14 g/L de LV em estudo de Borsari et al. (2006), ambos utilizaram planejamento fatorial.

#### - Efeito de sais na produção da LS

A influência dos sais NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi avaliada na produção da LS pelo *B. subtilis* Natto (Figura 2). Os sais testados induziram o aumento da atividade e o aumento da produção de LV. O NaCl induziu em 26 % a atividade da LS (0.8 M) e em 60 % a produção de LV (0.6 M). Estes dados são semelhantes aos obtidos por Vigants et al. (1998), que observaram o estímulo da síntese de levana por *Z. mobilis* na presença de NaCl, durante a fermentação e no sobrenadante após a interrupção do cultivo, aumentando em 1,2 vez a produtividade na concentração de 0.4 M, isto sugere que a enzima foi ativada. Quando utilizado o KCl, houve um aumento da produção da LS em 71% e de LV em 90%, a 0.8 M. O Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi o sal que se destacou na influência da atividade, reduzindo acentuadamente o crescimento celular e induzindo em 200% a atividade da LS e a produção de LV em 291.82% (0.4 M), desempenho muito interessante para as indústrias, por oferece alto rendimento de enzima e biopolímero, com baixo crescimento microbiano, facilitando a separação da biomassa.

**Figura 2** – Efeito dos sais NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no crescimento do *B. subtilis* Natto (linhas contínuas) produção de LS (linhas tracejadas) e produção de LV (linhas pontilhadas) durante a fermentação.



#### - Temperatura e pH ótimos

A condição que atingiu a melhor atividade da LS foi pH 6.0 e 50°C com 5.38 UA/mL correspondendo a média dos pontos centrais (Tabela 3). O pH e a temperatura foram significativos ( $p < 0.05$ ), porém influenciaram negativamente a atividade da LS.

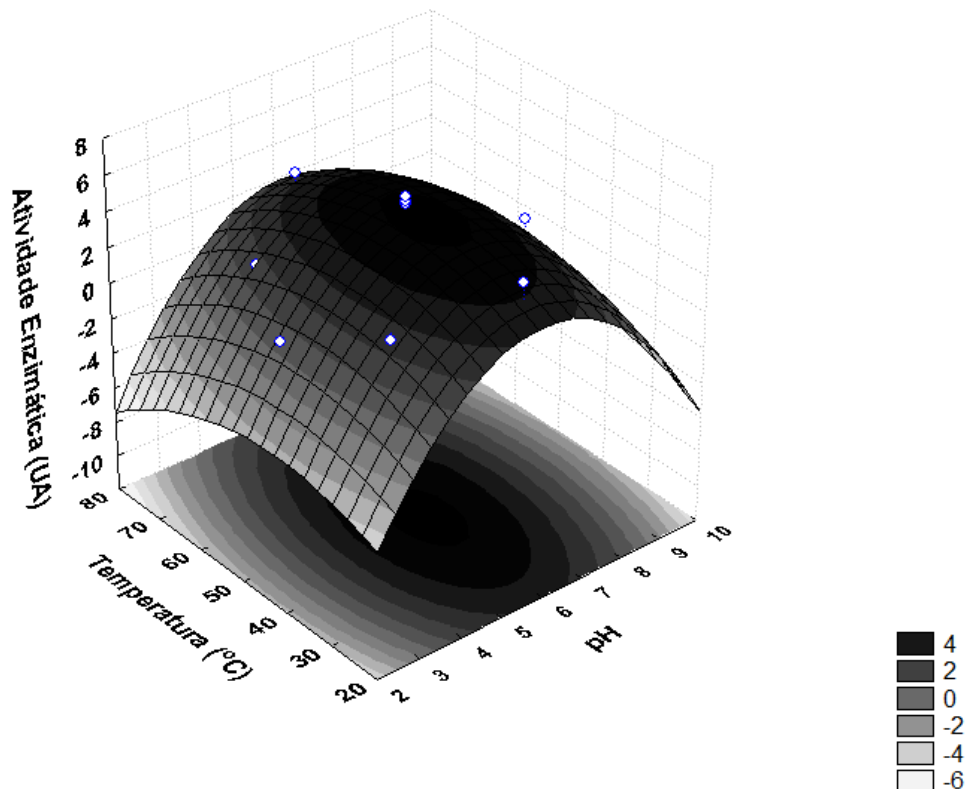
**Tabela 3** – Atividade da LS de *B. subtilis* Natto por DCCR 2<sup>2</sup>, com 2 repetições no ponto central, para avaliar a influência do pH e da temperatura.

Ensaio	Níveis dos fatores		Resposta
	pH	Temperatura (°C)	AE (UA/mL)
1	4.0	35	2.11
2	4.0	65	1.47
3	8.0	35	1.45
4	8.0	65	1.40
5	3.2	50	0.60
6	8.8	50	1.54
7	6.0	29	4.80
8	6.0	71	3.13
9	6.0	50	5.17
10	6.0	50	5.38
11	6.0	50	5.61

Os dados foram tratados estatisticamente e na superfície de resposta (Figura 3) gerada pelo modelo observa-se que as condições ótimas para a atividade da LS são pH 6.0 e temperatura 50°C. O pH interfere na atividade enzimática pois altera a distribuição de cargas elétricas da enzima, influenciando a conformação de seu sítio ativo e, conseqüentemente a sua interação com o substrato. A maioria das LS estudada possui pH ótimo entre 5.5 e 6.0 (Yanase et al., 1992; Ammar et al., 2002; Park et al., 2003; Paul et al., 2011). Goldman (2008) estudou a levanasacarase de *Z. mobilis* e observou que existe em duas formas ativas, dependentes do pH e da força iônica. Em valores de pH acima de 7.0 a proteína se apresenta na forma dimérica, e abaixo de 6.0, forma microfibrilas bem ordenadas. Estas formas se interconvertem com a alteração do pH e a forma como a enzima se arranja afeta a produção de polissacarídeos e as propriedades cinéticas, de forma que, em pH acima de 7.0 a enzima tende a hidrolisar sacarose e sintetizar fruto-oligossacarídeos já em pH abaixo de 6.0 catalisa quase exclusivamente a síntese de levana.

A temperatura ótima relatada por alguns autores mostra similaridade com os resultados aqui apresentados, a invertase de *Z. mobilis* (Yanase et al, 1995), LS termoestável de *Bacillus* sp. TH4-2 purificada (Ammar et al, 2002) e LS de *Bacillus natto* estabilizada com glucomanan (Ammar et al. 2002), apresentaram atividade na faixa de 50°C. Porém a temperatura ótima das enzimas é dependente do micro-organismo e das condições estudadas, como demonstrado para LS purificada de *Z. mobilis*, que apresentou temperatura ótima na faixa de 5 a 15°C (YANASE et al, 1992) e para LS purificada de *Microbacterium laevaniformans* (Park et al, 2003), nativa de *Acetobacter nitrogenifigens* (Paul et al., 2011) e purificada de *B. subtilis* NRC 33a, a temperatura ótima foi de 30°C.

**Figura 3** – Superfície de resposta para atividade da LS de *B. subtilis* Natto para pH na faixa 3.3 a 8.8 e temperatura na faixa 29 a 71°C.



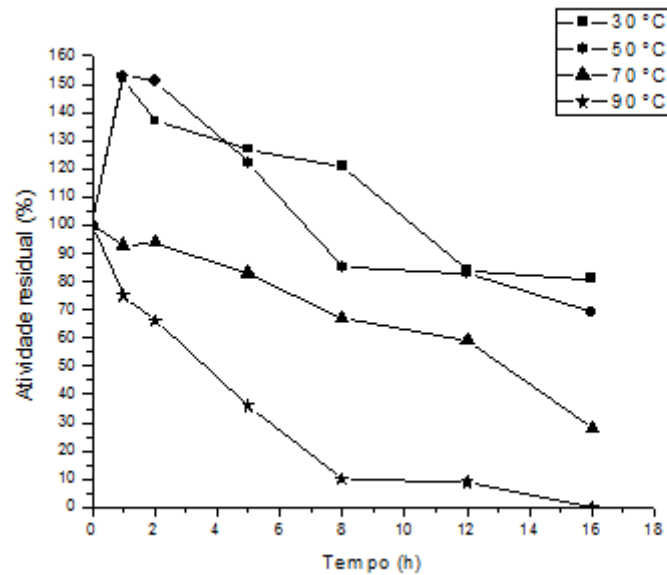
#### - Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da LS foi determinada através da atividade residual em relação ao controle, com manutenção da enzima em diferentes tempos e temperaturas (Figura 4a). Observou-se um aumento de 50% na atividade da enzima em 30 e 50°C e após 16 h de incubação cerca de 80% da atividade foi conservada nessas temperaturas. A atividade da LS reduziu em 72% a 70°C e foi inativada totalmente a 90°C após 16 h de incubação.

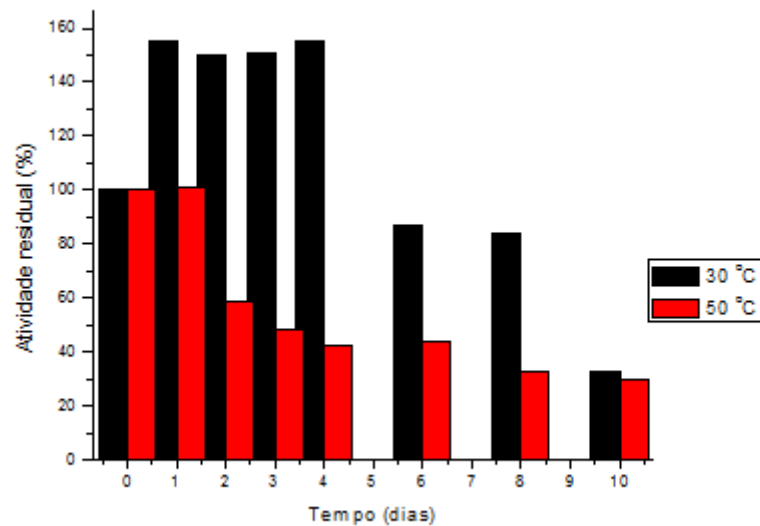
A estabilidade da LS foi testada durante 10 dias de incubação (Figura 4b), e permaneceu ativa durante todo o teste, com queda gradativa da atividade, de forma que 30% foi conservada ao final do teste em ambas as temperaturas. A enzima se mostrou mais estável a 30°C, havendo um aumento de 50% da atividade durante os primeiros 4 dias. No estudo anterior este incremento havia sido observado somente na primeira hora, o que pode ser justificado pela frequente manipulação do sobrenadante incubado para a retirada de amostra. Já a 50°C houve manutenção da atividade no primeiro dia, quando comparado a amostra

não incubada, com queda acentuada de 40 % no segundo dia, e quedas gradativas até o décimo dia de incubação.

**Figura 4** – Estabilidade térmica da LS de *B. subtilis* Natto em diferentes temperaturas em (a) 16 horas de incubação e (b) 10 dias de incubação.



(a)



(b)

- Efeito de sais na atividade da LS

O efeito dos sais em diferentes concentrações foi avaliado para a LS de *Bacillus subtilis* (Tabela 4). Os cátions bivalentes ( $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{CuSO}_4$ ) promoveram inibição da atividade da enzima, exceto o  $\text{ZnCl}_2$ , que inibiu a enzima apenas na concentração de 0.2 M, e estimulou gradativamente a sua atividade nas demais concentrações. A forte inibição da atividade da LS de *L. reuteri* pelos íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  já foi reportada e o mecanismo de inibição da atividade de frutossiltransferase por metais é desconhecido e, discordando com este estudo, o íon  $\text{Ca}^{+2}$  tem sido descrito como estabilizador da enzima (Van Hijun et al., 2001).

Apesar da LS não utilizar metais como cofator, o KCl,  $\text{ZnCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  demonstraram-se indutores da atividade. O KCl e o  $\text{ZnCl}_2$  promoveram estímulo de 33% e o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  de 57%. O NaCl não promoveu alterações no comportamento da enzima, indicando um possível sinergismo entre o metal e o radical, pois quando ligado ao íon  $\text{Cl}^-$ , apresentou pouca influência, mas ligado ao grupamento  $\text{SO}_4^{-2}$ , foi o sal com maior influência na atividade da enzima.

**Tabela 4** – Efeito de diferentes sais na atividade da LS.

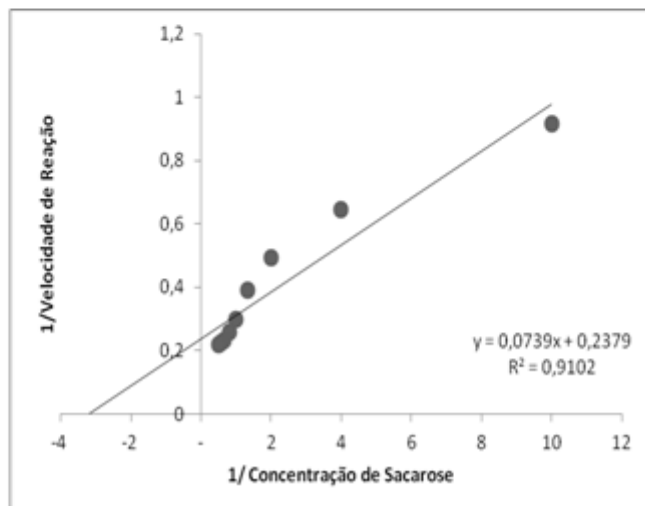
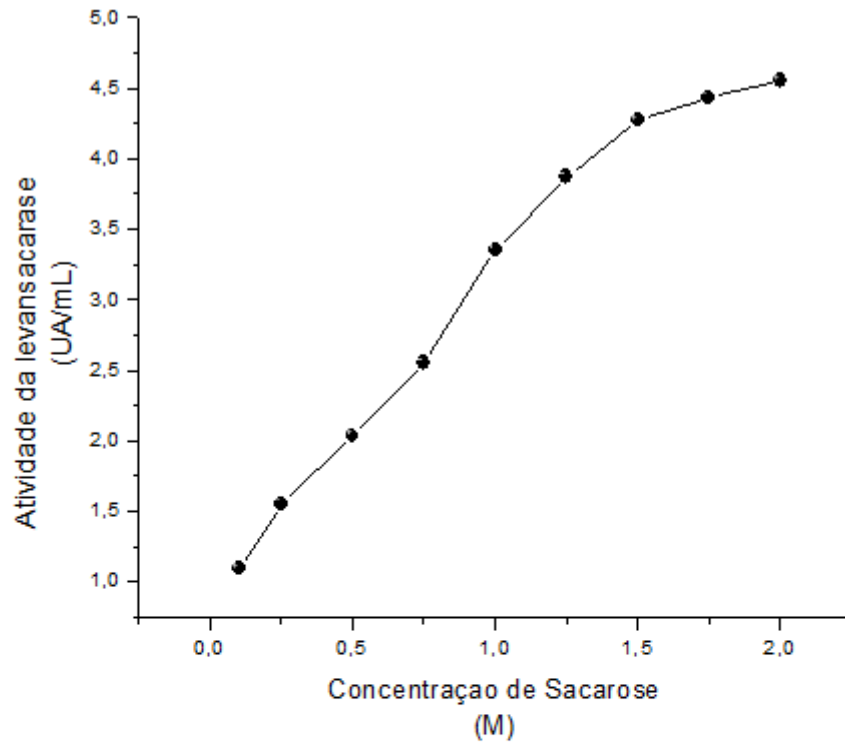
Concentração (M)	Atividade relativa (%)								
	NaCl	KCl	$\text{ZnCl}_2$	$\text{BaCl}_2$	$\text{CaCl}_2$	$\text{MnCl}_2$	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$\text{FeSO}_4$	$\text{CuSO}_4$
0.2	92	94	86	56	77	55	103	63	53
0.4	114	119	112	59	68	56	103	54	74
0.6	105	121	114	73	60	53	121	65	75
0.8	102	133	133	81	56	55	157	66	80

- Especificidade da LS pelo substrato sacarose

O  $K_m$  foi de  $313 \text{ mmol}^{-1}$ , obtido na condição otimizada neste estudo de pH e temperatura para a atividade da LS, indicando que a enzima possui baixa afinidade pelo substrato. Os valores de  $K_m$  reportados na literatura variam de 4.0 e 160 mM, para *B. subtilis* e *Bacillus megaterium* os valores encontrados foram 4.0 e 6 mM respectivamente (Gay et al., 1983, Van Hijun et al., 2000, Homann et al., 2007), para *Gluconobacter diazotrophicus*, 11.8 mM (Hernández et al., 1995), *Z. mobilis*,

122 mM (Yanase et al., 1992) e *Pseudomonas s. phaseolicola*, 160.0 mM (Hettwer et al., 1995)

**Figura 5** – Determinação da Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) da LS de *B. subtilis* Natto.



## Conclusões

O *B. subtilis* Natto demonstrou ser uma cepa eficiente na produção de levana, pois apresentou desempenho superior quando comparado às cepas testadas nos demais trabalhos, alcançando rendimentos até 75% mais altos.

A avaliação da influência dos sais NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na produção da enzima indicou que todos promoveram aumento da atividade da LS e da produção de LV, com inibição do crescimento celular, com destaque para o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que inibiu em 80% o crescimento do micro-organismo, facilitando a separação das células e obtenção do biopolímero e da enzima, aumentou em 100% a atividade da LS e em 200% a produção de LV. A influência de sais na atividade da enzima também foi testada e, apesar da LS não utilizar metais como cofator, o KCl, ZnCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> demonstraram-se indutores, o NaCl não promoveu alterações no comportamento da enzima, indicando um possível sinergismo entre o metal e o radical, e os demais sais, todos compostos por íons bivalente, inibiram a atividade.

A enzima pode ser considerada termoestável, pois se manteve ativa durante 4 dias a 30°C, com pequenas quedas de atividade a 50°C, mantendo 20% de atividade após 10 dias.

Os resultados aqui obtidos demonstram que a cepa de *B. subtilis* Natto é promissora, devido à possibilidade de otimização da produção de LV e que a LS é termoestável e termoativada a 30°C, com potencialização da sua produção pelo micro-organismo quando adicionado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ao meio de cultivo. Este sal também se demonstrou indutor da atividade da enzima.

## Referências

- Abdel-Fattah, A., Mahmoud, D. A. R., & Esawy, M. A. T. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology*, *51*, 402-407.
- Ahmed, S. A. (2008). Optimization of production and extraction parameters of *Bacillus megaterium* levansucrase using solid-state fermentation. *Journal of Applied Sciences Research*, *4* (10), 1199-1204.
- Ammar, Y. B., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., & Minamiura, N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology*, *99*, 111-119. (a)
- Ammar, Y. B., Matsubara T., Ito, K., Iizuka, M., & Minamiura, N. (2002). Some properties of levansucrase of *Bacillus natto* stabilized with periodate oxidized yeast glucomannan. *Enzyme and Microbial Technology*, *30*, 875-882. (b)
- Ananthalakshmy, V. K.; Guanasekaran, P. (1999). Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *87* (2), 214-217.
- Ascêncio, S. D., Orsato, A., França, R. A., Duarte, M. E. R., & Nosedá, M. D. (2006). Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignment of digeneaside, a low-molecular-mass carbohydrate produced by red seaweeds. *Carbohydrate Research*, *341*, 677-682.
- Beckers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., & Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, *38*, 701-706.
- Bergeron, L. J.; Morou-Bermudez, E.; Burne, R. (2000). A Characterization of the Fructosyltransferase Gene of *Atinomyces naeslundii* WVU45. *Journal of Bacteriology*, *182* (13), 3649-3654.
- Borsari, R. R. J., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B., & Silva, R. S. S. F. (2006). *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, *26* (3), 604-609.
- Brooks, G. F.; Butel, J. S; & Morse, S. A. (2000). *Microbiologia Médica*. (21th ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (Pag. 158).
- Calazans, G. M. T., Lopes, C. E., Lima, R. M. O. C., & França, F. P. (1997). Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, *19*, 19-21.
- Calazans, G. M. T., Lima, R. C., França, F. P., & Lopes, C. E. (2000). Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *27*, 245-247.

- Carlsson, J. (1970). A levansucrase from *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 4, 97-113.
- Castillo, E., & Lopez-Munguia, A. (2004). Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *Journal of Biotechnology*, 114, 209–217.
- Cote, G. L. (1988). Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Biotechnology Letters*, 10 (12), 879-882.
- Dahech, I., Belghith, K. S., Hamden, & K. Feki, A. (2011). Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 742-746.
- Dawes, E. A., Ribbons, D. W., & Rees, D. A. (1966). Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of levan. *Biochemistry Journal*, 98, 804-812.
- Dedonder, R. (1966). Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Enzymes of Complex Saccharide Synthesis*, 86, 500-505.
- Doelle, H. W. & Greenfield, P. F. (1985). Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 152-157.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Mais examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951-962.
- Esawy, M. A., Ahmed, E. F., Helmy W. A., Mansour, N. M., El-Senousy, W. M., & El-Safty, M. M. (2011). Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. *Carbohydrate Polymers*, 86, 823-830.
- Euzenat, O., Guiber, A., & Combes, D. (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*, 32 (3), 237-243.
- Fleuri, L. F., & Sato, H. H., Study of different parameters in the production of lytic enzymes. (2008). *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 28, 299-310.
- Goldman, D., Lavid, N., Schwartz, A., Shohan, G., Danino, D., & Shoham, Y. (2008). Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (47), 32209-32217.
- Harwood, Cr. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Biotechnol*, 10, 247-256.
- Kang, J. E., Lee, S. O., Lee, J. D., Lee, Th. H. (1999). Purification and characterization of a levanbiose producing levanase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 263-269.
- Le Gorrec, K., Connes, C., Guibert, A., Uribelarrea, J. L., & Combes, D. (2002). Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working

- on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 and 11872 supernatant. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 44-52.
- Leibovici, J., Borit, A., Sandbank, U., & Wolman, M. (1979). The role of macrophages and polymorphs in the levan-induced inhibition of lewis lung carcinoma in C57BL mice. *British Journal of Cancer*, 40, 597-606.
- Lyness, E.; Doelle, H. W. (1980). Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, 2 (12), 549-554.
- Lyness, E.; Doelle, H. W. (1981). Ethanol production from cane juice by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 3 (5), 257-260.
- Lyness, E.; Doelle, H. W. (1983). Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 5 (5), 345-350.
- Melo, I. R., Pimentel, M. F., Lopes, C. E., Calazans, G. M. T. (2007) *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 45-51.
- Nelson, N. A. A. (1944). Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *The Journal of Biological Biochemistry*, 153, 375 - 380.
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M., & Biosca, E. G. (2010). Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. *Research in Microbiology*, 161, 549-555.
- Pabst, M. J. (1977). Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infection and Immunity*, 15 (2), 518-526.
- Park, H. E., Park, N. H., Kim, M. J., Lee, T. H., Lee, H. G., Yang, J. Y., & Cha, J. (2003). Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 820-827.
- Paul, A., Samaddar, N., Dutta, D., Bagchi, A., Chakravorty, S., Chakravorty, W., & Gachhui, R. (2011). Mercuric ion stabilizes levansucrase secreted by *Acetobacter nitrogenifigens* strain RG1<sup>T</sup>. *Protein Journal*, 30, 262-272.
- Poli, A., Kazak, H., Gurleyendag, B. Tommonaro, G. Pieretti, G., Oner, E. T., & Nicolaus, B. (2009). High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrate Polymers*, 78, 651-657.
- Shih, I.; Shieh, Y.; Yu, C., & Hsieh, C. (2005). Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53, 8211-8215.
- Shih, I. L., Chen, L. D., & Wu, J. Y. (2010). Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. *Carbohydrate Polymers*, 82, 111-117.

- Somogyi, M. A. (1952) A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry*, 160, 61-68.
- STATISTICA for windows v. 7. (2006). Tulsa, OK, USA: Statsoft.
- Tanaka, T., Oi, S., & Yamamoto, T. (1979) Synthesis of levan by levansucrase: Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *Journal of Biochemistry*, 85, 287-293.
- Théodore, K., & Panda, T. (1995) Applications of response surface methodology to evaluate the influence of temperatures and initial pH on production of  $\beta$ -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 1043-1049.
- Van Hijum, S. A. F. T., Bonting, K., Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2001). Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 323-328.
- Vigants, A., Kruce, R., Bekers, M., & Zikmanis, P. (1998). Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. *Biotechnology Letters*, 20 (11), 1017-1019,
- Viikari, L., & Gisler, R. (1986). By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 240-244.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., & Vigants, A. (2011) Levansucrases from *Pseudomonas syringae* PV. Tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. *Journal of Biotechnology*, 155, 338-340.
- Wang, J. K., Chiu, H. H., & Hsieh, C. S. (2009). Optimization of the medium components by statistical experimental methods to enhance nattokinase activity. *Fooyin Journal of Health Science*, 1 (1), 21-27.
- Wei, Q.; & Chang, S. K. C. (2004). Characteristics of fermented Natto products as affected by soybean cultivars, *Journal of Food Processing Preservation*, 28, 251-253.
- Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., Kato, N., & Tonomura, K. (1992). Purification, crystallization, and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 56 (8), 1335-1337.
- Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., & Lee, H. G. (2004). Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 37-41.

**ARTIGO B**

**NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE SACAROSE POR BIOCSENSOR DE  
LEVANASACARASE**

**Bruna Caroline Marques-Gonçalves; Luiz Henrique Dall' Antonia; Maria Antonia  
P. Colabone Celligoi\***

## NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE SACAROSE POR BIOCENSORES DE LEVANASACARASE

Bruna Caroline Marques-Gonçalves<sup>4</sup>; Luiz Henrique Dall' Antonia<sup>5</sup>; Maria Antonia P. Colabone Celligoi<sup>a\*</sup>

### Resumo

Biossensores enzimáticos têm sido explorados na área biotecnológica para monitorar substratos, produtos e intermediários, e para detectar e quantificar substâncias de uma forma simples e de baixo custo. Este é o primeiro relato de biossensor desenvolvido a partir da imobilização da enzima levanasacarase para detecção de sacarose. A enzima foi fisicamente imobilizada em pasta de carbono e as suas características cinéticas foram avaliadas. O pH ótimo da enzima imobilizada foi 6,0, coincidindo com o pH ótimo da enzima livre. A concentração de enzima utilizada foi significativa na construção do biossensor, porém a concentração de substrato não apresentou significância no desempenho do eletrodo de trabalho. A imobilização da enzima diminuiu a sua afinidade pelo substrato ( $K_{m\text{ ap.}} = 8,33 \text{ mol L}^{-1}$ ) quando comparada a enzima livre ( $K_m = 3,13 \text{ mol L}^{-1}$ ). A aplicação do biossensor para a quantificação de sacarose em suco de fruta e refrigerante foi bem sucedida, com bom desempenho do equipamento.

**Palavras-chave:** *Bacillus subtilis* Natto. Biossensor. Levanasacarase. Pasta de carbono.

### 1 INTRODUÇÃO

Devido a demanda produtiva das grandes indústrias, análises rápidas, precisas e de baixo custo têm sido priorizadas. Os equipamentos convencionais e de alta precisão, tais como HPLC, UPLC, CG, exigem mão de obra técnica especializada, aparato específico e tempo para que as análises sejam processadas. O emprego de biossensores nessa área tem sido promissor, por se tratar de um equipamento de baixo custo, fácil construção e capaz de proporcionar análises rápidas com resultados precisos devido a sua alta seletividade, possibilitando o monitoramento de substratos, produtos e intermediários (Scheper, 1992, Rossato et al., 2001; Alfaya, 2002).

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil. Contato autor: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Caixa Postal 6001, Brasil. Tel.: +55 43 3371 4513 E-mail: macelligoi@uel.br (M. A. P. C. Celligoi).

<sup>5</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil

Com desenvolvimento do primeiro biossensor de pasta de carbono em 1988, construído a partir da imobilização da enzima glicose-oxidase em carbono grafite e óleo mineral, diversos pesquisadores se direcionaram para este campo, devido à facilidade de obtenção do suporte e rapidez do processo de imobilização por adsorção física, e por este processo poder ser aplicado a uma série de enzimas. Bagal-Kestwal et al. (2008) descreve desvantagens como disponibilidade limitada da enzima, alto custo para sua purificação e baixa estabilidade da enzima pura em solução durante a estocagem. Fatibello-Filho e Vieira (2002) descrevem o emprego de tecidos vegetais e extratos brutos para a construção de biossensores, prática extremamente econômica e que geralmente possui tempo de vida superior aos métodos que utilizam enzimas purificadas, visto que as enzimas naturalmente imobilizadas são mais estáveis e geralmente possuem seu cofator disponível.

A imobilização de levanasacarase por adsorção física, ligação iônica, ligação covalente e aprisionamento, visando maiores rendimentos de produção de levana a partir da sacarose, têm sido descritos por alguns pesquisadores (Chambert e Petit-Glatron, 1993; Iizuka, et al., 1993; Jang et al., 2001; Esawy et al., 2008; El-Rafai et al., 2009), porém este é o primeiro estudo que descreve a aplicação da levanasacarase em biossensores.

A levanasacarase é uma frutossiltransferase, capaz de produzir levana a partir da hidrólise da sacarose, empregando a energia da ligação glicosídica para formar ligações frutósídicas. Isto ocorre através da transferência de resíduos de frutose a um aceptor (Castillo e Lopez-Mungia, 2004), que pode ser a água, alcoóis, rafinose ou outros mono e dissacarídeos, levana e fruto-oligossacarídeos (FOS) (Le Gorrec et al., 2002).

O armazenamento da energia de reação proveniente da hidrólise da ligação glicosídica da sacarose pela levanasacarase torna possível a sua determinação através da voltametria cíclica, um método simples e rápido para se obter informações sobre processos eletroquímicos, como o potencial formal de uma reação, quando as formas oxidadas e reduzidas da mesma são estáveis por tempo suficiente para se obter um voltamograma (Da Silva, 2006).

A detecção de sacarose por alguns biossensores tem sido estudada. Rotariu et al., (2002) desenvolveram um biossensor a partir da imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* e eletrodo potenciométrico de oxigênio e as determinações foram baseadas na atividade respiratória do micro-organismo para

determinar sacarose em bebidas. Haghghi et al. (2004) e Soldatkin et al., 2008 desenvolveram biossensores utilizando as enzimas invertase, mutarotase e glicose oxidase imobilizadas e a detecção da sacarose foi baseada na hidrólise deste açúcar pela enzima invertase, a  $\alpha$ -glicose resultante era isomerizada a  $\beta$ -glicose pela mutarotase para possibilitar a sua detecção pela glicose oxidase. O biossensor descrito neste trabalho foi desenvolvido de forma simples, a partir da imobilização de somente uma enzima, apresentando resultados satisfatórios neste estudo inicial, e que podem ser melhorados.

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi desenvolver um biossensor para a detecção de sacarose baseado na imobilização da levanasacarase. A enzima foi imobilizada em pasta de carbono e quimicamente caracterizada. O biossensor foi aplicado para a quantificação de sacarose em refrigerante e suco de fruta.

## **2 MATERIAL**

### **2.1 EQUIPAMENTOS E ELETRODOS**

Foi realizada uma fermentação em batelada em mesa agitadora orbital e o cultivo foi interrompido em centrifuga refrigerada, para a obtenção do sobrenadante como fonte de enzimas.

As medidas espectrofotométricas para a determinação da atividade da levanasacarase foram obtidas empregando um espectrofotômetro, utilizando cubeta de acrílico de 1,00 cm de caminho ótico.

As medidas de voltametria cíclica foram obtidas utilizando-se um potenciostato PalmSens e célula de vidro, sem compartimento divisório, com capacidade de 30 mL, com tampa de PVC com orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções.

Os eletrodos de trabalho utilizados foram construídos a partir da imobilização da levanasacarase em uma seringa de plástico de 1 mL (seringa clínica para insulina), modificada com um fio de cobre acoplado ao êmbolo e ligado a uma seção de grafite para o contato externo. O contato entre o fio de cobre e a seção de grafite foi melhorado pela aplicação de uma tinta condutiva (Conдумax plus). O contra-eletrodo usado foi de platina e o de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 M).

## 2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para o preparo do tampão Mc Ilvanes foram utilizadas soluções de ácido cítrico 0,1 M, solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e sacarose comercial. Os reagentes utilizados pertencem são das marcas Chemco e Synth.

Para a construção dos biossensores foram utilizados pó de carbono grafite (CG), Fluka e óleo mineral comercial (OM), Nujol, União Química.

## 3 MÉTODOS

### 3.1 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA LEVANASACARASE

O micro-organismo utilizado para a produção da levanasacarase foi o *Bacillus subtilis* Natto, isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Fundação André Tosello.

A levanasacarase foi obtida por fermentação em batelada em mesa agitadora orbital durante 24 h a 37 °C nas condições 250 g L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 7,5 e 160 rpm conforme condição previamente otimizada (dados não disponíveis). O cultivo foi interrompido por centrifugação a 9050 x g durante 15 min, onde as células do micro-organismo foram decantadas e o sobrenadante foi denominado de extrato bruto (EB) e utilizado como fonte de enzimas.

A atividade enzimática foi determinada segundo Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999), onde uma unidade de atividade de polimerização foi expressa como a quantidade de enzimas necessária para polimerizar 1 μmol de açúcar redutor em 1 min sob as condições experimentais.

### 3.2 COMPOSIÇÃO DA PASTA DE CARBONO

A ordem de adição dos componentes para a confecção da pasta de carbono e o desempenho da enzima imobilizada frente ao substrato sacarose foram avaliados. A primeira pasta foi preparada através da maceração em grau de 150 mg de CG e 50 μL de OM com pistilo por 10 min, seguido da adição de 200 μL de EB e maceração por mais 20 min, quando a pasta adquiriu uma consistência adequada e homogênea. A segunda pasta foi preparada através da maceração em grau de 150

mg de CG e 200  $\mu$ L de EB com pistilo por 10 min, seguido da adição de 50  $\mu$ L de OM e maceração por mais 20 min. Imediatamente após o preparo cada pasta foi colocada na extremidade do eletrodo de trabalho. Foi utilizado tampão Mc Ilvanes pH 6,0.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO PH NA EFICIÊNCIA DO BIOSSENSOR

Para o estudo do pH, da concentração da levanasacarase e do substrato na funcionalidade do eletrodo de trabalho foram realizados 18 ensaios variando o volume de EB em 100, 200 e 300  $\mu$ L e o pH em 5,0; 6,0 e 7,0, na ausência e na presença de sacarose, dissolvido em Tampão Mc Ilvanes. A massa do CG e o volume de OM utilizados para o preparo das pastas foram mantidos constantes em 150 mg e 50  $\mu$ L para todos os eletrodos em estudo testados.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LEVANASACARASE E SUBSTRATO NA EFICIÊNCIA DO BIOSSENSOR

Para avaliar a influência da concentração da levanasacarase de *B. subtilis* Natto e da sacarose na eficiência do eletrodo de trabalho foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^2$  com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, com as variáveis independentes: ( $X_1$ ) concentração do agente biológico (29,5 a 170,5  $\mu$ L) e ( $X_2$ ) concentração do substrato (29,5 a 170,5 mM) em tampão Mc Ilvanes pH 6,0.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA LEVANASACARASE

Para verificar a especificidade da levanasacarase pela sacarose a pasta de carbono foi composta por 150 mg de CG, 250  $\mu$ L de EB, 50  $\mu$ L de OM e as concentrações de sacarose 10 a 500 mM em Tampão Mc Ilvanes pH 6,0. Com os valores obtidos foi determinada a constante de Michaelis-Menten aparente ( $K_{m\ ap.}$ ) da enzima.

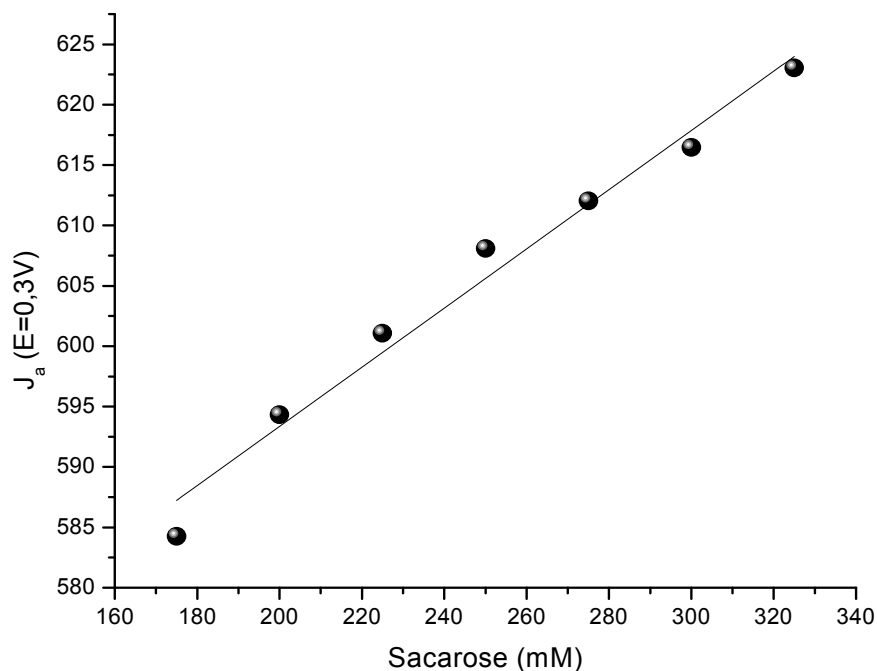
### 3.6 APLICAÇÃO DO BIOSENSOR

O biossensor construído foi utilizado na determinação de sacarose em refrigerante tipo guaraná envasado em lata de alumínio de 350 mL e suco de abacaxi a base de soja envasado em embalagem tetra pak de 1000 mL. Alíquotas de 0,150 mL de guaraná e 0,200 mL de suco de abacaxi foram transferidas para a célula contendo 20 mL da solução tampão Mc Ilvanes pH 6,0.

Os dados nutricionais fornecidos pelo fabricante nas embalagens destacam somente o valor dos açúcares contidos nos líquidos. Para determinar a quantidade de sacarose, os açúcares totais e os açúcares redutores foram quantificados através dos métodos Dubois et al. (1956) e Somogyi (1952) e Nelson (1944) respectivamente. A diferença correspondeu à quantidade de sacarose, e esse valor foi confrontado com o obtido pela análise com o biossensor.

As medidas voltamétricas obtidas através das análises foram confrontadas com uma curva de calibração construída variando a concentração de sacarose de 170 a 330 mM em potencial de 0,3 V (Figura 1).

**Figura 1** – Curva de calibração para determinação de sacarose.



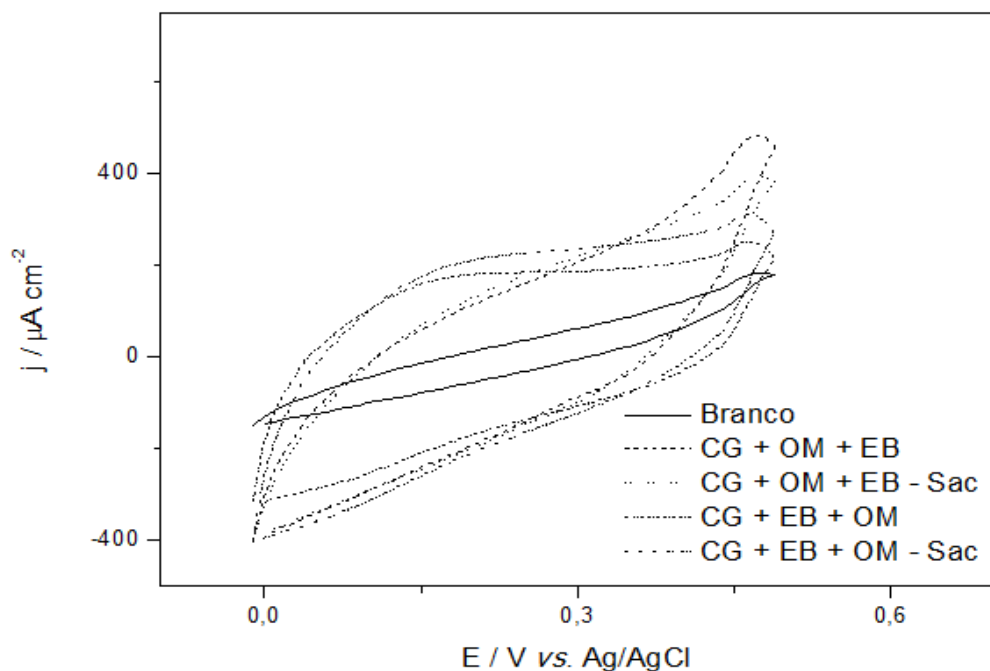
### 3.7 MEDIDAS ELETROANALÍTICAS

As medidas voltamétricas foram realizadas em célula de vidro contendo 10 mL de tampão Mc Ilvanes pH 6,0 em um intervalo de potencial 0 a 1,0 V. Os testes foram realizados com velocidade de varredura de  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ .

#### Resultados e Discussões

Inicialmente foi avaliado o perfil voltamétrico dos eletrodos em estudo em solução tampão Mc Ilvanes pH 6,0 variando a ordem de adição dos componentes durante a confecção da pasta de carbono conforme apresentado na Figura 2. O eletrodo de LS confeccionado pela adição dos componentes na ordem: CG, EB e OM apresentou maior desempenho e pode ser empregado para a detecção de sacarose, pois foi verificado um aumento da densidade de corrente quando adicionado o substrato ao tampão. A levanasacarase catalisa a hidrólise da sacarose em glicose e frutose e síntese de levana a partir da polimerização da frutose resultante e a mudança da densidade de corrente pode ser explicada pela oxidação da extremidade redutora dos monossacarídeos liberados pela enzima após a quebra da sacarose.

**Figura 2** – Voltamograma cíclico para avaliar a ordem de adição dos componentes da pasta de carbono.



Na Tabela 1 estão apresentadas as densidades de corrente observada nos voltamogramas cíclicos em função dos diferentes volumes de EB (100 a 300  $\mu\text{L}$ ) incorporados ao CG em tampão Mc Ilvanes com diferentes valores de pH (5,0 a 7,0), na ausência e na presença de sacarose. Em todos os valores de pH analisados houve um aumento da densidade de corrente com o aumento da concentração de enzimas, tanto na ausência quanto na presença do substrato, e embora tenha havido queda da densidade de corrente em pH 5,0 e 7,0 em todas as concentrações de enzimas quando foi acrescentado o substrato ao tampão, em pH 6,0 houve um incremento dessa densidade quando empregado 200 e 300  $\mu\text{L}$  de EB. A caracterização bioquímica da levanasacarase foi realizada em nossos laboratórios e o pH ótimo para a atividade enzimática foi 6,0 (dados não disponíveis), por esta razão os demais experimentos foram realizados em pH 6,0.

**Tabela 1** – Picos de densidade de corrente para eletrodo de LS em diferentes valores de pH e concentração de enzimas, na presença e na ausência de sacarose, determinados no potencial de 0,3 V.

EB ( $\mu\text{L}$ )	$j_a$ ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ )	
	Tampão	Tampão + Sacarose
pH = 5,0		
100	198,68	96,11
200	312,86	266,22
300	416,82	393,28
pH = 6,0		
100	174,49	60,94
200	223,07	323,67
300	326,94	350,35
pH = 7,0		
100	164,16	67,03
200	249,67	233,42
300	342,08	300,31

**Tabela 2** – Delineamento Composto Central Rotacional  $2^2$  para avaliar a influência das variáveis independentes: ( $x_1$ ) concentração do substrato e ( $x_2$ ) volume de EB na sensibilidade do biossensor. Os resultados foram obtidos no potencial de 0,3 V.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Resposta
	$x_1$	$x_2$	$J_a$ ( $\mu A\ cm^{-2}$ )
1	-	-	60,84
2	-	+	190,16
3	+	-	52,62
4	+	+	203,69
5	-1,41	0	162,91
6	+1,41	0	135,32
7	0	-1,41	31,69
8	0	+1,41	372,09
9	0	0	136,36
10	0	0	138,89
11	0	0	176,94

Códigos	Fatores	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
$X_1$	Sacarose (mM)	29,5	50	100	150	170,5
$X_2$	EB	29,5	50	100	150	170,5

Para a otimização das condições de trabalhos do eletrodo de LS foi aplicado o DCCR  $2^2$  conforme a Tabela 2. Através da análise dos resultados da análise de variância (ANOVA) na Tabela 3 observa-se que houve efeito significativo e positivo para a quantidade de enzimas adicionada à pasta de carbono ( $p < 0,05$ ). A concentração de sacarose ( $p = 0,6523$ ) e a interação entre as variáveis ( $p = 0,6796$ ) não foram significativos. O  $R^2$  (coeficiente de determinação) obtido foi 0,87, de acordo com Joglekar e May (1987) valores acima de 0,80 podem ser considerados aceitáveis.

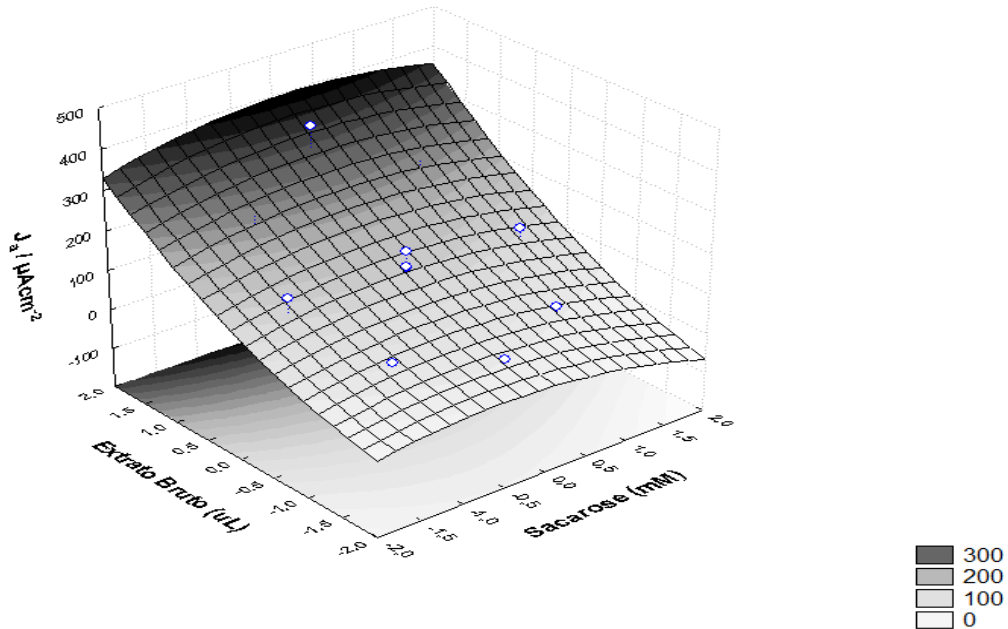
**Tabela 3** – Análise de variância e efeitos para o DCCR  $2^2$ .

Variáveis	SQ	GL	QM	F	p
<b>Concentração de sacarose(L)</b>	142,03	1	142,03	0,2748	0,6525
<b>Concentração de sacarose(Q)</b>	950,87	1	950,87	1,8398	0,3078
<b>Volume de EB (L)</b>	72540,18	1	72540,18	140,3578	0,0071
<b>Volume de EB (Q)</b>	1015,69	1	1015,69	1,9653	0,2960
<b>1L x 2L</b>	118,27	1	118,27	0,2288	0,6796
<b>Falta de Ajuste</b>	10034,68	3	3344,89	6,4720	0,1368
<b>Erro puro</b>	1033,65	2	516,82		
<b>SQ Total</b>	86654,41	10			

A superfície de resposta está representada na Figura 3 na forma de um plano ascendente, indicando que maiores densidades de corrente foram

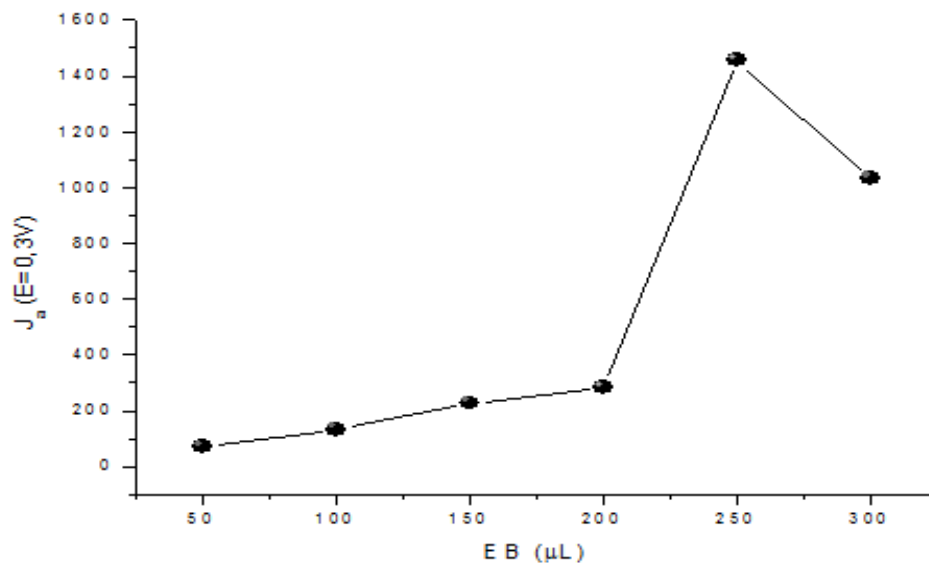
alcançadas em maiores volumes de EB e valores intermediários do substrato sacarose.

**Figura 3** – Superfície de resposta para densidade de corrente em função do volume de EB e concentração de substrato



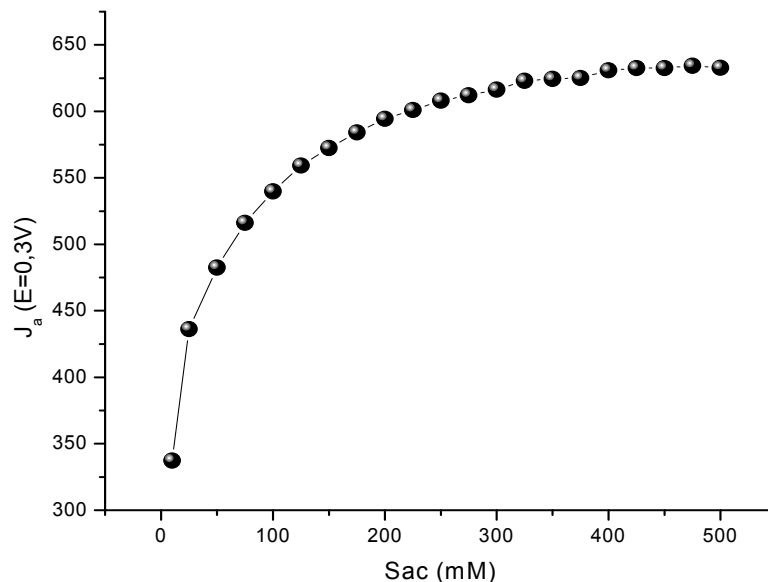
A partir dos resultados obtidos pela metodologia de superfície de resposta foi realizado um *screening* e a melhor quantidade de enzimas a ser incorporada na pasta de carbono foi 250  $\mu\text{L}$  (Figura ).

**Figura 4** – Densidade de corrente para diferentes concentrações de enzima incorporada na pasta de carbono para construção do eletrodo de LS.



O  $K_{m\text{ ap}}$  obtido foi  $8,33\text{ mol L}^{-1}$  (Figura 5). Esta variável também foi obtida bioquimicamente (dados não mostrados), correspondendo a  $K_m = 3,13\text{ mol L}^{-1}$ , indicando que a enzima livre possui maior afinidade pelo substrato, como esperado, pois somente os sítios ativos presentes na interface pasta de carbono e tampão permanecem disponíveis, e ainda o óleo mineral incorporado na pasta de carbono, por ser um agente apolar, tende a repelir as moléculas de água, dificultando o acesso da sacarose solubilizada no tampão até a enzima.

**Figura 5** – Determinação do  $K_m$  da levanasacarase imobilizada.



Segundo as informações nutricionais do fabricante, a quantidade de açúcar no refrigerante corresponde a  $100\text{ mg mL}^{-1}$ , e no suco de abacaxi,  $65\text{ mg mL}^{-1}$ . As análises laboratoriais indicaram um teor de  $81,87\text{ mg mL}^{-1}$  de açúcar total no refrigerante, dos quais  $43,82\text{ mg mL}^{-1}$  correspondem a açúcares redutores e  $38,05\text{ mg mL}^{-1}$  a sacarose; a quantificação pelo o biossensor indicou  $31,44\text{ mg mL}^{-1}$  de sacarose (82,63%). As análises laboratoriais indicaram um teor de  $73,93\text{ mg mL}^{-1}$  de açúcares totais, dos quais  $47,91\text{ mg mL}^{-1}$  corresponde a açúcares redutores e  $26,06\text{ mg mL}^{-1}$  a sacarose. A quantificação pelo biossensor indicou sacarose na concentração de  $23,70\text{ mg mL}^{-1}$  (91,10%).

## Conclusões

Os demais biossensores desenvolvidos para detecção de sacarose envolvem um sistema complexo de enzimas para a quebra do açúcar e detecção da glicose liberada. O biossensor descrito neste estudo é capaz de detectar a sacarose com a imobilização de somente uma enzima, de forma rápida e fácil. O biossensor apresentou bom desempenho na determinação e quantificação de sacarose em suco de fruta e refrigerante, sendo necessários mais estudos para aprimoramento.

O pH ótimo de trabalho observado para a enzima imobilizada foi 6,0, coincidindo com o da enzima livre. Segundo a análise estatística a quantidade de enzimas imobilizadas foi significativa, e a concentração de substrato não apresentou significância no desempenho do eletrodo de trabalho. A imobilização da enzima em pasta de carbono diminuiu a sua afinidade pelo substrato ( $K_{m\text{ ap.}} = 8,33 \text{ mol L}^{-1}$ ) quando comparada a enzima livre ( $K_m = 3,13 \text{ mol L}^{-1}$ ).

## Referências

- Alfaya, A. A. S., Kubota, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de SOL-GEL na construção de biossensores. *Quim. Nova*, 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
- Bagal, D. S.; Vijayan, A. Aiyer, R. C.; Karekar, R. N.; Karve, M. S. Fabrication of sucrose biosensor based on singles mode planar optical waveguide using co-immobilized plant invertase and GOD. *Biosens. Bioelectron.*, v. 22; p. 3072-3079, 2007.
- Carlsson, J. A levansucrase from *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, v. 4, p. 97-113. (1970).
- Castillo, E.; Lopez-Munguia, A. Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *J. Biotechnol.*, v. 114, p. 209–217, 2004.
- Dawes, E. A.; Ribbons, D. W.; Rees, D. A. Sucrose utilization by *Zymomons mobilis*: formation of levan. *Biochem. J.*, v. 98, p. 804-812, 1966.
- Dedonder, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Enzymes Complex Saccharide Synthesis*, v. 86, p. 500-505, 1966.
- Dubois, M. et al. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, Minnesota, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C. Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.
- Joglecar, A. N.; May, A. T. Product excellence through design of experiments. *The American Association of Cereal Chemists*, v. 32, n. 12, p.859-868, 1987.
- Le Gorrec, K.; Connes, C.; Guibert, A.; Uribealrea, J. L.; Combes, D. Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 and 11872 supernatant. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 44-52, 2002.
- Leite, O. D.; Desenvolvimento e aplicação de um biossensor da pasta de carbono modificado com extrato bruto de *Pleurotus ostretus*. 2002. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia-Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.
- Leite, O. D.; Fatibello-Filho, O.; Barbosa, A. M, Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Formulations using a Biosensor Modified with a crude extract of Fungi Laccase (*Pleurotus ostretatus*). *Journal Brazilian of Chemical Society*, v. 14 n. 2, p. 297-303, 2003.
- Nelson, N. A. A. Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *The Journal of Biological Biochemistry*, Cincinnati, v.153, p. 375 - 380,1944.

Ordax, M.; Marco-Noales, E.; López, M. M.; Biosca, E. G. Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovoral* under copper stress throught differente strategies. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 549-555, 2010.

Pabst, M. J. Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. **Infection and Imunity**, v. 15, n. 2, p. 518-526, 1977.

Poli, A.; Kazak, H.; Gurleyendag, B.; Tommonaro, G.; Pieretti, G.; Oner, E. T.; Nicolaus, B. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growinh on defined media. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 651-657, 2009.

Rossato, S. S., Freire, R. S.; Durán, N.; Kubota, L. T. Biossensores amperoétricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interessa ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

Rotariu, L., Bala, C., Magearu, V. Yeast cells sucrose biosensor based on a potentiometric oxygen electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 215-222, 2002.

Scheper, T., Biosensors for process monitoring. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 163-172, 1992.

Soldatkin, O. O., Peshkova, V. M., Dzyadevych, S. V., Soldatkin, A. P., Jaffrezic-Renaul, N., El'skaya, A. V. Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor. **Materials Science & Engineering**, v. 28, p. 959-964, 2008.

Somogyi, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, [s. l.], v. 160, p 61 – 68, 1952.

Statistica for windows v. 7. (2006). **Tulsa, OK, USA: Statsoft.**

Van Hijum, S. A. F. T.; Bonting, K.; Maarel, M. J. E. C; Dijkhuizen, L. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 323-328, 2001.

Visnapuu, T.; Mardo, K.; Mosoarca, C.; Zamfir, A. D.; Vigants, A. Levansucrases from *Pseudomonas syringae* PV. Tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. **Journal of Biotechnology**, v. 155, p. 338-340, 2011.

## CONCLUSÕES

A condição otimizada para a produção da levanasacarase foi 300 g L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 7,5 e 160 rpm com atividade de 8,57 UA mL<sup>-1</sup>. Embora já tenham sido reportadas atividades mais altas na literatura, a produção de levana por esta cepa superou as produções observadas por outros autores para este bacilo, atingindo rendimentos de até 205.93 g L<sup>-1</sup>, tornando-se uma cepa interessante para estudos de otimização da produção deste polissacarídeo.

Os cultivos realizados na condição otimizada para a avaliação da influência dos sais NaCl, KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na produção da enzima indicaram que todos promoveram aumento da produção da levanasacarase e de levana e inibiram o crescimento celular, com destaque para o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que inibiu em 80% o crescimento do *B. subtilis* Natto, aumentou em 100% a produção da enzima e em 200% a de levana. Apesar da levanasacarase não utilizar metais como cofator, os sais KCl, ZnCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> contribuíram com aumento significativo da atividade enzimática. O NaCl não promoveu alterações no comportamento da enzima, indicando um possível sinergismo entre o metal e o seu radical, e os demais sais, todos íons bivalentes, foram inibidores da atividade. Estudos relatam forte inibição desta enzima pelos íons Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> por mecanismo desconhecido, e descrevem o Ca<sup>2+</sup> como estabilizador, discordando deste estudo.

A temperatura e o pH ótimos observados para a atividade da levanasacarase foram 50°C e 6,0. A enzima foi termo-ativada quando incubada a 30°C e se manteve estável por 4 dias, com queda gradativa de atividade, conservando 20% após 10 dias. A termo-estabilidade também foi observada a 50°C. O K<sub>m</sub> da enzima (K<sub>m</sub> = 313 mM) indicou baixa afinidade pelo substrato.

O eletrodo de trabalho do biossensor foi composto por 250 µL de EB, 50 µL de OM e 150 mg de CG. O pH ótimo da enzima imobilizada foi 6,0, concordando com o da enzima livre, e o K<sub>m ap</sub> = 833 mM, indicando que a enzima imobilizada possui menor afinidade pela sacarose quando comparada com a livre. As análises realizadas com o biossensor para identificação de sacarose em refrigerante e suco de abacaxi foram bem sucedidas, tornando-se uma alternativa promissora para a quantificação deste açúcar de forma rápida e econômica.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. F.; MAHMOUD, D. A. R.; ESAWY, M. A. T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NCR 33A and enzyme synthesis of levan and fructo-oligosaccharids. **Current Microbiology**, v. 51, p. 402-407, 2005.
- AHMED, S. A. Optimization of production and extraction parameters of *Bacillus megaterium* levansucrase using solid-state fermentation. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 4, n. 10, p. 1199-1204, 2008.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
- AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; IIZUKA, 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.; GUANASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 214-217, 1999 (a).
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUANASEKARAN, P. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 109-115, 1999 (b).
- BABÉ, L. M.; SCHIMIDT, B. Purification and biochemical analysis of WprA, a 52-kDa serine protease secreted by *B. subtilis* as an active complex with its 23-kDa propeptide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 13386, p. 211-219, 1998.
- BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; GRUBE, M.; LAUKEVICS, J.; VIGANTS, A.; ZIKMANIS, P. Fructan biosynthesis by intra and extracellular *Zymomonas mobilis* levansucrase after simultaneous production of ethanol and levan. **Acta Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 85-93, 2003.
- BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, 40, 1535 – 1539, 2005.
- BEZZATE, S.; AYMERCH, S.; CHAMBERT, R.; CZARNES, S.; BERG, O.; HEULIN, T. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. **Environment Microbiology**, v. 2, p. 333-342.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v.31, p. 1639-1650, 2009.
- 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. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 604-609, 2006.

- BORSARI, R. R. J.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S; CELLIGOI, M. A. P. C. Evaluation of supplementation of sucrose médium on the synthesis of *Zymomonas mobilis* bio-products. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 3, p. 229-233, 2010.
- CALAZANS, G.M.T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. A . Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245-247, 2000.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. M.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, 32, n. 1, p. 15-187, 2009.
- CHAMBERT, R. TREBOUL, G.; DEDONDER, R. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 235-300, 1974.
- CHAMBERT, R. GONZY-TREBOUL, G. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation process. **European Journal of Biochemistry**, v. 62, p. 55-64, 1976.
- CHAMBERT, R.; PETIT-GLATRON, M. F. Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrow by *Bacillus subtilis* levansucrase. **Carbohydrate Research**, v. 191, p. 117-123, 1989.
- CHAMBERT, R.; PETIT-GLATRON, M. F. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. **Carbohydrate Research**, v. 244, p. 129-136, 1993.
- CHAMBERT, R.; PETIT-GLATRON, M. F. Anionic polymers of *Bacillus subtilis* cell wall modulate the folding rate of secreted proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p.43-47, 1999.
- COTE, G. L. Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 12, p. 879-882, 1988.
- DA SILVA, R. C.. Preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados com ditiocarbamatos para a análise de fármacos. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia-Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.
- DAHECH, I.; BELGHITH, K. S.; HAMDEN, K.; FEKI, A. Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 742-746, 2011.
- DEDONDER, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. **Enzymes of Complex Saccharide Synthesis**, v. 86, p. 500-505, 1966.
- EL-REFAI, H. A.; ABDEL-FATTAH, A. F.; MOSTAFA, F. A. Immobilization and properties of *Bacillus circulans* levansucrase. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 51, p. 149-156, 2009.

ESAWY, M. A.; MAHMOUD, D. A. R.; FATTAH, A. F. A. Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 2, p. 237-246, 2008.

ESAWY, M. A., AHMED, E. F.; HELMY, W. A.; MANSOUR, N. M.; EL-SENOUSY, W. M.; EL-SAFETY, M. M. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 823-830, 2011.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 237-243, 1997.

FOUET, A.; ARNAUD, M.; KLIER, A. RAPOPORT, G. Characterization of the precursor form of the exocellular levansucrase from *Bacillus subtilis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 119, n. 2, p. 795-800, 1984.

GHAZY, I.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; FERRER, M. BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Purification and kinetic properties of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal Biotechnology**, v. 128, p. 204-211, 2007.

GEIER, G.; GENDER, K. K. Characterization and influence of virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. **Physiol Mol Plant Pathol**, v. 42, p. 387-404, 1993.

GONZY-TREBOUL, G.; CHAMBERT, R.; DEDONDER, R. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: reexamination of some physical and chemical properties. **Biocchimie**, v. 57, p. 17-28, 1975.

GORREC, K.L; CONNES, C; GUIBERT, A; URIBELARREA, JL; COMBES, D. Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 and 11872 supernatant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 44-52, 2002.

GUY, P.; LE COQ, D. STEINMENTZ, M.; FERRARI, E.; HOCH, J. A. Cloning structural gene *sacB*, wich codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherechia coli*. **Journal Bacteriology**, v. 153, p. 1424-1431, 1983.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Applied Mocrinology and Biotechnology**, v. 79, p. 589-596, 2008.

HÉRNANDEZ, L.; ARRIETA, J.; MENENDEZ, C. VAZQUEZ, R.; COEGO, A.; SUAREZ, V.; SELMAN, G. PETIT-GLATRON, M. F. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. **Biochemistry Journal**, v. 309, p. 113-118, 1995

HETTWER, U.; GROSS, M.; RUDOLPH, K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas siringae* pv. phaseolicola. **Jounal of Bacteriology**, v. 177, p. 2834-2839, 1995.

HEYER, A. G.; WENDERBURG, R. Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. **Applied Environment Microbiology**, v. 67, p. 363-370, 2001.

HOMANN, A.; BIEDENDIECK, R.; GÖTZE, S.; JAHN, D. SEIBEL, J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry Journal**, v.407, p.189-198, 2007.

JANG, K. I.; SONG, K. B.; PARK, B. S.; KIM, C. H.; CHUNG, B. H.; CHOUE, R. W.; LEE, K. S.; LEE, C.; CHUN, U. H.; RHEE, S. K. Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 339-343, 2001.

KANG, H. K.; SEO, M. Y.; SEO, E. S.; KIM, D.; CHUNG, S. Y.; KIMURA, A.; DAY, D. F.; ROBYT, J. F. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1727, p. 5-15, 2005.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

LEIBOVICI, J.; BORIT, A.; SANDBANK, U.; WOLMAN, M. The role of macrophages and polymorphs in the levan-induced inhibition of lewis lung carcinoma in C57BL mice. **British Journal of Cancer**, 40, 597-606, 1979.

LEITE, O. D.; Desenvolvimento e aplicação de um biossensor da pasta de carbono modificado com extrato bruto de *Pleurotus ostretus*. 2002. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia-Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.

LIMA, R. S.; NUNES, G. S. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos. Estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 9-17, 2007.

LOUZADA, E.S.; LUCCAS, P. O.; MAGALHÃES, C. S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Revista Analytica**, n. 11, p. 52-57, 2004.

LYNESS, E.; DOELLE, H. W. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 12, p. 549-554, 1980.

LYNESS, E.; DOELLE, H. W. Ethanol production from cane juice by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 3, n. 5, p. 257-260, 1981.

LYNESS, E.; DOELLE, H. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 5, p. 345-350, 1983.

MATULOVÁ, M.; HUSÁROVÁ, S.; CAPEK, P. SANCELME, M. DELORT, A. M. NMR structural study of fructans produced by *Bacillus* sp. 3B6, bacterium isolated in cloud water. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 501-507, 2011.

MARTINEZ-FLEITZ, CARLOS; ORTIZ-LOMBARDÍA, MIGUEL; PONS, TIRSO; TARBOURIECH, NICOLAS; TAYLOR, EDWARD J., G. ARRIETA; HERNÁNDES, LÁZARO; DAVIES, GIDEON J. Cristal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconocetobacter diazotrophicus*. **Biochemistry Journal**, p. 19-27, 2005.

MANTSALA, P; PUNTALA, M. Comparison of levansucrase from *Bacillus subtilis* and from *Bacillus amyloliquefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 13, p. 395-399, 1982.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, p. 237-256, 2002.

MELO, I. R., PIMENTEL, M. F., LOPES, C. E., CALAZANS, G. M. T. Application of fractional factorial designs to levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 45-51, 2007.

MENG, G.; FURTTNER, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. **Nature Structural Biology**, v. 10, p. 953-941, 2003.

MORALES –ARRIETA, S.; RODRIGUEZ, M. E.; SEGOVIA, L.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; OLVERA-CARRANZA, C. Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. **Gene**, v. 376, p. 59-67, 2006.

NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**, v. 153, p. 376-380, 1944.

OHTSUKA, K.; HINO, S.; FUKUSHIMA, T.; OSAWA, O.; KANEMATSU, T.; UCHIDA, T. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 56, p. 1373-1377, 1992.

OLIVARES-ILLANA, V.; WASTER-ODARTE, C.; LE BORGNE, S.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain from *Pozol*, a fermented corn beverage of Mayan origin. **Journal Ind Microbiology and Biotechnology**, 2002.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 177-183, 2007.

PABST, M. J. Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. **Infection and Immunity**, v. 15, p. 518-526.

PASCAL, M.; KUNST, F.; LEPESANT, J.-A.; DEDONDER, R. Characterization of two sucrase activities in *Bacillus subtilis* Marburg. **Biochimie**, v. 53, p. 1059-1066, 1971.

REHM, J.; WILLMITZER, L.; HEYER, A. G. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 1305-1310, 1998.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2.ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by in vitro mutagenesis and elevated temperature. **Process Biochemistry**, n. 36, p. 543-548, 2001.

SANTIAGO-HERNÁNDEZ, J. A.; VÁSQUEZ-BAHENA, J. M.; CALIXTO-ROMO, M. A.; XOCONOSTLE-CÁZARES, G. B.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; RUÍZ-MEDRANO, R.; MONTES-HORCASITAS, M. C.; HIDALGO-LARA, M. E. Direct immobilization of a recombinant invertase to Avicel by *E. Coli* overexpression of a fusion protein containing the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* and the carbohydrate-binding domain CBD<sub>Cex</sub> from *Cellulomonas fimi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 172-176, 2006.

SEIBEL, J.; MORARU, R.; GOTZE, S.; BUCHHOLZ, K.; NA'AMNIEH, S.; PAWLOWSKI, A.; HECHT, H. J. Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* Fructosyltransferase (levansucrase). **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2335-2349, 2006.

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.

SHROEDER, V. A. MICHALEK, S. M.; MACRINA, F. I. Biochemical characterization and evaluation of virulence of a fructosyltransferase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* V403. **Infect Immun**, v. 57, p. 3560-3569, 1989

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, [s. l.], v. 160, p.61-68, 1952.

SONG, D. D.; JACQUES, N. A. Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivares* ATCC 25975. **Biochemistry Journal**, v. 341, p. 285-291, 1999.

STATISTICA for windows v. 7.0. **Tulsa, OK, USA: Statsoft**, 2006

TAN, Y. L.; LIU, C. G.; YU, L. J.; CHEN, X. G. Effect of linoleic-acid modified carboxymethyl chitosan on bromelain immobilization onto self-assembled nanoparticles. **Frontiers of Materials Science**, v. 2, n. 2, p. 209-213, 2008.

TANAKA, T.; OI, S.; MASARU, I.; YAMAMOTO, T. Levansucrase of *Bacillus subtilis*. **Agricultural Biotechnology Chemistry**, v. 42, n.2, p. 323-326, 1978.

TIEKING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F.; GÄNZEL, M. G. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 655-663, 2005.

VAN HIJUM, S.A.T.F.; BONTING, K.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 323-328, 2001.

VAN HIJUM, S.A.T.F.; VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H.; RAHAOUI, H.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that high-molecular weight inulin and inulin oligosaccharides. **Applied Environment Microbiology**, v. 68, p.4390-4398, 2002.

VAN HIJUM, S.A.T.F.; SZALOWSKA, E.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. **Microbiology**, v. 150, p. 621-630, 2004.

VELÁZQUEZ-HERNANDES, M. L.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; BRAVO-PATIÑO, A.; CAJERO-JUÁREZ, M.; CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1763-1778, 2009.

VELÁZQUEZ-HERNANDES, M. L.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; CRUZ-VÁZQUEZ, F.; TREJO-CONTRERAS, M. J.; FUENTES-RAMÍRES, L. E.; BRAVO-PATIÑO, A.; CAJERO-JUÁREZ, M.; CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J. *Gluconobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 137-149, 2011.

VIGANTS, A.; ZIKMANIS, P.; BEKERS, M. Sucrose osmolality as a regulator of anabolic and catabolic parameters in *Zymomonas culture*. **Acta Biotechnologica**, v. 16, n. 4, p. 321-327, 1996.

VIGANTS, A. KRUCE, R.; BEKERS, M; ZIKMANIS, P. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 11, p. 1017-1019, 1998.

VIGANTS, A.; HICKE, H. G.; MARX, S. P. A simple and efficient method for the purification of membrane bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 42, p. 415-418, 2001.

VIGANTS, A.; MARX, S. P.; LINDE, R.; ORE, S.; BEKERS, M.; VINA, I.; HICKE, H. G., A novel and simple method for the purification of extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 198-202, 2003.

VIGNOLIE, J. A.; CAZETTA, M. L.; SILVA, R. S. S.; CELLIGOI, M. A. P. C. Influence of high osmotic pressure on sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1169-1175, 2010.

VIIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 240-244, 1986.

WANG, J. K.; CHIU, H. H.; HSIEH, C. S. Optimization of the medium components by statistical experimental methods to enhance nattokinase activity. **Fooyin Journal of Helth Science**, v. 1, n. 1, p. 21-27, 2009.

WILKOLAZKA, A.J.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Use of laccase modified electrode for amperometric detection of plant flavonóides. **Enzyme and Microbial Technology**. v.35, p.238-241, 2004.

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 Reseach**, v. 3, p. 573-579, 1976.

YANASE, H.; IWATA, M.; NAKAHIGASHI, R.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, crystallization, and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 56, n. 8, p. 1335-1337, 1992.

YANASE, H.; IWATA, M.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, crystallization, and properties of the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis*. **Jouanal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 367-369, 1995.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

Relatório Técnico: Identificação de micro-organismos – coleção de culturas tropicais  
– André Tosello – Campinas, SP

### Relatório Técnico

Serviço: Identificação de microrganismos		Relatório: 080120rf	
Interessado: Universidade Estadual de Londrina		Data de Recebimento: 16/10/2008	
<b>Serviço No.</b>	<b>Amostra</b>		
080120-1	Amostra : <i>Bacillus</i> Isolado do Natto		

#### 1. Objetivos:

Identificação de microrganismos por taxonomia convencional.

#### 2. Metodologia utilizada:

- **Identificação de bactérias por Taxonomia clássica convencional.**

Avaliação de características fisiológicas e metabolismo bioquímico pela taxonomia clássica convencional, associada o sistema de testes rápidos de identificação.

A identificação é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados dos copóloos de referência descritas na literatura.

#### 3. Resultados:

Serviço No.	Amostra	Resultados
080120-1	Amostra : <i>Bacillus</i> Isolado do Natto	<i>Bacillus subtilis</i> ; (Ehrenberg 1835) Cohn 1872

#### 4. Bibliografia:

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen disponível em: <http://www.dsmz.de/>

Gordon, R.E.; Haynes, W.C. and Pang, C.Hor-Nay. **The Genus *Bacillus***. Agriculture Handbook Nº 427. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, 1973.

Holt J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.<sup>a</sup>, Stanley J.T., Williams, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9<sup>th</sup> ed. The Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

Sneath, P.H.<sup>a</sup> Endospore-forming Gram positive rods and cocci. In: Sneath P.H.<sup>a</sup>; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. Vol.2.,

Slepecky, R.<sup>a</sup> and Hemphill, H.E. The genus *Bacillus* – Nonmedical. In: Ballows, A; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. and Schleifer, K.H. (Ed.) **The Prokaryotes**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 1982. Vol.II

**Observações:**

As análises foram realizadas nos laboratórios da Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello.

Os resultados têm significação restrita e se aplicam somente às culturas recebidas para análise.

As culturas serão mantidas em nosso laboratório por um período de um mês a partir desta data. Após este período elas serão descartadas.

Data	Emitido por
07/Nov/2008	Aline de Souza Lopes Identificações/Testes e Ensaios - CCT/FAT

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

No. SERVIÇO:

## Tabela Bacillus

Melo de cultura	NA
Temperatura	35°C

Característica da Colônia		Característica da Célula	
Cor	Creme	Forma	Bastonete
Forma	Irregular	Gram	Positivo
Margem	Irregular	Rearranjo	Isolado e aos pares
Superfície	Plana	Presença de Esporos	Sim
Textura	Friável	Forma do Esporo	Elipsoidal
Brilho/Opacidade	Opaca	Local onde esta na célula	Central e subterminal
		Móveis	sim
		Requerimento de Oxigênio	Aeróbico

Testes Preliminares			
Catalase	+	Citrato	+
Oxidase	-	Uréia	-
Indol	-	Hidrolise de Arginina	-
Redução de Nitrato	+	Hidrolise de Lisina	-
Metabolismo fermentativo e oxidativo	Inerte	Hidrolise de Ornitina	-
Crescimento a 30°C	+	Propionato	+
Crescimento a 37°C	+	Esculina	+
Crescimento a 50°C	+	Fenilalanina	-
TSI	Acidifica glicose	Voges Proskauer	+
H <sub>2</sub> S	-	Amido	+
Tirosina	-	Gelatina	+
Crescimento em pH5,7 - SDA	+		

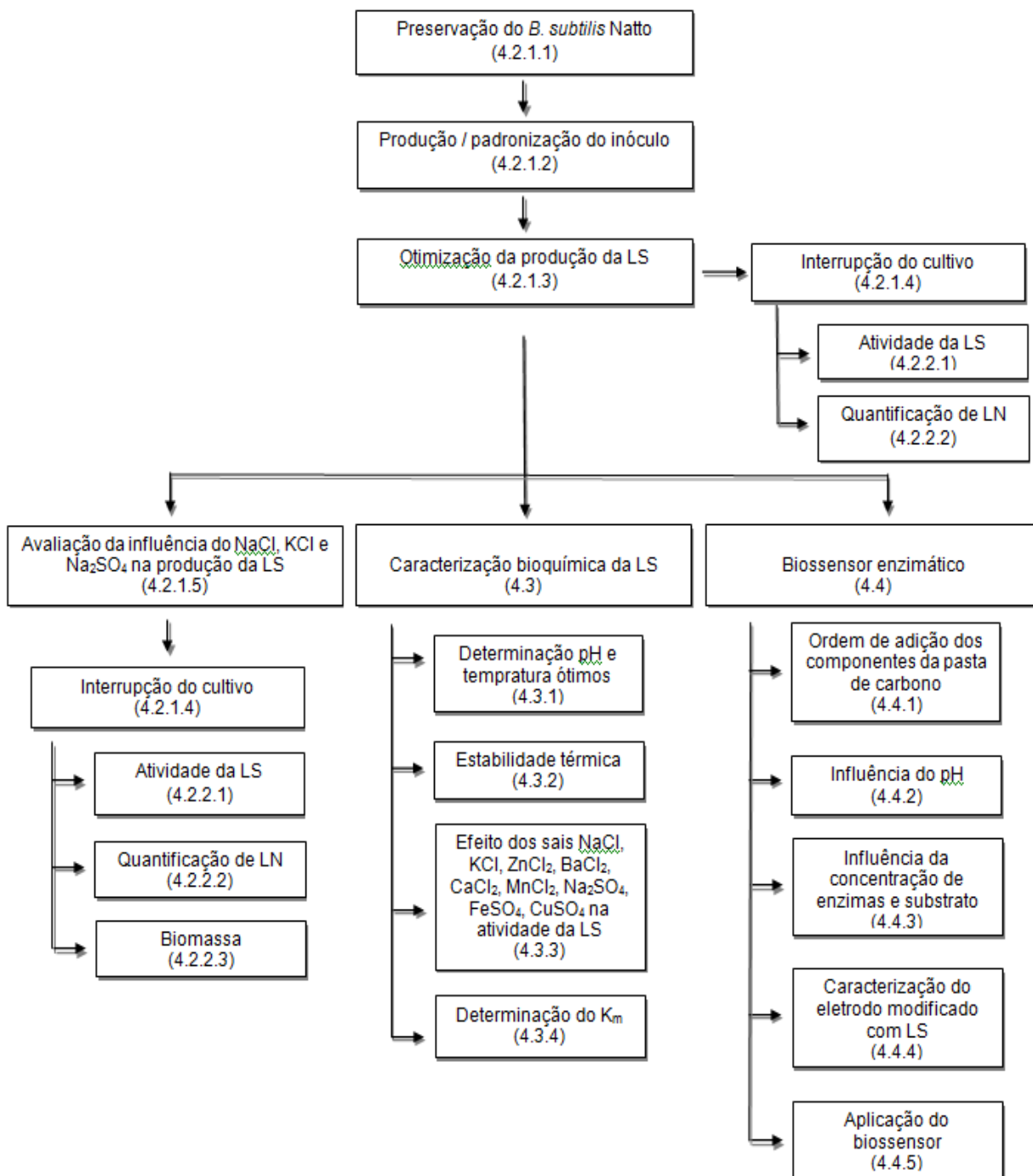
Vitek		API							
SUC – sacarose	+	TRE – trealose	+	GLY – glicerol	+	INO – inositol	+	INU = inulina	+
TZR – vermelho de tetrazólio	-	PLA – palatinosio	+	ERY – eritritol	-	MAN – D-manitol	+	MLZ – D-melezitose	-
TAG – tagatose	-	SOR – sorbitol	+	DARA – D-arabinose	-	SOR – D-sorbitol	+	RAF – D-rafinose	-
GLU – glicose	+	NAU – N-acetil-D-glucosamina	+	LARA – L-arabinose	+	MDM – metil-alfa-D-manopiranosido	-	AMD = amido	+
INO – inositol	-	AMY – amilopectina	+	RIB – D-ribose	+	MDG – metil-alfa-D-glucopiranosido	+	GLYG = glicogênio	+
GAL – galactose	-	KCN- tiocianato de potássio	+	DXYL – D-xilose	-	NAG – N-acetil-glucosamina	-	XLT – xilitol	-
ARA – arabinose	+	NCL – cloreto de sódio 7%	+	LXYL – L-xilose	-	AMY – amigdalina	-	GEN – gentiobiose	-
XYL – xilose	-	MEN – ácido mandélico	+	ADO – D-adenitol	-	ARB – arbutina	-	TUR – D-turanose	+
MAN – manitol	+	OLD = oleandomicina	+	MDX = metil-beta-D-xilopiranosido	+	ESC = esculina citrato de ferro	+	LYX = lixianse	-
RAF – rafinose	-	NAA – acetato de sódio	+	GAL – D-galactose	-	SAL – salicina	-	TAG – D-tagatose	-
SAL – salicina	-	ARB – arabitól	-	GLU – D-glicose	+	CEL – D-celibiose	-	DFUC – D-fucose	-
AGA – amigdalina	-	PAS – poliamido-hidroestreptina	+	FRU – D-frutose	+	MAL – D-maltose	+	LFUC – L-fucose	-
INU = inulina	+	NAE = ácido nalidixico	+	MNE = D-manose	+	LAC = D-lactose (origem bovina)	+	PARI = D-arabitól	-
RIB – ribose	-	ESC – esculina	+	SBE – L-sorbose	-	MEL – D-melibiose	-	LARI – L-arabitól	-
MLT – maltose	+	THRM – termófilo	-	RHA – L-raminose	-	SAC – D-sacarose	+	GNT – glucanato de potássio	-
				DUL – dulcitol	-	TER – D-trealose	+	2KG – 2-cetog lucanato de potássio	-
								5KG – 5-cetog lucanato de potássio	-

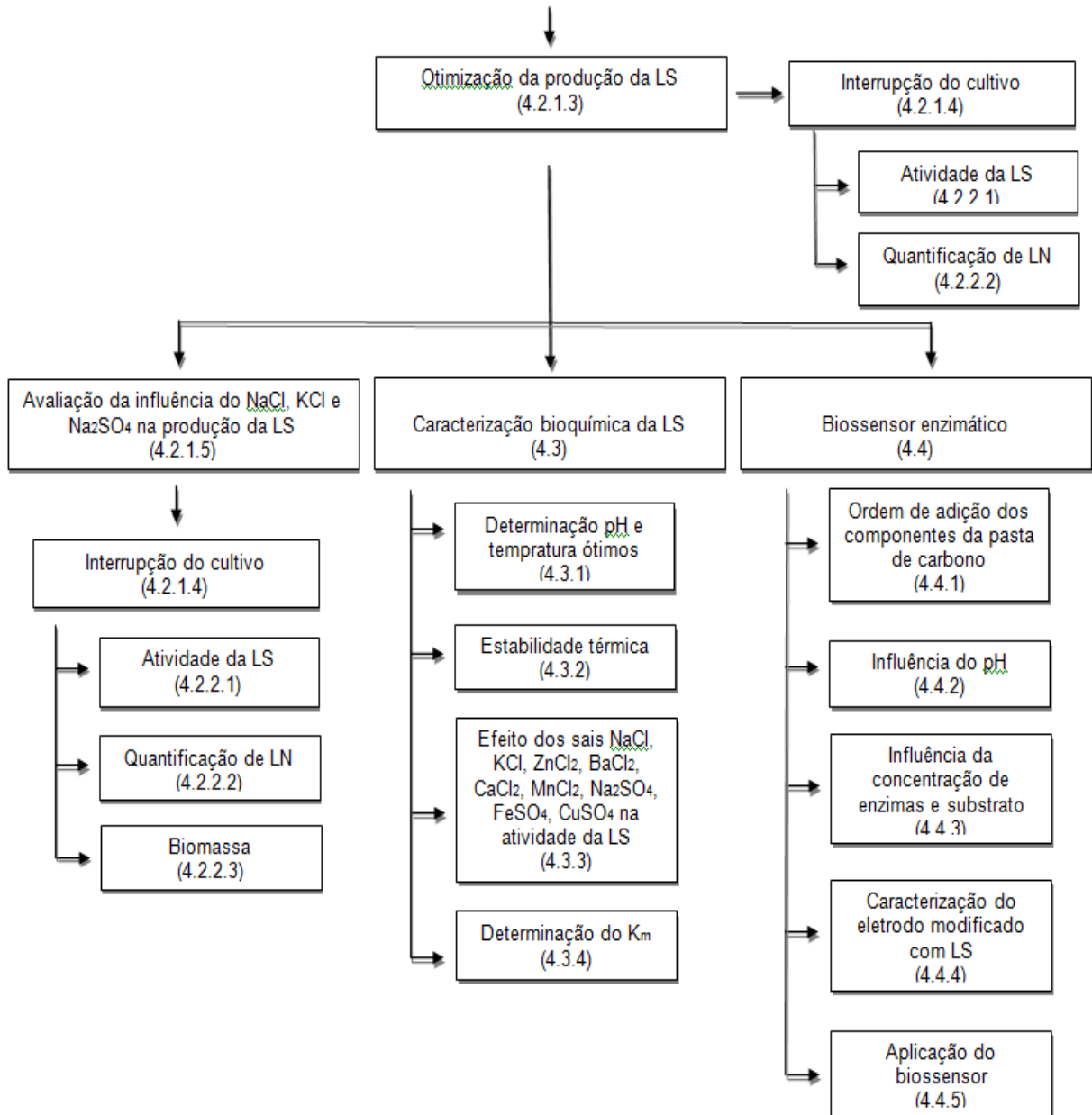
### Resultado da identificação

Identificação foi realizada com testes bioquímicos, sistema de identificação Vitek (porcentagem de identificação de 81%), API (porcentagem de identificação de 98,3%) e comparação com a literatura, resultando: *Bacillus subtilis*

## ANEXO B

## Fluxograma de trabalho





## ANEXO C

### Normas para submissão do Artigo A para a revista Carbohydrate Polymers

#### DESCRIPTION

*Carbohydrate Polymers* covers the study and exploitation of carbohydrate polymers which have current or potential industrial application in areas such as food, textiles, paper, wood, adhesives, biodegradables, biorefining, pharmaceuticals, and oil recovery.

Topics include:

- studies of structure and properties
- biological and industrial development
- analytical methods
- chemical and microbiological modifications
- interactions with other materials

The role of the carbohydrate polymer must be central to the work reported, not peripheral. Research must be innovative and advance scientific knowledge. The journal publishes review papers, original research papers, short communications, and book reviews. Only papers with international relevance are published.

#### AUDIENCE

University and industrial research institutes; users and manufacturers of carbohydrate polymers.

#### IMPACT FACTOR

2010: 3.463 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

AUTHOR INFORMATION PACK 28 Sep 2011 [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol) 2

#### ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS

Chemical Abstracts

Chemical Engineering Biotechnology Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EMBiology

Engineering Index

Food Science and Technology Abstracts

Polymer Contents

SCISEARCH

Science Citation Index

Scopus

Theoretical Chemical Engineering Abstracts

#### EDITORIAL BOARD

##### *Editors*

**J.F. Kennedy**, Advanced Science and Technology Institute, 5 The Croft, Buntsford Drive, Stoke Heath, Bromsgrove, B60 4JE, UK, **Email:** [jfk@chembiotech.co.uk](mailto:jfk@chembiotech.co.uk)

**J.R. Mitchell**, School of Biosciences, Div. of Food Sciences, University of Nottingham, College Road, Sutton Bonington, Loughborough, LE12 5RD, UK, **Email:** [john.mitchell@nottingham.ac.uk](mailto:john.mitchell@nottingham.ac.uk)

##### *Associate Editor*

**R.A.A. Muzzarelli**, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

##### *Editorial Board Members*

**I. Arvanitoyannis**, University of Thessaly, Volos, Greece  
**J.N. BeMiller**, Purdue University, West Lafayette, IN, USA  
**G.G. Birch**, University of Reading, Reading, England, UK  
**B.E. Christensen**, Norwegian University of Science & Technology (NTNU), Trondheim, Norway  
**M.A. Coimbra**, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal  
**Y. Du**, Wuhan University, Wuhan, Hubei, China  
**D.E. Dunstan**, University of Melbourne, Parkville, VIC, Australia  
**Y. Fang**, Shaanxi Normal University, Xi'an, China  
**H.P. Fink**, Fraunhofer Institute for Applied Polymer Research, Potsdam, Germany  
**P. Gatenholm**, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden  
**M. Gidley**, University of Queensland, St Lucia, QLD, Australia  
**P.A.J. Gorin**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Parana, Brazil  
**A. Harada**, Osaka, Japan  
**J. Jane**, Iowa State University, Ames, IA, USA  
**S. Kasapis**, RMIT University, Melbourne, Australia  
**H. Liu**, China University of Geosciences, Wuhan, China  
**P. Methacanon**, Ministry of Science and Technology (Thailand), Pathumthani, Thailand  
**E.R. Morris**, University College Cork, Cork, Ireland  
**V.J. Morris**, Institute of Food Research, Norwich, UK  
**P. Prasertsan**, Prince of Songkla University, Hatyai, Thailand  
**S.B. Ross-Murphy**, King's College London, London, England, UK  
**P.A. Sandford**, Los Angeles, CA, USA  
**P. Seib**, Kansas State University, Manhattan, KS, USA  
**B.C. Simionescu**, Romanian Academy, Iasi, Romania  
**J.F. Thibault**, Institut National de la Recherche Agronomique INR, Nantes, France  
**S. Tokura**, Hokkaido University, Sapporo, Japan  
**A.J. Varma**, National Chemical Laboratory, Pune, India  
**J. Vercellotti**, V-Labs Inc., Covington, LA, USA  
**Q. Wang**, Agriculture and Agri-Food Canada, Guelph, ON, Canada  
**P.A. Williams**, Glyndwr University, Wrexham, England, UK  
 AUTHOR INFORMATION PACK 28 Sep 2011 [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol) 3

## GUIDE FOR AUTHORS

### INTRODUCTION

*Carbohydrate Polymers* covers the study and exploitation of carbohydrate polymers which have current or potential industrial application in areas such as food, textiles, paper, wood, adhesives, biodegradables, biorefining, pharmaceuticals, and oil recovery.

Topics include: studies of structure and properties biological and industrial development analytical methods chemical and microbiological modifications interactions with other materials.

The role of the carbohydrate polymer must be central to the work reported, not peripheral. At least one named carbohydrate polymer must be mentioned in the paper. Research must be innovative and advance scientific knowledge.

Examples of papers which are not appropriate for *Carbohydrate Polymers* include: papers which major in biological, physiological and pharmacological aspects of non-carbohydrate molecules attached to, or mixed with, carbohydrate polymers; papers on the materials science of biocomposites where there is no mention of any specific carbohydrate polymer, or the role of the carbohydrate polymer is not central to the study.

### *Types of paper*

**Original full-length research papers** should contain material that has not been previously published elsewhere, except in a preliminary form. These papers should not exceed 6000 words of text and generally not more than eight figures/tables.

**Review papers** will be accepted in areas of topical interest and will normally emphasise literature published over the previous five years. They should not exceed 12,000 words plus figures, tables and references.

**Short Communications** are research papers constituting a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to literature, and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 2,000 words plus figures, tables and references. They will be reviewed in the same way as research papers.

**Letters to the Editor** are published from time to time on subjects of topical interest.

**Book reviews** are commissioned by the Editors as warranted.

### **Contact details for submission**

Contributors must submit their articles electronically via the Elsevier Editorial System <http://ees.elsevier.com/carbpol> This is the only method of submission, and facilitates processing of your article.

### *Review Process*

A peer review system is used to ensure high quality of papers accepted for publication. The Editors will reject papers without formal review when it is deemed that the paper is 1) on a topic outside the scope of the Journal, 2) lacking technical merit, 3) of narrow regional scope and significance, 4) does not advance scientific knowledge, or 5) is poorly written.

Any revised papers returned later than three months after being sent the referees' comments will be treated as a new submission. When submitting a revised paper authors must list all of the reviewer's comments and indicate how they have responded to the comment, and where in the paper they have made appropriate revisions.

### **Page charges**

This journal has no page charges.

## **BEFORE YOU BEGIN**

### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of

\$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### ***Language and language services***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### ***Submission***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

### ***Referees***

Authors are required to submit with their articles, the names and contact details (including e-mail address) of three potential referees. Please note that the journal may not use your suggestions, but your help is appreciated and may speed up the selection of appropriate reviewers. Your manuscript will be rejected if these names are not provided. Email addresses provided must be current and proven - otherwise processing of your manuscript will be delayed.

## **PREPARATION**

### ***Use of wordprocessing software***

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Pages must be numbered, and lines must be numbered consecutively throughout the manuscript.

### ***Article structure***

*Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Experimental*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### ***Essential title page information***

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author

actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### *Essential title page information*

- **Title.** Concise and informative. The title must not exceed 100 characters (including spaces). Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts should be 100-150 words in length.

#### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title

or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### **Database linking and Accession numbers**

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI)  
(GenBank ID: BA123456)
- PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- MINT: Molecular INTeractions database (MINT ID: 6166710)
- MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.

- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. 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 color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### *Tables*

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Do not exceed a total of 8 figures in your research paper.

### **References**

#### *Citation in 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 recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution

of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication' Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. 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.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

#### *Reference style*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological

Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. Details concerning this referencing style can also be found at <http://linguistics.byu.edu/faculty/henrichsenl/apa/apa01.html>.

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.

*Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (1979). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S.

Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

**Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

**Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge)

and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes
- For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### ***Proofs***

One set of page proofs (as PDF files) 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) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them 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 – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all 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.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. 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.

## **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Do not contact the editors - they do not have access to this information and will not be able to help you.

## ANEXO D

### Normas para submissão do Artigo B para a revista *Biosensors and Bioelectronics*

#### DESCRIPTION

*Biosensors & Bioelectronics* is the principal international journal devoted to research, design, development and application of biosensors and bioelectronics. It is an interdisciplinary journal serving professionals with an interest in the exploitation of biological materials and designs in novel diagnostic and electronic devices including sensors, DNA chips, electronic noses, lab-on-a-chip and  $\mu$ -TAS.

Biosensors are defined as analytical devices incorporating a biological material (e.g. tissue, microorganisms, organelles, cell receptors, enzymes, antibodies, nucleic acids, natural products etc.), a biologically derived material (e.g. recombinant antibodies, engineered proteins, aptamers etc) or a biomimic (e.g. synthetic receptors, biomimetic catalysts, combinatorial ligands, imprinted polymers etc) intimately associated with or integrated within a physicochemical transducer or transducing microsystem, which may be optical, electrochemical, thermometric, piezoelectric, magnetic or micromechanical (Turner et al., 1987; Turner, 1989).

Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S. (1987)  
Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press ISBN: 0198547242

Turner, A.P.F. (1989) Current trends in biosensor research and development. *Sensors and Actuators* 17, 433-450.

Biosensors usually yield a digital electronic signal which is proportional to the concentration of a specific analyte or group of analytes. While the signal may in principle be continuous, devices can be configured to yield single measurements to meet specific market requirements. Examples of Biosensors include immunosensors, enzyme-based biosensors, organism- and whole cell-based biosensors. They have been applied to a wide variety of analytical problems including uses in medicine, biomedical research, drug discovery, the environment, food, process industries, security and defence. The design and study of molecular and supramolecular structures with molecular biorecognition and biomimetic properties for use in analytical devices is also included within the scope of the journal. Here the focus is on the complementary intersection between molecular recognition, nanotechnology, molecular imprinting and supramolecular chemistry to improve the analytical performance and robustness of devices.

The emerging field of Bioelectronics seeks to exploit biology in conjunction with electronics in a wider context encompassing, for example, biological fuel cells, bionics and biomaterials for information processing, information storage, electronic components and actuators. A key aspect is the interface between biological materials and micro- and nano-electronics.

While endeavouring to maintain coherence in the scope of the journal, the editors will accept reviews and papers of obvious relevance to the community, which describe important new concepts, underpin understanding of the field or provide important insights into the practical application, manufacture and commercialisation of biosensors and bioelectronics.

#### AUDIENCE

Biotechnologists, biochemists, bioelectrochemists, analytical chemists, chemical engineers, electronic engineers.

## IMPACT FACTOR

2010: 5.361 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

## ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA

BIOSIS

Bioengineering Telegen Abstracts

Biotechnology Research Abstracts

Cambridge Scientific Abstracts

Chemical Abstracts

Current Biotechnology Abstracts

Current Contents

EMBASE

Environmental Abstracts

Pollution Abstracts

Science Citation Index

Scopus

## EDITORIAL BOARD

### *Editor-in-Chief*

**A.P.F. Turner**, IFM-Department of Physics, Chemistry and Biology, Linköping University, S-58183 Linköping, Sweden, **Email:** biosensors@ep.liu.se

### *Managing Editor*

**A. Tang**, Linköping University, Linköping, Sweden, **Email:** Biosensors@ep.liu.se

### *Editors*

**A. Amine**, Univ Hassan II Mohammedia, Mohammadia, Morocco

**L. Blum**, Université Claude Bernard - Lyon I, Villeurbanne, France

**J.J. Kulys**, Lithuanian Academy of Sciences, Vilnius, Lithuania

**I. Lundstrom**, Linköping University, Linköping, Sweden

**M. Mascini**, Università degli Studi di Firenze, Sesto Fiorentino, Italy

**O. Ramström**, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

**F.W. Scheller**, Universität Potsdam, Golm, Germany

**X.-E. Zhang**, Chinese Ministry of Science and Technology, Beijing, China

### *Editorial Board*

**C. Allender**, Cardiff University, Cardiff, UK

**L. Angnes**, Universidade de São Paulo, Sao Paulo, Brazil

**U. Billitewski**, Gesellschaft für Biotech. Forschung GmbH, Braunschweig, Germany

**L. Campanella**, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italy

**J. Fritz**, International University Bremen, Bremen, Germany

**A.C. García**, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

**S. Gaspar**, International Centre of Biodynamics, Bucharest, Romania

**M.B. Gu**, Korea University, Seoul, South Korea

**H. Gulce**, Selçuk University, Konya, Turkey

**I. Karube**, Research Ctr for Advanced Science & Technology Tokyo, Japan

**E. Katz**, Clarkson University, Potsdam, NY, USA

**F.S. Ligler**, U.S. Naval Research Laboratory, Washington, DC, USA

**S.D. Minteer**, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA

**K. Mitsubayashi**, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

**F. Mizutani**, University of Hyogo, Kamigori, Hyogo, Japan

**D. Moscone**, Università di Roma "Tor Vergata", Roma, Italy

**S.F. Peteu**, Bayer Diabetes Care, Tarrytown, NY, USA

**W. Schumann**, Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany

**K.J. Shea**, University of California at San Francisco (UCSF), San Francisco, CA, USA

**G. Siegel**, Institut für Physiologie, Berlin, Germany

**A. Simonian**, Auburn University, Auburn, AL, USA

**K. Sode**, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Japan

**G.S. Wilson**, University of Kansas, Lawrence, KS, USA

**R. Zehbe**, Technische Universität Berlin (TUB), Berlin, Germany

AUTHOR INFORMATION PACK 1 Feb 2012 [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios) 4

## GUIDE FOR AUTHORS

### ***Aims and Scope***

*Biosensors & Bioelectronics* is the principal international journal devoted to research, design, development and application of biosensors and bioelectronics. It is an interdisciplinary journal serving professionals with an interest in the exploitation of biological materials and designs in novel diagnostic and electronic devices including sensors, DNA chips, electronic noses, lab-on-a-chip and  $\mu$ -TAS.

Biosensors are defined as analytical devices incorporating a biological material (e.g. tissue, microorganisms, organelles, cell receptors, enzymes, antibodies, nucleic acids, natural products etc.), a biologically derived material (e.g. recombinant antibodies, engineered proteins, aptamers etc) or a biomimic (e.g. synthetic receptors, biomimetic catalysts, combinatorial ligands, imprinted polymers etc) intimately associated with or integrated within a physicochemical transducer or transducing microsystem, which may be optical, electrochemical, thermometric, piezoelectric, magnetic or micromechanical. Biosensors usually yield a digital electronic signal which is proportional to the concentration of a specific analyte or group of analytes. While the signal may in principle be continuous, devices can be configured to yield single measurements to meet specific market requirements. Examples of Biosensors include immunosensors, enzyme-based biosensors, organism and whole cell-based biosensors. They have been applied to a wide variety of analytical problems including uses in medicine, biomedical research, drug discovery, the environment, food, process industries, security and defence. The design and study of molecular and supramolecular structures with molecular biorecognition and biomimetic properties for use in analytical devices is also included within the scope of the journal. Here the focus is on the complementary intersection between molecular recognition, nanotechnology, molecular imprinting and supramolecular chemistry to improve the analytical performance and robustness of devices.

The emerging field of Bioelectronics seeks to exploit biology in conjunction with electronics in a wider context encompassing, for example, biological fuel cells, bionics and biomaterials for information processing, information storage, electronic components and actuators. A key aspect is the interface between biological materials and micro- and nano-electronics.

While endeavouring to maintain coherence in the scope of the journal, the editors will accept reviews and papers of obvious relevance to the community, which describe important new concepts, underpin understanding of the field or provide important insights into the practical application, manufacture and commercialisation of biosensors and bioelectronics.

### ***Types of papers***

Full papers should describe original research work not previously published, and should be complete descriptions of full investigations comprising around 5000 words and with up to 6 figures and/or tables.

Short Communications should be concise but complete descriptions of original limited investigations comprising around 3000 words with up to 3 figures and/or tables.

Review Articles should comprehensively cover a subject of current interest, comprise around 8000 words and be extensively referenced. Illustrations and summary tables are encouraged. Contributions may be submitted or invited.

Exceptions to these criteria may be permitted if you discuss your requirements in advance with an Editor.

## BEFORE YOU BEGIN

### ***Ethics in publishing***

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

### ***Policy and ethics***

The work described in your article must have been carried out in accordance with Directive 86/609/EEC for animal experiments <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

### ***Conflict of interest***

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### ***Submission declaration***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### ***Changes to authorship***

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue*: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### ***Copyright***

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the

copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### ***Retained author rights***

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### ***Role of the funding source***

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### ***Open access***

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### ***Language and language services***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### ***Language***

Papers will be published in English. Authors' manuscripts must be consistent in style, spelling and syntax.

### ***Submission***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Please submit your article via <http://www.elsevier.com/locate/bios>

### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

### *Article structure*

#### **Essential title page information**

**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

**Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

**Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Abstract**

The abstract is the part of your paper which will be read by the largest number of scientists so it plays a crucial role. The abstract is a condensation of the information (facts) in the paper and should be brief (150 - 250 words), specific and self-contained including the methods of the research and the principal results. The abstract should not include trivial experimental details, references, figures or equations.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

**1. Introduction**

This section should state the objectives of the work and provide an adequate background. It should also describe briefly the work presented in the paper. Avoid a detailed literature survey or a summary of the results.

**2. Material and methods**

It should provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

**3. Results**

Results should be clear and concise.

**4. Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. A combined Results and Discussion section is often appropriate. The Results and Discussion should deal with the interpretation of the results in the light of previously published findings.

**5. Conclusions**

It should be kept short and must be fully supported by the results reported. The Conclusions section should include the major conclusions, the limitations of the work and the future work.

**Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

*Subdivision - unnumbered sections*

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

*Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

*Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

*Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

*Results*

Results should be clear and concise.

*Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

*Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

The abstract is the part of your paper which will be read by the largest number of scientists so it plays a crucial role. The abstract is a condensation of the information (facts) in the paper; it is not a description of the contents of the paper. The abstract should present as much as possible of the qualitative and quantitative information contained in the paper yet it should be brief (150 - 250 words), specific and self-contained.

The abstract may include the following:

1. The context for the work.
2. The purpose or objectives of the work (what was the research question or problem and why it is important).
3. Theoretical or experimental methods used.
4. Results (qualitative and quantitative).
5. Conclusions and their limitations (what was the meaning of the results).
6. Safety information concerning dangerous compounds or procedures if relevant.

If the paper reports a new instrument or method then the abstract should include a description of its advantages and disadvantages compared to other established techniques. The abstract should not include trivial experimental details, references, figures or equations.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Nomenclature and Units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: <http://www.iupac.org> for further information.

### ***Math formulae***

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### ***Artwork***

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with

the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. 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 color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure.

A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration.

Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations

used. The preferred positions for all figures should be indicated in the text.

#### **Tables**

Please note that a full paper should contain no more than 6 single figures/tables/schemes. A short communication should contain no more than 3 single figures/tables/schemes.

Tables should be typed in double spacing on separate pages and provided with a suitable heading. Tables should be clearly referred to in the text using Arabic numerals. Considerable thought should be given to layout so that the significance of the results can be easily grasped. Each table should have a title which makes the general meaning understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be sufficiently explanatory, and presented in a way consistent with the column width. Columns of figures multiplied by the same power of ten should not be presented as such. The power of ten should be indicated in the column heading, e.g.:

104[NaCl]/mol l<sup>-1</sup>

4.2

3.5

0.26

rather than

[NaCl]/mol l<sup>-1</sup>

4.2 x 10<sup>-4</sup>

3.5 x 10<sup>-4</sup>

2.6 x 10<sup>-5</sup>

In order to demonstrate the repeatability/reproducibility of the method, Authors are asked to include

relative standard deviations (RSD) or the coefficient of variations (CV) in tables.

#### **References**

##### *Citation in 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 recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'.

Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. 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.

#### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

#### *Reference Style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S.,

Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In

order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### ***Proofs***

One set of page proofs (as PDF files) 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) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them 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 – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all 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.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. 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.

## **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>