



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

**MICHELLE CRISTINA TANOUE BATISTA**

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE  
LEVANA DE ALTA MASSA MOLAR POR *ZYMOMONAS  
MOBILIS* EM MEIO DE CALDO DE CANA DE AÇÚCAR**

---

Londrina  
2006

**MICHELLE CRISTINA TANOUE BATISTA**

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE  
LEVANA DE ALTA MASSA MOLAR POR *ZYMOMONAS  
MOBILIS* EM MEIO DE CALDO DE CANA DE AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de mestre.

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. Rui Sérgio Santos Ferreira da Silva

Londrina  
2006

**MICHELLE CRISTINA TANOUE BATISTA**

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE  
LEVANA DE ALTA MASSA MOLAR POR *ZYMOMONAS  
MOBILIS* EM MEIO DE CALDO DE CANA DE AÇÚCAR**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Antonia P. C. Celligoi  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Jonas Contiero  
Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita  
Filho”UNESP – Rio Claro

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Garcia  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 18 de dezembro de 2006

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Miriam e Mauricio, que sempre me apóiam em todas as decisões.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Maurício e Miriam pelo amor, suporte financeiro e emocional.

Aos meus irmãos, Ricardo e Maira pelas horas compartilhadas, as brincadeiras e a amizade.

Ao querido amigo Robson Laza Machado, por toda amizade, abrigo, companheirismo e dedicação.

Aos amigos Vanessa, Hassan, Johann e Thiago Ribeirão por toda compreensão e afeto.

A professora Maria Antonia, pela orientação, compreensão e força.

Ao Cassiano, Kaori e a todos os colegas de curso, que fizeram com que esta etapa fosse mais facilmente vencida.

Ao Nelson, pela competência profissional e atenção.

A Professora Dalva Myiagui, pela dedicação nas etapas iniciais deste trabalho.

Ao Professor Rui Sergio, pelo conhecimento e tempo compartilhados.

Regard no practice as immutable. Change and be ready to change again. Accept no eternal verity. Experiment.

*(Skinner, 1969, Walden Two)*

BATISTA, Michelle Cristina Tanoue - **Efeito das condições de cultivo na produção de levana de alta massa molar por *Zymomonas mobilis* em meio de caldo de cana de açúcar**, 2006. 83F. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

## RESUMO

A distribuição da massa molar da levana de *Zymomonas mobilis* CP4 em caldo de cana de açúcar foi investigada quanto ao efeito do pH, tempo de cultivo e concentração inicial de açúcares através da metodologia de superfície de resposta. Os experimentos seguiram um delineamento estatístico  $2^3$  e posteriormente ampliado para experimentos em blocos ortogonais. A distribuição da massa molar das levanas dos diferentes cultivos foi estimada por cromatografia de permeação em gel. A análise e interpretação estatística, bem como a avaliação dos perfis cromatográficos sugerem que a maior produção da levana de alta massa molar (maior que  $6.7 \times 10^5$ ) foi obtida em pH 5.0, tempo de 24h sendo que a concentração de açúcares não teve efeito significativo.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*. Levana, Massa molar. Cromatografia de permeação em gel. Caldo de cana-de-açúcar. Metodologia de superfície de resposta.

BATISTA, Michelle Cristina Tanoue - **Efeito das condições de cultivo na produção de levana de alta massa molar por *Zymomonas mobilis* em meio de caldo de cana de açúcar** – 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – State University of Londrina. Londrina, 2006.

### ABSTRACT

The distribution of molecular mass of levan from *Zymomonas mobilis* CP4 in sugar cane juice was investigated for the effect of pH, growth time and initial sugar concentration using response surface methodology. The experimental runs were carried out according to a  $2^3$  statistical design, with further expansion to orthogonal block runs. The distribution of molecular mass of levans from different cultures was estimated by gel permeation chromatography. Statistical analysis and interpretation as well as the evaluation of chromatographic profiles suggest that the production of high molecular mass levan (greater than  $6.7 \times 10^5$ ) was achieved in pH 5.0 after 24 hours, with no significant effect of initial sugar concentration.

**Keywords:** *Zymomonas mobilis*. Levan. Molecular weight. Gel permeation chromatography (GPC). Sugar cane juice. Response-surface methodology.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
3.1 ZYMOMONAS MOBILIS .....	13
3.2 LEVANA.....	16
3.3 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS EPSs .....	19
3.4 METODOLOGIAS DE SEPARAÇÃO DE EPSs .....	21
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 MATERIAIS .....	23
4.1.1 Microrganismo .....	23
4.1.2 Meios de cultura .....	23
4.1.2.1 Meio de preservação .....	23
4.1.2.2 Meio de inóculo .....	24
4.1.2.3 Meio de fermentação.....	24
4.2 MÉTODOS .....	24
4.2.1 Clarificação.....	24
4.2.2 Padronização da cromatografia de exclusão molecular .....	25
4.2.3 Delineamento estatístico .....	25
4.2.3.1 Bloco 1 .....	25
4.2.3.2 Bloco 2 .....	25
4.2.4 Preservação do microrganismo.....	26
4.2.5 Inóculo.....	27
4.2.6 Fermentação .....	28
4.2.7 Determinação da biomassa.....	28
4.2.8 Determinação dos açúcares redutores e açúcares redutores totais.....	28
4.2.9 Separação da levana.....	29
4.2.10 Determinação da levana.....	29

4.2.11 Estimativa da massa molar da levana por cromatografia de exclusão molecular .....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
5.1 EFEITO DO PH, TEMPO DE CULTIVO E CONCENTRAÇÃO INICIAL DO CALDO DE CANA DE AÇÚCAR NA BIOMASSA E LEVANA .....	31
5.2 ARTIGO SUBMETIDO À PROCESS BIOCHEMISTRY .....	36
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>58</b>
ANEXO A – Curva de calibração e perfil da levana Sigma .....	59
ANEXO B – Perfis cromatográficos das amostras .....	62
ANEXO C – Normas para submissão do artigo.....	74
ANEXO D – Comprovante de submissão do artigo.....	82

## 1 INTRODUÇÃO

Alguns polissacarídeos provenientes de processos fermentativos são focados pela versatilidade de suas aplicações, principalmente na indústria alimentícia. Entretanto, uma nova aplicação tem sido enfatizada: o uso farmacológico. É sabido que existe uma participação dos polissacarídeos na estimulação imune e na supressão tumoral. Trabalhos já mostraram resultados positivos no uso de escleroglucana no tratamento de tumores (SUTHERLAND, 2002). Algumas frutanas também detêm essa capacidade, inclusive o polímero de frutose  $\beta$  (2-6), a levana.

A aplicação dos vários polissacarídeos relaciona-se com o padrão de ramificação e o grau de polimerização. Há indicações de que glucanas de maior massa molar têm maior atividade antitumoral que as de baixa polimerização (SHU, LUNG, 2004). A atividade antitumoral de levana de microorganismos já foi observada por alguns pesquisadores, inclusive aquela isolada de *Zymomonas mobilis* (CALAZANS et al., 1997, 2000). Esses trabalhos sugerem que a atividade antitumoral da levana está associada a uma massa molar específica. Outras aplicações farmacêuticas são: substituto do plasma sanguíneo, imunomodulador, ação de prolongar o efeito de certas drogas e hipocolesterolêmico. (DOELLE et al., 1993 ; BEKERS et al., 2001).

A levana também se mostra promissora para a indústria alimentícia. Aquela de maior massa molar possui também maior viscosidade, característica desejável para utilização como espessantes e estabilizantes alimentares. Por ser um polímero de frutana, pode ser usado na elaboração de produtos dietéticos e também tem propriedade de não ser cariogênico. Vários microrganismos produzem levana, entre eles *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Aerobacter lavanicum*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas sp* e *Corynebacterium laevaniformans* (HAN,CLARKE, 1990). Dentre os organismos produtores de levana, *Zymomonas mobilis* é o mais promissor para produção em escala industrial (ANANTHALAKSHMY, GUNASEKARAN, 1999). Esta bactéria é gram-negativa e anaeróbica, também produz sorbitol e etanol, utilizando a via de Entner-Doudoroff para obtenção de energia.

Como substratos para o crescimento de *Zymomonas mobilis* é comum o uso de sacarose, frutose ou glicose nos meios de cultivo. Uma alternativa para baratear os custos de cultivo e produção da levana é a utilização de produtos agroindustriais regionais, como o caldo de cana de açúcar, de onde o microrganismo foi primeiramente isolado (SWINGS, DE LEY, 1977). O uso de produtos da agroindústria se justifica pelo baixo custo, disponibilidade e composição desses substratos, contribuindo para a redução do custo final do produto.

Para melhor identificar as interações entre os fatores envolvidos nos processos de produção de levana, utilizou-se a estatística como planejamento experimental. A metodologia de superfície de resposta tem sido utilizada por diversos grupos de pesquisas em biotecnologia, com o objetivo de avaliar com mais acuidade a influência das condições externas no metabolismo do microrganismo avaliado. Além disso, um delineamento adequado diminui o número de experimentos, reduzindo também o tempo e o custo dos trabalhos.

Poucos trabalhos discutem a dinâmica das condições de cultivo na massa molar dos polissacarídeos. Este trabalho visou, por meio de delineamentos estatísticos, estudar a influência do pH, concentração de substrato e tempo de cultivo na produção de levana de alta massa molar pela bactéria *Zymomonas mobilis*, utilizando caldo de cana-de-açúcar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das condições de cultivo na produção de levana de alta massa molar por *Zymomonas mobilis* CP4 em meio de caldo de cana de açúcar.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito do pH, tempo de cultivo e concentração do meio de cultivo para estimular o aumento de levana de alta massa molar.
- Verificar a distribuição da massa molar da levana produzida por *Zymomonas mobilis* nas diferentes condições de cultivo.
- Avaliar por metodologia estatística o efeito das variáveis testadas para definir a melhor condição de cultivo para a produção de levana de alta massa molar por *Zymomonas mobilis*.
- Padronizar a técnica de determinação da massa molar por cromatografia de exclusão molecular.
- Acompanhar o consumo de açúcares e a produção de levana nas fermentações.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *ZYMOMONAS MOBILIS*

Na Europa, África, Ásia e América este organismo foi contaminante de bebidas fermentadas como cerveja e suco de maçã, muitas vezes estragando o sabor das bebidas. Lindner, em 1924, isolou o gênero *Zymomonas* do polque mexicano, sendo esta descoberta comumente designada como a primeira identificação representativa do microrganismo. No entanto, Berker e Hillier, em 1911, foram os primeiros a isolar e estudar a bactéria contaminante das bebidas fermentadas mas não designaram um táxon ao gênero. (SWINGS, DE LEY, 1977)

*Zymomonas mobilis* é uma bactéria gram-negativa, em formato de bastonetes de 2 - 6 µm de comprimento por 1 – 1,4 µm de largura, geralmente aglomeradas aos pares. Podem ser móveis, possuindo de 1-4 flagelos e perdem a mobilidade espontaneamente. Esta bactéria não forma esporos ou cápsulas e também não apresentam lipídios intracelulares e glicogênio. Embora seja classificada como anaeróbica, apresenta bom crescimento em condições aeróbicas. O crescimento se dá numa faixa considerável de pH, de 3,5 a 7,5. A *Z. mobilis* CP4 cresce até a temperatura de 38°C e não tolera concentração maior que 1% NaCl (SWINGS, DE LEY, 1977).

Realiza fermentação etanólica, produzindo também CO<sub>2</sub> e os co-produtos de seu metabolismo são ácido glucônico, sorbitol, levana e fructo-oligosacarídeos. O microrganismo utiliza a via de Entner-Doudoroff para obtenção de energia, obtendo um saldo final de apenas um ATP por molécula de glicose utilizada. (DOELLE et al., 1993; SWINGS, DE LEY, 1977). *Z. mobilis* é a única dentre os microrganismos anaeróbios a utilizar a via de Entner-Doudoroff para a fermentação e sua classificação taxonômica ainda não está claramente confirmada. (GRUBE et al., 2002.)

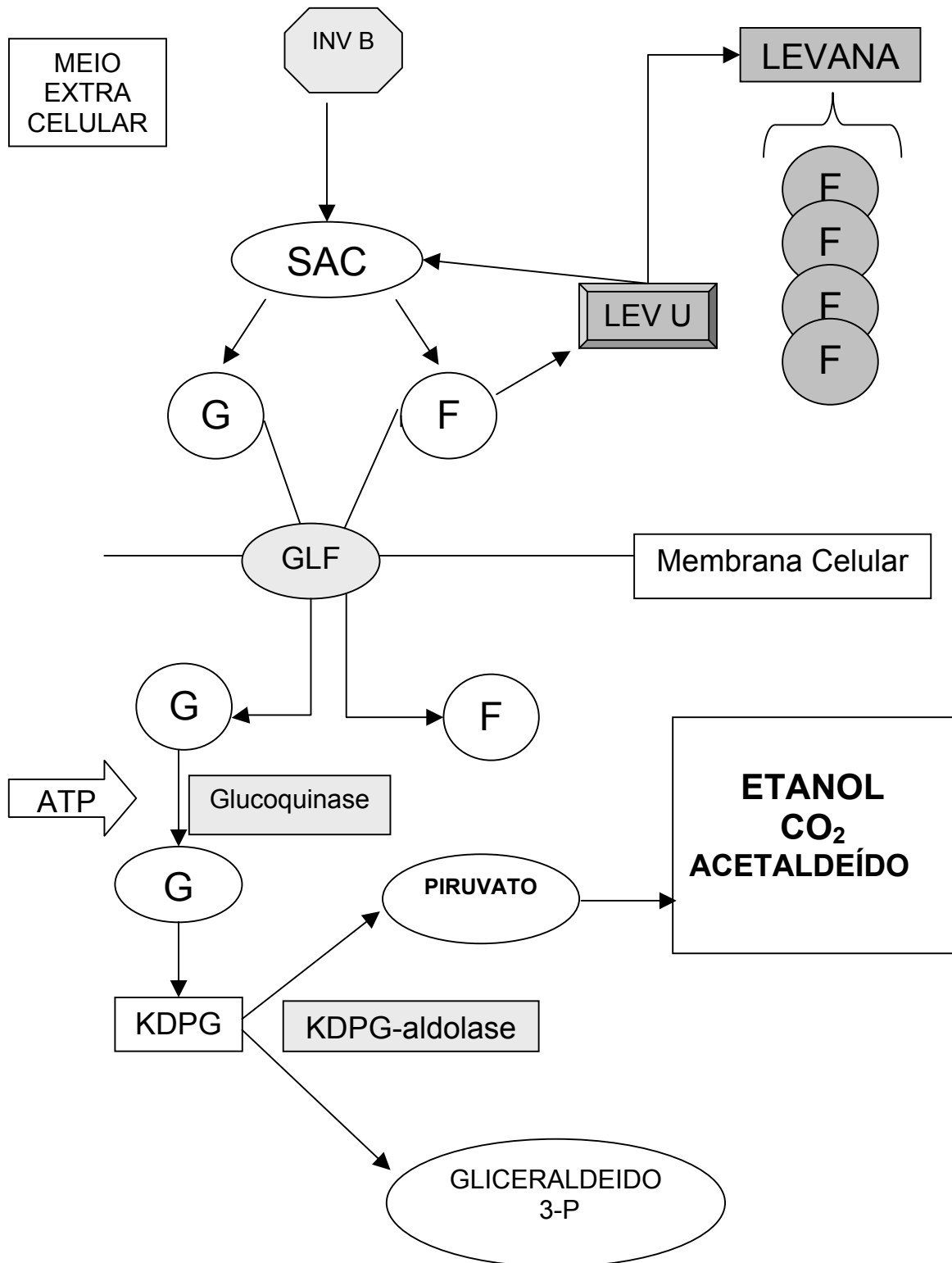
Como substratos para o crescimento de *Zymomonas mobilis* são utilizadas sacarose, D-frutose ou D-glicose como fontes de carbono (SPRENGER, 1996). Cresce em altas concentrações de glucose devido a um sistema facilitador de glucose que equilibra as concentrações intra e extracelular. A característica deste

microrganismo tolerante a grandes concentrações de açúcares apresenta uma alternativa para baratear os custos de cultivo e produção da levana: a utilização de produto agroindustrial regional, como o caldo de cana de açúcar.

No metabolismo de carboidratos de *Z. mobilis*, pode coexistir com a fermentação etanólica, a produção de alguns sub-produtos, principalmente quando é utilizada a sacarose na composição do meio de cultivo. Dentre os sub-produtos formados estão a levana (SWINGS, DE LEY, 1977), sorbitol (VIKARI, 1986) e frutooligossacarídeos (DOELLE et al., 1993). Também pode produzir ácido glutâmico ácido acético e acetaldeído (TANAKA, YAMAMOTO, 1989).

*Zymomonas mobilis* metaboliza a sacarose por meio de três enzimas: **levanasacarase** (LevU), extracelular, responsável pela síntese de levana e fruto-oligossacarídeos; a **sacarase** (InvB), também extracelular, que hidrolisa a sacarose e a **sacarase** (SacA/InvA), sem localização nem função bem definidas. (SPRENGER, 1996; DOELLE et al., 1993).

Dentre os organismos produtores de levana, *Zymomonas mobilis* é o mais promissor para produção em escala industrial (ANANTHALAKSHMY, GUNASEKARAN, 1999).



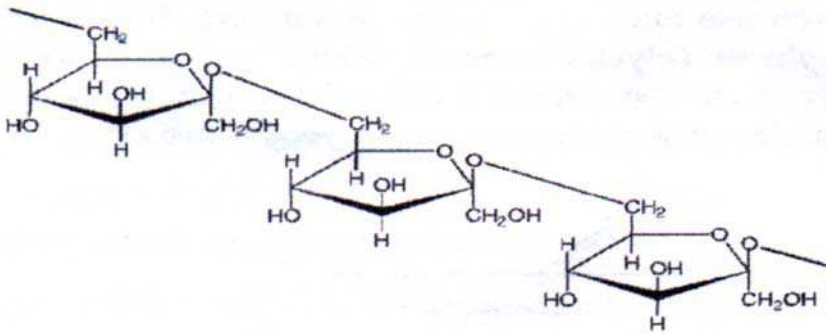
**Figura 1** – Esquema da via Entner-Doudoroff de *Zymomonas mobilis*.

A figura 1 representa o metabolismo de carboidratos de *Zymomonas mobilis* pela via de Entner-Doudoroff. A *Zymomonas mobilis* cresce em sacarose

converte o dissacarídeo sacarose (SAC) em frutose (F) e glicose (G) pela enzima invertase (INVB) ou pela enzima levanasacarase, que converte a frutose em levana e libera glicose. Por um transportador (GLF) na membrana celular, a glicose que entra na célula sofre ação da enzima glucoquinase e, após uma cascata de reações, é formado o composto 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato (KDPG). Observa-se a ausência da enzima fosfofrutoquinase (SPRENGER, 1996) e a presença de KDPG-aldolase na transformação de KDPG em gliceraldeído-3-fostato e piruvato, o que caracteriza a via de Entner-Doudoroff. A ausência da fosfofrutoquinase explica o gasto de apenas um ATP (Glicose  $\rightarrow$  Glicose 6-fosfato). Na via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas, o gasto é de 2 ATPs. A economia de ATP nesta etapa mostra a alta eficiência metabólica de *Zymomonas mobilis* na fermentação de açúcares, poupando gasto com a formação de biomassa e convertendo mais açúcares em piruvato. A frutose liberada na hidrólise da sacarose pode ser polimerizada pela levanasacarase (LEVU), formando a levana, ou segue para o interior da celular por uma via semelhante a via das pentoses, originando gliceraldeído 3-P (SPRENGER, 1996; SWINGS, DE LEY, 1977; DOELLE et al., 1993).

### 3.2 LEVANA

A levana é um polissacarídeo de ligações glicosídicas predominantemente  $\beta$ -(2,6) podendo apresentar ramificações  $\beta$ -(2,1) (YOO et al., 2004). A levana é produzida a partir da frutose obtida do metabolismo da sacarose, os resíduos são polimerizados pela enzima levanasacarase. Não há síntese de levana em meio contendo apenas frutose. (RIBBONS et al., 1962 apud MURO et al., 2000). A massa molar das levanas tem sido reportada entre  $2 \cdot 10^6$  e  $1 \cdot 10^8$ . Em *Streptococcus salivarius*, a levana altamente ramificada chega a  $1,27 \cdot 10^8$ . (TANAKA, YAMAMOTO, 1980).



**Figura 2** - Estrutura da levana sem ramificações. Ligações do tipo  $\beta$  2-6.

Vários microorganismos produzem levana, dentre eles *Erwinia herbicola*, *Erwinia amylovora*, *Acetobacter suboxydans*, *Gluconobacter oxydans*, *Rhanella aquatilis*, *Bacillus natto*, *Actinomyces viscous*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyia*, *Aerobacter lavanicum*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas sp* e *Corynebacterium laevaniformans*. Recentemente também foi encontrada em plantas como gramíneas e em plantas lenhosas (HAN, CLARKE, 1990; DAWES et al. 1966). Para os microrganismos, a levana é uma fonte de reserva de carboidratos e protege do estresse osmótico do meio (HAN, CLARKE,, 1990). Nas plantas, a levana armazenada protege contra o déficit hídrico em baixas temperaturas (VIJIN, SMEEKENS, 1999).

As condições de cultivo e incubação da enzima é que determinam a quantidade de levana produzida. Utilizando enzimas engenheiradas e/ou mutantes, conseguiu-se ampliar muito a produção do exopolissacarídeo, assim como aplicando as técnicas de imobilização enzimática.

Muitas aplicações são possíveis na indústria farmacêutica: como substituto do plasma sanguíneo, imunomodulador e ação de prolongar o efeito de certas drogas, hipocolesterolêmico (DOELLE et al., 1993; BEKERS et al., 2001). A levana também pode servir como agente encapsulante de drogas, agente emagrecedor (ILAN, 1990).

Na indústria alimentícia, e pode ser utilizada como agente encapsulador e carreador para flavorizantes e corantes, fixando cores e sabores (HAN,CLARKE, 1990). A levana de maior massa molar possui também maior

viscosidade, característica desejável para utilização como espessantes e estabilizantes alimentares.

Sendo constituída de frutose, as enzimas digestivas não têm ação. A frutose é metabolizada diretamente no fígado, não aumentando a glicemia, portanto, pode ser utilizada na elaboração de produtos dietéticos. Esses produtos também têm a vantagem de não serem cariogênicos. Estudos intensivos têm sido feitos devido ao interesse em suas propriedades como prebióticos e fibras solúveis. (CASTILLO, MUNGUÍA, 2004).

A levana é produzida pela enzima levanasacarase (sacarose: 2,6-  $\beta$  D frutana: 6  $\beta$  D frutossil transferase: EC. 2.4.1.10). (SANGILYANDI, GUNASEKARAN, 1998), que é a responsável pela polimerização dos resíduos de frutose. Os produtos podem ser desde grandes polissacarídeos de mais de  $10^7$  Da, as levanas, até pequenos oligosacarídeos de até nove resíduos de frutose (BEKERS et al., 2002). A reação acontece pela adição de um resíduo de frutose proveniente da quebra da sacarose a um acceptor. Este acceptor pode ser a levana, água, acil álcool de cadeia curta e vários monossacarídeos e dissacarídeos (YANASE et al., 2002).



A síntese de polímeros de oligossacarídeos de baixa massa molar pela levanasacarase ocorre quando estão presentes moléculas aceptoras como lactose ou maltose (CASTILLO. MUNGUÍA, 2004). O fator que mais influencia na síntese de co-produtos como os fructo-oligosacarídeos é a alta osmolaridade do meio, pela adição de sais minerais (BEKERS et al., 2000). A evidência de que a enzima é fortemente inibida pela glicose está provada no artigo de Euzenat et al., 1997.

Além da função de transferases/polimerase, essa enzima pode atuar como hidrolítica, tendo como substrato a sacarose. (SANGILYANDI et al., 1999). As diferentes funções estão relacionadas com a fonte da enzima (KIM et al.1998),

temperatura (PARK et al., 2004), concentração inicial de sacarose e a presença de solventes orgânicos miscíveis em água (CASTILLO, MUNGUÍA, 2004).

A levanasacarase isolada de *Zymomonas mobilis* tem massa molar de 55 kDa, o pH ótimo é 5,0, tanto para formação de levana quanto para a hidrólise da sacarose. A enzima mostrou-se estável do pH 5,0 ao 7,0 e foi inativada em pH 9,0. A atividade hidrolítica ótima é alcançada em temperatura de 50°C e para a formação de levana, em torno de 30°C. A enzima encontra-se livre, no extrato bruto, ou ligada à membrana (VIGANTS et al., 2001).

A levanasacarase de *Zymomonas mobilis* mostra maior vantagem para a aplicação industrial que as de outras bactérias, como *Bacillus* e *Rhanella*, pois a levU de *Z. mobilis* é mais ativa a baixas temperaturas, o que contribui para condições de produção e diminui as chances de contaminação (PARK et al., 2004).

### **3.3 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)**

O tamanho da molécula do polissacarídeo é que define a aplicação. Uma separação adequada aliada a um controle na produção agrega valor ao produto final.

As condições de cultivo interferem no grau de polimerização da molécula produzida. O fator que muito contribui para a mudança na massa molar é o pH. Shu e Lung (2004), utilizando o fungo basidiomiceto *Antrodia camphorata*, obtiveram um aumento da massa molar do exopolissacarídeo com a diminuição do pH do meio de cultivo, porém com a diminuição de sua produção.

Utilizando meio de glucose para a produção de EPS por *Lactobacillus rhamnosus*, Pham et al. (2000) demonstraram a existência de duas classes desse EPS, uma de alta massa molar e outro com menor massa. A fração que representava a maior massa molar decaiu nos cultivos de 48 e 72 horas, quando comparadas com as mesmas frações de cultivos de 24 horas.

Degeest e Vuyst (1999) cultivaram a bactéria láctica *Streptococcus thermophilus* em diferentes concentrações de nitrogênio. A bactéria produziu dois tipos de EPS, com composição iguais de galactose e glucose (4:1), porém de

diferentes massas molares. Um EPS de  $1,8 \cdot 10^6$  e outro de  $4,1 \cdot 10^5$ . O aumento da quantidade de EPS de baixa massa molar está relacionado com o aumento da concentração inicial de nitrogênio. A separação foi feita em Sephacryl S-500, como eluente foi utilizado o carbonato de amônio 0.05M a taxa eluição 2mL/min.

A massa molar da dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM foi analisada por GPC (Cromatografia de permeação em gel), por Kim et al. (2003). O estudo dos autores mostrou que a distribuição do EPS é claramente bimodal, em duas classes de massas molares, uma maior ( $>10^6$ ) e outra menor ( $10^3-10^5$ ). O aumento da concentração de açúcares no meio de cultivo aumenta também a porcentagem da fração de menor massa molar. O pH mostra menor efeito sobre a distribuição das dextranas do que a temperatura e a concentração, e os maiores valores de pH favorecem a síntese de dextranas de baixa massa molar. Quanto ao efeito da temperatura, aquelas menores (4 e 15° C) têm as frações de alta massa molar aumentadas em relação às temperaturas mais altas (37 e 45° C).

Seo et al. (2004) utilizando o microrganismo *Aureobasidium pullulans* demonstraram que o resíduo do processamento da soja é um bom substituto para o extrato de levedura, já que o microrganismo é capaz de produzir exopolissacarídeo semelhante com este substrato de baixo custo. Além disso, o EPS obtido tem massa molar superior aquele produzido com extrato de levedura.

O efeito imunomodulador e antitumoral já foi comprovado com as levanas extraídas de *Zymomonas mobilis* e *Aerobacter levanicum* (CALAZANS et al., 2000). No mesmo artigo, os autores concluem que a atividade antitumoral da levana de *Z. mobilis* está principalmente associada aquelas de massa molar em torno de 460.000 Da. Yoo et al. (2004) separaram e caracterizaram as levanas de *Gluconobacter xylinus*, *Microbacterium laevaniformes*, *Rahnella aquatilis* e *Zymomonas mobilis*. Apenas *G. xylinus* mostrou fraca atividade antitumoral, e isto parece estar relacionado ao sua menor massa molar (40.000 Da) em relação às levanas das outras bactérias (710.000 a 380.000 Da).

A síntese de levana é altamente influenciada pela temperatura e o pH. O pH ótimo para a produção é próximo de 5,0 (DOELLE et al., 1993). A síntese é afetada pela concentração de glucose, e cessa a produção de levana na concentração de glucose acima de 0,5 mg/mL. (DOELLE et al., 1993; SWINGS, DE LEY, 1977). A adição de levanas de baixa massa molar de *Bacillus subtilis* e

*Gluconobacter oxydans* demonstrou que servem como “primers” para o crescimento da cadeia do polissacarídeo (CHAMBERT, PETIT-GLATRON, 1993).

Hettwer et al. (1995) utilizando a levanasacarase de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola obtiveram levana de menor massa molar a temperaturas maiores que 18° C e tampão de alta força iônica, provavelmente pela maior dissociação da enzima e seu produto. A alta temperatura também hidrolisa a levana.

### 3.4 METODOLOGIAS DE SEPARAÇÃO DE EPS

Steinmetz et al. (1995) analisaram o polissacarídeo produzido por *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *pseudomallei* em gel de Sepharose CL-4B numa coluna de 1.6 por 50 cm. O eluente foi PBS 0.01M a uma taxa de eluição de 24 mL/h. Estima-se por GPC que a massa molar deste EPS é maior que 150 kDa.

A bactéria marinha *Vibrio alginolyticus* produziu um EPS de glucose, aminoarabinose, aminoribose e xylose na proporção 2:1: 9:1. A estimativa da massa molar foi feita por GPC em Sepharose 4B, com eluente fosfato de sódio 50 mM, taxa de eluição de 20mL/h. O perfil cromatográfico revela um único pico logo após o volume morto, o que comprova o alta massa molar. O aparelho Brookfield DV-II com spindle CP-40 foi usado para medir a massa molar aparente de  $6,39 \cdot 10^6$  Da, aproximadamente (MURALIDHARAN, JAYACHANDRAN, 2003).

Han et al. (1990) utilizando *Bacillus polymyxa* produziram levana em meio definido de sacarose. As massas molares foram determinados em coluna Sephacryl S-500 de tamanho 2,6 x 70 cm, usando água deionizada como solvente a 2,75 mL/min e detecção por monitor de índice de refração. A diálise em membrana revelou um único pico de  $2 \cdot 10^6$  Da. Este pico é mais afilado e uniforme do que os padrões puros de dextrana devido ao longo período de fermentação (mais de 15 dias).

Marshall e Weigel (1980) cultivaram *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 e NCTC 8606. Isolando a levana da linhagem NCTC 8606 em Sepharose 4B, com limite de exclusão de  $5 \cdot 10^6$  obtiveram exclusão completa do EPS, mas em Sepharose 2B, com limite de exclusão  $20 \cdot 10^6$  ocorreu apenas a exclusão parcial da levana, o que apenas permite assegurar que o tamanho da molécula encontra-se

entre 5 e 20 milhões. Utilizando a levana da linhagem ATCC 13419, obtiveram completa exclusão em Sepharose 2B, o que possibilita a conclusão de que sua massa molar é maior que 20 milhões.

Tanaka e Yamamoto (1979, 1980) utilizando a enzima isolada de *Bacillus subtilis* produziram levana e sua massa molar foi determinada por gel filtração em Bio Gel P-150, coluna de 2,7 x 67 cm. A levana obtida é maior que  $2 \cdot 10^6$  Da e utiliza como primer a levana de baixa massa molar adicionada à reação enzimática.

Yoo et al. (2004) isolaram as levanas dos cultivos de vários microrganismos, filtrando as amostras em membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  antes da aplicação na coluna. O sistema de separação foi Hewlett-Packard 1100 series, USA, em uma série de PSM 300 e PSM 3000, utilizando água com eluente a 1,0 mL/min. Os cultivos duraram 48 hrs, e a composição do meio foi variável, de acordo com a bactéria. Os pHs foram ajustados entre 7,0 e 7,2. As massas molares encontradas após análise em GPC foram: *Gluconobacter xylinus*  $M_w=40.000$ , *Microbacterium laevaniformes*  $M_w=710.000$ , *Rahnella aquatilis*  $M_w=380.000$  e *Zymomonas mobilis*  $M_w=570.000$ .

Calazans et al. (2000) testaram *Zymomonas mobilis* CP-4, ZAP, ZAG-12 e Z-1-81 em cultivos de sacarose 100g/L por 72 horas. As levanas obtidas foram estudadas quanto à sua polidispersão por GPC e quanto à atividade no sarcoma 180. Os pesos moleculares médios foram estimados pela medida da viscosidade. A maior inibição do tumor está relacionada à massa molar média igual a 460.000 Da.

Uma vez demonstrada a versatilidade de aplicações do exopolissacarídeos levana, mostra-se a importância de uma melhor avaliação de suas características para a produção e aplicação efetiva. Considerando levana e suas propriedades, aliada à capacidade produtora do organismo *Zymomonas mobilis* e ao baixo custo do caldo de cana de açúcar, este trabalho teve como foco a avaliação da distribuição da massa molar da levana isolada de diferentes condições de cultivo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Microrganismo

O microrganismo *Zymomonas mobilis*00 ATCC 31821 CP4 foi cedido pelo Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Paulista (Júlio Mesquita Filho), UNESP Campus de Rio Claro.

#### 4.1.2 Meios de cultura

##### 4.1.2.1 Meio de Preservação (SWINGS, DE LEY, 1977).

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

#### 4.1.2.2 Meio de Inoculo

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Sacarose	100
Extrato de levedura	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.5

#### 4.1.2.3 Meio de Fermentação

O caldo de cana foi previamente autoclavado e clarificado. O caldo foi quantificado em açúcar redutor total (ART) e a concentração foi corrigida com sacarose comercial até atingir a concentração determinada pelo planejamento estatístico.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Caldo de cana de açúcar	150-250
Extrato de levedura	2
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	2

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Clarificação (Buzato, 1992)

A 1L caldo de cana de açúcar foi adicionada a clara em neve de dois ovos em erlenmeyers de 2L e colocado em vapor fluente por 15 minutos. O líquido é filtrado em algodão hidrófobo e o caldo clarificado é quantificado.

#### **4.2.2 Padronização da cromatografia de exclusão molecular**

A levana utilizada foi isolada de um cultivo feito em condições pré-otimizadas (24 horas, 250 g/L de caldo de cana, sem agitação) e a levana Sigma.

#### **4.2.3 Delineamento estatístico**

Empregou-se um delineamento central composto com dois blocos ortogonais e aproximadamente rotacionais.

##### **4.2.3.1 Bloco I**

Para testar os fatores pH, tempo de cultivo e concentração inicial do caldo de cana-de-açúcar, os cultivos foram utilizados no meio descrito em 4.1.2.3, variando o pH ( $X_1$ ) em 4.0; 5.0 e 6.0, o tempo de cultivo ( $X_2$ ) em 12; 24 e 36 h, e a concentração do meio ( $X_3$ ) a 150, 200 e 250 g/L de açúcares totais. Para esta etapa, foi escolhido um delineamento estatístico fatorial completo com 3 fatores em dois níveis de variação tipo,  $2^3$ , com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios.

**Tabela 1** – Bloco 1 fatorial completo  $2^3$  para avaliar o efeito do pH, tempo de cultivo e concentração de açúcar, com as variáveis codificadas e originais.

(*) Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais		
	X1	X2	X3	pH	Tempo (h)	Concentração (g/L)
<b>1</b>	-1	-1	-1	4	12	150
<b>2</b>	1	-1	-1	6	12	150
<b>3</b>	-1	1	-1	4	36	150
<b>4</b>	1	1	-1	6	36	150
<b>5</b>	-1	-1	1	4	12	250
<b>6</b>	1	-1	1	6	12	250
<b>7</b>	-1	1	1	4	36	250
<b>8</b>	1	1	1	6	36	250
<b>9</b>	0	0	0	5	24	200
<b>10</b>	0	0	0	5	24	200
<b>11</b>	0	0	0	5	24	200

(\*) Os ensaios foram aleatorizados.

#### 4.2.3.2 Bloco 2

Nesta etapa, as mesmas variáveis do bloco 1 foram testadas (pH, tempo de cultivo e concentração inicial do meio) em um bloco ortogonal ao primeiro, com pontos estrelas ( $\alpha = \pm 1,8$ ), com três repetições no ponto central, para permitir o emprego de um modelo de segunda ordem (Tabela 2).

**Tabela 2** – Bloco 2 com pontos estrela para avaliar o efeito do pH, tempo de cultivo e concentração inicial do caldo de cana-de-açúcar, com as variáveis codificadas e decodificadas.

(*) Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	pH	Tempo (h)	Concentração (g/L)
12	-1,8	0	0	3,2	24	200
13	1,8	0	0	6,8	24	200
14	0	-1,8	0	5	2h24min	200
15	0	1,8	0	5	45h36min	200
16	0	0	-1,8	5	24	110
17	0	0	1,8	5	24	290
18	0	0	0	5	24	200
19	0	0	0	5	24	200
20	0	0	0	5	24	200

(\*) Os ensaios foram aleatorizados.

#### 4.2.4 Preservação do microorganismo

A preservação de *Zymomonas mobilis* CP4 foi em meio de sacarose 20 g/L, conforme descrito no item 4.1.2.1 As culturas foram renovadas a cada 4 semanas e conservadas em câmara fria a 4°C.

#### 4.2.5 Inóculo

O inóculo foi obtido de cultivos preparados em erlenmeyer de 125 mL, no meio descrito no item 4.1.2.2, mantido por 24h a 28°C. O conteúdo foi centrifugado a 4300 xg por 20 min. O precipitado de células foi re-suspenso em NaCl 0.9% e a concentração das células foi calculada por turbidimetria a 605 nm. O inóculo foi padronizado em 0.2 g/L.

Uma curva de biomassa de peso seco por turbidimetria foi confeccionada como curva padrão.

#### **4.2.6 Fermentação**

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de cultivo, conforme descrito em 4.1.2.3 as condições de cultivo estão estabelecidas na Tabela 1. Todos os cultivos foram mantidos a 25°C e condições estáticas.

#### **4.2.7 Determinação da biomassa**

Após centrifugado o meio de cultivo, o sedimento de células foi re-suspenso em solução salina e determinada a absorvância a 605nm e relacionada a curva de biomassa previamente confeccionada.

#### **4.2.8 Determinação dos Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART)**

Os açúcares redutores (AR) foram medidos pelo método de Somogy-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGY, 1945). As absorvâncias foram medidas a 540nm. Os açúcares redutores totais (ART) foram medidos pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), com absorvâncias medidas a 490nm. Para a curva de calibração, foi usado padrão de glicose, de concentrações de 0 a 100 µg/mL.

#### **4.2.9 Separação da levana**

Ao sobrenadante do meio de cultivo centrifugado foi adicionado etanol absoluto a 4°C na proporção de 3:1 (etanol: sobrenadante), deixado em repouso por 24 horas a 4°C. O material foi centrifugado e o precipitado foi re-suspenso em água destilada e a concentração foi medida pelo método de Fenol-Sulfúrico.

#### **4.2.10 Determinação de levana**

A quantificação da levana foi feita pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS, et al., 1956), utilizando frutose como padrão em concentrações de 0 a 100mg/mL. As leituras das absorvâncias foram a 490nm.

#### **4.2.11 Estimativa da massa molar da levana por cromatografia de exclusão molecular**

A levana foi separada do extrato livre de células segundo descrito no item 4.2.9 e submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sepharose 6B. Este gel é de agarose a concentração 6% , com partículas de diâmetro de 45-165 µm, tem intervalo de fracionamento para polissacarídeos  $1 \times 10^4$  –  $1 \times 10^6$ . (COLLINS, 1995).

Uma coluna cromatográfica, de 1.6 cm de diâmetro X 40 cm comprimento e volume total de 80.43 mL foi preenchida com o gel de Sepharose6B.

O tampão fosfato 50 mM em pH 7,0, previamente desaerado em Kitassato, a vácuo, foi usado como eluente. A vazão do eluente foi de 14 mL/h, controlada por bomba peristáltica. Para cálculo do volume morto, foi usado blue dextrana, 1mg/mL . Os volumes coletados foram de 3,5 mL .

As amostras de 0,5 mL foram aplicadas a 4 mg/mL. A velocidade de eluição foi de 14 mL/h e os açúcares eluídos foram dosados pelo método fenol-sulfúrico. Cada tubo de eluição corresponde a um volume de 3,5 mL coletados a cada 15 minutos.

A partir de padrões de dextrana de *Leuconostoc mesenteroides*, de pesos 50.000, 670.000 e 1.400.000 Da foi confeccionada uma curva de calibração (ANEXO A).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 EFEITO DO pH, TEMPO DE CULTIVO E CONCENTRAÇÃO INICIAL DO CALDO DE CANA DE AÇÚCAR NA BIOMASSA E LEVANA

O bloco 1 (Tabela 1) que corresponde a um delineamento factorial ( $2^3$ ), analisado estatisticamente, mostrou que o pH e o tempo foram os fatores relevantes na produção de levana. O teste da curvatura indicou a necessidade de um modelo de segunda ordem para melhor ajustamento dos dados experimentais.

Com base nos resultados do bloco 1, uma nova análise foi desenvolvida, com a escolha conveniente da amplitude da variação ( $\alpha = \pm 1.8$ ) para garantir a ortogonalidade dos blocos (Bloco 2 – Tabela 2). Mesmo considerando a blocagem ortogonal, o efeito bloco não foi significativo ( $p > 0.3379$ ) e, portanto, o delineamento pode ser analisado como um todo.

De acordo com os resultados mostrados na tabela 3, os maiores valores de biomassa estão nos pHs 6.8; 6.0 e 5.0 e o crescimento celular é reduzido em pH 4.0 e 3.2 e nos cultivos de 12 e 2.4h. Estes valores de biomassa corroboram com Doelle et al. (1993) e Anantalakshmy e Gunasekaram (1999) que afirmaram que o pH ótimo para o crescimento de *Z. mobilis* é em torno de 5.0.

Os maiores valores de levana ( $Y_1$ ) estão no ponto central, pH 5.0, (ensaios 9, 10, 17 e 18 – Tabela 3), alcançando, em média, 6.3 g/l, embora o crescimento celular tenha sido levemente maior nos ensaios de pH 6.0 (ensaios 6, 8) e pH 6.8 (ensaio 13). Os valores de levana total parecem confirmar que indicam que o pH ótimo para levanasacarase é 5.0, como já referido por outros autores (ANANTHALAKSHMY, GUNASEKARAN, 1999; REISS, HARTMEIER, 1990) e não está associado ao aumento da biomassa. Isto já foi observado (PARKER et al., 1997; CAZZETA et al., 2005) e ocorre porque *Zymomonas mobilis* utiliza a via de Entner-Doudoroff para metabolizar os carboidratos, produzindo apenas 1 mol ATP por mol de glucose consumida (DIEZ et al., 1991; SPRENGER, 1996).

**Tabela 3** – Respostas biomassa e levana total ( $Y_1$ ) obtidas do delineamento central composto em dois blocos ortogonais para verificar o efeito do pH, tempo de fermentação e concentração inicial do caldo de cana de açúcar.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Bloco	Respostas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>		Biomassa g/l	Levana g/l	LAMM %
1	-1	-1	-1	1	0,69618	1,107	43,32
2	1	-1	-1	1	1,19709	2,287	40,816
3	-1	1	-1	1	0,9905	2,535	45,771
4	1	1	-1	1	1,57348	4,749	53,029
5	-1	-1	1	1	0,46412	0,54	45,545
6	1	-1	1	1	0,88579	3,977	34,639
7	-1	1	1	1	0,81504	0,124	41,129
8	1	1	1	1	1,50839	5,574	56,357
9	0	0	0	1	1,15747	5,759	54,637
10	0	0	0	1	1,29331	7,873	52,224
11	-1,8	0	0	2	0,282	0,151064	23,82763
12	1,8	0	0	2	1,616	1,964867	46,4614
13	0	-1,8	0	2	0,196685	0,147976	10,34357
14	0	1,8	0	2	1,3678	2,821843	47,28566
15	0	0	-1,8	2	1,272	2,810262	53,86855
16	0	0	1,8	2	1,251	4,767409	54,42612
17	0	0	0	2	1,282	5,45582	52,5268
18	0	0	0	2	1,375	6,163533	54,62253

		Fatores originais				
		-1,8	-1	0	1	1,8
X <sub>1</sub>	pH	3,2	4	5	6	6,8
X <sub>2</sub>	Tempo fermentação (h)	2,4	12	24	36	45,6
X <sub>3</sub>	Concentração inicial caldo de cana-de-açúcar (g/L)	110	150	200	250	290

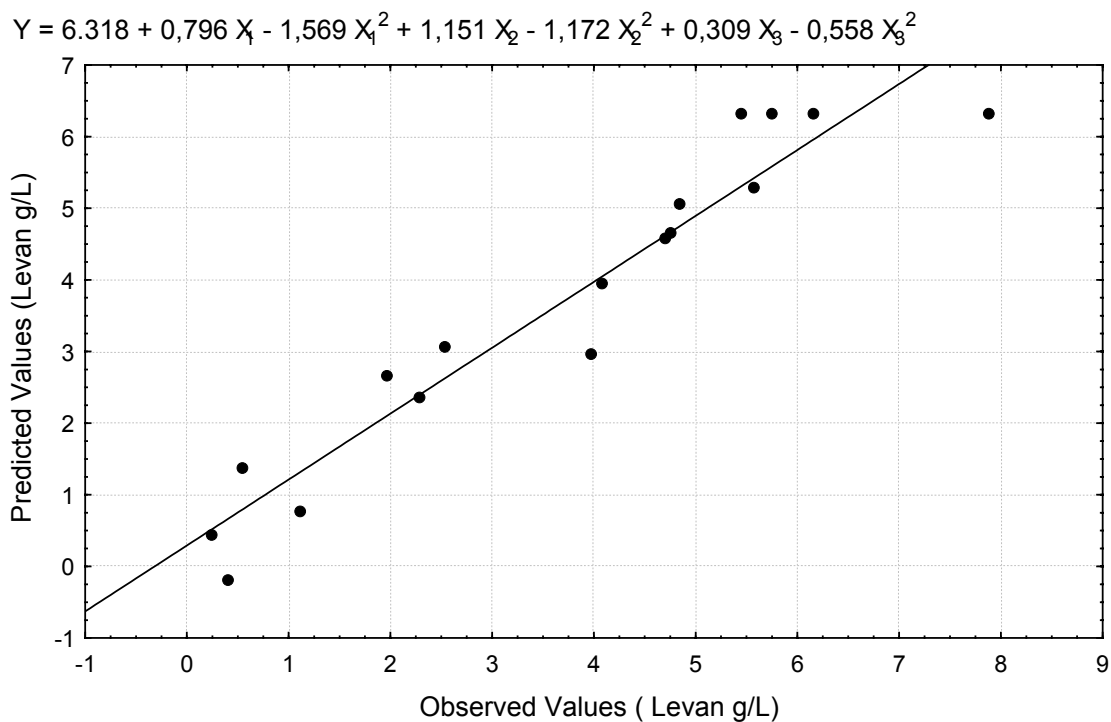
Os resultados da Tabela 3 mostram que a variação na concentração de açúcar foi o fator de menor influência nos valores de levanas totais e biomassa. Apesar de ser um fator de menor impacto em relação ao pH e o tempo de cultivo, ela ainda é relevante, o que fica evidente nos gráficos de contorno para a produção de levana (g/L), que mostram que os maiores valores de levana são atingidos a 200 g/L, no ponto central. Ananthalakshmy e Gunasekaram (1999) descreveram em seus estudos com *Z. mobilis* que os valores mais altos de biomassa foram associados as menores concentrações de açúcares, mas o aumento da concentração acima de 150 g/L não aumentou a biomassa. Também, observaram maiores valores de levana em sacarose 250 g/L, em cultivos de 20h.

Analisando os valores de levana e comparando o ensaio 7 com o ensaio 5 (Tabela 3), que apresenta os mesmos valores de pH (4.0), a mesma

concentração de açúcares (250g/L), e diferentes tempos, de 36 e 24 h, respectivamente, o valor de levana do ensaio 7 parece anômalo. O delineamento empregado permite, para a análise estatística de levana, a falta de um ponto fatorial e o ensaio 7 foi suprimido na modelagem para esta resposta.

O modelo obtido para produção de levana ( $Y_1$ ) é a equação (1), a seguir, com  $R^2$  aj 0.87 e lack of fit não significativa ( $p > 0.86$ ). Os valores previstos e os valores experimentais estão plotados na figura 3.

$$Y_1 = 6.318 + 0.796 X_1 - 1.569 X_1^2 + 1.150 X_2 - 1.172 X_2^2 + 0.309 X_3 - 0.558 X_3^2 \quad (1)$$



**Figura 3** – Valores de levana previstos pela equação (1) e valores de levana observados nos experimentos.

A respectiva análise de variância com os termos significativos pode ser vista na tabela 4. A superfície de resposta obtida está ilustrada na figura 4.

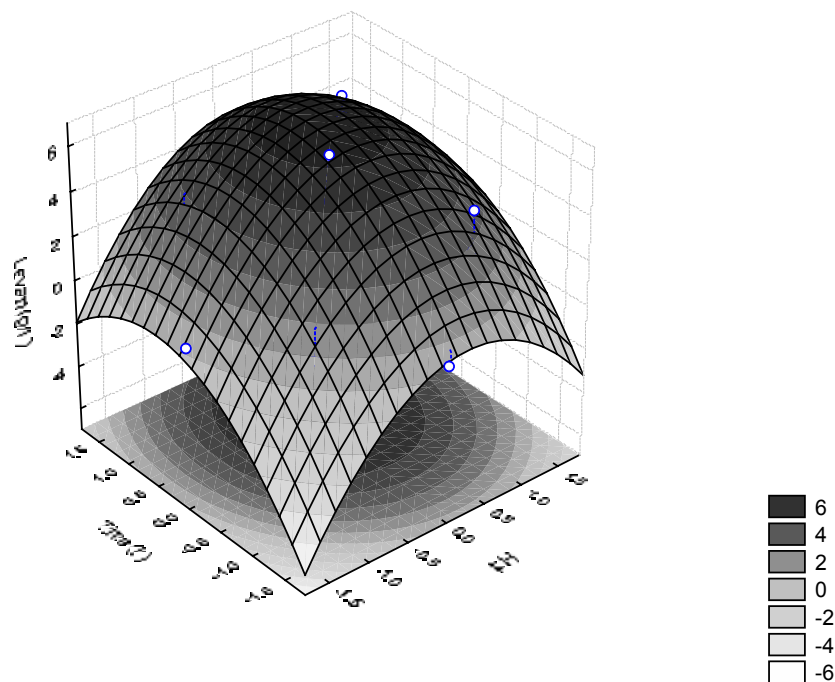
Os resultados e discussão complementares, referentes à análise da resposta “Levana de alta massa molar” estão apresentados na forma de artigo, o qual foi elaborado de acordo com as normas da revista *Process Biochemistry*, que são mostradas no Anexo C.

**Tabela 4** – Análise de variância do modelo proposto para a produção de levana (g/L) de *Zymomonas mobilis* em caldo de cana de açúcar apenas com os termos significativos quadráticos (Q) e lineares (L).

	SQ	GL	QM	F	p
pH (L)	8,38546	1	8,38546	12,52425	0,005366
pH (Q)	37,65069	1	37,65069	56,23381	0,000021
t (L)	17,50800	1	17,50800	26,14937	0,000455
t(Q)	21,01577	1	21,01577	31,38845	0,000227
conc (L)	1,26174	1	1,26174	1,88450	0,199824
Conc (Q)	4,76390	1	4,76390	7,11521	0,023596
Resíduo	6,69538	10	0,66954		
Total SS	83,83569	16			

SQ-Soma dos quadrados; GL-Graus de liberdade; QM-Quadrado médio.

$$Y = 6.318 + 0,796 X_1 - 1,569 X_1^2 + 1,151 X_2 - 1,172 X_2^2 + 0,309 X_3 - 0,558 X_3^2$$



**Figura 4** – Superfície de resposta obtida para levana (g/L) produzida por *Zymomonas mobilis* em meio de caldo de cana de açúcar a 200g/L.

## 5.2 ARTIGO

Os resultados e discussão deste trabalho estão apresentados no artigo “**Effect of culture conditions in the molecular weight distribution of *Zymomonas mobilis* levan in sugar cane juice**”, submetido ao periódico *Process Biochemistry* em 06/12/2006.

### **Effect of culture conditions in the molecular weight distribution of *Zymomonas mobilis* levan in sugar cane juice**

Michelle Cristina Tanoue Batista <sup>a</sup>, Rui Sergio dos Santos Ferreira da Silva <sup>b</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Department of Biochemistry and Biotechnology*, <sup>b</sup> *Department of Science and Food Technology, State University of Londrina*

*Post-Box 6001, 86051-990 Londrina, Parana Stat, Brazil*

Corresponding author: [michellebio@yahoo.com.br](mailto:michellebio@yahoo.com.br)

Phone: +43-3371-4270

#### **Abstract**

The distribution of molecular mass of levan from *Zymomonas mobilis* CP4 in sugar cane juice was investigated for the effect of pH, growth time and initial sugar concentration using response surface methodology. The experimental runs were carried out according to a 2<sup>3</sup> statistical design, with further expansion to orthogonal block runs. The distribution of molecular mass of levans from different cultures was estimated by gel permeation chromatography. Statistical analysis and interpretation as well as the evaluation of chromatographic profiles suggest that the production of high molecular mass levan (greater than  $6.7 \times 10^5$ ) was achieved in pH 5.0 after 24 hours, with no significant effect of initial sugar concentration.

**Keywords:** Levan. *Zymomonas mobilis*. Molar mass. Gel permeation chromatography (GPC). Response-surface methodology, Sugar cane juic.

## 1 INTRODUCTION

Levan consists of  $\beta$ -(2,6)-linked fructose residues, and may contain  $\beta$ -(2,1) branches [1,2]. Molecular weights have been reported to be  $2 \times 10^6$  Da in levan from *Bacillus polymyxa* [3],  $12.7 \times 10^7$  Da in *Streptococcus salivarius* [4] and higher than  $10^7$  Da in *Zymomonas mobilis* [2]. Levan has potential applications as prebiotic and probiotic agent, as thickener, emulsifier, stabilizer and encapsulating agent [5]. Levan also has several applications in medicine, including its use as an antitumor agent [1,7,8]. Evidences suggest that glucans with higher molecular weights have higher antitumor activity than the ones with lower degree of polymerisation [6]. Antitumor activity of levan from *Zymomonas mobilis* is related to a specific molecular weight range, and the maximal values for this activity were found in polymers with  $4.6 \times 10^5$  [8,9].

Biopolymers have a wide range of applications, and new molecules with commercial potential are one of the targets in industrial research. However, exploring their structural features and physical properties further than current theoretical knowledge is a challenge to be overcome [10]. Several applications of exopolysaccharides are related to their pattern of branching and degree of polymerisation [11]. Reports on the factors that affect the chemical structure of levans are scarce, although studies with other polysaccharides have shown that molecular weight may vary according to the microorganism and culture conditions. Medium pH has been reported as the most influential factor in molecular weight of exopolysaccharides from several microorganisms [6,12]. Likewise, time [13], initial sugar concentration [12], temperature [12], nitrogen source [14,15], increased ionic strength [4], and levan addition [4,16] have been shown to be relevant in exopolysaccharide chain polymerisation and can be altered by changing culture conditions.

The carbon source is a markedly important factor in EPS biosynthesis and the use of alternative substrates in biotechnological processes can be an option for decreasing costs and providing nutrients that are necessary for microbial metabolism. Amongst the substrates reported in literature, sugar cane molasses [17], beet sugar [18,19] and sugar cane juice [19] can be named. Sugar cane juice is a broadly available, low-cost agroindustrial byproduct that can be

purchased throughout the year in Brazil. It has high titers of sucrose and salts needed for microbial growth, as well as adequate osmolarity for levan biosynthesis.

Response surface methodology has been used in various biotechnology research works [17,20,21] aiming at determining the influence of external conditions in microbial metabolism, and simultaneously investigating the interactions amongst the factors studied. Moreover, it can decrease the amount of experiments that have to be performed without loss of information, which in turn lead to a reduction of production time and costs.

Levan has potential industrial applications, and the use of local available substrates for production of this EPS could decrease its production costs as well as add value to agroindustrial byproducts. In this respect, the objective of this work was to use response surface methodology to the effects of pH, growth time and sugar concentration in the molecular weight distribution of levan from *Zymomonas mobilis*, using sugar cane juice.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 MICROORGANISM AND CULTURE CONDITIONS

*Zymomonas mobilis* CP4 (ATCC 31821) were maintained as 4°C in a culture medium contained [g/L]: sucrose, 20; yeast extract, 2.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0;  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 1.0;  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ , 0.5 and renewed each 4 weeks. The inoculum culture contained [g/L]: sucrose, 100; yeast extract, 2.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0;  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 1.0;  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ , 0.5. The cells concentration was standardized in 0.2 g/L

The batch fermentation medium contained yeast extract, 2.0;  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ , 2.0 and sugar cane juice. Commercial sucrose was added until reach the concentrations determined by the statistical design. The cultures were maintained in static conditions at 28°C. The initial pH of the growth medium was adjusted using NaOH 2N and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N. The values of pH, culture time and sugar cane juice concentration were adjusted according to the statistic design in Table 1.

## 2.2 ANALYTICAL METHODS

The fermentation culture was centrifuged at 4300 x g for 20 min at 4°C and re-suspended in saline 0,9% and the biomass was measured by turbidimetry in 605 nm. The reducing sugars were quantified according to Somogy [22] and Nelson [23]. Total sugars were determined according to Dubois et al. [24]. Levan was separated by precipitation with ethanol 95% at 4°C, centrifuged at 8700 x g for 20 min at 4°C and estimated by phenol-sulfuric acid [24].

Levan samples for molecular weight estimation by gel permeation chromatography (GPC), was treated with cold ethanol 95% (1:3) (v/v) and incubated at 4°C for 24 h. After this time, it was centrifuged and the pellet was re-dissolved in distilled water. The samples were applied to the column at 4mg/ml. The molecular mass of levan was determined by a gel permeation chromatography (GPC) with a 40 cm x 1.6 cm column of Sepharose 6B (Sigma) using 50 mM phosphate buffer pH 7.0 as elution buffer, at the flow rate of 14 ml/h. The system was equipped with a peristaltic pump. Fractions of 3.5 mL were collected and analyzed for total reducing sugars (TRS) by phenol-sulfuric acid method [24]. *Leuconostoc mesenteroides* dextran standarts (Sigma) from  $5.0 \times 10^4$  to  $1.0 \times 10^6$  were used to construct a calibration curve.

## 2.3 DESIGN OF EXPERIMENTS

A central composite design (CCD) with 2 orthogonal blocks was used [28]. The first block containing 8 factorial runs and suitable central runs was used for selecting the most important factors. The second block containing the star points ( $\alpha = 1.8$ ), added to the same number of central runs allowed the use of a second order model (Table 1).

The software STATISTICA 5.1 (1998) was used for obtaining the analysis of variance (ANOVA), regression coefficients and response surface plots. Evaluated factors were:  $X_1$  (pH);  $X_2$  (fermentation time);  $X_3$  (initial sugar cane juice concentration). The response Y (levan with molecular weight greater than  $6.7 \times 10^5$ )

was transformed to  $Z = Y^2$ , based on result of Box-Cox test for increasing the goodness of fit.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 VARIABLE SCREENING

Statistical analysis of block 1 (Table 1), which corresponds to a  $2^3$  factorial design, showed that pH and time were relevant factors in production of high molar weight levan. However, binary interaction  $X_1X_2$  had significant effect on response Y (levan with molecular weight greater than  $6.7 \times 10^5$ ). Curvature test indicated the necessity of a second order model for fitting the experimental data (Table 2).

#### 3.2 RESPONSE MODELLING

Results of block 1 lead to the development of a second analysis, with convenient variation amplitude ( $\alpha = \pm 1.8$ ) for ensuring block orthogonality (Table 1 - Block 2). The effect of block was not significant ( $p > 0.3379$ ) even considering orthogonal blocking, therefore both blocks can be analysed as one design.

Levan samples assayed by gel permeation chromatography (GPC) produced chromatograms shown in Figures 1, 2, 3 and 4. The elution profile of the samples showed revealed the existence of predominantly two classes of average molecular weights (Mw): HMWL - high molecular weight levan (greater than  $6.7 \times 10^5$ ) and LMWL - low molecular weight (less than  $5.0 \times 10^4$ ).

The high molecular weight class was measured as % of total levan extracted from culture. The values of sugars eluted in this first peak were added and

their percentage is shown in Table 1. This fraction predominates over the low molecular weight class, and therefore was chosen for modelling response Y.

The elution profiles of samples in pH 4.0 (Figure 1) showed the presence of only one class of levan with high molecular weight. In pH 5.0 a high percentage of HMWL and a slight peak of LMWL can be observed (Figure 2). Elution of levans from cultures in pH 6.0 clearly showed the presence of a second peak corresponding the LMWL (Figure 3). The presence of levans with molecular weights even lower can be observed in pH 6.8 (run 12), although the standard curve used does not allow to precisely detect differences within that range (Figure 3). These results demonstrated that increasing the pH led to the formation of a low molecular weight class of levans for *Zymomonas mobilis* CP4. These results are in agreement with Shu et al. [6], who have reported that exopolysaccharides (EPS) isolated from *Antrodia camphorata* showed higher molecular weight in cultures grown in pH 4.0, whereas the low molecular weight EPS were produced in pH 6.0. However, Kim et al. [12] observed in cultures of *Leuconostoc mesenteroides* for production of dextrans that a higher pH range (5.5 to 6.0) favoured the formation of high molecular weight fractions; whereas a low molecular weight fraction was formed in pH lower than 4.5. Therefore, pH has a marked effect in production and molecular weights distribution of EPS, but the responses may vary according to the microorganism and pH ranged tested.

The growth time that was most favourable for production of HMWL was 24 hours, and this fraction comprised 53.47 % of the sample (Table 1). In 36 hours (Figure 4) this fraction has decreased to 49.03 % and in 45.6 hours (run 14) only 47.28 % of the sample were HMWL (Figure 4). These results are probably related to degradation of levan by levanase produced by *Zymomonas mobilis* [26] secreted in later growth time. According to Han [5], this hydrolytic activity could be responsible for the formation of short and heterogeneous chains instead of long and uniform polymers. Other works have demonstrated the participation of EPS-degrading enzymes in later growth time, such as in EPS from *Antrodia camphorata* [6], *Lactobacillus rhamnosus* [13] and pullulan from *Aureobasidium pullulans* [27].

Sucrose concentration was the least influential factor in production of high molar mass levan (Table 1). Within the range studied, no correlation could be observed between total sugar concentration in sugar cane juice and molar mass distribution. However, other works have shown that higher concentrations of sugars

leads to the production of low molar mass EPS in *Leuconostoc mesenteroides* [12] and *Aureobasidium pullulans* (Shin et al. 1987 apud [15] ).

Transformation and analysis of responses allowed to create the model represented by Equation 1 with Adjusted  $R^2 = 0.891$  and not significant lack-of-fit ( $p > 0.098$ ). The transformed response  $Z$  was obtained from original response  $Y$  ( $Z = Y^2$ ).

$$Z = 2935.284 + 274.876 X_1 - 448.818 X_1^2 + 468.932 X_2 - 507.99X_2^2 + 410.859 X_1X_2 \quad (1)$$

The ANOVA table (Table 3) shows the significance of effects. Initial sugar concentration was not significant ( $p > 0.5963$ ) and hence not included in the equation (1) for formation of peak 1. The fitted surface obtained from the model is shown in Figure 5.

Analysis of data in Table 1 and fitted surface revealed that the values observed in the central runs are close to the optimum. Data obtained in two experimental runs previously carried out in the same conditions of the central point runs (pH 5.0; culture time 24 h and initial sugar cane juice concentration 200 g/L) were used for experimental validation of the model. The value predicted for response  $Y = \sqrt{Z}$  was 54.18 % and the confidence interval (95 %) is between 52.59 % and 55.74 %. Validation experiments yielded the values 54.10 %, within the confidence interval and 51.62 %, nearing the lower limit of the confidence interval. The average value, 52.878 % ( $Z = 2796.127$ ) of levans with molecular weights greater than  $6.7 \cdot 10^5$  Da, is within the confidence interval, which indicates a good prediction capability for the model.

## REFERENCES

- [1] Yoo S.H, Yoon EJ, Cha J, Lee HG. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Biological Macromolecules* 2004;34:37-41.
- [2] Doelle HW; Kirk L, Crittenden R, Hsien T. *Zymomonas mobilis*-Science and Industrial Application. *Critical Reviews in Biotechnol* vol. 13, 1993;1:57-98.
- [3] Han YW, Clarke MA. Production and characterization of microbial levan. *J Agric Food Chem* 1990;38:393-396.
- [4] Tanaka, T, Oi S, Yamamoto T. The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesised by levansucrase. *J Biochem* 1980;87:297-303.
- [5] Han YW. Microbial levan. *Advances in Applied Microbiol* 1990;35:171-194.
- [6] Shu CH, Lung MY. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharides by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Proc Biochem* 2004;39:931-937.
- [7] Bekers M, Upite D, Kaminska E, Laukevics J, Gurbe M, Vigants A, Linde R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Proc Biochem* 2005;40:1535-1539.
- [8] Calazans GMT, Lopes CE, Lima RMOC, França FP. Antitumoral activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol Letters* 1997;19:19-21.
- [9] Calazans GMT, Lima RC, França FP, Lopes CE. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Biological Macromolecules* 2000;27:245-247.
- [10] Sutherland IW. A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. *Microbiol Today* 2002;29:70-71.
- [11] Sutherland IW. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int Dairy J* 2001;11:663-674.
- [12] Kim D, Robyt JF, Lee SY, Lee JH, Kim YM. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, temperature of reaction of

*Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMCM dextran sucrose. Carbohydr Res 2003;338:1183-1189.

[13] Pham PL, Dupont I, Roy D, Lapoint G, Cerning J. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus rhamnosus* and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. Appl Environ Microbiol 2000;66:2302-2310.

[14] Degeest B; Vuyst L. Indications that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and ps production in a complex medium. Appl Environ Microbiol 1999;65:2863-2870.

[15] Seo HP, Son CH, Chung CH, Jung DI, Kim SY, Gross RA, Kaplan DL, Lee JW. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. Bioresource Technol 2004;95:293-299.

[16] Chambert R, Glatron, MFP. Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. Carbohydr Res 1989;191:117-123.

[17] Cazzeta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS, Silva RSF. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. Proc Biochem 2005;40:747-751.

[18] Han YW, Watson MA Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. J Ind Microbiol 1992;9:257-260.

[19] Bekers M, Linde R, Upite D., Kaminska E, Viesturs U. Sugar beet juice fermentation by *Zymomonas mobilis* attached to stainless steel wire spheres. Acta Biotechnol 2001;21: 89-96.

[20] Sreekumar O, Chand N, Basappa SC. Optimization and interaction of media components in ethanol production using *Zymomonas mobilis* by response surface methodology. J Biosci Bioeng 1999;88(3):334-338.

[21] Hamsaveni DR, Prapulla SG, Divakar S. Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. Proc Biochem 2001;36:1103-1109.

[22] Buzato JB. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* CP4 under chemostatic and continuous transient reactor operation. Saint Andrews: University of Saint Andrews; Ph.D. thesis; 1992.

[23] Somogyi M. A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry* 1952;160:61-68.

[24] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Biochem* 1944;84:375-380.

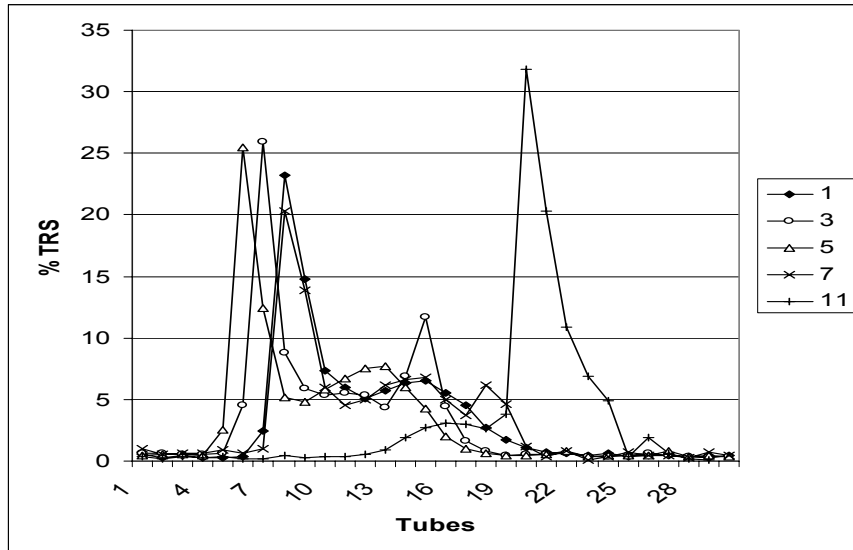
[25] Dubois M, Gilles KA, Roberts PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal Chem* 1956;9:77-103.

[26] Ananthalakshmy VK, Gunasekaran P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biol Technol* 1999; vol 42, n.3:291-297.

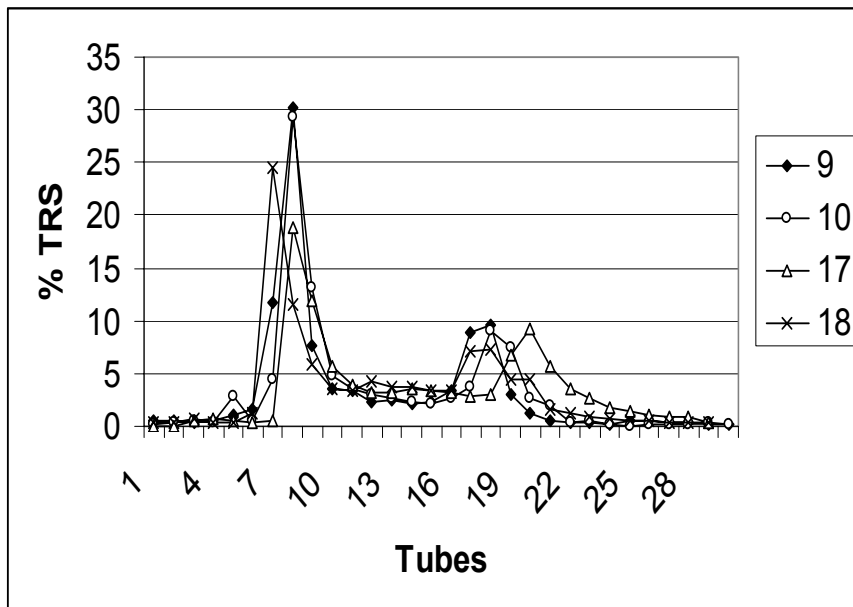
[27] Lee JH, Kim JH, Zhu IH, Zhan XB, Lee JW, Shin DH, Kim SK. Optimization of conditions for the production of pullulan and high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Letters* 2001;23:817-820.

[28] Box GED, Draper NR. Empirical model building and response surface. John Wiley & Sons, New York, 1987.

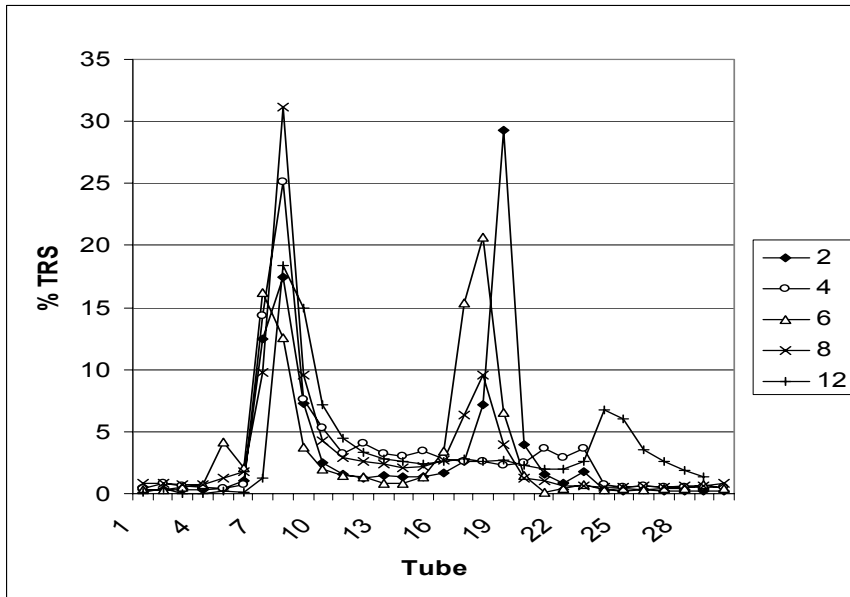
## FIGURES



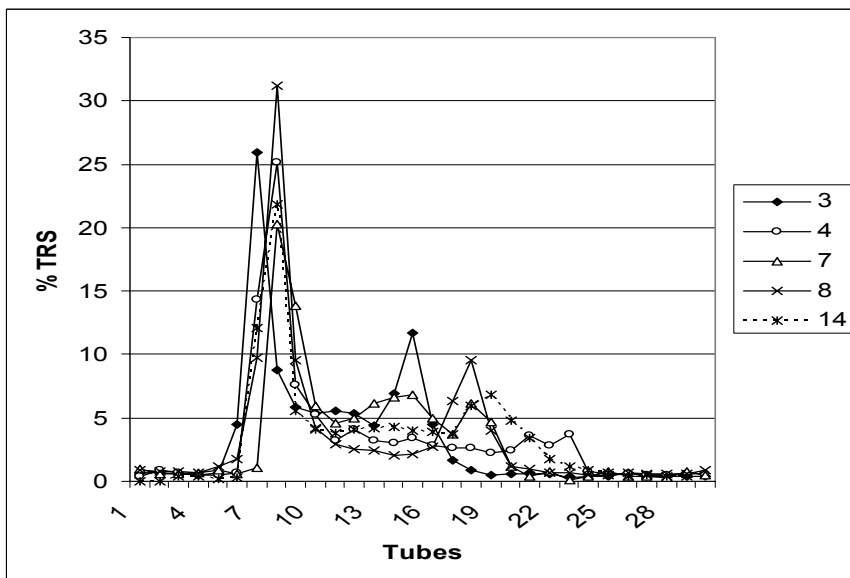
**Figure 1** – Chromatograms of *Zymomonas mobilis* levans in sugar cane juice cultivates at pH 4.0 (runs 1, 3, 5, and 7) and pH 3.2 (runs 11). TRS: % of total reducing sugars eluted. Tubes: 3mL/15'



**Figure 2** – Chromatograms of *Zymomonas mobilis* levans in sugar cane juice cultivates at central points (runs 9, 10, 17 and 18) - Table 1. The pH was 5.0, time culture 24h and sugar cane juice concentration 200 g/L. TRS: % of total reducing sugars eluted. Tubes: 3mL/15'

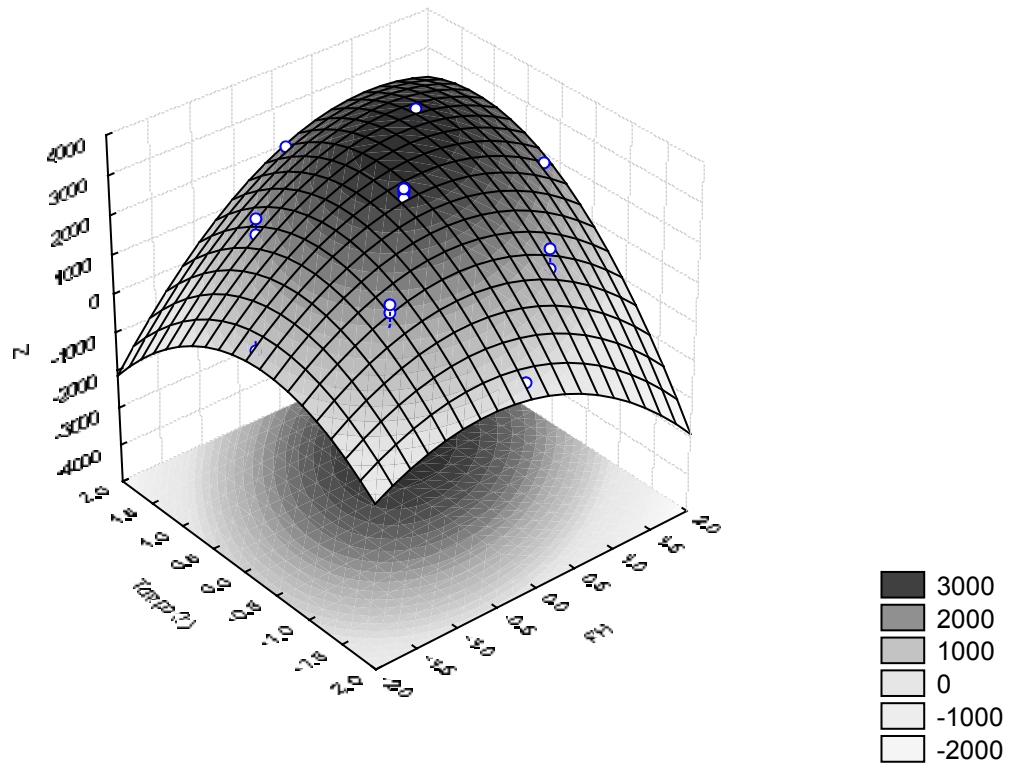


**Figure 3** – Chromatograms of *Zymomonas mobilis* levans in sugar cane juice cultivates at pH 6.0 (runs 2, 4, 6 and 8) and pH 6.8 (run 12).  
 TRS: % of total reducing sugars eluted.  
 Tubes: 3mL/15'



**Figure 4** – Chromatograms of *Zymomonas mobilis* levans in sugar cane juice cultivates at 36h (runs 3, 4, 7 and 8) and 45.6h (run 14) – Table 1.  
 TRS: % of total reducing sugars eluted.  
 Tubes: 3mL/15'

$$Z = 2935,284 + 274,876 X_1 - 448,818 X_1^2 + 468,932 X_2 - 507,999 X_2^2 + 410,859 X_1 X_2$$



**Figure 5** – Response-surface to high molecular weight levan (HMWL) production by *Zymomonas mobilis*. Concentration was fixed in 200 g/L.

## TABLES

**Table 1**– Fatorial design  $2^3$  (block 1) and star design (block 2) for investigation of the effect of pH, culture time and initial sugar cane juice concentration in biomass, levan production and high molecular weight levan (HMWL) responses.

Runs	Coded Variables			Block	Responses		
	X1	X2	X3		Biomass g/l	Levan g/l	HMWL %
1	-1	-1	-1	1	0,69618	1,107	43,32
2	1	-1	-1	1	1,19709	2,287	40,816
3	-1	1	-1	1	0,9905	2,535	45,771
4	1	1	-1	1	1,57348	4,749	53,029
5	-1	-1	1	1	0,46412	0,54	45,545
6	1	-1	1	1	0,88579	3,977	34,639
7	-1	1	1	1	0,81504	0,124	41,129
8	1	1	1	1	1,50839	5,574	56,357
9	0	0	0	1	1,15747	5,759	54,637
10	0	0	0	1	1,29331	7,873	52,224
11	-1,8	0	0	2	0,282	0,151064	23,82763
12	1,8	0	0	2	1,616	1,964867	46,4614
13	0	-1,8	0	2	0,196685	0,147976	10,34357
14	0	1,8	0	2	1,3678	2,821843	47,28566
15	0	0	-1,8	2	1,272	2,810262	53,86855
16	0	0	1,8	2	1,251	4,767409	54,42612
17	0	0	0	2	1,282	5,45582	52,5268
18	0	0	0	2	1,375	6,163533	54,62253

		Original levels				
		-1,8	-1	0	1	1,8
X <sub>1</sub>	pH	3,2	4	5	6	6,8
X <sub>2</sub>	Culture time (h)	2,4	12	24	36	45,6
X <sub>3</sub>	Initial sugar cane juice concentration (g/L)	110	150	200	250	290

**Table 2** – Analysis of variance showing the effects of pH and culture time in the production of high molecular weight levan (Z) by *Zymomonas mobilis* CP4 in first block.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean Square	F-test	p
X <sub>1</sub> (L)	10,2995	1	10,2995	6,4086	0,126989
X <sub>2</sub> (L)	127,7302	1	127,7302	79,4766	0,01235
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	161,0731	1	161,0731	100,2233	0,009831
Residual	41,0838	6	6,8473		
Total	340,1866	8			

**Table 3** – Analysis of variance showing the effects of pH and culture time in the production of high molecular weight levan (Z) by *Zymomonas mobilis* CP4.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean Square	F-test	p
X <sub>1</sub> (L)	1094060	1	1094060	13,28208	0,00336
X <sub>1</sub> (Q)	3339740	1	3339740	40,545	0,000036
X <sub>2</sub> (L)	3184118	1	3184118	38,65574	0,000045
X <sub>2</sub> (Q)	4278567	1	4278567	51,94252	0,000011
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1350443	1	1350443	16,3946	0,001613
Residual	988454	12	82371		
Total	12924319	17			

(L) – Linear; (Q) – Quadratic; X<sub>1</sub> = pH; X<sub>2</sub> = culture time.

## 6 CONCLUSÕES

-As melhores condições de cultivo para o aumento da massa molar da levana de *Zymomonas mobilis* CP4 foram pH 5.0 e tempo de fermentação de 24h.

-A concentração inicial do caldo de cana-de-açúcar, na faixa estudada, não foi relevante para o aumento da massa molar de levana.

-Para a produção de levana (g/L), a concentração inicial de açúcares foi o fator de menor influência, porém afeta a produção de levana. Portanto, os termos lineares e quadráticos para concentração foram incluídos no modelo proposto para esta resposta.

- A maior concentração de levana (g/L) foi alcançada em pH 5.0, tempo de cultivo de 24 h em caldo de cana-de-açúcar na concentração inicial de 200g/L.

## REFERÊNCIAS

- ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN,P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, n.3, p.291-297,1999.
- BARKER P. E. et al. Biorreaction-separation on continuous chromatographic systems. **The Chemical Engineering Journal**, v.50, p.B23- B28, 1992.
- BEKERS M. et al. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**. v.40, p.1535-1539, 2005.
- BEKERS, M; et al. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. **International journal of Food Microbiology**. v.55, p.147-150, 2000.
- BEKERS, M. et al. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**.v.36, p.979-986, 2001.
- BEKERS, M. et al. Fructooligosaccharides and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**. v.38, p.701-706, 2002.
- BIGGS, D. R.; HANCOCK K. R. Fructan 2000. **Trends in plant Science**. v.6, n.1, Jan.,2001.
- BUZATO, J.B. **Ethanol production by *Zymomonas mobilis* CP4 under chemostatic and continous transient reactor operatin**. Saint Andrews: University of Saint Andrews, 1992. Tese (Doutorado) – Biochemistry Department, University of Saint Andrews, 1992.
- CALAZANS, G.M. T. et al. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v.19, n. 1, p.19-21, Jan. 1997.
- CALAZANS, G.M.T.; et al. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, p.245-247, 2000.

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

CAZZETA, M.L., et al. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. **Process Biochemistry**. v.40, p.747-751, Feb. 2005.

CHAMBERT R.; GLATRON, M. F. P. Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. **Carbohydrate Research**. v.191, p.117-123, 1989.

CHAMBERT, R.; GLATRON, M.F.P. Immobilization of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. **Carbohydrate Research**. v.244, p.129-136, 1993.

COLLINS, C. H.; BRAGA G.L.; BONATO P.S. **Introdução á métodos cromatográficos**. Editora Unicamp. 6ª Edição. 1995.

DAWES E.; RIBBONS, D; REES, D.A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of levan. **Biochemical Journal**. v.98, p.804-812, 1966.

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

DIEZ, J.C.; YOKOYA, F.; CARVALHO, P.R. Produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis*. **Arq Biol Tecnol** .v. 34, p. 375-380, 1991.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; HSEIN T. *Zymomonas mobilis*-Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.13, n.1, p.57-98, 1993.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. **Anal. Chem.** v.9, p77-103, 1956.

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

GRUBE, M; BEKERS, M; UPITE; D; KAMISNKA, E. Infrared spectra of some fructans. **Spectroscopy**. v.16, p. 289-296, 2002.

JANG, K.H. et al. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**. v. 23, p.339-344, 2001.

HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. production and characterization of microbial levan. **J. Agric. Food Chem.** v.38, p.393-396, 1990.

HETTWER, U. et al. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p.2834-2839, May. 1995.

ILAN, Y. W. Microbial levan. **Advanced and Applied Microbiology**, n.35; p.171-194, 1990.

KIM, M. G. et al. Levan and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*. **Biotechnology Letters**. v.20, n. 4, p.333-336, Apr.1998

KIM, D. et al. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMCM dextran sucrose. **Carbohydrate Research**. v.338, p.1183-1189, 2003.

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

MADI, B; et al. Effect of exogenous calcium on morphological development and biopolymer synthesis in the fungus *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme and Microbial Technology** . n.21, p. 102-107, 1997.

MARSHALL, K; WIEGEL, H. Relative molecular masses and structure of some levans elaborated by strains of *Streptococcus salivarius*. **Carbohydrate Research**. v.80, p.373-377, 1980.

MURO A. C. et al. Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. **Biotechnology Letters**. v.22, p.1639-1642, 2000.

MURALIDHARAN, J.; JAYACHANDRAN, S. Physicochemical analyses of the exopolysaccharide produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. **Process Biochemistry**. v.38, p.841-847, 2003.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v.84, p.375-380, 1944.

PARK, B. S., et al. Secretory production of *Zymomonas mobilis* levansucrase by the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.34, p.132-138, 2004.

PARKER, C. et al. Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3519-3525, 1997.

PHAM P. L. et al. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus rhamnosus* and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. **Applied and environmental Microbiology**. p.2302-2310, jun. 2000.

REISS M.; HARTMEIR W. Levan production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. *Food Biotechnol.* v.4, p.69-75, 1990.

RUEGGER M.J.S.; TORNISIELO, S.M.T. Produção de biomassa por fungos filamentosos em meio de vinhaça de cana de açúcar suplementado com melão. **Arquivos Biologia e Tecnologia**. v.39, p.323-332, Jun. 1996.

SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. A simple method for purification of thermostable levansucrase of *Zymomonas mobilis* from a recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 33, p.153-156, 1998.

SANGILYANDI, G.; RAJ, K.C.; GUNASEKARAN, P. Elevated temperature and chemical modifications selectively abolishes levan forming of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**. v.21, p.179-182, 1999.

SEO, H-P; et al. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. **Bioresource Technology** . n. 95, p. 293-299, 2004.

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

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

SPRENGER, G.A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **Microbiology Letters**, v.145, p. 301-307, 1996.

STEINMETZ I. et al. Purification and characterization of na exoplisaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. **Infection Immunity**. p.3959-3965, Oct.,1995.

SOMOGY, M. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**.v.160, p.61-68, 1952.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**. v.16, 1998.

SUTHERLAND, I.W. Polysaccharides for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. n.38, p.319-328, 1999.

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

SUTHERLAND, I. A sticky business. Microbial polysaccharides:current products and future trends. **Microbiology today**.v.29, mai, 2002.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas mobilis*. **Bacteriological Reviews**. v.41,n.41,p.1-46, 1977.

TANAKA, T.;YAMAMOTO T. Synthesis of levan y levansucrase-some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. **Journal Biochemistry**.v.85, p.287-293, 1979.

TANAKA, T.; OI, S.;YAMAMOTO, T.The molecular structure of low and high molecular weight levans synthetised by levansucrase. **Journal Biochemistry**. v.87, p.297-303, 1980.

TOMA M. M., et al. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**. v.38, p.1347-1350, 2003.

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

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

VIJIN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: More than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**. v. 120, p. 351-359, 1999.

WIILEMOT, R. M.; SIMEÓN, M. R. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. v.11, p.675-685, 2001.

YANASE, H.; MAEDA, M.; HAGIWARA, E.; YAGI, H.; TANIGUCHI, K.; OKAMOTO, K. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. **Journal Biochemistry**. v.132, p. 565-572, 2002.

YOO, S.H; et al. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **Biological Macromolecules**, n.34, p. 37-41, 2004.

YUN J. N. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation and applications. **Enzyme and Microbial Technology**. v.19, p.107-117, 1996.

## **ANEXOS**

## **ANEXO A – Curva de calibração e perfil da levana Sigma**

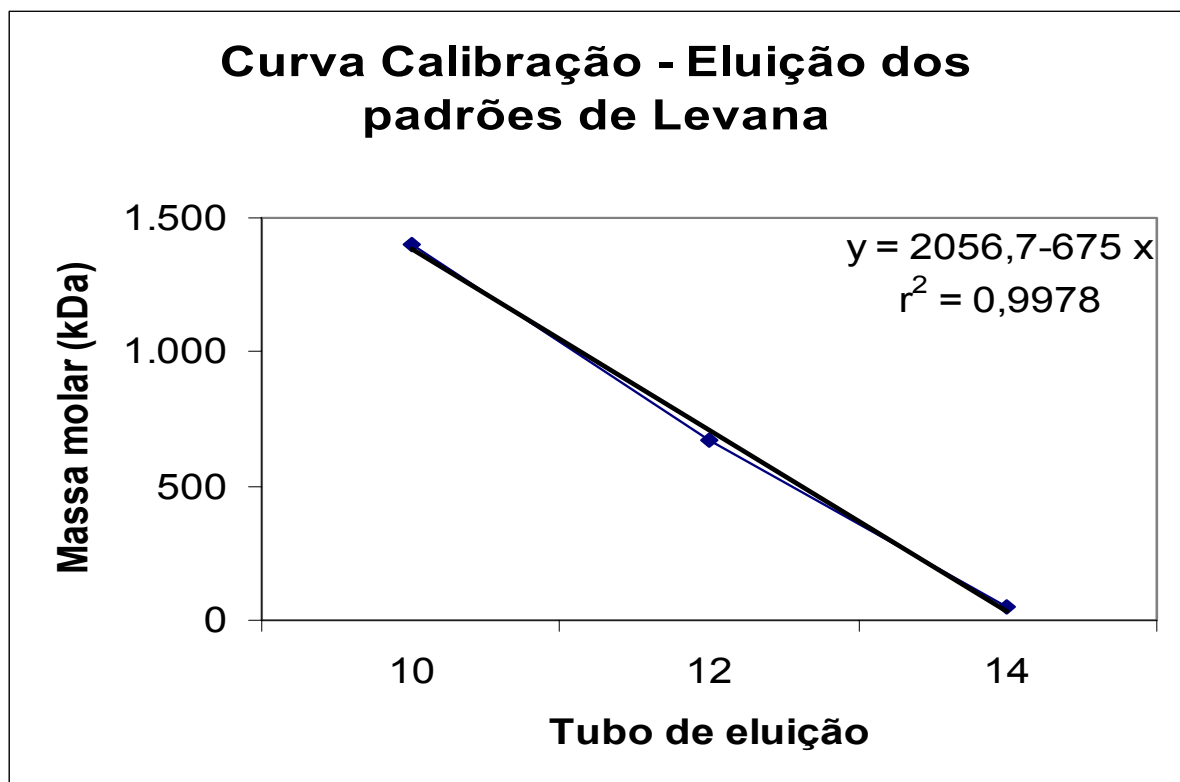
## ANEXO A – Curva de calibração e perfil da levana Sigma

-Curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular com padrões de *Leuconostoc mesenteroides* Sigma de 50000, 670000 e 1000000 Da

-Perfil de eluição da mistura de levanas de *Erwinia herbicola* Sigma

### Curva dos padrões de levana

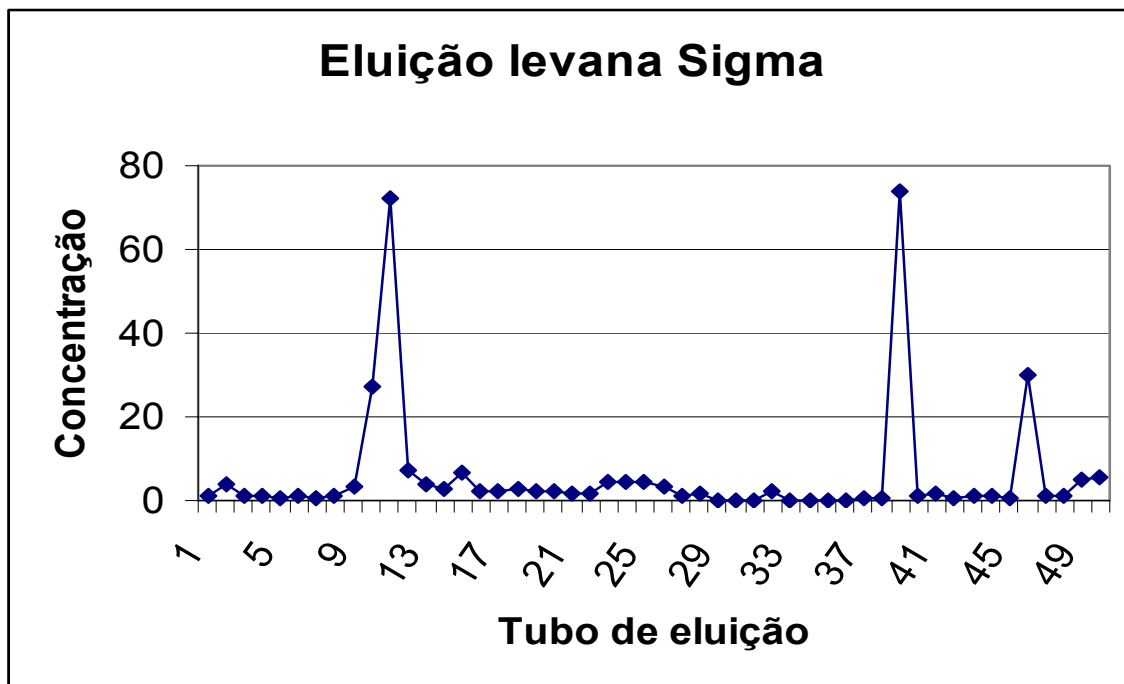
A curva foi confeccionada com padrões de *Leuconostoc mesenteroides* de 50000, 670000 e 1000000 Da.



**Figura 1** – Massas Molares de levana x tubo de eluição do pico.

### Cromatografia de exclusão molecular com levana de *Erwinia herbicola*

A levana Sigma extraída de *Erwinia herbicola* exibe um perfil cromatográfico com três classes de levanas de diferentes massas molares. Segundo a curva de calibração, o primeiro pico deve ser maior que 670.000 Da, e os outros picos têm massas molares inferiores á 50.000 Da.



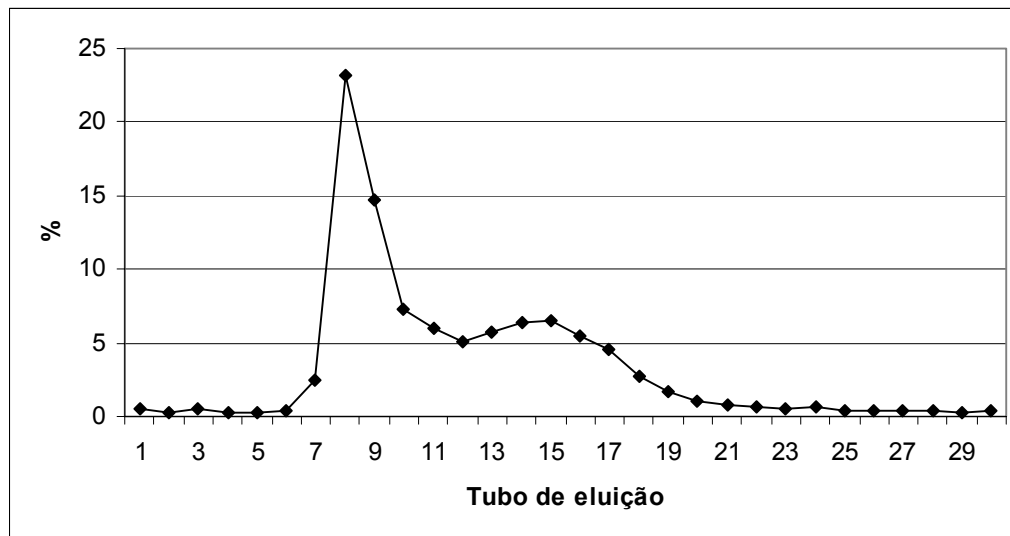
**Figura 2** – Perfil cromatográfico de levana de *Erwinia herbicola* (Sigma).

## **ANEXO B – Perfis de eluição das amostras**

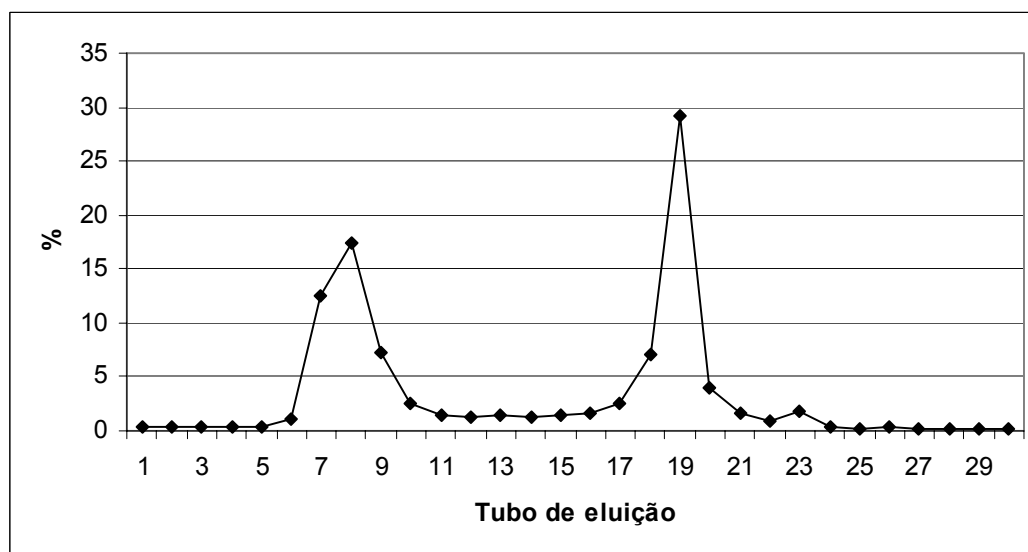
## ANEXO B – Perfis de eluição das amostras

As amostras de levanas dos cultivos determinados pelo delineamento foram isoladas e submetidas á cromatografia de permeação em gel. Os perfis de eluição das amostras correspondem aos respectivos ensaios apresentados na tabela abaixo. Os açúcares totais foram medidos pelo método de fenol-sulfúrico e estão em porcentagem sobre o total de açúcares eluídos. Cada tubo de eluição corresponde a 3.5mL/15'.

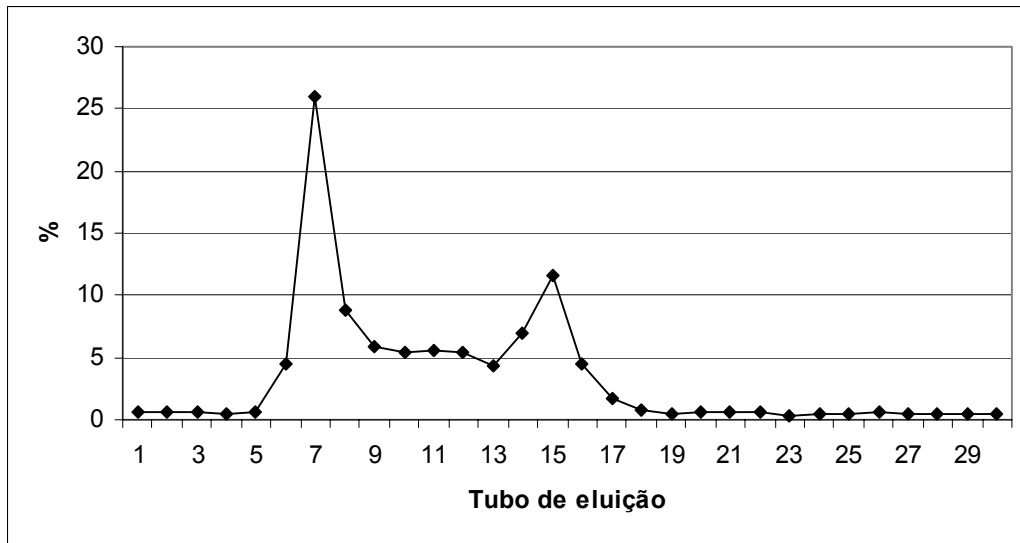
(*) Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais		
	X1	X2	X3	pH	Tempo (h)	Concentração (g/L)
1	-1	-1	-1	4	12	150
2	1	-1	-1	6	12	150
3	-1	1	-1	4	36	150
4	1	1	-1	6	36	150
5	-1	-1	1	4	12	250
6	1	-1	1	6	12	250
7	-1	1	1	4	36	250
8	1	1	1	6	36	250
9	0	0	0	5	24	200
10	0	0	0	5	24	200
11	0	0	0	5	24	200
12	-1,8	0	0	3,2	24	200
13	1,8	0	0	6,8	24	200
14	0	-1,8	0	5	2h24min	200
15	0	1,8	0	5	45h36min	200
16	0	0	-1,8	5	24	110
17	0	0	1,8	5	24	290
18	0	0	0	5	24	200
19	0	0	0	5	24	200
20	0	0	0	5	24	200



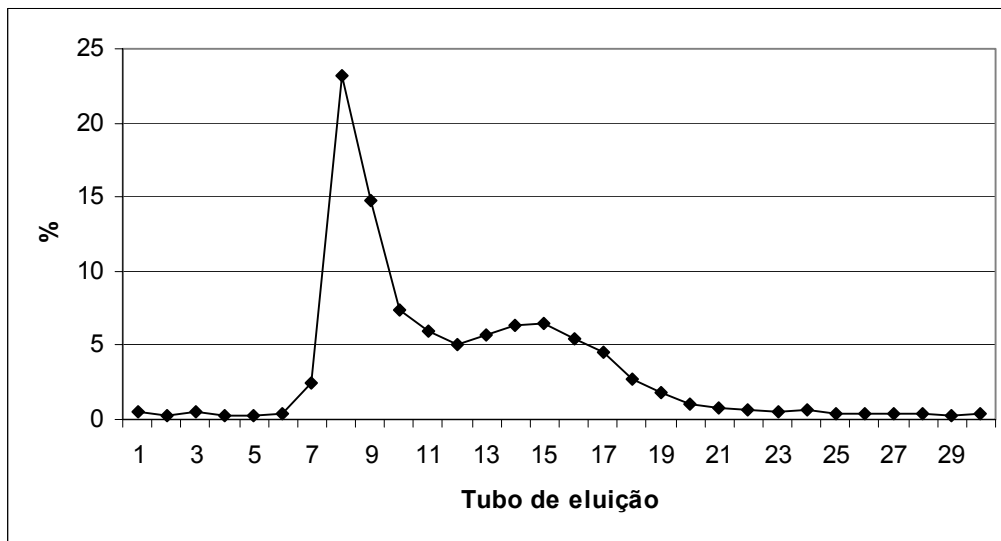
**Figura 1** – Perfil cromatográfico do ensaio 1.



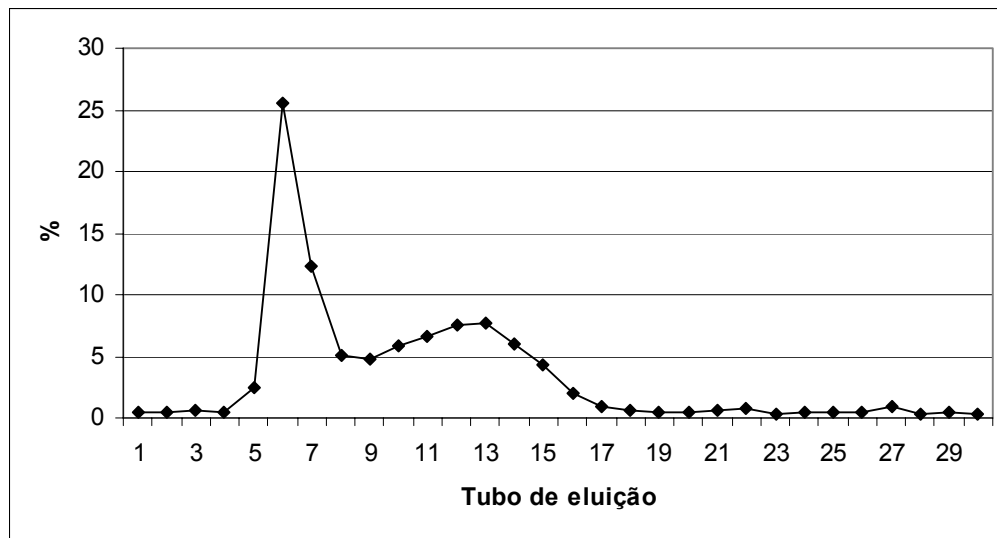
**Figura 2** – Perfil cromatográfico do ensaio 2.



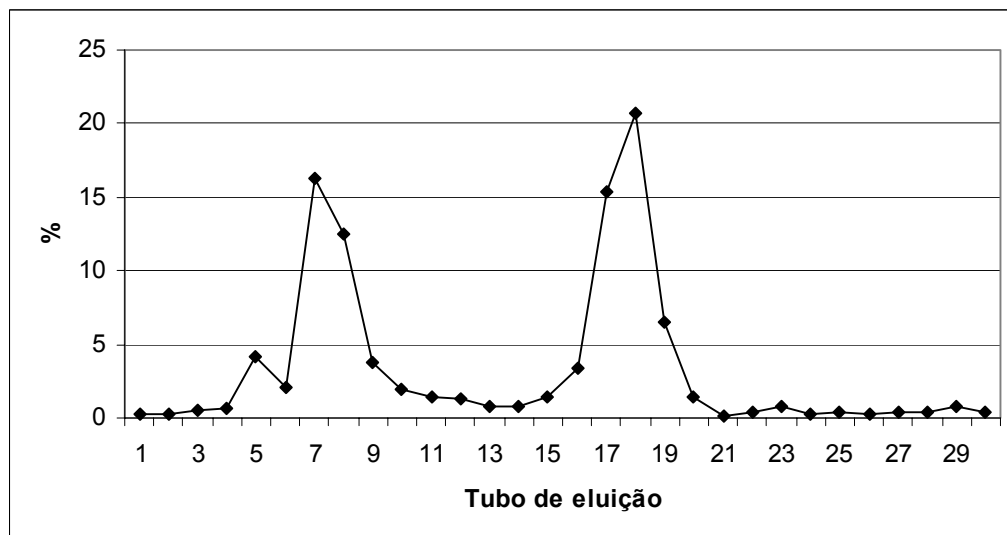
**Figura 3** – Perfil cromatográfico do ensaio 3.



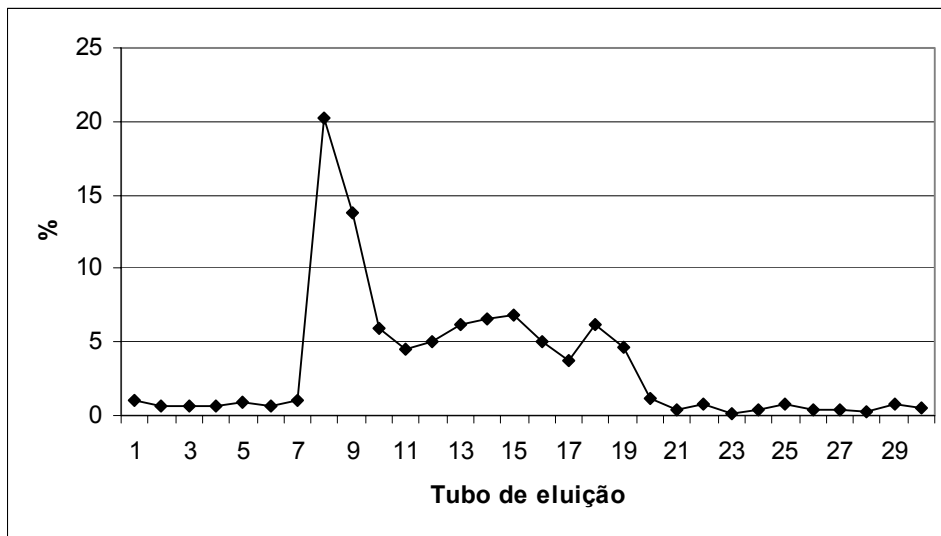
**Figura 4** – Perfil cromatográfico do ensaio 4.



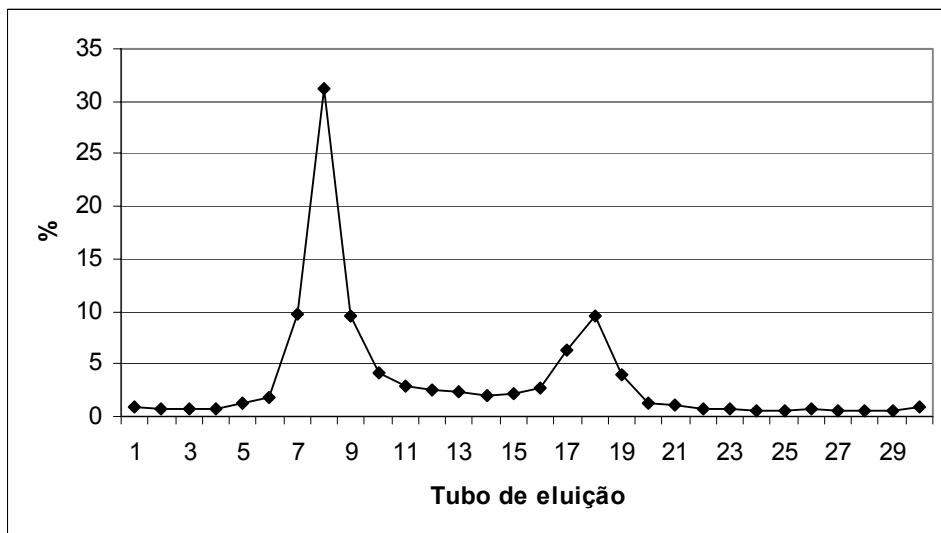
**Figura 5** – Perfil cromatográfico do ensaio 5.



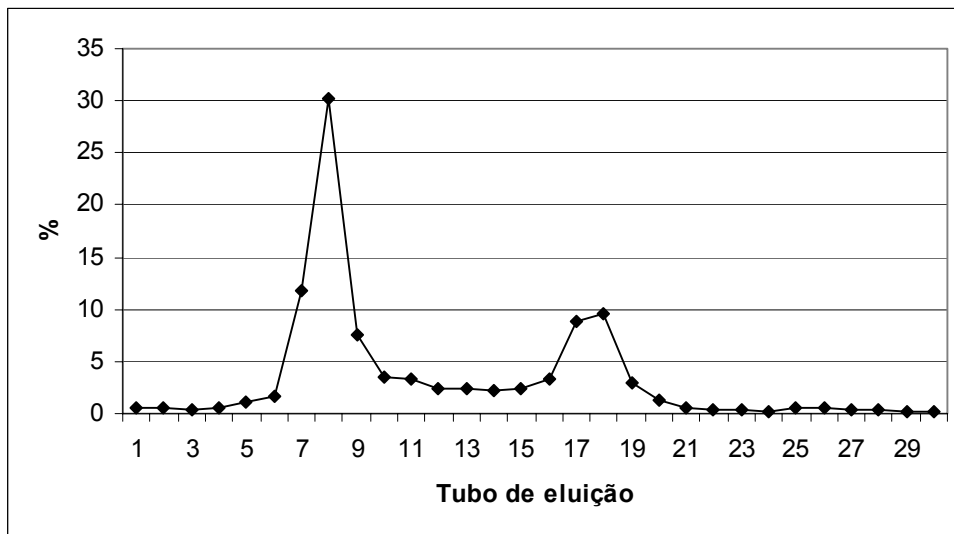
**Figura 6** – Perfil cromatográfico do ensaio 6.



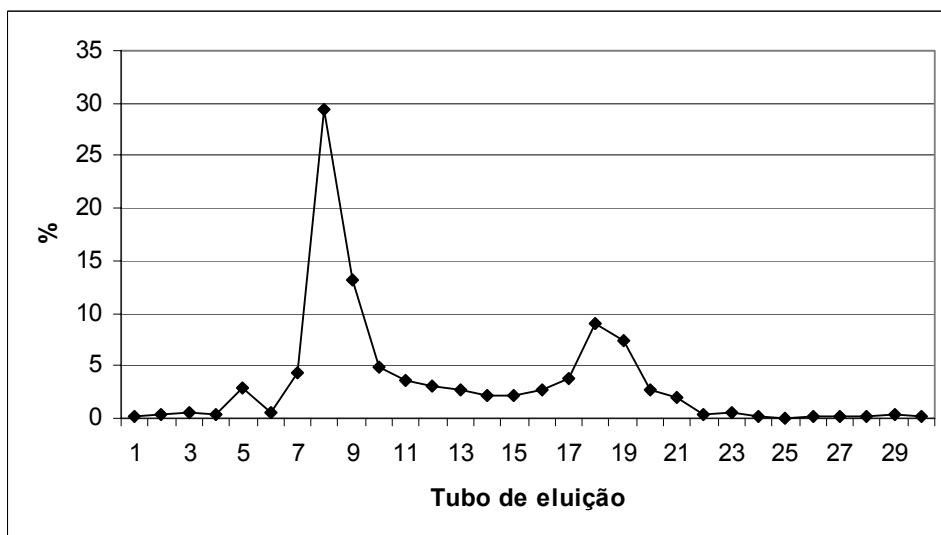
**Figura 7** – Perfil cromatográfico do ensaio 7.



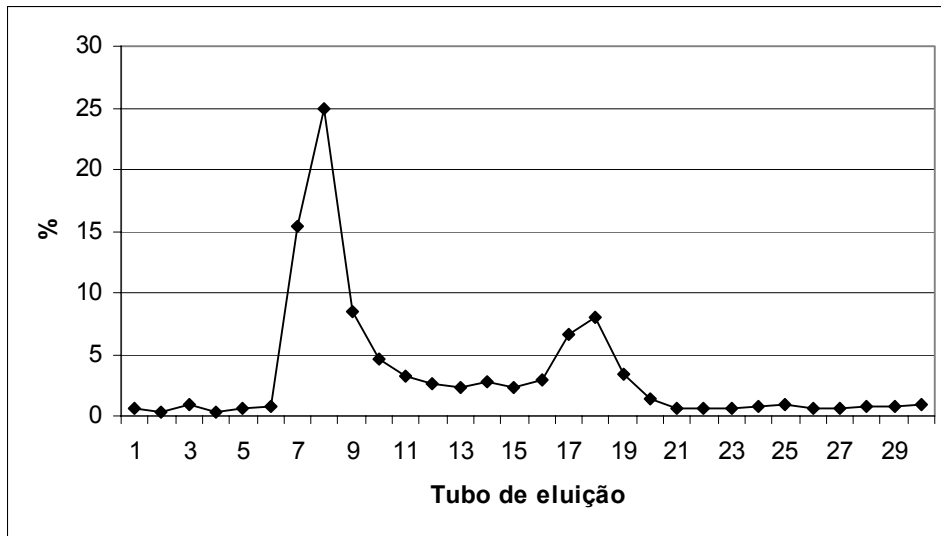
**Figura 8** – Perfil cromatográfico do ensaio 8.



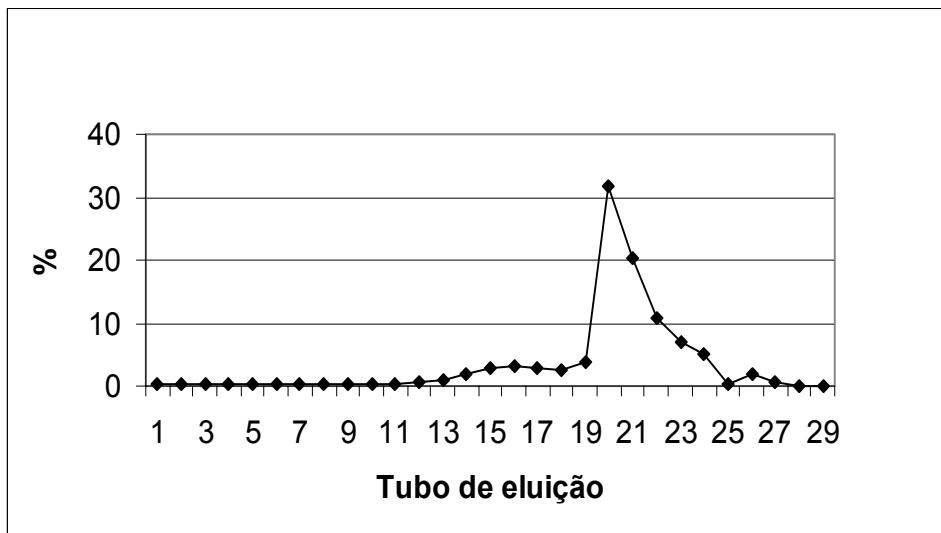
**Figura 9** – Perfil cromatográfico do ensaio 9.



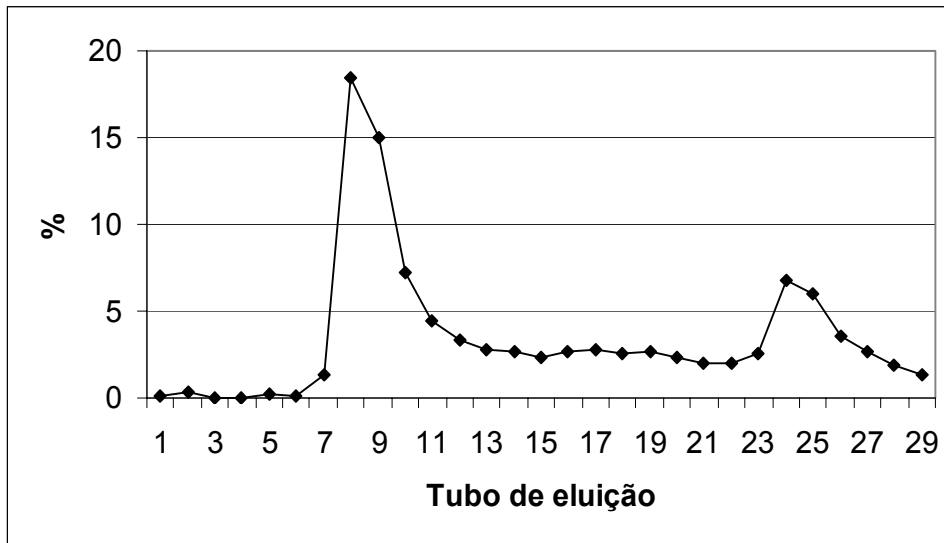
**Figura 10** – Perfil cromatográfico do ensaio 10.



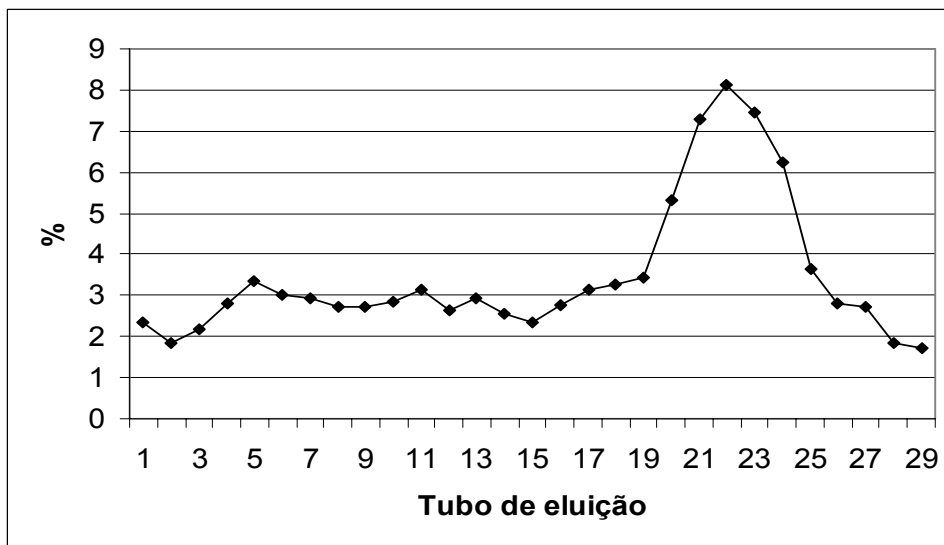
**Figura 11** – Perfil cromatográfico do ensaio 11.



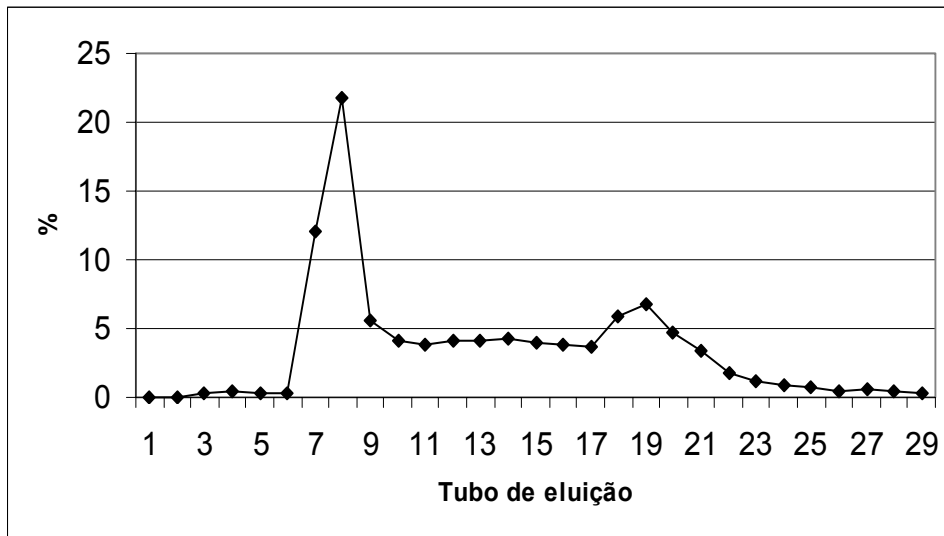
**Figura 12** – Perfil cromatográfico do ensaio 12.



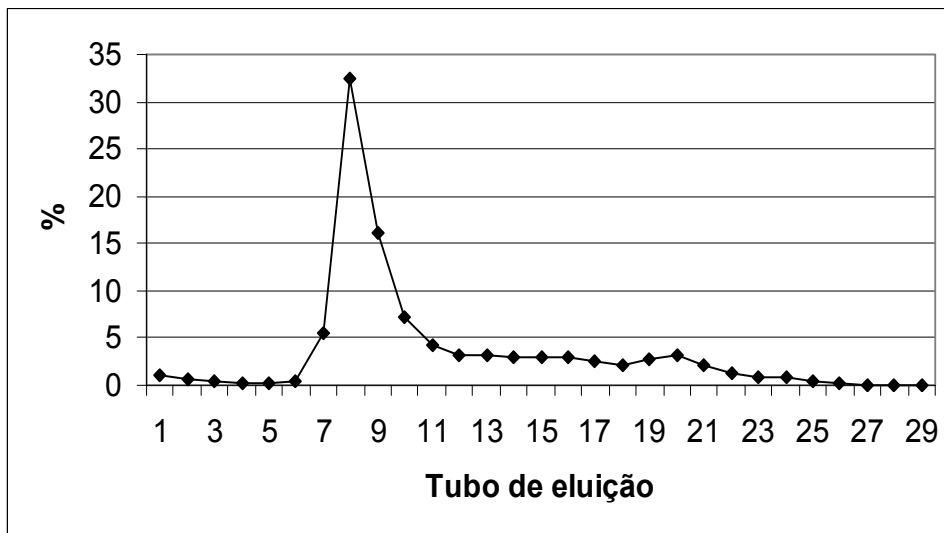
**Figura 13** – Perfil cromatográfico do ensaio 13.



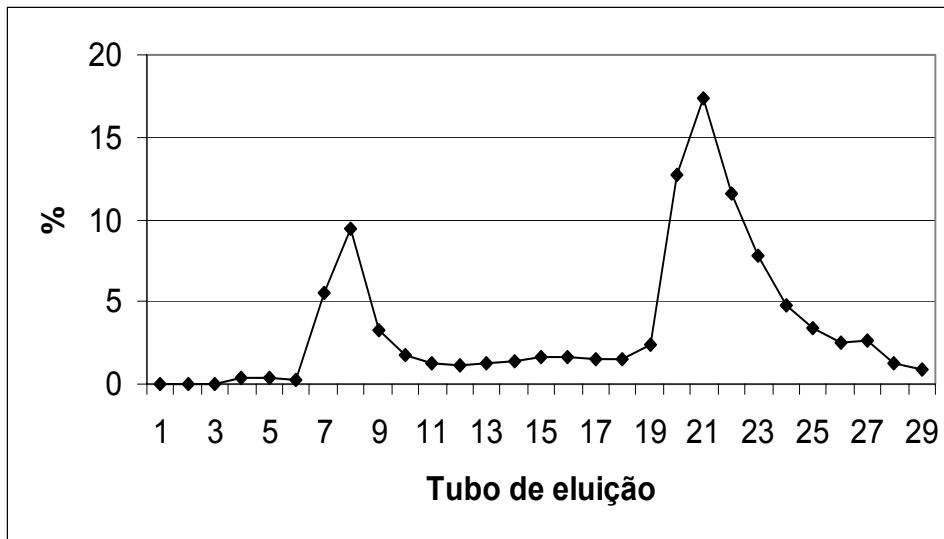
**Figura 14** – Perfil cromatográfico do ensaio 14.



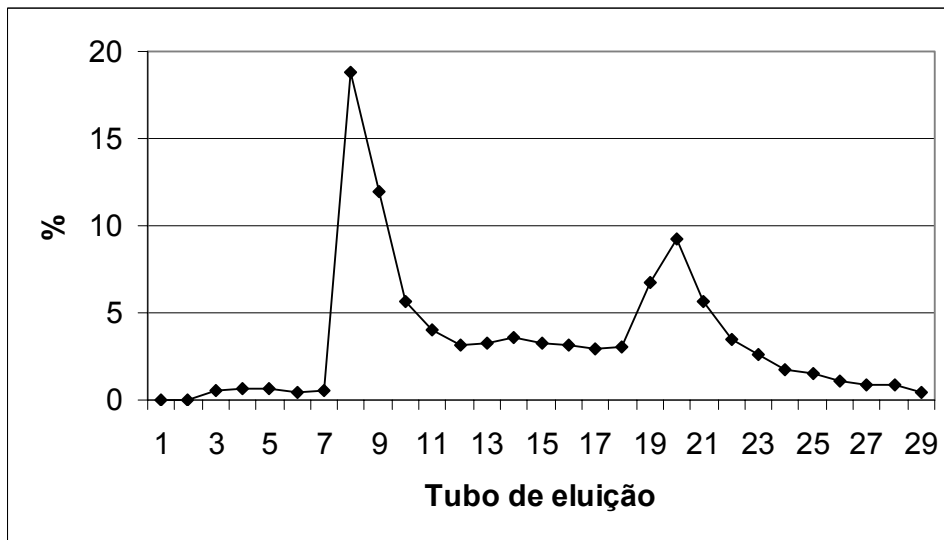
**Figura 15** – Perfil cromatográfico do ensaio 15.



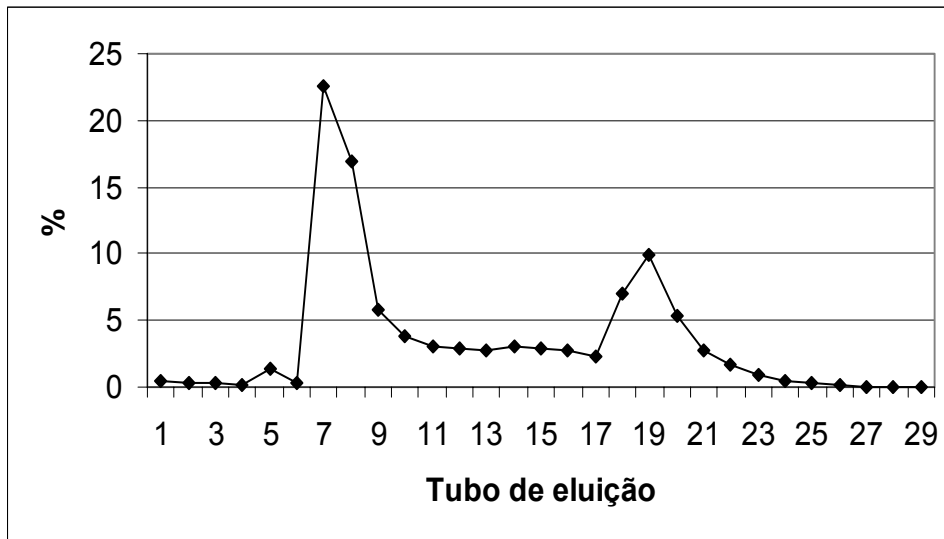
**Figura 16** – Perfil cromatográfico do ensaio 16.



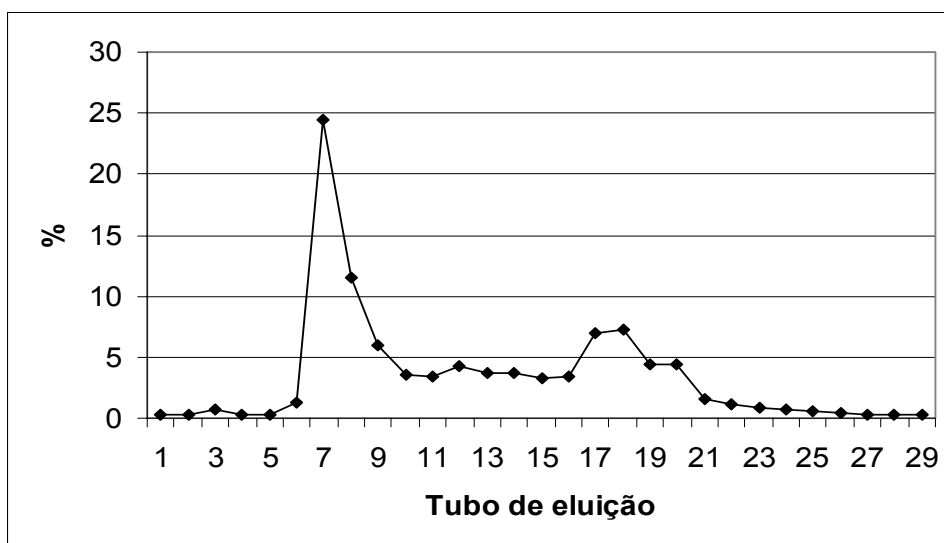
**Figura 17** – Perfil cromatográfico do ensaio 17.



**Figura 18** – Perfil cromatográfico do ensaio 18.



**Figura 19** – Perfil cromatográfico do ensaio 19.



**Figura 20** – Perfil cromatográfico do ensaio 20.

**ANEXO C – Instruções e normas para o encaminhamento e publicação do Artigo no periódico Process Biochemistry.**

## **ANEXO C – Instruções e normas para o encaminhamento e publicação do Artigo no periódico Process Biochemistry.**

### **PROCESS BIOCHEMISTRY**

#### **Guide for Authors**

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

#### **Submission of manuscripts**

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

A cover letter should be submitted on line by authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to PRBI, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described, 4) the transfer of copyright from the author to the publisher.

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

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

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press.

## **Format and type of manuscripts**

Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews. The text must be as concise as possible. All manuscripts must follow the following presentation style: and the contacting fax and email, Abstract and six key words, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement, References, a separate page of figure legends, and finally tables and figures with a separate page for each one. The Results & Discussion sections may be combined together, but anyway it is very important and necessary to make thorough discussion about the submitted work including novelty and impact, Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. It is highly recommended that the legends to be as complete and concise as possible: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend. Incomplete legends could not be accepted.

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

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

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

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

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

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10<sup>9</sup> in America, 10<sup>12</sup> in Europe) is ambiguous and should not be used.

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

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

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

### **References:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Language Polishing:**

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

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

### **Proofreading**

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

### **Offprints**

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

### **Author enquiries**

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit Elsevier's Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

### **Online manuscript tracking**

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

For full and complete Guide for Authors, please refer the World Wide Web: <http://www.elsevier.com/locate/procbio>

**ANEXO D – Comprovante de submissão do artigo “Effect of culture conditions in the molecular weight distribution of *Zymomonas mobilis* levan in sugar cane juice” ao periódico Process Biochemistry.**

Yahoo! Mail - michellebio@yahoo.com.br

Página 1 de 1

**YAHOO! MAIL**  
BRASILEdited by Foxit PDF Editor  
Copyright (c) by Foxit Software Company, 2004  
For Evaluation Only.

imprimir - fechar janela

De: "Process Biochemistry" <prbi@elsevier.com>  
Para: michellebio@yahoo.com.br  
Assunto: Submission Confirmation  
Data: Wed, 06 Dec 2006 00:58:24 -0000

Dear Michelle Tanoue Batista,

Your submission entitled "Effect of culture conditions in the molecular weight distribution of *Zymomonas mobilis* levan in sugar cane juice" has been received by Process Biochemistry

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/prbi/>.

Your username is: Michelle C. Tanoue Batista  
Your password is: \*\*\*\*\*

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Process Biochemistry