



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**



## **Estudo da Produção de Frutose a partir de Levana obtida da Sacarose**

**Renata Miterhof Meirelles**  
Engenheira de Alimentos

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre**  
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M478e Meirelles, Renata Miterhof  
Estudo da produção de frutose a partir de levana obtida da sacarose / Renata Miterhof Meirelles. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Frutose. 2. Frutana  $\beta$ -frutosidase. 3. *Kluyveromyces marxianus*. 4. Levana. 5. Sacarose. I. Frutana Exohidrolase. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

(cars/fea)

Título em inglês: Study of fructose production from levana obtained from sucrose

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fructose, Fructan  $\beta$ -fructosidase,

*Kluyveromyces marxianus*, Levan, Sucrose

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Ranulfo Monte Alegre

Marta Cristina Teixeira Duarte

Alexandre Nunes Ponezi

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por Renata Miterhof Meirelles para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, aprovado pela Comissão Julgadora em 27 de outubro de 2010.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre  
(Orientador – DEA/FEA/UNICAMP)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marta Cristina Teixeira Duarte  
(Membro – CPQBA/UNICAMP)

---

Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi  
(Membro – CPQBA/UNICAMP)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gabriela Alves Macedo  
(Membro – DCA/FEA/UNICAMP)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lúcia Regina Durrant  
(Membro – DCA/FEA/UNICAMP)



*Dedico aos meus pais Sonia e Carlos Eduardo e aos meus irmãos Bernardo e Julia, pelo amor, apoio, compreensão e incentivo. Por jamais terem medido esforços para que eu chegasse onde estou.*

*Amo muito vocês!*



## AGRADECIMENTOS

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*Chico Xavier*

Agradeço à Faculdade de Engenharia de Alimentos e à UNICAMP por me acolherem e permitirem meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço à agência financiadora CNPQ pela concessão da bolsa para a realização do mestrado.

Agradeço ao Prof. Ranulfo Monte Alegre pela dedicação na orientação deste trabalho, confiança e pelo grande ensinamento científico.

Aos membros da Banca Examinadora pela análise, correções e sugestões que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

Agradeço aos funcionários e professores da FEA/UNICAMP, pela ajuda e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório, Cláudia, Lucielen, Tati, Andréia, Renato, César, Oswaldo e Dona Maria, pelos momentos de descontração, seriedade e cooperação, mas em especial ao por toda ajuda nos meus experimentos, amizade e paciência.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação, construídos e descobertos durante o percurso, pelos momentos compartilhados, pela ajuda, amizade e alegria. À Juliana pela grande amizade e companheirismo, Dudu/Pitico, Vanessa, Vânia, Vitor, Andréia, Titi, Gláucia, e a todos os outros que aqui não citei, mas que de alguma forma contribuíram e estão presentes no meu coração.

Um especial agradecimento às minhas amigas-irmãs Maria Fernanda e Amanda, presentes em todas as etapas da minha vida. Obrigada pela amizade eterna e imprescindível. Amizade essa que vai além do que as palavras podem expressar e que não conhecem tempo, nem distância.

Existem pessoas que aparecem em nossa vida quando menos esperamos, são pessoas colocadas no nosso caminho que deixam nossos dias mais bonitos, nossa vida mais feliz. Agradeço ao meu namorado Lizarb, que sempre escutou o que eu tinha para dizer e desabafar, agradeço seu carinho, compreensão, companheirismo, incentivo e grande ajuda nos momentos mais difíceis, agradeço por fazer parte da minha vida. Com você do meu lado tudo ficou melhor!

Agradeço imensamente a minha família, pelo apoio, incentivo e amor. Mesmo distantes estiveram sempre presentes na minha mente e coração. Aos meus pais Sonia e Eduardo pela criação, ensinamentos, educação e amor. Ao meu padrinho Fernando pelo apoio. Aos meus avós Aparecida e Geraldo pelo carinho. Aos meus irmãos Bernardo e Julia pela amizade e companheirismo.

E principalmente, agradeço ao que o sentido visão muitas vezes não vê, mas sinto muitas vezes presente em minha vida. A Deus, que me ilumina e protege todos os dias, pela saúde e pela minha família.

*"A coisa mais indispensável a  
um homem é reconhecer o uso que  
deve fazer do seu próprio conhecimento."  
Platão*



## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT .....	xix
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Frutose .....	3
2.1.1 Classificação e Estrutura.....	4
2.1.2 Fontes de Frutose.....	5
2.2 Xarope de frutose .....	7
2.2.1 Aplicações.....	8
2.2.2 Nutrição .....	9
2.2.3 Produção .....	10
2.3 Inulina .....	12
2.4 Levana.....	13
2.4.1 Levanassacarase .....	14
2.4.1.1 Hidrólise de Sacarose – Formação de frutose livre .....	15
2.4.1.2 Transferência do Radical Frutosil/Transfrutosilação – Formação de Levana .....	16
2.5 <i>Zymomonas mobilis</i> .....	17
2.5.1 Produção de Levana por Levanassacarase de <i>Zymomonas mobilis</i> .....	18
2.5.1.1 Influência da Temperatura e pH.....	24
2.5.1.2 Influência da Concentração da Sacarose .....	26
2.5.1.3 Influência da Presença de Sais .....	27
2.6 Hidrólise de Levana.....	28
2.6.1 Formação de Frutose livre .....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1 Produção de Levana .....	35
3.1.1 Micro-organismo .....	35
3.1.2 Manutenção do Micro-organismo .....	35
3.1.3 Preparo do Inóculo .....	36
3.1.4 Fermentação em Frascos Erlenmeyer.....	36
3.1.5 Separação da Levana Sintetizada .....	37
3.2 Hidrólise de Levana.....	38
3.2.1 Micro-organismos .....	38
3.2.2 Manutenção do Micro-organismo .....	38
3.2.3 Preparo do Inóculo .....	38
3.2.4 Seleção de Micro-organismos .....	39
3.2.5 Estudo da Otimização do Meio de Fermentação para Produção de Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) .....	39
3.3 Caracterização Parcial da Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) .....	41
3.3.1 Perfil de Temperatura e pH.....	41
3.3.2 Estabilidade Térmica .....	42
3.3.2.1 Determinação da Constante de Desnaturação ( $K_d$ ) .....	42
3.3.2.2 Determinação da Meia Vida da Enzima ( $t_{1/2}$ ) .....	43

3.3.2.3	Determinação da Energia de Ativação da Desnaturação ( $E_{ad}$ ).....	43
3.3.3	Estabilidade de pH.....	44
3.3.3.1	Determinação da Constante de Desnaturação ( $K_d$ ) .....	44
3.3.3.2	Determinação da Meia Vida ( $t_{1/2}$ ).....	44
3.3.4	Determinação de $K_m$ e $v_{m\acute{a}x}$ .....	44
3.4	Metodologia Analítica .....	45
3.4.1	Determinação de Levana .....	45
3.4.2	Determinação de Atividade Enzimática de Levanassacarase .....	45
3.4.3	Determinação de Atividade Enzimática da Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) .....	46
3.4.4	Determinação de Açúcares .....	46
3.4.5	Determinação de pH.....	47
3.4.6	Cromatografia .....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1	Produção de Levana .....	49
4.2	Hidrólise de Levana.....	57
4.2.1	Seleção de Micro-organismos.....	57
4.2.2	Otimização do Meio de Fermentação para Produção de Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) .....	58
4.2.2.1	Delineamento Plackett-Burman (PB12) .....	58
4.2.2.2	Delineamento Fatorial Fracionário (FF) $2^{4-1}$ .....	60
4.2.2.3	Delineamento para Estudo da Concentração de Levana.....	63
4.3	Caracterização Parcial da Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	66
4.3.1	Perfil de Temperatura e pH.....	66
4.3.2	Estabilidade Térmica .....	71
4.3.3	Estabilidade de pH.....	76
4.3.4	Determinação de $K_m$ e $v_{m\acute{a}x}$ .....	78
5	CONCLUSÕES.....	83
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	85
7	ANEXO .....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1: Formas estruturais da frutose (Fonte: LOURENÇO, 2004).....	5
Figura 2-2: Estrutura da levana (Fonte: LEVAN STRUCTURE, 2008).....	13
Figura 4-1: Produção de levana (g/L) durante PB12 com cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494: (a) ensaios 1 a 8 (b) ensaios 9 a 16. ....	51
Figura 4-2: Rendimento de produção de levana por concentração de sacarose inicial durante PB12 com cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.....	52
Figura 4-3: Produtividade de levana (g/L.h) durante PB12 com cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.....	53
Figura 4-4: Atividade enzimática (U/mL) de frutana $\beta$ -frutosidase para hidrólise de levana com linhagens de <i>Kluyveromyces</i> . ....	58
Figura 4-5: Valores de pH obtidos no FF $2^{4-1}$ para hidrólise de levana com frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 com 24 e 46 horas de cultivo. ....	61
Figura 4-6: Atividade enzimática obtida no FF $2^{4-1}$ para hidrólise de levana com frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 com 24 e 46 horas de cultivo. ....	62
Figura 4-7: Valores de pH obtidos para hidrólise de levana com frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 com 12, 23 e 35 horas de cultivo.....	63
Figura 4-8: Atividade enzimática (U/mL) para hidrólise de levana com frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 com 12, 23 e 35 horas de cultivo.....	64
Figura 4-9: Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo.....	69
Figura 4-10: Superfície de resposta para a atividade de frutana $\beta$ -frutosidase em função do pH e temperatura da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	69
Figura 4-11: Curva de contorno para a atividade de frutana $\beta$ -frutosidase em função do pH e temperatura da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281. ....	70
Figura 4-12: Efeito da temperatura em função do tempo de incubação para a frutana $\beta$ -frutosidase da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281, para cálculo da constante de desnaturação ( $K_d$ ) na .....	72
Figura 4-13: Linearização dos valores de $K_d$ em função da temperatura (K) para o cálculo da energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da frutana $\beta$ -frutosidase da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	73
Figura 4-14: Comparação dos valores de $K_d$ experimental com os estimados para frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	74
Figura 4-15: Efeito do pH em função do tempo de incubação para a frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 no pH 3,0.....	76
Figura 4-16: Meia vida de estabilidade de pH para a frutana $\beta$ -frutosidase proveniente de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	77
Figura 4-17: Efeito da concentração do substrato levana na atividade da frutana $\beta$ -frutosidase proveniente de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281. ....	79
Figura 4-18: Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ para a frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	80
Figura 4-19: Cromatografia do padrão frutose e dos produtos finais das reações de levana (5, 10, 20, 30 e 40 g/L) pela frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	82



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2-1: Açúcares simples em algumas frutas, hortaliças e vegetais. ....	6
Tabela 2-2: Classificação dos produtos à base de frutose.....	7
Tabela 3-1: Composição do meio utilizado na manutenção da cepa e no preparo do inóculo do mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.....	35
Tabela 3-2: Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento PB12, com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para produção de levana pelo mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494.....	37
Tabela 3-3: Composição do meio YM usado na manutenção das cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> . ....	38
Tabela 3-4: Composição do Meio de Inóculo para as cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .39	
Tabela 3-5: Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento Plackett-Burman (PB12), com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para produção de frutana β-frutosidase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	40
Tabela 3-6: Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento Fatorial Fracionário (FF) 2 <sup>4-1</sup> com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para produção de frutana β-frutosidase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	41
Tabela 3-7: Matriz dos ensaios gerada pelo DCCR 2 <sup>2</sup> com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para determinação de temperatura e pH ótimo de atividade de frutana β-frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281. ....	42
Tabela 4-1: Valores de pH obtidos no PB12 para produção de levana com cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.....	49
Tabela 4-2: Produção de levana (g/L) obtida no PB12 para produção de levana com cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.....	50
Tabela 4-3: Porcentagem da concentração de levana produzida por concentração de substrato inicial obtida no PB12 com cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494. ....	52
Tabela 4-4: Produtividade de levana (g/L.h) obtida no PB12 com cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.....	53
Tabela 4-5: Resultados dos ensaios 12 e média dos pontos centrais obtidos no PB12 com cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.....	54
Tabela 4-6: Estimativa dos efeitos para concentração de levana produzida pela cepa mutante de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 no PB12 após 24 h de cultivo. ....	54
Tabela 4-7: Atividade enzimática (U/mL) de frutana β-frutosidase para hidrólise de levana com linhagens de <i>Kluyveromyces marxianus</i> . ....	57
Tabela 4-8: Resultados obtidos no PB12 para hidrólise de levana com frutana β-frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 após 24h de cultivo. ....	59
Tabela 4-9: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática obtida no PB12 de hidrólise de levana com frutana β-frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 após 24h de cultivo.....	60
Tabela 4-10: Valores de pH e atividade enzimática (U/mL) obtidos no FF 2 <sup>4-1</sup> para hidrólise de levana com frutana β-frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 com 24 e 46 horas de cultivo.....	61
Tabela 4-11: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática obtida no FF 2 <sup>4-1</sup> para hidrólise de levana com frutana β-frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 com 24 horas de cultivo.....	62

Tabela 4-12: Valores de pH obtidos na hidrólise de diferentes concentrações de levana pela enzima frutana $\beta$ -frutosidase de <i>K. marxianus</i> NRRL Y-8281 com 12, 23 e 35 horas de cultivo.....	63
Tabela 4-13: Atividade enzimática obtida para hidrólise de levana com frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 com 12, 23 e 35 horas de cultivo.....	64
Tabela 4-14: Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> , com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para estudo do efeito da temperatura e pH, e respostas de atividade enzimática de frutana $\beta$ -frutosidase.....	67
Tabela 4-15: Coeficientes de regressão para a respostas de atividade enzimática de frutana $\beta$ -frutosidase obtida de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 sobre a levana.....	67
Tabela 4-16: Análise de Variância (ANOVA) para a atividade de frutana $\beta$ -frutosidase sobre a levana.....	68
Tabela 4-17: Valores de $K_d$ (min <sup>-1</sup> ) e suas respectivas temperaturas para a frutana $\beta$ -frutosidase da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	73
Tabela 4-18: Valores experimentais e estimados da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas estudadas para frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	74
Tabela 4-19: Valores experimentais da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) nos diferentes pHs estudados para a frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	77
Tabela 4-20: Atividade enzimática em função da concentração de levana para a frutana $\beta$ -frutosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281.....	78
Tabela 7-1: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 40 °C.....	97
Tabela 7-2: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 50 °C.....	97
Tabela 7-3: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 60 °C.....	97
Tabela 7-4: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 70 °C.....	97
Tabela 7-5: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 80 °C.....	98
Tabela 7-6: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 3,0.....	98
Tabela 7-7: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 4,0.....	98
Tabela 7-8: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 5,5.....	98
Tabela 7-9: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 7,0.....	99
Tabela 7-10: Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 8,0.....	99

## RESUMO

O mercado consumidor da frutose tem aumentado significativamente nos últimos anos pela sua utilização cada vez maior em substituição à sacarose em virtude do seu poder edulcorante 70% superior e dos benefícios fisiológicos importantes, como metabolismo independente da insulina, sendo adequada para alimentos fabricados especificamente para diabéticos. Sua maior aplicação tecnológica encontra-se no uso de xaropes enriquecidos com frutose em vários segmentos industriais como alimentício, farmacêutico e químico. Comercialmente, a obtenção de frutose envolve um processo de alto custo sendo interessante o desenvolvimento de um processo que combine a produção por via enzimática e a utilização da sacarose como substrato para obtenção de frutose de alto grau de pureza. O objetivo geral deste trabalho foi estudar e otimizar a hidrólise da levana para obtenção de frutose livre. Para tal, levana foi previamente obtida pela levanassacarase durante fermentação da cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em substrato a base de sacarose. *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 foi selecionada dentre três linhagens da espécie *Kluyveromyces marxianus* (CCT4294, NRRL Y-8281 e NRRL Y-610) devido à sua maior produção de frutana  $\beta$ -frutosidase. Foram realizados delineamentos experimentais tendo como variáveis temperatura,  $\text{pH}_{\text{inicial}}$ , concentrações iniciais de levana, extrato de levedura e peptona. A enzima agiu exohidroliticamente obtendo apenas frutose como produto, e não foi observado inibição da reação pelo produto. A frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 foi caracterizada parcialmente quanto ao pH e temperatura ótimos (4,4 e 50 °C), estabilidade térmica e pH de pré incubação, além dos parâmetros cinéticos da Equação de Michaelis-Mentem,  $K_m$  e  $V_{\text{máx}}$  (61,5  $\mu\text{mol/mL}$  e 0,0112  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ , respectivamente) para o substrato levana.

**Palavras chaves:** Frutose, Frutana  $\beta$ -frutosidase, Frutana Exohidrolase, Levana, Sacarose, *Kluyveromyces marxianus*, *Zymomonas mobilis*.



## ABSTRACT

The market for fructose consumption has increased significantly in the last years by increasing its use in place of sucrose, because of its sweetening power 70% higher than the sucrose and the physiological benefits like independent metabolism of insulin, which is, therefore, suitable for food made specifically for diabetics. His greatest technological application is the use of enriched fructose syrups in various industries like food, pharmaceutical and chemical ones. Commercially, the obtainment of fructose involves a high cost, being interesting to develop a process that combines the production of fructose by an enzyme, using sucrose as substrate to obtain fructose of high purity. Therefore, the objective of this work was to study and optimize the hydrolysis of levan to obtain free fructose. To accomplish this, the levan was previously obtained by levansucrase during fermentation of mutant strain of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 in sucrose substrate. *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 was selected among three strains of the species *Kluyveromyces marxianus* (CCT4294, NRRL Y-8281 and NRRL Y-610) by the increased production of fructan  $\beta$ -fructosidase. Experimental designs were performed having as variables temperature, initial pH, initial concentrations of levan, yeast extract and peptone. The enzyme acted in a exohydrolytically fashion, getting only fructose as released product, and it was not observed inhibition by product reaction. The fructan exo- $\beta$ -fructosidase of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 was partially characterized for optimum pH and temperature (4.4 and 50 °C), thermal and pH stability, besides the kinetic parameters of the Michaelis-Mentem equation,  $K_m$  and  $V_{m\acute{a}x}$  (61,5  $\mu\text{mol/mL}$  and 0,0112  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ , respectively) to the substrate levan.

**Keywords:** Fructose, Fructan  $\beta$ -fructosidase, Fructan Exohydrolase, Levan, Sucrase, *Kluyveromyces marxianus*, *Zymomonas mobilis*.



## 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Vários carboidratos têm gerado grande interesse nas últimas décadas com a disponibilidade de novas tecnologias para a sua produção. Produtos de hidrólise do amido não só ganharam quotas substanciais do mercado em alguns países, como também têm substituído a sacarose em grande número de aplicações (LIPINSKI; VON, 2006).

Grandes mudanças no uso de adoçantes nos Estados Unidos ocorreram desde 1970, tanto em quantidade como em composição. O aumento do consumo de edulcorantes tem sido marcado por uma mudança na fonte de adoçantes. Até a década de 1970, a maior parte do açúcar era obtida a partir de beterraba ou de cana-de-açúcar, sob a forma de sacarose. A partir da década de 70, o xarope de milho com alta concentração de frutose (High Fructose Corn Syrup – HFCS) ganhou popularidade como edulcorante em alimentos processados, induzido por um aumento relativo no preço do açúcar e pela necessidade emergencial do surgimento de edulcorantes mais baratos à base de milho (BEGHIN; JENSEN, 2008).

A frutose, dentre todos os açúcares conhecidos na natureza, é a que tem maior poder edulcorante, sendo necessária menor quantidade do produto para se obter o mesmo resultado. É conhecida como o açúcar ideal do ponto de vista nutricional. Alguns pesquisadores apontam benefícios fisiológicos que podem ser obtidos incluindo a frutose na dieta (GUPTA et al., 1994). Além disso, pode substituir a sacarose já que esta é responsável por agravar problemas de obesidade, arteriosclerose e diabetes (VANDAMME; DERYKE, 1983).

O estudo da produção de xarope de frutose enriquecido a partir de sacarose tem atraído a atenção de pesquisadores, em função de sua crescente utilização em vários segmentos industriais como: alimentício (doces, bebidas e produtos dietéticos), farmacêutico e químico (agente redutor), chegando a substituir a sacarose em diversas aplicações como pode ser verificado em mercados como Japão e Estados Unidos.

Seu valor comercial é três vezes maior que o da sacarose. O Brasil importa todos os frutoligossacarídeos que necessita para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica. Isto deve-se em parte, a falta de um processo biotecnológico adequado e economicamente

viável para aplicação industrial, tornando-se interessante o desenvolvimento de um processo para a produção de frutose.

Usualmente, a obtenção de frutose é feita através de processos que envolvem hidrólise da sacarose ou amido de milho com posterior inversão com glicose isomerase e separação da frutose da glicose (LOURENÇO, 2004). Este é um processo de alto custo tornando-se necessário identificar novas fontes que possam ser utilizadas na produção de frutose. A hidrólise de frutanas, polímeros de frutose, vem sendo estudada como alternativa para a obtenção de frutose.

Dentre muitos métodos para obtenção de frutose de alto grau de pureza, a utilização de inulina vem sendo bastante estudada. Os frutoligossacarídeos (FOS) tipo inulina são muito mais bem estudados quanto às suas aplicações do que os FOS tipo levana. Por outro lado, as levanases têm sido mais estudadas que as inulinas, provavelmente pela sua maior facilidade de obtenção. A inulina, apesar de apresentar maior produtividade de frutose do que a sacarose, também é um substrato mais caro.

Assim, torna-se interessante o desenvolvimento de um processo que combine a produção de frutose por via enzimática, com a utilização da levanassacarases para hidrólise de sacarose e polimerização da frutose em levana, e posterior ação da frutana  $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) na hidrólise da levana para produção de frutose livre, tendo-se a partir de uma matéria-prima de menor custo (sacarose), um produto com alto valor comercial (frutose) e com boas perspectivas econômicas.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho é estudar a produção enzimática da frutose. Objetivos específicos:

1. Produzir levana a partir da sacarose utilizando a levanassacarase.
2. Estudar a produção da Frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces* e sua ação para hidrólise de levana.
3. Desenvolver planejamentos experimentais para definição das melhores condições para a produção de frutose.
4. Determinar as condições para obtenção da máxima conversão.
5. Otimizar da produção da frutose em frascos Erlenmeyer através de Planejamento Experimental.
6. Caracterizar parcialmente a enzima livre obtida.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Frutose

A frutose, também conhecida como levulose, é um açúcar adequado à mesa, ingrediente para formulação de alguns alimentos e substrato para processos fermentativos (VANDAMME; DERYKE, 1983). É tolerada por pacientes diabéticos e está relacionada com o aumento da absorção de ferro (BIRCH; BLAKEBROUGH; PARKER, 1981; GODFREY; WEST, 1996).

A frutose vem sendo empregada como adoçante de bebidas e frutas industrializadas, constituindo de 4,0% a 8,0% em peso, em decorrência de algumas características como maior solubilidade em soluções aquosas e pelo fato de ser mais doce que a sacarose (HALLFRISCH, 1990).

De longe, o poder edulcorante é a propriedade funcional mais importante do xarope de frutose, sendo 1,2 a 1,8 vezes mais doce que a sacarose e com valor econômico aproximadamente três vezes maior (BIRCH; BLAKEBROUGH; PARKER, 1981; GODFREY; WEST 1996). Devido às diferentes formas como a frutose se apresenta em soluções aquosas e a dependência de mudanças de temperatura, a intensidade de doçura comparada com sacarose não é apenas dependente da concentração, mas também da temperatura, diminuindo com o aumento da mesma (LIPINSKI; VON, 2006).

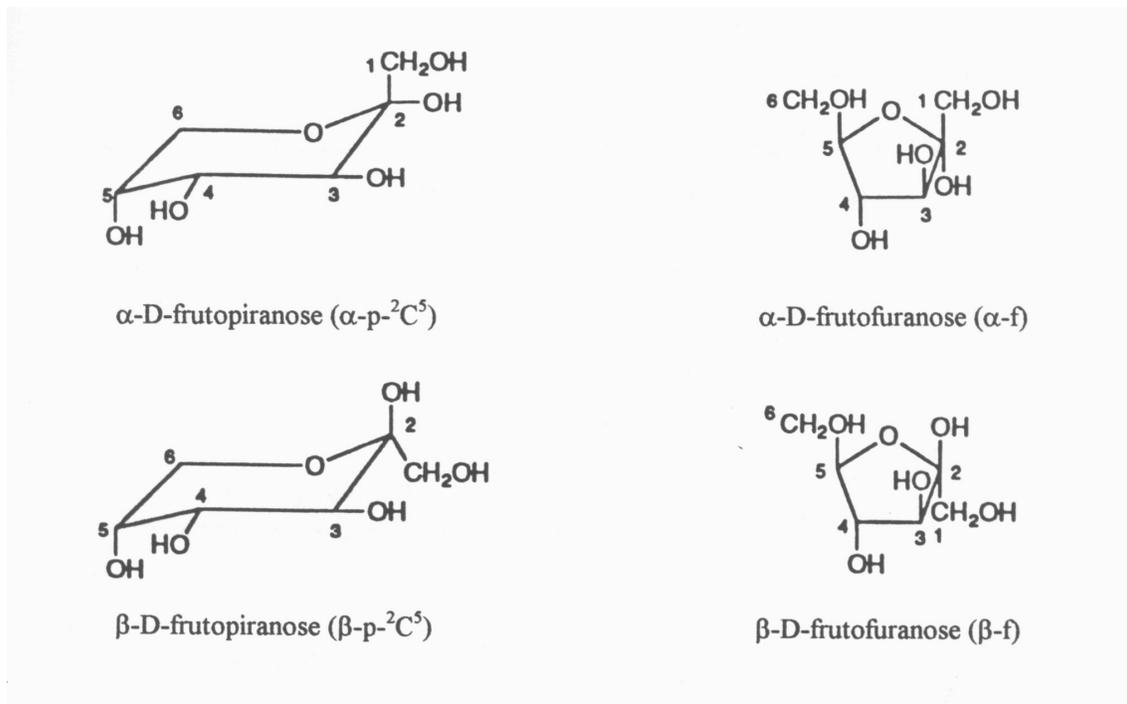
Sua utilização na indústria de alimentos e bebidas vem crescendo de forma acentuada pelo fato desse açúcar não apresentar problemas de cristalização como a sacarose (GE et al., 1998). Funcionalmente, o xarope de frutose proporciona poder edulcorante, viscosidade, humectância, sólidos nutritivos e fermentabilidade (BUCK, 2001). Assim como a glicose, a frutose abaixa o ponto de congelamento dos alimentos por possuir baixo peso molecular quando comparados com di e oligossacarídeos; e por serem açúcares redutores esses monossacarídeos desenvolvem cor nos produtos através da reação de Maillard, envolvendo proteínas e aminoácidos. Essa reação promove a formação de uma coloração marrom e o estágio inicial da reação ocorre mais rapidamente com frutose do que com glicose (DILLIS, 1993). O xarope de frutose também pode ser utilizado para aumentar a pressão osmótica e diminuir a atividade de água (BUCK, 2001).

### 2.1.1 Classificação e Estrutura

A frutose é um açúcar simples e como todos os monossacarídeos é um açúcar redutor. Os açúcares são carboidratos, apresentando carbono, hidrogênio e oxigênio na sua composição em uma proporção de 1:2:1 (MALTA; GUIMARÃES, 1976). É um isômero da glicose com mesma fórmula empírica,  $C_6H_{12}O_6$ , mas com estrutura química diferente.

Segundo Nelson e Cox (2004), o monossacarídeo glicose contendo o grupo carbonila no final da cadeia de carbono, ou seja, em um grupo aldeído, é uma aldose, enquanto a frutose contendo o grupo carbonila em qualquer outra posição, em um grupo cetona, é uma cetose. As hexoses, que incluem as aldohexose D-glicose e ceto-hexose D-frutose são os monossacarídeos mais comuns na natureza.

Em solução aquosa aldotetroses e todos os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono ocorrem predominantemente como estruturas cíclicas (anel), em que o grupo carbonila formou uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila ao longo da cadeia (NELSON; COX, 2004). A frutose possui formas tautoméricas, como a  $\beta$ -D-frutopiranosose, que está presente no estado cristalino. Quando dissolvida em água ocorre modificação rápida, que resulta na formação dos tautômeros  $\beta$ -D-frutofuranose,  $\alpha$ -D-frutofuranose e  $\alpha$ -D-frutopiranosose. As fórmulas estruturais dos compostos estão apresentadas na Figura 2-1.



**Figura 2-1:** Formas estruturais da frutose (Fonte: LOURENÇO, 2004).

### 2.1.2 Fontes de Frutose

Além da sacarose e glicose, a frutose é um dos sacarídeos mais comuns de ocorrência natural, especialmente em frutas, podendo ser o monossacarídeo predominante (LIPINSKI; VON, 2006), estando presente ainda em alguns vegetais, mel e outras plantas. Os vegetais podem conter de 1 a 2% de seu peso na forma de frutose livre e mais 3% de frutose sob a forma de sacarose (MATTHEWS; PEHRSSON; FARHAT-SABET, 1987). A Tabela 2-1 apresenta a porcentagem de frutose em alguns alimentos.

**Tabela 2-1:** Açúcares simples em algumas frutas, hortaliças e vegetais.

<b>Frutas</b>	<b>Frutose (%)</b>	<b>Glicose (%)</b>	<b>Sacarose (%)</b>
Maça	6-8,0	1-4,0	1-5,0
Banana	2-4,0	3-6,0	6-14,0
Cereja	5-7,0	5-7,0	0,2
Uva	5-7,0	5-7,0	0,5
Laranja	2-3,0	2-3,0	4-7,0
Pêra	5-9,0	1-2,0	1-2,0
Ameixa	1-4,0	2-5,0	1-5,0
Morango	1-3,0	1-3,0	1-2,0
Tomate	1-1,5	1-1,5	<0,1
Mel	41	34	2,0
<b>Hortaliças e Vegetais</b>			
Aspargos	1,4	1,0	0,3
Feijão	1-1,5	0,5-1,0	0,6
Repolho	1,6	1,7	0,4
Cenoura	1,0	1,0	4,0
Alho	1,5	1,0	1-1,5
Alface	0,6	0,5	0,1
Cebola	1,0	2,0	1,0
Ervilha	<0,1	<0,1	1-5,0
Batata	<0,1	<0,1	<0,1

Fonte: HALLFRISCH, 1990.

A frutose, além de ser encontrada sob forma isolada na natureza, é constituinte da sacarose ( $\beta$ -D-Frutofuranosil  $\alpha$ -D-glicopiranosil) e de outros polímeros denominados frutanas (RUMESSEN, 1992). Segundo Hallfrisch (1990) pode ser encontrada como rafinose, um trissacarídeo e também como estaquiose, um tetrassacarídeo em algumas leguminosas como a soja, lentilha, ervilha e feijão. Essas formas não são absorvidas pelo intestino humano, sendo fermentadas pelas bactérias no intestino grosso, gerando gases que acompanham a digestão dessas leguminosas.

## 2.2 Xarope de frutose

O consumo de açúcares na forma líquida tem aumentado significativamente nos últimos anos, principalmente na indústria de refrigerantes. O açúcar líquido apresenta algumas vantagens neste segmento industrial, como facilidade de manuseio e economia no processo. O produto pode estar na forma de xarope de sacarose, xarope de açúcar invertido (mistura de açúcares simples) ou ainda como xarope enriquecido com frutose.

Os principais produtos comerciais à base de frutose estão apresentados na Tabela 2-2.

**Tabela 2-2:** Classificação dos produtos à base de frutose.

Propriedades	Estado Físico	Descrição Química	% Frutose	% Água	Poder Edulcorante
Frutose cristalina	Cristalino	Cetohexose	99,5	0,2	130 - 180
HFCS 42%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	29,8	29	90 – 95
HFCS 55%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	42,4	23	95 – 100
HFCS 90%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	69,3	23	100 – 106
Frutose líquida	Líquido	Frutose pura e água	77,0	23	110 - 120

Fonte: WHITE; OSBERGER, 2001.

A frutose cristalina e o xarope de milho de alta concentração de frutose (HFCS) são muitas vezes erradamente confundidos como mesmo produto. A frutose cristalina é mais onerosa do que a sacarose, xarope de milho com alta concentração de frutose ou xaropes de glicose, tendo, no entanto, certo número de utilizações específicas (BUCK, 2001).

A frutose cristalina é produzida para oferecer muitos benefícios exclusivos como a melhoria da textura do produto, sabor e estabilidade. Especificamente, quando combinado com outros edulcorantes e amidos, é usada para impulsionar a altura de bolos (em produtos assados), para melhorar o escurecimento em produtos de panificação devido à sua

reatividade em reações Maillard, além de possuir propriedades de caramelização e prolongar a vida útil. Ela é usada em preparações de frutas com baixas concentrações de sólidos, produtos lácteos, doces e geléias em que se combina bem com edulcorantes intensivos. Não é de fácil recristalização, sendo adequado para produtos com recheios suaves ou líquidos e ainda reduz a atividade de água nestes produtos (HALLFRISCH, 1990).

A formulação do xarope de frutose é um sistema edulcorante que melhora o sabor de frutas, previne cristalização e preserva cores (BUCK, 2001). Em alguns países como a Alemanha, chocolate e produtos de padaria fina para diabéticos utilizam frutose em vez de sacarose (HALLFRISCH, 1990). O xarope de frutose é utilizado comercialmente em misturas para bolos, gelatinas e pudins dietéticos, balas, sobremesas geladas, suplementos alimentares, bebidas energéticas e no aumento da funcionalidade do amido, além de ser utilizada também na indústria farmacêutica (BUCK, 2001).

### **2.2.1 Aplicações**

O xarope de frutose substitui a sacarose na maior parte dos alimentos, exceto quando um edulcorante seco é necessário, como em mistura seca, e quando a higroscopicidade é uma preocupação, como em alguns produtos de confeitaria. Algumas das diversas categorias de produtos que possuem xarope de frutose como ingrediente são produtos de padaria, bebidas de todos os tipos, frutas processadas, condimentos, sobremesas congeladas, doces, geléias, conservas de picles, vinhos e licores. O xarope de frutose concentrado na forma líquida é ideal para linhas grandes e automatizadas. O maior segmento do mercado é de longe o de bebidas, como as esportivas com requisitos isotônicos que incentivam o rápido esvaziamento gástrico e as à base de cola. Também é usado como coadjuvante na fermentação de vinho e como edulcorante para coolers de vinho e licores. O segundo maior mercado para o xarope é a indústria panificadora. É ideal em produtos que necessitam do crescimento da levedura como em pães e bolos, uma vez que é diretamente fermentável pela levedura sem necessidade de inversão. Além do uso como adoçante e açúcar fermentescível, é amplamente usado como humectante. Altos níveis de substituição de sacarose em produtos como bolos e biscoitos resultam em

características diferentes nos produtos finais, como biscoitos com menor atividade de água, bolos densos e com volume diminuído. Em alimentos processados, a indústria de frutas enlatadas usa enormes quantidades de xarope de frutose, geralmente combinado com xarope de sacarose e é cada vez mais usado em vegetais enlatados como milho e ervilha. As propriedades de redução são importantes na manutenção do vermelho vivo de catchup e de morango em conserva. Grandes quantidades de xarope de frutose são usadas na produção de doces, geléias e conservas. A substituição do dissacarídeo sacarose em sorvetes e sobremesas congeladas por xarope de frutose tem efeito no ponto de congelamento e textura do produto. Em alguns casos é benéfico, em outros ambas (sacarose e frutose) são preferencialmente combinados para utilização (BUCK, 2001).

### **2.2.2 Nutrição**

A frutose é usada como combustível energético e para a síntese de glicoproteínas e glicolípídeos. Não é necessária na dieta, uma vez que as quantidades exigidas são modestas e podem facilmente ser produzidas a partir da glicose endógena (KOHLMEIER, 2003).

Além de aumentar a absorção do ferro no organismo ao formar um complexo ferro-frutose, que é melhor absorvido que o ferro inorgânico (GUPTA et al., 1994), de acordo com a American Diabetes Association a frutose produz menor aumento de glicose no plasma sanguíneo do que quantidades isoenergéticas de sacarose e a maioria dos amidos. Nesse sentido, frutose pode oferecer vantagem como edulcorante na dieta diabética (CORTI, 1999). A frutose é metabolizada independentemente da insulina e, portanto, é adequado para alimentos fabricados especificamente para diabéticos. O seu índice glicêmico é 20% do valor da glicose (LIPINSKI; VON, 2006).

Clinicamente Wang e Vaneys em 1981 já citavam sua utilização na dieta de diabéticos além da sua utilização como constituinte de soluções em nutrição parenteral, substituindo parcialmente ou totalmente a glicose. É considerada menos irritante para as veias, não interfere na glicemia do paciente, está associada ao menor risco de hipoglicemia após a interrupção abrupta e tem efeito poupador de proteínas. Em 1975, Coarse e Cardoni citaram a utilização da frutose também no tratamento da intoxicação alcoólica.

A frutose, na forma de xarope de frutose utilizado em alimentos, foi incluída em avaliação abrangente dos efeitos dos açúcares na saúde conduzido pela FDA em 1986. Esta avaliação concluiu que, "á exceção da contribuição para a cárie dental, não há nenhuma prova concludente que demonstra perigo ao público geral, quando os açúcares são consumidos nos níveis atuais e na maneira praticada." (BUCK, 2001).

### 2.2.3 Produção

Comercialmente a frutose é obtida a partir da isomerização da glicose, que por sua vez é obtida por hidrólise multi-enzimática do amido (BIRCH; BLAKEBROUGH; PARKER, 1981; KIM; RHEE, 1989; GODFREY; WEST, 1996). É um processo de alto custo que envolve três etapas enzimáticas. O amido sofre ação da  $\alpha$ -amilase em alta temperatura, hidrolizando as ligações glicosídicas do amido obtendo 10-20% de glicose. Tratado com amiloglucosidase também para hidrólise, alcançando conteúdo de glicose de aproximadamente 95%. O xarope de glicose obtido é filtrado, descolorido com uso de carvão ativado e refinado através do tratamento em resina de troca iônica para remoção de sais e outros compostos iônicos. Em seguida, esse xarope de glicose passa por uma coluna de leito fixo de glicose isomerase imobilizada (KIM; RHEE, 1989; BUCK, 2001; PESSONE et al., 2004). Essa enzima de isomerização promove a conversão da glicose em frutose e obtendo apenas 45% de solução de frutose no melhor caso, pois o equilíbrio termodinâmico entre glicose e frutose é próximo de 50% de glicose e 50% de frutose (KIM; RHEE, 1989; BUCK, 2001).

O tratamento em resina de troca iônica proporciona um produto com teor de cinzas extremamente baixo, o que ajuda a manter a estabilidade de cor e sabor do xarope pela remoção de precursores e catalisadores de cor. Ambos os tratamentos, com carvão ativado e resina de troca iônica, servem para reduzir rastro de componentes que podem promover ou catalisar cor e desenvolver sabor (BUCK, 2001).

O material refinado pelo tratamento com glicose isomerase pode ser novamente filtrado, refinado com carvão ativado e resina de troca iônica e evaporado tornando-se o xarope comercial de frutose 42%. Pode também ser tratado em meio de unidades de fracionamento para enriquecer o teor de frutose a 80-95%, novamente filtrado e refinado

em carvão e resina de troca iônica. Pode ser evaporado e fornecido como produto comercial com propriedades semelhantes ao de frutose cristalina para aplicações líquida; no entanto, geralmente esse xarope concentrado de frutose é misturado com o xarope de frutose 42% para obter-se um produto com concentração de cerca de 55% de frutose. A glicose da unidade de fracionamento é alimentada de volta para as colunas de isomerização (BUCK, 2001).

Embora o milho seja uma fonte econômica e abundante de amido para a fabricação de xarope de frutose, a tecnologia de produção de xaropes concentrados de frutose é aplicável ao amido de outras fontes que não o milho. Para todos os efeitos práticos, as propriedades são idênticas (BUCK, 2001).

O xarope de frutose também pode ser obtido através da hidrólise da frutanas, polímeros de frutose, em que a frutose é o produto principal. Diferentes tipos de frutanas podem ser distinguidos em função do tipo de ligações glicosídicas: inulina consiste em um polímero linear com ligações  $\beta(2-1)$ ; levana, com ligações tipo  $\beta(2-6)$ ; e graminan, polímeros que possui ligações tipo  $\beta(2-6)$  e  $\beta(2-1)$  (ROOVER et al., 1999).

Polissacarídeos microbianos foram comparados com polissacarídeos de plantas tradicionais. As vantagens de polissacarídeos microbianos são: funcionalidade nova, propriedades químicas e físicas constantes e reprodutíveis, custo e fornecimento estáveis (MACCORMICK et al., 1996).

A solubilidade da levana é muito maior que a da polifrutana de origem vegetal, inulina, e ainda a susceptibilidade à hidrólise enzimática com invertase microbiana é maior do que a de inulina (BEKERS et al., 2002).

A inulina é hidrolisada à frutose por inulinase (EC 3.2.1.7) e frutana  $\beta$ -frutósíase (F $\beta$ F) (EC 3.2.1.80). Esta última enzima hidrolisa a inulina, levana, e sacarose; inulinase também hidrolisa sacarose, semelhante à invertase. A levana também é hidrolisada por levanase (EC 3.2.1.65), mas esta enzima não está disponível comercialmente, em contraste com preparações termoestáveis de inulinases normalmente aplicada para hidrólise de inulina ou de sacarose em formas imobilizadas (BIELECKI, 2004).

### 2.3 Inulina

A polifrutana inulina ocorre como reserva de carboidratos nos tubérculos e raízes de plantas como a alcachofra de Jerusalém, chicória e dália. É constituída por cadeias lineares de moléculas de  $\beta$ -2,1-D-frutofuranose ligadas (NAKAMURA et al., 1995). Hidrólises química ou enzimática das ligações  $\beta$ (2-1) de inulina resultam em frutose (LIPINSKI; VON, 2006).

A produção de frutose por hidrólise da inulina é mais vantajosa do que a produção convencional a partir do amido (KIM; RHEE, 1989). A reação enzimática com o uso da inulinase é simples (KIM; RHEE, 1989). As inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alta concentração de frutose e na produção de frutoligossacarídeos (ETTALIBI; BARATTI, 1987; POORNA; KULKARNI, 1995; SANTOS, 2002).

Inulinases são 2,1- $\beta$ -D frutana furohidrolase (EC 3.2.1.7.), diferentes das invertases (EC 3.2.1.26). Ambos os tipos de enzimas são  $\beta$ -frutosidases, as quais possuem ação hidrolítica sobre a sacarose. Além disso, a inulinase possui ação hidrolítica sobre a inulina e a levana (KUSHI et al., 1996).

A inulinase pode ser obtida da cultura de vários micro-organismos e apresenta características diversas e a seleção de micro-organismos dependerá de suas características fisiológicas. Entre os micro-organismos produtores, as leveduras, principalmente do gênero *Kluyveromyces*, foram as que apresentaram melhor produtividade (TREICHEL, 2004).

A inulina pode ser hidrolisada por dois tipos de inulinases dependendo de seu modo de ação: exoinulinase e endoinulinase. Exoinulinases quebram as ligações  $\beta$ (2-1) da inulina e separam a molécula de frutose a partir do terminal não redutor da cadeia. A endoinulinase age na ligação interna da inulina, liberando oligofrutosídeos (inulo-triose, -tetraose e -pentose) como principais produtos. A maioria das inulinases bacterianas são exoenzimas. Devido ao sinergismo de ação das duas enzimas, frutose é obtida facilmente, porém é difícil determinar se as enzimas coexistem. Também é difícil separar as duas enzimas completamente por métodos convencionais, já que elas possuem propriedades similares (JING et al., 2003).

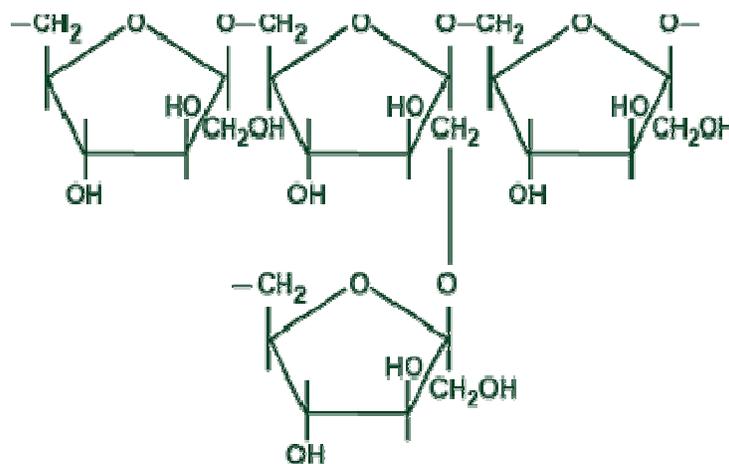
As inulinases microbianas atuam sobre o substrato sacarose de modo similar à invertase, entretanto este comportamento não é observado com as invertases, pois as

mesmas apresentam fraca ou nenhuma atividade sobre polímeros de frutose, como a inulina. A hidrólise completa da inulina por exoinulinase produz xarope com 95% de frutose sob condições otimizadas (JING et al., 2003). Wenling, Huiying e Shiyuan (1999) estudaram a produção contínua de xaropes enriquecidos em frutose com inulinase imobilizada a partir da inulina e verificaram que com conversão de 75% produziu-se uma mistura contendo 85% de D-frutose e 15% de D-glicose.

A inulina apesar de apresentar maior produtividade de frutose do que a sacarose é um substrato mais caro, portanto, estudos envolvendo a produção de frutose a partir da sacarose, que é o açúcar comum de mesa, mostram-se como alternativa interessante (LOURENÇO, 2004).

## 2.4 Levana

A levana é um biopolímero de alta massa molar, constituído por unidades de frutose, unidas por ligações  $\beta(2-6)$  e ramificações  $\beta(2-1)$  (CLARKE et al., 1990) como apresentado na Figura 2-2, presente em várias plantas e produtos microbianos (HAN; CLARKE, 1990).



**Figura 2-2:** Estrutura da levana (Fonte: LEVAN STRUCTURE, 2008).

O conhecimento da ocorrência, biossíntese e propriedades desta frutana são extensas. Resultados de pesquisas mostram um grande potencial para aplicações práticas de

levana e seus produtos de hidrólise no domínio dos alimentos com propriedades pró-saudável (SZWENGIEL et al., 2009).

Recentemente, o interesse comercial na produção de levana tem sido intensificado por possuir inúmeras aplicações biotecnológicas. Pesquisas sobre bactérias produtoras de levana vêm sendo implementadas, uma vez que a mesma é uma fonte alternativa de frutose. Na indústria de alimentos pode ser empregada como fixador de cores e sabores, bem como espessante e estabilizante de vários alimentos (YUN, 1996), além de apresentar características funcionais no organismo humano, como agente hipocolesterolêmico e anticarcinogênico (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

A levana microbiana é produzida a partir de substrato à base de sacarose por reação de transfrutossilacção da levanassacarase ( $\beta$ -2,6-frutanos: D-glicose frutossil-transferase, EC 2.4.1.10) por uma variedade de micro-organismos; como *Acetobacter suboxydans*, *Aerobacter levanicum*, *Erwinia herbicola*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Pseudomonas syringae* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005), sendo *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* as mais estudadas para este fim (WEBER, 2003).

Das bactérias produtoras de levana, *Zymomonas mobilis* tem sido a melhor alternativa, uma vez que usa como fonte de carbono a sacarose ou resíduos industriais contendo este açúcar, em diferentes concentrações, em meio rico em sais minerais. A produção de levana é influenciada não apenas pela fonte de carbono e sua concentração, mas também pelas variações de pH, temperatura e tipo de sais presentes, além da oxigenação do meio de fermentação, afetando também as características da molécula e o crescimento celular (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

#### 2.4.1 Levanassacarase

Segundo Chambert e Gonzy-Tréboul (1976) a levanassacarase é uma frutossiltransferase que catalisa principalmente a seguinte reação:



As enzimas frutossiltransferases (FTS) bacterianas realizam 3 tipos de reação com a sacarose: (1) hidrólise, quando a sacarose é invertida em frutose e glicose; (2) polimerização, quando a unidade de frutose é ligada a um radical frutossil; e (3) transferase de frutose para um aceptor, formando um oligossacarídeo. Levanassacarases (E.C. 2.4.1.10) são as que sintetizam levana, frutanas que têm ligações tipo  $\beta(2-6)$  entre suas unidades frutossil (HIJUM, 2003).

Entre os fatores essenciais para a síntese da levana destacam-se a osmolaridade do meio de crescimento, que pode ser garantida pelo alto teor de sacarose (BEKERS et al., 2000), o tempo e a temperatura de cultivo (MURO et al., 2000).

Segundo Schomburg e Salzmann (1991) o pH ótimo para hidrólise de sacarose em glicose e frutose é 6,5. A 15 °C e 10% de sacarose, em faixas de pH de 4,0-5,0, a transfrutossilação ocorre preferencialmente e oligo e polissacarídeos são produzidos, e em faixas de pH de 7,0-8,0 a hidrólise de sacarose é intensificada, oligossacarídeos são produzidos ao invés de polissacarídeos como produto da transfrutossilação. A enzima pode ser estocada por 2 semanas a 4 °C.

As levanassacarases ocorrem mais comumente entre bactérias e têm sido mais estudadas do que as inulossacarases (enzimas produtoras de inulina), provavelmente pela sua maior facilidade de obtenção. Por outro lado, os frutoligossacarídeos (FOS) tipo inulina são muito mais bem estudados quanto às suas aplicações e efeitos quando ingeridos do que os tipo levana.

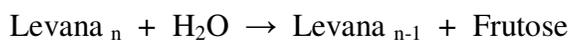
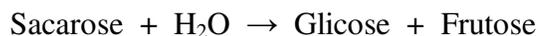
#### **2.4.1.1 Hidrólise de Sacarose – Formação de frutose livre**

Além da formação de levana, a levanassacarase catalisa liberação de frutose e formação de frutoligossacarídeos concomitantemente (ABDEL-FATTAH; MAHMOUD; ESAWY, 2005). De acordo com as condições experimentais, água, álcoois, monossacarídeos, sacarose, oligossacarídeos e levana podem atuar como aceptores do radical frutossil. Na presença de sacarose sozinha a atividade enzimática leva à formação de frutose livre, oligossacarídeos e levana (CHAMBERT; TRÉBOUL; DENDONDER, 1974).

Em temperaturas baixas, como 5°C e 15°C, a transfrutossilação ocorre preferencialmente à hidrólise de sacarose, mas inversamente em altas temperaturas, como

30°C e 40°C, preferencialmente a hidrólise é catalisada (SCHOMBURG; SALZMANN, 1991).

Segundo Song e Rhee (2003), quando água atua como acceptor do radical frutossil, frutose livre é gerada a partir da sacarose e levana, como mostrado nas reações abaixo:



Porém estas reações ocorrem em ritmo muito mais lento do que quando comparado a um açúcar como acceptor.

Chambert, Tréboul e Dendonder (1974) descreveram a reação hidrolítica da levana e confirmaram que, na ausência de levana na mistura, a sacarose tem duplo papel: atua tanto como doadora do radical frutossil e como primeiro acceptor do radical, no início da cadeia de levana. O rendimento em levana inicial depende da concentração de sacarose. Constataram que a baixa concentração de sacarose (inferior a 12 mM), o rendimento em levana está perto de 0%, o que significa que a levanassacarase tem apenas uma atividade hidrolítica sob estas condições.

Euzenat, Guibert e Combes (1997) produziram FOS por fermentação através de *Bacillus subtilis* e observaram que, no início do experimento, enquanto ocorria a hidrólise da sacarose, o aparecimento da frutose foi mais rápido que o da levana, ou seja, a síntese de levana a partir da frutose liberada no meio mostrava-se mais lenta do que a própria liberação desta. Mais tarde, a taxa de produção de frutose diminuiu, quando então passou a ocorrer a síntese de levana. A quantidade de sacarose hidrolisada passou de 65% na primeira hora de síntese para 33% depois de 8 horas. O experimento foi finalizado após 8h para manter a alta proporção de transformação de frutose em levana, atingindo-se o rendimento de 30% desta, em relação à massa inicial de sacarose.

#### **2.4.1.2 Transferência do Radical Frutossil/Transfrutossilção – Formação de Levana**

Além de formar levana pela transferência do radical frutossil da sacarose para o carbono 6 da frutose no terminal não redutor (DEDONDER, 1966), a enzima catalisa outras

reações como a inversão de sacarose, formando oligossacarídeos e outras reações de transfrutossilagem (KIM et al., 2000).

A polimerização de açúcares por frutotransferases de micro-organismos está incluída em uma variedade de processos a que a célula recorre em situações de estresse, para facilitar a sua sobrevivência em ou meios competitivos ou hostis; sobrevivência de bactérias no solo (*Bacillus subtilis*), fitopatogêneses (*Erwinia* e *Pseudomonas ssp*) ou simbiose de plantas interagindo com bactérias (*Bacillus polymyxa*) conforme relatado por Hernandez et al. (1995).

Quando a bactéria *Bacillus subtilis* é incubada no meio contendo sacarose, a enzima levanassacarase catalisa a formação de levana de alto peso molecular (DEDONDER; NOBLESSE, 1953; COTÉ; AHLGREN, 1993). Entretanto, poucas levanassacarases mostraram-se ativas em altas temperaturas. Entre estas, a obtida de *Zymomonas mobilis* (SANGILYANDI; GUNASEKARAN, 1998), *Ranhnella aquatilis* JCM-1683 (OHTSUKA et al., 1992) e *Pseudomonas syringae* (HETTWER; GROSS; RUDOLPH, 1995) foram consideradas como termoativas.

Dedonder (1966) observou que a enzima levanassacarase é termolábel e que sua atividade é instantaneamente reduzida à metade se colocada a 60 °C, no entanto a adição de íons metálicos como ferro, alumínio e zinco aumentam sua estabilidade. Levana acelera as taxas de polimerização de levana no início da reação de polimerização, mas é eficaz apenas sob condições de baixa concentração (SCHOMBURG; SALZMANN, 1991). O pH ótimo para a atividade da enzima levanassacarase é de 6,5. Em culturas contendo sacarose, pode-se utilizar pH com valores menores para a produção adequada de levana pela mesma enzima (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

## 2.5 *Zymomonas mobilis*

*Zymomonas* são bactérias Gram-negativas, com 2-6 µm de comprimento e 1-1,5 µm de diâmetro, e apresentam-se ao microscópio como células isoladas, mas muitas vezes em pares. São anaeróbias, mas toleram algum oxigênio, uma minoria das linhagens é móvel, possuindo 1 a 4 flagelos polares e não formam esporos. Produzem etanol a partir da glicose pela via de Entner-Doudoroff (2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, KDPG), utilizam somente três açúcares como fontes de carbono e energia, a glicose, a frutose e a sacarose. O

crescimento em sacarose é acompanhado pela formação extracelular de frutoligossacarídeos (FOS), levana e sorbitol, com significativa redução na síntese de etanol (SWINGS; DE LEY, 1977; SPRENGER, 1996; LEE; HUANG, 2000).

Podem crescer a baixos valores de pH; entretanto o pH ótimo de crescimento é 7,3, e o pH final após 3 dias a 30 °C está entre 4,5 e 5,2. A temperatura na qual as células de *Zymomonas* crescem é de 25 a 30 °C (SWINGS; DE LEY, 1977).

O conteúdo macromolecular (lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos) das células de *Z. mobilis* é diferente quando cultivada em glicose do que quando cultivada em sacarose. O conteúdo celular destes componentes reflete as condições fisiológicas do micro-organismo, além de permitir a monitoração do processo fermentativo. Quando cultivada em meio de sacarose, *Z. mobilis* apresentou maior dinamismo na composição macromolecular das células e também foi encontrada concentração 4,5 vezes maior de carboidratos, além dos lipídeos, que também se encontravam em concentrações mais elevadas na biomassa cultivada em sacarose do que em meio de glicose. A biomassa crescida em glicose, por sua vez, apresentou concentrações mais elevadas de proteína (GRUBE et al., 2002).

*Z. mobilis* polimeriza a frutose da sacarose provavelmente para reduzir a osmolaridade de meios muito concentrados e, conseqüentemente, o estresse osmótico. A levana é produzida a partir da sacarose, mas não a partir de mistura de glicose e frutose. Esta produção também depende da concentração de sacarose no meio, de forma que se esta for muito baixa (em torno de 0,5 g/L) a formação de levana cessa e somente frutose livre é liberada para o meio, o que confirma a necessidade de redução do estresse osmótico (SWINGS; DE LEY, 1977).

### **2.5.1 Produção de Levana por Levanassacarase de *Zymomonas mobilis***

Devido ao grande interesse nos produtos da levanassacarase, é válido o estudo de maneiras para obtê-los em grandes quantidades. Quanto aos rendimentos em levana e oligossacarídeos, os melhores resultados obtidos até agora foram por síntese enzimática. É de se esperar, portanto, que haja também interesse na obtenção da enzima.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) destacam que *Zymomonas mobilis* é um

micro-organismo com grande potencial para a produção de levana em escala ampliada, empregando sacarose como fonte de carbono e em condições de fermentação padronizadas.

Para a produção de levana por *Z. mobilis*, onde a sacarose é hidrolisada, a glicose é prioritariamente consumida como fonte de carbono e energia, e a frutose é polimerizada. Estudos sobre o metabolismo da sacarose por esta bactéria revelaram três enzimas hidrolizantes em suas células. São elas: (1) SacA ou InvA, uma sacarase intracelular; (2) B46 ou InvB, uma sacarase extracelular, responsável por 60% da atividade de hidrólise extracelular da sacarose; e (3) SacB, levanassacarase extracelular, uma  $\beta$ -frutofuranosidase, única responsável pela hidrólise da sacarose e formação de levana, com massa molecular de 56KDa (KANNAN; SANGILYANDI; GUNASEKARAN, 1997 apud SANGILYANDI; GUNASEKARAN, 2001).

Segundo Bekers et al. (2002), concentração de sacarose e temperatura são os fatores mais importantes que regem a atividade de levanassacarase de *Z. mobilis*.

Quando cultivada em meio rico em sacarose, a *Z. mobilis* promove a conversão do dissacarídeo em glicose e frutose. É também capaz de produzir outros metabólitos em altas concentrações sob condições de cultura adequadas, como por exemplo, sorbitol, gluconato e FOS (JOHNS; GREENFIELD; DOELLE, 1991; BEKERS et al., 1993).

Viikari e Gisler (1986) pesquisaram a produção de bioprodutos por diferentes linhagens de *Z. mobilis* durante a fermentação com sacarose. Foram comparadas oito linhagens de acordo com a hidrólise de sacarose e a conseqüente formação de etanol, levana e sorbitol. Baixa proporção de hidrólise de sacarose foi associada com a formação de levana e a alta proporção de hidrólise de sacarose com a formação de sorbitol.

Tanaka, Oi e Yamamoto (1979, apud EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997) investigaram as condições de produção de levana e estabeleceram que a levana de baixo peso molecular adicionada ao meio de reação atua como ativador da enzima mais do que a de alto peso molecular, e que este efeito diminui com o aumento da força iônica do meio de reação. Euzenat, Guibert e Combes (1997) acabaram por confirmar que a presença de levana atua diretamente sobre a enzima, isto é, a produção de levana de baixo peso molecular induziu um incremento na atividade de levanassacarase, uma vez que os melhores aceptores são os resíduos frutossil ao invés de água ou glicose.

A ação da levanassacarase, segundo Lyness e Doelle (1983), é controlada ainda que de formas distintas pela concentração de sacarose, glicose e frutose presentes no meio. Quando a levanassacarase foi utilizada para a produção de levana de alto peso molecular através de qualquer tipo de enzima invertase que atua sobre a sacarose, sua ação foi levemente inibida pela glicose. Ainda assim, ficou constatado que a concentração de sacarose é o fator de maior influência sobre a enzima, uma vez que a hidrólise ocorre mesmo em concentrações elevadas de glicose, bem como a síntese de levana a partir da frutose resultante. A alta taxa de hidrólise da sacarose foi relacionada à baixa afinidade da enzima com o substrato, ou seja, a baixa afinidade da enzima pela sacarose ocorre em fermentações com micro-organismos que normalmente crescem em altas concentrações de sacarose e requerem a rápida produção de glicose como fonte de energia.

Calazans et al. (1989) observaram que a concentração de levana produzida por *Zymomonas mobilis* em condições de cultura por batelada contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio foi 12,7%, enquanto que Bekers et al. (1990), utilizando uma linhagem de *Z. mobilis* denominada 113“S”, observaram que esta produziu aproximadamente 30-50 g/L de levana em condições de fermentação por batelada ou contínua.

Han e Clarke (1990) constataram aumento na produção do polissacarídeo, quando a cultura foi levemente agitada durante a fermentação, pois a agitação vigorosa e a aeração inibem a produção de levana. Vinhas, Calazans e Lopes (2000) concluíram que na produção de levana por *Z. mobilis* não é vantajoso promover a agitação, pois a mesma conduz a uma aeração que, em última análise, prejudica a produção de células e de levana.

A literatura tem mencionado que o melaço é uma matéria-prima difícil de fermentar, devido principalmente a infecções primárias ou secundárias nos mostos, composição química anormal como presença de ácidos graxos voláteis, quantidades excessivas de caramelo e rafinose, dentre outras (GUNASEKARAN et al. 1986).

Jerez (1993) estudou as condições de fermentação de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* CP4 e seu efeito sobre os parâmetros cinéticos de fermentação. Avaliou o efeito da temperatura, controle de pH e efeito de íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em meio de fermentação com sacarose. Em melaço de cana-de-açúcar, foram estudados os efeitos da clarificação e suplementação com nutrientes. Determinou os parâmetros cinéticos de fermentação do melaço em processo descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo em

escala de laboratório, descontínuo e descontínuo alimentado em escala piloto. Os tratamentos de clarificação do melaço removeram  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , mas não aumentaram o rendimento da fermentação. Foi observado que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são inibidores do crescimento de *Z. mobilis* CP4 e fermentação, mas o  $\text{Mg}^{2+}$  não apresentou efeito inibitório em nenhuma das condições estudadas.

Ernandes (2009) estudou a produção de levana através de diferentes fontes de carbono, meio sintético caldo de cana-de-açúcar, melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade (HTM) e melaço de cana-de-açúcar, utilizando fermentação submersa a 200 rpm, por 24 horas e com controle de temperatura com o micro-organismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Avaliou a influência das variáveis pH do meio de cultivo, temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), concentração de  $\text{KCl}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  e sacarose ou Teor de Sólidos Totais. O meio sintético mostrou-se o melhor meio para produção de levana, obtendo 4,5 g/L, sob 200 rpm, por 24 horas; pH 4,0; 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 18,0 g/L de  $\text{KCl}$ ; 18,0 g/L de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 5,0 g/L de  $\text{MgSO}_4$ ; 11,0 g/L de  $\text{CaCl}_2$  e 250,0 g/L de sacarose. A massa do biopolímero formada correspondeu a 1,8% do substrato inicial presente no meio sintético. O meio contendo cana de açúcar obteve 1,05 g/L de FOS na sua melhor condição (pH 8,0; 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 5,0 g/L de  $\text{KCl}$ ; 18,0 g/L de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 20,0 g/L de  $\text{MgSO}_4$ ; 11,0 g/L de  $\text{CaCl}_2$  e 250,0 g/L de teor de sólidos totais), correspondente a 0,42% do substrato inicial presente no meio. Concentrações similares de produção de levana nas fermentações com caldo de cana foram encontradas por Tano e Buzato (2002), os quais relataram valores de 1,66; 2,54 e de 3,85 g/L, em pH inicial de 5,4; 5,9 e 6,3, respectivamente, representando aumento em 53 e 130% nas fermentações em pH inicial 5,9 e 6,3 com relação ao pH inicial 5,4.

Os valores do exopolissacarídeo obtidos por Ernandes (2009) com o meio caldo de cana-de-açúcar foram inferiores aos obtidos com o sintético. Esse fato também foi observado por outros pesquisadores que estudaram diferentes meios de fermentação para a síntese de levana. Borsari (2004) estudou as condições de produção de levana por *Zymomonas mobilis* CP4, através de delineamentos estatísticos, variando a concentração e tipo de substrato, forma de cultivo, suplementação com ácido pantotênico, extrato de levedura, cloreto de sódio e a técnica de permeabilização celular. Os resultados indicaram que o processo por batelada alimentada não melhorou a produção de levana, pois a máxima concentração de levana obtida foi de 40,14  $\text{g/L}^{-1}$  em 150,0  $\text{g/L}^{-1}$  de sacarose e a adição de

caldo de cana-de-açúcar não foi estatisticamente significativa para formação de levana, sendo que este meio estimulou a produção de biomassa, sorbitol e etanol.

A partir dos meios contendo melaço de cana Ernandes (2009) obteve 2,83 g de levana/L com melaço HTM e 1,96 g/L com melaço ambos nas mesmas condições (200 rpm, por 24 horas; pH 8,0; 40 °C; 5,0 g/L de KCl; 5,0 g/L de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5,0 g/L de MgSO<sub>4</sub>; 11,0 g/L CaCl<sub>2</sub> e 250,0 g/L de teor de sólidos totais), correspondendo a respectivamente a 1,13% e 0,78% do substrato inicial. Valores estes são próximos aos obtidos por Oliveira et al. (2004), que estudaram a fonte de carbono melaço de cana-de-açúcar e observaram que ocorreu produção de levana de 2,53 g/L.

Segundo Oura (1983), o melaço deve ser tratado antes de ser utilizado em fermentação para precipitar alguns compostos inorgânicos e materiais em suspensão e posteriormente deve ser suplementado com suficiente quantidade de sais minerais e vitaminas para aumentar os rendimentos da produção de levana.

Estudos feitos por Vigants et al. (1998) verificaram que o efeito de sais minerais e da osmolaridade pode influenciar a síntese de levana. O efeito de KCl e NaCl não só estimulou a produção de etanol como também a de levana, já que teve ação direta sobre a enzima levanassacarase responsável pela produção de ambos os produtos.

Vinhas (1999) realizou um trabalho que teve como objetivos selecionar dentre duas linhagens de *Zymomonas mobilis*, ZAG-12 e ZAP, a melhor produtora de levana, verificar a produção com e sem agitação, influência da concentração inicial de sacarose sobre o rendimento final de fermentação, fracionar as levanas produzidas, determinar o peso molecular das levanas e desenvolver o diagrama ternário da mistura levana - água - etanol. Levana foi produzida em meio à base de sacarose suplementado com extrato de levedura e sais minerais. A produção em batelada foi feita em frascos com e sem agitação, nas concentrações iniciais de sacarose de 200 e 250 g/L, à temperatura de 25 °C por 72 horas de processo. Os resultados mostraram que a melhor produtora de levana foi a *Z. mobilis* linhagem ZAG-12, e que as melhores condições de produção foram concentração de sacarose inicial de 200 g/L, sem agitação. O fracionamento das levanas por precipitação com etanol possibilitou a construção de um histograma de distribuição das frações, indicando que as levanas produzidas apresentam diferentes faixas de peso molecular. A curva de solubilidade mostrou que é possível obter-se o equilíbrio dos três componentes

numa mistura, e evidenciou as áreas onde a mistura é homogênea (área acima da curva) ou heterogênea (área abaixo da curva).

Muro et al. (2000) investigaram a produção de levana usando linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes condições de cultivo, obtendo elevada produção de levana (41 g/L) com uma linhagem mutante HL 29 em meio de cultura contendo 200 g de sacarose L<sup>-1</sup> e 0,5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> incubado a 7 °C por 29 dias. Esta foi a primeira pesquisa que descreveu a síntese de levana por *Z. mobilis* a 7 °C.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) estudaram cepas de *Zymomonas mobilis* mutantes (ZML1 e ZML2), obtidas através do tratamento com NTG (N-metil N'nitroso guanidina), as quais produziram concentração máxima de levana de 21,6 e 20,0 g/L, respectivamente, em 24 horas de fermentação, a 30°C, com 150,0 g/L de sacarose. Wendt (2001) pesquisou duas linhagens de *Z. mobilis* mutante obtida através do tratamento da cepa natural CCT 4494 com NTG (N-metil N'nitro N'nitroso guanidina), seguindo-se de lavagem das células com água ou meio de cultura. O mutante lavado com água apresentou maior produção de levana, 64% mais que o mutante lavado com meio de cultura e em torno de 97% mais que a cepa natural. A produção de levana pela cepa natural tem o metabolismo acelerado e o pico de produção dá-se em torno de 10h de fermentação, enquanto pelo mutante lavado com água é mais lenta, atingindo a produção máxima em torno de 24h de fermentação. A produção máxima em frascos Erlenmeyer foi maior do que a obtida em reator de bancada, 42,7 g/L e 31,0 g/L respectivamente.

Borsari, Celligoi e Buzato (2003) estudaram a produção de levana por *Zymomonas mobilis* em fermentação descontínua alimentada. Os resultados demonstraram que apesar de ter ocorrido maior consumo de açúcares no processo descontínuo alimentado, não houve diferenças estatisticamente significativas na produção de levana nos processos estudados.

A forma como a levanassacarase é utilizada também influencia o rendimento e o tamanho molecular das cadeias formadas. Ao comparar as levanas produzidas por três diferentes preparações de levanassacarase de *Z. mobilis* (livre, imobilizada e extraída por permeabilização com tolueno), Jang et al. (2001) verificaram que os rendimentos foram próximos, mas ao utilizar a levanassacarase imobilizada ou a que havia sido extraída das células por permeabilização com tolueno, obtinham-se levanas com menores pesos moleculares. Isso foi atribuído ao fato de a levanassacarase nestas duas preparações estar

ligada mais fracamente à cadeia de levana. O maior rendimento (80%), porém, foi obtido com a enzima na forma livre, com a produção de levana de pesos moleculares bem mais altos. Em temperaturas elevadas, o rendimento em levana é melhor com as formas imobilizada e extraída por permeabilização com tolueno do que com a enzima livre, por aquelas serem mais estáveis que esta última forma.

A formação de levana e o crescimento celular são afetados não só pela fonte de carbono, como também pela presença de certos compostos químicos, variação do pH no meio de fermentação e da temperatura de incubação. A habilidade de *Zymomonas* em produzir levana varia de cepa para cepa.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) alcançaram valores de 12,6 g de levana/L com 150,0 g de sacarose/L, em 16 horas, a partir de *Zymomonas mobilis* B-4286. Por outro lado, Yoshida et al. (1990) utilizaram a mesma concentração de sacarose e obtiveram produções de levana de 35,0 g/L, com *Z. mobilis* IN-17-10 e de 3,1 g/L, com *Z. mobilis* IFO 13757, em 3 dias.

Carlos (1991) realizou ensaios de fermentação em mosto à base de sacarose, conduzidos em processo de batelada, utilizando seis linhagens de *Zymomonas mobilis*: AG11, CP4, P4, Z-1-81, Z-1-87 e Z-1-88, pertencentes à coleção do Departamento de Antibióticos da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco - Recife). Na etapa de seleção da melhor linhagem produtora de levana precipitável, como subproduto da fermentação da sacarose, foi escolhida a Z-1-81 por apresentar maior capacidade de conversão de substrato a levana, formando 3,7 g/L de levana (expressa como frutose).

### **2.5.1.1 Influência da Temperatura e pH**

Segundo Doelle et al. (1989), a temperatura e o pH ideais para o crescimento são diferentes dos requeridos para a produção de levana, que, por sua vez, varia conforme a cultura utilizada.

A atividade de transfrutoseilação, bem como o tamanho das cadeias formadas pelas levanassacarases são parâmetros que têm se mostrado bastante susceptíveis à temperatura de reação. Geralmente, a levanassacarase apresenta-se ativa de 4 a 60 °C, sendo que em temperaturas superiores a 60 °C sua estabilidade é muito reduzida, havendo queda brusca na atividade da enzima. Essa ampla faixa de temperatura também promove variação grande

na faixa de massas molares médias do polissacarídeo produzido, sendo as temperaturas mais baixas as mais favoráveis à produção de cadeias mais longas, de alta masa molar, enquanto que as temperaturas mais altas favorecem a produção de cadeias cada vez menores, com baixas massas molares, chegando à faixa dos oligossacarídeos e de açúcares redutores totais (ART) (MELO; CALAZANS, 2000; COIMBRA et al., 2002).

Segundo Doelle et al. (1989), a temperatura utilizada para o crescimento é diferente da requerida para a produção de levana e etanol. Ernandes (2009) notou que *Zymomonas mobilis* CCT 4494 teve a taxa de desenvolvimento celular e a formação dos produtos (levana, etanol e sorbitol) de modo diferente em relação à variação da temperatura de incubação testada para cada meio fermentativo.

A influência da temperatura na atividade de levansacarase de *Zymomonas mobilis* foi observada por Wendt (2001), que avaliou o comportamento da atividade sob temperaturas de 30 a 80 °C, verificando que a enzima apresentou maior atividade a 50 °C e inibição da atividade a 65 °C.

Jerez e Yokoda (1996) demonstraram, através dos resultados da fermentação com *Zymomonas mobilis*, que os parâmetros cinéticos são afetados tanto pela temperatura quanto pelo controle do pH do meio. Utilizando a temperatura de 37 °C, com e sem o controle de pH, a taxa específica de crescimento é maior e a quantidade de levana produzida é menor que na temperatura de 30 °C. Segundo Doelle et al. (1993), temperaturas baixas aumentaram o rendimento de produção de levana e temperaturas em torno de 34 °C inibiram todas as linhagens de *Z. mobilis*. O pH ótimo para a produção de levana foi de aproximadamente 5,0. Em pH 6,5 foi observado que houve redução da produção de levana, porém ocorreu a hidrólise de sacarose.

Silva (1996) fez experimentos para estudar a influência do pH sobre a formação de levana por *Z. mobilis* ZAG-12 em meios à base de sacarose. Cada experimento foi feito em diferentes valores iniciais de pH, tanto nos ensaios com controle quanto sem controle do pH. A análise destes demonstraram que a linhagem cresceu bem na faixa de pH entre 4,5 e 6,0. O controle do pH ao longo da fermentação mostrou menor quantidade de levana precipitável em comparação com as fermentações feitas sem o controle do pH (ente 4,5 e 5,0). O rendimento em levana formada foi maior nas primeiras 24 horas de fermentação. A faixa de pH inicial entre 5,5 e 6,0, nas fermentações com controle de pH e naquelas

contendo solução tampão, ocasionou maior eficiência bioquímica de produção de etanol e pequena formação de levana precipitável, em comparação às fermentações sem controle de pH.

### 2.5.1.2 Influência da Concentração da Sacarose

A concentração de sacarose influencia o tipo de acceptor usado nas reações de transfrutossilação catalisadas pela levanassacarase. Em baixas concentrações de sacarose, a reação predominante é a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, onde o acceptor é a água. Em alta concentração ocorre maior produção de oligossacarídeos (CRITTENDEN; DOELLE, 1994).

Confirmando o verificado por Crittenden e Doelle (1994), Vigants et al. (1998) afirmaram que a ativação das reações catalisadas pela levanassacarase foi inversamente proporcional à concentração do substrato (sacarose) no meio reacional, sendo que com a concentração de 23,4 mM (~8 g/L) a levanassacarase foi ativada 17 vezes, enquanto com a concentração de 158 M (~540 g/L) a ativação foi de apenas 3 vezes. Já Park et al. (2003) correlacionaram as condições de reação com a taxa de hidrólise/transfrutossilação, sendo a taxa de hidrólise medida pela liberação de frutose e glicose e a taxa de transfrutossilação medida pela formação de levana. Esta relação aumentou com a redução na concentração do substrato de sacarose.

A concentração inicial de sacarose influencia a atividade enzimática da levanassacarase; maiores concentrações proporcionam aumento da atividade, como verificado por Wendt (2001), que obteve aumento de 30% na atividade da enzima quando a concentração da sacarose passou de 20 para 40%, em reações mantidas sobre as mesmas condições. Crittenden e Doelle (1994), assim como Belghith et al. (1996), também verificaram a mesma influência na atividade da levanassacarase de *Zymomonas mobilis* com o incremento da concentração do substrato sacarose. Nos estudos relatados, verificou-se que com o incremento da concentração de sacarose houve redução da formação de levana de alto peso molecular, fato ocorrido devido à formação de levana de baixo peso molecular e oligossacarídeos.

Euzenat, Guibert e Combes (1997) confirmaram que a levana atua diretamente sobre a enzima, isto é, a produção de levana de baixo peso molecular induziu um

incremento na atividade de levanassacarase, uma vez que os melhores aceptores são os resíduos frutossil ao invés da água ou glicose.

### 2.5.1.3 Influência da Presença de Sais

Jerez (1993), quando estudou o efeito da variação da concentração de potássio, verificou que a taxa de desenvolvimento e a quantidade de levana formada são proporcionais ao aumento da concentração de potássio até a concentração de 10,0 g/L. Em outro estudo, Vigants et al. (1998) verificaram que a adição de NaCl e KCl ao meio de cultura contendo sacarose estimulou a biossíntese de levana. Constataram que NaCl ativa diretamente a levanassacarase, KCl ativa a enzima praticamente da mesma forma que o NaCl, enquanto NH<sub>4</sub>Cl e LiCl ativam menos pronunciadamente, o que permitiu que estes pesquisadores sugerissem que a levanassacarase de *Zymomonas mobilis* 113S têm uma propriedade de enzima alostérica, principalmente com os sais de Na e K como seus ativadores heterotrópicos.

Bekers et al. (2000) pesquisaram o efeito de altas concentrações de sal durante a fermentação de sacarose (10%) por *Z. mobilis* 113S. Foi verificado que a concentração de 0,6 M de solução de NaCl levou a aumento da síntese de levana.

Em estudos de Sangiliyandi, Raj e Gunasekaran (1999) e Park et al. (2003) as atividades de transfrutossilacção das levanassacarases de *Z. mobilis* e de *M. laevaniformans* mostraram-se fortemente inibidas por CuSO<sub>4</sub>, (95%) e HgCl<sub>2</sub> (100%) e moderadamente inibida por ZnSO<sub>4</sub> (50%) e AlCl<sub>3</sub> (22%). O FeSO<sub>4</sub> e os cloretos de Mg, Ca, Na, K, Mn e Co inibiram a atividade da levanassacarase em menos de 15%. A adição de EDTA, não influenciou a atividade da enzima, indicando a ausência da necessidade de íons metálicos como cofatores para a atividade da levanassacarase.

Várias enzimas da via Entner Doudoroff requerem cofatores como magnésio, cálcio, potássio para a produção de levana. Hoppner e Doelle (1983) reportaram que o cálcio e o magnésio ativam a enzima piruvato descarboxilase em *Zymomonas*, enquanto Bekers et al. (2000) observaram que o potássio ativa a enzima piruvato quinase.

Calazans et al. (1989) observaram que a concentração de levana produzida foi de 12,7% por *Zymomonas mobilis*, em condições de cultura por batelada contendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fonte de nitrogênio, enquanto que Bekers et al. (1990), utilizando uma linhagem de *Z.*

*mobilis* 113S, observaram que esta p $\hat{o}$ de produzir aproximadamente 30,0-50,0 g/L de levana em condi $\tilde{c}$ oes de fermenta $\tilde{c}$ ao por batelada ou cont $\acute{i}$ nua.

Garcia-Cruz (1997) estudou o efeito da adi $\tilde{c}$ ao de diferentes fontes de nitrog $\acute{e}$ nio na produ $\tilde{c}$ ao de levana e verificou que n $\tilde{a}$ o houve est $\acute{i}$ mulo no padr $\tilde{a}$ o de desenvolvimento celular e que o sulfato de am $\acute{o}$ nia, at $\acute{e}$  a concentra $\tilde{c}$ ao de 50 mM, promoveu discreto aumento da produ $\tilde{c}$ ao do polissacar $\acute{i}$ deo. Wendt (2001) observou que a concentra $\tilde{c}$ ao de extrato de levedura pode influenciar a s $\acute{i}$ ntese da levana. Al $\acute{e}$ m disso, relata influ $\acute{e}$ ncia n $\tilde{a}$ o s $\acute{o}$  pela rela $\tilde{c}$ ao carbono/nitrog $\acute{e}$ nio, mas tamb $\acute{e}$ m pela rela $\tilde{c}$ ao nitrog $\acute{e}$ nio org $\acute{a}$ nico/inorg $\acute{a}$ nico.

## 2.6 Hidr $\acute{o}$ lise de Levana

Os produtos da hidr $\acute{o}$ lise qu $\acute{i}$ mica ou enzim $\acute{a}$ tica da levana podem ser utilizados na ind $\acute{u}$ stria aliment $\acute{i}$ cia como edulcorante ou fibra diet $\acute{e}$ tica: xaropes de frutose e  $\beta$ (2,6)-frutofuranosil-oligossacar $\acute{i}$ deos (SONG; RHEE, 2003).

H $\acute{a}$  v $\acute{a}$ rios relatos sobre levanases e frutofuranosidases, que hidrolisam levana para produzir D-frutose ou v $\acute{a}$ rios levanoligossacar $\acute{i}$ deos (MURAKAMI et al., 1992). Levanassacarase tamb $\acute{e}$ m foi citada por Song e Rhee (2003) como enzima degradante de levana com  $\acute{a}$ gua como acceptor do radical frutosil formando frutose livre. Mas a hidrolise de sacarose e levana por esta enzima ocorre em taxa muito menor do que a rea $\tilde{c}$ ao com a $\acute{c}$ u $\acute{c}$ ar como acceptor formando 2,6- $\beta$ -D- frutoligossacar $\acute{i}$ deos.

Bielecki (2004) apresenta as enzimas envolvidas na degrada $\tilde{c}$ ao de inulina e levana: frutana  $\beta$ -frutosidase (EC 3.2.1.80) que hidrolisa inulina, levana, e sacarose; levana tamb $\acute{e}$ m  $\acute{e}$  hidrolisada por levanase (EC 3.2.1.65), mas esta enzima n $\tilde{a}$ o est $\acute{a}$  dispon $\acute{i}$ vel comercialmente, em contraste com prepara $\tilde{c}$ oes termost $\acute{a}$ veis de inulinase normalmente aplicada para hidr $\acute{o}$ lise de inulina ou de sacarose na forma imobilizada.

Segundo Song et al. (2002), enzimas degradantes de levana (Levan-degrading enzymes - LDEs) podem ser classificadas em diversos tipos com base em seus produtos de degrada $\tilde{c}$ ao: (i) Exo- $\beta$ -frutosidase (EC 3.2.1.80), que hidrolisa levana em frutose; (ii) levanase (EC 3.2.1.65), que hidrolisa levana em fruto-oligossacar $\acute{i}$ deos; (iii) 2,6- $\beta$ -D-frutana 6-levanabiohidrolase (EC 3.2.1.64), que hidrolisa levana em levanbiose; e (iv)

levana frutotransferase (LFTase), que produz DFAIV a partir de levana, um dissacarídeo cíclico que consiste em duas unidades de frutoses ligadas pelos seus carbonos redutores.

### 2.6.1 Formação de Frutose livre

Enzimas frutano-hidrolíticas de *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e outros organismos têm sido relatados anteriormente, mas não totalmente caracterizadas (TAKAHASHI, MIZUNO; TAKAMORI, 1985).

A enzima Frutana  $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F), EC 3.2.1.80, também conhecida pelos sinônimos Frutana exohidrolase (FEH), Exo- $\beta$ -(D)-frutosidase e Polissacarídeo- $\beta$ -frutofuranosidase, catalisa a reação de hidrólise das ligações o-glicosil 2,1 e 2,6 do terminal não-redutor dos resíduos de frutanas liberando frutose a partir do final da cadeia dos polímeros até a hidrólise ser concluída. O substrato natural são frutanas em água, também hidrolisando sacarose, produzindo apenas frutose (SCHOMBURG; SALZMANN, 1991).

Avigad e Bauer (1966) descreveram três tipos de hidrolases de frutanas. Os padrões de ação destas entram em uma das seguintes categorias: (i) não-específica capaz de hidrolisar sacarose e ligações  $\beta$ -2,1 e  $\beta$ -2,6 contidas em poli ou oligossacarídeos; (ii) que hidrolisa especificamente ligação  $\beta$ -2,6; ou (iii) que hidrolisa especificamente ligação  $\beta$ -2,1.

Estimaram a atividade da enzima não-específica de *Saccharomyces fragilis* n° 351 na hidrólise de levana e inulina usando tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 na mistura de reação a 30 °C. A hidrolase não-específica atacou ambas as ligações frutofuranosídicas,  $\beta$ -2,1 e  $\beta$ -2,6 em oligossacarídeos, inulina e levana. Unidades de frutose livre foram removidas sucessivamente dos terminais não-redutores das cadeias. A enzima hidrolisou sacarose numa taxa 25 vezes mais rápida do que inulina.

Takahashi, Mizuno e Takamori (1985) relataram as propriedades bioquímicas de uma frutana-hidrolase não-específica (frutosidase) presente no sobrenadante da cultura de *Streptococcus salivarius* KTA-19. Sob condições normais de ensaio, o efeito do pH sobre a atividade foi testado variando de 3,0 a 8,0, encontrando ótimo de 7,0. A enzima foi estável em 37 °C por 30 minutos, a pH 7,0, mas ela gradualmente tornou-se inativa em pH abaixo de 5,0 e perdeu quase toda a sua atividade em pH 4,5. A dependência da taxa máxima de

reação com a temperatura foi analisada na faixa de 20 a 70 °C. A melhor atividade foi obtida a 50 °C. A enzima reteve 80% da atividade até 55 °C, mas rapidamente tornou-se inativa acima de 60 °C. Quando armazenada a 4 °C como solução diluída (20 µg/ml) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,0), a enzima foi estável por vários dias e posteriormente tornou-se gradualmente inativa; 90% da atividade foi perdida em 2 semanas. Armazenamento da solução enzimática a -20 °C tornou-se mais estável do que a 4 °C, mas o congelamento e descongelamento repetidos aceleraram a inativação. A enzima purificada revelou alta atividade de hidrólise de levana e inulina, mas não hidrolisou dextrana ( $\alpha$ -1,6 glucana) e pseudonigerana ( $\alpha$ -1,3 glucana). A enzima também foi testada com vários substratos contendo ligações 2- $\beta$  de D-frutose, incluindo a sacarose, rafinose e melezitose. A enzima hidrolisou sacarose, mas rafinose em menor escala. Com cada um destes substratos, a liberação de frutose foi confirmada por cromatografia em camada delgada. Nenhuma atividade pode ser detectada com melezitose como substrato.

A atividade da enzima foi inibida por  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , e  $\text{Ag}^{+}$ , mas não por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , e  $\text{Zn}^{2+}$  numa concentração de  $10^{-3}$  M.  $\text{Mn}^{2+}$  estimulou a atividade (70%) na mesma concentração. A presença de EDTA ou KCN mostrou ligeiro efeito estimulante após 30 minutos de incubação. A enzima foi particularmente suscetível a reagente sulfidril, p-cloromercuriobenzoato, mostrando 63% de inibição da atividade da enzima na concentração de  $10^{-7}$  M. Em contraste, outro reagente sulfidril, iodoacetato, produziu inibição insignificante, nesta concentração. A presença de cisteína protegeu completamente a atividade da enzima contra a inativação por p-cloromercuriobenzoato. No entanto, a adição de cisteína após a inativação da frutosidase por p-cloromercuriobenzoato não mostrou efeito na recuperação da atividade. Tampão tris levou a uma inibição de 25% na concentração de  $10^{-3}$  M. A frutosidase de *Streptococcus salivarius* foi capaz de hidrolisar tanto inulina como levana. Durante toda a reação a análise cromatográfica em camada delgada mostrou que a D-frutose foi o único produto de ambos os polissacarídeos (TAKAHASHI; MIZUNO; TAKAMORI, 1985).

Takahashi, Mizuno e Takamori (1983) também purificaram e caracterizaram enzima específica para levana produzida por *Streptococcus salivarius* KTA-19. A enzima mostrou-se bastante específica, rompendo apenas ligações  $\beta$ -2,6-frutofuranosídicas de levana e não hidrolisou ligações  $\beta$ -2,1 da frutana inulina. Também não hidrolisou sacarose, rafinose ou

melezitose contendo ligações 2- $\beta$ . A enzima purificada foi incubada com substrato em tampão fosfato 20 mM, a 37 °C e pH 6,5 hidrolisando completamente a levana em 60 minutos. A relação da taxa máxima de reação com a temperatura foi estudado na faixa de 20 a 60 °C. A melhor atividade foi obtida entre 40 e 50 °C, e nenhuma atividade foi detectada em 55 °C. O efeito do pH sobre a atividade da enzima foi estudado na faixa de pH entre 3,0 a 8,0. O pH ótimo de 6,5 para esta enzima foi semelhante ao da espécie *Arthrobacter* relatado por Avigad e Bauer (1966), sendo a única levana hidrolase específica de origem bacteriana. No entanto, o modo de atuação desta foi diferente do da *Arthrobacter*, liberando apenas frutose durante a hidrólise da levana. Em contrapartida, a enzima de *Arthrobacter* quebra aleatoriamente a levana liberando uma infinidade de oligossacarídeos contendo diversos graus de polimerização. Os resultados indicaram que a enzima estreptocócica é do tipo exo e foi designada exo- $\beta$ -2,6-frutofuranosidase. A atividade da enzima foi inibida notavelmente por  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , e p-cloromercuriobenzoato e relataram Tampão tris como inibidor não-competitivo para a enzima de *Arthrobacter*, mas este não inibiu a estreptocócica.

Burne et al. (1987) fizeram experimentos para caracterização de exo- $\beta$ -D-frutosidase de *Streptococcus mutans* GS-5. Com alta especificidade para ligações  $\beta$ -2,6 de levana, a enzima também hidrolisou inulina (frutana de ligações  $\beta$ -2,1), sacarose e rafinose, com 34, 21, e 12%, respectivamente de atividade observada para o levana. A frutose apareceu imediatamente e foi o único açúcar liberado durante o decorrer do experimento independentemente do substrato utilizado. O pH ótimo da enzima para ação sobre polímeros de frutanas foi de 5,5 com quantidade significativa de atividade remanescente em pH 4,0. O pH ótimo para a degradação de sacarose foi mais amplo e mais baixo, com pico em aproximadamente 4,5. Atividade enzimática foi quase completamente inibida por  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ag}^{2+}$ , inibida parcialmente por  $\text{Cu}^{2+}$ , não inibida por íon flúor ou Tris, e ligeiramente estimulado por  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ . Frutose foi liberada linearmente com o tempo, e com tempo suficiente a enzima foi capaz de degradar completamente as ligações  $\beta$ -2,6 da levana com menos de 120 minutos. A enzima também degradou a inulina completamente, mas como esperado, a taxa foi significativamente mais lenta.

Igarashi, Yamamoto e Goto (1992) purificaram de cultura de *Streptococcus mutans* Ingbritt a enzima extracelular  $\beta$ -D-frutosidase e a caracterizaram. A enzima foi específica

para levana e também foi capaz de hidrolisar inulina, sacarose e rafinose com atividade de 13, 9 e 5% da hidrólise de levana. O pH ótimo para levana foi aproximadamente 5,5 e a enzima teve reatividade ótima a 55 °C. Foi inibida por  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ .

Zeng, Wen e Burne (2006) estudaram a regulação de expressão gênica de frutana hidrolase em *Streptococcus mutans*, responsável pela liberação de frutose a partir de frutanas do tipo levana e inulina.

Estudos relatam a extração e purificação da enzima contida em plantas. Smouter e Simpson (1991) estudaram o metabolismo de frutanas para determinar a existência e especificidade da atividade de frutansil transferase e atividade de hidrolase nas folhas de *Lolium rigidum* Gaudin (azevém). Incubações de frutanas de alto peso molecular com preparação da enzima bruta extraída da planta produziram exclusivamente frutose, independentemente do substrato utilizado. Frutanas de alto peso molecular, obtidas a partir de folhas de *Lolium rigidum* e tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. (4% w/v), e levana bacteriana de *Aerobacter levanicum* (1% w/v) foram utilizadas como substrato alternativo para atividade frutana hidrolase. A atividade da enzima foi medida pela liberação de frutose e foi ótima em temperatura de 25 °C.

Até 1999 poucas enzimas frutana exohidrolase tinham sido caracterizadas a partir de plantas dicotiledôneas (RUTHERFORD; DEACON, 1972; CLAESSENS; LAERE; PROFT, 1990; MARX; NÖSBERGER; FREHNER, 1997a) e de espécies monocotiledôneas (YAMAMOTO; MINO, 1985; WAGNER; WIEMKEN, 1986; HENSON, 1989; SIMPSON; WALKER; POLLOCK, 1991; BONNETT; SIMPSON, 1993; HENSON; LIVINGSTON, 1996; MARX; NÖSBERGER; FREHNER, 1997b). Exceto para 1-frutana exohidrolase de *Cichorium intybus* (CLAESSENS; LAERE; PROFT, 1990) e de *Helianthus tuberosus* (MARX; NÖSBERGER; e FREHNER, 1997a) nenhuma frutana exohidrolase de espécies de plantas dicotiledôneas foram purificadas à homogeneidade. Edelman e Jefford (1964) relataram a presença de duas atividades de frutana exohidrolase em *Helianthus tuberosus*. Claessens, Laere e Proft, (1990) relataram a possível presença de uma segunda frutana exohidrolase em raízes de chicória. O objetivo do estudo de Hoover et al. (1999) foi purificar e caracterizar esta segunda frutana exohidrolase usando raiz de chicória. Nenhum produto diferente da frutose foi detectado com a inulina como substrato; a atividade ótima foi encontrada entre pH 5,0 e 5,5 e temperatura ótima de cerca de 35 °C.

A enzima purificada hidrolisou ligações  $\beta$ -2,1 na inulina, 1-ketose e 1,1-nistose a taxas de pelo menos 5 vezes mais rápido do que ligações  $\beta$ -2,6 de levana e levanbiose, mas sacarose não foi hidrolisada. Frutose não afetou a atividade enzimática, mas sacarose foi um forte inibidor.

Em fungos enzimas endolíticas também foram relatadas (ONODERA et al., 1996), contudo não foi possível distinguir claramente entre invertase (EC 3.2.1.26), que principalmente cliva sacarose, e frutana exohidrolase (EC 3.2.1.80), que degradou predominantemente frutanas.

A extração de vegetais apresenta baixo rendimento, o que aumenta o valor comercial da enzima. Uma alternativa é a produção de enzima através de processos fermentativos, já que os bioprocessos apresentam como principais vantagens a facilidade de produção das enzimas, produção contínua durante todo o ano, possibilidade da utilização de substratos de baixo custo, entre outros (TREICHEL, 2004). A produção industrial de enzimas através de bioprocessos pode ser influenciada por muitos fatores como: seleção de um bom micro-organismo, escolha do substrato adequado e controle adequado das variáveis operacionais (físicas, químicas e bioquímicas). A manipulação adequada desses fatores pode levar a aumento na produção de enzimas (MAZUTTI et al., 2006).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Produção de Levana

##### 3.1.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado para a obtenção de levana foi a cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, geneticamente modificada por Wendt (2001) e depositada pelo Laboratório de Processos Fermentativos junto à Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas-SP). Para obtenção da cepa mutante, Wendt (2001) tratou a massa celular da cepa natural com 50 µg/mL de NTG (N-metil N'nitro N'nitroso Guanidina) por 45 minutos a 30 °C. As células foram lavadas repetidas vezes, ressuspensas em água, plaqueadas em meio ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e cultivadas por 24 h a 30 °C.

##### 3.1.2 Manutenção do Micro-organismo

Para manutenção da cepa mutante foi usado meio ágar inclinado conforme a composição descrita na Tabela 3-1, otimizado por Wendt (2001), previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. As culturas foram repicadas a cada 30 dias. O pH do meio ajustado a 5,5. Para melhor conservação da cultura, repiques foram feitos, em média, a cada três meses e verificado se a atividade enzimática corresponde à cepa mutada.

**Tabela 3-1:** Composição do meio utilizado na manutenção da cepa e no preparo do inóculo do mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Composto	Concentração (g/L)
Sacarose	50,0
Extrato de Levedura	5,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
Ágar	20,0

### 3.1.3 Preparo do Inóculo

A obtenção do inóculo foi feita em “shaker” (TECNAL, mod. TE 421) sendo utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio descrito na Tabela 3-1, exceto ágar, previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos. As condições de cultivo para o preparo do inóculo foram 30 °C a 100 rpm por 24 horas em pH<sub>inicial</sub> ajustado em 5,5. Desta cultura foi transferida alíquota de 10% (v/v) para frascos contendo meio estéril.

### 3.1.4 Fermentação em Frascos Erlenmeyer

As fermentações foram feitas em “shaker” (TECNAL, mod. TE 421) utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de fermentação (meio + 10% v/v inóculo). O tempo de fermentação foi de 24 h e amostras foram retiradas entre os tempos 10 e 24h. Na Tabela 3-2 é mostrada a matriz do delineamento Plackett-Burman de 12 ensaios (PB12), com os seus níveis reais e codificados (entre parênteses).

Esta fermentação foi realizada de acordo com o PB12, com 4 pontos centrais, totalizando 16 ensaios. As variáveis estudadas foram: agitação, pH<sub>inicial</sub>, temperatura e concentrações iniciais de sacarose, extrato de levedura, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A análise da matriz de resposta de concentração de levana do PB-12 foi feita com auxílio do software Statistica versão 7,0.

**Tabela 3-2:** Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento PB12, com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para produção de levana pelo mutante de *Zymomonas mobilis* CCT4494.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH <sub>inicial</sub>	Sacarose (g/L)	Ext Lev (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	MgSO <sub>4</sub> (g/L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	Agitação (rpm)
1	45 (1)	4,5 (-1)	350 (1)	2,0 (-1)	0,2 (-1)	0,2 (-1)	1,0 (1)	150 (1)
2	45 (1)	6,5 (1)	150 (-1)	10,0 (1)	0,2 (-1)	0,2 (-1)	0,2 (-1)	150 (1)
3	25 (-1)	6,5 (1)	350 (1)	2,0 (-1)	1,0 (1)	0,2 (-1)	0,2 (-1)	50 (-1)
4	45 (1)	4,5 (-1)	350 (1)	10,0 (1)	0,2 (-1)	1,0 (1)	0,2 (-1)	50 (-1)
5	45 (1)	6,5 (1)	150 (-1)	10,0 (1)	1,0 (1)	0,2 (-1)	1,0 (1)	50 (-1)
6	45 (1)	6,5 (1)	350 (1)	2,0 (-1)	1,0 (1)	1,0 (1)	0,2 (-1)	150 (1)
7	25 (-1)	6,5 (1)	350 (1)	10,0 (1)	0,2 (-1)	1,0 (1)	1,0 (1)	50 (-1)
8	25 (-1)	4,5 (-1)	350 (1)	10,0 (1)	1,0 (1)	0,2 (-1)	1,0 (1)	150 (1)
9	25 (-1)	4,5 (-1)	150 (-1)	10,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	0,2 (-1)	150 (1)
10	45 (1)	4,5 (-1)	150 (-1)	2,0 (-1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	50 (-1)
11	25 (-1)	6,5 (1)	150 (-1)	2,0 (-1)	0,2 (-1)	1,0 (1)	1,0 (1)	150 (1)
12	25 (-1)	4,5 (-1)	150 (-1)	2,0 (-1)	0,2 (-1)	0,2 (-1)	0,2 (-1)	50 (-1)
13 (C)	35 (0)	5,5 (0)	250 (0)	6,0 (0)	0,6 (0)	0,6 (0)	0,6 (0)	100 (0)
14 (C)	35 (0)	5,5 (0)	250 (0)	6,0 (0)	0,6 (0)	0,6 (0)	0,6 (0)	100 (0)
15 (C)	35 (0)	5,5 (0)	250 (0)	6,0 (0)	0,6 (0)	0,6 (0)	0,6 (0)	100 (0)
16 (C)	35 (0)	5,5 (0)	250 (0)	6,0 (0)	0,6 (0)	0,6 (0)	0,6 (0)	100 (0)

O pH foi ajustado de acordo com o delineamento experimental utilizando HCl ou NaOH (2 N), conforme necessário.

### 3.1.5 Separação da Levana Sintetizada

O meio fermentado do item 3.1.4 foi previamente centrifugado para separação de células. A levana sintetizada foi precipitada a partir do sobrenadante por meio de adição de etanol (ETOH) 70% (v/v) a baixa temperatura (0-5 °C). O precipitado foi dissolvido em água destilada e precipitou novamente. A levana isolada foi seca a vácuo, triturada e armazenadas até posterior utilização nos ensaios de fermentação com as cepas de *Kluyveromyces marxianus*.

## 3.2 Hidrólise de Levana

### 3.2.1 Micro-organismos

Foram utilizadas 3 linhagens de *Kluyveromyces marxianus* para pré-seleção do melhor produtor de frutana exohidrolase, sendo *Kluyveromyces marxianus* CCT4294 da coleção do Laboratório de Processos Fermentativos (FEA-UNICAMP), *K. marxianus* NRRL Y-8281 e *K. marxianus* NRRL Y-610 doados pela Northern Regional Research Laboratory (NRRL) dos Estados Unidos.

### 3.2.2 Manutenção do Micro-organismo

Para manutenção das cepas foi utilizando meio àgar de extrato de levedura e malte (YM) inclinado, previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Os tubos foram mantidos sob refrigeração (4°C). Na Tabela 3-3 é mostrada a composição do meio YM. Para melhor conservação da cultura, repiques foram feitos, em média, a cada três meses.

**Tabela 3-3:** Composição do meio YM usado na manutenção das cepas de *Kluyveromyces marxianus*.

Composto	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura	3,0
Extrato de Malte	3,0
Peptona	5,0
Glicose	10,0
Ágar	20,0

### 3.2.3 Preparo do Inóculo

A fermentação para obtenção do inóculo foi feita em “shaker” (TECNAL, mod. TE 421) sendo utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio descrito na Tabela 3-4, esterilizados a 121 °C por 15 minutos. As condições de cultivo para o preparo do inóculo foram 25 °C a 150 rpm por 24 horas em pH ajustado em 5,5. Desta cultura foi transferida alíquota de 10% (v/v) para frascos contendo meio estéril.

**Tabela 3-4:** Composição do Meio de Inóculo para as cepas de *Kluyveromyces marxianus*.

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Levana	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
Extrato de Levedura	5,0
Peptona	5,0

### 3.2.4 Seleção de Micro-organismos

As fermentações para a pré-seleção da linhagem de *Kluyveromyces marxianus* melhor produtora de frutana β-frutosidase (FβF) foram feitas em meio sintético contendo 5,0 g/L de levana; 1,2 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05 g/L de MgSO<sub>4</sub>; 1,0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,0 g/L de extrato de levedura; 5,0 g/L de peptona e pH<sub>inicial</sub> ajustado em 5,5.

Foram incubadas a 35 °C e agitadas a 150 rpm em “shaker” (TECNAL, mod. TE 421) utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de fermentação (meio + inóculo).

A produção da enzima foi acompanhada após 24 e 48 horas de fermentação. A linhagem NRRL Y-8281 com 24 horas de fermentação foi a que apresentou maior atividade de FβF e foi utilizada nos estudos de otimização.

### 3.2.5 Estudo da Otimização do Meio de Fermentação para Produção de Frutana β-frutosidase (FβF)

A metodologia para o estudo da otimização do meio para produção de frutana β-frutosidase (FβF) foi feita por planejamento experimental. As análises dos dados dos planejamentos foram feitas utilizando o programa Statistica versão 7,0. As fermentações foram realizadas em “shaker” (TECNAL, mod. TE 421) a 150 rpm, utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de fermentação (meio + inóculo).

Inicialmente utilizou-se um planejamento experimental Plackett-Burman de 12 ensaios (PB12) para o micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 com 4

pontos centrais, num total de 16 ensaios para avaliação das variáveis mais importantes do processo e seleção para o próximo delineamento. Na Tabela 3-5 é apresentada a matriz do delineamento PB12 com os seus níveis reais e codificados (entre parênteses), tendo como variáveis temperatura,  $\text{pH}_{\text{inicial}}$ , concentrações iniciais de levana, extrato de levedura e peptona.

**Tabela 3-5:** Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento Plackett-Burman (PB12), com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para produção de frutana  $\beta$ -frutosidase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Ensaio	Temperatura (°C)	$\text{pH}_{\text{inicial}}$	Conc. inicial Levana (g/L)	Conc. inicial Ext Levedura (g/L)	Conc. inicial Peptona (g/L)
1	37 (1)	3,5 (-1)	1,0 (-1)	5,0 (1)	1,0 (-1)
2	37 (1)	6,5 (1)	1,0 (-1)	1,0 (-1)	5,0 (1)
3	25 (-1)	6,5 (1)	5,0 (1)	1,0 (-1)	1,0 (-1)
4	37 (1)	3,5 (-1)	5,0 (1)	5,0 (1)	1,0 (-1)
5	37 (1)	6,5 (1)	1,0 (-1)	5,0 (1)	5,0 (1)
6	37 (1)	6,5 (1)	5,0 (1)	1,0 (-1)	5,0 (1)
7	25 (-1)	6,5 (1)	5,0 (1)	5,0 (1)	1,0 (-1)
8	25 (-1)	3,5 (-1)	5,0 (1)	5,0 (1)	5,0 (1)
9	25 (-1)	3,5 (-1)	1,0 (-1)	5,0 (1)	5,0 (1)
10	37 (1)	3,5 (-1)	1,0 (-1)	1,0 (-1)	5,0 (1)
11	25 (-1)	6,5 (1)	1,0 (-1)	1,0 (-1)	1,0 (-1)
12	25 (-1)	3,5 (-1)	5,0 (1)	1,0 (-1)	1,0 (-1)
13 (C)	31 (0)	5,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)
14 (C)	31 (0)	5,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)
15 (C)	31 (0)	5,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)
16 (C)	31 (0)	5,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)

Com base nestes resultados, foram determinadas as variáveis significativas e foi feito um delineamento Fatorial Fracionário (FF)  $2^{4-1}$  de resolução IV com 4 pontos centrais totalizando 12 ensaios. Neste planeamento a temperatura foi fixada em 30 °C e as variáveis estudadas foram  $\text{pH}_{\text{inicial}}$ , concentrações iniciais de levana, de extrato de levedura e de peptona e retiradas amostras nos tempos de 24 e 46 horas de fermentação. Na Tabela 3-6 é mostrada a matriz do FF  $2^{4-1}$  com os seus níveis reais e codificados (entre parênteses).

**Tabela 3-6:** Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento Fatorial Fracionário (FF)  $2^{4-1}$  com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para produção de frutana  $\beta$ -frutosidase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Ensaio	pH	Conc. inicial Levana (g/L)	Conc. inicial Ext Levedura (g/L)	Conc. inicial Peptona (g/L)
1	3,5 (-1)	3 (-1)	0 (-1)	0 (-1)
2	5,5 (1)	3 (-1)	0 (-1)	3 (1)
3	3,5 (-1)	10 (1)	0 (-1)	3 (1)
4	5,5 (1)	10 (1)	0 (-1)	0 (-1)
5	3,5 (-1)	3 (-1)	5 (1)	3 (1)
6	5,5 (1)	3 (-1)	5 (1)	0 (-1)
7	3,5 (-1)	10 (1)	5 (1)	0 (-1)
8	5,5 (1)	10 (1)	5 (1)	3 (1)
9 (C)	4,5 (0)	6,5 (0)	2,5 (0)	1,5 (0)
10 (C)	4,5 (0)	6,5 (0)	2,5 (0)	1,5 (0)
11 (C)	4,5 (0)	6,5 (0)	2,5 (0)	1,5 (0)
12 (C)	4,5 (0)	6,5 (0)	2,5 (0)	1,5 (0)

A análise dos resultados do FF mostrou a necessidade de estudar apenas a influência da concentração inicial de levana como variável para tentar otimizar as condições de produção da F $\beta$ F. Devido a este fato, nesta etapa a concentração inicial de levana foi variada de 10 a 30 g/L. O pH<sub>inicial</sub>, temperatura, concentrações iniciais de extrato de levedura e peptona foram fixados em 3,5 ; 25 °C ; 0 e 0 g/L respectivamente. O tempo de fermentação foi de 35 horas e amostras foram retiradas entre os tempos 12 e 35 horas.

### 3.3 Caracterização Parcial da Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F)

#### 3.3.1 Perfil de Temperatura e pH

O perfil de temperatura e pH na reação enzimática foi determinado através da atividade exohidrolítica da frutana  $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F), utilizando o método descrito no item 3.4.4, utilizando planejamento experimental como ferramenta para a realização do estudo.

Esta metodologia permite uma direção às condições ótimas de operação muito mais rapidamente através do planejamento experimental do que a análise convencional

univariável, além de permitir avaliar os dados estatisticamente fornecendo confiabilidade nos resultados obtidos (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Foi feito um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 2 variáveis (temperatura e pH), num total de 11 ensaios ( $2^2$  com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais), sendo  $\alpha$  igual a 1,4142. A faixa de temperatura estudada variou de 30 a 70 °C e o pH variou de 2,0 a 6,0 conforme pode ser visualizado na Tabela 3-7.

**Tabela 3-7:** Matriz dos ensaios gerada pelo DCCR  $2^2$  com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para determinação de temperatura e pH ótimo de atividade de frutana  $\beta$ -frutossidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)
1	2,6 (-1)	35,9 (-1)
2	5,4 (1)	35,9 (-1)
3	2,6 (-1)	64,1 (1)
4	5,4 (1)	64,1 (1)
5	2,0 (-1.41)	50 (0)
6	6,0 (1.41)	50 (0)
7	4,0 (0)	30 (-1.41)
8	4,0 (0)	70 (1.41)
9 (C)	4,0 (0)	50 (0)
10 (C)	4,0 (0)	50 (0)
11 (C)	4,0 (0)	50 (0)

### 3.3.2 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica de pré-incubação da enzima foi feita em termos de tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), incubando-se o caldo fermentado livre de células em tampão acetato 0,1 M pH 5,5 e variando a temperatura entre 40 a 80 °C. Foi determinada a atividade da frutana  $\beta$ -frutossidase (F $\beta$ F) ao longo do tempo utilizando o método descrito no item 3.4.4.

#### 3.3.2.1 Determinação da Constante de Desnaturação ( $K_d$ )

Com os dados de atividade em função do tempo de incubação para cada temperatura, obtidos ao longo da estabilidade térmica item 3.3.2, plotou-se os logaritmos naturais da atividade relativa  $U/U_0$  (atividade em determinado tempo  $U$ , dividida pela atividade inicial  $U_0$ ) em função do tempo (minutos) para a determinação de  $K_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ). A

regressão linear obtida dos dados experimentais obedece a Equação (01) e o valor da inclinação da reta equivale a constante  $K_d$  na temperatura avaliada.

$$\text{Ln}\left(\frac{U}{U_0}\right) = -K_d \times t + C_1 \quad (01)$$

Onde: Ln = logaritmo natural;  $U/U_0$  = atividade relativa;  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ ); t = tempo (min).

### 3.3.2.2 Determinação da Meia Vida da Enzima ( $t_{1/2}$ )

Costuma-se expressar a estabilidade térmica em termos de meia vida, a qual é definida como sendo o tempo necessário para perder 50% da sua atividade inicial, ou seja:  $U/U_0 = 0,5$ .

Uma vez determinado o valor de  $K_d$  (item 3.3.3) foi possível determinar a meia vida da enzima. Para a determinação da meia vida foi utilizada a Equação (02).

$$t_{1/2} = -\frac{\text{Ln}(0,5)}{K_d} \quad (02)$$

Onde:  $t_{1/2}$  = tempo de meia vida (min); Ln = logaritmo natural;  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ ).

### 3.3.2.3 Determinação da Energia de Ativação da Desnaturação ( $E_{ad}$ )

Os valores de  $K_d$  obtidos segundo o item 3.3.3 foram linearizados de acordo com a metodologia proposta por Arrhenius na forma de Ln ( $K_d$ ) versus  $1/T$ . A regressão linear obtida obedece a Equação (03), e o valor da inclinação desta equação foi multiplicado pela constante R (1,98 cal/mol.K) obtendo dessa forma o valor de  $E_{ad}$  expresso em cal/mol.

$$\text{Ln}K_d = \text{Ln}K - \frac{E_{ad}}{RT} \quad (03)$$

Onde:  $K_d$  = constante de desnaturação ( $\text{min}^{-1}$ );  $K$  = constante de Arrhenius;  $E_{ad}$  = energia de ativação de desnaturação ( $\text{cal/mol}$ );  $R$  = constante universal dos gases perfeitos ( $\text{cal/mol.K}$ );  $T$  = temperatura (K).

### 3.3.3 Estabilidade de pH

A estabilidade da enzima em relação ao pH de pré-incubação foi feita em termos de tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), incubando-se o caldo fermentado livre de células em tampões glicina, acetato e fosfato 0,1 M em valores de pH entre 3,0 e 8,0 na temperatura 50 °C. Foi determinada a atividade da frutana  $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) ao longo do tempo, utilizando o método descrito no item 3.4.4.

#### 3.3.3.1 Determinação da Constante de Desnaturação ( $K_d$ )

A constante de desnaturação ( $K_d$ ) também foi determinada conforme o item 3.3.2.1 para os diferentes valores de pH estudados para posterior determinação do tempo de meia vida.

#### 3.3.3.2 Determinação da Meia Vida ( $t_{1/2}$ )

O tempo de meia vida foi determinado conforme item 3.3.2.2 para os diferentes valores de pH estudados.

### 3.3.4 Determinação de $K_m$ e $v_{m\acute{a}x}$

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram feitas medindo-se a atividade enzimática em diferentes concentrações de levana em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e temperatura de 50 °C. As concentrações de levana utilizadas foram: 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 g/L.

### **3.4 Metodologia Analítica**

#### **3.4.1 Determinação de Levana**

O polissacarídeo foi quantificado do sobrenadante das amostras após a centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos para retirada das células, seguindo-se de precipitação com 70% (v/v) de etanol anidro (ETOH) previamente resfriado a baixa temperatura (0-5 °C). Homogeneizou-se a solução e deixou-se em repouso por 24 horas na temperatura de 4°C. A solução foi novamente centrifugada sob as mesmas condições anteriores, e a operação de precipitação pelo etanol foi repetida novamente para aumentar o grau de pureza do material isolado.

A levana precipitada foi hidrolisada em frutose, com volume igual de HCl 2 N, à temperatura de ebulição da água por 20 minutos. Neutralizou-se o material hidrolisado com NaOH 2 N. A pureza da levana foi estimada indiretamente como frutose (em g/L) pelo método Somogyi-Nelson (1952). Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 540 nm tendo como base amostras de frutose com concentrações conhecidas e, posteriormente, construiu-se uma curva de calibração utilizando o método.

#### **3.4.2 Determinação de Atividade Enzimática de Levanassacarase**

As amostras de sobrenadante obtidas conforme item 3.4.1 foram usadas como fonte da enzima extracelular.

A atividade enzimática foi determinada incubando-se 9 mL de solução de sacarose 10% (p/v) dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5, e 1 mL de sobrenadante a 30 °C por 3 horas. A reação enzimática foi interrompida em banho de água em ebulição por 10 minutos.

A atividade de hidrólise de levanassacarase foi medida pela concentração de glicose liberada através do método da glicose oxidase/peroxidase (Kit Bio Diagnóstica – Glicose Enz Color).

Após a diluição, com água destilada conforme necessário, 20  $\mu$ L de amostra e 2 mL do reagente foram misturados e incubados a 37 °C por 10 minutos. Paralelamente, foi feita a determinação do padrão (20  $\mu$ L padrão e 2 mL do reagente) e do branco (2 mL do reagente), sendo ambos incubados nas mesmas condições das amostras.

Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1  $\mu$ mol de glicose/minuto/mL.

### **3.4.3 Determinação de Atividade Enzimática da Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F)**

A atividade da frutana  $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) foi determinada misturando-se 1 mL do sobrenadante dos itens 3.2.4, 3.2.5, 3.3.1, 3.3.2.1 e 3.3.3.1 com 1 mL de solução de levana 1% em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e incubando em banho a 50 °C por 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida em banho de água em ebulição por 10 minutos.

Os açúcares redutores liberados foram medidos pelo método de Somogy-Nelson. Foi feito um branco para cada amostra para corrigir a liberação não enzimática de açúcares.

Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de frutose/minuto/mL.

### **3.4.4 Determinação de Açúcares**

Açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR) foram determinados na solução sobrenadante obtida conforme itens 3.2.4, 3.2.5 e 3.4.1 pelo método de Somogy-Nelson (1952). Na determinação do ART, uma alíquota do sobrenadante foi hidrolisada com HCl 2 N, aquecida em banho de água em ebulição por 15 minutos, resfriada e neutralizada com volume igual de NaOH 2 N.

### **3.4.5 Determinação de pH**

O pH foi determinado através de leitura direta em potenciômetro (DIGIMED, modelo DM 20).

### **3.4.6 Cromatografia**

Os açúcares foram identificados através de cromatografia em camada delgada, CCD (TLC - “Thin Layer Chromatography”) em sílica gel 60, utilizando acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (9:3:1:4, v/v) como fase móvel. Açúcares foram detectados com 0,2% de orcinol em ácido sulfúrico-etanol (1:9, v/v), sendo utilizados como padrões sacarose, frutose e glicose, aplicados com 1% (p/v) de concentração.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção de Levana

Nos experimentos preliminares foi obtida menor quantidade de levana sob mesmas condições do que a apresentada por Wendt (2001), que relatou máxima produção de 42,76 g/L em frascos Erlenmeyers, correspondendo a uma conversão de substrato inicial de 23,7%. Portanto, um delineamento Plackett-Burman de 12 ensaios (PB12) foi realizado. As variáveis utilizadas no delineamento PB12, os seus níveis reais e codificados e a matriz dos ensaios realizados foram apresentados na Tabela 3-2.

Na Tabela 4-1 constam os resultados de pH ao longo da fermentação. Independente do valor inicial houve queda do pH, sendo o valor mais baixo 3,15 no ensaio 12 ( $\text{pH}_{\text{inicial}}$  4,5) e o mais alto 4,70 no ensaio 7 ( $\text{pH}_{\text{inicial}}$  6,5).

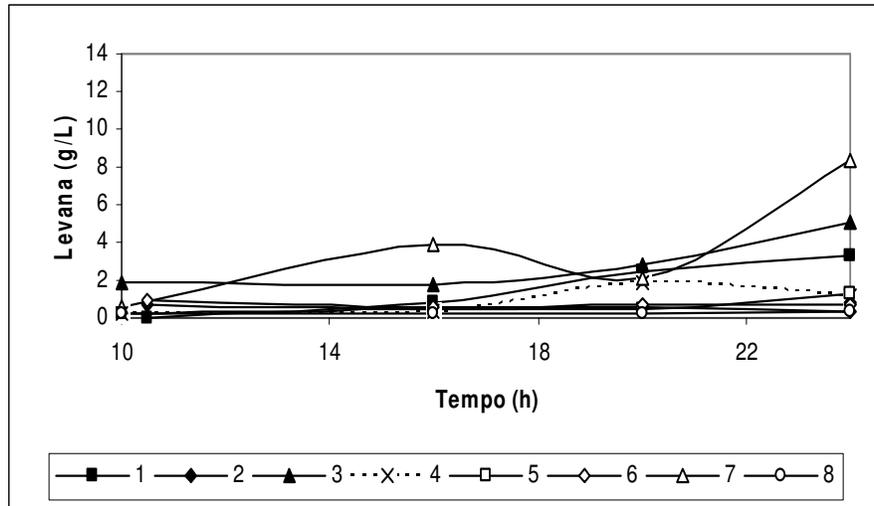
**Tabela 4-1:** Valores de pH obtidos no PB12 para produção de levana com cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Ensaio	inicial	pH			
		10 h	16 h	20 h	24 h
1	4,5	3,68	3,40	3,29	3,52
2	6,5	5,29	4,28	3,95	4,03
3	6,5	5,49	4,87	4,62	4,37
4	4,5	4,23	4,09	4,02	3,97
5	6,5	5,34	4,91	4,68	4,62
6	6,5	4,56	3,92	3,71	3,56
7	6,5	5,70	5,27	4,89	4,70
8	4,5	4,22	4,16	4,16	4,21
9	4,5	4,28	4,29	4,26	4,18
10	4,5	3,88	3,69	3,63	3,61
11	6,5	5,18	4,69	4,42	4,23
12	4,5	3,39	3,17	3,17	3,15
13 (C)	5,5	3,44	3,45	3,51	3,46
14 (C)	5,5	3,45	3,47	3,55	3,49
15 (C)	5,5	3,46	3,49	3,54	3,51
16 (C)	5,5	3,46	3,48	3,52	3,52

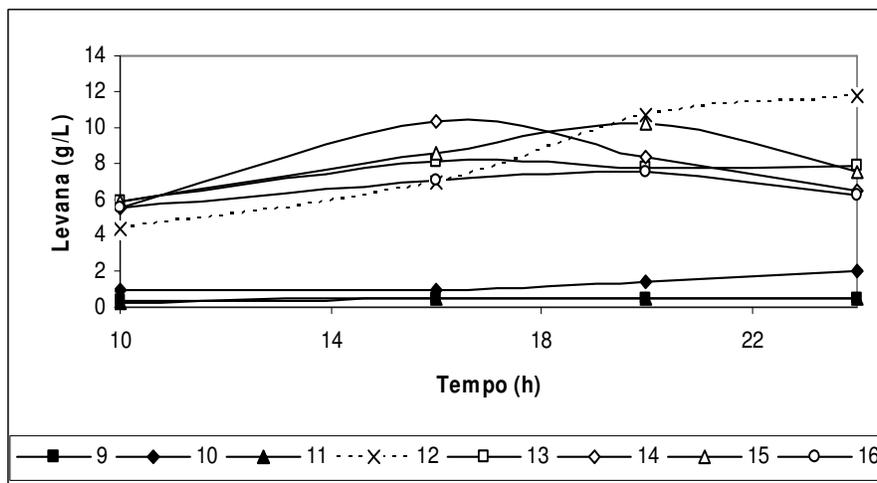
Os resultados da concentração de levana (g/L) podem ser visualizados na Tabela 4-2, A Figura 4-1 apresenta os gráficos destes valores em relação ao tempo de fermentação. A maior concentração do FOS foi de 11,71 g/L após 24 h de cultivo no ensaio 12, conduzido a 25 °C; pH<sub>inicial</sub> 4,5; sacarose 150 g/L; extrato de levedura 2,0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 g/L a 50 rpm. Esta concentração foi 67% maior que o segundo valor mais alto, 7,01 g/L, nos ensaios dos pontos centrais (35 °C; pH<sub>inicial</sub> 5,5; sacarose 250 g/L, extrato de levedura 6,0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,6 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 g/L a 100 rpm).

**Tabela 4-2:** Produção de levana (g/L) obtida no PB12 para produção de levana com cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Ensaio	Levana (g/L)			
	10 h	16 h	20 h	24 h
1	0,04	0,83	2,51	3,32
2	0,70	0,53	0,53	0,39
3	1,90	1,74	2,85	5,10
4	0,28	0,33	1,92	1,14
5	0,29	0,46	0,43	1,24
6	0,95	0,62	0,69	0,72
7	0,55	3,90	2,11	8,31
8	0,20	0,25	0,24	0,31
9	0,38	0,43	0,49	0,49
10	0,94	0,98	1,41	1,98
11	0,22	0,45	0,48	0,53
12	4,39	6,98	10,65	11,71
13 (C)	5,82	8,13	7,80	7,85
14 (C)	5,57	10,37	8,40	6,48
15 (C)	5,94	8,58	10,22	7,49
16 (C)	5,50	7,10	7,54	6,22



(a)



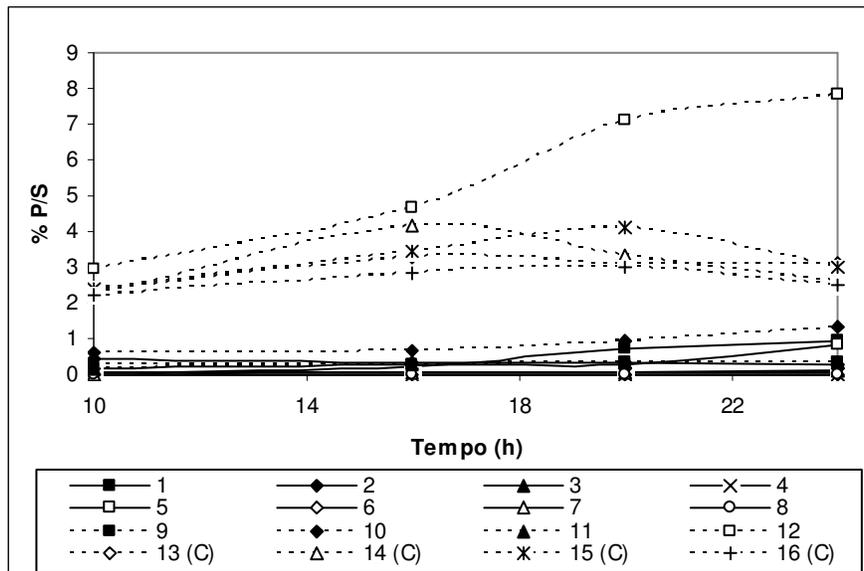
(b)

**Figura 4-1:** Produção de levana (g/L) durante PB12 com cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494: (a) ensaios 1 a 8 (b) ensaios 9 a 16.

A porcentagem de conversão de substrato inicial em produto, representada pela razão concentração de levana (g/L) por concentração inicial de sacarose (g/L), está apresentada na Tabela 4-3 e Figura 4-2. Os ensaios com valores maiores que os pontos centrais foram os experimentos do ensaio 12. Com 24 horas de cultivo foi obtido 7,8 % de conversão de substrato inicial em produto sendo 178 % maior que o valor observado nos pontos centrais, uma média de 2,8 % de conversão.

**Tabela 4-3:** Porcentagem da concentração de levana produzida por concentração de substrato inicial obtida no PB12 com cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Ensaio	P/S <sub>i</sub> (%)			
	10 h	16 h	20 h	24 h
1	0,0	0,2	0,7	0,9
2	0,5	0,4	0,4	0,3
3	0,1	0,0	0,0	0,1
4	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,2	0,3	0,3	0,8
6	0,0	0,0	0,0	0,0
7	0,0	0,1	0,0	0,1
8	0,0	0,0	0,0	0,0
9	0,3	0,3	0,3	0,3
10	0,6	0,7	0,9	1,3
11	0,1	0,3	0,3	0,4
12	2,9	4,7	7,1	7,8
13 (C)	2,3	3,3	3,1	3,1
14 (C)	2,2	4,1	3,4	2,6
15 (C)	2,4	3,4	4,1	3,0
16 (C)	2,2	2,8	3,0	2,5



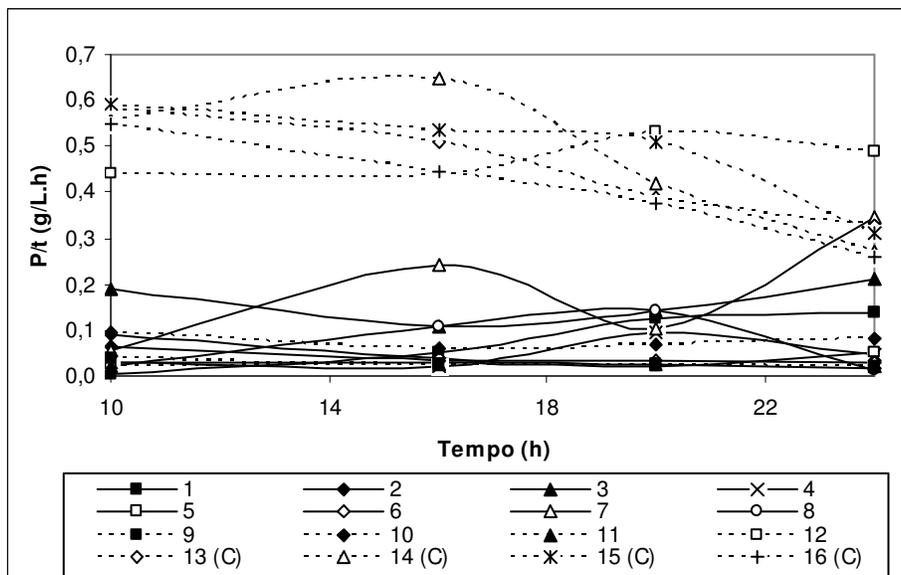
**Figura 4-2:** Rendimento de produção de levana por concentração de sacarose inicial durante PB12 com cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

A Tabela 4-4 e Figura 4-3 mostram os valores de produtividade em levana (g/L.h) para o delineamento PB12. Os melhores valores foram obtidos para os pontos centrais nos tempos 10 e 12 h (0,57 e 0,53 g/L.h respectivamente), e no ensaio 12 com 20 e 24 h (0,53 e 0,49 g/L.h respectivamente). A maior produtividade ocorreu nos pontos centrais no tempo

de 10 h de fermentação, correspondendo a 6,9; 7,2 e 16,9 % maiores que as obtidas pelos ensaios nos pontos centrais com 12 h, no ensaio 12 com 20 e 24 h, respectivamente.

**Tabela 4-4:** Produtividade de levana (g/L.h) obtida no PB12 com cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Ensaio	Produtividade em Levana (g/L.h)			
	10 h	16 h	20 h	24 h
1	0,004	0,052	0,126	0,138
2	0,067	0,033	0,027	0,016
3	0,190	0,108	0,143	0,213
4	0,028	0,021	0,096	0,047
5	0,029	0,028	0,021	0,052
6	0,090	0,039	0,034	0,030
7	0,055	0,244	0,106	0,346
8	0,020	0,108	0,143	0,013
9	0,038	0,027	0,025	0,020
10	0,094	0,061	0,071	0,082
11	0,022	0,028	0,024	0,022
12	0,439	0,436	0,532	0,488
13 (C)	0,582	0,508	0,390	0,327
14 (C)	0,557	0,648	0,420	0,270
15 (C)	0,594	0,536	0,511	0,312
16 (C)	0,550	0,444	0,377	0,259



**Figura 4-3:** Produtividade de levana (g/L.h) durante PB12 com cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

A Tabela 4-5 apresenta os resultados das duas melhores condições observadas, o ensaio 12 com 24 horas de cultivo e os pontos centrais com 10 horas de cultivo.

**Tabela 4-5:** Resultados dos ensaios 12 e média dos pontos centrais obtidos no PB12 com cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Ensaio	Levana (g/L)		P/S <sub>i</sub> (%)		Produtividade em Levana (g/L.h)	
	10 h	24 h	10 h	24 h	10 h	24 h
12	4,39	11,71	2,9	7,8	0,44	0,49
PC (média)	5,71	7,01	2,3	2,8	0,57	0,29

Mesmo tendo-se observado maior produtividade de levana nos pontos centrais com 10 h de fermentação (0,57 g/L.h), esta foi 16,9 % maior que a obtida no ensaio 12 com 24 h de cultivo (0,49 g/L.h). Enquanto as condições de maior concentração de levana e, principalmente, maior porcentagem de conversão de substrato inicial em produto foram ambas obtidas no ensaio 12 com 24 h de fermentação; 11,72 g/L de levana, concentração esta 101 % maior que os ensaios nos pontos centrais com 10 h de cultivo (5,71 g/L); e 7,8 % de conversão de substrato inicial em produto, porcentagem 242 % maior que os ensaios nos pontos centrais com 10 h de cultivo (2,3 %). O ensaio 12 com 24 h de fermentação mostrou-se o melhor nessas variáveis e faixas estudadas.

A análise estatística foi feita para o tempo de 24 h de fermentação. A Tabela 4-6 mostra a estimativa dos efeitos para a concentração de levana produzida pela cepa de *Z. mobilis* no planejamento Plackett-Burman de 12 ensaios através do SS residual.

**Tabela 4-6:** Estimativa dos efeitos para concentração de levana produzida pela cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 no PB12 após 24 h de cultivo.

Parâmetros	Efeito (g/L)	Desvio Padrão	t (6)	p-valor
Média *	2,94	0,71	4,12	0,0062
Curvatura *	8,15	2,85	2,85	0,0290
Temperatura (°C) *	-2,94	1,43	-2,06	0,0848
pH <sub>inicial</sub>	-0,44	1,43	-0,31	0,7670
Sacarose (g/L)	0,43	1,43	0,30	0,7745
Extrato de Levedura (g/L)	-1,91	1,43	-1,34	0,2287
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	-2,59	1,43	-1,82	0,1190
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O (g/L)	-1,49	1,43	-1,04	0,3378
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	-0,64	1,43	-0,45	0,6677
Agitação (rpm) *	-3,96	1,43	-2,77	0,0324

\* fatores estatisticamente significativos (90% de confiança).

As variáveis temperatura e agitação apresentaram efeito significativo na concentração de levana, a um nível de confiança de 90%, quando utilizado essas faixas de valores para as variáveis estudadas. Ambos apresentaram efeito negativo, ou seja, para aumentar a concentração de levana, deve-se diminuir os valores de agitação e temperatura. A variável que mais influenciou na concentração de levana foi agitação.

Sutherland (1999) aborda que existem vários fatores que podem influenciar na síntese do produto desejado e, dependendo das condições de fermentação empregadas no processo (pH, temperatura, fonte de carbono, tempo de incubação, etc.), o rendimento do biopolímero poderá reduzir ou aumentar. E são necessárias diferentes condições para a produção de levana quando utilizadas diferentes cepas de micro-organismos (DOELLE et al., 1989).

Foi observado neste experimento produção de levana superior a obtida por outras pesquisas. Viikari (1984) obteve 2,0% da sacarose convertidos em levana. Carlos (1991) fez ensaios de fermentação conduzidos em processo de batelada utilizando seis linhagens de *Zymomonas mobilis* (AG11, CP4, P4, Z-1-81, Z-1-87 e Z-1-88) e verificou que a melhor linhagem produtora de levana precipitável foi a Z-1-81, por apresentar maior capacidade de conversão de substrato a levana, formando 3,7 g/L de levana (expressa como frutose).

Em sua pesquisa, Bofo (2009) fez fermentações submersas em diferentes valores de pH inicial (5,0; 6,0 e 7,0) para as determinações dos melhores parâmetros para produção de levana. A temperatura de fermentação, concentração de sacarose, velocidade de agitação e inóculo adicionado foram fixados em 30 °C, 200 g/L, 200 rpm e 0,052 g de peso seco/L para todos os ensaios. A maior produção de biopolímero foi de apenas 0,29 g/L com 96 horas de cultivo, no meio de fermentação com pH inicial de 6,0 e final de 4,0, que correspondeu a apenas 0,15% de conversão de sacarose em levana. Os maiores rendimentos do produto foram obtidos após 6 horas de fermentação nos meios com pH<sub>inicial</sub> de 5,0 e 6,0. Os maiores picos de produtividade para as três diferentes condições de fermentação foram em 6 horas de incubação. Após este período houve decréscimos da produtividade até o final da fermentação. As produtividades encontradas em 6 horas de fermentação nos meios com pH<sub>inicial</sub> de 6,0 e 7,0 foram praticamente as mesmas (0,018 g/L.h e 0,017 g/L.h, respectivamente) tendo ligeira diferença em relação ao meio com pH<sub>inicial</sub> de 5,0 (0,013

g/L.h). Maior quantidade de levana foi produzida pela reação do extrato enzimático bruto e sacarose (7,92 mg/ml) obtida em meio reacional com 400 g/L de sacarose, temperatura de 20 °C, 24 horas de reação em pH 4,0, o que correspondeu a 1,8% de conversão de substrato inicial em levana.

Ernandes (2009) estudou a produção de levana através de diferentes fontes de carbono (meio sintético, caldo de cana-de-açúcar, melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade (HTM) e melaço de cana-de-açúcar em fermentação submersa a 200 rpm, por 24 horas e com controle de temperatura. Avaliou a influência das variáveis pH do meio de cultivo, temperatura (°C), concentração de KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> e sacarose ou Teor de Sólidos Totais, para a produção de levana, etanol e sorbitol. Encontrou como o melhor parâmetro fermentativo para síntese de levana o meio sintético composto de sacarose 250,0 g/L (40 °C; pH 4,0; KCl 18,0 g/L; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18,0 g/L; MgSO<sub>4</sub> 5,0 g/L; CaCl<sub>2</sub> 11,0 g/L; a 200 rpm por 24 horas) com produção de 4,5 g/L do FOS, correspondendo a 1,8% de conversão de substrato inicial. Posteriormente, utilizou esse experimento para reação do extrato enzimático bruto com meio de fermentação em condições idênticas, a fim de produzir levana, onde 2,9% da sacarose inicial foi utilizada para a produção do biopolímero levana (7,30 g/L), correspondendo a um aumento de 62% na produção do biopolímero, sendo que o restante do substrato pode ter sido convertido em outros compostos e fonte de C e N para o crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Conforme relatado por Belaich e Senez (1965), vários constituintes são utilizados não somente como fontes de energia para o desenvolvimento de *Z. mobilis*, mas também como blocos construtivos para biossíntese de levana.

As concentrações de levana obtidas nesta pesquisa são próximas às obtidas por Rogers et al. (1982) que observaram conversão de aproximadamente 10% da sacarose por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821, assim como Dawes et al. (1966), que utilizando os extratos brutos produzidos por *Zymomonas mobilis* e observaram que cerca de 10% da sacarose foi convertida em levana e o restante foi hidrolisado, com a formação de glicose e frutose.

Entretanto, estes resultados foram inferiores ao relatados por Ammar et al. (2002), que alcançaram 200 g/L utilizando a enzima levanasacarase termoestável de *Bacillus sp*

TH4-2 em solução de sacarose 36%, temperatura de reação de 50°C, após de 24 horas de reação, obtendo conversão de 55,6% de conversão de substrato inicial.

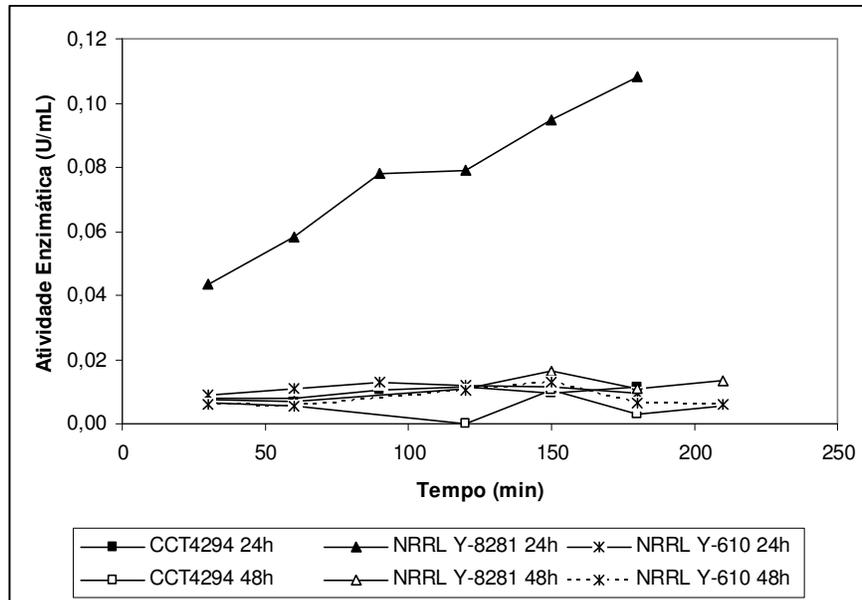
## 4.2 Hidrólise de Levana

### 4.2.1 Seleção de Micro-organismos

Como descrito na metodologia, foram utilizadas 3 linhagens da espécie *Kluyveromyces marxianus* para estudar a produção de frutana  $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F). Os resultados estão apresentados na Tabela 4-7 e Figuras 4-4, podendo-se visualizar a atividade enzimática em função do tempo. A Figura 4-4 ilustra a produção de F $\beta$ F pelas linhagens *Kluyveromyces marxianus* CCT4294, NRRL Y-8281 e NRRL Y-610, em meio de cultivo sintético. Amostras foram retiradas em 24 e 48 horas de fermentação.

**Tabela 4-7:** Atividade enzimática (U/mL) de frutana  $\beta$ -frutosidase para hidrólise de levana com linhagens de *Kluyveromyces marxianus*.

Tempo (min)	Atividade Enzimática (U/mL)					
	CCT4294		NRRL Y-8281		NRRL Y-610	
	24 h	48h	24 h	48h	24 h	48h
30	0,008	0,006	0,043	0,007	0,009	0,006
60	0,008	0,005	0,058	0,007	0,011	0,006
90	0,010		0,078		0,013	
120	0,011	0,000	0,079	0,011	0,012	0,010
150	0,010	0,011	0,095	0,017	0,011	0,013
180	0,011	0,003	0,108	0,011	0,010	0,007
210		0,006		0,013		0,006



**Figura 4-4:** Atividade enzimática (U/mL) de frutana  $\beta$ -frutosidase para hidrólise de levana com linhagens de *Kluyveromyces*.

Foi verificado que para as 3 linhagens testadas não houve variação na produção de enzima, exceto pelo tempo de 24 horas de fermentação quando utilizada *K. marxianus* NRRL Y-8281. Assim, dentre os 3 micro-organismos testados foi selecionada a linhagem NRRL Y-8281 para ser utilizada nos estudos de otimização.

#### 4.2.2 Otimização do Meio de Fermentação para Produção de Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F)

##### 4.2.2.1 Delineamento Plackett-Burman (PB12)

O primeiro delineamento utilizado para estudo com o micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 foi feito para obter resultados preliminares da atividade enzimática e avaliar a influência das variáveis estudadas (temperatura, pH<sub>inicial</sub>, concentrações iniciais de levana, extrato de levedura e peptona). As variáveis utilizadas no delineamento, os seus níveis reais e codificados e a matriz dos ensaios realizados foram apresentados na Tabela 3-5. Na Tabela 4-8 são mostrados os valores de pH, crescimento celular, atividade enzimática e consumo de levana após 24 horas de fermentação.

**Tabela 4-8:** Resultados obtidos no PB12 para hidrólise de levana com frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 após 24h de cultivo.

Ensaio	pH	Cresc. celular	Atividade (U/mL)	Consumo Levana (%)
1	3,63	1,79	0,0672	58,9
2	8,33	4,19	-	4,0
3	6,9	8,77	0,0213	9,9
4	5,38	4,73	0,1370	86,0
5	8,33	2,57	0,0001	2,9
6	8,15	2,31	-	22,0
7	7,62	8,23	0,0229	15,6
8	3,4	15,59	0,1648	75,5
9	3,23	1,13	0,0161	20,4
10	3,48	3,11	0,0691	62,8
11	7,16	7,89	0,0034	8,9
12	3,35	12,27	0,0871	61,4
13 (C)	6,59	4,27	0,0709	70,4
14 (C)	6,59	5,80	0,0755	61,2
15 (C)	6,68	5,84	0,0704	70,4
16 (C)	6,65	5,37	0,0690	72,1

O maior resultado de crescimento celular após 24 horas de cultivo foi de 15,6 vezes em relação ao apresentado no tempo zero hora, obtido no ensaio 8 sob condições de temperatura de 25 °C; pH<sub>inicial</sub> 3,5; levana 5,0 g/L; extrato de levedura 5,0 g/L e peptona 5,0 g/L. O maior consumo de levana foi de 86%, observado no ensaio 4 sob temperatura de 37 °C; pH<sub>inicial</sub> 3,5; levana 5,0 g/L; extrato de levedura 5,0 g/L e peptona 1,0 g/L.

Verificou-se que, de acordo com a composição do meio de cultivo e as condições de pH e temperatura, as atividades enzimáticas de F $\beta$ F variam de 0,1 (ensaio 5) a 164,8 mU/mL (ensaio 8). Os melhores valores foram obtidos sob condições do ensaio 8 e ensaio 4 com atividade 0,165 U/mL e 0,137 U/mL respectivamente, o que corresponde a atividade 20% maior no ensaio 8 em relação ao ensaio 4.

Pode-se constatar que os ensaios que apresentaram valores de atividade enzimática maiores que as obtidas nos pontos centrais foram os ensaios 4, 8 e 12, todos estes conduzidos nas condições de nível mínimo de pH inicial e nível máximo de concentração inicial de levana, diferenciando entre esses ensaios a temperatura de fermentação, concentração inicial de extrato de levedura e peptona.

Na Tabela 4-9 estão listados os valores dos efeitos de cada variável, bem como o desvio padrão, o valor de t e o nível de significância p.

**Tabela 4-9:** Estimativa dos efeitos para atividade enzimática obtida no PB12 de hidrólise de levana com frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 após 24h de cultivo.

Parâmetros	Efeito (g/L)	Desvio Padrão	t (10)	p-valor
Média *	0,054	0,01	6,28	0,0001
Temperatura (°C)	-0,002	0,02	-0,12	0,9058
pH <sub>inicial</sub> *	-0,088	0,02	-4,46	0,0012
Concentração de Levana (g/L) *	0,038	0,02	1,91	0,0849
Extrato de Levedura (g/L)	0,020	0,02	1,00	0,3411
Peptona (g/L)	-0,010	0,02	-0,53	0,6069

\* fatores estatisticamente significativos (90% de confiança).

Nessas faixas de valores estudados, a concentração inicial de levana e pH inicial apresentaram efeito significativo na atividade enzimática com nível de confiança de 90%. As outras variáveis não apresentaram efeitos significativos.

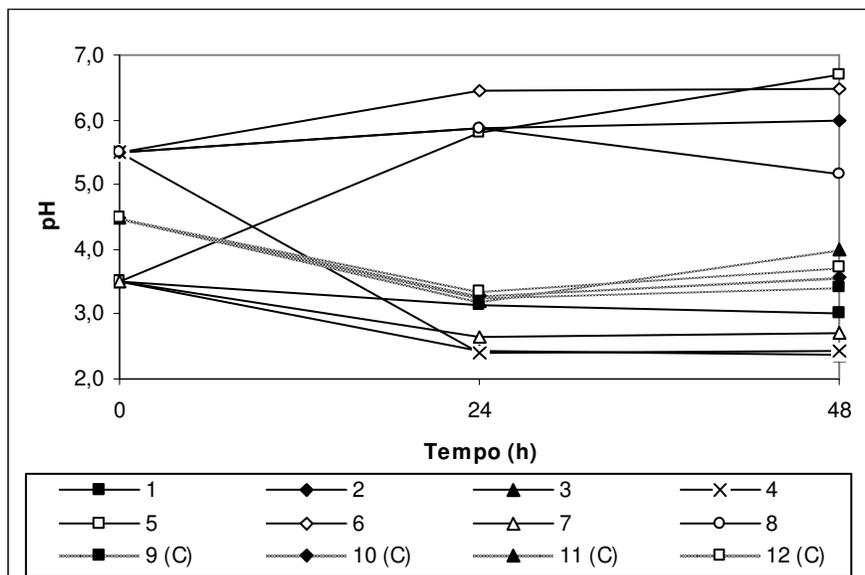
A concentração de levana teve efeito positivo sobre a atividade enzimática, já o efeito pH inicial foi negativo, o que mostrou que para aumentar a atividade devemos aumentar a concentração inicial de levana e diminuir o pH inicial do meio. A variável de maior influência foi o pH inicial. Para o próximo delineamento experimental a faixa de pH foi ajustada para valores inferiores. Da mesma forma, a faixa de concentração inicial de levana foi ajustada para valores superiores. Extrato de levedura e peptona, apesar de não terem sido significativos na faixa estudada, estavam presentes em nível máximo nos dois melhores ensaios, foram então ajustadas as faixas de valores e usando como nível inferior a ausência destes. A temperatura não apresentou efeito significativo e foi fixada em 30 °C.

#### 4.2.2.2 Delineamento Fatorial Fracionário (FF) $2^{4-1}$

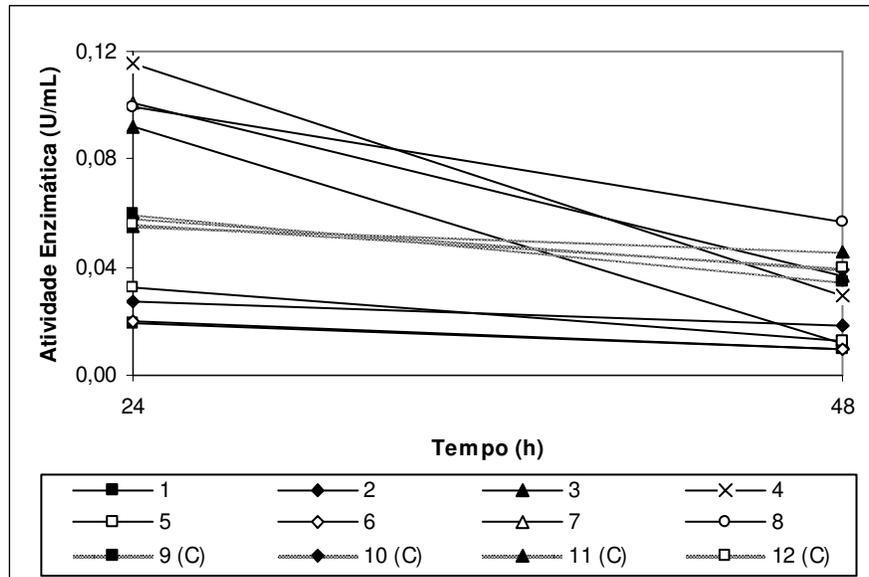
Os resultados do planejamento Fatorial Fracionário (FF)  $2^{4-1}$ , tendo como variáveis pH<sub>inicial</sub>, concentração inicial de levana, extrato de levedura e peptona e, como resposta, atividade enzimática da frutana  $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) em 24 e 46 horas de fermentação, estão apresentados na Tabela 4-10 e Figuras 4-5 e 4-6.

**Tabela 4-10:** Valores de pH e atividade enzimática (U/mL) obtidos no FF 2<sup>4-1</sup> para hidrólise de levana com frutana β-frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 com 24 e 46 horas de cultivo.

Ensaio	pH		Atividade Enzimática (U/mL)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
1	3,12	3,01	0,0191	0,0096
2	5,85	5,99	0,0269	0,0184
3	2,44	2,38	0,0923	0,0121
4	2,41	2,44	0,1154	0,0295
5	5,79	6,70	0,0324	0,0128
6	6,44	6,48	0,0201	0,0094
7	2,64	2,71	0,1010	0,0368
8	5,86	5,17	0,0992	0,0570
9 (C)	3,26	3,40	0,0598	0,0344
10 (C)	3,28	3,57	0,0579	0,0388
11 (C)	3,21	3,98	0,0555	0,0460
12 (C)	3,36	3,71	0,0557	0,0398



**Figura 4-5:** Valores de pH obtidos no FF 2<sup>4-1</sup> para hidrólise de levana com frutana β-frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 com 24 e 46 horas de cultivo.



**Figura 4-6:** Atividade enzimática obtida no FF 2<sup>4-1</sup> para hidrólise de levana com frutana β-frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 com 24 e 46 horas de cultivo.

Os melhores resultados de atividade enzimática de FβF foram obtidos com 24 horas de fermentação. Sua variação foi de 19 (ensaio 1) a 115 mU/mL (ensaio 4) em 24 horas e de 9,4 (ensaio 6) a 57,0 mU/mL (ensaio 8) com 46 horas, conforme a condição do meio de cultivo. As melhores atividades foram obtidas nas condições de maior concentração inicial de levana. A partir destes resultados foram calculados os efeitos das variáveis para a atividade enzimática da FβF de *K. marxianus* NRRL Y-8281 no planejamento FF 2<sup>4-1</sup> com 24 horas de fermentação, apresentados na Tabela 4-11.

**Tabela 4-11:** Estimativa dos efeitos para atividade enzimática obtida no FF 2<sup>4-1</sup> para hidrólise de levana com frutana β-frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 com 24 horas de cultivo.

Parâmetros	Efeito (g/L)	Desvio Padrão	t (7)	p-valor
Média *	0,062169	0,002509	24,78127	0,000000
pH	0,004407	0,006145	0,71716	0,496501
Conc Levana (g/L) *	0,080233	0,006145	13,05646	0,000004
Ext Levedura (g/L)	-0,000277	0,006145	-0,04508	0,965304
Peptona (g/L)	-0,001259	0,006145	-0,20490	0,843478

\* fatores estatisticamente significativos (90% de confiança).

Com 24 horas de cultivo, apenas a concentração inicial de levana apresentou efeito significativo na atividade enzimática com nível de confiança de 90%, no entanto o pH não

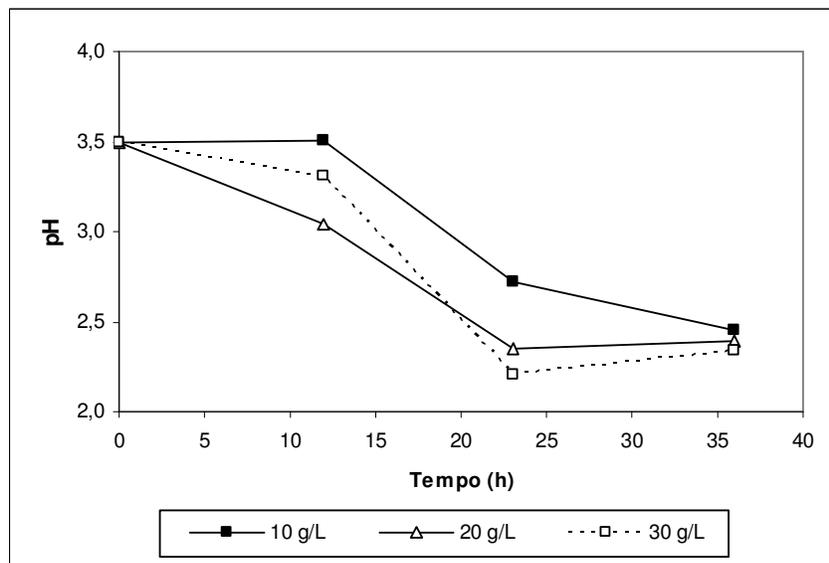
foi estatisticamente significativo e foi fixado em 3,5. A temperatura foi fixada em 25 °C onde foi observada melhor atividade. O aumento da concentração do extrato de levedura (de 0 a 5 g/L) e peptona (de 0 a 3 g/L) apresentou efeito não significativos (a 10% de significância) na faixa estudada e foram retiradas do próximo delineamento.

#### 4.2.2.3 Delineamento para Estudo da Concentração de Levana

Foi feito um estudo com pH<sub>inicial</sub> fixado em 3,5 e temperatura em 25 °C; sem extrato de levedura e peptona, variando a concentração inicial de levana de 10 a 30 g/L e tempo de fermentação de 35 horas com amostras retiradas em 12, 23 e 35 horas de cultivo. O pH decaiu durante a fermentação, como pode-se observar na Tabela 4-12 e Figura 4-7.

**Tabela 4-12:** Valores de pH obtidos na hidrólise de diferentes concentrações de levana pela enzima frutana β-frutossidase de *K. marxianus* NRRL Y-8281 com 12, 23 e 35 horas de cultivo

Ensaio	pH			
	0 h	12 h	23 h	35 h
10g/L	3,5	3,51	2,72	2,45
20 g/L	3,5	3,04	2,35	2,39
30 g/L	3,5	3,31	2,21	2,34

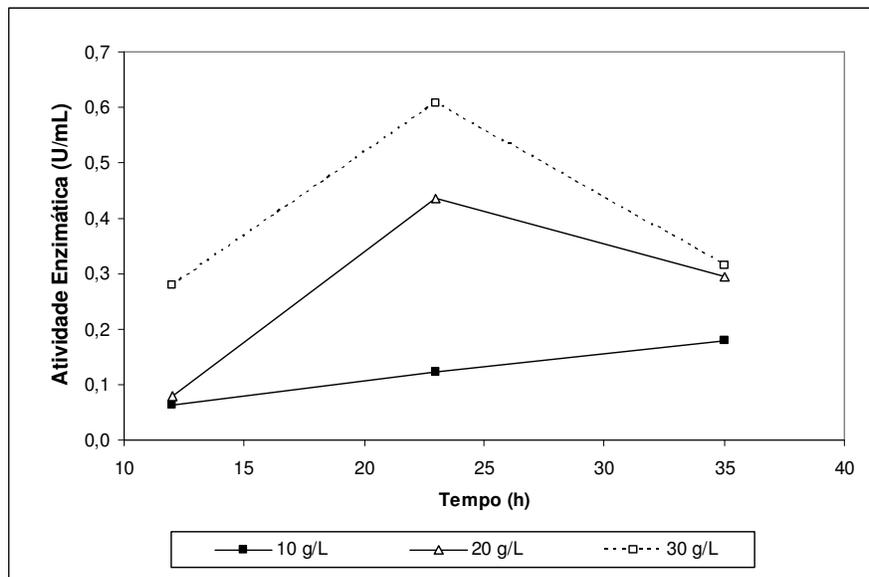


**Figura 4-7:** Valores de pH obtidos para hidrólise de levana com frutana β-frutossidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 com 12, 23 e 35 horas de cultivo.

Na Tabela 4-13 estão apresentados os resultados de atividade enzimática de F $\beta$ F para as concentrações iniciais de 10, 20 e 30 g/L, assim como a produtividade em relação ao substrato inicial e tempo de cultivo.

**Tabela 4-13:** Atividade enzimática obtida para hidrólise de levana com frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 com 12, 23 e 35 horas de cultivo.

Conc. Levana (g/L)	Atividade (U/mL)			Ativ/S <sub>i</sub> (U.mL <sup>-1</sup> /g.mL <sup>-1</sup> )			Ativ/tempo (U.mL <sup>-1</sup> /h)		
	12 h	23 h	35 h	12 h	23 h	35 h	12 h	23 h	35 h
10 g/L	0,064	0,123	0,179	0,643	1,235	1,786	0,005	0,005	0,005
20 g/L	0,079	0,435	0,294	0,394	2,173	1,471	0,007	0,019	0,008
30 g/L	0,279	0,607	0,315	0,929	2,025	1,051	0,023	0,026	0,009



**Figura 4-8:** Atividade enzimática (U/mL) para hidrólise de levana com frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 com 12, 23 e 35 horas de cultivo.

Avaliando-se a Figura 4-8 pode-se constatar que as maiores atividades foram observadas com 23 horas de fermentação e a melhor atividade foi 607 mU/mL na concentração inicial de levana de 30 g/L. Enquanto que no experimento de seleção obteve-se 43,5 mU/mL a partir da concentração inicial de levana de 5 g/L com *K. marxianus*

NRRL Y-8281. Correspondendo a uma atividade enzimática 14 vezes maior em relação ao primeiro experimento, com concentração inicial de levana apenas 6 vezes maior.

Em termos de atividade enzimática em relação à concentração inicial de substrato, a melhor condição foi  $2,17 \text{ U.mL}^{-1}/\text{g.mL}^{-1}$ , obtida com 23 horas de cultivo com concentração de levana de 20 g/L, contra  $2,03 \text{ U.mL}^{-1}/\text{g.mL}^{-1}$  com concentração de 30 g/L. Já a atividade em termos do tempo, os resultados com concentração inicial de levana de 30 g/L foram melhores, obtendo-se 0,023 e 0,026  $\text{U.mL}^{-1}/\text{h}$  para 12 e 23 horas respectivamente, e 0,019  $\text{U.mL}^{-1}/\text{h}$  com 23 horas de cultivo com 20 g/L.

Para a condição de concentração inicial de 30 g/L de levana, a Equação (04) foi obtida, e corresponde a máxima atividade a 23,4 horas de fermentação.

$$\text{Ativ} = -0,0024 * t^2 + 0,1124 * t - 0,7304 \quad (04)$$

Burne et al. (1987) estudaram a purificação, caracterização e expressão do gene de fructanase de *Streptococcus mutans* GS-5 em *Escherichia coli*. Antes da purificação da enzima de *E. coli* JM83 (pFRU1) observaram atividade de 11,3 U, correspondendo a 0,654 U/mg de proteína e após purificação, de 324,6 vezes, obtiveram atividade de 0,961 U, 204,5 U/mg de proteína. Para purificação da enzima do sobrenadante de *S. mutans* GS-5 com baixa taxa de crescimento, observaram atividade de 4,102 U, equivalente a 0,68 U/mg de proteína, e após purificação de 97,5 vezes obtiveram atividade de 0,093 U, 66,4 U/mg de proteína. Apresentaram perfis de atividade da enzima frutana hidrolase da *Escherichia coli* clonada e purificada do sobrenadante de *Streptococcus mutans* GS-5 com baixa taxa de crescimento.

Takahashi, Mizuni e Takamori (1985) purificaram e caracterizaram a F $\beta$ F de *Streptococcus salivarius* KTA-19. No caldo bruto com 8,6 g de proteínas totais observaram atividade de  $3,354 \cdot 10^3$  U, que corresponde a 0,39 U/mg de proteína.

Kato et al. (1999) purificaram e estudaram as propriedades de uma F $\beta$ F termolítica e termoestável de *Bacillus stearothermophilus* KP1289. No caldo de cultura obtiveram atividade de 10.000 U, equivalente a 0,7 U/mg de proteína e na preparação final da purificação da exo-enzima conseguiram 240 U, correspondente a 92 U/mg de proteína, utilizando inulina como substrato.

Roover et al. (1999) purificaram a enzima de raízes de chicória e a caracterizaram. Para 1 Kg de raízes de chicória, encontraram no extrato bruto com 602 mg de proteína atividade de 446 nkat, correspondente a 0,74 nkat/mg de proteína, utilizando inulina como substrato. Após purificação de 70 vezes, com 0,05 mg de proteína, obtiveram atividade de 2,6 nkat e 52,1 nkat/mg de proteína.

#### **4.3 Caracterização Parcial da Frutana $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281**

A partir da enzima F $\beta$ F do caldo bruto obtido pela fermentação do micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 em meio otimizado, foram determinados para a caracterização da enzima sobre a levana: o perfil de temperatura e pH na reação enzimática, a estabilidade térmica e de pH, e os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ . Resultados que podem ser úteis para os trabalhos futuros em processo de produção de frutose utilizando esta enzima.

##### **4.3.1 Perfil de Temperatura e pH**

Para a determinação do perfil de temperatura e pH, foi feito um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com duas variáveis independentes (temperatura e pH) com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais. Na Tabela 4-14 foi apresentada a matriz do DCCR com as respostas da atividade enzimática da F $\beta$ F de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 sobre a levana.

**Tabela 4-14:** Matriz do DCCR 2<sup>2</sup>, com seus níveis reais e codificados (entre parênteses) para estudo do efeito da temperatura e pH, e respostas de atividade enzimática de frutana β-frutosidase.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)
1	2,6 (-1)	35,9 (-1)	-
2	5,4 (1)	35,9 (-1)	0,780
3	2,6 (-1)	64,1 (1)	-
4	5,4 (1)	64,1 (1)	0,312
5	2,0 (-1.41)	50 (0)	-
6	6,0 (1.41)	50 (0)	0,289
7	4,0 (0)	30 (-1.41)	0,276
8	4,0 (0)	70 (1.41)	0,431
9 (C)	4,0 (0)	50 (0)	0,510
10 (C)	4,0 (0)	50 (0)	0,476
11 (C)	4,0 (0)	50 (0)	0,483

Avaliando-se a Tabela 4-14 pode-se constatar que os valores de atividade enzimática variaram de 0 a 0,510 U/mL. A análise dos efeitos das variáveis estudadas e as interações entre elas foram feitas e verificou-se que o parâmetro temperatura linear e a interação de pH e temperatura não foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância. Estas variáveis não significativas foram ignoradas e foi possível construir a Tabela 4-9 que apresenta os coeficientes de regressão para a atividade da FβF do micro-organismo *K. marxianus* NRRL Y-8281.

Na Tabela 4-15 os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos associados à letra Q. Verifica-se que todos os coeficientes de regressão obtidos foram altamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 4-15:** Coeficientes de regressão para a respostas de atividade enzimática de frutana β-frutosidase obtida de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 sobre a levana.

Parâmetros	Coeficientes de			
	Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor
Média	0,489842	0,050939	9,61618	0,000028
pH (L)	0,112395	0,031194	3,60310	0,008704
pH (Q)	-0,204258	0,037128	-5,50144	0,000905
Temperatura (Q)	-0,099769	0,037128	-2,68716	0,031214

\* nível de significância ( $p \leq 0,05$ ).

Para verificar a validade dos coeficientes e construção do modelo foi feita a análise de variância (ANOVA) conforme a Tabela 4-16. Verifica-se que o F calculado ( $F_{calc}$ ) para a regressão de 14,83 foi 3,41 vezes maior que o F tabelado ( $F_{tab}$ ), 4,35, sendo significativo. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi 86,5%. Pode-se então concluir que o modelo se ajusta aos dados experimentais.

**Tabela 4-16:** Análise de Variância (ANOVA) para a atividade de frutana  $\beta$ -frutosidase sobre a levana.

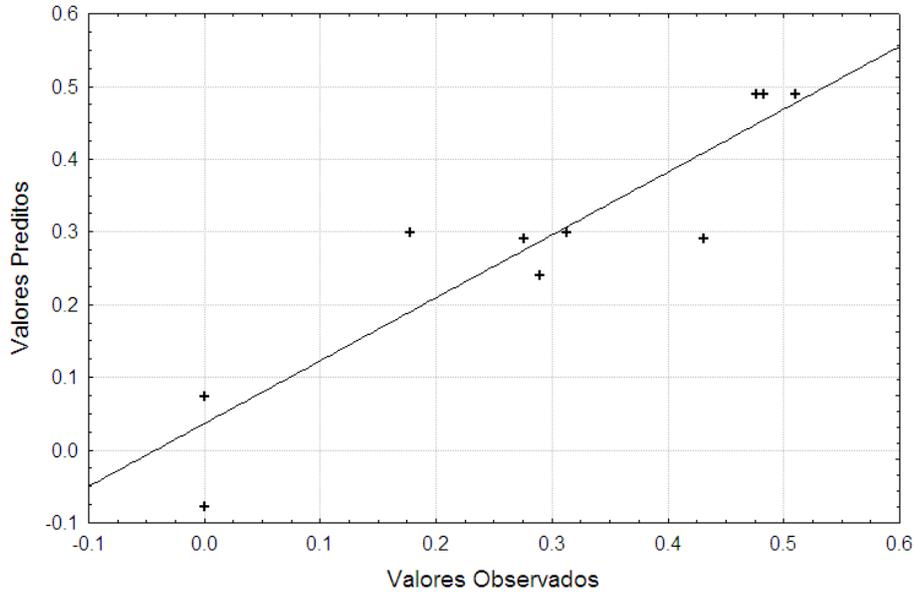
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{calc}$
Regressão	0,346404	3	0,115468	14,83
Resíduo	0,054491	7	0,007784	
Total	0,400895	10		

$$R^2 = 86,5; F_{Tab\ Reg / Res} (3; 7; 0,05) = 4,35$$

O modelo com as variáveis codificadas, para estimar a atividade da enzima F $\beta$ F (U/mL) do o micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 sobre a levana em função de temperatura e pH na faixa estudada, é colocado a seguir:

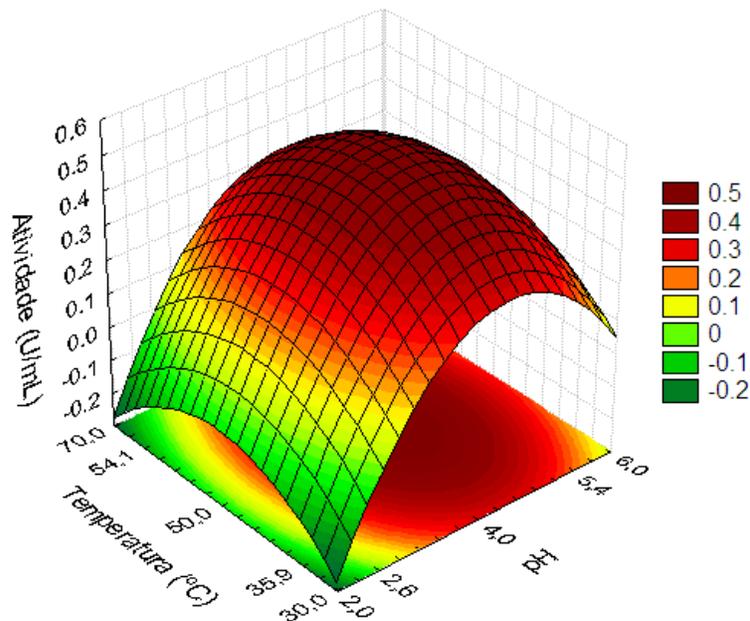
$$Atividade = 0,4898 + 0,1124pH - 0,2043pH^2 - 0,0998Temperatura^2 \quad (05)$$

Através do modelo descrito foi possível calcular os valores previstos pelo e comparar com os valores experimentais conforme Figura4-9.

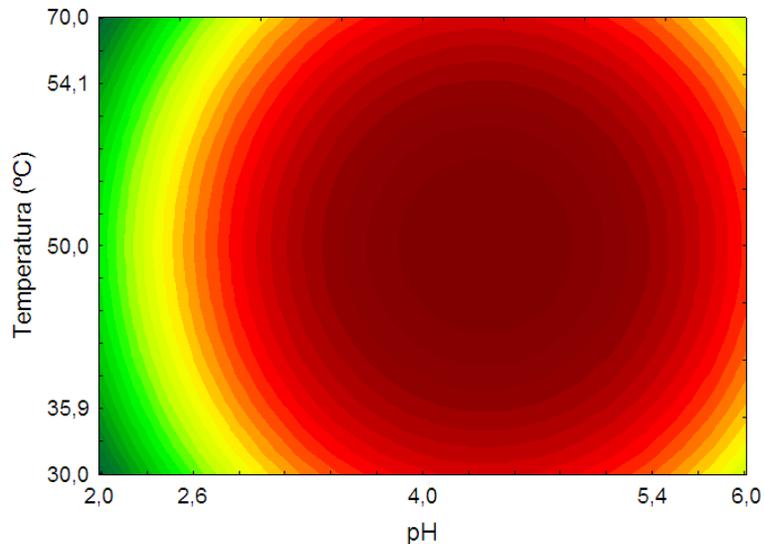


**Figura 4-9:** Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo.

Com o modelo definido e validado, foi possível gerar a superfície de resposta e curvas de contorno para as variáveis estudadas (Figuras 4-10 e 4-11) e obter as melhores condições de temperatura e pH na reação enzimática da F $\beta$ F do micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281, o que resultam em maior atividade enzimática.



**Figura 4-10:** Superfície de resposta para a atividade de frutana  $\beta$ -frutosidase em função do pH e temperatura da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.



**Figura 4-11:** Curva de contorno para a atividade de frutana  $\beta$ -frutosidase em função do pH e temperatura da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Foi possível verificar através da superfície de resposta e curvas de contorno que as faixas de temperatura e de pH obtidas como ótimas foram bastante amplas, o que possibilita a escolha de determinado ponto como ótimo de acordo com a necessidade e viabilidade do processo. Para a variável temperatura, a faixa ótima encontrada foi de 45 a 55 °C e para o pH foi de 4,0 a 5,0.

Analisando a equação, escolhemos a temperatura de 50 °C e pH 4,4 como ótimos para a reação enzimática da F $\beta$ F do micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Esta faixa de temperatura esta de acordo aos registrados por Takahashi, Mizuno e Takamori (1985), que caracterizaram frutosidase de *Streptococcus salivarius* KTA-19 e encontraram pH ótimo de 7,0 e temperatura ótima de 50 °C, mesma temperatura encontrada neste estudo. Burne et al. (1987) caracterizaram a enzima obtida na expressão do gene de fructanase de *Streptococcus mutans* GS-5 em *Escherichia coli*. Estudaram as condições ótimas de pH na reação enzimática para levana, inulina e sacarose nas faixas de 4,0 a 8,0, registrando pH ótimo de aproximadamente 5,5 sobre as frutanas, com quantidade significativa de atividade mantendo-se em pH 4,0. O pH ótimo para a degradação de sacarose foi mais amplo e mais baixo, com um pico em cerca de 4,5.

Já Kato et al. (1999) utilizaram a inulina como substrato para a frutosidase de *Bacillus stearothermophilus* KP1289. Essa inulinase termoestável teve atividade entre 30 e

70 °C e pH de 4,5 a 8,6, com ótimo a 60 °C e pH 6,1. Em relação ao pH ótimo, Pessoa e Vitolo (1999) caracterizaram a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* e encontraram o valor de 5,0. Um resultado similar foi obtido por Xião et al. (1989), sendo que a temperatura ótima para a inulinase foi de 55 °C. Manzoni e Cavazzoni (1988) estudaram a caracterização de inulinase de quatro leveduras (*Candida kefir*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces cicerisporus* e *Kluyveromyces fragilis*) e encontraram pH ótimo de 4,7 e uma temperatura ótima de 60 °C para todas as leveduras estudadas. Barthomeuf et al. (1991) estudaram a inulinase de *Penicillium rugulosum*, encontrando pH ótimo entre 5,5 e 5,6. Para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 foi encontrado pH e temperatura ótima de 5,0 e de 50 °C, respectivamente (CRUZ-GUERRERO et al.,1995). Para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a máxima atividade obtida foi no pH 4,0 (ROUWENHORST et al.,1988). A máxima atividade obtida por Santos (2002) para a enzima inulinase livre de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 foi obtida em pH 4,8 e temperatura de 63 °C. Na caracterização parcial de inulinase livre purificada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-7571, Treichel (2004) concluiu que em relação à temperatura e pH ótimos os valores são 4,5 e 55 °C, respectivamente.

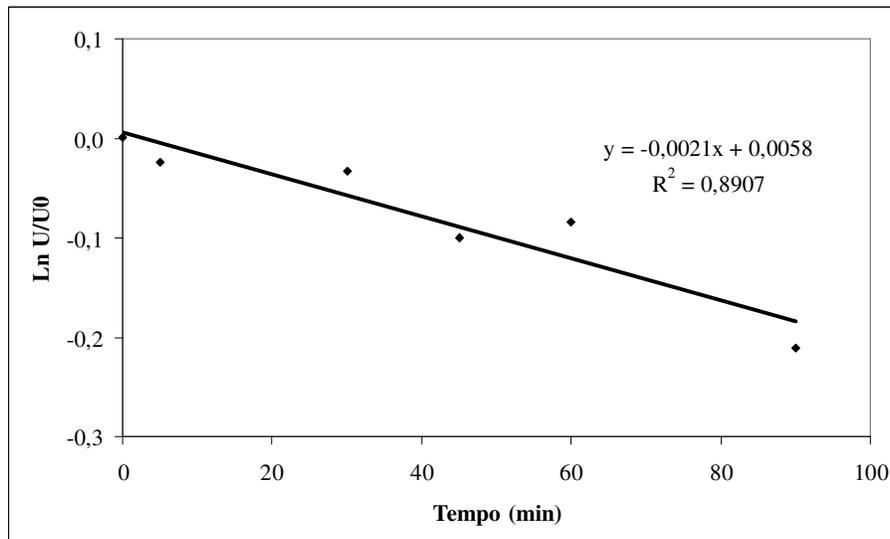
Ainda utilizando inulina como substrato, Roover et al. (1999) encontraram para frutossidase purificada de raízes de chicória pH ótimo entre 5,0 e 5,5 e temperatura ótima próxima de 35 °C e registram atividade de 90% a 45 °C em relação à obtida a 35 °C, enquanto que a atividade a 60 °C foi reduzida em aproximadamente 80%.

#### 4.3.2 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da FβF do micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 foi estudada através da determinação do tempo de meia vida da enzima. De cada solução incubada foram retiradas amostras em intervalos de tempo predeterminados e determinou-se as constantes de desnaturação ( $K_d$ ), meia vida ( $t_{1/2}$ ) e energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) em função das temperaturas analisadas. Levando-se em consideração que em altas temperaturas a desnaturação da enzima é importante e que a cinética de desnaturação é de primeira ordem.

O caldo fermentado foi incubado em tampão acetato 0,1 M pH 5,5 em diferentes temperaturas: 40, 50, 60, 70, 80 °C. A cada tempo pré-determinado foram retiradas amostras e determinadas a atividade enzimática (U) e atividade relativa ( $U/U_0$ ) da enzima. Os resultados obtidos com as incubações em diferentes temperaturas estão expressos nas Tabelas 7-1 a 7-5 (anexo). Estas mostram o decréscimo da atividade enzimática com o tempo, a diferentes temperaturas.

Foi graficado o logarítmico natural da atividade relativa ( $U/U_0$ ) em função do tempo para posterior determinação do valor  $K_d$  para cada temperatura estudada. Um exemplo do cálculo do  $K_d$  é mostrado através da Figura 4-14 para a temperatura de 60 °C.



**Figura 4-12:** Efeito da temperatura em função do tempo de incubação para a frutana  $\beta$ -frutosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281, para cálculo da constante de desnaturação ( $K_d$ ) na  $T= 60$  °C.

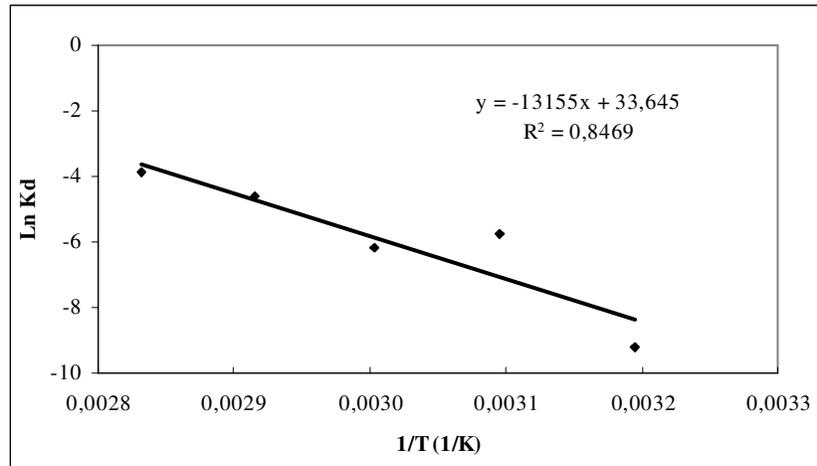
Através da Figura 4-11 foi possível calcular a constante de desnaturação para a temperatura de 60 °C, onde a inclinação da reta equivale ao valor de  $K_d = 0,0021 \text{ min}^{-1}$  conforme a Equação (01) citada no item 3.3.2.1. Com o valor de  $K_d$  foi possível calcular a meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) para a temperatura de 60 °C, através da Equação (02) do item 3.3.2.2, obtendo  $t_{1/2} = 330.1$  minutos ou 5,5 horas. Da mesma forma, foi calculado o  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para cada temperatura estudada.

Calculados os valores de  $K_d$  para cada temperatura estudada, foi possível construir a Tabela 4-17, que apresenta os valores de  $K_d$  e suas respectivas temperaturas e também o

logarítmico natural de  $K_d$  para posterior construção da Figura 4-13 e ,assim, ser possível calcular a energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da enzima através da metodologia de Arrhenius, conforme Equação (03) citada no item 3.3.2.3.

**Tabela 4-17:** Valores de  $K_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ) e suas respectivas temperaturas para a frutana  $\beta$ -frutosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	1/T (K <sup>-1</sup> )	$K_d$	Ln $K_d$
40	313	0,00319	0,0001	-9,2103
50	323	0,00310	0,0031	-5,7764
60	333	0,00300	0,0021	-6,1658
70	343	0,00292	0,0099	-4,6152
80	353	0,00283	0,0205	-3,8873



**Figura 4-13:** Linearização dos valores de  $K_d$  em função da temperatura (K) para o cálculo da energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) da frutana  $\beta$ -frutosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

A partir da Figura 4-13 foi possível calcular a energia de ativação de desnaturação ( $E_{ad}$ ) igualando a equação da reta ( $\text{Ln } K_d = 33,645 - 13155.1/T$ ) com a equação de Arrhenius ( $\text{Ln } K_d = \text{Ln } K - E_{ad}/RT$ ). Obtendo-se então  $E_{ad}/R = 13155$ , e multiplicando pela constante de gases ( $R = 1,98 \text{ cal/mol.K}$ ) obtemos  $E_{ad} = 26,05 \text{ Kcal/mol}$  ou  $109,05 \text{ KJ/mol}$  como valor de energia de ativação de desnaturação para frutana  $\beta$ -frutosidase do micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Também foi possível obter a equação final de Arrhenius. Para tanto, calculamos o valor de K (constante de Arrhenius) a partir de  $\text{Ln } K = 33,645$  e obtemos  $K = 4,091 \times 10^{14}$ .

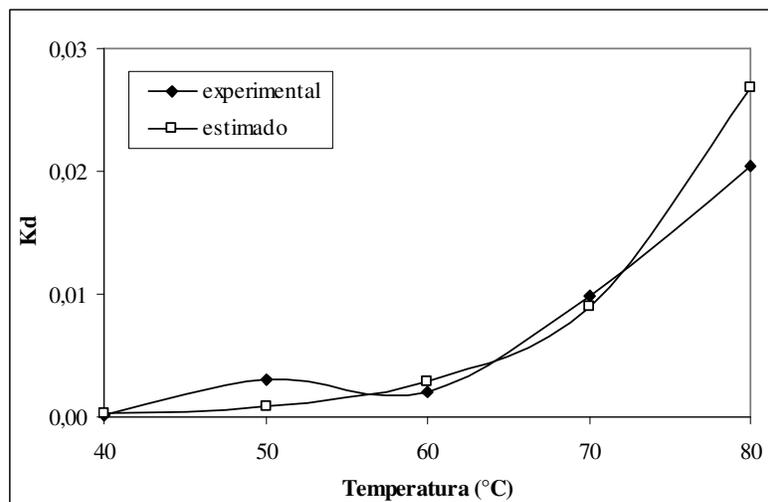
Desta forma, a expressão obtida para determinar os valores de  $K_d$  estimados está expressa na Equação (06) abaixo:

$$K_d = 4,091 \times 10^{14} \exp^{(-13155/T)} \quad (06)$$

A partir da Equação (06) foi possível estimar os valores de  $K_d$  e meia vida em função da temperatura conforme expresso na Tabela 4-18 e Figura 4-14.

**Tabela 4-18:** Valores experimentais e estimados da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas estudadas para frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Temperatura (°C)	$K_d$ Experimental ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ experimental (h)	$K_d$ estimado ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ estimado (h)
40	0,0001	115,52	0,0002	50,55
50	0,0031	3,73	0,0008	13,76
60	0,0021	5,50	0,0029	4,05
70	0,0099	1,17	0,0090	1,28
80	0,0205	0,56	0,0267	0,43



**Figura 4-14:** Comparação dos valores de  $K_d$  experimental com os estimados para frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Como pode-se verificar na Tabela 4-18, os valores de  $K_d$  e consequentemente  $t_{1/2}$  estimados pela Equação (06) não são iguais aos experimentais, porém próximos. Verifica-

se também que, à medida que se aumenta a temperatura, menor é a estabilidade da enzima. Assim, podemos dizer que a enzima proveniente da levedura é mais estável a baixas temperaturas, como a 40 °C, onde apresentou  $K_d = 1,00 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . E quando aumentada a temperatura para 50 °C a meia vida da F $\beta$ F cai consideravelmente.

A frutana F $\beta$ F deste micro-organismo mostrou-se bem mais estável que a de *Streptococcus salivarius* KTA-19, reportada por Takahashi, Mizuno e Takamori (1985) que, após aquecimento por 15 minutos e sob pH 7,0, reteve cerca de 80% da atividade até 55 °C, mas se tornou inativa acima de 60 °C. Também mostrou-se mais estável que a exohidrolase de *Bacillus stearothermophilus* KP1289, reportada por Kato et al. (1999), que registrou estabilidade até 60 °C por 10 minutos em pH 7,0 e um  $t_{1/2}$  de 10 minutos a 69 °C e pH 7,0.

Segundo Treichel (2004), a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-7571 mostrou maior estabilidade a 50 °C, com meia vida de 77 horas, e de 0,17 para 60 °C. Santos (2002) e Öngen-Baysel, Sukan, Vassilev (1994) também apresentaram a temperatura de 50 °C como a de maior estabilidade para a inulinase livre de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e *Aspergillus niger*, respectivamente.

Segundo Roover et al. (1999), que estudaram a inulinase isolada de raízes de chicória e avaliaram a sua estabilidade térmica entre 0 e 70 °C por 60 minutos, registram que temperaturas até 45 °C não afetaram a atividade, porém, a 60 °C 80% de atividade enzimática foi perdida. Catana et al. (2007) ressalta que incubar a enzima livre acima de 50 °C leva a perda bastante rápida da atividade catalítica, que é típico da maioria das enzimas, e que o aumento acentuado de estabilidade térmica foi obtido com a imobilização da enzima inulinase.

Os valores ótimos de atividade e estabilidade reportados na literatura, em geral, situam-se na faixa de 40°C e 60°C, demonstrando que a F $\beta$ F estudada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 está dentro da faixa ótima de estabilidade reportada pela literatura.

É importante salientar que as propriedades cinéticas e de estabilidade das enzimas podem variar simplesmente em função da origem, do meio de cultura utilizado ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo micro-organismo. Estas variações também dependem das condições do ensaio, como tempo de incubação, pH e temperatura, do

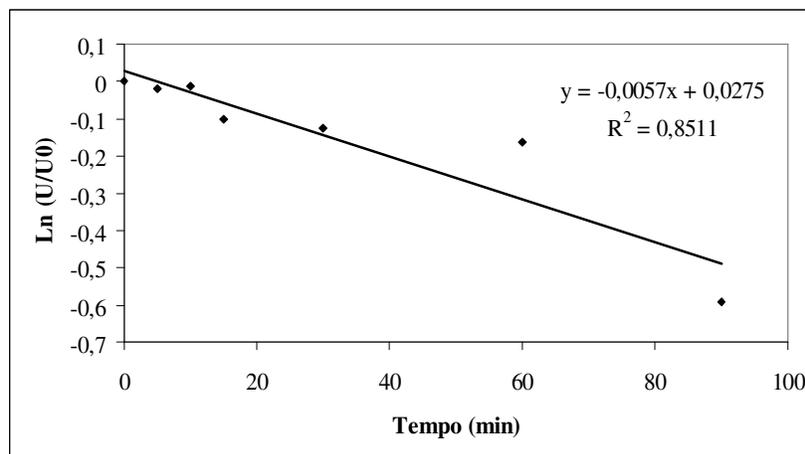
método e do substrato utilizado, tornando muitas vezes difícil a comparação (CARVALHO et al., 2005).

#### 4.3.3 Estabilidade de pH

A estabilidade de pH da F $\beta$ F proveniente do micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 foi estudada através da determinação da meia vida da enzima. De cada solução incubada foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados e determinou-se as constantes de desnaturação ( $K_d$ ) e meia vida ( $t_{1/2}$ ) em função dos pHs analisado.

O caldo fermentado foi incubado em sua temperatura ótima (50 °C) em diferentes valores de pH de tampão (3,0; 4,0; 5,5; 7,0; 8,0). A cada tempo pré-determinado foram retiradas amostras e determinadas a atividade exohidrolítica (U) e atividade relativa ( $U/U_0$ ) da enzima.

Os resultados obtidos com as incubações em diferentes pHs estão expressos nas Tabelas 7-6 a 7-10 (anexo). Graficou-se o logarítmico natural da atividade relativa ( $U/U_0$ ) em função do tempo para posterior determinação do valor  $K_d$  para cada pH estudado. Um exemplo do cálculo do  $K_d$  é mostrado através da Figura 4-15 para a o pH 3,0.



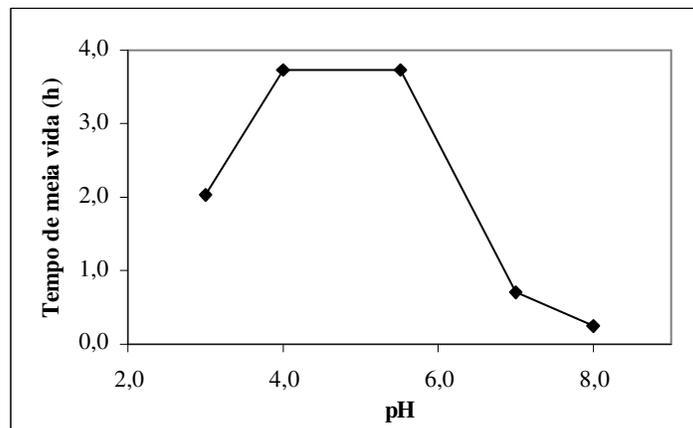
**Figura 4-15:** Efeito do pH em função do tempo de incubação para a frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 no pH 3,0.

Através da Figura 4-15 foi possível calcular a constante de desnaturação para o pH 3,0, onde a inclinação da reta equivale ao valor de  $K_d = 0,0057 \text{ min}^{-1}$ . Com o valor de  $K_d$  foi possível calcular o tempo de meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) para o pH 3,0, através da Equação (02) citada no item 3.3.2.2, obtendo  $t_{1/2} = 121,6$  minutos ou 2,03 horas. Da mesma forma foi calculado o  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para cada pH avaliado na enzima proveniente do micro-organismo *K. marxianus* NRRL Y-8281. Os resultados da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e meia vida ( $t_{1/2}$ ) dos diferentes pHs estudados (3,0; 4,0; 5,5; 7,0; 8,0) para a F $\beta$ F estão expressos na Tabela 4-19.

**Tabela 4-19:** Valores experimentais da constante de desnaturação ( $K_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) nos diferentes pHs estudados para a frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

pH	$K_d \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$
3,0	0,0057	2,027
4,0	0,0031	3,727
5,5	0,0031	3,727
7,0	0,0167	0,692
8,0	0,0484	0,239

O comportamento da meia vida em relação aos pHs estudados para a enzima pode ser melhor visualizado na Figura 4-16.



**Figura 4-16:** Meia vida de estabilidade de pH para a frutana  $\beta$ -frutosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

A análise dos resultados demonstra que a F $\beta$ F apresenta maior estabilidade na faixa de pH de 4,0 a 5,5. Takahashi, Mizuno e Takamori (1985) reportaram que, por 30 minutos

a 37 °C, a exohidrolase de *Streptococcus salivarius* KTA-19 foi mais estável em pH 7,0 mas gradualmente tornou-se inativa abaixo de pH 5,0, perdendo 80% da atividade em pH 4,5 e toda a atividade em pH 4,0. Kato et al. (1999) registraram estabilidade de pH da exohidrolase de *Bacillus stearothermophilus* KP1289 entre 4,2 e 10,4 por 15 horas a 27 °C, porém, 53% da enzima foi inativada em pH 6,1 após 15 horas a 55 °C.

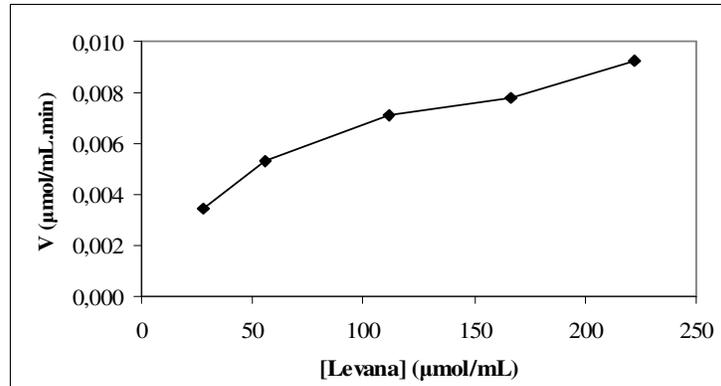
Treichel (2004) demonstra que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-7571 apresenta maior estabilidade em pH 4,4 e 4,8. Santos (2002) verificou que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* também apresentou maior estabilidade em valores de pH 4,4 e 4,8. A inulinase de *Penicillium* sp. TN-88 apresentou uma faixa de maior estabilidade em relação ao pH de pré-incubação entre 5,0 e 7,0 (Nakamura et al., 1997) e 5,0 e 6,0, em tampão citrato-fosfato para inulinase de *Aspergillus Níger* (ÖNGEN-BAYSEL; SUKAN; VASSILEV, 1994). Barthomeuf et al. (1991) encontraram para inulinase de *Penicillium rugulosus* uma maior estabilidade no intervalo de pH 4,0 até 6,5 com 24 horas de incubação.

#### 4.3.4 Determinação de $K_m$ e $v_{máx}$

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da Equação de Michaelis-Mentem ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ) para a F $\beta$ F, foi utilizada faixa de concentrações de 5,0 a 40,0 g/L de levana, em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 e a 50 °C, e medida a atividade enzimática. Os dados estão apresentados na Tabela 4-20 e Figura 4-17. Foi obtida cinética linear, assim como observado por Burne et al. (1987), mostrando que não houve inibição da reação pela frutose.

**Tabela 4-20:** Atividade enzimática em função da concentração de levana para a frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Levana (g/L)	Levana ( $\mu$ mol/mL)	Atividade ( $\mu$ mol/mL.min)
5	27,78	0,0035
10	55,56	0,0053
20	111,11	0,0071
30	166,67	0,0078
40	222,22	0,0093



**Figura 4-17:** Efeito da concentração do substrato levana na atividade da frutana β-frutosidase proveniente de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

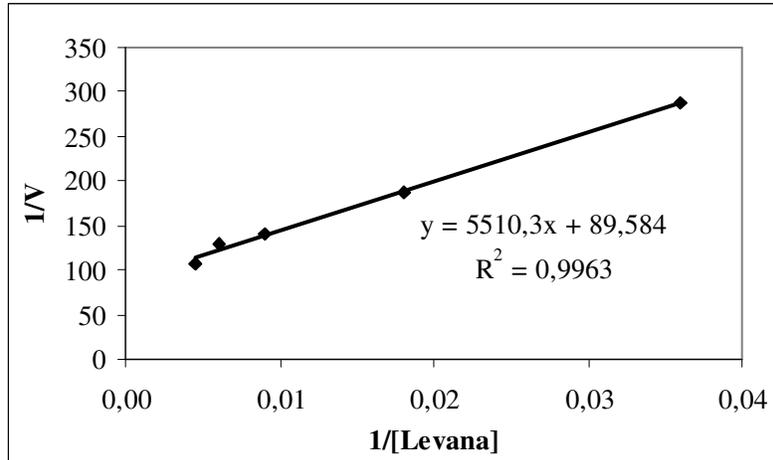
Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. Para a determinação dos parâmetros utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk, considerando a Equação (07):

$$v = \frac{v_{máx} [S]}{K_m + [S]} \quad (07)$$

Através da linearização, pelo método Lineweaver-Burk, temos a Equação (08):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{máx}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{máx}} \quad (08)$$

Graficando-se  $1/[S]$  versus  $1/v$ , conforme Figura 4-18, obtem-se  $K_m$  e  $V_{máx}$ .



**Figura 4-18:** Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{máx}$  para a frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

Pela equação do gráfico linearizado, obteve-se os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$ , que foram  $61,5 \mu\text{mol/mL}$  (equivalente a  $61,5 \text{ mM}$ ) e  $0,0112 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  respectivamente para o substrato levana.

Kato et al. (1999) também determinaram os parâmetros cinéticos pelo método Lineweaver-Burk, e obtiveram para a frutosidase de *Bacillus stearotherophilus* KP1289  $K_m$  de 80, 290 e 150 mM para inulina, sacarose e rafinose, respectivamente.

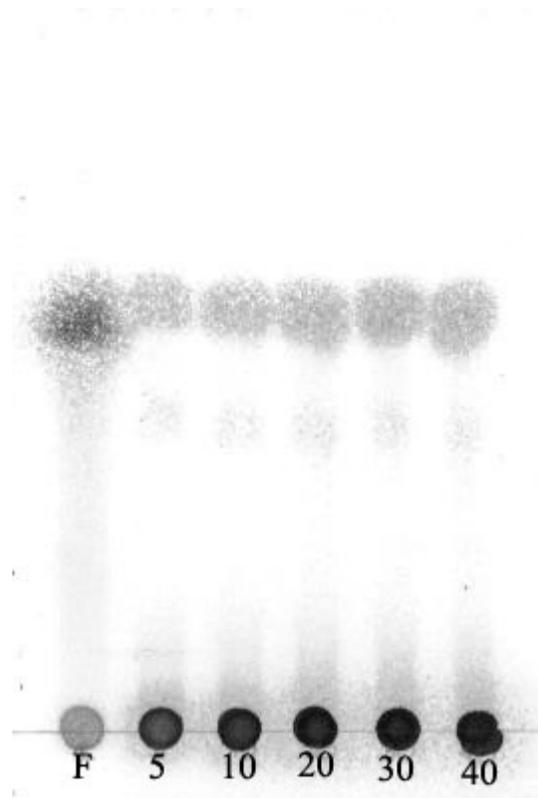
Segundo Roover et al. (1999), a inulinase purificada exibiu cinética hiperbólica de saturação com  $K_m$  de 58 mM na hidrólise de 1-kestose e  $K_m$  de 64 mM para 1,1-nistose. A enzima hidrolisa ligações  $\beta(2-1)$  em inulina, 1-kestose e 1,1-nistose a taxas de pelo menos 5 vezes mais rápidas que ligações  $\beta(2-6)$  em oligossacarídeos levana e levanbiose. A frutose não afetou a atividade, mas a sacarose é um forte inibidor. A enzima foi parcialmente inibida por Na-EDTA e  $\text{CaCl}_2$  (1 mM).

Burne et al. (1987) caracterizaram a F $\beta$ F obtida na expressão do gene de fructanase de *Streptococcus mutans* GS-5 em *Escherichia coli*. Durante caracterização do produto do gene codificado por pFRUI, foi revelado que a enzima estudada era uma  $\beta$ -D-frutosidase com maior especificidade para polímeros de frutana com ligações  $\beta(2-6)$ . A enzima também pode hidrolisar inulina (frutanas com ligações  $\beta(2-1)$ ), sacarose e rafinose, com 34, 21 e 12%, respectivamente, da atividade observada para levana. A atividade da enzima foi inibida quase completamente por  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ag}^{2+}$ , inibida parcialmente por  $\text{Cu}^{2+}$ , não inibida por flúor ou Tris, e pouco estimulado, por  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ . A enzima agiu exohidroliticamente

nos polímeros de frutana obtendo apenas frutose como produto. Com tempo suficiente, tanto levana e inulina foram completamente degradadas, sem evidência de inibição do produto.

Takahashi, Mizuno e Takamori (1985) purificaram F $\beta$ F de *Streptococcus salivarius*. A preparação da enzima purificada hidrolisou levana, inulina e diversos oligossacarídeos contendo ligação 2- $\beta$  como a sacarose e rafinose, mas não melezitose, dextrana e pseudonigerana. A frutosidase foi inibida por Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> e Ag<sup>+</sup>, mas não por Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, na concentração de 10<sup>-3</sup> M. Mn<sup>2+</sup> foi particularmente eficaz para estimular a atividade na mesma concentração. A presença tanto de EDTA ou KCN também aumentou a atividade da frutosidase de 20 a 30%. A enzima era sensível a reagentes sulfidrílicos como p-chloromercuribenzoato (10<sup>-7</sup> M) com 63% de inibição da atividade. No entanto, essa inibição foi superada, na presença de cisteína. Esta enzima atua como uma exofrutosidase, a análise cromatográfica revelou que a D-frutose foi formada a partir de inulina ou levana pela ação da enzima.

Assim como Burne et al. (1987) e Takahashi, Mizuno e Takamori (1985), frutose foi o único açúcar liberado durante o decorrer do experimento, como pode ser observado na Figura 4-19, quando amostras do produto final da reação de diferentes concentrações de levana (5, 10, 20, 30 e 40 g/L) pela ação da enzima foram aplicados na placa de sílica gel para identificação através de cromatografia em camada delgada (CCD) juntamente com o padrão de frutose. A liberação de apenas frutose como produto da enzima, sugere que a enzima atacou o terminal redutor da levana indicando que realmente se trata de uma frutana  $\beta$ -frutosidase.



**Figura 4-19:** Cromatografia do padrão frutose e dos produtos finais das reações de levana (5, 10, 20, 30 e 40 g/L) pela frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281.

## 5 CONCLUSÕES

1- Foi possível obter levana a partir da cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

2- Foi possível hidrolizar levana utilizando a enzima Frutana  $\beta$ -frutosidase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 cultivada em meio contendo levana como substrato obtendo apenas frutose como produto da enzima.

3- Foi possível caracterizar parcialmente a enzima Frutana  $\beta$ -frutosidase (F $\beta$ F) de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281 quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e pH de pré incubação, e determinar os parâmetros cinéticos da Equação de Michaelis-Mentem ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ).

4- Ensaios de hidrólise de levana mostraram que apenas frutose foi produzida, sugerindo que a enzima é uma Frutana  $\beta$ -frutosidase.



**6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDEL-FATTAH, A. F.; MAHMOUD, D. A. R.; ESAWY, M. A. T. Production of Levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzymic Synthesis of Levan and Fruto-oligosaccharides. **Current Microbiology**, v. 51, p.402–407, 2005.

AMMAR, Y. B.; MATSUBA, T.; ITO, K.; LIZUKA, M; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA, N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 99, p. 111-119, 2002.

ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 3, p.291–297, 1999.

AVIGAD, G.; BAUER, S. Frutan hydrolases. **Methods Enzymol**, v. 8, p.621–628, 1966.

BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.72, n.6, p.491-494, 1991.

BEGHIN, J. C., JENSEN H. H., Farm policies and added sugars in US diets. **Food Policy**, 2008.

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; VIGANTS, A.; VIESTURS, U.; PANKOVA, L.; DANILEVICS A. Frutooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, v. 38, p.701-706, 2002.

BEKERS, M.; SHVINKA, J.; PANKOVA, L.; LAIVENIEKS, M.; MEZBARDE, I. Simultaneous sucrose bioconversion into ethanol and levan by *Zymomonas mobilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 24, p. 265-274, 1990.

BEKERS, M.; SHVINKA, J.; RAIPULIS, J.; LAIVENIEKS, M.; PANKOVA, L.; MEZBARDE, I. A strain of *Zymomonas mobilis* -producer of levan. **LV patent no. 5909**, 1993.

BEKERS, M.; VIGANTS, A.; LAUKEVICS, J.; TOMA, M.; RAPOPORTS, A.; ZIKMANIS, P. The effect of osmoinduced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 55, p.147-150, 2000.

BELAICH, J. P.; SENEZ, J. C. Influence of aeration and of penthothenate on growth of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 89, p. 1195-1200, 1965.

BELGHITH, H.; SONG, K.; KKIM, C.; RHEE, S. Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 4, p.467-472, 1996.

BIELECKI, S. Enzymatic Conversion of Carbohydrates In: TOMASIK, P. (Ed.) **Chemical and Functional Properties of Food Saccharides**. CRC Press LLC, (Chemical and Functional Properties of Food Components Series; 5), 2004.

BIRCH, G. G.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K. J. **Enzymes and Food Processing**, Applied Science Publishers: Essex, 296p, 1981.

BOFO, D. C. S. **Produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em meio de cultura contendo sacarose e caracterização do sistema enzimático responsável pela hidrólise de sacarose e de formação de levana**. São José do Rio Preto, 2009. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

BONNETT, G. D.; SIMPSON, R. J. Frutan-hydrolyzing activities from *Lolium rigidum* Gaudin. **New Phytol**, v. 123, p.443–451, 1993.

BORSARI, R. R. J. **Avaliação das diferentes condições de cultivo para a produção de levana por CP4**. 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Estadual de Londrina, 2004.

BORSARI, R. R. J.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B. Produção de levana por *Zymomonas mobilis* em fermentação descontínua alimentada. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, Florianópolis-SC. Anais. Manaus: Pólo Editora Ltda, 2003.

BUCK, A. W. High Fructose Corn Syrup. In: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners**. 3.ed. revised. e expanded. New York; Marcel Dekker Inc., 2001, p.391-411.

BURNE, R. A.; SCHILLING, K.; BOWEN, W. H.; YASBIN, R. E. Expression, purification, and characterization of an exo-beta-D-fructosidase of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 10, p.4507-4517, 1987.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R.C.; FRANÇA, F.P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans, **Int. J. Biol. Macromol.** v. 27, n. 4, p. 245–247, 2000.

CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; MORAIS, J. O. F. D.; SOUZA, M. D. F. V. Q.; MARCAL, M. D. C. R.; LEIX, S.; LOPES, C. E. The levan and ethanol production by *Zymomonas mobilis* strain ZAP in sucrose media. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 32, p. 631, 1989.

CARLOS, T. F. **Produção de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* em mosto a base de sacarose**. 1991. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Estadual de Pernambuco, Recife, 1991.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lípases microbianas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CATANA, R.; ELOY, M.; FERREIRE, B. S.; CABRAL, J. M. S.; FERNANDES, P. Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p.260-266, 2007.

CHAMBERT, R.; GONZY-TRÉBOUL, G. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: kinetic and thermodynamics aspects of transfructosylation processes. **European Journal Biochemical**, v. 62, p.55-64, 1976.

CHAMBERT, R.; TRÉBOUL, G; DENDONDER, R. Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. **European Journal Biochemical**, v. 41, p.285-300, 1974.

CLARKE, M. A.; BAILEY, A. V.; ROBERTS, E. J.; Tsang, W.S. Polyfructose: a New Microbial Polysaccharide. Lichtenthaler, F.W. **Carbohydrates as Organic Raw Materials**. New York, 8: 169-182. 1990.

CLAESSENS, G.; LAERE, A.; PROFT M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus L.*). **Journal of Plant Physiology**, v. 136, p.35-39, 1990.

COARSE, J. F.; CARDONI, A. A. Use of fructose in the treatment of acute alcoholic intoxication. **American Journal of Hospital Pharmacy**, v. 32, n. 5, p.518-9, 1975.

COARSE, C. G. O.; LOBATO, A. V.; MELO, I. R.; PINHEIRO, I. O.; GOUVEIA, E. R.; CALAZANS, G. M. T. Estudo da produção de levana e oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*. **Relatório final de iniciação científica**, 2002.

CORTI, A. (Ed.). **Word Conference on Low-Calorie Sweeteners**, Barcelona: 1999, 244 p. (World review of nutrition and dietetics, 85).

COTÉ, G. L.; AHLGREN, J. A. Metabolism in microorganisms. Part I. Levan and levansucrase. In: SUZUKI, N.; CHATTERTON, N. J. (Ed.). **Science and Technology of Frutans**. Boca Raton: CRS Press, p. 142-168. 1993.

CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p.302-308, 1994.

CRUZ-GUERRERO, A.; GARCIA-PEÑA, I.; BARZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMEZ-RUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A Wild Inulinase

Hyperproducing Strain. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.80, n. 2, p. 159-163, 1995.

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

DEDONDER, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. In: **Methods in Enzymology**. v. 8, p.500-505, 1966.

DEDONDER, R.; NOBLESSE, C. Evidence for intermediate products containing glucose in the synthesis of levan by *Bacillus subtilis*. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 85, n. 3, p.356-364, 1953.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. *Zymomonas mobilis* – Science an industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 13, p. 57-98, 1993.

DOELLE, M.; MILLICHIP, R.; DOELLE, H. W. Production of ethanol from corn using inoculum cascading of *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, London, v. 15, p. 137-140, 1989.

JEREZ, M. C. D.; YOKODA, F. Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 1, p.129-137, 1996.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T. G. The metabolism of fructose polymers in plants. **Biochemistry Journal**, v. 93, p.148–161, 1964.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. São José do Rio Preto, 2009. 145 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p.71-82, 2005.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 26, p.13-20, 1987.

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

GARCIA-CRUZ, C. H. **Produção de polissacarídeos bacterianos**. 1997. 63 f. Dissertação (Título de Livre Docente)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1997.

GE, Y.; ZHOU, H.; KONG, W.; TONG, Y.; WANG, S.; LI, W. Immobilization of glucose isomerase and its application in continuous production of high fructose syrup. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 69, p.203-215, 1998.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzimology**. New York: Stockton Press, 1996, 609p.

GRUBE, M.; BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E. IR-spectroscopic studies of *Zymomonas mobilis* and levan precipitate. **Vibrational Spectroscopy**, v. 28, p.277-285, 2002.

GUNASEKARAN, P.; KARUNAKARAN, T.; KASTHURIBAI, M. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different substrates – a comparative study. **Journal Bioscience**, India, v. 10, p. 181-186, 1986.

GUPTA, A. N.; SINGH, D. P.; KAUR, N.; SINGH, R. Production, Purification and Immobilization of Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 59, p.377-385, 1994.

HALLFRISCH J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEBJ Journal**, v. 4, n. 9, p.2652-2660, 1990.

HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. Production and characterization of microbial levan. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 38, p.393-396, 1990.

HENSON, C. A. Purification and properties of barley stem frutan exohydrolase. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p.186–191, 1989.

HENSON, C. A.; LIVINGSTON-III, D. P. Purification and characterization of an oat frutan exohydrolase that preferentially hydrolyzes  $\beta$ -2,6 frutans. **Plant Physiol**, v. 110, p.639–644, 1996.

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

HETTWER, U.; GROSS, M.; RUDOLPH, K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 10, p.2834-2839, 1995.

HIJUM, S. A. F. T. Kinetics properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. **FEBS Letters**, v. 534, p.207-210, 2003.

HOPPNER, T. C.; DOELLE, H. W. Purification and kinetics characteristics of pyruvate decarboxile and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 17, p. 152-157, 1983.

IGARASHI, T.; YAMAMOTO, A.; GOTO, N. Characterization of exo- $\beta$ -D-fructosidase from *Streptococcus mutans* Ingbritt. **Microbiology and Immunology**, Japan, v. 36, n. 6, p.643-647, 1992.

JANG, K.; SONG, K. B.; PARK, B. S.; KIM, C. H.; CHUNG, B. H.; CHOUE, R. W.; LEE K. S.; LEE, C.; CHUN. U. K.; RHEE, S. K. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p.339-344, 2001.

JING, W.; ZHENGYU, J.; BO, J.; AUGUSTINE, A. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. **Process Biochemistry**, v. 39, p.5-11, 2003.

JEREZ, M. C. D. **Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melão de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis***. 1993. 108p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

JOHNS, M. R.; GREENFIELD, P. F.; DOELLE, H. W. Byproducts from *Zymomonas mobilis*. **Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 44, p.97-121, 1991.

KANNAN, T. R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Influence of intra and extracellular sucrose of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by-product formation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p.661-664, 1997.

KATO, K.; ARAKI, T.; KITAMURA, T.; MORITA, N.; MOORI, M.; SUZUKI, Y. Purification and Properties of a Thermostable Inulinase ( $\beta$ -D-Fructan Fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. **Starch/Stärke**, v. 51, n. 7, p.253–258, 1999.

KIM, M. G.; KIM, C.; LEE, J.; SONG, K.; RHEE, S. Synthesis of methyl  $\beta$ -D-frutoside catalyzed by levansucrase from *Rahnella aquatilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 9, p.646-651, 2000.

KIM, C. H.; RHEE, S. K. Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 3, p.201-206, 1989.

KOHLMEIER, M. **Nutrient Metabolism - Food science and technology international series**. London: Academic Press, 2003, 829 p.

KUSHI, R. T.; TREVISAN, H. C.; MONTI, R.; HOJO, O.; CARVALHO, A.; CONTIERO, J. Estudo da Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, São Carlos. **Anais XI SINAFERM**, 1996, p. 309-314.

LEE, W. C., HUANG, C. T. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grow on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p.217-227, 2000.

LEVAN STRUCTURE. In: **Montana Polysaccharides Corporation**. Disponível em: <[www.polysaccharides.us/LevanStructure.png](http://www.polysaccharides.us/LevanStructure.png)>. Acesso em: 01 nov. 2008.

LIPINSKI, G-W; VON, R. Reduced-calorie sweeteners and caloric alternatives. In: Spillane, W. J. **Optimising sweet taste in foods**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006.

LOURENÇO, C. M. **Desenvolvimento de Processo Contínuo de Obtenção de Frutose a Partir de Sacarose**. Campinas, 2004. 97p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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

MALTA, O.; GUIMARÃES, A.P. Açúcar. In: HOUAIS, A. **Enciclopédia Mirador Internacional**. Rio de Janeiro: Encyclopaedia Britannica do Brasil Publicações, p.93-97, 1976.

MARX, S. P.; NÖSBERGER, J.; FREHNER, M. Seasonal variation of frutan-b-frutosidase (FEH) activity and characterisation of a  $\beta$ -(2,1)-linkage specific FEH. **New Phytol**, v. 135, p.267–277, 1997a.

MARX, S. P.; NÖSBERGER, J.; FREHNER, M. Hydrolysis of frutan in grasses: A  $\beta$ -(2,6)-linkage specific frutan-b-frutosidase from stubble of *Lolium perenne*. **New Phytol**, v. 135, p.279–290. 1997b.

MATTHEWS, R. H.; PEHRSSON, P. R.; FARHAT-SABET, M. Sugar content of selected foods: Individuals and total sugars. In: **Home Economics Research Report**. Washington (DC): Hum Nutr Information Service. v. 48, p.3-14, 1987.

MANZONNI, M.; CAVAZZONI, V. Extracellular Inulinase from four Yeast. **Lebensm – Wiss. U-Technology**, v.21, p. 271-274, 1988.

MAZUTTI, M. A.; BENDER, J. P.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. D. Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p.56-59, 2006.

MACCORMICK, C. A.; HARRIS, J. E.; JAY, A. J.; RIDOUT, M. J.; COLQUHOUN, I. J.; MORRIS, V. J. Isolation and characterization of new extracellular polysaccharide from an *Acetobacter* species. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p.419-424, 1996.

MELO, I. R.; CALAZANS, G. M. T. Efeito da concentração inicial de sacarose no inóculo para a produção de levana In: **XL Congresso Brasileiro de Química**, Recife, anais; Associação Brasileira de Química. p.48, 2000.

MURAKAMI, H.; KURAMOTO, T.; MIZUTANI, K.; NAKANO, H.; KITAHATA, S. Purification and Some Properties of a New Levanase from *Bacillus* sp. No. 71. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.56, n. 4, p.608-613, 1992.

MURO, A. C.; RODRÍGUEZ, E.; ABATE, M. C.; SIÑERIZ F. Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 22, n. 20, p.1639-1642, 2000.

NAKAMURA, T.; OGATA, Y.; SHITARA, A.; NAKAMURA, A.; OHTA, K. Continuous Production of Fructose Syrups from Inulin by Immobilized Inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 2, p.164-169, 1995.

NAKAMURA, T.; SHITARA, A.; MATSUDA, S.; MATSUO, T.; SUIKO, M.; OHTA, K. Production, Purification and Properties of an Endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates Inulotriose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 4, p. 313-318, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004.

OHTSUKA, K.; HISO, S.; FUKUSHIMA, S.; OZAWA, O.; KANEMATSU, T.; UCHIDA, T. Characterization of levansucrase from *Rahnella aqualitis* JMC-1683. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, n. 9, p.1373-1377, 1992.

OLIVEIRA, M. R.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Estudo experimental de produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* em altas concentrações de sacarose. **Semina**, Londrina, v. 25, p. 134-140, 2004.

ÖNGEN-BAYSEL, G.; SUKAN, S. S.; VASSILEV, N. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 3, p. 275- 280, 1994.

ONODERA, S.; MURAKAMI, T.; ITO, H.; MORI, H.; MATSUI, H.; HONMA, M.; CHIBA, S.; SHIOMI, N. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA and gene encoding endo-inulinase from *Penicillium purpurogenum*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 60, p.1780-1785, 1996.

PARK, H.; PARK, N. H.; KIM, M.; LEE, T. H.; LEE, H. G.; YANG, J.; CHA, J. Enzymatic synthesis of frutosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium*

*levaniformans* ATCC 15953. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p.820-827, 2003.

PESSOA, A.; VITOLO, M.; Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v. 16, n. 3, 1999.

PESSONE, R. A. B.; OLMEDO, P. M. O.; CLEMENTE FILHA, A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Produção de concentrados de frutose por inulinasas de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p.373-377, 2004.

POORNA, V.; KULKARNI, P. R. A study of Inulinase Production in *Aspergillus niger* using Fractional Factorial Design. **Bioresource Technology**, v. 54, p.315-320, 1995.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F., **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Casa do Pão, Campinas – SP, Brasil, 2005.

ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; SKOTNICH, M. L.; TRIBE, D. E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Advances in Biochemical Engineering**, New York, v. 23, p. 37-84, 1982.

ROOVER, J.; LAERE, A. V.; WINTER, M. D.; TIMMERMANS, J. W.; ENDE, W. V. D. Purification and Properties of a Second Frutan Exohydrolase From the Roots of *Cichorium intybus*. **Physiologia Plantarum**, Ireland, v. 106, p.28–34, 1999.

ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E., VAN DER BAAN, A. SCHEFFEERS, A. VAN DIJKEN, J. Production, Distribution and Kinetic properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.5, p.1131-1137,1988.

RUMESSEN, J. J. Fructose and related food carbohydrates. **Scand J Gastroenterol**, v. 27, n. 10, p.819-28, 1992.

RUTHERFORD, P. P.; DEACON, A. C. Frutofuranosidases from roots of dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). **Biochemistry Journal**, v. 126, p.569–573, 1972.

SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. A simple method for purification of thermostable levansucrase of *Zymomonas mobilis* from recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p.153-156, 1998.

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

SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Polymerase and hydrolase activities of

*Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by *in vitro* mutagenesis and elevated temperature. **Process Biochemistry**, v. 36, p.543-548, 2001.

SANTOS, A.M.P. Síntese de Oligossacarídeos a partir da sacarose por Inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*. Campinas, 2002. 161p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SCHOMBURG, D.; SALZMANN, M. (Ed.). **Enzyme Handbook**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. v. 4.

SILVA, M. C. P. Influência do pH sobre a produção de levana pela *Zymomonas mobilis* ZAG-12 em meio à base de sacarose. 1996. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

SIMPSON, R. J.; WALKER, R. P.; POLLOCK, C. J. Frutan exohydrolase activity in leaves of *Lolium temulentum*. **New Phytol**, v. 119, p.499–507, 1991.

SMOUTER, H.; SIMPSON, R. J. Frutan metabolism in leaves of *Lolium rigidum* Gaudin - Frutosyltransferase, invertase and frutan hydrolase activity. **New Phytol.**, v. 119, p.517-526, 1991.

SOMOGYI, M. Notes on Sugar Determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p.19, 1952.

SONG, E.; KIM, H.; SUNG, H. K.; CHA, J. Cloning and characterization of a levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. **Gene**, v. 291, p.45-55, 2002.

SONG, K.; RHEE, S. Levansucrase. In: **Handbook of Enzymology**. New York, 2003.

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

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 38, p. 319-328, 1999.

SZWENGIEL, A.; CZARNECKA, M.; GRUCHALA L.; CZARNECKI, Z.; CZARNECKI, Z. Properties and application of levan. **Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc**. V.16, n. 5, p. 18-29, 2009.

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

TAKAHASHI, N.; MIZUNO, F.; TAKAMORI, K. Isolation and Properties of Levansucrase from *Streptococcus salivarius* KTA-49. **Infection and Immunity**, v. 42, n. 1, p. 231-236, 1983.

TAKAHASHI, N.; MIZUNO, F.; TAKAMORI, K. Purification and Preliminary Characterization of Exo- $\beta$ -D-Fruktosidase in *Streptococcus salivarius* KTA-19. **Infection and Immunity**, v. 47, n. 1, p. 271-276, 1985.

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

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Influência do pH inicial do caldo de cana-de-açúcar na produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821. **Semina**, v. 23, p. 93-98, 2002.

TREICHEL, H. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados, para viabilidade econômica da etapa de recuperação e purificação da enzima**. Campinas, 2004. 111p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VANDAMME, E. J.; DERYKE, D. G. Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 139-76, 1983.

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

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

VINHAS, G. M.; CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E. Produção de levanas por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 e obtenção da curva de solubilidade do sistema de levana-água-etanol. **SINAFERM**, 2000.

VINHAS, G. M. **Estudo da produção e do fracionamento de levanas produzidas por *Zymomonas mobilis***. 1999. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de produtos bioativos)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

WAGNER, W.; WIEMKEN, A. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel). **Journal of Plant Physiology**, v.123, p.429–439. 1986.

WANG, Y.M; VANEYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. **Ann Rev Nutr**, v. 1, p. 437-475, 1981.

WEBER, A. **Estudo da síntese de frutoligossacarídeos por levanassacarase imobilizada em reator de coluna.** Campinas, 2003. 87p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

WENDT, R. **Estudo da Produção de Levana através de *Zymomonas mobilis*.** Campinas, 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

WENLING, W.; HUIYING, W. W. L; SHIYUAN, W. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces sp.* Y-85. **Process Biochemistry**, v.34, n. 6-7, p. 643-646, 1999.

WHITE, J. S.; OSBERGER, T. F. Crystalline fructose. In: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners.** 3.ed. revised. e expanded. New York; Marcel Dekker Inc., 2001, p.367-390.

XIAO, R.; TANIDA, M.; TAKAO, S. Purification and Characteristics of two Exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering** v. 67, n.5, p. 331-334, 1989.

YAMAMOTO, S.; MINO, Y. Partial purification and properties of phleinase induced in stem base of orchardgrass after defoliation. **Plant Physiol**, v.78, p.591–595. 1985.

YOSHIDA, Y.; SUZUKI, R.; YAGI, Y. Production of levan by *Zymomonas mobilis sp.* **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 70, p. 269-271, 1990.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 19, n. 2, p. 107-117, 1996.

ZENG, L.; WEN, Z. T.; BURNE, R. A. A novel signal transduction system and feedback loop regulate frutan hydrolase gene expression in *Streptococcus mutans*. **Molecular Microbiology**, v.62, n.1, p.187–200. 2006.

## 7 ANEXO

**Tabela 7-1:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 40 °C.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Ativ Relat (U/U<sub>0</sub>)</b>	<b>Ln (U/U<sub>0</sub>)</b>
0	1,00	0
15	0,97	-0,0314
30	0,99	-0,0108
90	0,98	-0,0204

**Tabela 7-2:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 50 °C.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Ativ Relat (U/U<sub>0</sub>)</b>	<b>Ln (U/U<sub>0</sub>)</b>
0	1,00	0
10	0,96	-0,0436
55	0,84	-0,1745

**Tabela 7-3:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 60 °C.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Ativ Relat (U/U<sub>0</sub>)</b>	<b>Ln (U/U<sub>0</sub>)</b>
0	1,00	0
5	0,98	-0,0239
30	0,97	-0,0324
45	0,91	-0,0998
60	0,92	-0,0844
90	0,81	-0,2110

**Tabela 7-4:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 70 °C.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Ativ Relat (U/U<sub>0</sub>)</b>	<b>Ln (U/U<sub>0</sub>)</b>
0	1,00	0
4	0,99	-0,0111
16	0,79	-0,2297
26	0,80	-0,2215

**Tabela 7-5:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação à temperatura de 80 °C.

Tempo (min)	Ativ Relat (U/U <sub>0</sub> )	Ln (U/U <sub>0</sub> )
0	1,00	0
4	0,90	-0,1034
12	0,65	-0,4312
20	0,61	-0,4933
30	0,55	-0,6058

**Tabela 7-6:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 3,0

Tempo (min)	Ativ Relat (U/U <sub>0</sub> )	Ln (U/U <sub>0</sub> )
0	1,00	0
5	0,98	-0,0190
10	0,99	-0,0127
15	0,90	-0,1004
30	0,88	-0,1250
60	0,85	-0,1612
90	0,55	-0,5908

**Tabela 7-7:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 4,0

Tempo (min)	Ativ Relat (U/U <sub>0</sub> )	Ln (U/U <sub>0</sub> )
0	1,00	0
5	0,83	-0,1850
10	0,85	-0,1662
60	0,80	-0,2289
90	0,67	-0,3969

**Tabela 7-8:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 5,5

Tempo (min)	Ativ Relat (U/U <sub>0</sub> )	Ln (U/U <sub>0</sub> )
0	1,00	0
10	0,96	-0,0436
55	0,84	-0,1745

**Tabela 7-9:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 7,0

<b>Tempo (min)</b>	<b>Ativ Relat (U/U<sub>0</sub>)</b>	<b>Ln (U/U<sub>0</sub>)</b>
0	1,00	0
15	0,87	-0,1437
60	0,75	-0,2837
90	0,18	-1,7266

**Tabela 7-10:** Atividade exohidrolítica em função do tempo de incubação em pH 8,0

<b>Tempo (min)</b>	<b>Ativ Relat (U/U<sub>0</sub>)</b>	<b>Ln (U/U<sub>0</sub>)</b>
0	1,00	0
15	0,53	-0,6326
45	0,02	-3,9310
75	0,04	-3,1083

