

Produção de levana por fermentação submersa utilizando *Zymomonas mobilis* cct 4494

Levan production by submerged fermentation using *Zymomonas mobilis* cct 4494

**Producción de levana por fermentación sumergida utilizando *Zymomonas mobilis* cct
4494**

Recebido: 17/09/2020 | Revisado: 24/09/2020 | Aceito: 29/09/2020 | Publicado: 01/10/2020

Letícia Biazzi de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9902-6117>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: leticiabiazzi96@gmail.com

Mariane Daniella da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2900-9741>

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil

E-mail: marianedaniella@hotmail.com

Talita Garcia Lopes Viçoso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5917-7140>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: talita@vicoso.com.br

Maria Laura Ferreira Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5843-8844>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: marialaura2604@gmail.com

Jaciara Jesus Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8547-1818>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: Jaciarajesus6@gmail.com

Jesley Pires Tomaz Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7776-7969>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: jesleypires@hotmail.com

Simone Aparecida Biazzi de Lapena

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9790-3027>

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil

E-mail: simone.lapena@unesp.br

Crispin Humberto Garcia Cruz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2482-0639>

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil

E-mail: crispin.garcia-cruz@unesp.br

Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2822-5901>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: fermariapague@gmail.com

Resumo

A levana é formada por unidades de frutose e produzida por micro-organismos a partir da fermentação de um meio de cultura contendo sacarose e sais minerais. É um biopolímero com aplicações industriais usado na área alimentícia (fixador de cores e sabores, espessante e estabilizante) e também na farmacêutica (substituto de plasma sanguíneo, imunomodulador, anticarcinogênico e hipocolesterolêmico). Esse trabalho teve como objetivo abordar especificamente aspectos relacionados ao delineamento da produção de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, variando os parâmetros de uma fermentação submersa. As condições para a fermentação e produção foram avaliadas por um planejamento fatorial e foi aplicada a metodologia de superfície de resposta. Os resultados demonstram que o baixo valor de p encontrado para o intercepto levana (Y_1), indicou que os níveis estudados nesta pesquisa foram bem escolhidos e que o coeficiente de regressão da equação descreveu o experimento acima de 99% de confiança. Das variáveis independentes analisadas, a agitação e sua combinação binária com a temperatura apresentaram as maiores diferenças significativas nos resultados. O maior cultivo do biopolímero foi de 10,58 g.L⁻¹ de levana. Os valores de levana e da biomassa reduziram significativamente em temperaturas superiores a 30 °C e o produto da fermentação, como o crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, foram proporcionais ao aumento da concentração de sacarose testada.

Palavras-chave: Biopolímero; Polissacarídeos; Exopolissacarídeos; Bactéria; Produção.

Abstract

Levan is an exopolysaccharide formed by fructose units produced by microorganisms during the fermentation of a culture medium containing sucrose, yeast extract and mineral salts. It is a biopolymer with industrial applications, both in the food area (color and flavor fixative, thickener and stabilizer of various foods) and also in the pharmaceutical (blood plasma substitute, immunomodulator, anticarcinogenic and hypocholesterolemic). This work aimed to specifically address aspects related to the design of levana production from the bacterium *Zymomonas mobilis* CCT 4494, varying the conditions of a submerged fermentation. The fermentation conditions for the production of levana were evaluated from a factorial planning and the response surface methodology was applied. The results demonstrate that the low p value found for the levan intercept (Y_1), indicated that the levels studied in this research were well chosen and that the regression coefficient of the equation described the experiment with above 99% of confidence. Of the independent variables analyzed, agitation and its binary combination with temperature represented the most significant for this biopolymer biosynthesis. The highest production of levan obtained was 10.58 g.L^{-1} , when using the initial sucrose concentration of 150 g.L^{-1} . The values of biopolymer and biomass reduced significantly at temperatures above $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and the fermentation product, such as the growth of *Zymomonas mobilis* CCT 4494, was proportional to the increase on concentration of sucrose tested.

Keywords: Biopolymers; Polysaccharides; Exopolysaccharides; Bacteria; Production.

Resumen

Levana está formada por unidades de fructosa y producida por microorganismos a partir de la fermentación de un medio de cultivo que contiene sacarosa y sales minerales. Es un biopolímero con aplicaciones industriales utilizadas en el área de alimentos (fijador de color y sabor, espesante y estabilizador) y también en productos farmacéuticos (sustituto del plasma sanguíneo, inmunomodulador, anticarcinogénico e hipocolesterolémico). Este estudio tuvo como objetivo abordar específicamente aspectos relacionados con el diseño de la producción de levana por la bacteria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, variando los parámetros de una fermentación sumergida. Las condiciones de fermentación y producción fueron evaluadas por una planificación factorial y se aplicó la metodología de la superficie de respuesta. Los resultados muestran que el bajo valor p encontrado para la interceptación de levana (Y_1) indicó que los niveles estudiados en esta investigación fueron bien elegidos y que el coeficiente de regresión de la ecuación describió el experimento por encima del 99% de

confianza. De las variables independientes analizadas, la agitación y su combinación binaria con la temperatura mostraron las mayores diferencias significativas en los resultados. El cultivo de biopolímero más grande fue de 10,58 g.L⁻¹ de levana. Los valores de Levana y biomasa disminuyeron significativamente a temperaturas superiores a 30 °C y el producto de fermentación, como el crecimiento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, fue proporcional al aumento de la concentración de sacarosa probada.

Palabras clave: Biopolímeros; Polisacáridos; Exopolisacáridos; Bacterias; Producción.

1. Introdução

Os polissacarídeos são polímeros compostos por cadeias de milhares de unidades de monossacarídeos, podem ser lineares ou ramificados ou a mistura de estes dois tipos de estruturas. São extraídos de plantas (incluindo as algas), de animais e pela ação de micro-organismos. Os polímeros que são obtidos através de organismos vivos são chamados de biopolímeros e apresentam grande potencial industrial (Cunha et al., 2009).

Os biopolímeros são endo ou exopolissacarídeos dependendo de sua localização, dentro ou fora da célula, são produtos de processos fermentativos e apresentam vantagens sobre os de origem animal e vegetal, como a reprodutibilidade e estabilidade das características físico-químicas, não dependem das condições climáticas para a sua obtenção e podem ser produzidos em pequenos espaços. Por isso, podem ser largamente utilizados na indústria como emulsificantes, geleificantes e estabilizantes (Lima, 2019).

Os exopolissacarídeos (EPS) são excretados ou formados fora da célula, portanto, podem ser obtidos diretamente no meio de cultivo em forma de muco ou ele pode ser encontrado na camada aderente em volta da parede celular, chamada cápsula. Os EPS são produzidos durante o crescimento de bactérias, fungos filamentosos ou leveduras (Sutherland, 1972).

Dentre a classe de exopolissacarídeos se encontra a levana constituída por unidades de frutose unidas por ligações β (2 \rightarrow 6), sintetizado por vários micro-organismos como *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Erwinia herbicola*, *Streptococcus salivarius* e *Zymomonas mobilis*. É resultante de reações de transfructosilação em fermentações de culturas crescidas em meios ricos em sacarose (Ernandes; Garcia-Cruz, 2011).

Esse biopolímero tem despertado grande interesse devido às suas aplicações em diversas áreas da saúde e da alimentação humana, pois, apresenta propriedades muito úteis para as indústrias, como solubilidade em água e óleo, alta viscosidade, estabilidade ao calor,

aos ácidos e bases, agindo como estabilizante, emulsificante, espessante e encapsulante (Ernandes; Garcia-Cruz, 2009).

Devido às aplicações biotecnológicas da levana as bactérias produtoras do biopolímero vêm ganhando destaque, sendo a *Zymomonas mobilis* uma das mais promissoras. A *Z. mobilis* é uma bactéria gram-negativa, que utiliza sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono e energia, produzindo quantidades equimolares de etanol e CO₂. É uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta as condições de cultura extremamente peculiares, causando grande interesse no mundo científico biotecnológico e industrial. A habilidade da bactéria em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder a manipulação física e química do ambiente, bem como sua limitada formação de produtos a torna um micro-organismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos microbianos (Ferreira, 2013).

Quando a bactéria *Z. mobilis* cresce em meio de sacarose, consome preferencialmente a glicose, fazendo com que a frutose fique acumulada no meio de fermentação que levam à conversão da frutose em levana através da levanasacarase (Parker et al., 1997).

Devido ao destaque da levana, esta pesquisa teve como objetivo abordar especificamente aspectos relacionados ao delineamento e à otimização de sua produção, variando as condições de fermentação, a partir da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 cultivada em caldo sintético de sacarose.

2. Metodologia

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado para a pesquisa foi a *Zymomonas mobilis* CCT 4494, cedida pelo Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz, do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de São José do Rio Preto - SP.

2.2 Meios de cultura

2.2.1 Meio de Manutenção

A linhagem bacteriana foi armazenada em geladeira a 4°C, após o crescimento em estufa a 30°C por 24 h em meio composto por (g.L⁻¹): glicose, 20,0; extrato de levedura, 5,0 e ágar 20,0; em pH 6,5, sendo repicada mensalmente em tubos.

2.2.2 Meio de Crescimento e Produção

O meio de crescimento e de fermentação da bactéria foi composto por diferentes concentrações de sacarose (100; 150 e 200 g.L⁻¹) e de extrato de levedura (2,5; 5,0 e 7,5 g.L⁻¹), adicionado de 1,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; (NH₄)₂SO₄ e MgSO₄.7H₂O (de acordo com o experimento proposto pelo planejamento experimental.). A solução de sacarose foi esterilizada separadamente a 121°C, por 20 minutos, e depois de resfriada até a temperatura ambiente e misturada assepticamente no momento do preparo do meio de fermentação contendo os sais que foram previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados. O pH do meio de crescimento foi adequado para 6,5 com NaOH e então foi incubado a 30°C, por 24 h com rotação de 200 rpm, em Shaker Marconi, modelo MA 830.

2.3 Produção do biopolímero

2.3.1 Planejamento Experimental para produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494

O planejamento experimental foi feito pelo software Statistica 6.0 (STATSOFT, 1996), a partir de um delineamento do tipo 2⁴⁻¹ (Box; Hunter, 1978), sendo necessários 08 experimentos, com 02 repetições no ponto central (pc).

As variáveis independentes estudadas foram: X₁ = temperatura em °C; X₂ = agitação em rpm; X₃ = concentração inicial de sacarose em g.L⁻¹ e X₄ = concentração inicial de extrato de levedura em g.L⁻¹. As respostas analisadas foram: produção de levana (Y₁), em g.L⁻¹. A Tabela 1 mostra as variáveis independentes, codificadas, que foram estudadas para a produção do produto de fermentação pela bactéria.

Tabela 1 – Variáveis independentes, codificadas, estudadas para a produção de levana (Y_1), por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Tratamentos	Variáveis			
	X ₁ (°C)	X ₂ (rpm)	X ₃ (g.L ⁻¹)	X ₄ (g.L ⁻¹)
01	25,0	50	50,0	2,50
02	35,0	50	50,0	7,50
03	25,0	150	50,0	7,50
04	35,0	150	50,0	2,50
05	25,0	50	150,0	7,50
06	35,0	50	150,0	2,50
07	25,0	150	150,0	2,50
08	35,0	150	150,0	7,50
09*	30,0	100	100,0	5,00
10	25,0	50	50,0	2,50
11	35,0	50	50,0	7,50
12	25,0	150	50,0	7,50
13	35,0	150	50,0	2,50
14	25,0	50	150,0	7,50
15	35,0	50	150,0	2,50
16	25,0	150	150,0	2,50
17	35,0	150	150,0	7,50
18*	30,0	100	100,0	5,00

*Pontos Centrais. X₁: temperatura (°C); X₂: agitação (rpm); X₃: sacarose (g.L⁻¹); X₄: extrato de levedura (g.L⁻¹). Tempo de fermentação: 24 horas.

2.4 Métodos Analíticos

Após os processos fermentativos foram retiradas amostras e realizadas as determinações: do pH, da concentração celular, levana, Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Totais (AT).

O pH foi determinado diretamente no caldo fermentado em potenciômetro Digimed modelo DM20.

Após a centrifugação do caldo fermentado para interromper a fermentação, a concentração celular foi determinada pela medição da absorbância de suspensões diluídas em água destilada, a 570 nm, em espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam”, para sua conversão em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume), uma curva de calibração da concentração celular das suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

A determinação da estimativa da concentração de levana foi medida a partir da precipitação do polissacarídeo pela adição de 03 volumes de etanol anidro, previamente resfriado, após centrifugação do caldo fermentado a 6941g e 4 °C durante 15 min. O precipitado de levana foi seco em estufa à vácuo a 45 °C até peso constante, por aproximadamente 24 horas, e o seu rendimento foi calculado pela relação entre gramas do polissacarídeo obtido e as gramas consumidas da fonte de carbono.

A estimativa da biomassa foi determinada pelo peso seco das células obtidas após a centrifugação do caldo de fermentação.

Os Açúcares Redutores (AR) foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1952) e Nelson (1944). Os Açúcares Totais (AT) pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956).

2.5 Cálculo dos parâmetros cinéticos

2.5.1 Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (\%) \quad (\text{equação 1})$$

2.5.2 Coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido

$$Y_{p/s} = \frac{(P_f - P_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (\%) \quad (\text{equação 2})$$

2.5.3 Produtividade

$$P = \frac{(P_f - P_0)}{(t_f - t_0)} \quad (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) \quad (\text{equação 3})$$

Onde:

P_0 = massa produto inicial (g.L^{-1}); P_f = massa de produto final (g.L^{-1}).

S_0 = concentração inicial de substrato (g.L^{-1}); S_f = concentração final de substrato (g.L^{-1}).

t_f = tempo (h); t_0 = tempo inicial (h).

X_0 = massa celular seca (g.L^{-1}); X_f = massa celular seca final (g.L^{-1}).

3. Resultados e Discussão

Para que a produtividade de levana seja mais eficiente, os estudos com a utilização de diferentes substratos, condições e processos de fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* tem sido mais intensificado. Quando essa bactéria se desenvolve em altas concentrações de sacarose ocorre a produção de levana. A concentração de sacarose do meio de crescimento e a temperatura de desenvolvimento da bactéria são os dois fatores que mais afetam a atividade da levanasacarase e conseqüentemente a síntese de levana (Ernandes; Garcia-Cruz, 2011).

Para a verificação da eficiência da produção de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, diferentes concentrações de sacarose, extrato de levedura e sais minerais, foram variadas no meio de fermentação. Esses processos foram realizados em fermentações de 24 h de duração, com variações de temperatura, agitação e concentração de substratos em um planejamento experimental, descrito no item (2.3.1).

Tabela 2 – Produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, a 30 °C, por 24 h de fermentação em meio sintético composto de sacarose.

Corridas	pH final	Parâmetros (g.L ⁻¹)				Sacarose consumida
		Biomassa	Y ₁	AT	AR	
01	4,83	0,068	1,38	31,78	1,64	19,86
02	4,85	0,119	5,14	3,12	0,61	47,49
03	4,80	0,240	5,36	32,97	4,24	21,27
04	4,76	0,127	1,60	6,39	2,21	45,82
05	4,85	0,088	0,94	63,94	6,87	92,93
06	4,88	0,185	4,55	7,93	0,98	143,05
07	4,79	0,184	4,46	36,93	7,37	120,44
08	4,75	0,279	7,73	14,39	4,13	139,74
09*	4,76	0,147	10,58	5,66	2,04	96,38
10	4,86	0,062	1,33	32,23	3,56	21,33
11	4,80	0,117	5,16	2,66	0,69	48,03
12	4,89	0,290	5,39	39,47	10,72	21,25
13	4,73	0,130	1,69	5,16	2,03	46,87
14	4,84	0,09	0,98	104,29	4,52	50,23
15	4,88	0,189	4,25	7,55	1,94	144,39
16	4,76	0,182	4,50	63,01	9,52	96,51
17	4,72	0,281	7,78	14,35	8,52	144,17
18*	4,76	0,146	10,12	7,21	0,96	93,74

*Pontos centrais. Y₁: Levana; AT: Açúcares totais; AR: Açúcares redutores. Fonte: Autores.

É possível verificar que os parâmetros testados em cada experimento (Tabela 2) apresentaram grandes diferenças nos valores de produção de levana e de biomassa. A maior produção de levana foi de $10,58 \text{ g.L}^{-1}$ obtida nas condições de cultivo do experimento número 9, com os parâmetros: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 100 rpm; $100,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura (Tabela 2).

A maior produção de biomassa se deu no experimento 12, com: $35 \text{ }^\circ\text{C}$; 150 rpm; $150,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose e $7,50 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, foram obtidos $0,290 \text{ g.L}^{-1}$.

A produção de levana pode aumentar ou diminuir dependendo das condições empregadas na fermentação, um dos fatores que mais influência na síntese do produto desejado é a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo, pois, em um meio contendo sacarose esta será hidrolisada e a bactéria sintetizará glicose para o seu desenvolvimento e produção. Então, a enzima levanasacarase produzida pela bactéria irá utilizar a frutose decorrente da quebra da sacarose para a formação de levana, pois, a levanasacarase liga as frutoses presentes formando pontes beta ($2 \rightarrow 6$), dando origem à cadeia de levana.

Ao utilizar a concentração inicial de sacarose de 150 g.L^{-1} , Ernandes e Garcia-Cruz (2011) relataram a máxima formação de levana pela *Z. mobilis* CCT 4494 em $42,4 \text{ g.L}^{-1}$. Valor maior do que o obtido nesse trabalho, que foi de $10,58 \text{ g.L}^{-1}$ em uma concentração inicial de sacarose de 100 g.L^{-1} .

Os autores Ferreira et al. (2019) avaliaram a maximização de levana pela linhagem *Z. mobilis* CCT 4494 com sacarose em altas concentrações e os valores demonstraram que as melhores condições para a produção em batelada ocorreram com $250,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose inicial, 100 rpm de agitação, a 25°C , pH de 4,5, durante 72 h de fermentação, resultando em $7,60 \text{ g.L}^{-1}$. Valor inferior ao obtido nesse trabalho ($10,58 \text{ g.L}^{-1}$).

Em uma fermentação com a mesma bactéria, a *Z. mobilis* CCT 4494, os pesquisadores Lorenzetti et al. (2015) obtiveram a melhor produção de levana com alto teor inicial de sacarose ($300,0 \text{ g.L}^{-1}$), foi de $18,84 \text{ g.L}^{-1}$, porém, com a bactéria imobilizada em alginato.

Assim como, Silbir et al. (2014), imobilizando a *Zymomonas mobilis* B-14023 e utilizando concentração inicial de açúcares de 150 g.L^{-1} , produziram $15,52 \text{ g.L}^{-1}$ de levana e $1,42 \text{ g.L}$ de biomassa da bactéria, em 48 h de fermentação. Estes autores testaram várias fontes orgânicas de nitrogênio e obtiveram a maior produção com extrato de levedura. O mesmo substrato utilizado como fonte de nitrogênio e de vitaminas neste trabalho.

Por meio destas pesquisas podemos observar que altas concentrações de sacarose inicial influenciaram na formação do biopolímero durante o processo fermentativo com

linhagens de *Zymomonas mobilis*, considerando as condições de fermentação empregadas em cada uma e resultaram em máxima produção do biopolímero.

Em algumas corridas realizadas, apesar da alta disponibilidade de substrato inicial (Si) presente no meio de fermentação, ocorreu baixo consumo de substrato (Sc) e elevada quantidade de AT que é dada pela diferença Si – Sc, no final das fermentações, conforme os resultados apresentados (Tabela 2). Estes consumos insatisfatórios de açúcar podem ser resultantes da osmolaridade do meio e, também, da presença de inibidores (Ernandes; Garcia-Cruz, 2011).

Os baixos valores de AR obtidos através das análises realizadas com as amostras confirmam baixa velocidade de hidrólise da sacarose, a qual parece estar associada com a formação de levana, pois *Z. mobilis* utilizou o substrato inicial para seu crescimento e para favorecer, possivelmente, a atividade da enzima levanasacarase extracelular, que converte a sacarose em frutose com ligações β (2 \rightarrow 6), formando a cadeia de levana.

Além da produção de levana pela *Z. mobilis* estar diretamente relacionada com a concentração de sacarose presente no meio, o pH inicial e a temperatura de incubação também são fatores que influenciam diretamente na produção do biopolímero pela bactéria. Segundo Ernandes e Garcia-Cruz (2010) o pH do meio deve estar entre, 4,5 e 6,5 para a *Z. mobilis*, portanto, o pH inicial deste experimento foi de 6,5.

Os mesmos autores, Ernandes e Garcia-Cruz (2011b) verificaram durante o estudo com a *Z. mobilis* CCT 4494 em meio sintético de sacarose que, com o desenvolvimento da fermentação, o pH caiu de 7,0 para 4,4; devido à formação de ácidos, porém o micro-organismo tolerou pH baixos. Resultados semelhantes quanto à variação do pH também foram observados neste experimento, pois a faixa de pH final foi entre 4,7 e 4,9 e, independente destes valores, houve a produção do subproduto levana e também o crescimento de *Z. mobilis*, nos diferentes processos fermentativos testados.

Outro fator analisado foi a produtividade e o rendimento da bactéria em diferentes valores de temperatura, agitação, concentração de sacarose e extrato de levedura, na fermentação de 24 horas (Tabela 3).

Tabela 3 – Coeficientes de rendimento e produtividade de levana produzido em meio sintético fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 durante 24 horas.

Corridas	$Y_{1,2} x/s$ (%)	$Y_1 p/s$ (%)	P_1 (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
01	0.28	6.95	0.05
02	0.24	10.82	0.21
03	1.30	24.20	0.22
04	0.27	3.49	0.06
05	0.09	8.54	0.33
06	0.13	3.18	0.19
07	0.05	3.70	0.18
08	0.19	5.53	0.32
09*	0.14	10.98	0.44
10	0.29	6.23	0.05
11	0.23	10.74	0.21
12	1.34	24.42	0.21
13	0.28	3.60	0.07
14	0.17	15.89	0.33
15	0.09	3.50	0.21
16	0.08	4.66	0.18
17	0.19	5.40	0.32
18*	0.15	10.80	0.42

*Pontos Centrais. $Y_{1,2} x/s$: Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido; $Y_1 p/s$: Coeficiente de rendimento de levana em relação ao substrato consumido; P_1 : Produtividade de levana. Tempo de fermentação: 24 horas.

Ao observar os resultados para os parâmetros de produção de levana, biomassa, açúcares totais, açúcares redutores, sacarose e pH final é perceptível uma correlação com os dados apresentados quanto ao coeficiente de rendimento e produtividade de levana

Ao observar os resultados para os parâmetros de produção de levana, biomassa, açúcares totais, açúcares redutores, sacarose e pH final (Tabela 2) é perceptível uma correlação com os dados apresentados quanto ao coeficiente de rendimento e produtividade de levana (Tabela 3), os parâmetros de cultivo do experimento 9 (100 rpm; 30°C; 100,0 de sacarose e 5,0 de extrato de levedura, em g.L⁻¹) apresentaram o maior teor de produtividade de levana, que foi de 0,44 g.L⁻¹.h⁻¹, e um rendimento de 10,98%.

Valores semelhantes foram obtidos por Silbir et al. (2014), onde a produtividade máxima de levana foi de 0,375 g.L⁻¹.h⁻¹, na 36ª hora de fermentação, o rendimento efetivo total foi de 10,30%. E também por Santos et al (2016), que obtiveram o teor de produtividade de levana em 0,39 g.L⁻¹.h⁻¹, porém, com a bactéria *Z. mobilis* CCT 4494 imobilizada em alginato. Esses valores são parecidos com o encontrado nesse trabalho, que teve produtividade de 0,44 g.L⁻¹.h⁻¹.

Em seu trabalho Ferreira (2013) obteve um rendimento maior do que o obtido nesse trabalho, foi de 20,20% para um ensaio com pH 4,5, temperatura 25°C, 24 h de fermentação da *Z. mobilis* CCT 4494 e concentração inicial de sacarose de 50 g.L⁻¹. E a maior

produtividade obtida foi de $0,35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ nas condições: pH 6,5, temperatura de 25°C , 24 h de fermentação e concentração de sacarose de 250 g/L.

Os autores Ernandes e Garcia-Cruz (2011) obtiveram o máximo valor do coeficiente de rendimento em levana ($Y_1 \text{ p/s}$) de 28,30%, valor superior ao encontrado neste trabalho que foi de 10,98%.

Conforme estudos realizados por Ernandes (2009) é importante destacar que a linhagem de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 apresentou tolerância às concentrações de substrato testadas e isto é devido à sua elevada capacidade de regulação osmótica a ao eficiente sistema de transporte de glicose. A partir do substrato utilizado, observou-se que a levana obtida da fermentação como também o crescimento de *Zymomonas*, foram proporcionais ao aumento da concentração de sacarose testada.

É muito importante considerar que diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos afetam o rendimento da fermentação. Muitas vezes, as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, afetando a conversão dos açúcares em etanol e levando a uma maior formação de produtos secundários e de biomassa, especialmente, levana, glicerol e ácidos orgânicos. Esses fatores, como temperatura, pH, espécie de micro-organismo, contaminações, devem ser controlados durante todo o processo de fermentação.

A Tabela 4 apresenta de forma resumida a avaliação da ANOVA das estimativas parcial dos efeitos; grau de significância; as correlações entre as variáveis (p) e os coeficientes da regressão para a resposta levana (Y_1) durante as fermentações de 24 horas da *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de temperatura, agitação, concentração de sacarose e de extrato de levedura.

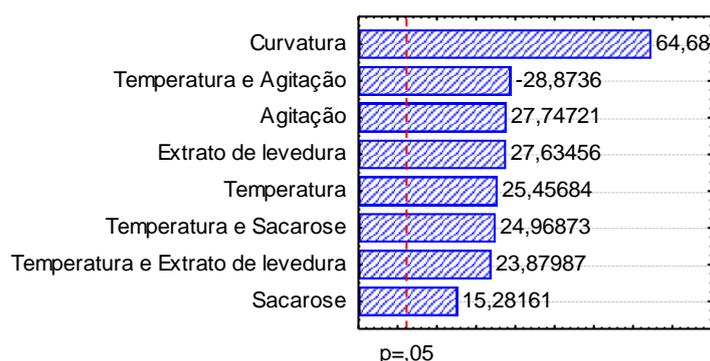
Tabela 4 – ANOVA referente a estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_1), utilizando o meio sintético fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Variáveis	Y_1		
	Efeitos	P	Coeficientes
Intercepto*	3.89000	0.000000	3.890000
X_1 *	1,69500	0,000000	0,847500
X_2 *	1,84750	0,000000	0,923750
X_3 *	1,01750	0,000000	0,508750
X_4 *	1,84000	0,000000	0,920000
$X_1 X_2$ *	-1,92250	0,000000	-0,961250
$X_1 X_3$ *	1,66250	0,000000	0,831250
$X_1 X_4$ *	1,59000	0,000000	0,795000

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (Temperatura); X_2 (Agitação); X_3 (Sacarose); X_4 (Extrato de levedura) e Y_1 (levana). Fonte: Autores.

O baixo valor de p encontrado para o intercepto levana (Y_1) indicou que os níveis foram bem escolhidos e que o coeficiente de regressão da equação que descreveu o experimento acima foi de 99,0% de confiança ($r_{Y_1}^2 = 0,9989$). Além disso, todas as variáveis independentes também foram significativas ($p < 0,05$) e, influenciaram na produção do biopolímero (Figura 1).

Figura 1 – Estimativa parcial dos efeitos para a resposta levana (Y_1) na fermentação de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de temperatura, agitação, concentração de sacarose e de extrato de levedura.



Fonte: Autores.

De todas as variáveis, a agitação (X_1) e sua combinação com a temperatura ($X_1 X_2$) foram as que mais tiveram efeito significativo em relação à produção de levana (Figura 1). A interação entre $X_1 X_2$ ocasionou efeito negativo ($Coeficiente > 0$), ou seja, quanto menor o

valor da variável temperatura maior é a concentração do produto obtido, uma vez que, obtiveram-se valor máximo de levana de 5,0 g.L⁻¹ com temperaturas inferiores a 30 °C e agitação de 150 rpm.

Assim como na pesquisa de Ferreira (2013) que levana a partir da *Z. mobilis* CCT 4494 e verificou que os melhores resultados ocorreram nas maiores concentrações de sacarose, já mencionado anteriormente, obteve a maior produtividade (0,35 g.L⁻¹) com a utilização de 250 g.L⁻¹ de sacarose em menores temperaturas. Semelhante ao observado neste trabalho, melhores resultados com altas concentrações de sacarose e a baixas temperaturas. Ainda, Ferreira (2013) obteve a maior produção de levana na temperatura de 25°C, que foi de 9,91 g.L⁻¹, e a sua menor produção foi 1,38 g.L⁻¹ de levana ao elevar a temperatura em 35°C. Portanto, a maior produtividade foi em temperatura baixa, 25°C, e a 35° foi encontrada a menor produtividade.

Todas as concentrações de extrato de levedura (2,5; 5,0 e 7,0 g.L⁻¹) influenciaram na síntese do biopolímero, sendo que este foi proporcional ao aumento da variável. A concentração ótima do extrato de levedura para produção de levana foi entre 5,0 e 7,5 g.L⁻¹ de extrato quando associada à agitação nos valores entre 100 e 150 rpm.

O extrato de levedura é composto por vitaminas como o ácido pantotênico, ácido nicotínico, biotinina, tiamina e piridoxina e também por nitrogênio, que são essenciais para o crescimento celular e um fator estimulante para a formação de levana (De Oliveira et al., 2007).

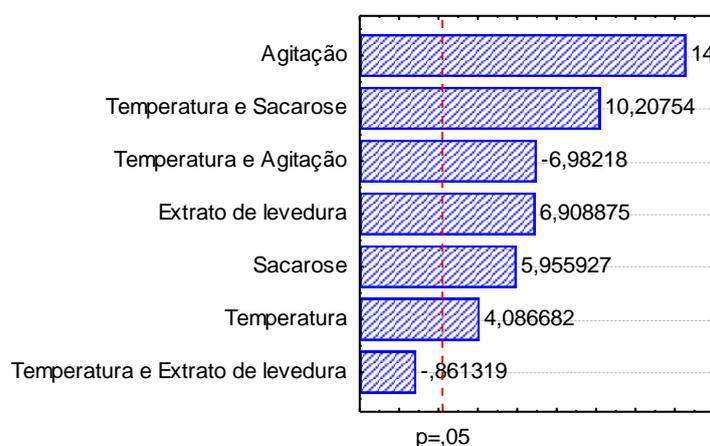
Tabela 5 – ANOVA referente à estimativa parcial dos efeitos, *p* e os coeficientes de regressão para biomassa, utilizando o meio sintético acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de temperatura, agitação, concentração de sacarose e de extrato de levedura.

Variáveis	Biomassa		
	Efeitos	P	Coefficientes
Intercepto*	0.162444	0.000000	0.162444
X ₁ *	0,027875	0,002191	0,013937
X ₂ *	0,099375	0,000000	0,049687
X ₃ *	0,040625	0,000140	0,020313
X ₄ *	0,047125	0,000041	0,023563
X ₁ X ₂ *	-0,047625	0,000038	-0,023813
X ₁ X ₃ *	0,069625	0,000001	0,034813
X ₁ X ₄	-0,005875	0,409240	-0,002937

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo (*p*<0,05). X₁ (Temperatura); X₂ (Agitação); X₃ (Sacarose); X₄ (Extrato de levedura). Fonte: Autores.

De acordo com o relatado, observou-se que a agitação foi a que mais influenciou significativamente ($p < 0,05$) no crescimento da cepa bacteriana, assim como ocorreu para a síntese de levana (Tabela 5). A temperatura de incubação, quando associada à sacarose ($X_1 X_3$) e à agitação ($X_1 X_2$), também proporcionou efeito significativo no desenvolvimento celular, seguido pelo extrato de levedura (X_4) e sacarose (X_3) (Figura 2).

Figura 2 – Estimativa parcial dos efeitos para a biomassa na fermentação de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de temperatura, agitação, concentração de sacarose e de extrato de levedura.



Fonte: Autores.

O efeito da combinação binária temperatura e agitação ($X_1 X_2$) foi negativo (*Coefficiente* < 0) não somente para a síntese do biopolímero como também para o crescimento de *Z. mobilis* CCT 4494. A massa celular foi inversamente proporcional aos valores de temperatura testados (25,0; 30,0 e 35,0°C). Obteve-se valor máximo de biomassa de 0,22 g.L⁻¹ entre 26 e 28°C, considerada esta como a região ótima de temperatura.

A biomassa e a síntese de levana foram proporcionais ao aumento da concentração de sacarose. Acima de 140,0 g.L⁻¹ de substrato e 140 rpm, a produção de ambos aumentou para 0,22 g.L⁻¹ e 5,0 g.L⁻¹, respectivamente, quando comparados aos demais valores testados de sacarose e agitação.

A autora Ferreira (2013) relatou que a massa do biopolímero reduziu aproximadamente 34% quando a temperatura de fermentação passou de 25°C para 35°C.

Ao se utilizar 7,5 g.L⁻¹ do extrato de levedura, foi obtido a maior produção de biomassa da bactéria, no experimento 12 proporcionou 0,29 g.L⁻¹, referente as seguintes condições de cultivo: 150 rpm, por 24 horas; pH 6,5; temperatura 25°C; sacarose 50,0 e

extrato de levedura 7,5 g.L⁻¹. O desenvolvimento da bactéria foi proporcional ao aumento da concentração de extrato de levedura, o mesmo ocorreu em relação à síntese de levana. As maiores taxas de crescimento foram na região ótima de 7,5 g.L⁻¹ de extrato e acima de 140 rpm.

4. Conclusão

Todas as variáveis estudadas foram significativas para a produção de levana e para o crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494. O produto obtido da fermentação, assim como, o crescimento bacteriano foram proporcionais ao aumento da concentração de fonte de carbono (sacarose) e, a agitação e sua combinação com a temperatura foram as mais significativas à síntese do exopolissacarídeo.

Ao se aumentar a concentração do substrato foi aumentada a produção do biopolímero, a melhor concentração utilizada foi de 150 g.L⁻¹.

A concentração ótima do extrato de levedura para a produção de levana foi entre 5,0 e 7,5 g.L⁻¹ de extrato, quando associada à agitação nos valores entre 100 e 150 rpm. Portanto, a concentração que resultou nos melhores resultados foi de 7,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura.

Para a variável temperatura, quanto menor o valor maior é a concentração do produto obtido. A temperatura entre 26 e 28°C, foi considerada esta como a região ótima de temperatura.

Referencias

Box, G. E. P., Hunter, W. G. (1978). Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building. John Wiley & Sons.

Cunha, P. L. R. (2009). Quim. Nova. 32, 649.

De Oliveira, M. R., Da Silva, R. S. S. F., Buzato, J. B., & Celligoi, M. A. P. C. (2007). Biochem. Eng. J. 37, 177.

Dubois, M., Gilles, K. A., & Hamilton, J. K. (1956). Analytical Chemistry. 28, 356.

Ernandes, F. M. P. G., & Garcia-Cruz, C. H. (2009). Acta Scientiarum Technology. 31, 41.

- Ernandes, F. M. P. G., & Garcia-Cruz, C. (2010). *Acta Scientiarum Technology*. 32, 26.
- Ernandes, F. M. P. G., & Garcia-Cruz, C. H. (2011). *Ciênc. agrotec.* 35, 354.
- Ernandes, F. M. P. G., & Garcia-Cruz, C. H. (2011b). *Journal of Engineering and Technology*., 1(2), 47-56.
- Ferreira, J. (2013). *Produção de levana e bioetanol utilizando cascas de banana por *Zymomonas mobilis**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil.
- Ferreira, J., Santos, V. A. Q., Calegari, G. C., Garcia-Cruz, C. H. (2019). *The Electronic Journal of Chemistry*. 11.
- Lima, U. A. (2019). *Coleção Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Editora Edgard Blucher.
- Lorenzetti, M. F. S., Moro, M. R., Garcia-Cruz, C. H. (2015). *Journal of Food Process Engineering*. 38, 36.
- Nelson, N. A. (1944). *Biochemistry*. 153, 380.
- Parker, C., Peekhaus, N., Zhang, X., Conway, T. (1997). *Appl. Environ Microbiol.* 63, 3519.
- Santos, V. A. Q., Garcia-Cruz, C. H. (2016). *Acta Scientiarum Technology*. 38, 263.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., Goksungur, Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., & Goksungur, Y. (2014). *Carbohydrate Polymers*. 99, 454.
- Somogyi, M. (1952). *Journal of Biological Chemistry*. 195, 19.
- Statsoft, I. N. C. (1996). *Program of Calculus and Graphics Statistics*.

Sutherland, I. W. (1972). *Advances in Microbial Physiology*. 8, 213.

Porcentagem de contribuição por autor no manuscrito

Letícia Biazzi de Lima – 11,11%

Mariane Daniella da Silva – 11,11%

Talita Garcia Lopes Viçoso – 11,11%

Maria Laura Ferreira Martins – 11,11%

Jaciara Jesus Silva – 11,11%

Jesley Pires Tomaz Silva – 11,11%

Simone Aparecida Biazzi de Lapena – 11,11%

Crispin Humberto Garcia Cruz – 11,11%

Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes – 11,11%