

## **Produção de Levana por *Bacillus subtilis* natto utilizando Melão de Cana-de-Açúcar**

**Janaina Mantovan<sup>1</sup>, Dieyssi Santos Alves<sup>1</sup> e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia  
Caixa Postal 10011 – CEP 86057-970 Londrina – PR - E-mail: macelligoi@uel.br

### **RESUMO**

A levana é um exopolissacarídeo de frutose sintetizado pela levanasacarase em meio com sacarose. Esse polímero possui aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, entre outras. Estudos relatam que alguns sais podem estimular a atividade da enzima e produção da levana. O melão de cana de açúcar é um substrato rico em sacarose, de baixo custo comercial e de fácil obtenção. Assim, o objetivo deste trabalho foi aplicar o melão de cana de açúcar e testar a eficiência do Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na produção de levana por *B. subtilis* natto CCTT 7712. Os resultados indicaram que o melão pode ser uma alternativa e o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mostrou ser um sal capaz de estimular a produção do polissacarídeo.

**Palavras-chave:** levana. melão de cana-de-açúcar. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **INTRODUÇÃO**

A levana é um homopolímero de frutose formado por ligações  $\beta$ -2 $\rightarrow$ 6, e é produzida pela reação de transfrutossilação através da levanasacarase, tendo sacarose como indutor. As aplicações na indústria alimentícia são diversas, como estabilização de espessantes, agentes de emulsão e modificadores de sabor. A levana pode ser usada ainda como substituinte do açúcar devido as baixas calorias e também atua auxiliando a microflora intestinal, já que é um estimulante da proliferação de bactérias probióticas. Apresenta aplicações também nas indústrias farmacêuticas e cosméticas<sup>1</sup>.

*Bacillus subtilis* Natto é uma bactéria capaz de produzir levana de alto peso molecular, quando cultivado em meio contendo sacarose e outros nutrientes que estimulam o crescimento celular e tem sido amplamente estudado, pois apresenta vantagens de alta produção e nas características do produto que pode ser utilizado industrialmente<sup>2</sup>.

Diversos fatores podem influenciar a atividade enzimática e o crescimento do microrganismo, como a fonte de carbono e sua concentração, fonte de nitrogênio, oxigenação do meio de fermentação, temperatura, variação de pH e sais presentes no meio<sup>3</sup>.

A busca pela otimização na produção da levanasacarase levou a observação de uma possível estimulação na síntese de levana em adição de sais, entre eles estão o NaCl, KCl<sup>4</sup>, HgCl<sub>2</sub><sup>5</sup>, e Fe<sup>2+6</sup>.

A busca por fontes de carbono provenientes de resíduos agroindustriais podem diminuir os custos de produção. Alguns exemplos de resíduos usados em diversos estudos biotecnológicos são: caldo de cana-de-açúcar<sup>7</sup>, melão de cana-de-açúcar<sup>8</sup>, melão de beterraba<sup>9</sup> e silagem de arroz<sup>10</sup>.



### MATERIAL E MÉTODOS

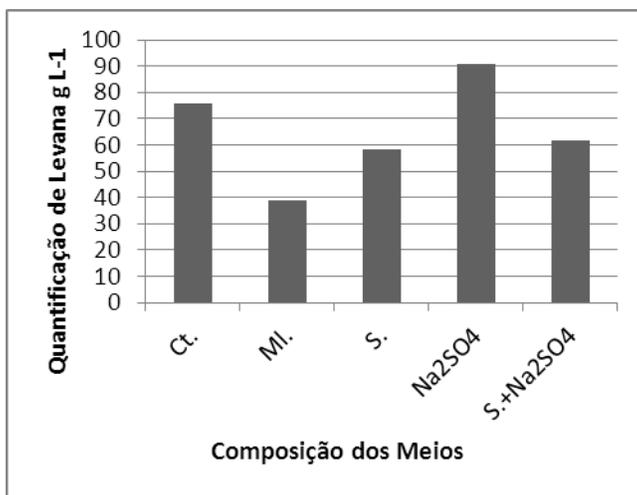
O microrganismo utilizado foi o *Bacillus subtilis natto* CCTT 7712. As fermentações foram realizadas a 250g/L<sup>-1</sup> de açúcares totais nos meios: (1) melão (2) melão + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>; MnSO<sub>4</sub>; Amônio Citrato e extrato de levedura (3) melão + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4M (4) melão + todos os sais. O melão utilizado foi suplementado com sacarose comercial, de forma que 25% dos açúcares foram provenientes do melão e 75% da sacarose. O controle foi com sacarose comercial. As fermentações foram em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL dos meios, a 160 rpm; pH 7,5 ; 37° C por 24 h (condição previamente otimizada).

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 15000 rpm durante 15 min. As células foram ressuspensas em solução salina (NaCl a 0,9 g %<sup>-1</sup>). A produção de levana das fermentações foi determinada através do sobrenadante de precipitação por 12 h com etanol absoluto. A levana precipitada foi ressuspensa em 1 mL de HCl 0,1 M e hidrolisada por 1 h a 100° C, resfriada e neutralizada com 0,1 mL de NaOH 2 M. A concentração de levana foi quantificada pelo método Somogyi-Nelson, através de açúcares redutores.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que os diferentes meios de cultivo (Figura 1) influenciaram na produção de levana, de forma que, apenas o meio contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi positivo. O meio 1 contendo apenas melão (MI) representou a menor produção com uma queda de aproximadamente 50% em relação ao controle. O meio 2 contendo melão e sais (S.) diminuiu a produção do polissacarídeo em 23% . O meio 4 que continha todos os sais (S+Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) também foi inferior ao controle, mas a produção de levana foi apenas 18,6% menor que o controle. Já o meio 3 com melão e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> representou a melhor produção de levana, superando o controle, com um aumento de 20%.

Figura 1. Quantificação de levana produzida por *B. subtilis* em diferentes meios de cultivo.



### CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, apenas o meio 3 com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi positivo para produção da levana.

### REFERÊNCIAS

- (1) CHUNG-JEN, C.; JEN-YOU, W.; PO-TING, C.; YUN-PENG, C. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 3, n. 3, p. 445-451, 2009.
- (2) SHIH, I-L.; SHIEH, C-J.; HSIEH, C-Y. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8211-8215, 2005.
- (3) ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 71-82, 2005.
- (4) VIGANTS, A.; KRUCZAK, R.; BEKERS, M.; ZIKMANIS, P. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 11, p. 1017-1019, 1998.
- (5) PAUL, A.; SAMADDAR, N.; DUTTA, D.; BAGCHI, A.; CHAKRAVORTY, S.; CHAKRAVORTY, W.; GACHHUI, R. Mercuric ion stabilizes levansucrase secreted by *Acetobacter nitrogenifigens* strain RG1T. **Protein Journal**, v. 30, p. 262-272, 2011
- (6) BELGHITH, KS.; DAHECH, I.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 451- 458, 2012.
- (7) BORSARI, R. R. J.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 604-609, 2006.
- (8) CAZETTA, M.L., et al. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 747-751, 2005.
- (9) BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPIDE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 979-986, 2001.
- (10) YILMAZ, M.; CELIK, G.; ASLIM, B. ;ONBASILI, D. Influence of Carbon Sources on The Production and Characterization of The Exopolysaccharide (EPS) by *Bacillus sphaericus* 7055 Strain. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 20, p. 152-156, 2012.