

Produção e Caracterização de Levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto

**Gabrielly Terassi Bersaneti¹, Janaina Mantovan¹, Dionísio Borsato² e
Maria Antonia P. Colabone Celligoi¹**

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

²Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Química

Caixa Postal 10011 – CEP 86.057.970 Londrina – Paraná - E-mail: gaby_terassi@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir levanasacarase de Bacillus subtilis natto e avaliar os parâmetros cinéticos pH e temperatura e o efeito da concentração do substrato sacarose na atividade enzimática. A atividade de hidrólise da levanasacarase no extrato bruto obtido do cultivo de B. subtilis natto, após 24 h, 150 rpm e 37°C foi de 18,7 U/mL. A caracterização parcial demonstrou que as condições ótimas de reação da enzima foram pH 6,0 e 50°C. O Km para sacarose foi de 20mM.

Palavras-chave: levanasacarase; *Bacillus subtilis* natto; caracterização enzimática, fermentação.

INTRODUÇÃO

A levanasacarase (EC 2.4.1.10) pertence à família 68 das hidrolases glicosídicas e são conhecidas por catalisar três reações distintas: hidrólise, transfrutossilação e polimerização (CANTAREL et al., 2009), quando o substrato é a sacarose ocorre a liberação de frutose que é convertida em fruto-oligossacarídeos e levana por reação de transfrutossilação em liberação de resíduo de glicose (GORREC et al., 2002).

As condições de fermentação tais como a concentração de substrato, temperatura e pH entre outros, são de grande importância pois podem afetar diretamente a produção de levanasacarase extracelular (LI et al., 2014; GONÇALVES et al., 2013; INTHANAVONG, 2011).

Em processos biotecnológicos o *B. subtilis* tem potencial de aplicação devido ao seu metabolismo com alta capacidade de multiplicação e secreção de proteínas extracelulares (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo produzir levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto e avaliar a influência do pH, temperatura e o efeito da concentração do substrato sacarose na atividade de hidrólise da enzima. Melhorando o conhecimento bioquímico e dessa enzima para auxiliar sua aplicação industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus subtilis* natto. Meio do inóculo composto por (g L⁻¹): sacarose, 100; extrato de levedura, 2; fosfato monopotássico, 2; sulfato de amônio, 1 e sulfato de magnésio, 0,5.

O inóculo foi padronizado a $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de células e o meio de fermentação composto por (g L^{-1}): sacarose, 420,7; extrato de levedura, 2; fosfato monopotássico, 1; sulfato de amônio, 3; sulfato de magnésio, 0,6; sulfato de manganês, 0,2 e amônio citrato, 0,25 (condição pré otimizada em menor escala). A fermentação foi realizada em Erlenmeyer de 2 L com 500 mL do meio de fermentação, em mesa agitadora com 150 rpm, 24 h, 37°C e pH fixo em 8,0.

A fermentação foi interrompida por centrifugação a $9.050 \times g$ por 15 min a 4°C . O sobrenadante foi denominado de extrato bruto (EB) e utilizado como fonte de levanasacarase. A atividade de hidrólise de levanasacarase foi determinada com 250 μL de EB, 250 μL de sacarose (1 mol L^{-1}), 500 μL de tampão acetato (50 mmol L^{-1}), pH 5,0 incubados por 30 min à 30°C (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999). Os resultados foram expressos em U/mL, sendo (U) uma unidade de atividade de hidrólise da levanasacarase.

Para caracterizar a enzima foram utilizados tampões com pH de 3,0 a 9,0 e as temperaturas variaram de 30 a 90°C . O efeito da concentração de sacarose na atividade de levanasacarase foi determinado nas condições ótimas de reação pH 6,0 a 50°C . O valor de K_m foi determinado pelo método de Lineweaver-Burk descrito por Marzocco; Torres (1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de hidrólise da levanasacarase no extrato bruto obtido do cultivo de *B. subtilis* natto, após 24 h, 150 rpm a 37°C foi de $18,7 \text{ U/mL}$. A influência do pH na atividade da levanasacarase está representada na Figura 1 e a maior atividade foi de $22,6 \text{ U/mL}$ em pH 6,0, Meng; Futterer (2003) e Ammar et al. (2002) também relataram pH ótimo de 6,0 para a enzima produzida por *Bacillus subtilis* e *Bacillus* sp. TH4-2.

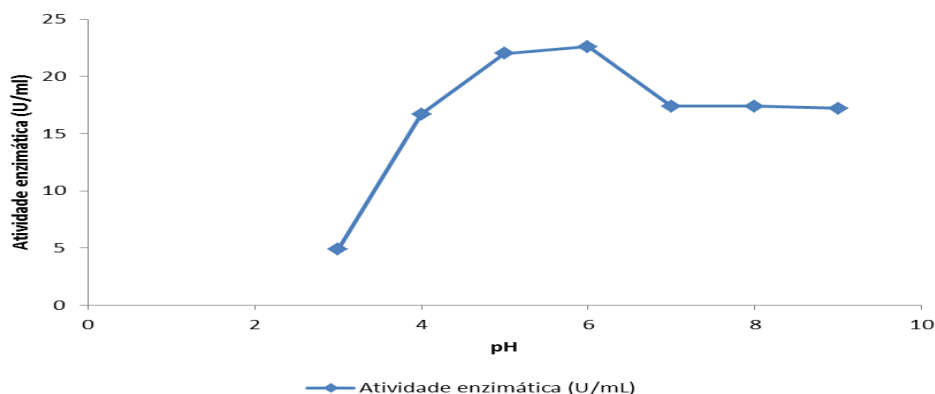


Figura 1. Efeito do pH na atividade de hidrólise da levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto

Dentre as temperaturas utilizadas, 50°C foi a melhor para atividade de hidrólise atingindo $26,4 \text{ U/mL}$ (Figura 2). Caputi et al. (2013) relataram que a enzima levanasacarase de *Erwinia amylovora* é ativa em uma ampla gama de temperatura, mas apresentou ótima atividade de hidrólise em 50°C . Em estudos realizados por Belghith et al. (2012) demonstraram a máxima atividade de levanasacarase, de *Bacillus* sp foi em 50°C mantendo 100% de sua atividade

original por mais de 1h. Também é possível visualizar na Figura 2 que o aumento da temperatura (acima de 50°C) faz com que a atividade enzimática caia drasticamente.

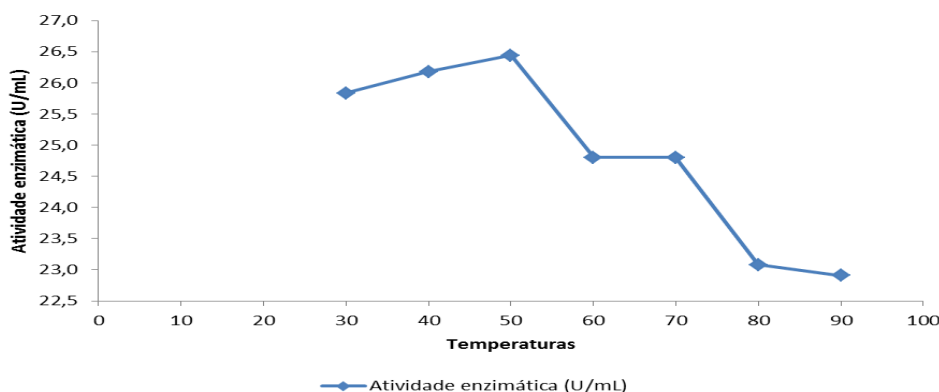


Figura 2. Efeito da temperatura na atividade de hidrólise da levanasacarase por *Bacillus subtilis* natto.

O Km da levanasacarase para sacarose foi de 20 mM e esse valor está compatível aos valores de Km reportados na literatura que variam de 4,0 e 160 mM para *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Zymomonas mobilis* (CHAMBERT; TREBOUL; DEDONDER, 1974; HOMANN et al., 2007; GOLDMAN et al., 2008).

CONCLUSÕES

No pH ótimo (6,0) a atividade de hidrólise da levanasacarase aumentou 21 % em relação ao valor obtido no extrato bruto. Esse dado associado à temperatura ótima (50 °C) o valor obtido foi ainda maior 41 %. Estas informações foram relacionadas ao Km para a sacarose (20 mM), e são úteis para futuras aplicações industriais da enzima.

REFERÊNCIAS

- AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; IIZUKA, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA, N. Caracterization of a thermostable levansucrase from Bacillus sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**, v.99, p.111-119, 2002.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by Zymomonas mobilis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, p.291-297, 1999.
- BELGHITH, K. S.; 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.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J S.; MORSE, S. A. Os estafilococos. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.62-158, 2000.
- CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v.37, p.233-238, 2009.



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

- CAPUTI, L.; NEPOGODIEV, S. A.; MALNOY, M.; REJZEK, M.; FIELD, R. A.; BENINI, S. Biomolecular characterization of the levansucrase of *Erwinia amylovora*, a promising biocatalyst for the synthesis of fructooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61(50), p.12265–73, 2013.
- CHAMBERT, R.; TREBOUL, G. ; DEDONDER, R. Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. **European Journal of Biochemistry**, v.41, p.285–300, 1974.
- GOLDMAN, D.; LAVID, N.; SCHWARTZ, A.; SHOHAM, G.; DANINO, D.; SHOHAM, Y. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase. An ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.32209–32217, 2008.
- GONÇALVES, B. C. M.; MANTOVAN, J.; LÚCIA, M.; RIBEIRO, L.; BORSATO, D.; CELLIGOI, P. C. Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* Natto CCT 7712. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**. v.02, p.001-008, 2013.
- GORREC, K.; CONNES, C.; GUIBERT, A.; URIBELARREA, J. L.; COMBES, D. Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 and 11872 supernatant. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.44-52, 2002.
- HOMANN, A.; BIEDENDIECK, R.; GÖTZE, S.; JAHN, D. SEIBEL, J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry Journal**, v.407, p.189- 198, 2007.
- INTHANAVONG, L. **Production and Characterization of the Fructosyltransferase (Levansucrase) from *Geobacillus stearothermophilus* and its Application for the Synthesis of Novel Fructooligosaccharides**. Tese de doutorado, McGill University, Montreal, Canada, 2011.
- LI, R.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W.; MIAO, M. Purification and characterization of an intracellular levansucrase derived from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. **Wiley Online Library**, p.1–29, 2014.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica Básica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 1999.
- MENG, G. Y.; FÜTTERER, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. **Nature Structural Biology**, v.10, p.935-941, 2003.