

Produção de Levana e Levanasacarase Utilizando Subprodutos Agroindustriais como Fonte de Nitrogênio

Janaina Mantovan¹, Gabrielly Terassi Bersaneti¹, Isadora Cernach Carneiro da Fontoura¹ e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi¹

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

RESUMO

*O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes subprodutos agroindustriais (soro de leite, proteína de soja e milhocina) como fontes alternativas de nitrogênio, para aumentar a produção de levana e levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto. Foram testadas diferentes concentrações das fontes e comparadas ao extrato de levedura. A produção de levana foi maior, quando utilizada proteína de soja a 2 e 6 g.L⁻¹ e soro de leite a 6 g.L⁻¹. Entre as fontes alternativas de nitrogênio, a proteína de soja a 6 g.L⁻¹ foi a melhor para atividade da levanasacarase. Os subprodutos testados podem ser uma alternativa viável para aumentar a produção de levana e reduzir custos.*

Palavras-chave: Levana, Levanasacarase, Soro de Leite, Proteína de Soja.

INTRODUÇÃO

A levana é um polissacarídeo extracelular constituído por resíduos de D-frutose, unidos por ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 6), podendo ainda apresentar pontos de ramificações β -(2 \rightarrow 1) e um resíduo de glucose terminal (ARVIDSON, RINEHART e GADALA-MARIA, 2006). Pode ser produzida por diversas bactérias, destacando o *Bacillus subtilis* natto, por sua eficiência.

Dahech et al. (2012) descreveram que a levanasacarase produz levana através da transferência do grupo frutossil da sacarose para uma cadeia de frutanas (reação de transfrutossilacção). Esse polissacarídeo apresenta diversas características importantes como, alta viscosidade; solubilidade em água e óleo; estabilidade ao calor; aos ácidos e bases; atuando como agente estabilizador; emulsificante; espessante e encapsulante o que torna de grande aplicação em industriais (BEKERS et al., 2005).

Diversos fatores como as fontes de carbono e nitrogênio, oxigenação, temperatura, pH e sais podem influenciar a atividade enzimática e a produção de levana (ERNANDES; CRUZ, 2005). O extrato de levedura é utilizado como principal fonte de nitrogênio, devido a sua composição (BEKERS et al., 2002). No entanto, seu alto custo pode inviabilizar a aplicação em processos de escala industrial, assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de fontes alternativas de nitrogênio (soro de leite, proteína de soja e milhocina) para produção de levana e levanasacarase por *B. subtilis* natto.

MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus subtilis* natto. O meio de fermentação foi composto por (g.L⁻¹): Sacarose comercial 250; KH₂PO₄ 1,0; (NH₄)₂SO₄ 3,0; MgSO₄(7H₂O) 0,6; MnSO₄ 0,2; Citrato de Amônio 0,25. E as fontes de nitrogênio foram: soro de leite, proteína de soja e

milhocina, nas concentrações de 2, 4 e 6 g.L⁻¹. As fermentações foram em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio de fermentação com as diferentes fontes de nitrogênio, a 160 rpm; pH 7,5 ; 37° C por 24 h. O controle foi com extrato de levedura a 2 g.L⁻¹ (condição previamente otimizada).

As fermentações foram interrompidas por centrifugação a 9.050 x g por 15 min. A biomassa foi quantificada por turbidimetria a $\lambda = 400$ nm e comparada a uma curva de biomassa em g.L⁻¹, a levana foi determinada após precipitação do sobrenadante com etanol absoluto por 12 horas, hidrolisada com 1 mL de HCl 0,1 M por 1 h a 100° C e neutralizada com 0,1 mL de NaOH 2 M, quantificada como açúcares redutores por Somogyi-Nelson.

A atividade da levanasacarase foi determinada do sobrenadante da fermentação, pela medida de formação de levana. Foram utilizados 0,25 mL do sobrenadante (extrato bruto) para reagir com 0,25 mL de uma solução de sacarose 1M em 0,5 mL de tampão acetato pH 5,0, incubada por 2 h a 30°C. A reação foi interrompida em banho fervente por 10 min e a levana foi determinada através de açúcares redutores por Somogyi-Nelson. A atividade da enzima foi expressa em UA, uma unidade de atividade de formação de levana é expressa pela quantidade de enzima necessária para a polimerização de 1 μ mol de frutose em 1 min sob as condições experimentais (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999).

A análise estatística foi realizada através do teste de Tukey, utilizando o programa SASM-Agri versão 8.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças estatísticas entre os meios foram representadas pelas letras, a; b; c; d; e; f; g. A Figura 1 mostra a produção de levana variando as fontes de nitrogênio. As maiores produções de levana (a), 86,4; 85,0 e 81,3 g.L⁻¹; ocorreram nos meios com soro de leite a 6 g.L⁻¹ e proteína de soja a 6 e 2 g.L⁻¹, respectivamente. Que comparado ao extrato de levedura (57 g.L⁻¹), ocorreu um aumento significativo de até 52%.

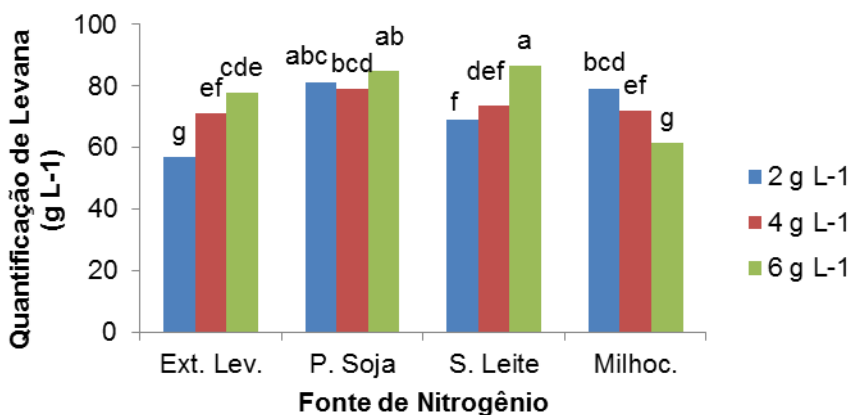


Figura 1 – Produção de levana por *Bacillus subtilis* natto variando as fontes de nitrogênio. Letras iguais não diferem estatisticamente.

Apenas a milhocina foi inferior ao controle, quando em 6 g.L⁻¹. Silbir et al., (2014) constataram que o extrato de levedura a 2,5 g.L⁻¹ foi a melhor fonte para a produção de levana (15,52 g.L⁻¹), no entanto a milhocina pôde ser considerada uma alternativa viável (13,91 g.L⁻¹).

A Figura 2 apresenta a atividade da levanasacarase nas diferentes fontes de nitrogênio. O meio controle com extrato de levedura (2 g.L^{-1}) foi onde ocorreu a maior atividade ($7,0 \text{ UA}$), porém em maiores concentrações possui efeito inibitório. Belght et al., (2012) avaliaram a levanasacarase de *Bacillus sp*, relatando que o extrato de levedura, dentre as diversas fontes de nitrogênio estudadas (triptona, caseína, ureia, sulfato de amônio, nitrato de sódio e amônio) foi o mais influente na produção.

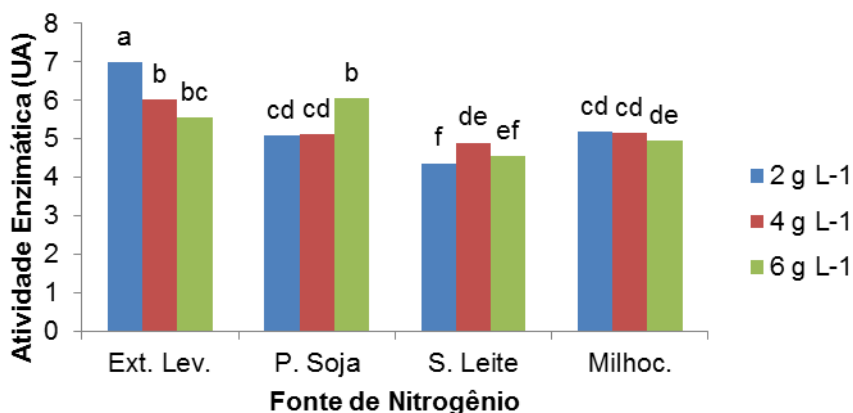


Figura 2 – Levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto em diferentes fontes de nitrogênio.
Letras iguais não diferem estatisticamente.

No meio com proteína de soja (6 g.L^{-1}) obteve-se a melhor atividade ($6,06 \text{ UA}$), no entanto, cerca de 13,4% inferior ao controle. A milhocina reduziu a atividade em 29,3% e o soro de leite em 37,5%. Esses dados são semelhantes aos de Abdel-Fattah; Mahmoud e Esawy (2005), onde a proteína de soja diminuiu a produção do polissacarídeo em aproximadamente 16,6% e a milhocina 23,3%.

CONCLUSÕES

Os dados mostraram que fontes de nitrogênio, provenientes de subprodutos agroindustriais podem ser uma alternativa viável para a produção de levana e levanasacarase. O soro de leite se destacou com uma produção de $86,4 \text{ g.L}^{-1}$ na concentração de 6 g.L^{-1} . A melhor atividade da levanasacarase, entre os meios com fonte alternativa de nitrogênio, foi em proteína de soja (6 g.L^{-1}), atingindo UA de $6,06 \text{ UA}$.

Agências de Fomento: CAPES, CNPq.

REFERÊNCIAS

AHMED, A. F.; MAHMOUD, D. A. R.; ESAWY, M. A. T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* nrc 33a and enzymic synthesis of levan and fructooligosaccharides. **Current Microbiology**, v. 51, p. 402-407, 2005.



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUANASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 214-217, 1999.
- ARVIDSON, S. A.; RINEHART, B. T.; GADALA-MARIA, F. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus sp.* **Carbohydrate polymers**, v.65, p.144-149, 2006.
- BECKERS, M.; LAUKEVICS, J.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; VIGANTS, A.; VIESTURS, U.; PANKOVA, L.; DANILEVICS, A. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 701-706, 2002.
- BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1535-1539, 2005.
- 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.
- DAHECH, I.; BELGHITH, K.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. international. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 329 - 335, 2012.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 71-82, 2005.
- ESAWY, M. A.; AHMED, E. F.; HELMY W. A.; MANSOUR, N. M.; EL-SENOUSY, W. M.; EL-SAFY, M. M. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 823-830, 2011.
- NELSON, N. A. A. Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Biochemistry**, Cincinnati, v.153, p. 375 - 380,1944.
- SELIM SILBIRA, S.; DAGBAGLIB, S.; YEGINA, S.; BAYSALA, T.; GOKSUNGURA, Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 454-461, 2014.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, v. 160, p.61-68, 1952.