

## **Biossíntese de levana de alto peso molecular por levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto**

**Isadora Cernach Carneiro da Fontoura<sup>1</sup>, Gabrielly Terassi Bersaneti<sup>1</sup>, Hanny Cristina Braga Pereira<sup>1</sup>, Janaina Mantovan<sup>1</sup>, Agnes Magri<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 10.101 – CEP 86057-970 - Londrina – PR - E-mail: isaacernach1@gmail.com

### **RESUMO**

*A levanasacarase, enzima extracelular que pode ser obtida de Bacillus subtilis natto, é uma frutossiltransferase bifuncional responsável por produzir levanas de alto e baixo peso molecular. Essa enzima pode ser obtida através do processo fermentativo. O Objetivo desse trabalho foi avaliar síntese enzimática de levana por Delineamento Composto Central Rotacional, variando o tempo e a proporção de extrato enzimático e sacarose. Os resultados demonstraram que em maior tempo e em menor proporção de extrato enzimático/sacarose ocorreu a maior síntese enzimática atingindo 37,78 g/L.*

**Palavras-chave:** levanasacarase; enzima; levana; *Bacillus subtilis*

### **INTRODUÇÃO**

*Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva e formadora de esporos que pode crescer em meio contendo fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e outros sais essenciais. Tem sido amplamente estudada para a produção de levanasacarase, uma enzima extracelular, que sintetiza levana de alta e baixa massa molecular, quando são alteradas as condições de fermentação. Essa enzima é uma frutossiltransferase bifuncional que promove a hidrólise da sacarose e catalisa a formação de levana e fruto-oligossacarídeos (Hijum, 2003 e SILVA, 2012).

A interação entre o substrato (sacarose) e a enzima ocasiona a reação de transfrutossilacção pela levanasacarase que polimeriza as unidades de frutose levando a formação de levana microbiana. Esse processo de polimerização origina cadeias com tamanhos moleculares variados desde oligossacarídeos que tem menor grau de polimerização, até os polissacarídeos que apresentam um alto grau.

A levana tem uma variedade de aplicações principalmente, nas áreas de alimentos e farmacêutica devido às suas propriedades físicas e as suas funções biológicas. Essas propriedades refletem suas funções que é diretamente dependente de seu peso molecular e sua estrutura.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a síntese enzimática da levana pela levanasacarase variando a concentração do extrato enzimático e da sacarose em diferentes tempos de reação.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

**Microrganismo:** *Bacillus subtilis natto*, isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia, Campinas – SP. O microrganismo foi mantido a 4 °C em meio inclinado, sendo o repique realizado a cada 30 dias.

**Meio de Inoculo:** O meio de inoculo: contendo 25 mL de meio composto por 100 g/L de sacarose, 2 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de  $K_2PO_4$ , 1 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$  e 0,5 g/L de  $MgSO_4(H_2O)$  foi preparado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL. O meio foi ajustado a pH= 7,0, incubado por 24 h em shaker rotatório, à 37 °C e 150 rpm (rotações por minuto).

**Meio de fermentação:** O meio de fermentação: 400 g/L sacarose, 2 g/L de extrato de levedura, 1 g/L  $K_2PO_4$ , 3 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,6 g/L de  $MgSO_4(H_2O)$ , 0,2 g/L de  $MnSO_4$  e 0,25 g/L de amônio citrato. As fermentações foram realizadas em Erlermeyers de 2 L, contendo 400 mL, pH=7,7, 35 °C e 240 rpm por 24 h. O inoculo foi padronizado em 0,2 g/L para a fermentação.

**Atividade Enzimática:** Após a fermentação, o meio foi centrifugado por 15 min, a 9000 rpm e 4 °C, o sobrenadante foi considerado o extrato enzimático. A atividade enzimática nesse extrato foi de 4UA/ml. Para avaliação da síntese enzimática foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com duas variáveis e 6 pontos centrais, totalizando 14 ensaios. As variáveis tempo (X1) e proporção de extrato enzimático/sacarose (X2) foram testadas em 5 níveis (-1,414; -1; 0; 1; 1,414), correspondendo à faixa de 8 a 27,312 h para o tempo e 1:2 a 1:4,414 para a proporção extrato enzimático/sacarose (Tabela 1). A variável resposta (Y1) foi levana de alta massa molar (a levana foi extraída do meio de fermentação com etanol na proporção 1:1,15), esta proporção foi padronizada para obter levana de alta massa. As levanas foram quantificadas após hidrólise por açúcares redutores pelo método de Somogyi e Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944).

Os dados foram submetidos à Análise de Variância com  $P \leq 0,05$  e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

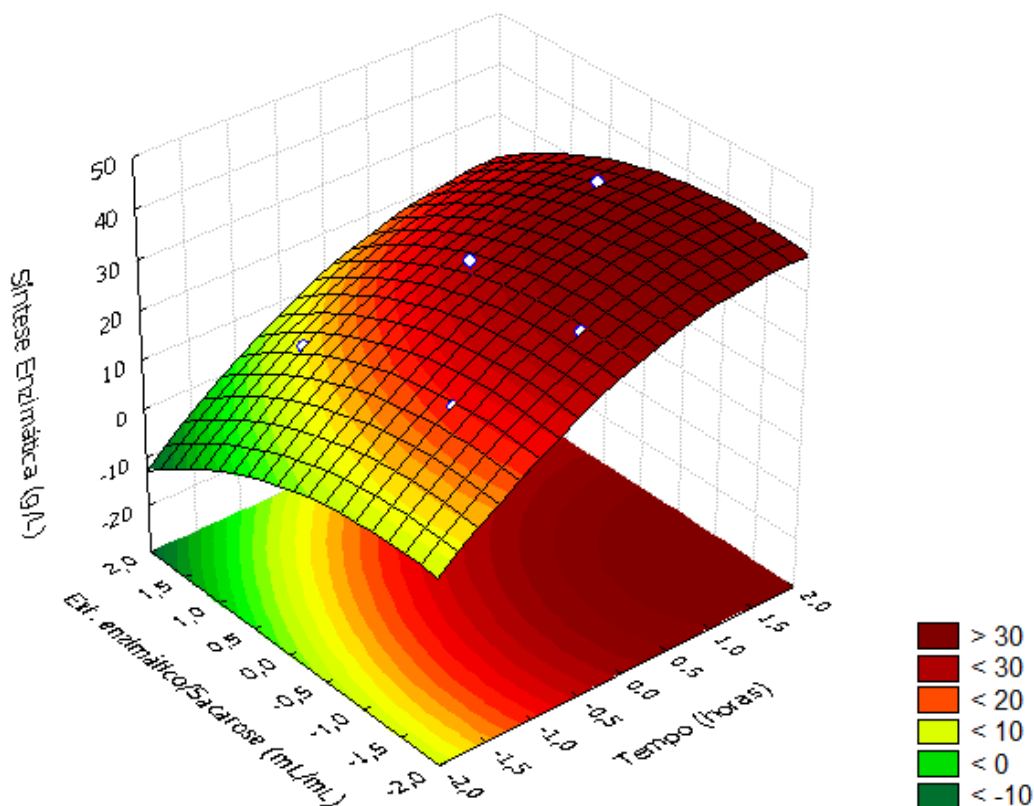
### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A maior síntese enzimática de levana (37,78 g/L) foi obtida na maior faixa de tempo de 27,312 horas (Tabela 1). Pela otimização as variáveis extrato/sacarose foi otimizada no nível inferior (-1,414) que corresponde a proporção de 1:1,586 e o tempo no nível superior (+1,414) que corresponde a 27,312 horas. Pela análise estatística dos resultados a proporção extrato enzimático/sacarose ( $p=0,027093$ ) assim como a amplitude de tempo mostraram efeito significativo ( $p=0,003117$ ).

O valor obtido foi de 37,78 g/L e o predito de 37,829 g/L, comprovando a otimização nas condições estudadas. A Figura 1 apresenta a superfície de resposta relacionando o tempo e o extrato enzimático.

**Tabela 1.** Efeito do tempo e da proporção extrato enzimático/sacarose na síntese de levana por levanasacarase de *B. subtilis natto*.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas		Variável Resposta
	<i>x1</i>	<i>x2</i>	<i>X1</i> Tempo (h)	<i>X2</i> Proporção Ext.enzi / Sacarose	<i>Y1</i> Síntese Enzimática (g/L)
<b>1</b>	-1	-1	8	1:2	22,15
<b>2</b>	-1	1	8	1:4	14,33
<b>3</b>	1	-1	24	1:2	33,98
<b>4</b>	1	1	24	1:4	27,26
<b>5</b>	-1,414	0	4,688	1:3	10,72
<b>6</b>	1,414	0	27,312	1:3	37,78
<b>7</b>	0	-1,414	16	1:1,586	32,68
<b>8</b>	0	1,414	16	1:4,414	17,10
<b>9</b>	0	0	16	1:3	33,00
<b>10</b>	0	0	16	1:3	28,00
<b>11</b>	0	0	16	1:3	27,30
<b>12</b>	0	0	16	1:3	22,02
<b>13</b>	0	0	16	1:3	32,83
<b>14</b>	0	0	16	1:3	26,22



**Figura 1.** Superfície de resposta para a síntese enzimática de levana por levanasacarase de *B. subtilis natto* em função do tempo e proporção de extrato enzimático e sacarose.

### CONCLUSÕES

A maior síntese enzimática de levana foi de 37,78 g/L e ocorreu em uma maior faixa de tempo 27,312 horas. Ambas as variáveis, proporção extrato bruto/sacarose e amplitude de tempo, mostraram efeito significativo na síntese enzimática de levana por levanasacarase ( $p < 0,5$ ). Os dados sugerem que maiores faixas de tempo e menor proporção extrato bruto/sacarose proporcionaram resultados positivos na síntese enzimática de levana.

**Agências de Fomento:** Agradecimentos à CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

### REFERÊNCIAS

- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 84, p. 375-380, 1944.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.
- SILVA, B.P Produção de fruto-oligossacarídeo por levanasacarase de *Bacillus subtilis natto*, p. 40, 2012.
- SILVA, B.P High production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis natto*. **African Journal of Biotechnology** P. 2, 2014.