

## Comparação da produção de levana por *Zymomonas mobilis* e *Bacillus velezensis* utilizando carboidratos de baixo custo e caracterização por espectrofotometria

### *Comparison of levan production by Zymomonas mobilis and Bacillus velezensis using low-cost carbohydrates and spectrophotometric characterisation*

Caroline Ellen da Cruz Hora<sup>1\*</sup>, Mônica Pereira Franca<sup>2</sup>, Joalene de Azevedo Santos Ferreira<sup>3</sup>, Paulo Fernando de Almeida<sup>4</sup>, Gustavo Miranda Pires Santos<sup>5</sup>, Josilene Borges Torres Lima Matos<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Nutricionista, Mestre, Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA; <sup>2</sup>Cirurgiã-dentista, Mestre, Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Professora Associado de Microbiologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – UFBA; <sup>3</sup>Engenheira Eletricista, Mestre em Regulação da Indústria de Energia, Doutora e Pós-doutora em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia – UFBA; <sup>4</sup>Médico Veterinário, Mestre em Ciência de Alimentos, Doutor em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Professor Titular de Microbiologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – UFBA; Biomédico, Mestre em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Doutor em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Professor do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA; Farmacêutica Bioquímica, Mestre, Doutora e Pós-doutora pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Professora Associada III de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia – UFBA

#### Resumo

**Introdução:** a levana é um exopolissacarídeo obtido pela transfrutossilacção de moléculas de sacarose a partir de culturas microbianas, com aplicações diversas nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. **Objetivos:** este estudo comparou a produção de levana por *Zymomonas mobilis* e *Bacillus velezensis*, incorporando carboidratos de baixo custo no meio de cultura, como suco de palma e caldo de cana, visando redução nos custos de produção. **Metodologia:** o processo experimental incluiu a incubação dos inóculos microbianos em meios de cultura controle e meios de cultura suplementados com 20% de suco de palma e (ou) caldo de cana, previamente esterilizados e incubados a 30 °C, sob agitação de 150 rpm por quarenta e oito horas, seguida de extração e quantificação do biopolímero através de centrifugação e precipitação com etanol. O produto obtido foi submetido à estufa de secagem a 50 °C para se obter o peso seco. Em seguida, o peso foi calculado, o material foi triturado e encaminhado para espectrofotometria. Os resultados da produção do biopolímero em cada condição foram tabulados, e as análises estatísticas foram realizadas usando-se o software GraphPad Prism e o teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando-se  $p < 0,05$  como estatisticamente significante. **Resultados:** com base nos dados estatísticos, o *Bacillus velezensis* produziu aproximadamente três vezes mais levana quando comparado com a produção por *Zymomonas mobilis*. A análise espectroscópica revelou que os biopolímeros produzidos apresentam picos característicos da levana comercial, demonstrando o potencial para aplicações industriais. **Conclusão:** esses achados destacam *Bacillus velezensis* como uma fonte promissora para a produção mais econômica e sustentável de levana. **Palavras-chave:** Biopolímeros; *Bacillus*; *Zymomonas*; Crescimento microbiano; Espectrofotometria.

#### Abstract

**Introduction:** Levan is an exopolysaccharide obtained by transfructosylation of sucrose molecules from microbial cultures, with diverse applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. **Objectives:** this study compared levan production by *Zymomonas mobilis* and *Bacillus velezensis*, incorporating low-cost carbohydrates, such as palm juice and sugarcane juice, into the culture medium, to reduce production costs. **Methodology:** the experimental process included incubation of microbial inocula in control culture media and culture media supplemented with 20% palm juice and/or sugarcane juice, previously sterilised and incubated at 30°C, under agitation at 150 rpm for forty-eight hours, followed by extraction and quantification of the biopolymer through centrifugation and ethanol precipitation. The resulting product was subjected to a drying oven at 50°C to obtain the dry weight. The weight was then calculated, the material was ground, and sent for spectrophotometry. The results of biopolymer production under each condition were tabulated, and statistical analyses were performed using GraphPad Prism software and Tukey's multiple comparisons test, with  $p < 0.05$  considered statistically significant. **Results:** based on the statistical data, *Bacillus velezensis* produced approximately three times more levan than *Zymomonas mobilis*. Spectroscopic analysis revealed that the biopolymers produced exhibit peaks characteristic of commercial levan, demonstrating potential for industrial applications. **Conclusion:** these findings highlight *Bacillus velezensis* as a promising source for more economical and sustainable levan production.

**Correspondente/Corresponding:** \*Caroline Ellen da Cruz Hora – End: Av. Reitor Miguel Calmon, s/n – Canela, Salvador – BA, 40231-300 – E-mail: carol.ellennutri@gmail.com

**Keywords:** Biopolymers; *Bacillus*; *Zymomonas*; Microbial growth; Spectrophotometry.

## INTRODUÇÃO

A levana é um polímero de moléculas de frutose, unidas, predominantemente, através de ligações  $\beta$  (2-6), sintetizadas por reações de transfrutossilacção por diversos microrganismos que utilizam a sacarose como fonte de carbono e energia. Esse biopolímero, também denominado polifrutana – pelo fato de estar constituído de moléculas de frutose com uma única glicose no grupo inicial da sacarose –, pode apresentar alto ou baixo peso molecular, dependendo da fonte de carbono utilizada no processo de síntese<sup>1-3</sup>.

Devido a suas propriedades químicas, biológicas e mecânicas, a levana tem despertado interesse por sua biodegradabilidade, não toxicidade e aplicações versáteis na indústria alimentícia, farmacêutica e ambiental, incluindo o uso como fixador de cores e sabores, agente espessante, agente encapsulante, emulsificante, estabilizante e em produtos dietéticos, por seu poder adoçante. Na área médica e na indústria farmacêutica, é usada como substituto de plasma sanguíneo, imunomodulador, anticarcinogênico e hipocolesterolêmico, com ações anti-inflamatórias, e, na área ambiental, como matéria-prima na produção de plásticos verdes<sup>4-7</sup>. No entanto, a principal barreira para a produção comercial de levana ainda é o alto custo das operações, que requerem processos que combinem eficiência, rendimento elevado e conformidade com padrões de pureza e segurança<sup>8</sup>.

A busca por novas cepas microbianas, que possam melhorar o rendimento da produção de levana, e a utilização de fontes alternativas de açúcar para reduzir custos são medidas essenciais para viabilizar a produção em larga escala. A produção desse biopolímero, especialmente em escala industrial, apresenta algumas limitações, e um dos principais fatores é o alto custo dos substratos ricos em sacarose. O processo de obtenção da levana envolve também várias etapas, como síntese, precipitação, centrifugação, secagem e purificação. Essas limitações destacam a importância da busca por fontes alternativas, como substratos de baixo custo e otimização dos processos, visando tornar a produção economicamente viável<sup>9-11</sup>. Dessa forma, o caldo de cana-de-açúcar surge como uma alternativa promissora. Embora seja utilizado na indústria para a extração da sacarose comercial, seu uso *in natura*, como substrato microbiano, apresenta vantagens econômicas e ambientais. O caldo contém elevada concentração de sacarose (em torno de 10 a 15%), além de outros compostos bioativos e minerais que podem favorecer o metabolismo microbiano. Ao utilizá-lo diretamente, evita-se o custo do refino da sacarose, tornando o processo mais acessível.

Nesse contexto, *Zymomonas mobilis* e *Bacillus velezensis* foram selecionados como potenciais microrganismos produtores de levana. *Zymomonas mobilis* é um bastonete gram-negativo, não produtor de endósporos, móvel, anaeróbico facultativo, cujo crescimento em meio rico em sacarose promove a conversão do dissacarídeo em glucose e frutose. Pode se desenvolver a baixos valores de

pH, mas o pH ótimo é 7,3, e o pH final, depois de 3 dias a 30 °C em meio padrão, está entre 4,8 e 5,2. A temperatura ideal de crescimento está entre 25 a 30 °C<sup>7,12,13</sup>. *Bacillus velezensis* é um bacilo gram-positivo, aeróbico, formador de endósporos, que pode ser encontrado no solo. Na literatura consultada, não há registro de infecção, toxicidade ou qualquer outra ação prejudicial a humanos e a outros mamíferos ocasionada por *Bacillus velezensis*<sup>14,15</sup>.

O uso de substratos alternativos, como suco de palma e caldo de cana-de-açúcar é uma estratégia promissora para reduzir os custos associados à produção de levana<sup>9,16,17</sup>. O Brasil é referência mundial na produção de cana-de-açúcar, além de apresentar a maior área plantada do mundo de palma forrageira, principalmente da espécie *Opuntia ficus-indica* (palma gigante)<sup>18-20</sup>, e possui grande potencial para que esses recursos abundantes sejam utilizados de forma sustentável no desenvolvimento de biopolímeros. Além disso, resíduos industriais, como melão e bagaço de mandioca, já demonstraram ser fontes viáveis para produção de biopolímeros, contribuindo para a redução de resíduos e levando a um impacto ambiental positivo<sup>9,10,21</sup>.

Assim, o objetivo deste estudo foi comparar a produção de levana por *Zymomonas mobilis* e *Bacillus velezensis*, avaliando a incorporação de fontes alternativas de carbono, como suco de palma e caldo de cana. A combinação dessas duas fontes naturais pode representar uma estratégia sinérgica. O caldo de cana é uma fonte rica e acessível de sacarose, substrato essencial para a ação da levansucrase. Já a palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) é composta por açúcares simples, mucilagens e compostos bioativos, como polifenóis e flavonoides<sup>17</sup>, os quais podem atuar como cofatores metabólicos ou estimuladores enzimáticos, favorecendo a produção microbiana de biopolímeros. A associação entre essas duas fontes pode fornecer não apenas sacarose, mas também compostos que modulam positivamente a atividade microbiana, especialmente de *Bacillus spp.*, otimizando o rendimento do processo de biossíntese da levana.

## METODOLOGIA

### Obtenção dos inóculos

Foram utilizadas cepas de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 da coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, e *Bacillus velezensis*, isolado no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM). O isolamento foi realizado durante o processo de síntese de levana por *Zymomonas mobilis* em biorreator, a partir de um meio de cultura com adição de cana-de-açúcar. Durante o processo, foram observadas alterações no comportamento da produção em relação aos ensaios anteriores, como presença de espuma e redução no tempo de síntese da levana. Foi realizada investigação de possível contaminação e, após confirmação da presença do microrganismo, ele foi isolado e posteriormente identificado utilizando-se o kit QIAamp DNA, mini kit da QIAGEN, para extração

do DNA das amostras, conforme as recomendações do fabricante. A reação de amplificação de DNA foi realizada utilizando-se o kit TaQ DNA polymerase recombinant da INVITROGEN. O gene de interesse foi o ribossomal 16S, utilizando-se primers fd1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e rp2 (ACGGCTACCTTGTACGACTT). As amostras foram purificadas utilizando-se o kit de purificação de DNA da GE ILLUSTRATE EXO PRO STAR, e posteriormente encaminhadas para sequenciamento. O sequenciamento de DNA foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto Gonçalo Moniz (IGM, FIOCRUZ-BA), no equipamento 3500xl Series Genetic Analyzer da APPLIED BIOSYSTEMS. Foi feito o Blastn da sequência no banco de dados do NCBI, otimizado para sequências do 16S. Cem sequências foram selecionadas e alinhadas com o algoritmo MUSCLE. Para a construção da árvore filogenética, foi utilizado o algoritmo PhyML, usando-se o modelo de substituição TN93 e *bootstrap* com valor 1000.

#### Ativação das bactérias

Para a ativação dos microrganismos, 1 mL da cultura crioconservada foi adicionado em 50mL de Meio RM adaptado de Ernandes, Garcia-Cruz<sup>13</sup> (2011), composto de sacarose (100 g), extrato de levedura (10g), fosfato de monopotássico,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1g), sulfato de amônio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1), e sulfato de magnésio –  $\text{MgSO}_4$ <sup>1</sup>, e incubado a 30 °C e 150 rpm, por vinte e quatro horas. Em seguida, para obtenção dos inóculos, 10 mL da cultura ativada de cada microrganismo foram individualmente transferidos para

100 mL de meio RM e incubados a temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm *overnight*, na incubadora *shaker* NEW BRUNSWICK 126.

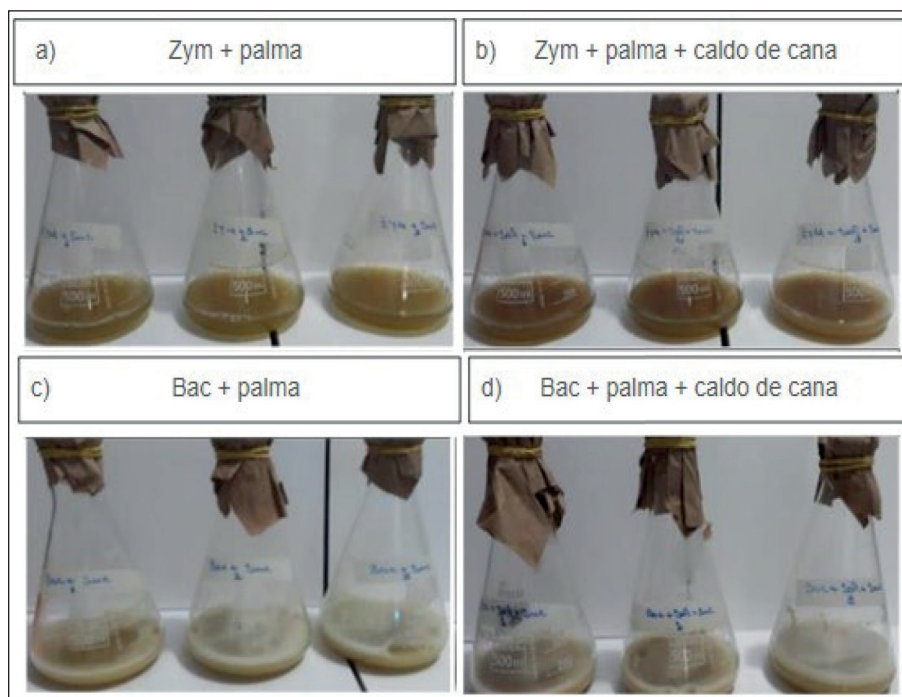
#### Obtenção dos substratos palma e caldo de cana

Para a extração do suco da palma *in natura*, foram retirados os espinhos e a casca. Em seguida, foi realizado o processamento da polpa em liquidificador, sem adição de água, e coação com um pano de malha fina. O caldo de cana foi obtido por moagem em máquina específica e armazenado sob refrigeração até ser utilizado nos testes experimentais.

#### Processo de síntese de levana em *shaker* rotativo

Os experimentos de síntese de levana foram realizados em *shaker* rotativo NEW BRUNSWICK 126, de forma asséptica e em triplicatas, utilizando-se Erlenmeyer de 500 mL. Para isso, 10 mL dos inóculos foram individualmente transferidos para 90 mL de meio RM (experimento controle), 70 mL do meio RM suplementado com 20% de suco de palma (experimento teste 1) e 70 mL do meio RM suplementado com mistura 10 % suco de palma + 10 % caldo de cana (experimento teste 2). Foram previamente esterilizados e incubados a temperatura de 30 °C, sob agitação de 150 rpm por quarenta e oito horas (Figura 1). Durante o processo de incubação, não foram observados desvios de temperatura. A condição foi mantida constante em 30 °C, conforme os parâmetros experimentais estabelecidos.

**Figura 1** – Produção de levana por *Zymomonas mobilis* (Zym) e *Bacillus velezensis* (Bac) em *shaker*, após 48 horas, utilizando-se o meio de cultivo sintético RM suplementado com 20% de solução de suco de palma e (ou) caldo de cana, nas combinações: a) Zym + palma; b) Zym + palma + caldo de cana; c) Bac + palma; e d) Bac + palma + caldo de cana.



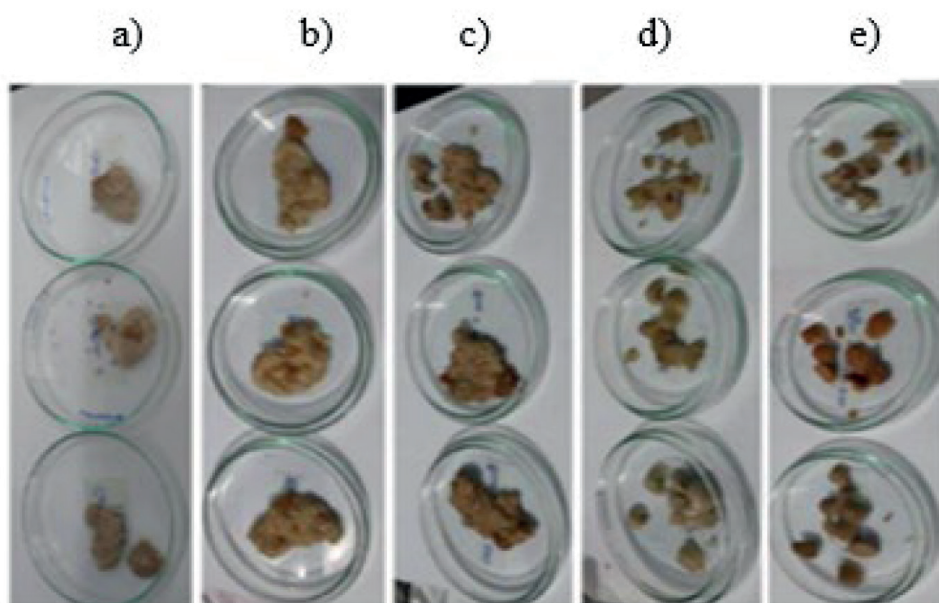
Fonte: autoria própria

### Extração de polímero e quantificação da produção de levana

Na obtenção da levana produzida no *shaker*, os caldos de fermentação foram centrifugados por vinte minutos, com rotação a 4000 rpm e temperatura de 4 °C, para descarte das células bacterianas, utilizando-se a centrífuga EPPENDORF 5804R. Os sobrenadantes obtidos em triplicata foram acondicionados em Erlenmeyer, adicionados a etanol (1:3 v/v) e armazenados sob refrigeração ( $\pm 4$  °C)

durante doze horas, para a precipitação da levana. Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm a 4 °C por trinta minutos, para concentrar e recuperar o total da levana precipitada. O biopolímero foi acondicionado em placas de Petri e desidratado na estufa a 50 °C, até se obter o peso constante (peso seco sem variação). Na Figura 2, pode-se observar o aspecto macroscópico da levana produzida em *shaker*.

**Figura 2** – Aspecto macroscópico da levana produzida por *Zymomonas mobilis* (Zym) e *Bacillus velezensis* (Bac) após 48 horas: a) Controle; b) Bac + palma; c) Bac + palma + caldo de cana; d) Zym + palma; e) Zym + palma + caldo de cana



Fonte: autoria própria

### Caracterização da levana através de espectroscopia FTIR

A espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi aplicada para determinar a estrutura molecular dos biopolímeros produzidos. Para a FTIR, foi selecionada uma amostra de cada condição e, dentro de cada condição, uma amostra de cada triplicata, que foram trituradas após secagem. Pequenas quantidades do biopolímeros foram levadas para se realizar leitura no equipamento Espectrômetro FT-IR VERTEX 70/70v BRUKER. As amostras absorveram a luz infravermelha e absorbâncias da energia foram medidas nos comprimentos de onda.

### Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism, versão 9.4.3. As avaliações

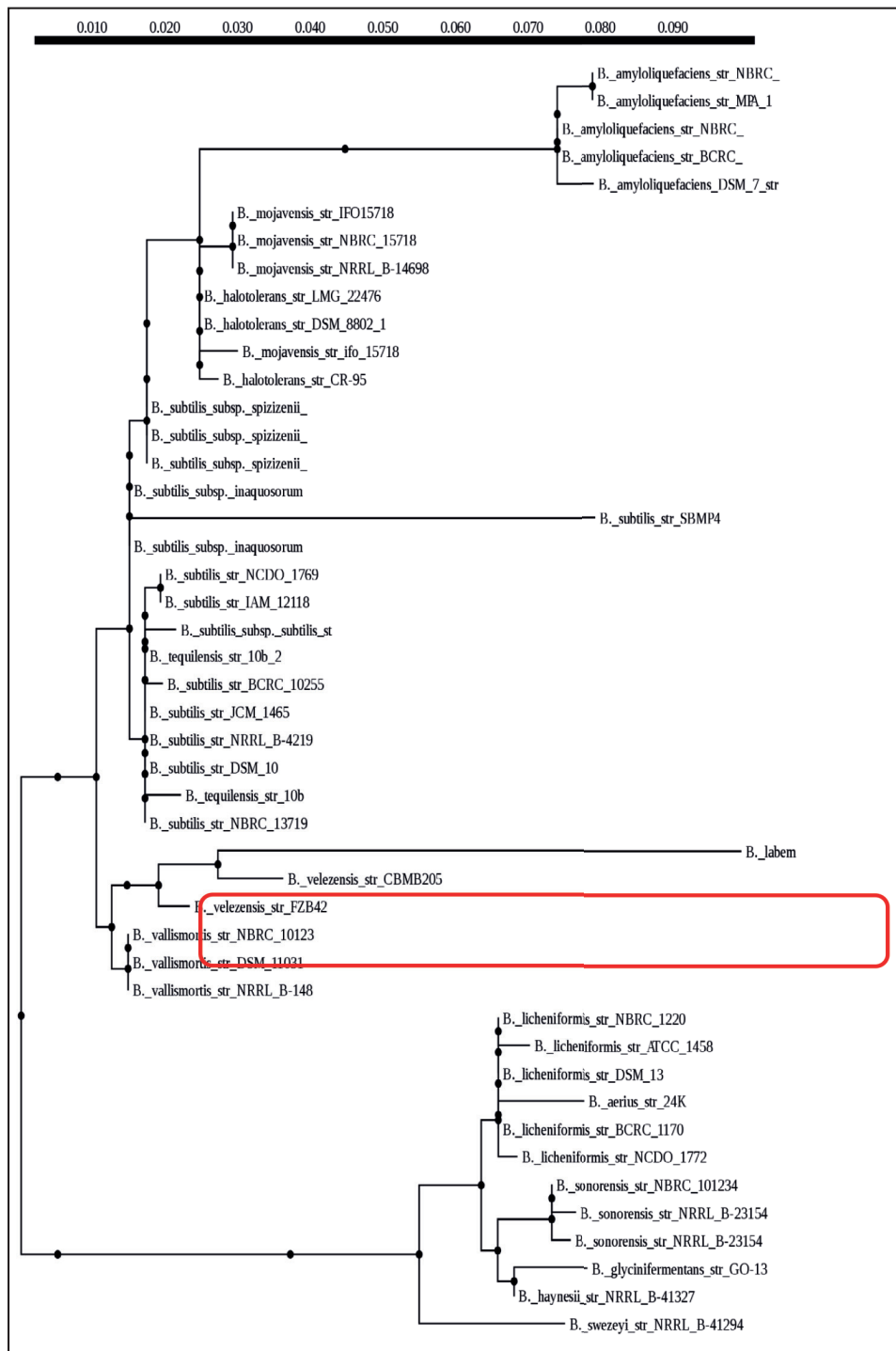
foram conduzidas utilizando-se o teste ANOVA com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, com um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Os resultados foram expressos como diferença média e intervalo de confiança de 95% (95% CI). Para cada comparação, foi verificada a significância estatística por meio do valor de *p* ajustado. O valor de *p* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

### Identificação do microrganismo isolado

Após isolamento do bacilo gram-positivo, o teste de sequenciamento e a árvore filogenética identificou *Bacillus velezensis*. A reconstrução filogenética pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Árvore filogenética do microrganismo isolado no LABEM.



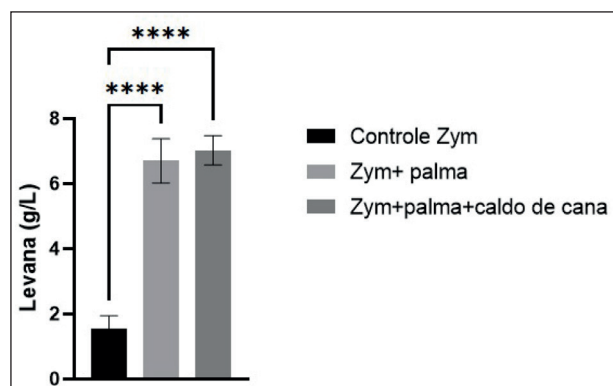
Fonte: autoria própria

### Quantificação da levana

A produção de levana por *Zymomonas mobilis* e *Bacillus velezensis* foi avaliada em diferentes condições de cultivo. No caso de *Zymomonas mobilis*, a produção no meio RM (controle) foi de 1,46 g/L. Com a adição de suco de palma ao meio de cultura, a produção aumentou para 6,70 g/L, e, com a suplementação combinada de palma

e caldo de cana, a produção chegou a 7,03 g/L. Apesar do aumento observado, as diferenças na produção nas diversas condições de cultura não foram estatisticamente significantes, ( $p=0,0804$  e  $p=0,0596$ , respectivamente) (Figura 4).

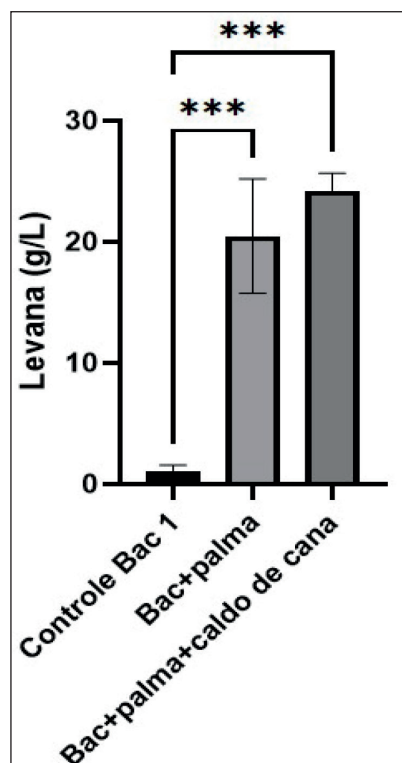
**Figura 4** – Produção de levana utilizando-se meio RM e meio RM suplementado com suco de palma e palma com caldo de cana por *Zymomonas mobilis* (Zym).



Fonte: autoria própria

O *Bacillus velezensis* produziu 1,21 g/L de levana no meio RM (controle), enquanto, após a adição de suco de palma ao meio controle, a produção aumentou para 20,33 g/L, e, com a suplementação combinada de palma e caldo de cana, atingiu 24,25 g/L. Nessas condições, as diferenças foram estatisticamente significantes, com  $p < 0,0001$  em ambas as comparações (Figura 5).

**Figura 5** – Produção de levana utilizando-se meio RM e meio RM suplementado com suco de palma e palma com caldo de cana por *Bacillus velezensis* (Bac).

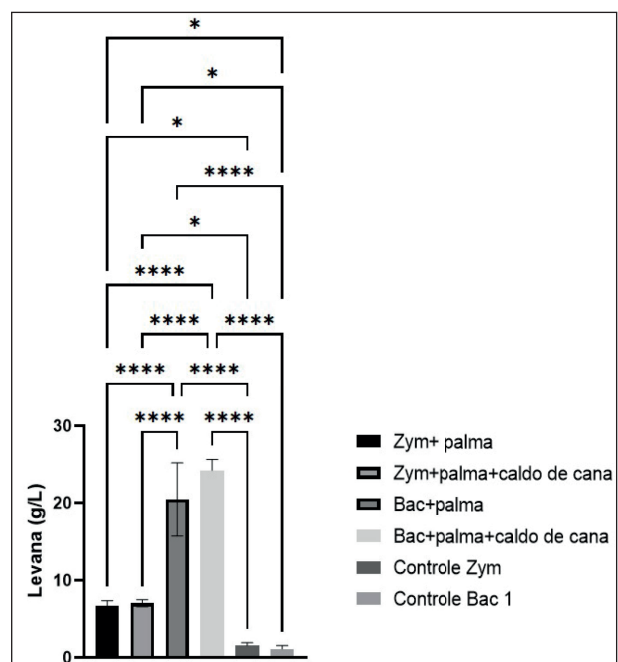


Fonte: autoria própria

Na Figura 6, podemos observar que a produção de levana pela *Z. mobilis*, em meio controle (1,46 g/L), foi

semelhante, em comparação com a produção pela *B. velezensis* nas mesmas condições (1,21 g/L) ( $p=0,9998$ ). No entanto, a suplementação com suco de palma resultou em uma produção três vezes maior de levana por *B. velezensis* (20,33 g/L) em comparação com a produção pela *Z. mobilis* (6,70 g/L) ( $p<0,001$ ). Igualmente, a produção de levana depois da suplementação com suco de palma e caldo de cana pela *B. velezensis* (24,25 g/L) foi estatisticamente maior que pela *Z. mobilis* (7,03 g/L) ( $p<0,0001$ ).

**Figura 6** – Comparação da produção de levana utilizando-se cepas de *Zymomonas mobilis* (Zym) e *Bacillus velezensis* (Bac), com adição de fontes alternativas palma e caldo de cana adicionadas ao meio de cultivo RM.



Fonte: autoria própria

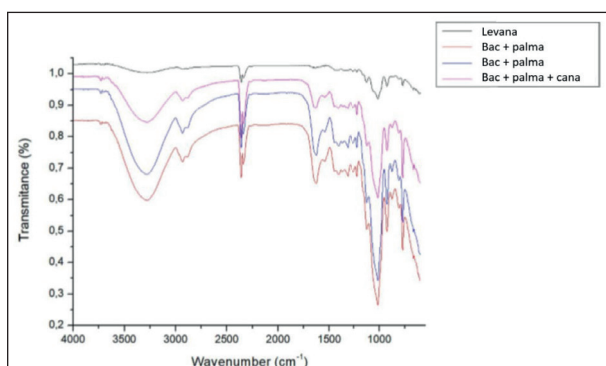
### Caracterização do biopolímero através de FTIR

A caracterização das amostras de levana foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros obtidos mostraram semelhanças significativas com os picos característicos da levana comercial (Sigma), indicando que os biopolímeros produzidos por ambas as bactérias são similares ao padrão comercial. As Figuras 7 e 8 apresentam os espectros FTIR das amostras de levana produzidas por *Bacillus velezensis* e *Zymomonas mobilis*, respectivamente.

Os picos observados nas amostras confirmam a presença de grupos funcionais típicos da levana, como bandas correspondentes a ligações O-H, C-H e C-O. A região de 3300-3400  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de grupos hidroxila (-OH), comuns em polissacarídeos. Outra região de 2900  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada às ligações C-H, que

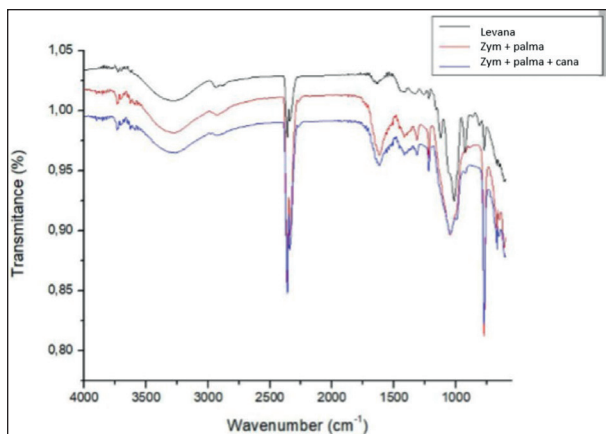
indicam a presença de unidades sacarídeas. A região de 1000-1200  $\text{cm}^{-1}$  é característica da estrutura glicosídica da levana, com variações indicando possíveis mudanças conformacionais. A levana padrão da Sigma apresentou picos bem definidos, enquanto as amostras produzidas com *Bacillus* com palma e caldo de cana mostraram alterações nos picos de 3300  $\text{cm}^{-1}$  e 1700  $\text{cm}^{-1}$ , indicando interações intermoleculares. As amostras produzidas por *Zymomonas mobilis* usando-se palma e caldo de cana apresentaram variações na região de 1000-1200  $\text{cm}^{-1}$ , o que indica diferenças estruturais.

**Figura 7** – Espectros de FTIR das amostras de levana produzidas por *Bacillus velezensis*. A repetição se refere a espectros obtidos de duas amostras representativas da triplicata experimental, indicando reprodutibilidade do perfil espectral.



Fonte: autoria própria

**Figura 8** – Espectros de FTIR das amostras de levana produzidas por *Zymomonas mobilis*.



Fonte: autoria própria

## DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que *B. velezensis* apresentou maior eficiência em relação a *Z. mobilis* na obtenção da levana, quando adicionados, ao meio de síntese do polissacarídeo, o suco de palma e o suco de palma acrescido do caldo de cana. A literatura aponta

diversos estudos utilizando bactérias na produção de polissacarídeos<sup>7,10,22</sup>, sendo a levana especialmente valorizada por sua relevância comercial e ampla aplicabilidade<sup>7,9,22</sup>. No entanto, não há registro, na literatura, sobre o uso de caldo de cana e do suco de palma combinados para produção de levana, o que representa uma proposta inovadora. Adicionalmente, o elevado custo de produção desse biopolímero dificulta a larga utilização da levana<sup>22</sup>, e, nesse contexto, nota-se um interesse tanto na identificação de novos microrganismos produtores quanto em processos que visem a redução de custo e a otimização de sua produção em larga escala.

Neste trabalho, *Zymomonas mobilis*, uma bactéria apontada na literatura com grande eficiência na produção de levana, se comparada a outros microrganismos, como exemplo *Bacillus subtilis*<sup>2,23</sup> ou *Bacillus amyloliquefaciens*<sup>24</sup>, e uma bactéria menos estudada quanto à produção de levana, *Bacillus velezensis*, foram testadas. E essa última se mostrou com maior capacidade de produção diante de suplementação com fontes naturais de sacarose. Esses achados estão de acordo com a literatura sobre a utilização de meios alternativos, suplementados com fontes naturais de sacarose, como o caldo de cana, como meios satisfatórios para a produção de levana. No estudo de Ernandes<sup>23</sup> (2006), foi observado que a adição de substratos naturais, como caldo de cana, pode proporcionar um rendimento satisfatório de levana, embora inferior ao notado em meios sintéticos ricos em sacarose. No presente estudo, *Z. mobilis* alcançou produções semelhantes às reportadas na literatura, mas sem diferenças estatisticamente significantes quando suco de palma foi combinado com caldo de cana. Um estudo realizado em 2007 utilizando *Zymomonas mobilis* apresentou um rendimento de 22,5 g/L no meio à base de sacarose (250 g/L), e o que utilizou melão de cana-de-açúcar (250 g/L) teve um rendimento de 2,5 g/L<sup>25</sup>.

Por outro lado, neste estudo, *Bacillus velezensis* se destacou com um aumento expressivo na produção de levana em ambas as condições suplementadas. No trabalho de Han, Clarke<sup>26</sup> (1990), ao avaliar a produção de levana pelo *Bacillus polymyxa*, utilizando como meio de produção caldo de cana e melaços de beterraba como fonte de carbono, os autores encontraram uma conversão em média de 46% de sacarose em levana, e concluíram que são meios satisfatórios para a produção de levana. Um estudo utilizando *Bacillus lentus* apresentou um rendimento de 57,5 g/L no meio com 250 g/L de sacarose, e o meio usando melão de cana-de-açúcar com substrato alternativo resultou em um rendimento de 50 g/L, o que indica uma leve diminuição na produção de levana com o uso do substrato alternativo<sup>27</sup>.

Com base nos resultados deste trabalho identificamos que não houve aumento da eficiência na produção de levana pelos dois microrganismos estudados, quando adicionada a suplementação de palma com caldo de cana, além do suco de palma. Dessa forma podemos sugerir que a suplementação utilizando apenas a pal-

ma representa uma opção com boa viabilidade, dado o potencial para produção de levana, facilidade na aquisição, com possibilidade de redução dos custos, visto que o Brasil apresenta a maior área de plantação mundial de palma<sup>19</sup>. Por outro lado, vale ressaltar que outros substratos, como a casca de manga, apesar de servirem como fonte de carbono viável para a produção de levana, apresentam rendimentos menores que os resultados alcançados neste estudo<sup>28</sup>.

A composição dos substratos utilizados pode ter influenciado diretamente na síntese da levana. A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*), além de ser fonte de açúcares solúveis, como glicose e frutose, é rica em mucilagens, fibras solúveis, ácidos orgânicos, antioxidantes e compostos fenólicos, que podem atuar como indutores metabólicos. Esses compostos podem influenciar a expressão da levansucrase ou modular o ambiente osmótico e redox do meio, favorecendo a biossíntese de exopolissacarídeos como a levana, principalmente por microrganismos do gênero *Bacillus*, que apresentam maior plasticidade metabólica. Por outro lado, o caldo de cana contribui diretamente com a oferta de sacarose, substrato primário da reação de transfrutoseilação. A associação entre esses dois substratos pode ter criado uma condição bioquímica mais favorável para a produção de levana, embora os resultados não tenham demonstrado vantagem estatística em relação ao uso da palma isolada.

A presença de compostos bioativos no suco de palma, como polifenóis e vitaminas, pode desempenhar um papel importante ao atuar como cofatores ou indutores metabólicos, estimulando vias secundárias de produção de biopolímeros em *Bacillus velezensis*. Esses compostos podem não ter o mesmo efeito em *Zymomonas mobilis*, devido à diferença na regulação enzimática entre os dois microrganismos, uma possibilidade para a menor produção de levana por *Zymomonas* neste estudo, em comparação ao *Bacillus*.

Os resultados apontam que a produção de levana utilizando *Bacillus velezensis* mostrou-se mais eficiente quando comparada à produção de *Zymomonas mobilis*. Entretanto, estudos que comparam a produção de levana pela *Z. mobilis* e outras bactérias a têm apontado como mais eficiente nessa produção, a exemplo do estudo de Ernandes<sup>23</sup> (2006), que compara a produção levana entre as bactérias *Zymomonas mobilis* e *Bacillus subtilis*.

O aumento expressivo na produção de levana por *Bacillus velezensis*, em contraste com *Zymomonas mobilis*, pode ser explicado por diferenças na fisiologia e nas vias metabólicas desses microrganismos. *B. velezensis*, sendo uma espécie aeróbia e formadora de endósporos, apresenta um metabolismo altamente adaptável, capaz de utilizar uma ampla variedade de substratos, incluindo os presentes no suco de palma. Estudos indicam que *Bacillus* spp. pode metabolizar eficientemente polissacarídeos complexos e monossacarídeos, como glicose e frutose, que estão presentes em grandes quantidades na palma

forrageira<sup>14,15</sup>. Ademais, a produção de levana em *Bacillus* spp. é fortemente influenciada pela atividade da enzima levansucrase, cuja expressão pode ser estimulada pela presença de substratos ricos em sacarose e outros carboidratos. A diversidade enzimática de *B. velezensis* permite maior flexibilidade metabólica, resultando em produção elevada de biopolímeros. Em contraste, *Z. mobilis*, um microrganismo com metabolismo predominantemente fermentativo, depende principalmente da via da Entner-Doudoroff para o catabolismo de carboidratos. Essa via, embora eficiente para a produção de energia, não favorece tanto a síntese de levana em condições com substratos mais complexos, como o suco de palma<sup>13</sup>. Assim, mesmo com a adição de suco de palma, o aumento na produção de levana por *Z. mobilis* foi modesto e não significativo.

Outro ponto relevante é a caracterização do biopolímero por espectroscopia FTIR. González-Torres *et al.*<sup>29</sup> (2024), utilizando uma levedura como modelo experimental, confirmaram a similaridade estrutural da levana produzida com um padrão comercial. Isso reforça a viabilidade do uso de *B. velezensis* e *Z. mobilis* na produção de levana para aplicações industriais.

Embora os resultados obtidos tenham fornecido informações importantes sobre a possibilidade de uso da palma como substrato para viabilizar a produção de levana, algumas limitações devem ser destacadas. Os experimentos foram conduzidos em *shaker* rotativo, e estudos em fermentadores em larga escala são importantes para avaliar a viabilidade industrial dos processos. Outro ponto seria sobre a caracterização, porque, embora as análises usando FTIR tenham demonstrado similaridade estrutural com a levana comercial, análises adicionais, como a cromatografia, poderiam fornecer informações mais detalhadas, como a pureza do biopolímero.

Estudos futuros devem focalizar a otimização das condições de cultivo e os parâmetros de fermentação, bem como a avaliação de outras cepas microbianas que possam apresentar maior expressão de levansucrase e consequente aumento na produtividade e na exploração de diferentes fontes de carbono alternativas, como é sugerido por Hertadi, Permatasari, Ratnaningsih<sup>3</sup> (2021). A combinação de estratégias biotecnológicas e substratos renováveis e a otimização de cultivo, como é sugerido por Phengnoi *et al.*<sup>30</sup> (2022), pode contribuir para a produção sustentável e competitiva de biopolímeros, promovendo avanços significativos nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmaram que *Bacillus velezensis* é um microrganismo emergente, com alto potencial para produção de levana, superando *Zymomonas mobilis* em eficiência. A suplementação com palma demonstrou ser uma alternativa viável e econômica, com rendimentos comparáveis aos do caldo de cana, tornando-se uma opção promissora no contexto brasileiro, devido à sua

ampla disponibilidade e seu custo reduzido. Além disso, a caracterização da estrutura por FTIR revelou que os biopolímeros produzidos por ambos os microrganismos apresentam similaridade com o padrão comercial, reforçando sua viabilidade para aplicações industriais.

## REFERÊNCIAS

1. Donot F, Fontana A, Baccou JC, Schorr-Galindo S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr Polym.* 2012 Jan;87(2):951-62. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.083
2. Ragab TIM, Malek RA, Elsehemy IA, Farag MMS, Salama BM, El-Baseer MAA, et al. Scaling up of levan yield in *Bacillus subtilis* M and cytotoxicity study on levan and its derivatives. *J Biosci Bioeng.* 2019 Jun;127(6):655-62. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.09.008
3. Hertadi R, Permatasari NU, Ratnaningsih E. Box-Wilson Design for Optimization of in vitro Levan Production and Levan Application as Antioxidant and Antibacterial Agents. *Iran Biomed J.* 2021 May;25(3):202-12. doi: 10.52547/ibj.25.3.202
4. Wu F.-C, Chou S.-Z, Shih I.-L. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2013;44(6):846-53. doi: 10.1016/j.jtice.2013.03.009
5. Dahech I, Belghith KS, Hamden K, Feki, A, Belghith H, Mejdoub H. Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *Int J Biol Macromol.* 2011;49(4):742-6. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.07.007
6. Mummaleti G, Sarma C, Kalakandan SK, Gazula H, Sivanandham V, Anandharaj A. Characterization of levan produced from coconut inflorescence sap using *Bacillus subtilis* and its application as a sweetener. *LWT.* 2022 Jan;154:112697. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112697
7. Ernandes FMPG, Garcia-Cruz CH. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. *Semin Cienc Agrar.* 2005 Jun;26:71. doi: 10.5433/1679-0359.2005v26n1p71
8. Srikanth R, Siddhartha G, Sundhar Reddy CHSS, Harish BS, Janaki Ramaiah M, Uppuluri KB. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydr Polym.* 2015 Jun;123:8-16. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.079
9. Veerapandian B, Shanmugam SR, Varadhan S, Sarwareddy KK, Mani KP, Ponnusami V. Levan production from sucrose using chicken feather peptone as a low-cost supplemental nutrient source. *Carbohydr Polym.* 2020 Jan;227:115631. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115631.
10. Gojgic-Cvijovic GD, Jakovljevic DM, Loncarevic BD, Todorovic NM, Pergal MV, Ciric J, et al Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *Int J Biol Macromol.* 2019 Jan;121:142-51. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019
11. Keerthashalini P, Sobanadevi V, Uppuluri KB. Deep eutectic solvent assisted recovery of high molecular weight levan from an isolated *Neobacillus pocheonensis* BPSCM4. *Prep Biochem Biotechnol.* 2024;54(3):407-18. doi: 10.1080/10826068.2023.2245877
12. Oliveira MR de, Silva RSSF da, Buzato JB, Celligoi MAPC. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate source. *Biochem Eng J.* Nov 2007;37(2):177-83. doi: 10.1016/j.bej.2007.04.009
13. Ernandes FMPG, Garcia-Cruz CH. Nutritional Requirements of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 for Levan Production. *Braz Arch Biol Technol.* 2011;54(3):589p600. doi: 10.1590/S1516-89132011000300021
14. Grady EN, MacDonald J, Ho MT, Weselowski B, McDowell T, Solomon O, et al. Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiol.* 2019 Jan;19:5. doi: 10.1186/s12866-018-1380-8
15. Rabbee MF, Sarafat Ali M, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek K.-H. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules.* 2019 Mar;24(6):1046. doi: 10.3390/molecules24061046
16. Ernandes FMPG, Boscolo M, Cruz CHG. Influência da composição do meio para a produção de etanol, por *Zymomonas mobilis*. *Acta Scientiarum – Technology.* 2010;32:21-6. doi: 10.4025/actascitechnol.v32i1.7454
17. Guedes BN, Fathi F, Silva AM, Santini A, Oliveira MBPP, Souto EB. Biopharmaceutical applications of *Opuntia ficus-indica*: bibliometric map, bioactivities and extraction techniques. *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.* 2023;249:2457-69. doi: 10.1007/s00217-023-04314-w
18. Abreu D, Moraes LA de, Nascimento EN, Oliveira RA de. A produção da cana-de-açúcar no Brasil e a saúde do trabalhador rural. *Revista Brasileira de Medicina do Trabalho.* 2011 Jan;9:49–61.
19. Lopes EB, organizador. PALMA FORRAGEIRA: Cultivo, Uso Atual e Perspectivas de Utilização no Semiárido Nordeste. Paraíba: EMEPA; 2012.
20. Moura MSB de, Souza LSB de, Sá. IIS, Silva TGF da. Aptidão do Nordeste Brasileiro ao Cultivo da Palma Forrageira sob Cenários de Mudanças Climáticas. 2011.
21. Mummaleti G, Sarma C, Yarrakula S, Urla R, Gazula H. Production, properties and applications of levan polysaccharide. *Food and Humanity.* 2024;3:100369. doi: 10.1016/j.fooHum.2024.100369
22. Öner ET, Hernández L, Combie J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Elsevier;* 2016. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.002
23. Ernandes FMPG. Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar) [dissertação]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista; 2006. 107p.
24. Sahyoun AM, Wong Min M, Xu K, George S, Karboune S. Characterization of levans produced by levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Gluconobacter oxydans*: Structural, techno-functional, and anti-inflammatory properties. *Carbohydr Polym.* 2024 Jan;323:121332. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121332
25. Oliveira MR de, Silva RSSF da, Buzato JB, Celligoi MAPC. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochem Eng J.* 2007 Nov;37(2):177-83. doi: 10.1016/j.bej.2007.04.009
26. Han YM, Clarke MA. Production and Characterization of Microbial Levan [Internet]. [citado 2024 Dec 15 ];1990;38(2). Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf00092a011>
27. Abou-Taleb K, Abdel-Monem MO, Yassin MH, Draz A. Production, Purification and Characterization of Levan Polymer from *Bacillus lentus* V8 Strain. *Br Microbiol Res J.* 2015 Jan;5:22-32. doi: 10.9734/bmrj/2015/12448.
28. Saeed S, Ahmed S, Naz A, Arooj F, Mehmood T. Valorization of Using Agro-Wastes for Levan through Submerged Fermentation and Statistical Optimization of the Process Variables Applying

Response Surface Methodology (RSM) Design. *Microorganisms*. 2013 Jun;11(6):1559. doi: 10.3390/microorganisms11061559

doi: 10.3390/molecules29051105

29. González-Torres M, Hernández-Rosas F, Pacheco N, Salinas-Ruiz J, Herrera-Corredor JA, Hernández-Martínez R. Levan Production by *Suhomyces kilbournensis* Using Sugarcane Molasses as a Carbon Source in Submerged Fermentation. *Molecules*. 2024 Mar;29(5):1105.

30. Phengnoi P, Thakham N, Rachphirom T, Teerakulkittipong N, Lirio GA, Jangiam W. Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis. *Heliyon*. 2022 Dec;8(12):e12137. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12137

---

Sub: 17/02/2025

Aceite: 24/11/2025