

Produção de Sorbitol por *Zymomonas Mobilis* ATCC 29191 em Meio de Sacarose Pré-Tratado com Invertase

Sorbitol Production By *Zymomonas Mobilis* ATCC 29191 In Medium Of Sucrose Pre-Treated With Invertase

Márcio de Barros¹; Josiane Alessandra Vignoli²; Viviane Cristina Schiabel² ;
João Batista Buzato³; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi³

Resumo

Foi estudada a produção de sorbitol em meio de sacarose pré-tratado com invertase, empregando *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. A melhor produção de sorbitol foi 41,39 g/L e a melhor produtividade foi de 1,72g/L.h⁻¹ em 24 horas de fermentação no meio de sacarose pré-tratada. Esses valores representam uma melhoria de 72,17% na produção de sorbitol com adição de invertase.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*; sorbitol; invertase

Abstract

Sorbitol production by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium of sucrose pre-treated with invertase was studied. The best results were obtained when the medium was pre-treated with invertase as sorbitol production of 41,39 g/L and a productivity of 1,72 g/L.h⁻¹ in 24 hours of fermentation. The invertase addition in the fermentation broth increased 72,17% in the sorbitol formation.

Key Words: *Zymomonas mobilis*; sorbitol; invertase

Introdução

O uso de sacarose pela bactéria fermentativa *Zymomonas mobilis* origina subprodutos como sorbitol e levana. O sorbitol é produzido e acumulado como um osmoprotetor a partir da frutose e a enzima bacteriana glicosefrutose-oxirredutase converte glicose e frutose em glicono- α -lactona e sorbitol respectivamente. Foi demonstrado que a enzima

frutoquinase é inibida pela elevação de glicose no meio em decorrência da hidrólise da sacarose e, assim, favorece a conversão da frutose em sorbitol. (BEKERS et al., 2000)

Considerando a ampla aplicação do sorbitol nas indústrias de alimentos e medicamentos com produção industrial de custo elevado, procuram-se alternativas de obtenção de compostos por processos

¹ Aluno de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica – CCE/UUEL

² Alunas de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – TAM/UUEL

³ Docente do Departamento de Bioquímica – CCE/UUEL. email: macelligoi@uel.br

fermentativos (SILVEIRA; JONAS, 2002). É sabido que *Zymomonas mobilis* produz sorbitol a partir não só da sacarose, mas também a partir de uma mistura de glicose mais frutose em detrimento da produção de etanol (KANNAN et al., 1998).

Quando uma mistura de glicose mais frutose foi usada para produzir sorbitol, o processo apresentou problemas de aplicação industrial, pois a utilização direta desses substratos gera custo maior comparado com o valor do produto (SPRENGER, 1996).

O uso do tratamento prévio da sacarose por invertase, para a produção de metabólitos de interesse, não tem sido muito explorado e pode ser uma alternativa de diminuição de custo. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo, favorecer a produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* utilizando a hidrólise prévia do meio de sacarose pela invertase de *Saccharomyces cerevisiae*.

Material e métodos

Microrganismo e condição de preservação:

Zymomonas mobilis ATCC 29191 foi preservada em meio com a seguinte composição (g%): sacarose 10; extrato de levedura 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2; KH_2PO_4 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03; peptona 0,5 e FeSO_4 0,02. Após incubação por 24 horas a 30°C, as culturas foram mantidas a 4°C e reativadas a cada 30 dias.

Invertase: A enzima invertase, utilizada para o pré-tratamento do meio, foi extraída da levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae*, segundo Nepomuceno (1998).

Meios de fermentação: Meio I - sacarose a 20% de açúcares redutores totais (ART) com adição de sais do meio de preservação. **Meio II** - sacarose 20% de ART, pré-tratado por 2 horas com invertase, sob agitação, a temperatura de 28 °C, na proporção 1:50 (1 mL de invertase e 50 mL de meio de fermentação), este meio também teve a adição dos sais do meio de preservação. Os meios foram esterilizados a 121°C por 20 minutos.

Fermentações: O inóculo foi padronizado em 0,2 g/L para todos os experimentos. As fermentações

foram realizadas em frascos de erlenmeyer de 250mL, com 100 mL dos meios I e II. O pH foi ajustado em 6,0 e os frascos incubados por 48 horas a 30°C. Após os tempos de 0, 8, 24, 32 e 48 horas amostras foram retiradas para análise do crescimento celular, por densidade ótica, a = 605nm. As medidas foram relacionadas com uma curva padrão de peso seco em g/L. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e do sobrenadante foram quantificados os açúcares redutores, redutores totais e o sorbitol.

Determinações dos açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART): Pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944) e os redutores totais segundo Amorim (1982).

Determinação do sorbitol: O sorbitol foi estimado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna aminex HPX-87 (Biorad) (8mm, 300 X 7.8 mm) temperatura de 65°C com água destilada e deionizada (ultra pura) no fluxo de 1mL/min.

Resultados e discussão

Muitos esforços têm sido direcionados para substituir processos químicos por processo fermentativo. Industrialmente, o sorbitol é produzido por hidrogenação catalítica de xarope dextrose, em alta temperatura e pressão (RO; KIM, 1991). Quando *Zymomonas mobilis* é cultivada em meios com alta pressão osmótica, proporcionada através da presença de sais ou altas concentrações de açúcares, a bactéria excreta sorbitol para o meio (BEKERS et al., 2000).

Fermentações por *Zymomonas mobilis*, podem ocorrer tanto em meio de sacarose como em frutose mais glicose. Entretanto, a fermentação de cada um desses açúcares desenvolve uma resposta metabólica diferenciada. Assim, a utilização de glicose e frutose reduz o tempo de fermentação, enquanto uso de sacarose leva a formação de levana e outros subprodutos, reduzindo a produtividade de etanol. Logo, uma maneira de disponibilizar frutose é adicionar invertase ao meio de sacarose. O pré-tratamento do meio de cultivo rico em sacarose por invertase tem sido usado na produção de ácido láctico

CONDIÇÕES DE CULTIVO	Tempo (horas)	Ar (g/L)	ART (g/L)	Consumo (g/L)	Sorbitol (g/L)	Biomassa (g/L)	Sorbitol Yp (%)	Y(p) g/L.h ⁻¹	Y(p) g/g.l ⁻¹
Meio I	0	40,6	211,25	0	0	0,2	0		
Meio I	24	5,68	24,26	186,99	24,04	0,8	21,19	1,0	0,11
Meio II	0	147,77	211,25	0	0	0,2	0		
Meio II	24	18,27	35,05	176,2	41,39	0,52	44,01	1,72	0,23

I (Sacarose sem hidrólise prévia); II (Sacarose com hidrólise prévia)

e etanol com resultados satisfatórios, (OLIVEIRA et al., 2000; GUILMAN et al., 1999/2000).

A tabela 1 mostra os valores de açúcar redutor (AR) 40,6 e 147,77 g/L presentes no meio de cultivo com e sem o tratamento com a invertase, respectivamente. A presença de AR no meio de cultivo antes do tratamento com invertase pode ser explicada a partir da utilização de açúcar cristal comercial usado como fonte de sacarose e da presença desses açúcares na composição do extrato de levedura utilizado. O valor de AR após o tratamento com invertase meio II demonstra uma elevação de 263% em relação ao meio I.

As figuras 1 e 2 ilustram os parâmetros cinéticos obtidos desde o inóculo até 48 horas de fermentação.

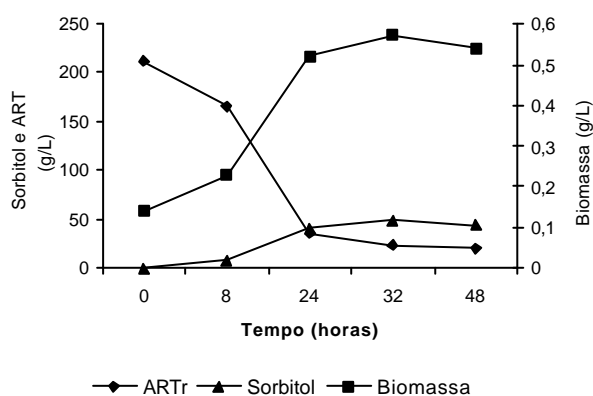


Figura 1. Cinética da produção de sorbitol, açúcares residuais e biomassa de *Zymomonas mobilis* no meio sacarose 200 g/L pré-hidrolisado (meio II).

As figuras mostram que após 24 horas de fermentação os valores analisados permaneceram estáveis, e assim, para cálculo de produção, considerou-se este tempo de fermentação.

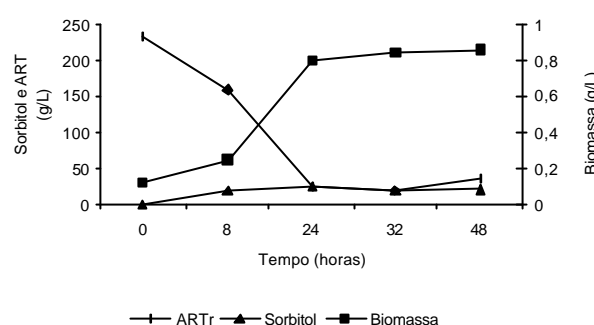


Figura 2. Cinética da produção de sorbitol, açúcares residuais e biomassa de *Zymomonas mobilis* no meio sacarose 200 g/L (meio I).

Neste trabalho, a produtividade foi de 1,72 g/L.h⁻¹ e 1,0 g/L.h⁻¹ no meio II e I respectivamente. As concentrações de sorbitol alcançadas foram 24,04 e 41,39 g/L nas condições I e II respectivamente. Isto representa uma elevação de 72% quando é feito o tratamento do meio com invertase. Lee e Huang (1995) utilizaram invertase imobilizada e *Zymomonas mobilis*, para a produção de etanol e sorbitol. As concentrações de sorbitol variaram de 5 a 24 g/L sem invertase e 15,7 a 33,4 g/L com invertase imobilizada. A utilização de mutantes com alta atividade de levansacarase em meio de sacarose a 100 g/L, foi estudados por Kannan et. al. (1997, 1998). Os resultados para a produção de sorbitol não foram satisfatórios, uma vez que as concentrações atingidas foram 1,8; 1,3 e 7,4 g/L com os mutantes denominados de LS1A; LS1 e B-806, respectivamente.

Contudo, Kirk e Doelle (1993) usaram uma linhagem mutante, sem a atividade da frutoquinase e juntamente com invertase imobilizada, e alcançaram 17,3g/L de sorbitol em apenas 5 horas de fermentação.

Neste trabalho, os valores de conversão de substrato e sorbitol foram 0,11 e 0,23 g/g.h⁻¹ no meio I e II respectivamente. Silveira et al. (1992) utilizaram uma mistura equimolar de glicose e frutose na concentração final de 100 g/L e o valor foi de 0,11g/g.h⁻¹ por esta mesma cepa.

Os resultados apresentados neste trabalho, utilizando o pré-tratamento com invertase do meio de fermentação, mostraram favoráveis à produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis*.

Conclusões

A partir dos resultados, verifica-se que a pré-hidrólise da sacarose do meio de fermentação, pela invertase de levedura aumentou a disponibilidade de açúcares redutores, com conseqüente aumento da produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis*.

A melhor condição para a produção de sorbitol foi no meio de sacarose pré-hidrolisado com invertase elevando a produção em 72,17% comparando - se ao meio sem pré hidrolise da sacarose.

A melhor produtividade foi em 24horas de fermentação atingindo 1,72 g/L.h⁻¹. Assim, esta técnica pode representar uma alternativa viável para melhorar a produção de sorbitol, sem onerar o processo em meio de sacarose por *Zymomonas mobilis*.

Referências

AMORIM, H. V.; ZAGO, E. A.; OLIVEIRA, A. J. *Novos métodos analíticos para controle de fermentação alcoólica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. (Série: Manuais de Técnicos e Científicos)

BEKERS; M. et al. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas Mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, v. 55, p.147-150, 2000.

DOELLE, H. W. et al. *Zymomonas mobilis* : Science and industrial application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.13, n.1, p.57-98, 1993.

GUILMAN, F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Comparação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em meio melaço de cana-de-açúcar puro e pré-

tratado com invertase. *Semina: Ciências Biológicas / Saúde*, Londrina, v. 20/21, n.2, p.39-43, jun. 1999/2000.

KANNAN, T.R.; SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Influence of intra-and extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by - product formation. *Biotechnology Letters*, v.19, n.7, p.661-664, 1997.

KANNAN, T. R.; SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.22, p.179-184, 1998.

KIRK, L. A.; DOELLE, H. W. Rapid ethanol production from sucrose without by product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.15, n.9, p.859-990, 1993.

LEE. W. C; HUANG. C. T. Enhancement of ethanol production from sucrose by *Zymomonas mobilis* by the addition of immobilized invertase. *Enzyme and Microbial Technology*, v.17, p.79-84, 1995.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Biochemistry*, v.53, p.375-380, 1944.

NEPOMUCENO, M. F. Cinética enzimática II da invertase. In: _____. *Bioquímica experimental*. Piracicaba; UNIMEP, 1998. p. 57-60.

OLIVEIRA, A. R. de et al. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, em fermentação contínua, utilizando melaço de cana-de-açúcar previamente tratado com invertase. *UNOPAR Científica*, Ciências Biológicas e Saúde, Londrina, v.2, n.1, p.9-5, out. 2000.

ROH, H. S.; KIM, H. S. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and an oxirredutase of *Zymomonas mobilis*. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.13, p.920-924, 1991.

SILVEIRA, M. M. et al. Production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*: comparison of strains. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.35, p.591-594, 1992.

SILVEIRA, M. M.; JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.59, p.400-408, 2002.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry*, v.160, p.61-68, 1945.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS: Microbiology Letters*, v.145, p.301-307, 1996.