

Influência do PH Inicial do Caldo de Cana-de-Açúcar na Produção de Levana por *Zymomonas Mobilis* ATCC 31821

Influence of the initial ph of sugar cane juice on the production of levan by *Zymomonas mobilis* ATCC 31821.

Marcia Sadae Tano¹; João Batista Buzato²

Resumo

Foi investigada a influência do pH inicial da garapa em alta concentração de açúcar para produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC31821. Os pH iniciais dos meios foram 5,4; 5,9 e 6,3 e as concentrações de levana obtidas foram 1,66; 2,54 e 3,83 g/L, respectivamente, após 48 horas de cultivo. A concentração final de levana, em meio de pH inicial de 6,3 e 5,9 foi, respectivamente, 130% e 53% superior àquela obtida em meio de pH inicial de 5,4. O fator de produção em pH inicial 5,9 foi 87,5% e em pH 6,3 foi 162,5% superiores em relação àquele obtido em pH inicial 5,4

Palavras-chave: Levana, pH, *Zymomonas mobilis*, caldo de cana-de-açúcar.

Summary

The influence of initial pH of sugar cane juice in high concentration was investigated for levan production by *Zymomonas mobilis*. In the initial pH of medium of 5.4; 5.9 and 6.3 the levan concentration achieved 1.66; 2.54 and 3.83 g/L, respectively, in 48 hours of fermentation. The final levan concentration in the initial pH of 6.3 and 5.9 increased 130 and 53% when compared to concentration at initial pH 5.4 in the medium. The levan yield at pH 5.9 was 87.5% and at pH 6.3 was 162.5% superior in relation to that obtained at initial pH 5.4.

Key Words: Levan, pH, *Zymomonas mobilis*, sugar cane juice.

Introdução

Geralmente, emprega-se a bactéria *Z. mobilis* para a produção de etanol a partir da sacarose, frutose e glicose (Falcão de Moraes *et al.*, 1993). Porém, na fermentação, em alta concentração inicial de

sacarose, a taxa de hidrólise deste dissacarídeo é maior do que o consumo dos seus monossacarídeos (PARKER *et al.*, 1997; TANO *et al.*, 2000). Conseqüentemente, os monossacarídeos acumulam-se no caldo de fermentação e favorecem a formação de subprodutos, como a levana e o sorbitol, o que re-

¹ Farmacêutica-Bioquímica. Pós-graduada em Microbiologia - Departamento de Microbiologia – UEL. Departamento de Bioquímica - Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina - PR, CEP 86051-900, Fone: (043) 371-4270, Fax (043) 371-4216.

² Docente do Departamento de Bioquímica da UEL

duz o rendimento em etanol (KANNAN et al., 1997; PARKER et al., 1997)

Levana, um bioexopolímero de frutose, de alta massa molecular é formado pela atividade da enzima *levansacarase* e depende da disponibilidade de frutose acumulada no meio, após a hidrólise da sacarose (KANNAN et al., 1997; PARKER et al., 1997). Atribui-se a essa enzima uma dupla função, pois ela atua também na hidrólise da sacarose.

Levana é um produto de importância para as indústrias de alimentos como espessante e adoçante (Ananthalakshmy & Gunasekaran, 1999), farmacêutica (CALAZANS et al., 1997; FALCÃO DE MORAIS et al., 1993), cosmeceutica e de toileria (SUTHERLAND, 1998). No entanto, a sua efetiva aplicação é dificultada pela sua baixa bioprodutividade (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999; SUTHERLAND, 1998).

A influência da temperatura de cultivo sobre a composição do meio de fermentação e a concentração do extrato de levedura nesse meio foram estudadas como *Z. mobilis*, com o objetivo de aumentar a produção de etanol e reduzir a formação de levana (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999; CRITTENDEN; DOELLE, 1994; DIEZ; YOKOYA, 1996; FAVELLA TORRES; BARATTI, 1987).

São raros os trabalhos existentes que visam a melhorar o desempenho da bactéria para a produção de levana.

Por conseguinte, este trabalho teve a finalidade de avaliar a influência do pH inicial do caldo de cana-de-açúcar para a produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821

Materiais e métodos

Microrganismo: Z. mobilis ATCC 31821.

Meio de manutenção: O meio foi preparado com 50 g/L de sacarose e os outros componentes foram utilizados nas mesmas concentrações do meio de fermentação. Após incubação por 24 horas a 30° C, as

culturas foram mantidas a 4° C e reativadas a cada 30 dias.

Meio de fermentação (g/L): Açúcar redutor total (ART) do caldo de cana-de-açúcar 150; extrato de levedura 5; sulfato de magnésio hepta hidratado 0,5; sulfato de amônia 1; fosfato de potássio 1. O volume de trabalho foi de 100 ml. Os valores de pH foram acertados com solução de KOH 50% (pH 5,9; 6,3), a concentração celular inicial no meio de fermentação foi de 0,2 mg/ml e a fermentação foi conduzida a 28°C e 180 rpm. Os ensaios experimentais foram feitos com 2 repetições em triplicatas.

Métodos analíticos: A biomassa foi verificada por absorvimetria em 605 nm contra água destilada. O correspondente peso seco foi obtido a partir de uma curva padrão estabelecida pela absorvância *versus* peso seco. A levana foi separada do caldo sobrenadante por precipitação pelo etanol a 75% e, após a hidrólise ácida a 65°C por 30 minutos, o polímero foi quantificado como açúcar redutor (AR). As dosagens de AR e ART foram determinadas pelo Método de Somogy (1945), em 540 nm. O pH foi verificado por potenciometria (marca HANNA instruments modelo HI 9321). O etanol foi quantificado por cromatografia gasosa (marca SHIMADZU modelo CG-17A, coluna Dbwax e comprimento 30cm/0,25 cm na temperatura de 60°C, injetor a 150°C e detector a 250°C).

Resultados e discussão

A Tabela 1 mostra as produções de levana e os parâmetros cinéticos do consumo de açúcar obtido da fermentação do caldo de cana, em ART inicial (ARTi) de 150 g/L, conduzidos em 3 diferentes pH iniciais utilizando a *Z. mobilis* ATCC 31821. Os pH iniciais dos meios de fermentações estudados foram 5,4; 5,9 e 6,3 e os pH finais atingiram, seqüencialmente: 3,82; 3,75 e 3,88, no final das fermentações (48 horas).

pH inicial		5,4	5,9	6,3
ART inicial	g/L	151,98	151,53	151,69
ART cons.	g/L	68,97	55,86	60,66
AR inicial	g/L	15,30	14,98	13,84
AR residual	g/L	60,75	49,38	50,33
Levana	g/L	1,66	2,54	3,83
YL/S	g/g	0,024	0,045	0,063
YP/S	g/g	0,38	0,37	0,34
YX/S	g/g	0,034	0,028	0,032
pH final		3,82	3,75	3,88

NOMENCLATURA: ART = açúcar redutor total; AR = açúcar redutor; YL/S = coeficiente de rendimento em levana (g levana/g açúcar consumido); YP/S = coeficiente de rendimento em etanol (g etanol/g açúcar consumido); YX/S = coeficiente de rendimento em biomassa (g biomassa/g de açúcar consumido).

As bioproduções de levana nas fermentações do caldo de cana em pH 5,4; 5,9 e 6,3 foram 1,66; 2,54 e 3,83 g/L, respectivamente (Tabela 1). Comparativamente, as produções obtidas em levana em pH 5,9 e 6,3 representam, respectivamente, um aumento em 53 e 130% com relação ao pH inicial 5,4 (referência=100%).

Outros autores, empregando diferentes cepas de *Z. mobilis* verificaram que a produção de levana foi bastante diversificada. Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) alcançaram valores de 12,6 g/L com *Z. mobilis* B-4286 em 150g de sacarose/L, em 16 horas. Por outro lado, Yoshida *et al.* (1990) utilizaram a mesma concentração de sacarose e obtiveram produções de levana de 35 g/L com *Z. mobilis* IN-17-10 e 3,1 g/L com *Z. mobilis* IFO 13757, em 3 dias, vale ressaltar que, nesses trabalhos, o substrato acrescentado ao meio de fermentação foi a sacarose e não o caldo de cana *in natura*.

Os consumos de açúcar em pH 5,4; 5,9 e 6,3 foram 68,97; 55,86 e 60,66 g/L, respectivamente. Apesar da alta disponibilidade de açúcar (ARTi) no meio, observou-se um baixo consumo de açúcar e elevada quantidade de ARTr (residual), que é dada pela diferença do ARTi – ARTc (consumido), no final das fermentações. Esses consumos insatisfatórios de

açúcar podem ser resultantes da osmolaridade do meio e, também, da presença de inibidores no caldo de cana (JOACHIMSTHAL *et al.*, 1998; PARK; BARATTI, 1993; TANO *et al.*, 2000)

Paralelamente, as concentrações de ARr (residual) encontradas no final das fermentações foram 60,75; 49,38 e 50,33 g/L, respectivamente, demonstrando uma utilização incompleta de monossacarídeos, que se acumularam no caldo de fermentação (Tabela 1).

Rogers *et al.* (1982) observaram que aproximadamente 10% da sacarose (ARTc) foram convertidos para levana por *Z. mobilis* ATCC 31821. Em nossos resultados, nos cultivos em pH 5,4; 5,9 e 6,3 foram convertidos para levana, seqüencialmente, 2,41; 4,55 e 6,31% do açúcar consumido do caldo de cana. Assim, nossos valores obtidos foram inferiores ao mencionado por estes autores. Todavia, a melhor conversão do açúcar para levana foi obtido quando o pH inicial foi 6,3.

Os resultados deste trabalho mostraram-se mais compatíveis com o parâmetro citado por Viikari (1984) onde 2% da sacarose (ARTi) foi convertido para levana. Verificamos que, no meio de cultivo em pH 5,4; 5,9 e 6,3, o valor de açúcar inicial convertido em levana foi respectivamente: 1,09; 1,68 e 2,52%. Portanto o aumento da conversão do açúcar para levana acompanhou a elevação dos pH iniciais.

Os rendimentos em levana (YL/S) aqui obtidos em pH 5,4; 5,9 e 6,3 foram: 0,024; 0,045 e 0,063, respectivamente. Proporcionalmente, estes rendimentos foram 87,5 e 162,5% superiores aos obtidos em pH 5,4.

Os rendimentos em etanol (YP/S) em pH 5,4; 5,9 e 6,3 foram, respectivamente, 0,38; 0,37 e 0,34. Os valores de rendimento em pH 5,4 e 5,9 não apresentaram alteração significativa. No entanto, em pH 6,3 o rendimento obtido de levana acarretou uma diminuição do rendimento em etanol (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com Diez e Yokoya (1996) e Viikari (1984)

Por outro lado, o rendimento em biomassa (YX/S) foi maior em pH 5,4 do que em pH 5,9 e 6,3 (Tabela 1). Os rendimentos em pH 5,4; 5,9 e 6,3 foram: 0,034; 0,028 e 0,032 respectivamente, que são compatíveis com os resultados obtidos por Diez e Yokoya (1996).

Vale destacar que, segundo os estudos de Lyness e Doelle (1983), que purificaram a enzima *levansacarase* de uma cultura de *Z. mobilis* NCIB 11199, a atividade enzimática para hidrólise da sacarose foi melhor em pH 6,5. Crittenden e Doelle (1994) estudaram a atividade *levansacarase* da *Z. mobilis* UQM 2716 e concluíram que para a formação de levana o pH 5,5 foi melhor. Posteriormente, Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) obtiveram uma maior produção de levana em pH inicial 5,0 do que em pH 6,0 e 7,0. Em somatória, esses autores observaram em *Z. mobilis* a existência de uma atividade descrita como *levanase*.

Diez e Yokoya (1996), por sua vez, demonstraram a influência do pH inicial do meio de fermentação, em cultura contínua, com *Z. mobilis* ATCC 31821. Na fermentação com pH inicial em 5,7, mantido sob controle, a produção de levana foi de 2,86 g/L, porém quando este pH inicial não esteve sob controle a produção foi de 3,77 g/L.

Muitas são as variáveis interferentes para a produção de levana. Com base nos resultados deste trabalho, podemos concluir que na fermentação do caldo de cana em alta concentração de açúcar inicial com *Z. mobilis* ATCC 31821, a produção de levana foi superior quando o pH inicial foi 6,3 em relação aos pH iniciais 5,4 e 5,9.

Os resultados indicam que *Z. mobilis* parece dispor de mecanismos bioquímicos reguladores da produção de levana, como substância de reserva temporária, quando há alta disponibilidade de frutose no caldo de fermentação. Para isso, ele pode utilizar-se da atividade *levanase*, como afirmaram Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999).

Referências

- ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives Biology Technology*, 42, n.3, p.292-297, 1999.
- CALAZANS, G.M.T. et al. Antitumor activity of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, v.19, p.19-21, 1997.
- CRITTENDEN, R.G.; DOELLE, H.W. Identification and characterisation of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). *Applied Microbiology Biotechnology*, v.41, n.3, p.302-308, 1994.
- DIEZ, J.C.; YOKOYA, F. Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. *Arquivos Biologia Tecnologia*, v.39, n.1, p.129-137, 1996.
- FALCÃO DE MORAIS, J.O. et al. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. *Journal Biotechnology*, v.31, p.75-91, 1993.
- FAVELA TORRES, E.; BARATTI, J. The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.27, p.121-128, 1987.
- JOACHIMSTHAL, E. et al. A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations. *Biotechnology Letters*, v.20, n.2, p.137-142, 1998.
- 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.
- LYNESS, E.W.; DOELLE, H.W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.5, n.5, p.345-350, 1983.
- PARKER, C. et al. Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. *Applied Environmental Microbiology*, v.63, n.9, p.3519-3525, 1997.
- PARK, S.C.; BARATTI, J. Effects of potassium chloride on ethanol production by an osmotolerant mutant of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.38, p.542-549, 1993.
- ROGERS, P.L. et al. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advance Biochemistry Engineering*, v.23, p.37-84, 1982.

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

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH*, v.16, p.41-46, 1998.

TANO, M.S.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. *Brazilian Archives Biology Technology*, v.43, n.4, p.425-430, 2000.

VIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.19, p.252-255, 1984.

YOSHIDA, Y., SUZUKI, R.; YAGI, Y. Production of levan by a *Zymomonas* sp. *Journal Fermentation Bioengineering*, v.70, n.4, p.269-271, 1990.

