

# Estudo Experimental da Produção de Sorbitol por *Zymomonas mobilis* em Altas Concentrações de Sacarose

## Experimental Study of Sorbitol Production by *Zymomonas mobilis* in High Sucrose Concentration

Marcos Roberto de Oliveira<sup>1</sup>; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>2</sup>; João Batista Buzato<sup>2</sup>; Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva<sup>3</sup>

---

### Resumo

O sorbitol apresenta diversas aplicações industriais e sua produção por método convencional é cara e de baixo rendimento. A produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* tem atraído atenção, pois tanto o custo de produção quanto o impacto ambiental são baixos. O sorbitol exerce função contra a elevada pressão osmótica, sendo que altas concentrações de açúcares promovem a sua produção. Este trabalho avaliou o efeito de alta concentração de sacarose na produção de sorbitol. A elevação de sacarose de 100 a 300g/L resultou em aumento de produção de sorbitol de 4,979 para 20,633g/L. A análise estatística demonstrou que 95,5% da variação na produção de sorbitol pode ser explicada pela metodologia estatística.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*; sorbitol; superfície de resposta.

---

### Abstract

The sorbitol presents several industrial applications and its conventional production is of high cost and low yield. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis* production has attracted attention as both production cost and environmental impact are low. The sorbitol plays an osmo-protective rule so that its production is promoted by high sugar concentrations. This work has evaluated the effect of high sucrose concentration in the sorbitol production. The raise of sucrose concentration from 100 to 300g/L caused an increase in the sorbitol production from 4,979 to 20,633g/l. Statistic analysis showed that 95,5% in the variation in sorbitol production can be explained.

**Key Words:** *Zymomonas mobilis*; sorbitol; response surface methodology.

### Introdução

Sorbitol, um açúcar álcool presente em frutas e vegetais, apresenta uma ampla aplicação nas indústrias de alimentos (KRETCHMER; HOLLENBECK, 1991), cosméticos, têxtil e farmacêutica (HOUGH; PARKER;

VLITOS, 1979). A produção industrial de sorbitol ocorre por meio de processo químico de hidrogenação de carboidratos, que libera níquel durante o processo, tornando o rendimento do processo menos atrativo (GORP, 1999).

---

<sup>1</sup> Aluno de Mestrado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE/UUEL

<sup>2</sup> Docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE/UUEL. macelligoi@uel.br.

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Tecnologia em Alimentos e Medicamentos – TAM/UUEL.

A utilização de processos fermentativos tornou-se uma opção viável (SILVEIRA; JONAS, 2002) nos últimos anos, devido à utilização de condições suaves de reação, diminuindo os custos de produção e os impactos ambientais (WEI, 2001). Dentre os microrganismos candidatos à produção industrial por processo fermentativo, têm-se destacado *Zymomonas mobilis*, uma bactéria, gram negativa anaeróbica, etanologênica (KANNAN; SANGILIYANDI; GUNASEKARAM, 1997). Embora o etanol seja o principal produto, a *Zymomonas mobilis* também apresenta potencial para produzir levana, ácido glucônico, sorbitol e fruto oligossacarídeos quando cultivada em meio de sacarose, (BEKERS, et al., 2000; SPRENGER, 1996)

A bactéria *Zymomonas mobilis* utiliza somente sacarose, glicose e frutose como fontes de carbono e energia (SWINGS; DELEY, 1977). O crescimento em meio de sacarose é acompanhado pela formação extracelular de levana e sorbitol com redução significativa na formação de etanol (SPRENGER, 1996; ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999).

Quando as células de *Zymomonas mobilis* são colocadas em condições de estresse, como alta concentração de açúcares, a enzima Glicose-frutose-oxirredutase (GFOR) fornece à célula uma alta concentração de sorbitol (um novo soluto para a célula), para contrapor os efeitos de desidratação provocada pela alta osmolaridade externa (KO et al, 2000; SPRENGER, 1996). O sorbitol não protege a célula contra o estresse salino acima de 2%, pois nessa condição a bactéria ele é incapaz de crescer (LOOS; et al, 1994).

O planejamento e otimização de experimentos têm sido aplicados em pesquisas básicas e tecnológicas. Essas pesquisas contribuem para a otimização de processos, onde diversos fatores estão envolvidos, e possibilitam a sua avaliação conjunta (BARROS; SCARMINO; BRUNS; 1996; BOX; HUNTER, 1978).

A metodologia de análise de superfície de resposta permite selecionar a combinação dos níveis ótimos dos fatores na obtenção da melhor resposta para um determinado processo ou produto (NELDER; MEAD, 1965).

Este estudo investigou a correlação entre o tempo de fermentação e o efeito das altas concentrações de sacarose, no processo fermentativo em batelada de produção de sorbitol, por meio de planejamento estatístico e análise dos dados por metodologia de superfície de resposta.

## Material e Métodos

### Microrganismo e Meio de Cultivo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Zymomonas mobilis* CP4, cedida pelo Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP - Rio Claro, mantida em meio de manutenção contendo em g.L<sup>-1</sup>: Sacarose 20; Extrato de levedura 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2; (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O) 0,5. Após o crescimento por 24 horas, a cepa foi mantida a 4°C, e repicada mensalmente. O inóculo foi padronizado em 0,2 g.L<sup>-1</sup>, utilizando-se o mesmo meio de manutenção contendo sacarose a 100 g.L<sup>-1</sup>, mantido a 25°C por 24 horas. No meio de fermentação, variou-se a concentração de sacarose de 100 g.L<sup>-1</sup> a 300 g.L<sup>-1</sup> acrescido dos sais descritos anteriormente.

### Processo Fermentativo

As fermentações em batelada foram realizadas em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio de fermentação a 25°C, e sem agitação, de acordo com a tabela do planejamento estatístico descrito na tabela 1.

**Tabela 1:** Delineamento fatorial completo para a produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* CP4.

Ensaio	Fatores		Respostas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	ART consumido g.L <sup>-1</sup>	Sorbitol g.L <sup>-1</sup>
01	-1	-1	0,581	14,164	1,076
02	-1	0	0,755	39,884	3,652
03	-1	+1	0,884	55,378	4,979
04	0	-1	0,558	30,970	12,167
05	0	0	0,681	38,553	13,216
06	0	+1	0,753	46,726	15,578
07	+1	-1	0,366	17,458	12,025
08	+1	0	0,481	47,468	13,515
09	+1	+1	0,558	51,477	20,633
10	0	0	0,582	36,413	13,286
11	0	0	0,563	40,053	12,302

Fatores	Níveis de variação		
	-1	0	+1
X <sub>1</sub> Sacarose	100 g.L <sup>-1</sup>	200 g.L <sup>-1</sup>	300 g.L <sup>-1</sup>
X <sub>2</sub> Tempo	12 horas	18 horas	24 horas

## Métodos analíticos

Após o processo fermentativo, os meios foram centrifugados (4.300 g por 15 minutos) e a biomassa foi determinada espectrofotometricamente, relacionando-se absorvância com uma curva de peso seco (g/L<sup>-1</sup>). Os açúcares redutores (AR) foram determinados pelo método de Somogy (1945) e Nelson, (1944); os açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método do Fenol-Sulfúrico (DUBOIS, 1956), utilizando-se glicose como padrão.

O teor de sorbitol foi determinado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando coluna Aminex HPX-87C, com 300x78 mm, mantida em forno a 55 ° C. O método de corrida foi isocrático com água ultrapura como fase móvel na vazão de 1,0 mL/min, utilizando-se o detector de Índice de Refração.

## Análise Estatística

A produção de sorbitol foi avaliada com relação aos fatores X<sub>1</sub> (concentração inicial de sacarose) e X<sub>2</sub> (tempo de fermentação), utilizando como

planejamento estatístico o delineamento fatorial completo do tipo 3<sup>2</sup>, com 2 repetições verdadeiras no ponto central. Totalizaram-se experimentos aleatorizados (Tabela 1) e as respostas biomassa, ART consumido e produção de sorbitol foram determinadas. A análise foi realizada por meio da metodologia de superfície de resposta (BARROS; SCARMINO; BRUNS, 1996 ; BOX; HUNTER, 1978).

## Resultados e Discussão

Onze experimentos foram realizados avaliando-se o efeito da concentração de sacarose (X<sub>1</sub>) e tempo de fermentação (X<sub>2</sub>) de acordo com o delineamento fatorial completo (tabela 1). A produção de sorbitol (Z) foi modelada de acordo com a equação do 2 ° grau (equação1). Os coeficientes foram estimados pelo método dos mínimos quadrados:

$$Z=12,901 + 6,077 \cdot X_1 - 4,268 \cdot X_1^2 + 2,653 \cdot X_2 + 1,020 \cdot X_2^2 + 1,176 \cdot X_1 \cdot X_2$$

(equação 1)

Os valores calculados pela equação 1 e os observados experimentalmente para a produção de sorbitol são mostrados na tabela 2. O coeficiente de determinação ajustado indica que 95,51% da variação na produção de sorbitol pode ser explicada pela concentração inicial de sacarose (X<sub>1</sub>) e tempo de fermentação (X<sub>2</sub>).

**Tabela 2:** Valores calculados e observados para a produção de sorbitol (g.L<sup>-1</sup>)

Ensaio	Valores originais dos fatores		Produção sorbitol (g.L <sup>-1</sup> )	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Calculado	Observado
1	100	12	2,098	1,076
2	100	18	2,555	3,652
3	100	24	5,053	4,9790
4	200	12	11,268	12,167
5	200	18	12,901	13,216
6	200	24	16,575	15,578
7	300	12	11,901	12,025
8	300	18	14,710	13,515
9	300	24	19,561	20,633
10	200	18	12,901	13,286
11	200	18	12,901	12,302

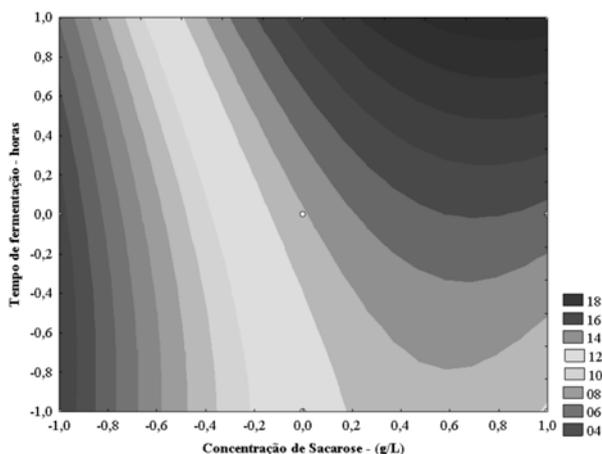
A análise de variância da produção de sorbitol é apresentada na tabela 3 e demonstra que a regressão (equação 1) é significativa com  $p < 0,05$ . Os desvios de regressão (não mostrados) não são significativos ( $p > 0,12$ ). Portanto, a equação 1 apresenta boa capacidade preditiva (tabela 2), exceto para os dois valores inferiores dos fatores, possivelmente em razão de dificuldades analíticas.

**Tabela 3:** Análise de variância da produção de sorbitol considerando o modelo completo.

Variável.: Sorbitol (g.L <sup>-1</sup> ) - R-sqr = 0,97752; Adj = 0,95505 - QM Resíduo = 1,451311					
Causa de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F Calculado	p
Sacarose (g.L <sup>-1</sup> ) L+Q	267,7875	2	133,8937	92,25708	0,000113
Tempo (h) L+Q	44,8895	2	22,4448	15,46517	0,007224
1*2	5,5343	1	5,5343	3,81328	0,108287
Resíduo	7,2566	5	1,4513		
Total	322,8678	10			

L = Termo linear. Q = Termo quadrático. 1\*2 = Interação

As curvas de níveis demonstram as sub-regiões mais adequadas para os mais altos valores de produção de sorbitol, com o tempo na faixa de 0,80 a 1,00 (22,8 horas a 24 horas) e a concentração inicial de sacarose na faixa de 0,80 a 1,00 (280 g.L<sup>-1</sup> a 300 g.L<sup>-1</sup>) (Figura 1).



**Figura 1:** Curva de superfície de resposta para a produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* variando o tempo e a concentração de sacarose

De acordo com a Tabela 1, os fatores concentração inicial de sacarose e tempo de fermentação influenciaram positivamente a produção de sorbitol. Nos ensaios nos quais a concentração inicial de sacarose era de 100 g.L<sup>-1</sup> (ensaios: 1, 2, 3), a produção de sorbitol foi respectivamente de 1,07 g.L<sup>-1</sup>, 3,65 g.L<sup>-1</sup> e 4,95 g.L<sup>-1</sup> com tempos de fermentação 12, 18 e 24 horas, respectivamente. Quando esses valores são comparados aos ensaios com concentração inicial de sacarose de 300 g.L<sup>-1</sup> (ensaios: 7, 8, 9) a produção foi respectivamente de 12,02 g.L<sup>-1</sup>, 13,51 g.L<sup>-1</sup> e 20,63 g.L<sup>-1</sup>. Nos tempos de fermentação 12, 18 e 24 horas respectivamente, ocorreu um aumento significativo de produção de sorbitol com o aumento da pressão osmótica causada pela elevada concentração inicial de açúcares.

O efeito osmoprotetor do sorbitol é descrito por vários autores em resposta ao estresse osmótico, que pode ser provocado por uma alta concentração de açúcares presentes no meio de cultivo (LOSS, *et al.*, 1994; BEKERS *et al.*, 2000; CAZETTA, *et al.*, 2004).

## Conclusões

Os fatores concentração inicial de sacarose e tempo de fermentação apresentaram efeitos significativos para a produção de sorbitol.

Para a resposta avaliada, considerando os fatores concentração inicial de sacarose e tempo de fermentação, foi observado que a regressão foi significativa ( $p < 0,05$ ) e o modelo proposto explica 95,51% da variação na produção de sorbitol.

## Referências

- ANANTHALAKSHMY, V. V.; GUNASEKARAN, P. Optimization of Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v.42, n.3, p.291-297, 1999.
- BARROS B.N.; SCARMINO I.S.; BRUNS E.R. *Planejamento e otimização de experimentos*. 2.ed. São Paulo: Unicamp; 1996.

- BEKERS, M. et al. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, n.55, p.147-150, 2000.
- BOX G.E.P.; HUNTER W.G. *Statistics for experiments*. New York: Wiley; 1978.
- CAZETTA, M.L. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochemistry*, London, 2004. In press.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Analytical Chemistry*, Washington, n.9, p.77-103, 1956.
- GORP, K.V. Catalytic hydrogenation of fine chemicals: Sorbitol production. *Catalysis Today*, Amsterdam, v.52, p.349-361, 1999.
- HOUGH, C.A.M.; PARKER, K.J.; VLITOS, A.J. *Developments in sweeteners*. Londres: Applied Science Publisher, 1979.
- KANNAN, T. R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAM, P. Influence of intra- and extra cellular surceases of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by-product formation. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.19, n.7, p.661-664, 1997.
- KO, B.C.B., et al. Purification, identification and characterization of an osmotic response element binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v.270, p.52-61, 2000.
- KRETCHMER, N.; HOLLENBECK, C.B. *Sugars and Sweeteners*. Florida: CRC Press, 1991.
- LOOS, H. et al. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 176, n. 24, p.7688-7693, 1994.
- NELDER, J.A.; MEAD, D.R.. A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, London, v.7, p.308-312, 1965.
- NELSON, N., A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry*, Washington, v.153, p. 375-380, 1944.
- SILVEIRA, M.M.; JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.59, p.400-408, 2002.
- SOMOGY, M. A. A new reagent for determination of sugar. *Journal of Biology Chemistry*, Bethesda, v.160, p.61-68, 1945.
- SPRENGER, G.A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis* a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 146, p.301-307, 1996.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, Baltimore, v.41, n.1, p.1-46, 1977.
- WEI, W. Intergeneric protoplast fusion between *Kluveromyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to produce sorbitol from Jerusalem artichokes. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.23, p.799-803, 2001.