

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol com células de *Zymomonas mobilis* tratadas com glutaraldeído e imobilizadas em alginato de cálcio

Analia Borges Folle¹, Victoria Baschera¹, Sabrina Carra¹, Eloane Malvessi¹, Mauricio Moura da Silveira¹

¹Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia - Laboratório de Bioprocessos
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS
E-mail para contato: abfolle@ucs.br

RESUMO

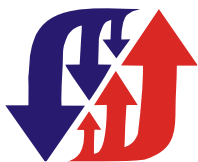
*A ação catalítica das enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidoredutase e glicono- δ -lactonase (GFOR/GL) é independente da viabilidade das células de *Zymomonas mobilis*. Convencionalmente, para evitar-se que o substrato da reação enzimática seja metabolizado, é feita a inviabilização celular com detergente, levando à permeabilização da parede da bactéria e ao acúmulo dos produtos de interesse. No processo com células imobilizadas em alginato de cálcio, é feita a reticulação prévia das células com glutaraldeído, substância conhecida pela sua ação biocida. Em estudos preliminares observou-se a eficácia da substituição da etapa de permeabilização pela inativação por glutaraldeído. Neste trabalho buscou-se avaliar a produção de ácido lactobiônico para as células tratadas somente com glutaraldeído, em comparação ao procedimento à permeabilização com CTAB e reticulação com glutaraldeído. A concentração de produtos obtida foi de 0,5 mol/L, com rendimento de 77%, para tratamento somente com glutaraldeído, resultados comparáveis aos melhores descritos na literatura para o procedimento convencional.*

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*, glicose-frutose oxidoredutase / gliconolactonase, glutaraldeído, inibição de metabolismo

INTRODUÇÃO

As enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL), presentes em células da bactéria, *Zymomonas mobilis*, são capazes de converter glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente (ZACHARIOU e SCOPES, 1986). A ação catalítica das enzimas GFOR/GL independe da viabilidade celular e, por isso, tem-se empregado a permeabilização celular com a finalidade de solubilizar os cofatores essenciais para a conversão a etanol, impedindo o metabolismo fermentativo das células. Dentre as técnicas de permeabilização, destaca-se a o tratamento com tolueno (CHUN e ROGERS, 1988) e com detergente brometo de cetil trimetil amônio - CTAB (REHR *et al.*, 1991), com a obtenção de excelentes rendimentos em produto (98-99%). Na literatura há relatos formas alternativas para inviabilizar o metabolismo fermentativo das células, como por exemplo, a utilização de células secas de *Z. mobilis* (CHIKAWA *et al.*, 1989) ou elevadas concentrações iniciais de substratos (SILVEIRA *et al.*, 1999) na reação de bioconversão.

Além da glicose, GFOR tem a capacidade de oxidar lactose a ácido lactobiônico (SATORY *et al.*, 1997; MALVESSI *et al.*, 2006). Na preparação do biocatalisador a ser utilizado na obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol com este sistema enzimático, Carra (2012) destaca a permeabilização das células de *Z. mobilis* com CTAB 0,2% (m/v), seguido



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

da reticulação com glutaraldeído e posterior imobilização em alginato de cálcio. Utilizando-se esta técnica, em estudos preliminares do grupo para obtenção de ácido glicônico (dados não publicados), verificou-se que ambos os tratamentos agem na inviabilização celular, destacando, ainda, a característica biocida do glutaraldeído (LEUNG, 2001; PEREIRA et al., 2014). Salienta-se que somente o tratamento com glutaraldeído, em ensaios de bioconversão com glicose/frutose, resultou num aumento na produtividade específica e por consequência em aumento da velocidade de formação de produto, desta forma, reduzindo o tempo das reações. Assim, visando a simplificação do processo, tornou-se interessante a avaliação do tratamento prévio das células apenas com glutaraldeído para ensaios de bioconversão de lactose/frutose em ácido lactobiônico e sorbitol.

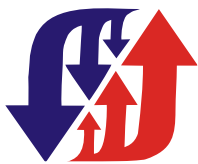
MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e meio de cultura: O microrganismo utilizado foi *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (NRRL B-4492), fornecido pelo *United States Departamento of Agriculture* (USDA). As culturas foram repicadas mensalmente, incubadas a 30°C e estocadas a 4°C. Os meios líquidos utilizados para conservação e ativação, obtenção do inóculo e nos cultivos em biorreator para a produção de células/enzimas foram formulados conforme descrito por Malvessi *et al.* (2006).

Inviabilização do metabolismo fermentativo e imobilização celular: Após o cultivo, as células foram submetidas aos tratamentos de inviabilização celular prévios à imobilização: Ensaio 1 - suspensão celular concentrada em 25 g/L (m/v) foi tratada com brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) 0,2% (m/v), a 4°C, por 15 minutos e reticuladas com glutaraldeído 0,5% (m/v), por 10 minutos, em temperatura ambiente. Ensaio 2 - suspensão celular concentrada a 50 g/L foi tratada somente com glutaraldeído 0,5 % (m/v), em temperatura ambiente, por 10 minutos. Ensaio 3 – controle com células isentas de tratamento. Para a imobilização em alginato de cálcio seguiu-se a metodologia descrita por Carra (2012).

Ensaios de bioconversão: Os ensaios de bioconversão foram realizados em reatores de 200 mL, contendo 100 mL de solução de lactose 0,7 mol/L e frutose 0,6 mol/L. O reator foi mantido em banho termostático, à temperatura de 39°C, sob agitação magnética, com pH controlado em 6,4 pela adição automática de solução de NaOH na concentração 7 mol/L. A concentração celular do biocatalisador imobilizado foi de 20 g/L (CARRA, 2012; MALVESSI *et al.*, 2006).

Métodos analíticos: A concentração celular foi estimada pela medida da absorbância de suspensões celulares, a 560nm, em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) e, ao final dos cultivos, por gravimetria. As concentrações de produtos, ácido lactobiônico e sorbitol, foram estimadas indiretamente em função do volume e da concentração de base utilizada para o controle do pH da reação. A determinação da atividade enzimática foi realizada como descrito para os ensaios de bioconversão com solução de glicose/frutose 0,7 mol/L, com células livres na concentração de 4 g/L e pH controlado em 6,4, pela adição de NaOH 1 mol/L. Uma unidade de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzimas capaz de formar 1 mmol de ácido glicônico por hora, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas (U/g).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1, apresentam-se os perfis cinéticos de formação de produto em ensaios com as células isentas de tratamento, tratadas somente com glutaraldeído e tratadas com CTAB/glutaraldeído. Observa-se que, em 24 horas de processo, o tratamento das células somente com glutaraldeído (Ensaio 2) resultou em maiores concentrações de produto formado, confirmando os resultados anteriores obtidos pelo grupo (dados não publicados), que comparou os diferentes tratamentos em ensaios de bioconversão com glicose e frutose. Sugere-se que este comportamento seja devido a combinação das formas de tratamento, uma vez que as atividades enzimáticas após os diferentes tratamentos de inativização celular realizados de forma separada foram semelhantes, ao passo que para o duplo tratamento (CTAB/glutaraldeído), observou-se redução de 25% na atividade enzimática (Figura 2).

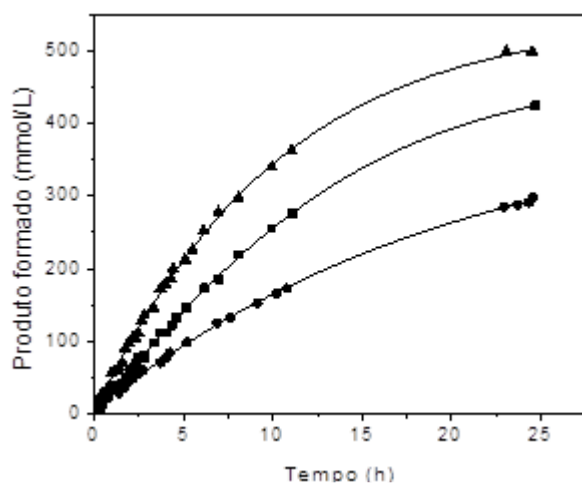


Figura 1 - Concentração de produtos formado em ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* submetidas aos diferentes tratamentos prévios à imobilização: (■) sem tratamento; (●) permeabilização com CTAB e reticulação com glutaraldeído; (▲) tratamento somente com glutaraldeído.

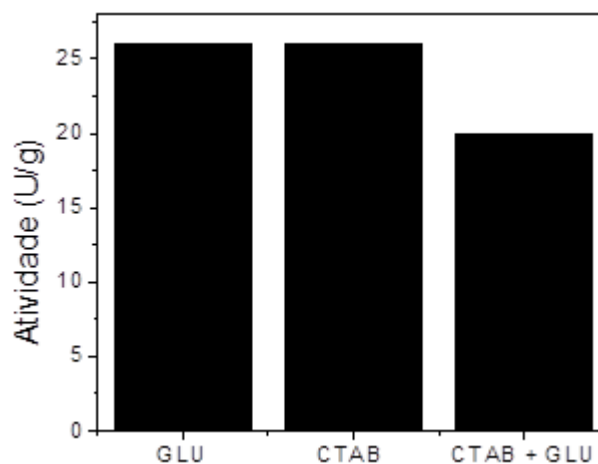
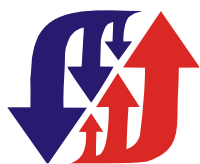


Figura 2 - Atividade enzimática GFOR/GL presentes nas células de *Zymomonas mobilis* submetidas aos diferentes tratamentos: GLU, tratadas somente com glutaraldeído; CTAB, tratadas somente com CTAB; CTAB+GLU, permeabilização com CTAB e reticulação com glutaraldeído.

Os resultados gerais para os ensaios de bioconversão com as células de *Z. mobilis* após os diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 1. Destaca-se o rendimento superior para as células tratadas apenas com glutaraldeído, atingindo 77% de conversão em 24h, enquanto para as células com duplo tratamento (CTAB/glutaraldeído) e isentas de tratamento, o rendimento máximo foi de 44% e 65%, respectivamente. Em termos de produtividade específica e velocidade máxima de formação de produto, o tratamento único com glutaraldeído representa um aumento de 32% e 160%, respectivamente, em comparação ao duplo tratamento. Embora os resultados para as células permeabilizadas com CTAB e reticuladas com glutaraldeído tenham acarretado em rendimentos inferiores aos atingidos com as células tratadas somente com glutaraldeído, Carra (2012) relata, para o duplo tratamento, valores similares aos atingidos somente com glutaraldeído no presente estudo. Desta forma, os dados obtidos para o tratamento com glutaraldeído são validados.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1 – Resultados gerais dos ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* submetidas aos diferentes tratamentos e imobilizadas em alginato de cálcio (Substrato inicial: lactose 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L, pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L de biocatalisador)

Parâmetros	Branco	Padrão	GLUT
t (h)	24	24	24
Pmax (mmol/L)	426	298	499
Sf (mmol/L)	232	375	151
ρ (%)	65	44	77
p (mmol/L/h)	17	15	20
q (mmol/g/h)	0,86	0,76	1,00
$\mu_{p,máx.}$ (mmol/g/h)	1,5	1,0	2,6

t, tempo de processo, Pmax, concentração máxima de produto (ácido lactobiônico ou sorbitol); Sf, concentração de lactose residual; ρ , rendimento em produto; p, produtividade; q, produtividade específica; $\mu_{p,máx.}$, máxima velocidade específica de formação de produto.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o tratamento das células de *Z. mobilis* somente com glutaraldeído não acarreta em redução da atividade catalítica da enzima, livre ou imobilizada, possibilitando, ao contrário, maiores produtividade e rendimento na bioconversão de lactose e frutose a ácido lactobiônico e sorbitol. Adicionalmente, o tratamento somente com glutaraldeído, permitiria suprimir uma etapa do processo e, assim, reduzir custos operacionais, aspecto particularmente importante no caso de sua eventual aplicação industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UCS, FAPERGS, CNPq e CAPES pelo apoio estrutural, financeiro e pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carra, S. 2012. *Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de Zymomonas mobilis*. Universidade de Caxias do Sul. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas. Programa de pós-graduação em Biotecnologia (Dissertação de mestrado). Caxias do Sul.
- Chun, U. H.; Rogers, P. L. 1988. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *App.Microbiol. Biotechnol.* 29:19-24.
- Ichikawa, Y.; Yutaka, K.; Nobuo, K.; Nobuhiro, M. 1989. Preparation of gluconic acid and sorbitol. *European Patent Application*, EP. 0322723.
- Leung, H. 2001. Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies. Review. *Ecotox Environ Safe.* 49:26-39.
- Malvessi, E.; Concatto, K.; Carra, S.; Silveira, M.M. 2006. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49: 139-144.
- Pereira, S. P. P.; Oliveira, R.; Coelho, S.; Musso, C.; Soares, A. M. V. M.; Domingues, I.; Nogueira, A. J. A. 2014. From sub cellular to community level: toxicity of glutaraldehyde to several aquatic organisms. *Sci Total Environ.* 470-471: 147-158.
- Rehr, B.; Wilhem, C.; Sahm, N. 1991. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Microbiol. Biotechnol.* 35:144-148.
- Satory M.; Fuerling, M.; Haltrich, D.; Kulbe, K.D.; Pittner, F.; Nidetzky, B. 1997. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnol. Lett.* 19:1205-1208.
- Silveira, M. M.; Wisbeck, E.; Lemmel, C.; Erzinger, G.; Costa, J.P.L.; Bertasso, M.; Jonas, R. 1999. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 75:99-103.
- Zachariou, M.; Scopes, R. K. 1986. Glucose-Fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.* 167:863-869.