

# EMPREGO DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA O CULTIVO DE *GLUCONOBACTER SUBOXYDANS* E QUANTIFICAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DE SORBITOL A SORBOSE

## THE UTILIZATION OF ALTERNATIVE SUBSTRATES FOR *GLUCONOBACTER* *SUBOXYDANS* GROWTH AND QUANTIFICATION OF L-SORBOSE FROM D-SORBITOL BIOCONVERSION

Jairo BRUNINI\*

Dejanira de Franceschi de ANGELIS\*\*

Akiko POLEZEL \*\*\*

### RESUMO

A bioconversão de D-sorbitol a L-sorbose é uma importante reação da síntese do ácido ascórbico a partir da glicose. Os melhores rendimentos desta reação são obtidos com a utilização da bactéria *Gluconobacter suboxydans*. Neste processo, várias são as fontes potenciais bioestimuladoras de crescimento microbiano,

(\*) - Bolsista da CAPES - P. G. C. B. - Área de Microbiologia Aplicada - I. B. - UNESP - Rio Claro.

(\*\*) - Depto. de Bioquímica e Microbiologia - IB - UNESP - Rio Claro.

(\*\*\*) - Ex-estagiária Depto. de Bioquímica e Microbiologia - IB - UNESP - Rio Claro.

Apoio FUNDUNESP (Processo n° 448/90 DFP/IF/CBS).

dentre estes materiais de origem vegetal e mesmo microbiana, sendo que alguns configuram-se como resíduos industriais.

Os substratos alternativos elaborados a partir de resíduos como leite de levedura e milhocina foram empregados com diferentes métodos de preparo e aplicados aos cultivos em técnica de batelada com *G. suboxydans*. Os meios de cultivo ensaiados mostraram-se promissores, apresentando resultados compatíveis com aquele utilizado como meio padrão.

## ABSTRACT

The bioconversion of D-sorbitol to L-sorbose is a important reaction of ascorbic acid from glucose, which the best yields were carry out with the *Gluconobacter suboxydans* bacterium. There are several available materials in this process, with potential growth-promoting (biostimulating) properties, which may be composed of plant or microbial materials, some of these belonging to industrial waste.

The substrates utilized for the batch culture of *Gluconobacter suboxydans* were formulated with baker's yeasts or corn steep liquor worked up by different methods. The culture media assayed showed hopeful and their issues were compatible with the culture utilizing standard media.

## INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico é um produto químico obtido industrialmente por um processo sintético, cujas propriedades químicas e biológicas são idênticas quando comparadas com aquelas de origem natural. O ácido ascórbico está incluído no grupo das vitaminas hidrossolúveis, constituindo material de grande utilidade na indústria alimentícia. A síntese química

desta vitamina pode ser realizada através de um processo de fabricação a partir da glicose, onde esta é reduzida eletroliticamente a D-sorbitol. Este poliálcool é a seguir oxidado pela ação de microorganismos a L-sorbose, que por sua vez sofre uma série de tratamentos químicos até ser transformada em ácido ascórbico.

O processo de fabricação da vitamina C utilizando a bactéria *Acetobacter xylinum* foi primeiramente descrito em 1896 (BERTRAND), apresentando taxa de rendimento de 75%. Atualmente, apesar de outros trabalhos indicarem que espécies de microorganismos tais como *Bacterium*, *Acetobacter* e *Streptomyces* possam realizar a conversão do D-sorbitol a D-sorbose, a literatura descreve o gênero *Gluconobacter* como o mais promissor nesta conversão, apresentando rendimentos já descritos acima de 90% (JAFFE, 1983).

O gênero *Gluconobacter* Asai, 1935 pertence a família ACETOBACTERIACEAE, possui células elipsóides a bastonetes curtos, ocorrem isoladas ou aos pares, são Gram negativas e podem ser móveis ou não, são estritamente aeróbias, tendo o oxigênio como acceptor final de elétrons. As colônias são claras, crescendo entre 25-30°C, não à 37°C e pH entre 5,5 e 6,0, contudo muitas linhagens podem crescer à pH 3,6.

Este trabalho buscou cultivar *Gluconobacter suboxydans* em meios de cultura alternativos e suplementados, visando obter rendimentos compatíveis com processos economicamente viáveis. Dentre os meios ensaiados empregou-se: milhocina, extrato aquoso de levedura, autolizado de levedura e extrato aquoso de levedura, todos acrescidos do sorbitol.

## MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo *Gluconobacter suboxydans*

Meios de cultivo

Meio de manutenção de manitol (MYP) DE LEY et al. (1984);

Meio Multidiferencial de Lee (LMDA) CASEY & INGLEDEW (1981);

Meio basal (YE) MORI et al. (1981);

Meio de Milhocina (M);

Meio de Extrato Aquoso de Levedura (EA);

Meio de Autolizado de Levedura (A);

### **Preparo dos meios de cultivo**

Meio YE (MORI et al., 1981)

Os constituintes do meio: 20g de extrato de levedura (DIFCO); 50g de sorbitol; 3g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 20mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 20 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 40mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0mg de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 10g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e 4mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  para 1000ml de água. Os constituintes do meio foram reidratados, o pH ajustado para 5,0 e distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 500ml, sendo em seguida esterilizados a 1 atm. por 15 minutos.

### **Meio M**

A milhocina ou "corn steep liquor", resíduo da produção de milho fornecido pela REFINAÇÕES DE MILHO BRASIL LTDA., foi ajustado para a concentração final de 20g/L de massa seca, à qual acrescentou-se sorbitol na concentração final de 5%. A seguir este meio foi distribuído em frascos de Erlenmeyer de 500ml e esterilizados à 1 atm. por 15 minutos.

### Meio EA

O extrato aquoso de levedura elaborado segundo LODDER & KREGER (1952) apud LODDER (1971) foi diluído para uma concentração final de 7g/L de massa seca, ao qual acrescentou-se sorbitol na concentração final de 5%. O meio foi distribuído em frascos de Erlenmeyer de 500ml e esterilizados a 1 atm. por 15 minutos.

### Meio A

Preparou-se uma suspensão de aproximadamente 500g de levedura de panificação (FLESHMANN) para 500ml de água em um balão de 1000ml, acrescentando-se 0,2ml de toluol e homogeneizou-se, mantendo-se em banho-maria à 55<sup>0</sup>C por 48 horas e pH inicial de 5,5. Em seguida pasteurizou-se por 10 minutos à 80<sup>0</sup>C e manteve-se o material sob refrigeração (7±2<sup>0</sup>C). Para o preparo do meio centrifugou-se a 3.000 rpm, e o extrato líquido ajustado para uma concentração de 7g/L de massa seca, ao qual acrescentou-se sorbitol na concentração final de 5%. o meio foi distribuído em frascos de Erlenmeyer de 500ml e esterilizados a 1 atm. por 15 minutos.

O procedimento experimental para cada meio ensaiado obedeceu a seqüência da FIG. 1.

Para as medidas quantitativas de crescimento celular empregou-se o espectrofotômetro CARL ZEISS M4 Q a 560nm em amostras colhidas a cada 12 horas. A conversão de sorbitol a sorbose foi acompanhada através do método quantitativo para açúcares redutores totais (ART) recomendado por BERNFELD (1955), elaborando-se uma curva de calibração em que a L-sorbose padrão estava na concentração de 540mg/ml. Os rendimentos da bioconversão são expressos em porcentagem com base na quantidade de ART produzida em relação à inicial.

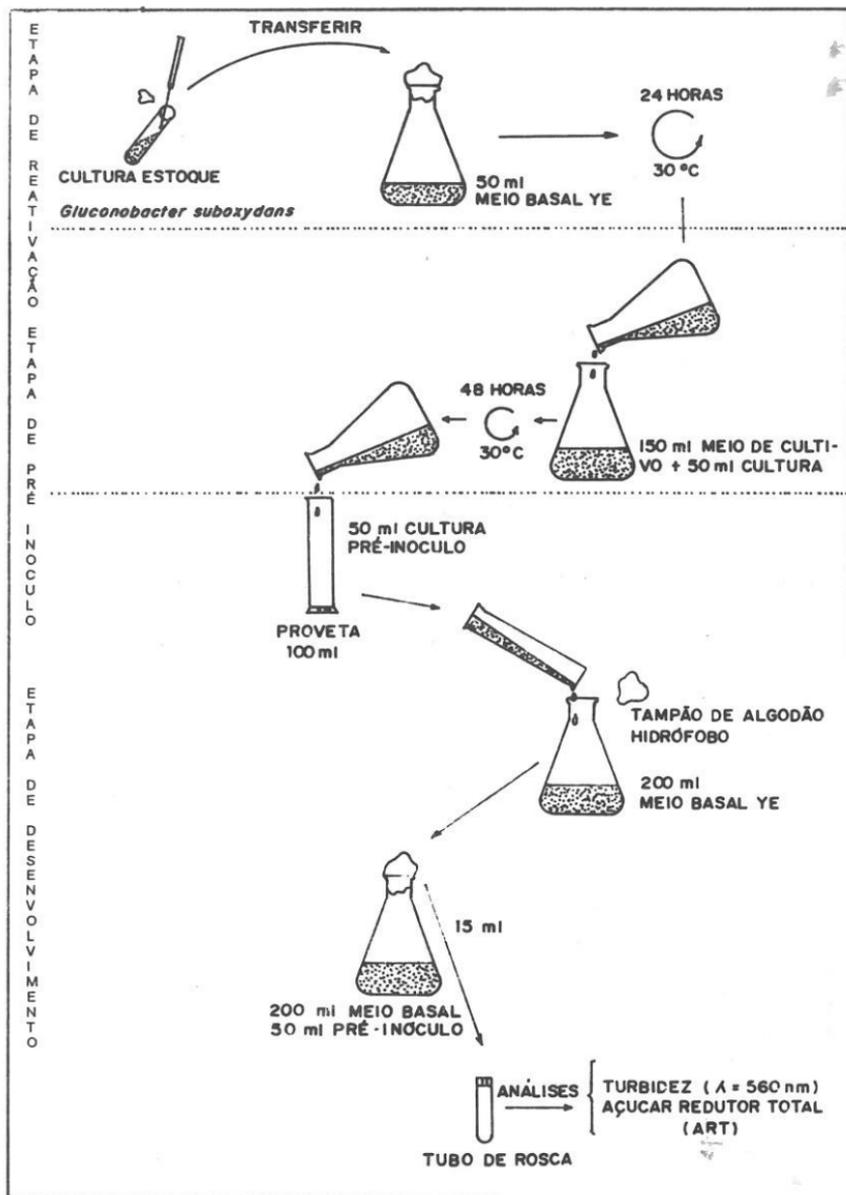


Figura 1 - Diagrama do Procedimento Experimental do Cultivo de *Gluconobacter suboxydans*.

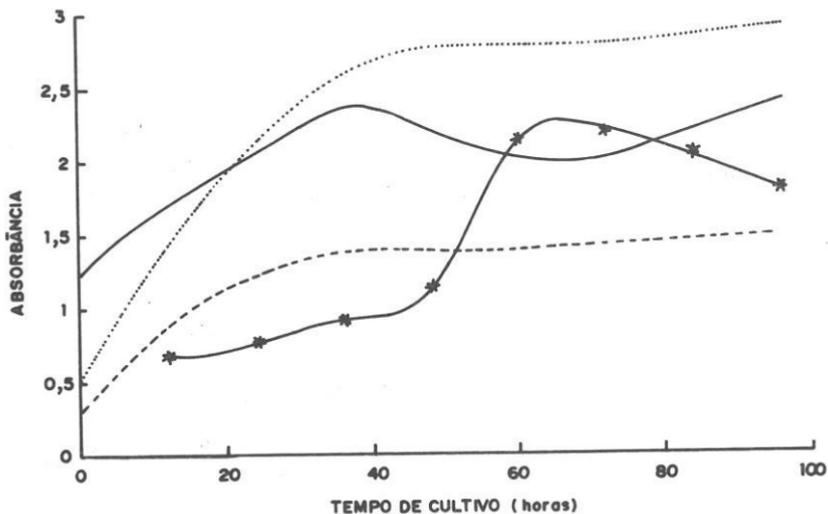


Figura 2 - Avaliação da Absorbância a 560 nm do Cultivo de *Gluconobacter suboxydans* nos meios de Cultura Basal (YE-); Milhocina (M\*); Extrato Aquoso de Levedura (EA...) e Autolisado Delevedura (A---).

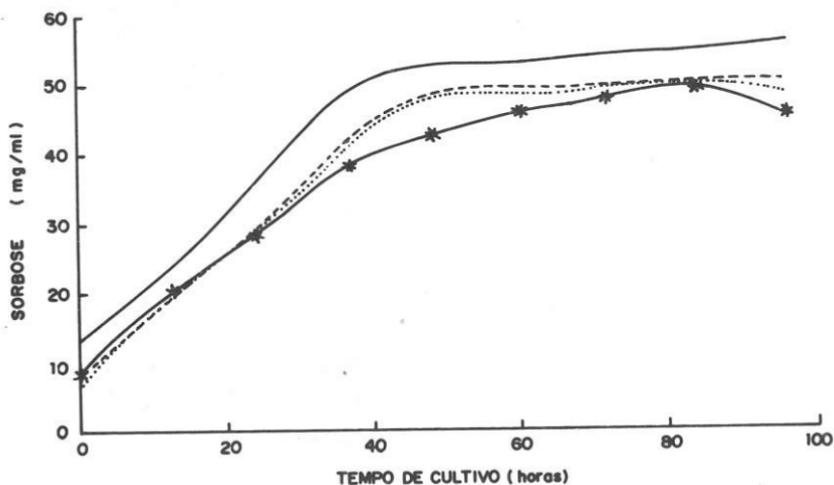


Figura 3 - Produção de L-Sorbose (mg/ml) *Gluconobacter suboxydans* Cultivado nos Meios Basal (YE-); Milhocina (M\*); Extrato Aquoso de Levedura (EA....) e Autolisado de Levedura (A---).

## RESULTADOS

O *G. suboxydans* são periodicamente reativadas e a pureza foi verificada através da inoculação em meio LMDA (CASEY & INGLEDEW, 1981).

Os dados de avaliação quantitativa do crescimento de *G. suboxydans* nos meios YE, M, EA e A durante 96 horas estão expressos na TAB. I e FIG. 2. O rendimento porcentual da bioconversão do *D-sorbitol a L-sorbose* estão expressos na TAB. II e FIG. 3.

**Tabela 1.** Avaliação da absorbância a  $\lambda = 560$  nm de *G. suboxydans* cultivado nos meios de cultura basal (YE), milho-cina (M), autolisado de levedura (A) e extrato aquoso de levedura (EA) sob agitação (270 rpm) e à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 96 horas

cultivo horas	Absorbância $\lambda = 560$ nm			
	meios de cultivo			
	YE	M	EA	A
0	1,229	—	0,507	0,291
12	1,773	0,666	1,490	0,958
24	1,973	0,708	2,166	1,223
36	2,493	1,016	2,632	1,406
48	2,185	0,811	2,796	1,385
60	1,992	2,426	2,774	1,370
72	1,938	2,178	2,761	1,434
84	2,203	2,034	2,858	1,445
96	2,385	1,779	2,895	1,486

Tabela 2. Rendimento percentual da bioconversão de sorbitol a sorbose de *Gluconobacter suboxydans* nos meios basal (YE), milhocina (M), autolisado de levedura (A) e extrato aquoso de levedura (EA) cultivado sob agitação (270 rpm) e à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 96 horas.

meio de cultura	nº do frasco	Porcentagem de bioconversão (%)									
		tempo de cultivo (horas)									
		0	12	24	36	48	60	72	84	96	
YE	1	30,0	41,3	62,3	98,7	100	97,6	100	96,2	100	
	2	26,9	45,4	74,9	100	100	100	100	100	100	
	3	21,9	49,6	75,9	100	100	100	97,8	100	100	
	$\bar{x}$	26,3	45,5	71,1	100	100	=100	=100	=100	100	
M	4	18,6	—	41,9	76,5	83,5	91,8	94,9	98,6	89,7	
	5	13,9	38,9	59,1	80,0	85,7	88,6	90,3	97,9	92,7	
	6	20,0	44,8	62,5	79,8	85,2	96,1	98,7	100	88,1	
	$\bar{x}$	17,5	41,9	54,5	78,8	84,8	92,2	94,6	=100	90,2	
EA	7	14,5	37,2	51,3	80,6	100	100	99,9	100	99,5	
	8	12,7	43,6	56,1	86,7	100	91,3	100	100	97,8	
	9	11,8	41,2	56,7	81,1	94,2	93,5	96,1	95,9	93,0	
	$\bar{x}$	13,0	40,7	54,7	82,7	99,2	95,5	98,7	=100	96,8	
A	10	16,4	45,3	46,8	83,9	100	99,4	97,6	96,4	100	
	11	17,9	34,4	62,9	88,8	95	94,7	96,2	100	97,2	
	12	13,4	36,3	56,3	83,8	100	99,4	100	100	97,1	
	$\bar{x}$	15,9	38,7	55,4	85,5	=100	97,9	99,3	=100	=100	

## DISCUSSÃO

A cultura de *G. suboxydans* após ser testada quanto à sua pureza no meio LMDA, foi submetida aos cultivos de acordo com a FIG. 1. Verificou-se através FIG. 2 e TAB. I que no meio EA, o cultivo apresentou melhor desempenho nas primeiras 48 horas quando comparado com o meio padrão YE. Por outro lado, o aspecto tecnológico de interesse refere-se às taxas de bioconversão de D-sorbitol a L-sorbose pela bactéria. Os meios M, EA e A mostraram uma performance suficiente para que os substratos ensaiados possam ser utilizados uma vez que são de baixo custo. Nestas condições tais meios apresentam potencial para substituir o meio YE sem perdas substanciais de rendimento nas primeiras 48 horas de cultivo (TAB. II e FIG. 3). Com relação a possibilidade da utilização de substratos alternativos, este trabalho indica caminhos que poderão conduzir à obtenção de L-sorbose em meios de cultura residuais tais como, milhocina, ou meios à base de extratos de levedura. Estas leveduras são produzidas em larga escala no setor alcooleiro e no final das safras são descartados como efluentes industriais cuja aplicação tem sido geralmente como biofertilizantes.

## CONCLUSÃO

Os meios ensaiados mostram-se com rendimentos compatíveis com o meio padrão (meio YE) utilizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNFELD, P. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$  In: COLOWICK, S.P., KAPLAN, N. D. (EDS), **Methods in enzymology**, Academic Press, 1955. pág. 149-50. 1955.

- CASEY G. P.; INGLEDEW, W. N. The use a understanding of media in brewing bacteriology. I. Early history and development of general purpuse media. **Brewer Digest**, **56(2)**: 26-33, 1981.
- DE LEY, J; SWINGS, J. Genus *Gluconobacter suboxydans* ASAI 1935, 689, mend. mut. char. ASAI, LIZUDA and KOMAQATA 1962. In: KRIEG, HOLT (EDS), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, ED. WILLIANS & WILKINS, pág. 275-8, 1984.
- JAFFE, G. M. Ascorbic acid. In: GRAYSON, M., ECKROTH, D. (eds.) **Vitamins**. 3a. ed. Wiley, 1983. cap. 24, pag. 8-40.
- LODDER, J. General classification of the yeasts. In: \_\_\_\_\_, **The Yeasts**, 2<sup>a</sup> ed., North-Holland Publishing Company, pag. 75, 1971.
- MORI, H., KOBAYASHI, T., SHIMIZU, S. High density of sorbose from sorbitol by fed-batch culture with do-stat. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, **14(1)**: 65-71, 1981.

## AGRADECIMENTOS

A REFINARIA DE MILHOS BRASIL LTDA. pela milhocina gentilmente cedida a este projeto de pesquisa.