

# ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÁCIDO MALTOBIÔNICO E MALTOBIONATO DE SÓDIO PRODUZIDOS POR *Zymomonas mobilis* IMOBILIZADA EM ESPUMA DE POLIURETANO

R. C. Souza<sup>1</sup>, L. M. Silva<sup>2</sup>, S. Carra<sup>3</sup>, J. Zeni<sup>4</sup>, E. Valduga<sup>5</sup>, E. Malvessi<sup>6</sup>

1- Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (robertacristina89@hotmail.com)

2- Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (leonardomeirelesdasilva@gmail.com)

3- Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul – CEP: 95070-560 – Caxias do Sul – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3218-2100 – e-mail: (scarra@ucs.br)

4- Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (jamilezeni@uricer.edu.br)

5- Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – CEP: 99709-910 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3520-9000 – e-mail: (veunice@uricer.edu.br)

6- Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul – CEP: 95070-560 – Caxias do Sul – RS – Brasil, Telefone: +55 (54) 3218-2100 – e-mail: (emalvess@ucs.br)

**RESUMO** – Os ácidos aldônicos, como ácido lactobiônico e maltobiônico, e seus sais vêm se destacando na área biotecnológica, devido as diversas aplicações industriais. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio frente a patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos. Para isto, *Zymomonas mobilis* e seu complexo enzimático intracelular foram imobilizados *in situ* em espuma de poliuretano flexível, seguido de ensaios de bioconversão, precipitação, purificação e conversão do sal em ácido. A atividade antibacteriana foi avaliada pela concentração inibitória mínima (CIM). O ácido maltobiônico, com pureza de 98,1%, apresentou CIM de 13,2 mg mL<sup>-1</sup> para *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli*, e de 10,0 mg mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e o maltobionato de sódio não apresentou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos estudados. Estas informações são relevantes para a área de segurança de alimentos, bem como para a biotecnologia e farmacêutica.

**ABSTRACT** – Aldonic acids, such as lactobionic and maltobionic acid, and their salts have been standing out in the biotechnological area, due to various industrial applications. In this context, the objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of maltobionic acid and sodium maltobionate against pathogens that cause foodborne diseases. For this, *Zymomonas mobilis* and its intracellular enzyme complex were immobilized *in situ* in flexible polyurethane foam, followed by tests of bioconversion, precipitation, purification and conversion of salt to acid. Antibacterial activity was assessed by the minimum inhibitory concentration (MIC). Maltobionic acid, with a purity of 98.1%, presented MIC of 13.2 mg mL<sup>-1</sup> for *Salmonella choleraesuis* and *Escherichia coli*, and 10.0 mg mL<sup>-1</sup> for *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, but sodium maltobionate did not pronounced

activity. This information is relevant to food safety area, as well as to biotechnology and the pharmaceutical.

**PALAVRAS-CHAVE:** ácidos aldônicos; *Salmonella choleraesuis*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*.

**KEYWORDS:** aldonic acids; *Salmonella choleraesuis*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção, via rotas biotecnológicas, de ácidos aldônicos, como ácido glicônico, ácido lactobiônico e ácido maltobiônico, assim como seus respectivos sais apresentam relevâncias tecnológicas, a partir de tecnologias limpas, menor consumo energético e reduzido resíduos de processo, quando comparadas com as via químicas, eletroquímicas ou catalíticas (Neostrata Company, 2010; Nielsen, 2010; Cañete-Rodríguez et al., 2016; Minal et al., 2017).

Estes ácidos aldônicos e seus sais podem ser produzidos pela ação enzimática do complexo enzimático periplasmático glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono-lactonase (GL) presentes em *Zymomonas mobilis* (*Z. mobilis*), bactéria esta Gram negativa e não patogênica para seres humanos (Carra, 2012; Malvessi et al., 2013; Delagustin et al., 2017; Folle et al., 2018; Flores, 2019).

Na área de alimentos, o ácido maltobiônico desperta atenção, sendo possível encontrar patentes com interesse de aplicação como agente acidificante, intensificador de sabor e estabilizantes, devido a propriedades como antioxidante e de não toxicidade (Yuen, 1974; Miyake e Sato; 1975; Nielsen, 2010). Adicionalmente, na literatura especializada são poucos os estudos referentes à bioprodução de ácido maltobiônico (Stodola e Lockwood, 1947; Kluyver et al., 1951; Meiberg et al., 1990; Nielsen, 2010; Garin, 2016; Flores, 2019).

Neste sentido, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do ácido maltobiônico e maltobionato de sódio produzidos via ação do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizados em espuma de poliuretano flexível.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Bioprodução de biomassa e do complexo enzimático

Para a produção de biomassa de *Z. mobilis* e o complexo enzimático periplasmático GFOR/GL seguiu-se a metodologia descrita por Malvessi et al. (2006), envolvendo as etapas de ativação, preparo de inóculo e cultivo em biorreator. Posteriormente, o meio fermentado foi centrifugado (Centrifuge MPW-351R, MPW® Med. Instruments, Polônia), por 10 min a 6000 rpm, e a massa seca determinada (Carra, 2012), fixando a concentração de 210 g<sub>célula\_seca</sub> L<sup>-1</sup> para os ensaios subsequentes.

### 2.2 Imobilização celular em espuma de poliuretano flexível

A imobilização da biomassa, contendo o complexo enzimático intracelular, em poliuretano flexível foi realizado *in situ*, envolvendo a mistura de proporções de polioli e isocianato para a formação da espuma, de acordo com as recomendações do fabricante (Dim Clay, Brasil) e do estudo de Mesquita

et al. (2018), com adaptações, utilizando 6 g de biomassa, concentrada a  $210 \text{ g}_{\text{célula\_seca}} \text{ L}^{-1}$  e os reagentes na proporção de 2:1 ( $\text{g}_{\text{poliol}}:\text{g}_{\text{isocianato}}$ ).

Após 24 h de cura, as espumas foram fracionadas, com auxílio de mixer doméstico (Britânia, Brasil) e tratadas com glutaraldeído 0,5% (m/v), visando inibir o metabolismo celular, sem afetar a atividade enzimática (Folle et al., 2018). Para padronização da dimensão do imobilizado obtido, as espumas após fracionadas e tratadas com glutaraldeído passaram por peneiras, sendo utilizadas para o estudo apenas os imobilizados com granulometria na faixa de 125 e 355  $\mu\text{m}$  (peneiras de 115 e 42 mesh, Bertel Indústria Metalúrgica Ltda, Brasil).

### 2.3 Bioconversão de maltobionato de sódio

Os ensaios de bioconversão foram realizadas em reator encamisado com 200 mL de volume de trabalho, agitação magnética, solução equimolar de maltose e frutose a  $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $39 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 6,4, mantido com solução de NaOH 2,5 M (Garin, 2016; Flores, 2019), em meio reacional contendo  $6,25 \text{ g}_{\text{célula\_seca}} \text{ L}^{-1}$  de biocatalisador imobilizado. As concentrações dos produtos da bioconversão e o consumo dos substratos foram estimadas pelo volume e concentração de NaOH utilizado para neutralizar o ácido formado e controlar o pH em 6,4 (Pedruzzi et al., 2007), e a produtividade mássica e produtividade específica determinadas, conforme Flores (2019). A bioconversão foi cessada após um consumo de 90% dos substratos (maltose e frutose).

### 2.4 Separação e purificação do maltobionato de sódio

Para a separação e purificação do maltobionato de sódio foram realizadas três precipitações sucessivas utilizando metanol, com concentração final de solvente na solução de 80% (m/v), conforme descrito por Flores (2019). Após, o sal foi analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Japan, modelo LC-20AD) com controle CMB-20A, bomba isocrática LC-20AD, CTO-20A column over e um detector de índice de refração (RID) (RID-20A), para avaliar a eficiência da purificação (Flores, 2019).

### 2.5 Conversão de maltobionato de sódio em ácido maltobiônico e cristalização

Para converter o maltobionato de sódio à ácido maltobiônico foi utilizada a metodologia descrita por Flores (2019), empregando o método de troca iônica com resina catiônica ácido forte Amberlite IRA-120 (Vetec Química Fina, Brasil). A cristalização foi realizada por liofilização (Edwards, Brasil), com vácuo de 500 mmHg,  $-45 \text{ }^\circ\text{C}$  e 36 h.

### 2.6 Avaliação da atividade antibacteriana

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método indireto de crescimento bacteriano, mediante a densidade ótica em meio de cultura líquido (Pierozan et al., 2009), utilizando leitor automático de microplacas (modelo EL800, Bio-Tek Instruments Inc., EUA), com comprimento de onda pré-selecionado em 490 nm. A CIM foi determinada como a menor concentração de amostra que não gerou alteração na turbidez, após 24 h de incubação, sendo realizada sobre bactérias Gram-negativas (*Salmonella choleraesuis* - ATCC 10708 e *Escherichia coli* - ATCC 25922) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* - ATCC 7644).

## 2.7 Análise estatística

Os resultados ( $n=3$ ) foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey com 5 % de significância, utilizando o software Statistica versão 5.0 (Statsoft Inc, USA).

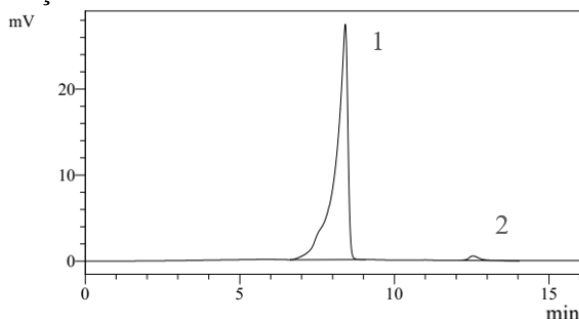
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Bioprodução de maltobionato de sódio

Na bioprodução do maltobionato de sódio e sorbitol houve um consumo de 90% dos substratos, maltose e frutose, em 72 h, com concentração máxima de  $493,39 \text{ mmol L}^{-1}$  e produtividade específica de  $1,37 \text{ mmol g}_{\text{celula\_seca}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . O sorbitol foi produzido devido ao processo catalítico da glicose-frutose oxidoreductase, em função da redução da frutose, porém, por não ser o produto de interesse neste estudo, foi reduzido a concentrações mínimas durante a etapa de purificação.

Após etapas de separação e de purificação obteve-se 98,1% de maltobionato de sódio (sal do ácido maltobiônico) e 1,90% de sorbitol (Figura 1).

Figura 1 – Cromatograma (CLAE) de identificação do maltobionato de sódio (1) e sorbitol (2), após etapa de separação e purificação.



Resultados semelhantes foram observados por Garin (2016), utilizando etanol na purificação de maltobionato de sódio, obtendo pureza média de 90%, e por Flores (2019), obtendo maltobionato de cálcio com pureza superior a 99% e matobionato de sódio com pureza final de 98%, utilizando metanol 80% (v/v).

### 3.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do maltobionato de sódio e ácido maltobiônico frente a *S. choleraesuis*; *E. coli*; *S. aureus* e *L. monocytogenes* é apresentada na Tabela 1. O ácido maltobiônico apresentou atividade antimicrobiana, com CIM entre  $10,0$  e  $13,2 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Alguns estudos avaliaram os mecanismos de ação antibacteriana do ácido lactobiônico frente a *Pseudomonas fluorescens* (Kang et al., 2020) e *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Kang et al., 2020; Cao et al., 2019), e observaram danos à integridade da parede celular e da membrana celular e mudanças nos padrões de conteúdo e atividade de proteínas. Chen e Zhong (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana do ácido lactobiônico, frente a *L. monocytogenes* e *E. coli*, e obtiveram uma CIM de  $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os autores ainda sugerem que combinações binárias e ternárias com concentrações apropriadas de nisina,

timol e ácido lactobiônico permitiram atividades sinérgicas contra *L. monocytogenes*. As CIM's utilizando ácido lactobiônico frente a *P. fluorescens* e MRSA foram também avaliadas, obtendo-se os valores de 12,5 e 18,75 mg mL<sup>-1</sup> (Kang et al., 2020). Adicionalmente, Cao et al. (2019) reportou, também utilizando o ácido lactobiônico, uma CIM de 15 mg mL<sup>-1</sup> frente a *S. aureus*.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) do maltobionato de sódio e ácido maltobiônico.

Micro-organismos	CIM (mg mL <sup>-1</sup> )*	
	Maltobionato de sódio	Ácido maltobiônico
<i>S. choleraesuis</i>	n.d.	13,2 <sup>a</sup> ±0,00
<i>E. coli</i>	n.d.	13,2 <sup>a</sup> ±0,00
<i>S. aureus</i>	n.d.	10,0 <sup>b</sup> ±0,00
<i>L. monocytogenes</i>	n.d.	10,0 <sup>b</sup> ±0,00

\* Média ± desvio padrão seguida de letras/colunas iguais indicam não haver diferença significativa p>0,05 (teste de Tukey); n.d. - não detectado, valores superiores a 50 mg mL<sup>-1</sup>.

## 4. CONCLUSÕES

O ácido maltobiônico apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. choleraesuis* e *E. coli*, com CIM variando entre 10 e 13,2 mg mL<sup>-1</sup>. Este estudo fornece informações relevantes direcionando a futuras aplicações do ácido maltobiônico em alimentos ou embalagens, visando a extensão do *shelf life* e a segurança de alimentos.

## 5. AGRADECIMENTOS

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

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cañete-Rodríguez, A. M., Santos-Duenas, I. M., Jiménez-Hornero, J. E., Ehrenreich, A., Liebl, W. & García-García, I. (2016). Gluconic acid: Properties, production methods and applications - An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process Biochemistry*, 51, 1891–1903.
- Cao, J., Fu, H., Gao, L. & Zheng, Y. (2019). Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiologica*, 64, 899–906.
- Carra, S. (2012). *Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de Zymomonas mobilis* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- Chen, H. & Zhong, Q. (2017). Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 260, 36–41.



- Delagustin, M. G. (2017) *Caracterização e avaliação da estabilidade do ácido lactobiônico e de diferentes lactobionatos produzidos por Zymomonas mobilis visando à utilização na área farmacêutica* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- Folle, A. B., Baschera, V. M., Carra, L. T. V. S., Polidoro, T. A., Malvessi, E. & Silveira, M. M. (2018). Assessment of different systems for the production of aldonic acids and sorbitol by calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 41, 185–194.
- Flores, M. L. (2019) *Síntese biocatalítica, recuperação e caracterização físico-química do ácido maltobiônico* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- Garin, D. L. (2016). *Uso do Sistema Enzimático de Zymomonas mobilis para a Produção de Ácidos Maltobiônico e Lactobiônico* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- Kang, S., Kong, F., Shi, X., Han, H., Li, M., Guan, B., Yang, M., Cao, X., Tao, D., Zheng, Y. & Yue, X. (2020). Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Pseudomonas fluorescens* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its application on whole milk. *Food Control*, 108, 106876.
- Kluyver, A. J., De Ley, J. & RIJVEN, A. (1951). The Formation and Consumption of Lactobionic and Maltobionic Acids by *Pseudomonas* Species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 17(1), 1–14.
- 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*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 39-144.
- Malvessi, E., Carra, S., Pasquali, F. C., Kern, D. B., Silveira, M. M. & Ayub, M. A. Z. (2013). Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40, 1–10.
- Meiberg, J. B. M., Bruinenberg, P. M. & Sloots. B. E. (1990). A process for the fermentative oxidation of reducing disaccharides. *EP Patent application* 0384534 A1.
- Mesquita, R. A., Hassemer, G., Marchiori, V., Kiedis, J., Valduga, E., Junges, A., Malvessi, E., Cansian, R. L. & Zeni, J. (2018). Synthesis of Xanthan Gum from *Xanthomonas campestris* Immobilized in Polyurethane. *Industrial Biotechnology*, 14(5), 276-281.
- Minal, N., Bharwade, S. B., Chaudhary, N. N. & Jain, A. K. (2017). Lactobionic Acid: Significance and Application in Food and Pharmaceutical. *International Journal Food of Fermented*, 6(1), 25-33.
- Miyake, T. & Sato, Y. (1975). Process for the production of foods and drinks with the employment of maltobionc acid. *US Patent* 3.899.604.
- Neostrata Company (2010). *Technical Information Bulletin: Maltobionic Acid*. Inc., 307 College Road East, Princeton, New Jersey.
- Nielsen, P. M. (2010). Maltobionate as antioxidant in food products. *US Patent Application Publication* 2010/0173044 A.
- Pedruzzi, I., Malvessi, E., Mata, V. G., Silva, E. A. B., Silveira M. M. & Rodrigues, A. E. (2007). Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1145, 128-132.
- Pierozan, M. K., Pauletti, G. F., Rota, L., Santos, A. C. A.; Lerin, L. A., Di Luccio, M., Mossi, A. J., Atti-Serafini, L., Cansian, R. L., Oliveira, J. V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 29, 764-770.
- Stodola, F. H. & Lockwood, L. B. (1947). The Oxidation of Lactose and Maltose to Bionic Acids by *Pseudomonas*. *Journal Biological Chemistry*, 171, 213-221.
- Yuen, S. (1974). Mixture of maltobionic acid and monosodium glutamate as a food seasoning. *US Patent* 3.829.583.