

IMOBILIZAÇÃO *IN SITU* DE *Zymomonas mobilis* EM ESPUMA DE POLIURETANO FLEXÍVEL

R. C. Souza¹, L. M. Silva², N. F. Palma³, J. Zeni⁴, E. Valduga⁵, E. Malvessi⁶

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- 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: (naieli.fernanda@gmail.com)

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 – O complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glucono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis* apresenta importância na bioprodução de ácidos aldônicos, os quais possuem diversas aplicações industriais. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi imobilizar *in situ* a bactéria *Zymomonas mobilis*, contendo o GFOR/GL, em espuma de poliuretano flexível. A bactéria e seu complexo enzimático intracelular foi imobilizada *in situ*, avaliando a atividade enzimática de diferentes formulações de isocianato, polioli e biomassa concentrada a 210 g_{célula_seca} L⁻¹, além da estabilidade operacional. A atividade enzimática do imobilizado frente a glicose e frutose e o rendimento de imobilização máximos foram de 19,42 U_{inicial} g⁻¹_{célula_seca} e 60,34%, respectivamente, com 16 ciclos operacionais.

ABSTRACT – The enzyme glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- δ -lactonase (GL) complex of *Zymomonas mobilis* is important in the bioproduction of aldonic acids, which have several industrial applications. And for this purpose, cell immobilization plays an important role. The aim of this study was to immobilize the bacteria *Zymomonas mobilis* in situ, containing GFOR/GL, in flexible polyurethane foam. The bacterium and its intracellular enzyme complex, after being produced, was immobilized in situ, evaluating the enzymatic activity of different formulations of isocyanate, polyol and biomass concentrated at 210 g_{dry_cell} L⁻¹ and operational stability. The enzyme activity of the immobilized with glucose and fructose and the maximum immobilization yield were 19.42 U_{g_{dry_cell}⁻¹} and 60.34%, respectively, with 16 operational cycles.

PALAVRAS-CHAVE: imobilização celular; ácidos aldônicos; estabilidade operacional; atividade enzimática.

KEYWORDS: cell immobilization; aldonic acids; operational stability; enzymatic activity.

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). Esses produtos apresentam propriedades interessantes para a aplicação em distintas áreas, como farmacêutica, biomédica, química, têxtil e alimentos, sendo aplicados como agente acidificante, intensificador de sabor, antioxidante e suplementação (Yuen, 1974; Miyake e Sato; 1975; Koka et al., 2005; Baldwin et al., 2009; Nielsen, 2010; Faergemand et al., 2012).

Os 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; Delagustin et al., 2017; Folle et al., 2018; Flores, 2019). E para este fim, a imobilização celular recebe um papel de destaque.

Alguns tipos de suportes são relatados na literatura, como a imobilização em alginato de sódio (Bertasso et al., 1996; Malvessi et al., 2010; Folle et al., 2018; Flores, 2019), κ -carragena (Rehr et al., 1991; Jang et al., 1996) e polímeros (Koehtopp et al., 1996; Ferraz et al., 2000; Mukhopadhyay et al., 2005; Vignoli et al., 2006), visando maior estabilidade, facilidade de separação do meio e possibilidade de reutilização.

A bioprodução de ácido lactobiônico e maltobiônico ainda é escassa, principalmente em relação ao ácido maltobiônico. Os estudos são baseados ao uso de micro-organismos livres ou imobilizados em poucos suportes, oportunizando a exploração do uso de outros materiais para a imobilização.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi imobilizar *Z. mobilis*, contendo o complexo enzimático GFOR/GL, em espuma de poliuretano flexível pela técnica de imobilização *in situ* e avaliar a atividade enzimática, rendimento do processo de imobilização e a possibilidade de reuso do imobilizado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioprodução de *Z. mobilis* 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 $\text{g}_{\text{célula_seca}} \text{L}^{-1}$ para os ensaios subsequentes.

2.2 Imobilização celular em espuma de poliuretano flexível

A imobilização da biomassa de *Z. mobilis* e do seu complexo enzimático intracelular em poliuretano flexível foi realizado *in situ*, envolvendo a mistura de proporções de poliálcool 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. A técnica foi realizada com 4 formulações diferentes (I, II,

III e IV) e com crescentes quantidades de biomassa (1, 3, 5 e 6 g de biomassa, respectivamente), a partir de testes preliminares.

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 μm (peneiras de 115 e 42 mesh, Bertel Indústria Metalúrgica Ltda, Brasil).

2.3 Atividade enzimática

Os ensaios de atividade enzimática do complexo enzimático GFOR/GL foram realizados no micro-organismo livre e imobilizado, conforme metodologia proposta por Malvessi et al. (2006), com modificações.

A determinação da atividade enzimática do micro-organismo livre foi realizada com solução equimolar de glicose e frutose ($0,7 \text{ mol L}^{-1}$) e 4 g L^{-1} de células de *Z. mobilis*. Os testes foram realizados em reator encamisado com 500 L de volume total e 100 mL de volume de trabalho, com temperatura controlada a 39°C , sob agitação magnética, por 1 h. O pH de 6,4 foi mantido com solução NaOH 1 M, contida numa bureta, com auxílio de um controlador de pH (DosaTronic pH 2900, Provitec, Brasil), acoplado a uma bomba peristáltica (DosaMini 100, Provitec, Brasil).

Para os testes com o micro-organismo imobilizado foi realizado os mesmos procedimentos e condições, porém utilizando NaOH 0,1 – 0,35 M, sendo esta dependente da velocidade reacional, 4 g de suporte imobilizado e a reação em 200 mL de volume de trabalho.

A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de ácido glucônico, em mmol, formado por hora e por grama de célula seca, contendo o complexo enzimático GFOR/GL ($\text{mmol h}^{-1} \text{ g}^{-1} = \text{U g}^{-1}$) e estes valores estimados pelo coeficiente angular da reta obtida pela relação entre o tempo e o volume consumido de base, volume este multiplicado pela concentração de NaOH utilizado para neutralizar o ácido formado e controlar o pH em 6,4 (Carra, 2012; Flores, 2019).

O substrato glicose foi escolhido para a determinação da atividade enzimática por ser a aldose com maior afinidade a enzima GFOR e é comumente utilizada como referência para efetivação da produção de biomassa da *Z. mobilis* e seu complexo enzimático (Malvassi, 2008; Carra, 2012; Garin, 2016; Delagustin, 2017 e Flores, 2019).

2.4 Rendimento do processo de imobilização

Para obtenção do rendimento calculou-se a razão das atividades enzimáticas do imobilizado e do micro-organismo livre, sendo o resultado expresso em percentual (%), conforme Equação 1, onde RI, é o rendimento de imobilização, $U_{\text{imobilizado}}$, é a atividade enzimática do imobilizado, e U_{livre} , é a atividade enzimática do micro-organismo livre.

$$\text{RI (\%)} = \frac{U_{\text{imobilizado}}}{U_{\text{livre}}} \times 100 \quad (1)$$

2.5 Estabilidade operacional do imobilizado

Para analisar a possibilidade de reuso do imobilizado, o mesmo, ao final de cada ciclo, ou seja a cada teste de atividade enzimática, foi removido do meio reacional e adicionado ao novo meio, sendo realizada nova medição da atividade enzimática, com a mesma amostra de imobilizado e nas mesmas

condições operacionais (1 h de teste em cada ciclo, com glicose e frutose $0,7 \text{ mol L}^{-1}$, 39°C e pH 6,4). O teste de estabilidade operacional é cessado quando ao determinar a atividade enzimática, este representar 50% do valor inicial, sendo determinado então o número total de ciclos operacionais, e consequentemente de reusos.

2.6 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

Os resultados de atividade enzimática, estabilidade operacional e rendimento de imobilização são apresentados na Tabela 1. Um incremento da atividade enzimática e rendimento de imobilização foi observado à medida que se aumentou a quantidade de biomassa imobilizada, com as formulações I e II diferenciando-se estatisticamente das III e IV, com valores variando entre 1,04 e $19,42 \text{ U g}^{-1}_{\text{célula_seca}}$ e 3,23 a 60,34%, respectivamente.

Tabela 1 – Atividade enzimática, rendimento e estabilidade operacional da *Z. mobilis* imobilizada *in situ* em espuma de poliuretano flexível.

Imobilizado	Atividade enzimática ($\text{U g}^{-1}_{\text{célula_seca}}$)	Atividade enzimática ($\text{U g}^{-1}_{\text{imobilizado}}$)	Rendimento de imobilização (%)	Estabilidade operacional (ciclos)
I	$1,04 \pm 0,30^b$	$0,01 \pm 0,01^b$	$3,23 \pm 0,94^b$	n.d.
II	$3,16 \pm 0,40^b$	$0,13 \pm 0,02^b$	$9,81 \pm 1,25^b$	n.d.
III	$17,01 \pm 2,56^a$	$1,07 \pm 0,17^a$	$52,86 \pm 7,96^a$	15,00 ^a
IV	$19,42 \pm 0,33^a$	$1,40 \pm 0,07^a$	$60,34 \pm 1,03^a$	16,00 ^a

Média \pm desvio padrão seguida de letras/colunas iguais indicam não haver diferença significativa $p>0,05$ (teste de Tukey); n.d.– estabilidade operacional não avaliada, devido à baixa atividade enzimática.

Embora, os valores de atividade enzimática dos imobilizados apresentaram valores inferiores ao micro-organismo livre ($32,58 \text{ U g}^{-1}_{\text{célula_seca}}$), observou-se uma ótima estabilidade operacional, com a possibilidade de até 16 ciclos, tornando o suporte e o imobilizado competitivo e relevante para a utilização e aplicações futuras.

Este comportamento, de redução da atividade enzimática nos imobilizados, foi observado também por Malvessi et al. (2010), que imobilizaram *Z. mobilis* em esferas de alginato de cálcio e observaram uma atividade enzimática de $5,4 \text{ U g}^{-1}_{\text{célula_seca}}$, quantidade esta inferior ao micro-organismo livre ($26 \text{ U g}^{-1}_{\text{célula_seca}}$), nas mesmas condições operacionais do presente trabalho, sendo justificado possivelmente pelos efeitos difusionais, com aumento da resistência a transferência de massa imposta pelo suporte. Além desses efeitos difusionais, os efeitos conformacionais ou de microambiente também podem ocorrer em uma imobilização, afetando a atividade enzimática (Lima et al., 2013). Adicionalmente, sabe-se que a reação química de uma molécula contendo o grupo isocianato com um poliálcool é uma reação exotérmica com rápido aumento da viscosidade do meio reacional (Mano e Mendes, 1999; Vilar, 1999).



Ferraz et al. (2000) imobilizaram *Z. mobilis* em membranas de fibra oca e observaram uma taxa de reação específica de $19,6 \text{ g}_{\text{gluconato}} \text{ g}_{\text{proteína}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, valor este que representa 50,26% do valor obtido pelas células livres ($39 \text{ g}_{\text{gluconato}} \text{ g}_{\text{proteína}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Este processo foi conduzido a $39 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 6,2. E Rehr et al. (1991) usando células de *Z. mobilis* imobilizadas em k-carragena, em processo a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 5, obtiveram valores de produtividades específicas de $2,1 \text{ g}_{\text{ácido_glucônico}} \text{ g}_{\text{célula}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para células livres, e de $1,8 \text{ g}_{\text{ácido_glucônico}} \text{ g}_{\text{célula}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para células imobilizadas. Este valor representa 85,71% do valor para o micro-organismo livre, sugerindo haver a inativação de uma pequena quantidade de enzimas durante a imobilização ou que houve limitações difusionais após imobilização.

4. CONCLUSÕES

A imobilização *in situ* de *Z. mobilis* em espuma de poliuretano flexível foi possível, com atividade enzimática de GFOR/GL apresentando rendimento de imobilização aproximado de 60%, associada a possibilidade de reuso por até 16 ciclos consecutivos. Estes resultados contribuem para as pesquisas para a produção de ácidos aldônicos, via rotas biotecnológicas, disponibilizando informações relevantes para o uso de um suporte de imobilização ainda pouco explorado para este fim.

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldwin, C., Akashe, A., Dinwoodie, R., Koka, R., West, L. G., & Kortum, O. (2009). Use of siderophores and organic acid to retard lipid oxidation. US Patent 7.595.073 B2.
- Bertasso, M., Silveira, M. M., & Mancilha, I. M. (1996). Preservação da atividade da enzima glicose-frutose oxidoreductase em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: *XI Simpósio Nacional de Fermentações*, São Carlos, Brasil.
- 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.
- 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.
- 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.
- Faergemand, M., Gilleladden, C., & Qvist, K. B. (2012). Method for producing an acidified milk product. *US Patent Application Publication* 20120045546 A1.
- Ferraz, H. C., Borges, C. P., & Alves, T. L. M. (2000). Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 89, 43-53.



- 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.
- Jang, I. H., Jung, S. G., Chang, H. S., & Chun, U. H. (1996). Improvement of the Process for Sorbitol Production with *Zymomonas mobilis* Immobilised in k-Carrageenan. *Process Biochemistry*, 31(5), 485-492.
- Koehntopp, P. I., Pinheiro, H. M. V., Silveira, M. M., & Jonas, R. (1996). Estudo da imobilização de *Zymomonas mobilis* em poliuretano visando a produção de sorbitol e ácido gluconico. In: *XI Simpósio Nacional de Fermentações*, São Carlos, Brasil.
- Koka, R., Mehnert, D.W., Fritsch, R. J., Steffan, W., Habermeier, P., Bradbury, A.G.W., Rohrmoos, A., Wolfschoon-Pombo, A., & Rose, M. (2005). Process for manufacturing cheeses and other dairy products and products thereof. *US Patent* 6916496B2.
- Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., & Schmidell, W. (2013). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher.
- 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. (2008). *Produção de Sorbitol e Ácidos Orgânicos por Zymomonas mobilis* (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Malvessi, E., Carra, S., Silveira, M. M., & Ayub, M. A. Z. (2010). Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose–fructose oxidoreductase/glucono- δ -lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. *Biochemical Engineering Journal*, 51, 1-6.
- Mano, E. B., & Mendes, L. C. (1999). *Introdução a polímeros* (2. ed.). São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda.
- 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 maltobionic acid. *US Patent* 3.899.604.
- Mukhopadhyay, R., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., Banerjee, P. C., & Guha, A. K. (2005). Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*, 15, 299–303.
- 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.
- Rehr, B., Wilhem, C., & Sahn, N. (1991). Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 144-148.
- Vignoli, J. A., Celligoi, M. A. P. C., & Silva, R. S. F. (2006). Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochemistry*, 41, 240–243.
- Vilar, W. D. (1999). *Química e Tecnologia dos Poliuretanos* (2. ed.). Rio de Janeiro: Vilar Consultoria.
- Yuen, S. (1974). Mixture of maltobionic acid and monosodium glutamate as a food seasoning. *US Patent* 3.829.583.