

SELEÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUTORAS DE L-ARABINOSE ISOMERASE(L-AI)

J. S. Mendes¹, J. A. M. Lemos¹, M. Y. V. Farias¹, J. C. M. Ximenes², R. M. Manzo³,
M. M. V. Melo², E. J. Mamarela³, L. R. B. Gonçalves¹

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Eng. Química

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia

³Instituto de Desenvolvimento Tecnológico para Indústria Química

[E-mail para
contato:jsousamendes@yahoo.com.br](mailto:jsousamendes@yahoo.com.br)

RESUMO—A L-arabinose isomerase (L-AI) é um biocatalisador utilizado na reação de isomerização da D-galactose em D-tagatose, um adoçante cujo sabor é similar ao da sacarose, facilitando sua aceitação pelos consumidores. Dentre as suas diversas aplicações, ressalta-se: a redução dos sintomas associados com o diabetes tipo II, hiperglicemia, anemia, hemofilia e o auxílio no controle de peso, devido ao seu baixo teor calórico. Diferentes microrganismos estão descritos na literatura como produtores da L-AI e estudos visando à implantação de um processo industrial se fazem necessários. Neste trabalho, estudaram-se 15 cepas bacterianas com o objetivo de produzir a L-AI, purificá-la e utilizá-la na bioconversão de D-galactose em D-tagatose. Das 15 cepas analisadas as cepas L3, L7, L9, L13 e L14 mostraram-se produtoras da L-AI, essas cepas são do gênero *Lactobacillus sp. elactobacillusplantarum*. As cepas foram isoladas de cana de açúcar, queijo coalho e molho de pimenta. Para o teste de vermelho de metila a cepa L9 apresentou coloração mais intensa e uma maior produção de ácidos durante a fermentação.

1.INTRODUÇÃO

Nos últimos anos em diversos países, e principalmente no Brasil, a população vem sofrendo cada vez mais com problemas de saúde causados pelo aumento de peso. Muitos destes problemas estão associados à má alimentação e consumo elevado de açúcares com alto valor calórico. Assim, neste estudo, avaliou-se a produção de um biocatalisador, a L-arabinose, para a obtenção de um adoçante de baixo valor calórico, D-tagatose, a partir da D-galactose.

A D-tagatose é um adoçante de baixo teor calórico e, entre os substitutos naturais de açúcar, é o mais semelhante em sabor às propriedades físicas da sacarose, sendo assim de fácil aceitação. A doçura da D-tagatose é muito semelhante a da sacarose (de 92%), quando se comparam soluções a 10%. Porém, a primeira apresenta um valor calórico bastante inferior (apenas 38% das calorias), portanto a D-Tagatose pode ser utilizada como um adoçante baixo-calórico em uma grande variedade de alimentos saudáveis, bebidas e suplementos alimentares. (Kim e Oh, 2005). Estudos fisiológicos do índice glicêmico têm demonstrado que esse isômero não ocasiona nenhum aumento dos níveis de glicose no sangue, sendo, portanto, seguro para pacientes diabéticos, e, ao

contrário da sacarose, não promove a cárie dentária. (Cheng *et al.*, 2010; Zehener 1988; Marzur 1989; Livesey & Brown 1996; Buemann *et al.* 1999).

Vários métodos têm sido estudados para a produção de D-tagatose. Ela pode ser produzida a partir de D-galactose por meio de rota química utilizando um catalisador de cálcio, mas este processo químico apresenta algumas desvantagens, tais como complexas etapas de purificação, geração de resíduos químicos e formação de subprodutos. (Kim e Oh, 2005). Tendo em vista tal desvantagem, tem havido grande interesse na produção por rota enzimática desse adoçante a partir de D-galactose. Várias enzimas envolvidas na biotransformação de D-tagatose foram investigadas (Rollini e Manzoni 2005; Ishida Kamiya *et al.* 1997; Kim *et al.* 2006) e a L-arabinose isomerase (L-AI, EC 5.3.1.4) apresenta grande potencial para a produção de D-tagatose, uma vez que pode catalisar a isomerização de D-galactose, a D-tagatose e converter L-arabinose a L-ribulose, com base na similaridade na configuração do substrato (Cheng *et al.*, 2010).

O primeiro relato de produção de L-AI por espécies de *Lactobacillus* ocorreu na década de 60 (Chakravorty, 1963). Apesar disso, são poucos os estudos que utilizam essas bactérias em sua forma nativa para a produção da L-AI até os dias atuais. A maioria dos trabalhos para a produção da L-AI utilizam microrganismos recombinados. Este estudo tem como objetivo obter uma cepa produtora da L-AI em sua forma nativa, visando a implantação do processo industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

As bactérias utilizadas foram isoladas previamente e gentilmente cedidas do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia – Lem Biotech. Na Tabela 1 temos as espécies estudadas. As cepas foram isoladas de fontes diferentes.

Tabela 1 – Cepas Microbianas

Linagem	Identificação	Origem
L1	<i>Lactobacillus</i> sp.	Iogurte
L2	<i>Lactobacillus</i> sp.	Cana de açúcar
L3	<i>Lactobacillus</i> sp.	Cana de açúcar
L4	<i>Lactobacillus</i> sp.	Intestino de boi
L5	<i>Lactobacillus</i> sp.	Queijocoalho
L6	<i>Lactobacillus</i> sp.	Queijocoalho
L7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Queijocoalho
L8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Queijocoalho
L9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Queijocoalho
L10	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Queijocoalho
L11	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Molho de Pimenta
L12	<i>Lactobacillus brevis</i>	Molho de Pimenta
L13	<i>Lactobacillus</i> sp.	Molho de Pimenta

L14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Molho de Pimenta
L15	<i>Lactobacillus</i> sp.	Leite in natura

2.2. Descrição do Cultivo

Os microrganismos testados foram repicados em placas de Petri contendo meio MRS comercial adicionado de ágar (1,5% m/v) e incubados a 37 °C por 48h. Após este período, três alçadas da cultura foram transferidas para meio de cultivo, preparado pela dissolução de meio MRS comercial em água na proporção de 55,15 g/L. Sendo então incubado em agitador orbital (Shaker Tecnal TE-048) à 130 rpm e 37 °C por 48h, para ativação das células. Em seguida, realizou-se a inoculação de meios MRS modificados (no qual houve a substituição de glicose por L-arabinose como fonte de carbono) com as culturas ativadas, obedecendo à relação de 3% v/v para o inóculo. Estas culturas foram incubadas em agitador orbital sob as mesmas condições anteriores por um período mínimo de 48h para a produção da enzima L-AI.

2.3. Testes de Verificação do Potencial de Produção da L-AI

Após o período de incubação, o caldo fermentado foi submetido ao teste com vermelho de metila, que indica a queda do pH do meio, fornecendo indícios de produção da enzima L-AI. Esse teste foi feito com a adição de 5 gotas de solução de vermelho de metila padrão em 2,5mL de caldo fermentado.

2.4. Métodos Analíticos

Concentrações de L-arabinose, ácido acético e ácido láctico, foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), coluna Aminex[®] Fermentation monitor, fase móvel ácido sulfúrico 1mM a 0,8mL/min.

3.RESULTADOS E DISCURSÕES

As 15 cepas microbianas foram inoculadas em MRS modificado, segue na Tabela 2 a composição do meio, com o intuito de identificar as cepas candidatas a produção da enzima L-arabinose isomerase.

Tabela 2 – MRS modificado

Componentes	g/L
Peptona	10
Extrato de levedura	5
Tween 80	1,08
Fosfato de potássio	2
Acetate de sódio	5
Citrate de amônio	2
Sulfato de magnésio	0,2

Sulfato de manganês	0,05
L-arabinose	5

No meio MRS modificado houve a substituição de glicose por L-arabinose. Amostras foram retiradas no início e final da fermentação, para o monitoramento do consumo de L-arabinose e a produção de ácidos durante a fermentação. Na Tabela 3 temos os resultados das análises em g/L de L-arabinose, ácido acético e ácido láctico.

Tabela 3 – Concentrações de açúcares e ácidos durante a fermentação

Cepa	L-arabinose 0h	L-arabinose 48h	Ácido acético 48h	Ácido láctico 48h
L1	5	4,091 ±0,244	1,339 ±0,163	5,833 ±0,519
L2	5	4,099 ±0,310	0,438 ±0,098	3,356 ±1,090
L3	5	0,300 ±0,027	3,290 ±0,263	5,854 ±0,494
L4	5	3,997 ±0,221	1,266 ±0,054	5,851 ±0,351
L5	5	5,008 ±0,463	0,917 ±0,121	6,977 ±0,796
L6	5	4,020 ±0,583	1,393 ±0,070	6,932 ±0,497
L7	5	0,728 ±0,069	1,660 ±0,076	6,094 ±0,707
L8	5	4,021 ±0,154	1,204 ±0,025	5,925 ±0,125
L9	5	0,699 ±0,098	2,138 ±1,114	9,130 ±0,036
L10	5	4,744 ±0,138	1,374 ±0,077	5,895 ±0,152
L11	5	5,010 ±1,031	1,067 ±0,205	4,117 ±1,044
L12	5	5,027 ±0,115	-	3,108 ±0,111
L13	5	0,285 ±0,042	1,917 ±0,248	6,453 ±0,520
L14	5	1,564 ±0,002	2,824 ±0,004	7,923 ±0,007
L15	5	4,790 ±0,121	1,388 ±0,024	6,163 ±0,106

Podemos ver na Tabela 3 que as cepas L3, L7, L9, L13 e L14, consumiram quase toda a L-arabinose fornecida, quanto a produção de ácidos ao momento todas as cepas tem uma produção muito parecida de ácido acético e láctico o que não nos esclarece muito sobre a produção da LAI visto que são semelhantes, porém nos cromatogramas do HPLC existem 2 picos que ainda não foram identificados para apenas algumas cepas, acredita-se que seja outros ácidos.

Realizou-se o teste de vermelho de metila, para verificar quais das cepas são produtoras da LAI. As cepas L3, L7, L9, L13 e L14 foram positivas para o teste de vermelho de metila, o que nos indica que são produtoras da enzima L-arabinose isomerase. Podemos verificar na Figura 1 o resultado do teste vermelho de metila. Os tubos com coloração amarelada significam que não são produtoras da LAI, ou seja, o pH está acima de 6, já os em tons de vermelho o pH está abaixo de 4, um dos indicativos para a produção de LAI. O pH inicial do meio de cultura é 6,5.

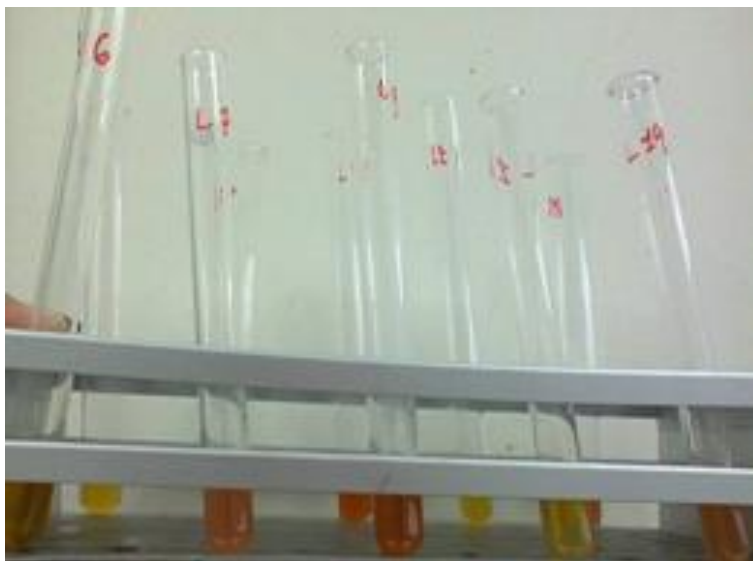


Figura 1 – Resultado teste vermelho de metila.

As análises feitas com o teste de vermelho de metila deram positivo para as cepas L3, L7, L9, L13 e L14. Para a cepa L9 o resultado da cor teve maior intensidade.

Após análise de todos os resultados conclui-se que 5 das 15 cepas são produtoras da enzima L-arabinose isomerase. As cepas foram L3, L7, L9, L13 e L14. Etapas posteriores desse estudo serão o melhoramento do rompimento celular das 5 cepas selecionadas, medida da atividade enzimática e seleção da cepa com melhores condições para o ampliamiento de escala. Essa seleção será baseada na medida de atividade da enzima produzida. Testes para a verificação de quais são os 2 ácidos produzidos pelas cepas estão em andamento.

6. REFERÊNCIAS

- Zehener, L.R. 1988 D-tagatose as a low-calories carbohydrate sugar and bulking agent. European Patent 257,626.
- Marzur, A.W. 1989 Functional sugar substitutes with reduced calories. European Patent 341,062.
- Jorgensen, F., Hansen, O.C., Stougaard, P., 2004. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterization of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 816-822.
- Oh, D-K., 2007. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 1-8.
- Cheng, L., Mu, W., Zhang, T., & Jiang, B., 2010b. An L-arabinose isomerase from *Acidothermus cellulolyticus* ATCC 43068: cloning, expression, purification, and characterization. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 86, 1089-1097.

Livesey, G. & Brown, J.C. 1996 D-tagatose is a bulk sweetener with zero energy determined in rats. *Journal of Nutrition* 126, 1601–1609.

Kim, H.-J., Oh, D.-K., 2005. Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose. *J. Biotechnol.* 120, 162–173.

Prabhu, P., Tiwari, M. K., 2008. Jeya, M.; Gunasekaran, P.; Kim, I. W.; Lee, J. K. Cloning and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 283–290

Rhimi, M., Aghajari, N., Juy, M., Chouayekh, H., Maguin, E., Haser, R., Bejar, S., 2009. Rational design of *Bacillus stearothermophilus* US100 L-arabinose isomerase: Potential applications for D-tagatose production. *Biochimie.* 91, 650–653.