

AValiação de cepas bacterianas visando a produção de L-arabinose isomerase (L-AI)

L. S. Cavalcante¹, M. Y. V. Farias¹, J. A. M. Lemos¹, J. S. Mendes¹, J. C. M. Ximenes², V. M. M. Melo², L. R. B. Gonçalves¹

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Eng. Química

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia

E-mail para contato: lucas.scavalcante01@gmail.com

RESUMO – A L-arabinose isomerase (L-AI) é um biocatalisador utilizado para a conversão de D-galactose em D-tagatose por um processo de isomerização. A D-tagatose tem propriedades adoçantes e caracteriza-se por possuir um sabor similar ao da sacarose (açúcar convencional), facilitando sua aceitação pelos consumidores. Portanto, o seu uso pode trazer benefícios como: 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 é necessário um profundo estudo para saber-se qual a melhor forma para a produção desse adoçante em uma escala industrial. Anteriormente, estudou-se 15 cepas e dessas foram escolhidas 5 (as que apresentaram características mais adequadas para produção da L-AI). Este trabalho, destina-se a determinar qual das 5 cepas bacterianas escolhidas apresenta melhor produção da L-AI para a conversão de D-galactose em D-tagatose. Das 5 cepas analisadas, aqui chamadas de L3, L7, L9, L13 e L14, a que mostrou-se melhor produtora do biocatalisador foi a L14 com uma atividade enzimática de 0,0078 U/mL.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos é evidente uma grande busca pela redução do consumo de calorias por parte da população motivado principalmente pela tentativa de uma reeducação alimentar voltada para a atenuação dos 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 e as propriedades físicas de sacarose, tornando sua aceitação e abrangência mais fáceis. A doçura da D-tagatose é similar 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. (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). Atualmente, vem sendo realizados diversos estudos para a produção desse adoçante e para a sua fabricação em uma escala industrial através de bioprocessos relacionados a conversões enzimáticas. Descobriu-se que através da enzima L-arabinose isomerase esse processo é possível e de maneira vantajosa (Rollini e Manzoni 2005; Ishida Kamiya e 1997; Kim *et al.* 2006), pois ele ocorre mediante uma reação de isomerização da D-galactose.

Neste estudo objetivou-se encontrar uma cepa em seu estado nativo, ou seja, que não recombinante, adequável a um processo industrial de produção da enzima que será utilizada na fabricação do adoçante. Avaliou-se os testes mediante atividade enzimática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

As cepas de *Lactobacillus* utilizadas foram isoladas previamente e gentilmente cedidas do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia – LemBiotech, situado na Universidade Federal do Ceará. Na Tabela 1 temos as espécies estudadas. As cepas foram isoladas de fontes diferentes.

Tabela 1 – Cepas Microbianas

| Linhagem | Identificação | Origem |
|----------|--------------------------------|------------------|
| L3 | <i>Lactobacillus</i> sp. | Cana de açúcar |
| L7 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | Queijo coalho |
| L9 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | Queijo coalho |
| L13 | <i>Lactobacillus</i> sp. | Molho de Pimenta |
| L14 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | Molho de Pimenta |

2.2. Descrição do Cultivo

Primeiramente as cepas foram inoculadas isoladamente por um período de 24 horas em meio de cultivo MRS. Preparou-se então um meio MRS modificado, em que a glicose constituinte é substituída por arabinose 5g/L, e para esse foi transferido caldo do inóculo na proporção de 3% v/v. Esse meio ficou em fermentação por 24 horas a 37° C e agitação de 130 rpm.

2.3. Processos para obtenção da enzima

Terminado o período de fermentação os caldos foram centrifugados a 4° C, em rotação de 6500rpm por 30 minutos para que as células produzidas fossem separadas do meio e tratadas adequadamente para a obtenção da enzima, que estava no meio intracelular.

Após a centrifugação e descarte do caldo obtido, as células foram resuspendidas em tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7 e acrescentou-se lisozima na proporção de 1mg/mL para o rompimento das paredes celulares das cepas. Deixou-se este sistema em agitação de 130 rpm a 37 °C por 3 horas para que a lisozima agisse de maneira eficaz. Posteriormente as células foram rompidas com o uso do ultrassom de ponteiros. Durante todo o processo de sonicação as células foram mantidas a baixas temperaturas para evitar o superaquecimento das células e uma possível desnaturação da enzima.

Acabado este processo a amostra foi centrifugada a 4 °C e 6500 rpm por 30 minutos e neste caso o precipitado é descartado e o líquido sobrenadante, que contém a enzima liberada continuará sendo tratado.

Realizou-se a precipitação salina com sulfato de amônio 80% m/v por 24 horas na geladeira. Terminado esse tempo a solução foi centrifugada a 4 °C e 6500 rpm por 30 min para que a enzima extrato enzimático fosse precipitada. O precipitado obtido foi resuspendido em 40 mL de tampão e então dessalinizado passando-o por uma coluna de dessalinização.

2.4. Métodos para leitura da atividade

A atividade da (L-AI) foi determinada utilizando como substrato uma solução de 0,5 M de D-galactose (Sigma) em tampão Fosfato 50 mmol.L-1 pH 7,0 suplementado com MnCl₂ 0,01 M. As amostras foram incubadas a 50 °C sob constante agitação. A quantidade de D-tagatose foi avaliada mediante o ensaio colorimétrico pelo método Carbazol-Cisteína-Ácido sulfúrico (Dische e Borenfreund, 1951). A leitura foi realizada em espectrofotômetro segundo Manzo et al., 2010.

Na equação 1 temos o cálculo da atividade enzimática.

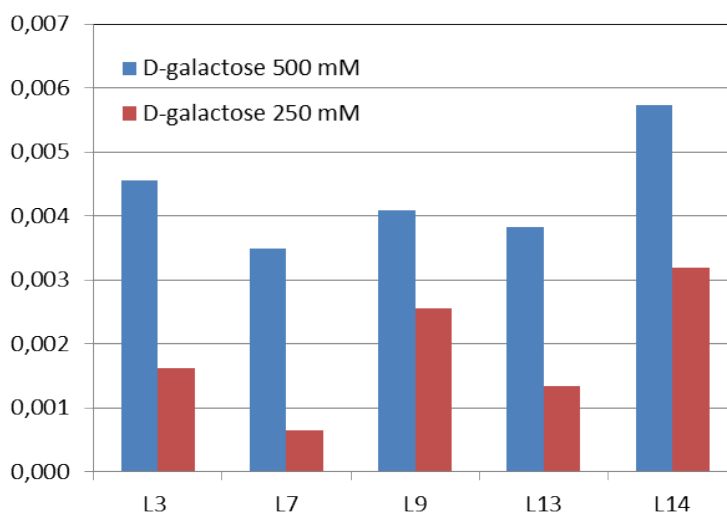
$$AE (U/mL) = \frac{[TAG](mM) \cdot V_T(mL)}{V_E(mL) \cdot t(min)} \quad (1)$$

3. RESULTADOS E DISCURSÕES

Neste trabalho realizaram-se diversas análises a fim de se determinar qual das cepas em estudo produzia a L-AI de maneira mais satisfatória para o processo de obtenção da D-tagatose.

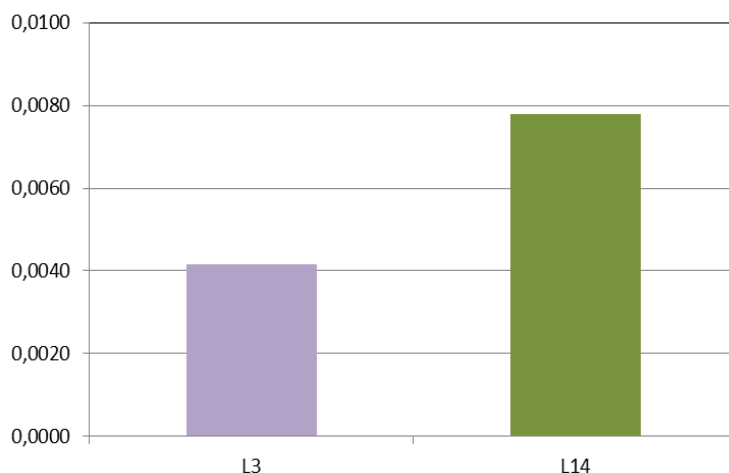
Os testes foram realizados variando-se a concentração de galactose, ora 500mM, ora 250mM. Na Figura 1 temos os resultados dos testes.

Figura 1 – Atividades com 500 mM e 250 mM de D-galactose.



Verifica-se na Figura 1 que a atividade enzimática para todas as cepas em estudo, foi maior quando utilizou-se concentração de D-galactose igual a 500mM. E pôde-se ver também que nessas condições as cepas L3 e L14 foram as que apresentaram melhor resultado, observando-se uma atividade de 0,0045 U/mL e 0,0057 U/mL, respectivamente. Realizou-se uma nova fermentação apenas com as cepas L3 e L14 e então novos testes para se determinar enfim qual a melhor cepa a ser utilizada. Esses resultados são mostrados na Figura 2.

Figura 2 – Atividade L3 e L14 com D-galactose 500 mM.



Na Figura 2 podemos ver a confirmação dos dados obtidos na Figura 1, é possível ver claramente que a cepa L14 apresenta uma melhor conversão de D-galactose em D-tagatose. Inferimos então que esta é a cepa mais adequada a ser utilizada na produção do biocatalisador a ser utilizado na bioconversão de D-galactose em D-tagatose.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho concluiu-se que a L14 foi, dentre as estudadas, a cepa com maior potencial para a bioconversão de D-galactose em D-tagatose e que a concentração de galactose de 500mM é a mais adequada para a bioconversão.

5. REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- 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.
- Kim, H.-J., Kim, J.-H., Oh, H.-J., Oh, D.-K., 2006. Characterization of a mutated *Geobacillus stearothermophilus* L-arabinose isomerase that increases the production rate of D-tagatose. *J. Appl. Microbiol.* 101, 213-221.
- Livesey, G. & Brown, J.C. 1996 D-tagatose is a bulk sweetener with zero energy determined in rats. *Journal of Nutrition* 126, 1601-1609.
- Marzur, A.W. 1989 Functional sugar substitutes with reduced calories. European Patent 341,062.
- Oh, D.-K., 2007. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1-8.
- 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.
- Zehener, L.R. 1988 D-tagatose as a low-calories carbohydrate sugar and bulking agent. European Patent 257,626.