

LENTIKATS®: UM POTENCIAL HIDROGEL PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR NA BIOPRODUÇÃO DE XILITOL

Mário Antônio Alves da Cunha¹; Walter de Carvalho²; Júlio César dos Santos³; Silvio Silvério da Silva⁴

^{1,2,3} Doutorandos em Biotecnologia Industrial. FAENQUIL / Departamento de Biotecnologia. Rodovia Itajubá-Lorena Km 74,5 CEP 12600-970, Lorena, SP, Brasil. E-mail: mariocunha@debiq.fauenquil.br

⁴ Professor Doutor. FAENQUIL / Departamento de Biotecnologia. E-mail: silvio@debiq.fauenqui.br

Palavras-chave: Lentikats, hidrogel, candida, xilitol, bagaço de cana-de-açúcar

Área do Conhecimento: II Ciências Biológicas

Resumo - Um novo hidrogel de álcool polivinílico (PVA) foi avaliado como suporte para imobilização de células de *Candida guilliermondii* visando a bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Foram realizados ensaios fermentativos em frascos Erlenmeyer, utilizando-se células da levedura aprisionadas em Lentikats® e uma concentração de inóculo de 1 g/L e sendo procedidas quantificações de açúcares (xilose, glicose, arabinose), biomassa celular e produção de xilitol em períodos de 12 e 24 horas, traçando-se o perfil fermentativo do sistema. Em 72 horas de cultivo foi observado consumo de substrato em torno de 90 %, $Y_{P/S}$ de 0,55 g/g e Q_P de 0,46 g/Lh⁻¹.

Introdução

Processos com biocatalizadores imobilizados oferecem algumas vantagens em relação aos processos com biocatalizadores livres, tais como fácil separação do conjunto suporte/células imobilizadas e possibilidade de reuso deste conjunto em sucessivas bateladas de fermentação, o que auxilia na adaptação celular ao meio fermentativo podendo levar a ganhos em produção e produtividade; maior proteção do biocatalizador contra condições ambientais desfavoráveis como pH, pressão osmótica e tensão de cisalhamento além da possibilidade de operação de sistemas contínuos à vazão específica de alimentação acima da velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{máx}$.

São observados na literatura diversos trabalhos utilizando sistemas com células imobilizadas na produção de cerveja [1]; na biotransformação de compostos aromáticos [2]; no tratamento biológico de efluente [3]; na produção de etanol [4]; na produção de enzimas [5] e atualmente na produção de xilitol [6,7].

O xilitol é um álcool pentahidroxiado com grande valor agregado por seu imenso campo de aplicações, desde a indústria de alimentos uma vez que o metabolismo insulina-independente dessa molécula e suas propriedades anticariogênicas o tornam um ingrediente interessante na formulação de alimentos funcionais, até a indústria farmacêutica onde pode ser utilizado na formulação de medicamentos para o tratamento da otite média aguda [8], em infusões pos-cirúrgicas para pacientes com dificuldades em metabolizar açúcares [9], em medicamentos para a

prevenção da osteoporose [10], no tratamento da fibrose cística [11] e em produtos de higiene oral.

Este poliálcool é industrialmente obtido por processo químico através da hidrogenação catalítica de D-xilose obtida de lignocelulósicos, sendo um processo relativamente dispendioso o que torna sua bioprodução uma atraente alternativa. Neste trabalho células de *Candida guilliermondii* foram imobilizadas por aprisionamento em hidrogel de álcool polivinílico (Lentikats®) e o perfil fermentativo do sistema foi avaliado através de ensaios fermentativos em frascos Erlenmeyers, usando-se meio de cultivo a base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com sais minerais e extrato de farelo de arroz.

Materiais e Métodos

Hidrólise Ácida do Bagaço de Cana-de-Açúcar

O procedimento de hidrólise foi realizado em reator de aço inox de 250 L a 121 °C, usando 100 mg de H₂SO₄ / g de bagaço (massa-seca) sob um tempo de reação de 10 minutos e uma relação sólido líquido de 1:10.

Concentração e Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico

Com o objetivando de aumentar o teor de xilose, o hidrolisado foi concentrado 5 vezes por evaporação à pressão reduzida em um concentrador de 30 L operado a 70 °C, e para reduzir o teor de compostos inibidores do metabolismo microbiano, foi tratado através de elevação e redução de pH e com carvão ativado conforme descrito por Alves *et al.*, (1998) [12].

Microrganismo, Suspensão Celular e Meio de Cultivo

Células da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 mantida em agar extrato de malte a 5 °C, foram inoculadas através da transferência de uma alçada para frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 50 mL de meio semidefinido constituído de 30 g/L de xilose, 3g/L de NH_4SO_4 , 0,1 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10 % (v/v) de extrato de farelo de arroz e cultivadas em incubadora rotatória a 200 rpm e 30 °C por 24 horas. As células foram então coletadas por centrifugação a 2000 x g por 20 minutos, lavadas e ressuspensas em pequeno volume de água destilada estéril.

O hidrolisado tratado foi autoclavado a 111 °C (0,5 atm) por 15 minutos e suplementado com NH_4SO_4 (3g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1g/L) e 10 % (v/v) de extrato de farelo de arroz, sendo utilizado como meio fermentativo.

Procedimento de Imobilização Celular

80 mL do “Líquido Lentikats” (Genialab, Braunschweig-Alemanha), disponível na forma de gel, previamente fundido em banho-maria a 90 °C e resfriado a 35 °C foi misturado a 20 mL de suspensão celular, de modo a obter-se uma solução contendo 6 g/L (massa seca de células / volume de solução). A solução PVA/Células foi gotejada em placas de petri de poliestireno estéril com auxílio de uma seringa descartável estéril de 20 mL de forma a obter-se gotículas de aproximadamente 3-5 mm de diâmetro. As placas foram então colocadas em câmara de fluxo laminar a temperatura ambiente com o objetivo da gelificação das gotículas através da redução de aproximadamente 70 % da massa inicial por evaporação da água, obtendo-se um hidrogel na forma de lentilhas contendo células da levedura aprisionadas em seu interior. As lentilhas foram estabilizadas e reentumecidas em solução estabilizadora (Genialab) por 2 horas sob agitação.

Ensaio Fermentativos

Foram realizados ensaios em frascos Erlenmeyer, em duplicata. Sendo utilizado 45 mL de meio fermentativo e 5 g de lentilhas (PVA/Células). A concentração celular na solução de PVA/células foi de 6 g/L (massa celular seca / volume de solução) e após gelificação, ou seja nas lentilhas, foi de 10,27 g/L. (massa celular seca / volume de gel). O volume reacional foi de 50 ml (meio + suporte) e obteve-se uma concentração inicial de células em relação ao volume reacional de 1,03 g/L.

As fermentações foram procedidas em incubadora orbital a 200 rpm e 30 °C. Foram analisados periodicamente a concentração celular no interior do suporte e no meio de cultivo,

consumo de açúcares (xilose, glicose e arabinose) e produção de xilitol.

Métodos Analíticos

As concentrações dos açúcares e xilitol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (cromatógrafo Shimadzu – Kyoto/Japão), usando detector de índice de refração (IR), coluna Bio Rad (Hercules, Califórnia/EUA) Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), a 45 °C, solução de H_2SO_4 (0,01N) como eluente com fluxo de 0,6 mL/min e 20 μL de volume de injeção. As concentrações celulares foram determinadas por turbidimetria a 600 nm em espectrofotômetro (Beckman DU 640B – Califórnia/EUA) através de correlação com curva padrão (absorvância a 600nm x massa celular seca). Para quantificação das células imobilizadas 0,2 g a 0,5 g de lentilhas foram dissolvidas em água destilada a 70 °C.

Resultados

A figura 1 mostra a concentração de células aprisionadas no suporte (X_{ri}) e livres no meio (X_{rm}) em relação ao volume reacional (50 mL) ao longo do processo fermentativo.

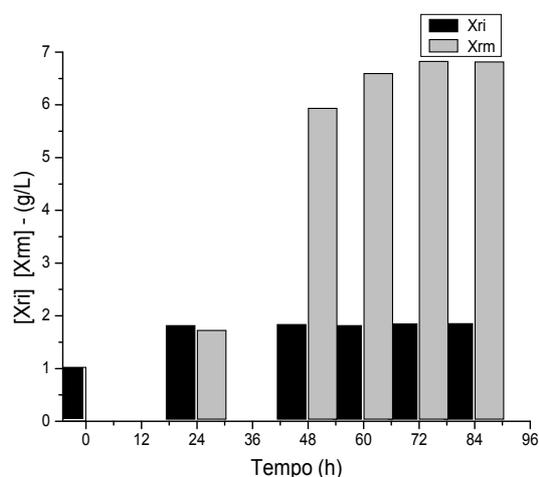


Figura 1- Crescimento Celular em função do Tempo

A figura 2 apresenta o consumo de substrato e a produção de xilitol no decorrer da fermentação.

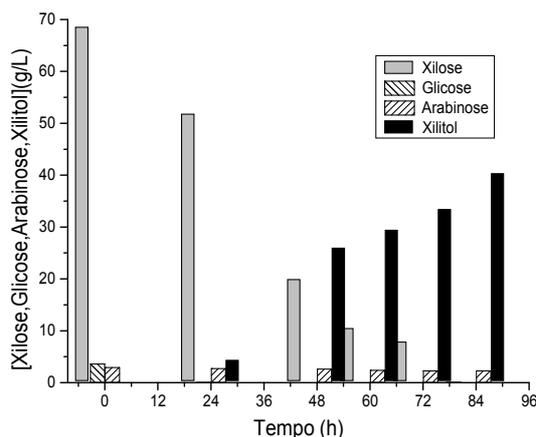


Figura 2- Consumo de Substrato e Produção de Xilitol

Na tabela 1 estão demonstrados os valores de concentração de Xilitol, fator de rendimento em xilitol, produtividade volumétrica e eficiência da bioconversão ao final de 72 horas de cultivo.

Tabela 1- Concentração de Xilitol (P_F), Fator de Conversão ($Y_{P/S}$), Produtividade Volumétrica (Q_P) e Eficiência (η) em 72 horas de Cultivo

Parâmetros	Resultados
P_F (g/L)	33,45
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,55
Q_P (g/Lh ⁻¹)	0,46
η (%)	60

Discussão

O aprisionamento de células em matrizes poliméricas é amplamente utilizado para a imobilização celular. E o uso de materiais resistentes e que apresentem baixas limitações de difusão de substrato e produto entre as células imobilizadas e o meio reacional é fundamental para o sucesso da imobilização e para o bom desempenho do sistema. Um tipo promissor de polímero, o álcool polivinílico, tem sido utilizado com resultados promissores de imobilização [13, 14]. Ding e Vorlop (1995) [15] desenvolveram uma técnica de gelificação para o aprisionamento de biomassa em PVA, caracterizada pela supressão dos ciclos de congelamento-descongelamento de soluções de PVA como tradicionalmente requerida. Esta nova matriz de PVA é chamada de Lentikats® e a partícula de gel é obtida na forma de lentilhas, sendo um material com alta estabilidade mecânica e elástico [16].

Os trabalhos de Duriex *et al.*, (2000) [17] e de Jekel *et al.*, (1998) [16] demonstraram a

compatibilidade da técnica de imobilização em Lentikats com a preservação da viabilidade microbiana. Comportamento semelhante foi verificado no presente trabalho com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com sais minerais e extrato de farelo de arroz. Verificando-se um bom desempenho deste sistema na bioprodução de xilitol.

Na figura 1, observa-se um aumento de biomassa na matriz até 24 horas de cultivo ($X_{ri} = 1,82$ g/L), permanecendo constante a concentração celular no interior do suporte até o final da fermentação (84 horas). Este fato sugere que em 24 horas de cultivo houve saturação dos poros da matriz polimérica pelo crescimento celular, havendo provável perda de células para o meio a partir deste período. Carvalho *et al.*, (2002) [18] trabalhando com a mesma levedura, imobilizada em gel de alginato de cálcio, também relata células suspensas no meio.

No início do processo fermentativo, não se observou células livres no meio, sendo observado somente a partir de 24 horas e havendo crescimento celular no meio até 60 horas (6,60 g/L), com pouca variação em 72 horas (6,83 g/L) e 84 horas (6,82 g/L). Em 72 horas de cultivo, em torno de 90 % da xilose foi consumida, sendo verificada concentração de xilitol de 33,45 g/L. Com relação aos açúcares glicose e arabinose, verifica-se que a glicose foi consumida nas primeiras 24 horas, enquanto a arabinose foi pouco consumida durante todo o processo fermentativo (21%). Um perfil semelhante foi verificado por Carvalho *et al.*, (2004) [6] trabalhando em reator de tanque de mistura e usando alginato de cálcio como suporte.

Ao final de 72 horas de fermentação, em torno de 55 % da xilose consumida foi convertida em xilitol com uma produtividade volumétrica de 0,46 g/Lh⁻¹ e eficiência de bioconversão de 60% em relação ao valor teórico de rendimento em xilitol para o microrganismo estudado. De fato, valores considerados promissores, uma vez que o hidrolisado hemicelulósico apresenta em sua constituição diversos compostos tóxicos ao metabolismo microbiano. Os resultados obtidos demonstram a viabilidade da técnica de imobilização de células de *Candida guilliermondii* em Lentikats para produção biotecnológica de xilitol.

Conclusão

Foi verificada a viabilidade técnica da imobilização de células de *Candida guilliermondii* em lentikats para a bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-

de-açúcar e a potencialidade da utilização deste suporte para fermentação em bioreatores.

Agradecimentos: Os autores agradecem o suporte financeiro da FAPESP e CNPq.

Referências

[1] WILLAERT, R. Beer production using immobilized cell technology. **Minerva Biotecnologica**. V.12, n.4, p.319-330, 2000.

[2] QUINTANA, M., DALTON, H. Biotransformation of aromatic compounds by immobilized bacterial strains in barium alginate beads. **Enzyme and Microbial Technology**. V.24, p.232-236, 1999.

[3] KUO, W., SHU, T. Biological pre-treatment of wastewater containing sulfate using anaerobic immobilized cells. **Journal of Hazardous Materials**. 2004 (in press).

[4] NAJAFPOUR, G., YOUNESI, H., ISMAIL, K. S. K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. V.92, p.251-260, 2004.

[5] ELLAIAH, P., PRABHAKAR, T., RAMAKRISHNA, B., TALEB, A. T. ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**. V.39, p.525-528, 2004.

[6] CARVALHO, W., SANTOS, J. C., CANILHA, L., ALMEIDA E SILVA, J. B., FELIPE, M. G. A., MANCILHA, I. M., SILVA, S.S. **Process Biochemistry**. 2004 (in press).

[7] SANTOS, J. C., CONVERTI, A., CARVALHO, W., MUSSATTO, S. I., SILVA, S.S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. 2004 (in press).

[8] TAPIAINEN, T., LUOTONEN, L., KONTIOKARI, T. RENKO, M., UHARI, M. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**. V.109, n.2, p.e19, 2002.

[9] MÄKINEN, K. K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Med Hypothesis**. V.54, p.603-613, 2000.

[10] MATTILA, P. T., KNUUTTILA, M.L.E. SVANBERG, M. J. Dietary xylitol supplementation

prevents osteoporosis changes in Streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism**. V.47, p.578-583, 1998.

[11] ZABNER, J., MICHAEL P. S., LAUNSPACH, J. L., KARP, P.H., KEARNEY, W. R. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **PNAS**. V.97, n.21, p.1164-1169, 2000.

[12] ALVES, L.A., FELIPE, M.G.A., SILVA, J.B.A., SILVA, S.S., PRATA, A.M.R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p.89-98, 1998.

[13] LOZINSKY, V. I., PLIEVA, F. M. Poly(vinylalcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. **Enzyme and Microbial Technology**. V.23, p.227-242, 1998.

[14] HASSAN, C. M., PEPPAS, N. A. Structure and applications of poly(vinylalcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. **Advanced Polymers Science**. V.153, p.37-65, 2000.

[15] DING, W. A., VORLOP, K.D. Gel aus polyvinylalkohol und verding zu seiner herstellung. **Patent DE 4327923**, 1995.

[16] JEKEL, M., BUHR, A., WILLKE, T., VORLOP, K. Immobilized of biocatalysts in Lentikats. **Chemical Engineering and Technology**. V.21, n.3, p.275-278, 1998.

[17] DURIEUX, A., NICOLAY, X., SIMON, J. P. Continuous malolatic fermentation by *Oenococcus Oeni* entrapped in Lentikats. **Biotechnology Letters**. V.22, p.1679-1684, 2000.

[18] CARVALHO, W., SILVA, S. S., VITOLO, M., FELIPE, M. G. A., MANCILHA, I. Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by use of a repeated-bath immobilized cell system. **Zeitschrift für Naturforschung**. V.57c, p.109-112, 2002.