

UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PREVIAMENTE HIDROLISADO E SUPLEMENTADO PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO

Heron Oliveira dos Santos Lima¹; Mirela Vanin dos Santos Lima¹; Roselene Ferreira Oliveira¹; Mirian Soudaleff¹

¹UTFPR Campus Campo Mourão/PR heronlima@utfpr.edu.br

Área: Ciência e tecnologia de alimentos

Introdução

Os L-aminoácidos apresentam um largo espectro de uso comercial como aditivos, suplementos alimentares, agentes terapêuticos e precursores para a síntese de peptídeos e agro-químicos (SHAM et al., 1995). O ácido glutâmico, também conhecido como glutamato monossódico (GMS) de acordo com Hermann, (2003) é, do ponto de vista comercial, o aminoácido mais importante, sendo obtido exclusivamente por fermentação e amplamente consumido como aditivo alimentar ou realçador em alimentos (NAMPOOTHIRI and PANDEY, 1998). Cerca de 1,5 milhões de toneladas de ácido L-glutâmico são produzidos por ano usando espécies de *Corynebacterium*. O mercado de ácido L-glutâmico cresce cerca de 6% ao ano e os principais produtores são: Japão, Korea e Índia (HERMANN, 2003). O ácido L-glutâmico é fabricado industrialmente por processos fermentativos conduzidos nos modos batelada, batelada alimentada, batelada alimentada repetida ou contínua, utilizando diversos glicídeos ou matérias-primas ricas em glicose, frutose e sacarose (SATO, 2001). Diversos produtos e subprodutos da indústria de alimentos e da agroindústria, por serem baratos e abundantes, têm sido empregados como substrato para a produção de substâncias comercialmente importantes como ácidos orgânicos, acetona, etanol e outros (MORAES et al., 1991). Resíduos e matérias-primas agroindustriais que contêm alto teor de carboidratos podem ser utilizados na obtenção de GMS, sendo que o melaço de cana-de-açúcar desperta maior interesse econômico. Cerca de 18 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil pelo setor sucroalcooleiro. Por seu baixo custo, alta disponibilidade e alto teor de açúcares fermentáveis, esta matéria-prima vem sendo empregada como substrato para diferentes tipos de fermentação. Para se obter um rendimento, tanto da produção de biomassa quanto da produção de ácidos orgânicos, vários pesquisadores têm suplementado o meio de cultivo com fontes de nitrogênio (DEMERCI et al., 1998; PAYOT et al., 1999; AMRANE and PRIGENT, 1998; SELMER-OLSEN and SORHAUG, 1998). Os aminoácidos são as unidades fundamentais das proteínas. Eles são estruturalmente formados por um grupo carboxil e um grupo amino ligados a um átomo de carbono (carbono α). Eles diferem uns dos outros em suas cadeias laterais (grupos R), as quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, influenciando a solubilidade do aminoácido em água. O carbono α liga-se, além dos grupos amino, carboxil e grupos R, a um átomo de hidrogênio, sendo assim considerado um centro quiral. Todas as moléculas com centros quirais são também opticamente ativas e podem formar estereoisômeros. Compostos biológicos com um centro quiral ocorrem naturalmente em apenas uma forma estereoisomérica, *D* ou *L*. Os resíduos aminoácidos em moléculas de proteínas são exclusivamente *L* isômeros (NELSON and COX, 2000). A bioquímica, a fisiologia e biologia molecular da biossíntese de aminoácidos em *Corynebacterium glutamicum* têm sido intensivamente estudadas. O conhecimento das vias biossintéticas e dos fatores que a regulam mostram que as vias metabólicas que levam a formação dos aminoácidos são muito mais simples neste microorganismo quando comparadas a outros como *E. coli*, fazendo com que esta bactéria possa ser manipulada para a produção de vários aminoácidos (SAHM et al., 1995). O preparo do inóculo é o primeiro passo crucial do bioprocesso, uma vez que influencia significativamente o rendimento e a produtividade do processo, devendo-se considerar sua estabilidade e

quantidade (HERMANN, 2003). A elaboração de meios de cultivo de baixo custo é um importante fator em processos fermentativos industriais. Como já mencionado, o melaço de cana-de-açúcar é um sub-produto da indústria do açúcar, apresenta uma alta concentração de sacarose, além de substâncias importantes para processos fermentativos. No Brasil, a cana-de-açúcar possui uma vantagem competitiva bastante grande em face de seu custo de produção ser inferior a de outros países, além do aproveitamento do bagaço e palha para geração de energia (RHEE et al., 1984). Embasado no que foi apresentado este trabalho teve como objetivo produzir ácido L-glutâmico por via fermentativa a partir de melaço de cana-de-açúcar previamente hidrolisado e suplementado.

Objetivo

Obtenção de ácido L-glutâmico por via fermentativa empregando o melaço de cana-de-açúcar previamente hidrolisado e suplementado como meio de cultivo e microrganismo *Corynebacterium glutamicum*.

Metodologia

Hidrólise da sacarose

O melaço de cana-de-açúcar (Usina de Açúcar e Álcool Sabarálcool S/A) foi diluído em tampão acetato (5mM) pH 4,5 para obtenção de uma solução a 10% (m/v). Em seguida foi adicionada a enzima invertase (EC3. 2.1.26 - 54U/mg Sigma) e o sistema foi mantido por 2h à 55°C sob agitação a 150rpm. Para determinação de açúcares redutores resultantes do processo de hidrólise, empregou-se o método proposto por Somogy (1952) e Nelson (1944), com leituras espectrofotométricas a 510nm.

Preparo do Inóculo e Fermentação

Para preparo do inóculo utilizou-se o microrganismo *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Fundação André Tosello – Campinas/SP). O microrganismo foi inicialmente ativado em caldo nutriente e mantido a 30°C durante 24 horas, em estufa bacteriológica. Então o *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 ativado foi adicionado na concentração 10% (v/v) em meio de pré-fermentação, contendo solução de glicose a 3%, suplementada com uréia, extrato de levedura, peptona e sais de magnésio, o sistema foi mantido por 40h a 30°C, sob agitação a 120rpm e pH 7,5. Após este período o processo de fermentação descontínuo foi desenvolvido, utilizando-se, como meio de cultivo uma solução de melaço de cana-de-açúcar (10%), previamente tratado com invertase, e suplementado com extrato de levedura, peptona, uréia, sais de magnésio, potássio cobre e ferro, que foi inoculada assepticamente com 10% (v/v) do caldo da pré-fermentação. O processo de fermentação foi mantido por 70 horas, com pH inicial a 7,5, à 30°C e sob agitação a 120rpm. O acompanhamento do processo fermentativo foi feito através da coleta de amostras do caldo de fermentação periodicamente para a realização das seguintes análises: (i) determinação de açúcares redutores segundo Somogy (1952) e Nelson (1944), com leituras espectrofotométricas a 510nm; e (ii) determinação de aminoácidos totais com leituras espectrofotométricas a 570nm, de acordo com metodologia de Yemm e Cocking (1955).

Resultados e Discussão

Hidrólise enzimática da solução de melaço

A hidrólise enzimática da solução de melaço de cana-de-açúcar a 10% (m/v) promoveu um aumento de 70,4% na concentração de açúcares redutores (AR), já que a concentração de AR inicial era de 22,76 g/L e passou para 77,91g/L após o tratamento por 2 horas com invertase.

Processo de Fermentação

Os resultados do processo de fermentação para produção de ácido L-glutâmico podem ser observados na Figura 1 e na Tabela 1. Analisando a Figura 1 verifica-se um acréscimo na concentração de aminoácidos totais indicando a produção de aminoácidos durante o processo de fermentação, sendo que a produção se estabiliza em torno de 60 horas. Através da Tabela 1 pode-se observar um decréscimo, em torno de 96,6%, de açúcares redutores indicando o consumo destes pelo microrganismo. Pode-se verificar, ainda, uma produção de 26,2% de aminoácidos totais no período de 70 horas de fermentação, além de se observar diminuição no valor do pH ao final (sendo corrigido e mantido durante o processo fermentativo em 7,2) concordando com a produção de ácido no meio. A

confirmação da presença deste aminoácido no caldo de fermentação será realizado por testes enzimáticos, cromatográficos e leituras em densidade óptica a 610nm da biomassa por curva padrão pré-determinada. Através destes resultados chegou-se a um rendimento de produção de aminoácidos totais de aproximadamente 2,9g/g (concentração de aminoácido totais por concentração de açúcares consumido) e uma produtividade de aminoácido totais de 3,09g/L.h.

Considerações Finais

Conforme os resultados apresentados concluiu-se que o melaço de cana-de-açúcar, previamente hidrolisado pela enzima invertase, apresentou-se como uma fonte viável para produção de aminoácido por fermentação utilizando o microorganismo *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Podendo-se sugerir que se faz necessário à realização de análises específicas a fim de se verificar a produção do ácido l-glutâmico.

Referências Bibliográficas

- AMRANE, A.; PRINGENT, Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, n. 4, p. 529-534, 1998.
- DEMERCİ, A.; POMETTO, A. L.; LEE, B.; HINZ, P. N. Media evaluation of lactic acid repeated-batch fermentation with *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.46, n.11, p. 4771-4774, 1998.
- HERMANN, T. **Industrial production of amino acids by coryneform bacteria**. *Journal of Biotechnology*, v. 104, p.155-172, 2003.
- MORAES, I.O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. **Multiplicação de agentes de controle biológico**. In: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. EMBRAPA, Brasília, p. 253-272, 1991.
- NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Immobilization of *Brevibacterium* cells for the production of L-glutamic acid. **Bioresource Technology**, v.63, p.101-106, 1998.
- NELSON D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2000.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 84, p. 375-380, 1944.
- PAYOT, T.; CHEMALY, Z.; FICK, M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* – Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. **Enzyme & Microbial Technology**, New York, v. 24, n. 3-4, p.191-199, 1999.
- RHEE, S. K.; PAGAN, R. J.; LEFEBVRE, M. F.; ROGERS, P. L. Ethanol production from desalted molasses using *Saccharomyces* and *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 62, p.297-300, 1984.
- SAHM, H.; EGGELING, L.; EIKMANN, B.; KRAMER, R. Metabolic desing in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.16, p.243-252, 1995.
- SATO, S. **Produção de aminoácidos**. In: LIMA U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL. Biotecnologia industrial. Processos Fermentativos e enzimáticos, São Paulo: Edgard Blucher, v.3, 2001.
- SELMER-OLSEN, E.; SORHAUG, T. Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. **Milchwissenschaft Milk Science International**, Munchen, v.53, n.7, p. 367-370, 1998.
- SOMOGY, M.A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, Cambridge, v. 160, p.61-68, 1952.
- YEM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analist**, London, v. 80, p. 209-213, 1955.

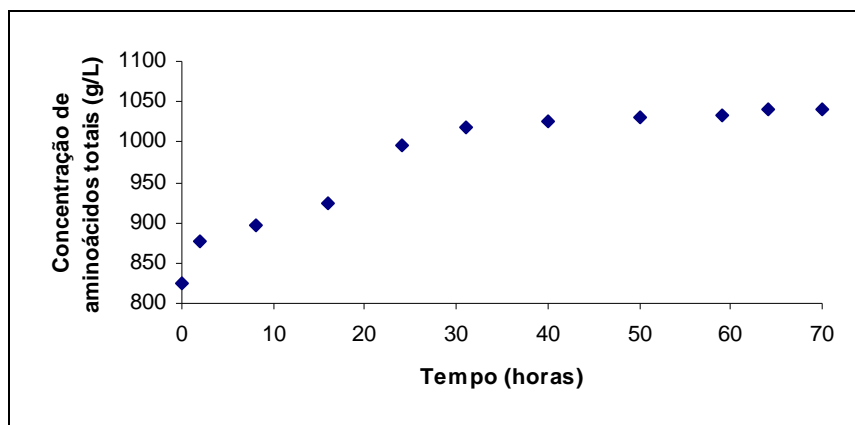


FIGURA 1 - Resultado da produção de aminoácidos totais durante a fermentação

TABELA 1 - Resultados dos parâmetros analisados no início e final da fermentação.

Parâmetros	Início da fermentação	Final da fermentação
Açúcares redutores (g/L)	77,03	2,64
Aminoácidos totais (g/L)	824,85	1040,95
pH	7,5	5,4