

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE
ÁCIDO LACTOBÍÔNICO E SORBITOL POR ENZIMAS
PERIPLASMÁTICAS DE *Zymomonas mobilis*

SABRINA CARRA

Caxias do Sul, 2012.

SABRINA CARRA

**ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE
ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL POR ENZIMAS
PERIPLASMÁTICAS DE *Zymomonas mobilis***

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia”.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

Co-Orientadora: Profa. Dra. Valéria Weiss Angeli

Caxias do Sul, 2012.

SABRINA CARRA

ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
LACTOBIÔNICO E SORBITOL POR ENZIMAS
PERIPLASMÁTICAS DE *Zymomonas mobilis*

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia”.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eloane Malvessi

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Weiss Angeli

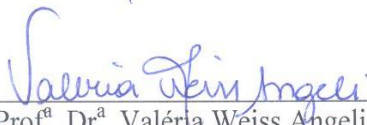
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08 DE DEZEMBRO DE 2011.



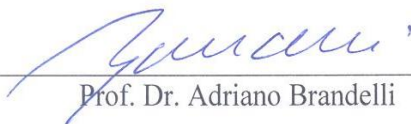
Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira



Prof^a. Dr^a. Eloane Malvessi



Prof^a. Dr^a. Valéria Weiss Angeli



Prof. Dr. Adriano Brandelli

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger



Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

C312e Carra, Sabrina

Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol
por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis* / Sabrina
Carra. – 2012.

xi, 107 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.
“Orientação: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira”

1. *Zymomonas mobilis*. 2. Enzimas. 3. Ácido lactobiônico.
4. Biotecnologia. I. Título

CDU 2.ed. : 579.844

Índice para o catálogo sistemático:

1. <i>Zymomonas mobilis</i>	579.844
2. Enzimas	577.15
3. Ácido lactobiônico	661.746.2
4. Biotecnologia	60

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Servi Gonçalves – CRB 10/1500

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre iluminar meu caminho e orientar as minhas decisões.

Aos meus pais, Dorvalino Carra e Miraci Sandi Carra pela dedicação, afeto e por sempre encherem a minha vida de esperança.

A toda minha família, em especial aos meus irmãos Maicon Carra e Luane Carra por sempre me apoiarem.

Ao Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira pelo seu ensinamento, paciência, apoio, orientação, incentivo e amizade.

A Profa. Dra. Eloane Malvessi pelo ensinamento, orientação e pela grande amizade.

A Profa. Dra. Vália Weiss Angeli pela confiança, apoio e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos pela paciência e estímulo, em especial às bolsistas Juliana Tibola Bertuoli, Bruna Campos de Souza, Aline Pinto do Santos e ao mascote Leonardo Guimarães de Almeida, por não terem medido esforços para me ajudar e, acima de tudo, por nossa amizade.

A Natasha Possamai, engenheira química, pela ajuda em uma crítica etapa do projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo conhecimento compartilhado, em especial a Profa. Dra. Mirian Salvador e ao Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon pela revisão da dissertação e por todas as contribuições significativas e essenciais dadas a este trabalho.

A Profa. Dra. Adriana Carmen Escalona Gower pela ajuda, incentivo, ensinamento e por todos os puxões de orelha que recebi, pois eles me tornaram mais perseverante e capaz.

Aos vizinhos do Laboratório de Enzimas e Biomassas pela parceria, sobretudo, à grande amiga Roselei Claudete Fontana, por enfrentar comigo os momentos de alegrias e decepções dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva, coordenador do laboratório de Óleos Essenciais e Produtos Naturais pela disponibilidade dos equipamentos e, em especial, à Dra. Fabiana Agostini.

Às funcionárias Marielsa Daré Neuman Secco, Rosângela Terezinha Festugato, Lucimara Serafini Rech e Claudete Salvador Terhorst.

À CAPES, UCS, CNPq e FAPERGS pelo apoio financiamento do projeto.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
NOMENCLATURA	vii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Zymomonas mobilis</i>	4
2.1.1 Aspecto geral	4
2.1.2 Metabolismo de carboidratos	5
2.2 Complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase e glicono-δ-lactonase de <i>Zymomonas mobilis</i>	8
2.3 Imobilização celular	12
2.3.1 Efeitos difusionais	13
2.4 Produção de sorbitol e ácido lactobiônico	15
2.5 Bioconversão empregando o sistema enzimático de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizado	17
2.6 Propriedades e aplicações de sorbitol e ácido lactobiônico	19
2.7 Recuperação de ácido lactobiônico	23

3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Microrganismo	25
3.2 Meio de cultura	25
3.3 Produção de células e enzimas	26
3.4 Permeabilização celular	27
3.5 Imobilização celular	27
3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos de glicose-frutose oxidorreductase e glicono-δ-lactonase	29
3.7 Ensaio de bioconversão de substratos em produtos	30
3.7.1 Estudos cinéticos com células livres de <i>Zymomonas mobilis</i>	31
3.7.2 Estudos cinéticos utilizando células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>	31
3.8 Estabilidade do sistema enzimático glicose-frutose oxidorreductase e glicono-δ-lactonase imobilizado em alginato de cálcio	33
3.8.1 Estabilidade à estocagem	33
3.8.2 Estabilidade enzimática em ciclos repetidos de bioconversão	34
3.9 Testes de difusividade	34
3.10 Separação e purificação dos produtos de bioconversão	35
3.11 Conversão de lactobionato de sódio em ácido lactobiônico	36
3.12 Cristalização do ácido lactobiônico	36
3.13 Avaliação das características físico-químicas do ácido lactobiônico e lactobionato de sódio	37
3.14 Métodos analíticos	37
3.14.1 Determinação da concentração celular	37

3.14.2 Determinação de açúcares redutores	38
3.14.3 Quantificação de frutose	39
3.14.4 Determinação de sorbitol	39
3.14.5 Estimativa da concentração de substratos e produtos em ensaios de bioconversão	40
3.14.6 Determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidoreductase e glicono-δ-lactonase	42
3.14.7 Determinações físico-químicas para o lactobionato de sódio e o ácido lactobiônico	43
3.14.7.1 Determinação do pH	43
3.14.7.2 Determinação do ponto de fusão	43
3.14.7.3 Determinação do poder rotatório específico	43
3.14.7.4 Determinação da quantidade de água	44
3.14.7.5 Determinação da pureza	44
3.15 Parâmetros de avaliação do processo de bioconversão	45
3.15.1 Rendimento em produto	45
3.15.2 Produtividade volumétrica, produtividade mássica e produtividade específica	46
3.15.3 Velocidade específica de formação de ácido lactobiônico	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Cinética de glicose-frutose oxidoreductase e glicono-δ-lactonase para diferentes carboidratos	48
4.2 Ensaio de bioconversão com células/enzimas permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>	58

4.3 Bioprodução de ácido lactobiônico utilizando células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>	64
4.4 Bioprodução: reutilização do biocatalisador	75
4.5 Bioprodução: comparação de células/enzimas de <i>Zymomonas mobilis</i> livres e imobilizadas	77
4.6 Recuperação e purificação do ácido lactobiônico obtido no processo de bioconversão	80
4.7 Caracterização físico-química do ácido lactobiônico e do lactobionato de sódio	86
4.8 Proposta de fluxo de produção de sorbitol e ácido lactobiônico por células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>	88
5. CONCLUSÕES	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXO – Cultivo de <i>Zymomonas mobilis</i>	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros cinéticos aparentes K_F , K_G e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i> com glicose e frutose como substratos.	53
Tabela 2: Parâmetros cinéticos aparentes K_F , K_L e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i> , com lactose e frutose como substratos.	55
Tabela 3: Parâmetros cinéticos aparentes e a relação $V_{m\acute{a}x}/K_M$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i> , com os pares lactose/frutose e glicose/frutose como substratos.	56
Tabela 4: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão com diferentes concentrações de células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> .	58
Tabela 5: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol nos ensaios de bioconversão utilizando 20g/L de células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> .	62
Tabela 6: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão com células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em suspensões de 30 a 70g/L, com 5g/L de biocatalisador em ensaios de bioconversão.	65
Tabela 7: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão com células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em suspensões de 30 a 70g/L e diferentes concentrações de biocatalisador na bioconversão.	69

- Tabela 8:** Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão, relativos a diferentes condições de estocagem das esferas, utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 70g/L e 20g/L de biocatalisador nos ensaios. 72
- Tabela 9:** Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão, utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 70g/L, com 20g/L de biocatalisador, em sucessivas bateladas de 24 horas. 76
- Tabela 10:** Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão, utilizando células de *Zymomonas mobilis* livres ou imobilizadas em suspensões de 70g/L, com 20g/L de biocatalisador. 78
- Tabela 11:** Solubilidade dos diferentes compostos presentes em meio reacional de bioconversão em etanol 75% (m/v). 81
- Tabela 12:** Resultados obtidos na avaliação físico-química nas amostras obtidas por via biotecnológica - lactobionato de sódio e ácido lactobiônico liofilizado – em comparação com o ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich). 87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspectos morfológicos de <i>Zymomonas mobilis</i> CP4.	4
Figura 2: Metabolismo de carboidratos por <i>Zymomonas mobilis</i> .	7
Figura 3: Microfotografia eletrônica de transmissão da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> .	8
Figura 4: Bioconversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glicônico, respectivamente, pelas enzimas glicose frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de <i>Zymomonas mobilis</i> .	9
Figura 5: Conversão de lactose a ácido lactobiônico utilizando enzimas presentes em <i>Pseudomonas graveolens</i> .	16
Figura 6: Estrutura do sorbitol.	19
Figura 7: Estrutura do ácido lactobiônico.	20
Figura 8: Sistema utilizado para a produção de células/enzimas em ensaios fermentativos.	26
Figura 9: Sistema utilizado para a imobilização de <i>Zymomonas mobilis</i> em alginato de sódio.	28
Figura 10: Sistema utilizado nos ensaios de bioconversão de substratos em produtos.	30
Figura 11: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL utilizando-se diferentes concentrações de células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191.	49
Figura 12: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191, com diferentes concentrações de substratos, a 39°C e pH 6,4.	52

- Figura 13:** Variação de atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, com diferentes concentrações de substratos, a 39°C e pH 6,4. 54
- Figura 14:** Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes concentrações de células livres de *Zymomonas mobilis*. 59
- Figura 15:** Velocidade específica de formação de produto (μ_P) em função do tempo relativo, em ensaios de bioconversão de ácido lactobiônico com diferentes concentrações de células/enzimas permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*. 60
- Figura 16:** Velocidade específica de formação de produto (μ_P) em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão de ácido lactobiônico com diferentes concentrações de células/enzimas permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*. 61
- Figura 17:** Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, com diferentes concentrações de frutose, utilizando 20g/L de células livres de *Zymomonas mobilis*. 63
- Figura 18:** Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão com 5g/L de biocatalisador, utilizando diferentes concentrações de suspensão celular de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. 66
- Figura 19:** Variação da concentração de glicose em função do tempo em testes de difusividade de esferas de alginato de cálcio contendo células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em diferentes concentrações. 67

- Figura 20:** Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 30g/L, 50g/L e 70g/L e diferentes concentrações de biocatalisador. 70
- Figura 21:** Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 70g/L e 20g/L de biocatalisador no processo, armazenadas em diferentes condições. 73
- Figura 22:** Velocidade específica de formação de produto (μ_P) em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão com 20g/L de biocatalisador, utilizando 70g/L de suspensão celular de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, armazenadas em diferentes condições. 74
- Figura 23:** Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, com células de *Zymomonas mobilis* livres e imobilizadas em suspensões de 70g/L, com 20g/L de biocatalisador 79
- Figura 24:** Velocidade específica de formação de produto (μ_P) em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão com 20g/L de biocatalisador, utilizando células de *Zymomonas mobilis* livres e imobilizadas em suspensão celular de 70g/L. 79
- Figura 26:** Perfil de separação cromatográfica (HPLC) de amostras de ácido lactobiônico. Coluna Aminex HPX87H (BioRad) fase móvel H₂SO₄ 0,50mM, fluxo 0,6mL/min, 60°C. 82
- Figura 27:** Sistema utilizado para cromatografia de troca iônica. 84

Figura 28: Perfil de separação cromatográfica (HPLC) de amostras de ácido lactobiônico. Coluna Aminex HPX87H (BioRad) fase móvel H₂SO₄ 0,50mM, fluxo 0,6mL/min, 60°C. 85

Figura 29: Fluxo de produção de ácido lactobiônico e sorbitol por células de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio. 90

NOMENCLATURA

$\rho_{\text{Sorb.}}$, rendimento em sorbitol (%)

α , ângulo de rotação

θ , inclinação da região linear do gráfico de $\ln(M_t/M_\infty)$ versus \sqrt{t}

ρ , rendimento em ácido lactobiônico (%)

$[\alpha]_D^{20}$, poder rotatório específico (°)

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

c , comprimento da cela do polarímetro (dm)

C , concentração da substância (g/mL)

$C_{\text{produto.formado}}$, concentração de produto formado (g/L)

$C_{\text{substrato,0}}$, concentração de substrato inicial (g/L)

$C_{\text{substrato,cons.}}$, concentração de substrato consumido (g/L)

CTAB, brometo de cetil trimetil amônio

dM_p/dt , derivada do produto em função do tempo

DNS, ácido 3,5-di-nitro-salicílico

D_v , constante de difusão (m^2/s)

GFOR, glicose-frutose oxidoreductase

GL, glicono- δ -lactonase

HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência

K_A , constante de Michaelis-Menten para o substrato A (mol/L)

K_B , constante de Michaelis-Menten para o substrato B (mol/L)

K_F , constante de Michaelis para a frutose (mol/L)

K_G , constante de Michaelis para a glicose (mol/L)

K_L , constante de Michaelis para lactose (mol/L)

- K_M , constante de Michaelis-Menten (mol/L)
- M_{∞} , massa de substrato no equilíbrio
- M , concentração de base (mol/L)
- $M_{0\text{esferas}}$, massa inicial das esferas na bioconversão (g)
- $M_{1\text{esferas}}$, massa das esferas após a primeira bioconversão (g)
- $M_{\text{ac. esperado}}$, massa de ácido lactobiônico esperado para 100% de conversão (g)
- $M_{\text{ac. formado}}$, massa de ácido lactobiônico formado (g)
- $M_{\text{ac. inicial}}$, massa de ácido lactobiônico inicial (g)
- $M_{\text{água}}$, massa de água contida em 1g de esfera (g)
- M_t , massa de substrato no tempo t
- M_X , massa de células (g)
- p , produtividade volumétrica (g/L/h)
- P_f , concentração final de produto (g/L)
- PM , massa molar do produto (g/mol)
- p_m , produtividade mássica (g/h)
- P_{max} , concentração máxima de ácido lactobiônico (g/L)
- $P_{\text{max.Sorb.}}$, concentração máxima de sorbitol (g/L)
- $PM_{\text{substrato}}$, massa molar do substrato (g/mol)
- P_o , concentração inicial de produto (g/L)
- q , produtividade específica (g/g/h)
- r , raio da esfera (m)
- $S_{f\text{ Frut.}}$, concentração residual de frutose (g/L)
- S_f , lactose residual (g/L)
- t , tempo de processo (h)
- U , uma unidade enzimática de GFOR/GL

v , velocidade inicial (U/g)

V_1 , volume de solução para a primeira batelada de bioconversão (mL)

V_2 , volume de solução para a segunda batelada de bioconversão (mL)

V_{base} , volume de base (mL)

$V_{\text{máx}}$, velocidade máxima (U/g)

V_{total} , volume total da bioconversão (mL)

μ_P , velocidade específica de formação de produto (g/g/h)

$\mu_{P,\text{max}}$, máxima velocidade específica de formação de produto (g/g/h)

RESUMO

Na presença de lactose e frutose, ácido lactobiônico e sorbitol são formados equimolarmente em reações catalisadas por glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL), enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. O ácido lactobiônico tem alto valor comercial e, como o sorbitol, importantes aplicações industriais. Este trabalho objetivou estudar a cinética de produção de ácido lactobiônico e sorbitol por células de *Z. mobilis* permeabilizadas com brometo de cetil trimetil amônio, livres ou imobilizadas em alginato de cálcio. As constantes de saturação de Michaelis-Menten de GFOR/GL para lactose e frutose foram estimadas em 0,39 e 0,050 mol/L, respectivamente, e $V_{m\acute{a}x}$ em 7,69 unidades de GFOR/GL por grama de células secas (U/g), em que U corresponde a mmol de produto formado por hora. A imobilização de *Z. mobilis* foi avaliada com suspensões celulares de 30, 50 e 70 g/L, observando-se redução do fluxo de massa dos solutos através das esferas de alginato de cálcio com maiores massas de células. Como na bioconversão de lactose/frutose em ácido lactobiônico/sorbitol, um considerável volume do reator é ocupado pelas esferas, o uso da suspensão celular de 70 g/L para a imobilização se mostrou favorável devido à menor quantidade do suporte para ter-se a concentração de células/enzimas desejada para o processo. Assim, os problemas operacionais associados à mistura e ao controle de pH foram minimizados. No processo de bioconversão, concentrações de biocatalisador, livre ou imobilizado, entre 5 a 20 g/L resultaram em teores de ácido lactobiônico semelhantes, em torno de 170 g/L, com rendimento de cerca de 70% e produtividades proporcionalmente crescentes. A velocidade específica de formação de produto calculada nas primeiras horas de processo com células imobilizadas ($\approx 0,76$ g/g/h) foi menor que a medida com células livres ($\approx 2,0$ g/g/h) em razão de o suporte de imobilização atuar como uma barreira física para o transporte de massa. Na sequência, porém, constatou-se uma maior estabilidade do sistema imobilizado e, em consequência, produtividades semelhantes ($\approx 7,1$ g/L/h) foram alcançadas em ambas as condições. Para avaliar-se possibilidade de reutilização das células imobilizadas, foram realizadas oito bioconversões seguidas – 193h de operação –, constatando-se a preservação de 85% da atividade inicial. Na bioconversão, o pH foi controlado em 6,4 com NaOH, sendo formado lactobionato de sódio. Este sal foi precipitado com etanol e, em seguida, convertido à forma ácida – ácido lactobiônico por cromatografia de troca iônica. O produto purificado apresentou características físico-químicas semelhantes às da substância padrão comercial.

ABSTRACT

Lactobionic acid and sorbitol are formed in equimolar basis from lactose and fructose in reactions catalyzed by the periplasmic-*Zymomonas mobilis* enzymes glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- δ -lactonase (GL). Lactobionic acid has a high commercial value and, like sorbitol, important industrial applications. The aim of this work was to study the kinetics of lactobionic acid and sorbitol production by cetyl trimethylammonium bromide-permeabilized cells of *Z. mobilis*, free or immobilized in calcium alginate. The Michaelis-Menten saturation constants for lactose and fructose were estimated as 0.39 and 0.050 mol/L respectively and V_{\max} as 7.69 GFOR/GL units per gram of dry cell mass (U/g), where U corresponds to mmol of product formed per hour. *Z. mobilis* immobilization was evaluated with cell suspensions of 30, 50, and 70 g/L and decreasing mass flux of solutes through calcium alginate spheres was observed as increasing cell mass was used. Since a significant reactor working volume was occupied by the alginate spheres in the bioconversion of lactose/fructose to lactobionic acid/sorbitol, the use of the 70 g/L cell suspension for immobilization seemed advantageous because of the smaller amount of support needed to have the desired cell/enzyme concentration for the process. As such, the operation problems associated with mixing and pH control were minimized. In bioconversion process, concentrations of biocatalyst, free or immobilized, from 5 to 20 g/L resulted in similar lactobionic acid titers, ca. of 170 g/L, with a yield of 70% and proportionally increasing productivities. The specific product formation rate calculated during the initial hours of process with immobilized *Z. mobilis* (≈ 0.76 g/g/h) was less than the measured with free cells (≈ 2.0 g/g/h) because the immobilization support acts as physical barrier to mass transport. In the sequence, however, it was noticed that the immobilized system presented a higher stability and, as a consequence, similar productivities (≈ 7.1 g/L/h) were achieved for both conditions. In order to assess the possibility of re-using the immobilized cells, eight sequential bioconversion runs were carried out – 193 h of operation – and a preservation of 85% of the initial enzyme activity was observed. In the bioconversion process, the pH value was controlled in 6.4 with NaOH and sodium lactobionate was formed. This salt was precipitated with ethanol and subsequently converted to its acid form – lactobionic acid – by ion exchange chromatography. The purified product presented physical-chemical characteristics which are similar to those of commercial-standard substance.

1. INTRODUÇÃO

Zymomonas mobilis é uma bactéria anaeróbia que apresenta elevada conversão de glicose a etanol. Utilizando-se sacarose ou glicose e frutose como substratos de fermentação, consideráveis quantidades de sorbitol e ácido glicônico são formados. As enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR), com a coenzima NADP⁺ acoplada, e glicono- δ -lactonase (GL) foram identificadas como responsáveis pela formação destes produtos.

Sorbitol é largamente utilizado na indústria de alimentos como edulcorante, como biossurfactante em produtos de limpeza e como emoliente em cosméticos, entre outras importantes aplicações. Ácido glicônico, por sua vez, tem aplicações principais na indústria de alimentos, como acidulante e estabilizante, e na remoção de incrustações em metais. Assim, houve, num primeiro momento, um grande interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos baseado neste sistema enzimático para a obtenção especialmente de sorbitol. Entretanto, visto que o complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* resulta na formação equimolar de seus produtos de redução e de oxidação, o seu uso industrial é ainda inviável devido à relativamente pequena demanda comercial de ácido glicônico em relação ao sorbitol. Por outro lado, relatos na literatura demonstram a capacidade deste complexo enzimático de oxidar outras aldoses em substituição à glicose, conduzindo à formação dos respectivos ácidos orgânicos e seus diferentes sais. Neste caso, destaca-se o ácido lactobiônico, resultante da oxidação da lactose, substância de alto valor agregado e importantes aplicações na área médica, como componente de soluções de conservação de órgãos a serem transplantados, e na área cosmética, devido ao seu poder hidratante, cicatrizante e anti-radicais livres.

Para a produção de ácido lactobiônico e sorbitol por *Z. mobilis*, é realizada, primeiramente, a etapa de obtenção de biomassa celular com alta atividade de GFOR/GL, e de etanol. Na sequência, a biomassa é inativada por permeabilização com solventes orgânicos ou detergentes e, posteriormente, usada na bioconversão de açúcares em produtos. Para a etapa de bioconversão, a técnica de imobilização celular tem sido empregada. Esse processo envolve a retenção da enzima em uma matriz polimérica, o que restringe a acessibilidade da enzima ao substrato, provocada, dentre outros fatores, por restrições à transferência de massa através do suporte. Por outro lado, a imobilização celular proporciona a obtenção de maior estabilidade enzimática, a facilidade na separação dos produtos na fase líquida, a possibilidade de uso de maior concentração do biocatalisador e, ainda, o reaproveitamento de células em repetidos ciclos de bioconversão.

Na bioprodução de ácido lactobiônico, são encontradas algumas dificuldades como a baixa afinidade entre o sistema GFOR/GL e lactose, o que torna a reação especialmente lenta ao final de cada batelada em razão da mais baixa concentração de substratos presentes no meio e, também, em decorrência da perda de atividade enzimática em função do tempo reacional. Assim, a produtividade do processo de bioconversão depende diretamente dos títulos em GFOR/GL presente nas células de *Z. mobilis* e de parâmetros operacionais que permitam o máximo aproveitamento da atividade enzimática.

Além disso, para que haja a conversão de lactose a ácido lactobiônico pelo complexo enzimático de *Z. mobilis*, o pH reacional deve ser controlado em valores próximos à neutralidade. Desta forma, a adição de hidróxido de sódio ao meio para o controle do pH, induz à formação de lactobionato de sódio. Tendo em vista que o ácido

lactobiônico é geralmente utilizado na forma ácida, torna-se necessário a conversão do lactobionato de sódio, obtido no processo de bioconversão, em uma substância ácida.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo geral estudar a cinética de produção de sorbitol e ácido lactobiônico por enzimas presentes no periplasma de *Z. mobilis* utilizando células permeabilizadas livres ou imobilizadas em alginato de cálcio. Para que o objetivo geral fosse alcançado, foram desenvolvidas atividades que focalizaram os objetivos específicos listados a seguir.

- . Avaliar o ajuste do complexo enzimático GFOR/GL presente em células permeabilizadas de *Z. mobilis* ao modelo de Michaelis-Menten.
- . Determinar o efeito da concentração de substrato e de células livres sobre a formação de produtos da bioconversão.
- . Estudar o efeito da difusão das substâncias no suporte em diferentes concentrações de suspensão celular de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.
- . Definir a concentração celular a ser utilizada na etapa de imobilização e no processo de bioconversão e seus efeitos sobre a velocidade específica de formação de produto.
- . Comparar a bioprodução utilizando células de *Z. mobilis* livres e imobilizadas em alginato de cálcio.
- . Testar as condições de armazenamento da biomassa imobilizada de *Z. mobilis* visando à preservação da atividade enzimática.
- . Avaliar a reutilização das células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio em sucessivos ciclos de bioconversão.
- . Realizar a conversão do lactobionato de sódio obtido no processo de bioconversão em sua forma ácida.
- . Caracterizar físico-quimicamente o ácido lactobiônico obtido por via biotecnológica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Zymomonas mobilis*

2.1.1 Aspecto geral

Zymomonas mobilis é uma bactéria anaeróbia Gram-negativa, na forma de bastonetes com 1 a 6 μm de comprimento e 1,0 a 1,5 μm de diâmetro, que se apresenta de forma isolada, aos pares ou em cadeia (Figura 1). Esta bactéria não forma esporos e, em sua grande maioria, não possui mobilidade (Swing & De Ley, 1977; Viikari, 1986).

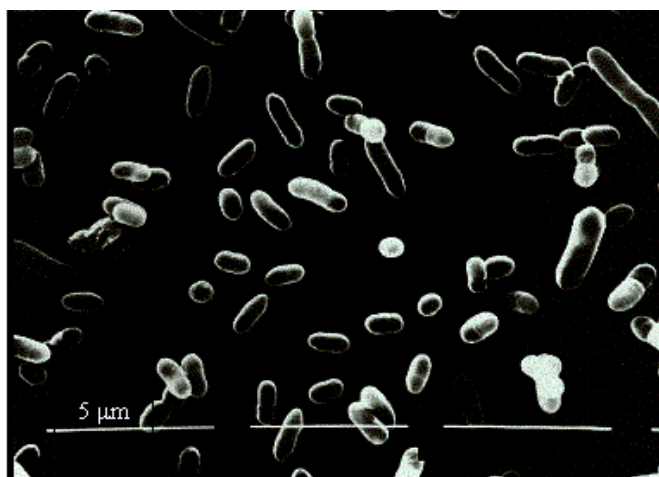


Figura 1: Aspectos morfológicos de *Zymomonas mobilis* CP4 (Palha *et al.* 2002).

Z. mobilis foi originalmente isolada de bebidas alcoólicas como o vinho de palma africano e o pulque mexicano e também identificada como um contaminante de cidra e cerveja nos países europeus (Swing & De Ley, 1977; Viikari, 1986). Já foi relatado o efeito antagônico deste microrganismo contra numerosas espécies de bactérias e fungos como, por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e

Candida albicans, não sendo patogênica para seres humanos e animais (Wanick *et al.*, 1970; Lima *et al.*, 1972).

2.1.2 Metabolismo de carboidratos

Z. mobilis tem atraído considerável interesse nas últimas décadas devido ao seu metabolismo e habilidade de produzir etanol com rapidez e eficiência a partir de açúcares simples. A bactéria é quimiorganotrófica, utilizando como fontes de carbono somente glicose, frutose e sacarose. Entretanto, após a década de 90, estudos na área de engenharia genética sobre esta bactéria foram expandidos e, através de recombinação de genes, foi possível demonstrar o metabolismo de outros açúcares como a xilose (Zhang *et al.*, 1995 apud Rogers *et al.*, 2007; Deanda *et al.*, 1996 apud Rogers *et al.*, 2007).

Zymomonas é o único procarioto que utiliza de um sistema de difusão facilitada para o transporte de glicose e frutose para o interior do citoplasma sem gasto de energia. Isso ocorre, possivelmente, devido a um gene glicose facilitador (GLF), similar ao encontrado em eucariotos (Barnell *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1995; Sprenger, 1996).

Glicose, frutose e sacarose são metabolizadas, dentre outras reações, pela via de Entner-Doudoroff, com rendimentos aproximadamente equimolares de etanol e CO₂ - Figura 2 - (Doelle *et al.*, 1993). Esta característica despertou o interesse de pesquisadores, uma vez que esta via normalmente é utilizada por microrganismos aeróbios, sendo o gênero *Zymomonas* o único anaeróbio a seguir esta rota metabólica (Gibbs & De Moss, 1954).

Na via bioquímica de Entner-Doudoroff, para cada mol de glicose ou frutose consumido é produzido um mol de ATP. Na primeira etapa do catabolismo, glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato pela ação da enzima glicoquinase, sendo ATP o doador

do grupamento fosfato. Posteriormente, glicose-6-fosfato desidrogenase converte glicose-6-fosfato em 6-P-gliconolactona, tendo a coenzima NAD(P)^+ como acceptora de elétrons. A redução do NAD(P)^+ ocorre pela transferência enzimática de um íon hidreto (H^-) liberando a coenzima reduzida (NADPH). Após a reação de hidrólise, catalisada pela enzima 6-gliconolactonase e de desidratação, pela enzima 6-glicono desidratase, ocorre a formação do 2-ceto-3-desoxi-6-P-gliconato, que é clivado por uma aldolase a piruvato e gliceraldeído-3-P. Gliceraldeído-3-P segue então quatro etapas similares ao observado na via glicolítica até a formação do piruvato, produzindo duas moléculas de ATP e uma molécula de NADH. O piruvato sofre a descarboxilação, formando acetaldeído, em uma reação catalisada pela piruvato descarboxilase. Na última etapa da via, a coenzima na forma reduzida, é amplamente reoxidada pela ação da enzima álcool desidrogenase, durante a reação de redução do acetaldeído a etanol (Swings & De Ley, 1977).

Utilizando glicose como fonte de carbono, a produção de etanol por *Z. mobilis* corresponde a cerca de 95% do valor máximo teórico, sendo formadas quantidades insignificantes de produtos secundários - acetoína, glicerol e lactato (Viikari, 1988). Por outro lado, na presença de sacarose ou uma mistura de glicose e frutose, rendimento em etanol de aproximadamente 80% foi alcançado devido à formação de gliconolactona e sorbitol, pela ação da enzima glicose-frutose oxidorreductase (Viikari, 1984). Nesta condição, glicono- δ -lactonase hidrolisa gliconolactona a gliconato que retorna à via de Entner-Doudoroff por ação da gliconato quinase (Figura 2).

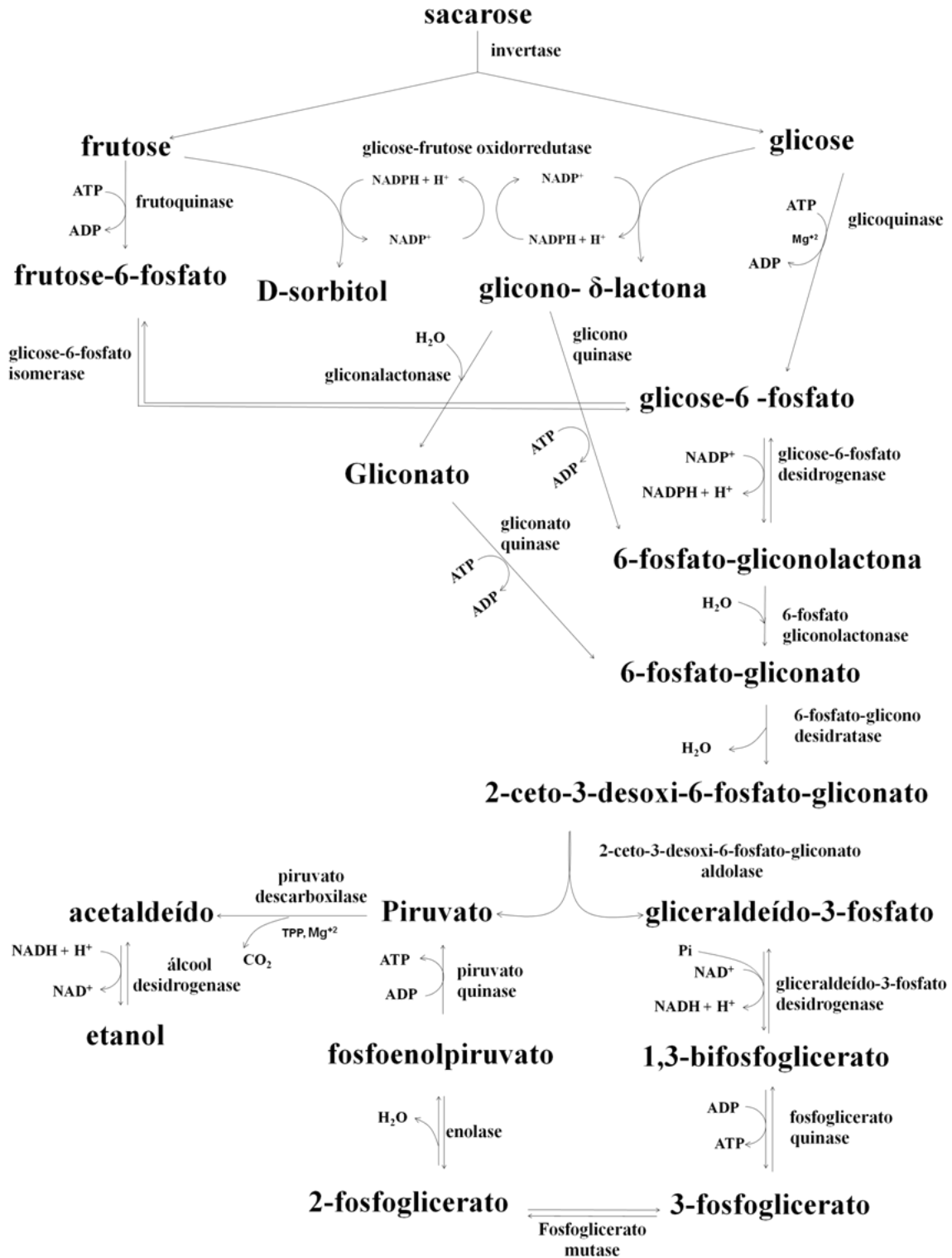


Figura 2: Metabolismo de carbohidratos por *Zymomonas mobilis* (adaptado de Gibbs & De Moss, 1954; Swing & De Ley, 1977; Sprenger, 1996).

A fim de evitar o retorno do gliconato a esta via, e conseqüente formação de etanol, diferentes autores desenvolveram processos utilizando células de *Z. mobilis* previamente cultivadas e tratadas com agentes permeabilizantes (Chun & Rogers, 1988; Rehr *et al.*, 1991). Assim, altos rendimentos em ácido glicônico e sorbitol foram alcançados. Segundo estes autores, isto ocorre devido ao extravasamento de compostos fosforilados necessários para a formação de etanol. A Figura 3 ilustra o efeito da permeabilização sobre células de *Zymomonas mobilis*. A imagem feita por microscópio eletrônico de transmissão mostra a distinção entre o conteúdo citoplasmático, antes (a) e depois (b) da permeabilização causada pelo extravasamento de compostos intracelular.

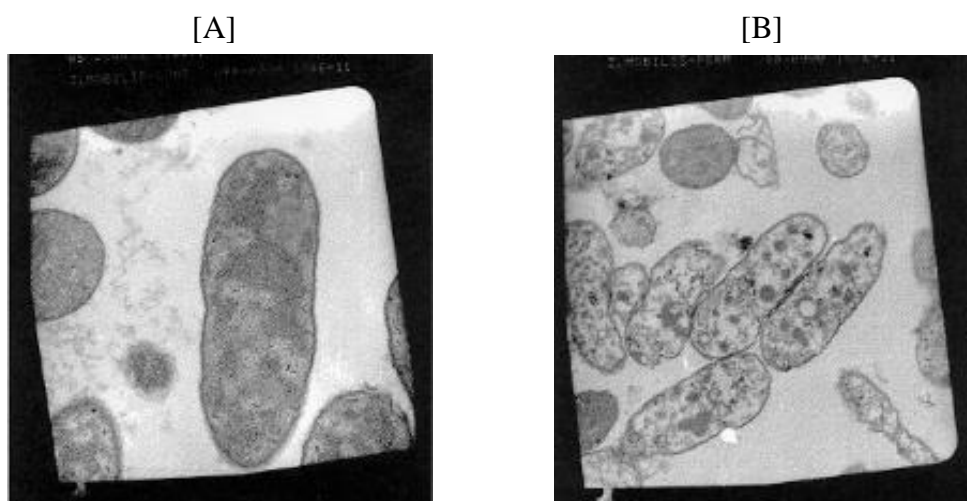


Figura 3: Microfotografia eletrônica de transmissão da bactéria *Zymomonas mobilis*.

[A] antes da permeabilização; [B] após a permeabilização (Wilberg *et al.* 1997).

2.2 Complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase e glicono- δ -lactonase de *Zymomonas mobilis*

Em cultivos de *Z. mobilis* em meio contendo glicose como fonte de carbono, além de altos rendimentos em etanol, elevada atividade de GFOR/GL são observadas,

sendo que a concentração da fonte de carbono influencia significativamente a atividade da enzima GFOR (Zachariou & Scopes, 1986; Erzinger, 1996).

A descrição do mecanismo bioquímico de obtenção de ácido glicônico e sorbitol foi primeiramente publicada por Zachariou & Scopes (1986), que identificaram a presença de glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) como responsável pela oxidação de glicose a glicono- δ -lactona e redução de frutose a sorbitol. Glicono- δ -lactona é então convertida a ácido glicônico (gliconato) pela ação de gliconolactonase (Figura 4).

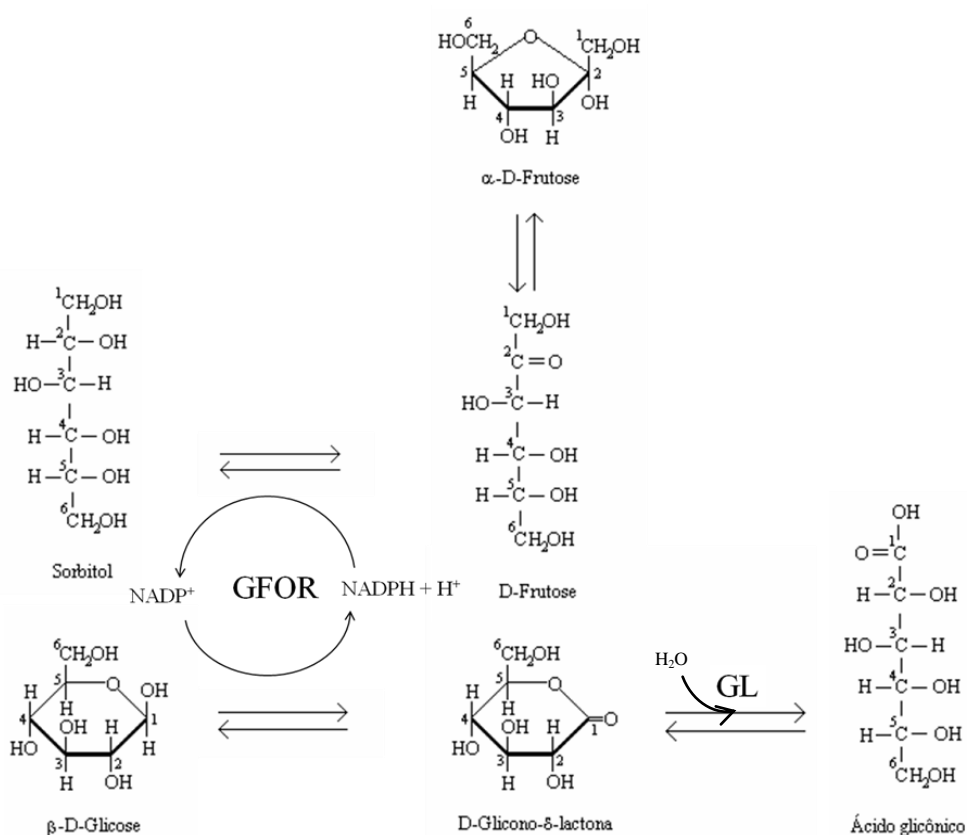


Figura 4: Bioconversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glicônico, respectivamente, pelas enzimas glicose frutose oxidoredutase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*. Adaptado de Hardman & Scopes (1988).

Hardman & Scopes (1988) estudaram a cinética de ação da GFOR e observaram que o processo catalítico consistia de duas meias reações, em que a redução do NADP^+

pela glicose e a oxidação do NADPH pela frutose são alternadas, com subsequente hidrólise de glicono- δ -lactona, catalisada pela glicono- δ -lactonase. As reações são de primeira ordem, sendo a velocidade no sentido da formação do produto aproximadamente 250 vezes maior que a reação reversa.

Segundo diversos autores (Zachariou & Scopes, 1986; Hardman & Scopes, 1988; Satory *et al.*, 1997), o mecanismo ping-pong é adequado para descrever as etapas de oxidação e redução do par de substratos glicose e frutose pela enzima GFOR purificada. A velocidade reacional em função da concentração de substrato é representada graficamente por um segmento de hipérbole, conforme o modelo de Michaelis-Menten (Equação 1), quando a concentração de um dos substratos é mantida constante e varia-se a concentração do outro substrato.

$$v = \frac{V_{\text{máx}}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A}{[A]}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

v , velocidade inicial;

$V_{\text{máx}}$, velocidade máxima;

K_A , constante de Michaelis-Menten para o substrato A;

K_B , constante de Michaelis-Menten para o substrato B.

Satory *et al.* (1997), utilizando enzimas purificadas, mostraram que GFOR/GL têm a capacidade de oxidar, além da glicose, outros carboidratos redutores, como maltose, galactose e lactose, levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos (ácido maltobiônico, galactônico e lactobiônico). De acordo com os autores, o valor de K_M de GFOR obtido para o substrato lactose foi de 1,2mol/L (a 30°C e pH 6,2), cerca de

80 vezes superior ao determinado para glicose. Embora a bioconversão de lactose a ácido lactobiônico tenha apresentado produtividade menor, esta substância recebe atenção em razão do alto valor agregado e importantes aplicações comerciais.

Carra *et al.* (2003) estudaram a cinética enzimática de GFOR/GL utilizando células permeabilizadas de *Z. mobilis* em diferentes concentrações equimolares de frutose com glicose, maltose, galactose ou lactose. Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$ estimados pelo método de Lineweaver-Burk foram de 0,68, 2,0 e 0,6 mol/L para K_M e 52, 47 e 7,6 mmol/g/h para $V_{máx}$ para os substratos glicose, maltose e galactose, respectivamente. Nas condições avaliadas, não foi possível determinar os parâmetros cinéticos para o par lactose/frutose.

Com relação ao pH e à temperatura, empregando células livres, Carra *et. al* (2003) demonstraram que, independentemente da aldose utilizada na reação enzimática em conjunto com frutose, faixa de pH em torno de 6,4 e temperatura de 45°C permitiram a obtenção de atividades enzimáticas mais altas. Entretanto, nos testes de termoestabilidade, a atividade enzimática de GFOR/GL foi mantida a 39°C.

Em reação catalisada pela enzima GFOR purificada, utilizando glicose e frutose como substrato, Zachariou & Scopes (1986) demonstraram que maior atividade catalítica foi obtida com temperatura entre 39 e 42°C e pH na faixa de 6,2 a 6,4. Estes autores constataram, ainda, que o sistema GFOR/GL é capaz de converter quase totalmente (>99%) soluções equimolares de glicose e frutose em gliconato de sódio e sorbitol, respectivamente.

A enzima glicose-frutose oxidoreductase apresenta como características a coenzima $NADP^+$ acoplada a sua estrutura e realizar reações de oxido-redução, podendo, desta forma, regenerar-se a cada reação. Entretanto, em estudos realizados por

Nidetzky *et al.* (1997), GFOR purificada se mostrou instável por períodos reacionais mais longos. Segundo os autores, este efeito se deve à exposição, ao meio reacional, de grupamentos sulfrídricos (SH) reativos, como resultado de mudanças conformacionais da enzima durante a catálise. Conforme Gollhofer *et al.* (1995), este efeito indesejável pode ser minimizado com a adição ao meio reacional de antioxidantes como ditioneitol – DTT.

Nidetzky *et al.* (1997) demonstraram a utilização de células livres de *Z. mobilis* por mais de 250 horas, em reator equipado com membrana de ultrafiltração e operado em regime contínuo, sem que ocorresse a diminuição da conversão do substrato ou da atividade enzimática. Segundo esses autores, como GFOR/GL estão presentes no periplasma de *Z. mobilis*, o microrganismo fornece uma espécie de proteção às enzimas, aumentando assim a estabilidade do sistema.

2.3 Imobilização celular

A imobilização de biocatalisadores – enzima ou células – é uma técnica utilizada em diversos processos, tanto em laboratório como em escala industrial, que consiste no confinamento físico de células íntegras e cataliticamente ativas em um sistema reacional, impedindo que essas passem para a fase solúvel onde estão contidos o substrato e o produto (Kourkoutas *et al.* 2004).

A imobilização, entre outras vantagens, proporciona o aumento da estabilidade operacional, permitindo que enzimas ou células sejam utilizadas por períodos prolongados. Esta técnica permite o uso de elevadas concentrações celulares no reator e o emprego de diferentes configurações e regime de operação de biorreatores.

De um modo geral, o sucesso da tecnologia de imobilização mostra que, as vantagens deste processo superam as limitações. Porém, alguns fatores devem ser destacados, não como uma desvantagem do processo, mas sim como pontos a serem evitados ou prevenidos. Dentre estes podem ser citados a possível perda de atividade durante o processo de imobilização, a instabilidade do biocatalisador e as questões relacionadas à difusão de substratos e produtos através do suporte (Kourkoutas *et al.* 2004; Vujcic *et al.* 2010).

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura e do pH. Na maioria dos casos estudados e relatados na literatura o processo de imobilização atua no sentido de aumentar a estabilidade da mesma (Zanin & Moraes, 2004; Cowan & Fernandez-Lafuente, 2011).

2.3.1 Efeitos difusionais

A enzima ligada a um suporte tem sua mobilidade restringida perdendo parte da sua acessibilidade ao substrato, o que resulta numa aparente redução da atividade, provocada, dentre outros fatores, por restrições difusionais, ou seja, limitações de acesso do substrato ao sítio ativo. Estas limitações difusionais podem acarretar em acúmulo de produto próximo ao sítio ativo, o que pode afetar a cinética da reação, pela redução da velocidade, ou ainda provocar alteração do pH no microambiente da enzima. Estes efeitos podem ser evitados ou diminuídos pela escolha criteriosa do suporte, pelo método de imobilização ou pelas condições de operação do biorreator (Zanin & Moraes, 2004).

O processo de imobilização por encapsulação em gel envolve a retenção da enzima em uma matriz polimérica. No interior da matriz ou da esfera não existe

mistura, e neste caso a difusão é o único meio de promover a transferência de massa. Dependendo do tamanho dos poros, o substrato não alcança o interior da esfera. Desta forma, apenas as enzimas imobilizadas na superfície da esfera podem exercer sua atividade catalítica. Como alternativa para contornar esta característica indesejável para o sistema, pode-se aumentar o tamanho dos poros ou diminuir o diâmetro da esfera. Entretanto, são as condições do processo e o biorreator utilizado que limitam o tamanho da partícula a ser empregada (Zanin & Moraes, 2004; Sassolas *et al.* 2011).

Rehr *et al.* (1991) avaliaram o processo de bioconversão de glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol utilizando células de *Z. mobilis* livres ou imobilizadas em κ -carragena. Neste estudo, foi constatada a queda de 15% na velocidade máxima específica de formação de ácido glicônico com a utilização de células imobilizadas. Segundo os autores, esse fato se deveu a problemas difusionais ou, ainda, à inativação parcial da enzima GFOR.

Com o intuito de avaliar a resistência difusional imposta pelo suporte, Pedruzzi (2010) demonstrou que não houve efeitos consideráveis de resistência difusional quando utilizadas esferas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio (4% m/v) com diâmetros médios entre 1,2 - 1,7mm.

Através da medida de transferência do soluto para o interior e para exterior de esferas de gel biocatalíticas, Scott *et al.* (1989) avaliaram o coeficiente de difusão com relação ao suporte utilizado levando em consideração a concentração de microrganismo no interior das esferas, a massa molecular das substâncias e a concentração de soluto. Foi demonstrado por esses autores que a difusão do soluto foi mais facilitada com a utilização de κ -carragena em comparação com o alginato de sódio. Além disso, o gel κ -carragena permite rápida difusão de moléculas de baixa massa molecular; entretanto concentrações elevadas do soluto prejudicam a difusão. Os autores relataram ainda que

a concentração de microrganismos no interior das esferas foi inversamente proporcional à difusão do soluto.

2.4 Produção de sorbitol e ácido lactobiônico

Além do processo utilizando *Z. mobilis* para a produção de sorbitol e ácido lactobiônico, processos com o emprego de catalisadores químicos e outros agentes biológicos também são relatados na literatura.

A produção industrial de sorbitol pode ser realizada por processos que envolvem a hidrogenação catalítica do xarope de glicose, numa concentração de 70% (m/v), catalisado por níquel (Ni^{+2}), à temperatura e pressão médias de 120-150°C e 40-50atm, respectivamente. O xarope de sorbitol obtido é resfriado e o catalisador eliminado por precipitação e filtração. A purificação da solução de sorbitol é realizada por cromatografia de troca iônica e carvão ativado (Haidegger, 1977, apud Silveira & Jonas, 2002). Por via biotecnológica, Duvnjak *et al.* (1991) relatam a obtenção de sorbitol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859 geneticamente modificada. Utilizando no meio de cultivo o suco de alcachofra de Jerusalém como fonte de carbono, mistura de frutose e glicose, foi observada a formação de etanol no início do processo enquanto que a produção de sorbitol ocorreu após o total consumo de glicose.

Com relação ao ácido lactobiônico, Edward & Islip (1952, apud Severo Júnior, 2008) relataram esta produção via oxidação eletrolítica da lactose. Nesse processo uma célula eletrolítica relativamente pequena converte uma solução aquosa saturada de lactose em ácido lactobiônico. Gutierrez *et al.* (2011) avaliaram a utilização de nanopartículas de ouro para a oxidação seletiva de lactose em ácido lactobiônico. Neste processo de síntese foi obtida produtividade em torno de 7,2g/L/h.

A conversão de lactose a ácido lactobiônico foi relatada com o emprego de enzimas presentes em *Pseudomonas graveolens* (Nishizuka & Hayaishi, 1962). Nessa reação, a lactose é convertida a lactobiono- δ -lactona pela ação da enzima lactose desidrogenase e subseqüentemente convertida a ácido lactobiônico por uma lactonase (Figura 5).

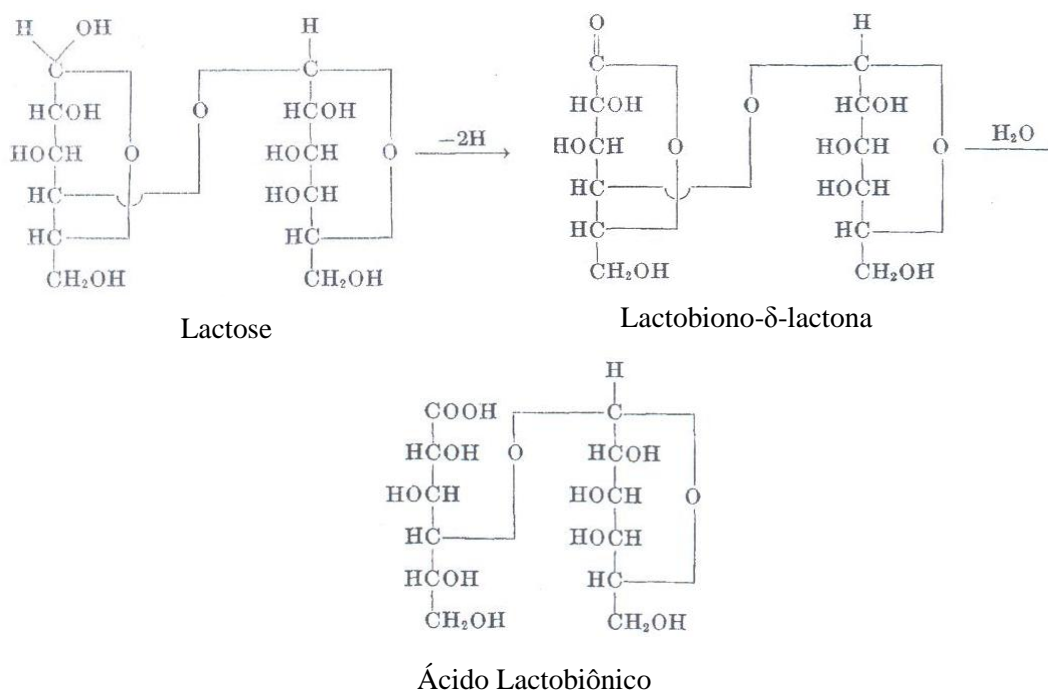


Figura 5: Conversão de lactose a ácido lactobiônico utilizando enzimas presentes em *Pseudomonas graveolens* (Nishizuka & Hayaishi, 1962).

Miyamoto *et al.* (2000), em meio contendo soro de leite (~50g/L de lactose) e 5 g/L de peptona, obtiveram cerca de 44g/L de ácido lactobiônico em 60 horas de processo com *Pseudomonas* sp LS13-1. Em testes com concentrações crescentes de lactose, rendimentos da ordem de 90% foram alcançados com 150 ou 200g/L de lactose. Em batelada alimentada, os autores relatam a baixa eficácia do soro de leite em função do aumento da viscosidade do meio. Entretanto, com lactose (150g/L inicial) e adição

intermitente de 50g de lactose + 0,8 g de peptona, destacam a obtenção de 290g/L de ácido lactobiônico ao final de 155 horas de cultivo.

Alonso *et al.* (2011) avaliaram o efeito do pH sobre a produção de ácido lactobiônico por *Pseudomonas taetrolens* utilizando soro de leite como matéria-prima. Segundo os autores, o pH do cultivo foi controlado em valores superiores a 6,5 durante a fase de crescimento celular e mantido em 6,5 no período de formação do ácido lactobiônico. Nestas condições, produtividade de 1,12g/L/h foi atingida.

Com o emprego do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, ácido lactobiônico e sorbitol são formados em base equimolar, atingindo-se, para o ácido, produtividade em torno de 8,0g/L/h (Malvessi, 2008).

2.5 Bioconversão empregando o sistema enzimático de *Zymomonas mobilis* imobilizado

Para a imobilização por encapsulamento do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, são descritos na literatura como suportes como alginato de sódio (Chun & Rogers, 1988, Bertasso *et al.*, 1996), κ -carragena (Rehr *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 1992) e ainda diferentes polímeros (Ferraz *et al.*, 2000; Vignoli *et al.*, 2006).

Severo Júnior (2008) avaliou o efeito da imobilização de *Z. mobilis* em módulos contendo membranas do tipo fibras ocas, sobre a formação de ácido lactobiônico. Foi demonstrado que a taxa específica de formação de ácido lactobiônico no sistema imobilizado foi de aproximadamente metade da taxa obtida com a utilização de células livres. Segundo esse autor, apesar do resultado obtido, a imobilização celular seria mais conveniente do ponto de vista de integração do processo de reação enzimática e separação de produtos por eletrodialise.

Koehntopp *et al.* (1996) avaliaram a imobilização de células de *Z. mobilis* em polímeros sintéticos (poliuretano). Segundo os autores este método de oclusão proporciona alta resistência mecânica e, devido à grande porosidade, boa difusão no meio reacional. Nos ensaios de bioconversão utilizando glicose e frutose para a formação de ácido glicônico e sorbitol, rendimento em torno de 100% foi obtido com produtividade específica de 2,3 g/g/h.

Utilizando células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, Malvessi *et al.* (2010) caracterizaram a ação de GFOR/GL em relação ao pH (5,2 – 9,7) e a temperatura (34-59°C) para o par de substratos glicose e frutose. Incremento da atividade enzimática foi observado em pH em torno de 7,8 e entre 47 e 50°C. Em função da barreira imposta pelo suporte, a transferência de massa no sistema imobilizado foi prejudicada e possivelmente por este motivo, foram encontrados valores de pH e temperatura mais altos que os relatados como ideais na literatura para suspensão celular de *Z. mobilis* (Zachariou & Scopes, 1986; Carra *et al.*, 2003).

Malvessi *et al.* (2006a) avaliaram, preliminarmente, diferentes configurações de biorreatores (mistura completa, de coluna com leito fixo e leito fluidizado) para bioprodução de ácido lactobiônico utilizando o sistema enzimático imobilizado de *Z. mobilis*. Valores superiores de máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico foram obtidos com o emprego de reator de mistura completa. Segundo os mesmos autores, o reator de mistura completa favorece a reação por proporcionar um melhor contato da enzima com o substrato, além de facilitar o controle do pH.

Malvessi *et al.* (2009), em ensaios de bioconversão com *Z. mobilis* imobilizada em alginato de cálcio, utilizando lactose e frutose como substratos, obtiveram conversão de 75%, alcançando 480mmol/L de ácido lactobiônico formado, resultados relevantes em se tratando de um processo biotecnológico.

Bertasso *et al.* (1996) avaliaram a preservação da atividade de GFOR/GL contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Os autores relatam a preservação de cerca de 80% da atividade inicial após aproximadamente 350 horas de processo de bioconversão em batelada.

2.6 Propriedades e aplicações de sorbitol e ácido lactobiônico

O sorbitol é um poliálcool, também conhecido como D-sorbitol ou D-glucitol (Figura 6), sendo amplamente encontrado na natureza, em várias espécies vegetais, principalmente em frutas como pêra, maçã, pêssego e ameixa (Freitas, 1990). Consiste em um pó branco, cristalino com ponto de fusão de 90 a 96°C e desvio óptico de + 4.0° para + 7.0°. É muito solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol 96%, apresenta fórmula molecular $C_6H_{14}O_6$ e massa molar de 182,2g/mol (European Pharmacopoeia, 2008; British Pharmacopoeia, 2009).

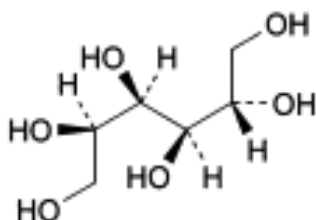


Figura 6: Estrutura do sorbitol (European Pharmacopoeia, 2008).

O sorbitol é utilizado como adoçante padrão de diversos alimentos, tendo poder edulcorante 60 vezes superior ao da sacarose (Budavari *et al.*, 1996) podendo ser aplicado como uma substância não cariogênica (Birkhed *et al.*, 1984). Em produtos de limpeza, como sabões e detergentes, pode ser utilizado como biossurfactante natural

(Nitschke & Pastore, 2002). Na indústria farmacêutica, usado em xaropes e pastas medicinais, como matéria-prima básica para a produção do ácido ascórbico e como emoliente na produção de cosméticos (Silveira & Jonas, 2002; Jonas & Silveira, 2004).

Na área biotecnológica, sorbitol pode ser utilizado como fonte de carbono na formulação de meio de cultivo para a produção de celulases e xilanasas por *Penicillium echinulatum* (Ritter, 2009). Estudos recentes demonstraram que sorbitol pode ser utilizado com eficiência na formulação de solução para criopreservação de sêmen de cavalo (Pojprasath *et al.*, 2011).

O ácido lactobiônico (ácido 4-O-β-D-galactopiranosil-D-glicônico) é composto por uma unidade de galactose quimicamente ligada por um éter a uma molécula de ácido glicônico (Figura 7). Consiste de um pó branco, cristalino, com ponto de fusão de 125°C, pKa 3,8 e desvio óptico de +23 para +29. É solúvel em água, ligeiramente solúvel em ácido acético glacial, em etanol anidro e metanol (European Pharmacopoeia, 2008; British Pharmacopoeia, 2009).

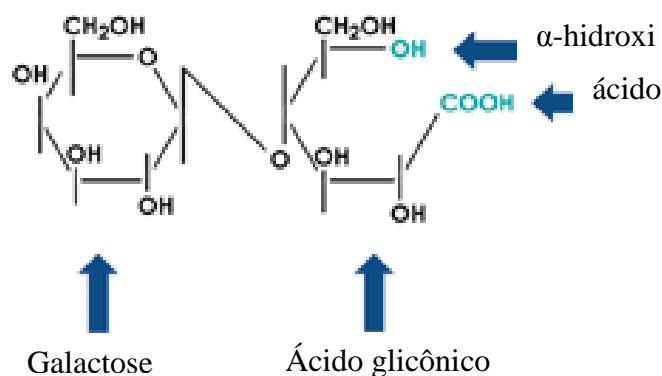


Figura 7: Estrutura do ácido lactobiônico (Briden, 2004).

Entre os produtos mais utilizados na indústria cosmética, estão os alfa-hidroxiácidos (AHA) e os polihidroxiácidos (PHA). O conhecimento sobre os efeitos benéficos dos AHA no tratamento da pele, bem como o seu grande sucesso comercial, remonta aos anos 70. Desde então, o uso dos AHA foi ampliado para o

tratamento de diversos problemas dermatológicos como acne, queratose, verrugas, rugas finas, pigmentação e pele fotoenvelhecida. Entretanto, por apresentarem moléculas de baixa massa molecular, penetram rapidamente na pele, podendo provocar ardência e queimação (Van Scott *et al.*, 1996).

Na constante busca por novas matérias-primas que contornassem os efeitos adversos provocados pelos AHA, foram descobertos os PHA. Os PHA são ácidos carboxílicos que contêm dois ou mais grupos hidroxila, formando uma estrutura molecular alifática ou alicíclica, sendo os seus representantes mais comuns o ácido glicônico e o ácido lactobiônico (Yu & Van Scott, 2004; Green, 2005).

Embora ainda pouco estudados, alguns PHA possuem importante atividade antioxidante. Uma substância antioxidante é aquela capaz de prevenir ou inibir a oxidação, através da captura ou supressão da formação de radicais livres. A exposição da pele à radiação UV gera oxidações e degradações causada pelos radicais livres formados (Carvalho, 2006).

O ácido lactobiônico é um composto higroscópico, com maior capacidade de absorção de água que os umidificantes tradicionais (sorbitol e glicerol), que proporciona o efeito hidratante na pele a partir da formação de uma película geleificante (Grimes *et al.*, 2004; Yu & Van Scott, 2004). Possui efeito antioxidante através da quelação do ferro e se mostrou capaz de inibir a oxidação de substâncias rapidamente oxidáveis, como a antralina e hidroquinona (Yu & Van Scott, 2004; Green, 2005). O ácido lactobiônico é benéfico também por inibir a enzima metaloproteinase, que é responsável pela degradação da matriz extracelular e da integridade estrutural da pele, que contribuiria para a formação de rugas, flacidez e telangiectasia (Barquet *et al.*, 2006).

Os PHA são também usados no tratamento da ictiose, caracterizada pela epiderme espessa e coberta de escamas, com aspecto de pele de peixe. Os AHA e os

PHA auxiliam na redução de escamas, sendo capazes de normalizar a reposição celular, a esfoliação e ainda estimular a produção de ceramidas, que reforçam a função de barreira (Beny, 2003). Melhora significativa na aparência da pele com ictiose foi relatada por Kempers *et al.* (1998) com o emprego de 10% de AHA e PHA.

Na cosmetologia, resultados positivos no tratamento da acne são relacionados ao uso de PHA. Estes ácidos diminuem a coesão entre os corneócitos e aumentam a descamação, contribuindo, desta forma, para o tratamento da acne. Como agentes de limpeza e hidratante, os PHA são usados para evitar o ressecamento da pele em pacientes que fazem uso de medicamentos tópicos ou sistêmicos. Também são empregados como agentes condicionantes após *peelings* com AHA, tratamentos a laser e microdermoabrasão. Os PHA consistem em uma alternativa para pacientes com pele sensível que, nas sociedades desenvolvidas, compreendem 50% da população em geral (Pinto *et al.*, 2009).

Várias empresas de produtos cosméticos nacionais (ProLife em São Paulo e Adcos no Espírito Santo) e internacionais (Neostrata e Nu Skin, nos Estado Unidos) já têm adotado o ácido lactobiônico como componente principal em suas formulações de uso tópico (disponível *online* em: <http://www.adcos.com.br>; <http://www.prolifeimport.com.br>; <http://www.neostrata.com/>; <http://www.nuskin.com>).

O ácido lactobiônico é também importante na área médica, como componente de soluções usadas na estabilização de órgãos antes de serem transplantados. Devido à sua habilidade de suprimir os danos causados aos tecidos pelos radicais livres, contribuem para a preservação extra-corpórea de órgãos por até 48 horas (Sumimoto & Kamada, 1990; Southard & Belzer, 1995; Murzina *et al.*, 2008).

Outras aplicações do ácido lactobiônico são relacionadas ao seu uso na forma de sal, com o intuito de aumentar a solubilidade de antibióticos, como é o caso do

lactobionato de eritromicina, que tem a solubilidade cerca de 50 a 100 vezes aumentada à da eritromicina em água (Hoffhine, 1956; Nordkvist *et al.*, 2007). Apresenta ainda alta capacidade de complexar minerais e resistência à ação das enzimas digestivas, podendo ser fermentado pela flora intestinal, com possíveis efeitos pré-bióticos (Schaafsma, 2008). Na área de alimentos, é utilizado como acidulante na produção de queijos (Koka *et al.*, 2002).

Para a utilização do ácido lactobiônico obtido por via biotecnológica em produtos farmacêuticos, a ANVISA preconiza que primeiramente seja realizada a caracterização físico-química fundamental dessa substância (Brasil, 2003). A European Pharmacopoeia (2008), como um código oficial farmacêutico, estabelece os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde. Para o ácido lactobiônico, as especificações farmacopéicas são: grau de pureza de 98-102%; máximo de 0,2% de açúcares redutores, 20 ppm de metais pesados e 5% de água.

2.7 Recuperação de ácido lactobiônico

Em processo de bioconversão utilizando células de *Z. mobilis*, elevadas concentrações de ácido lactobiônico e sorbitol são obtidas, com concentrações residuais apreciáveis de lactose e frutose sendo observadas após 24 horas de reação. Em se tratando de uma reação enzimática, o pH do meio reacional deve ser controlado e desta forma, através da adição de hidróxido de sódio, ocorre a conversão do ácido lactobiônico em lactobionato de sódio (Malvessi *et al.*, 2010).

Silveira *et al.* (2007) demonstraram a possibilidade de separar os produtos da reação utilizando sucessivas precipitações com solventes orgânicos comuns como

etanol, metanol, ácido glacial, entre outros. Destaque é dado para a utilização de etanol, uma vez que este solvente é o produto principal da fermentação de glicose por *Z. mobilis*. No caso, a separação e a precipitação são possíveis porque lactobionato de sódio é praticamente insolúvel e sorbitol é levemente solúvel em etanol.

Na maioria dos casos reportados na literatura, esta matéria-prima tem sido aplicada na forma ácida - ácido lactobiônico. Como neste trabalho o produto obtido é o lactobionato de sódio, torna-se necessário a conversão deste em sua forma ácida. Jones & Ho (2001) desenvolveram um processo de baixo custo para a conversão de lactobionato de cálcio em ácido lactobiônico. Neste estudo, com a utilização de resinas de troca iônica, soluções de ácido lactobiônico com quantidades insignificantes de impurezas foram obtidas. Para a cristalização, a solução de ácido lactobiônico foi concentrada por evaporação e submetida a secagem à vácuo. Com o emprego dessa técnica, os autores relatam a obtenção de grande quantidade de cristais puros de ácido lactobiônico a um custo relativamente baixo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

A bactéria utilizada nesse estudo foi *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580), adquirida do *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (RFA). As culturas foram mantidas em meio líquido, repicadas mensalmente e estocadas a 4°C (Malvessi *et al.*, 2006b).

3.2 Meio de cultura

O meio líquido utilizado para conservação, obtenção de inóculo e ensaios em biorreator continha em sua composição (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; KH_2PO_4 , 3,5; extrato de levedura bruto (Prodex Lac[®], Prodesa S.A, Brasil), 7,5 (Malvessi *et al.*, 2006b). No preparo do meio de ativação e conservação da cultura foram adicionados 20g/L de glicose e o pH ajustado para 5,5. Na obtenção de inóculos, a concentração de glicose utilizada foi de 100g/L e o pH do meio foi controlado com a adição de CaCO_3 (5 g/L).

Para os cultivos em biorreator foram utilizadas 150g/L de glicose. Para o inóculo e os cultivos em biorreator, foi preparada uma solução de glicose (500g/L), sendo adicionado ao meio o volume necessário desta solução para atingir-se a concentração desejada em cada condição.

A esterilização de todos os meios, bem como da solução de glicose, foi feita em autoclave, a 1 atm, por 15min.

3.3 Produção de células e enzimas

A ativação de culturas foi realizada adicionando-se 2mL de suspensão bacteriana em estoque a um tubo, com tampa, contendo 18mL de meio de ativação. Os tubos foram incubados em estufa a 30°C por 12 horas.

Para a produção do inóculo, foram usados frascos anaeróbios de 500mL, contendo 450mL de meio total. Os meios foram inoculados com 45mL da cultura previamente ativada e mantida sob agitação orbital de 200rpm, em agitador de bancada Certomat U/H – B. Braun Biotech, RFA, a 30°C, por 10 horas.

O cultivo microbiano foi realizado em regime descontínuo, em fermentador de bancada de 7,0 litros de volume total e 5,5 litros de volume útil, construído na Universidade de Caxias do Sul (Figura 8).

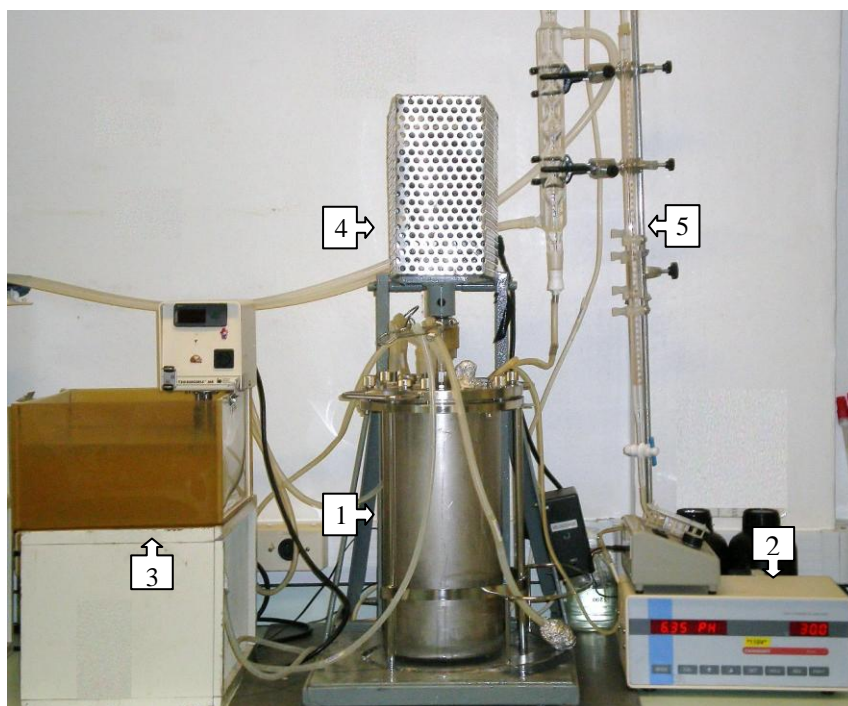


Figura 8: Sistema utilizado para a produção de células/enzimas em ensaios fermentativos. (1) cuba de fermentação; (2) controlador de pH; (3) banho termostatzado; (4) sistema de agitação; (5) condensador.

O meio de cultivo foi inoculado com o volume necessário para obter-se uma concentração celular de 20 unidades de D.O. (densidade óptica), descrito no item 3.14.1. A temperatura foi mantida a 30°C, com controle automático de pH em 5,5 pela adição automática de NaOH 5mol/L. Durante a primeira hora de fermentação, nitrogênio gasoso foi borbulhado no meio, à vazão de 0,5L/min, com a finalidade de garantir a anaerobiose. Após o término dos cultivos, o caldo fermentado foi recolhido e concentrado por centrifugação a 5836g por 10 minutos (Sigma, modelo 4-15). As células foram ressuspensas em água destilada e quando necessário, uma porção do sobrenadante foi estocada visando posterior análise do etanol formado.

3.4 Permeabilização celular

A permeabilização celular é um tratamento com detergente que leva ao extravasamento de compostos fosforilados necessários para a formação de etanol (Chun & Rogers, 1988; Rehr *et al.*, 1991) permitindo, então, com a utilização de lactose/frutose no meio, o acúmulo de ácido lactobiônico e sorbitol, produtos do metabolismo de *Z. mobilis* nestas condições reacionais. Após a centrifugação do caldo fermentado, a biomassa foi concentrada em 25g/L e submetida à permeabilização com 0,2% (m/v) de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), a 4°C, por 10min, seguindo a metodologia proposta por Rehr *et al.*, (1991) com algumas modificações.

3.5 Imobilização celular

Para o encapsulamento de *Z. mobilis* em alginato de sódio, foi utilizada a metodologia descrita por Malvessi (2008). Primeiramente, o alginato de sódio Algogel 5540 (Degussa Flavors & Fruit Systems do Brasil Ltda) foi dissolvido em água (4%

m/v) e mantido sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Paralelamente, 50g/L (em base seca) de células de *Z. mobilis* permeabilizadas foram tratadas com glutaraldeído 0,5% (m/v), sob agitação, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Posteriormente, à solução de alginato de sódio, foi adicionado igual volume de suspensão de células de *Z. mobilis* em diferentes concentrações (30, 50 e 70g/L). A mistura foi novamente mantida sob agitação por cerca de 2 horas para perfeita homogeneização. Para a formação das esferas de alginato de cálcio e imobilização das células, todo o volume da suspensão foi lentamente gotejado em solução de CaCl_2 0,3mol/L, através de agulhas hipodérmicas, com auxílio de uma bomba peristáltica (Figura 9). Após esta etapa, as esferas foram reticuladas com glutaraldeído 0,5% (m/v), sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 10min. O diâmetro médio das esferas de alginato de cálcio foi de $2,36 \cdot 10^{-3}$ m. As esferas foram armazenadas em água a 4°C até sua utilização.

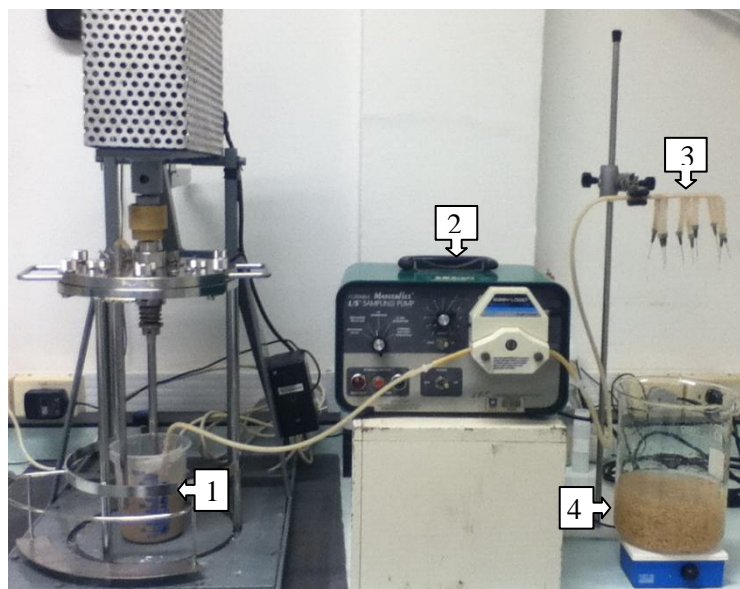


Figura 9: Sistema utilizado para a imobilização de *Zymomonas mobilis* em alginato de sódio. (1) solução de alginato de sódio + suspensão celular de *Z. mobilis*; (2) bomba peristáltica; (3) agulhas hipodérmicas; (4) esferas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.

3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos de glicose-frutose oxidoreductase e glicono- δ -lactonase

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em reator de 200mL, contendo 100mL de solução de lactose/frutose ou glicose/frutose. O reator foi mantido em banho termostaticado, a temperatura de 39°C, sob agitação magnética, com pH controlado em 6,4 pela adição automática de solução de NaOH contido em uma proveta, acoplado ao pHstato (Consort R735, Bélgica). A concentração da solução de NaOH empregada foi dependente da velocidade reacional sendo utilizados valores entre 0,25 a 1mol/L.

Para a estimativa dos parâmetros cinéticos aparentes K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da equação de Michaelis-Menten (Eq. 1), foram utilizadas soluções de lactose/frutose ou glicose/frutose, com o emprego de células livres, previamente permeabilizadas com CTAB. Primeiramente, foi avaliado o efeito da concentração de células/enzimas de *Z. mobilis* (entre 0,025 e 0,5g/L) sobre a atividade enzimática, utilizando solução padrão de lactose/frutose (0,7mol/L). A partir da concentração de biocatalisador que proporcionou maior atividade enzimática, foram realizados ensaios em que a concentração de um dos substratos foi mantida constante e variou-se a concentração do outro substrato, seguindo a metodologia descrita por Zachariou & Scopes (1986). Nos ensaios com o par glicose/frutose, a atividade enzimática foi avaliada nas seguintes condições: i) com concentração inicial de frutose de 0,7mol/L e concentrações iniciais de glicose de 0,005 a 0,40mol/L; ii) com concentração inicial de glicose de 0,7mol/L e concentrações iniciais de frutose de 0,03 a 0,45mol/L. Para os ensaios com o par lactose/frutose, a atividade enzimática foi avaliada nas seguintes condições: i) com concentração inicial de frutose de 0,70mol/L e concentrações iniciais de lactose de 0,15 a 0,35mol/L; ii) com

concentração inicial de lactose de 0,70mol/L e concentrações iniciais de frutose de 0,05 e 0,40mol/L.

Os parâmetros cinéticos aparentes (K_M e $V_{m\acute{a}x}$) da equação de Michaelis-Menten foram calculados com o auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0.

3.7 Ensaios de bioconversão de substratos em produtos

Os ensaios foram realizados em reator de 600mL de volume total e volume reacional de 200mL. As condições padrão de pH e temperatura foram pH 6,4 e 39°C, respectivamente. O reator encamisado foi acoplado a um banho termostaticado, sob agitação magnética, com pH controlado pela adição automática de solução de NaOH 7,0mol/L, contido em uma bureta de 50mL, acoplado ao controlador de pH (Consort R735), conforme observado na Figura 10.

Como biocatalisadores, foram utilizadas células/enzimas de *Zymomonas mobilis* livres ou imobilizadas em alginato de cálcio.

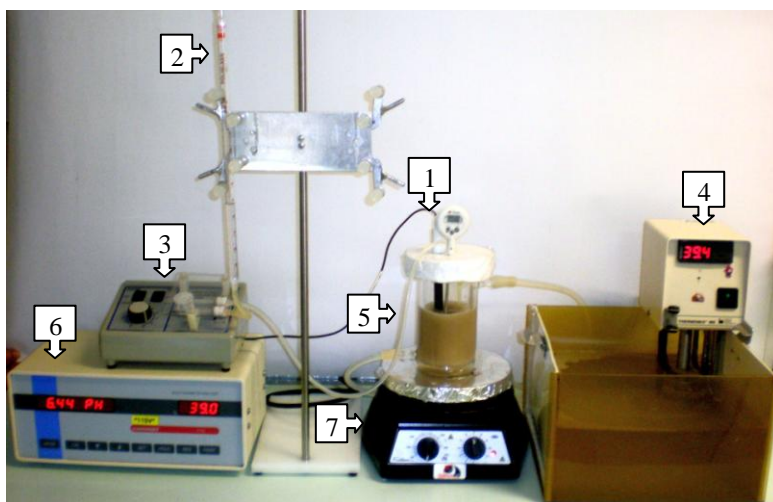


Figura 10: Sistema utilizado nos ensaios de bioconversão de substratos em produtos.

(1) sonda de pH; (2) bureta; (3) bomba peristáltica; (4) banho termostaticado; (5) reator; (6) controlador de pH; (7) agitador magnético

3.7.1 Estudos cinéticos com células livres de *Zymomonas mobilis*

Nos ensaios de bioconversão com células livres avaliou-se o efeito da concentração de biocatalisador - de 5, 10 e 20g/L - na velocidade reacional de formação de produtos, em meio contendo lactose/frutose (0,70mol/L), pH 6,4 e 39°C. Particularmente na condição de 20g/L de biocatalisador, a cinética foi também analisada utilizando soluções de substratos contendo lactose 0,70mol/L e variadas concentrações de frutose (0,50; 0,55; 0,60; 0,70mol/L).

3.7.2 Estudos cinéticos utilizando células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*

Nos ensaios com o sistema enzimático imobilizado, a formação de produtos foi avaliada em função da concentração de células/enzimas empregadas na etapa de imobilização - partindo de suspensões celulares contendo 30, 50 ou 70g/L - e no processo de bioconversão (5, 10, 20 ou 30g/L de biocatalisador), utilizando solução de lactose/frutose 0,70mol/L, sendo o processo conduzido nas condições de pH e temperatura padrão.

Tendo em vista que as esferas nas quais as células de *Z. mobilis* foram imobilizadas são compostas por mais de 90% de água, foi necessário ajustar o volume da solução de substratos (lactose/frutose) para obter, após a adição das esferas, o volume final de 200mL de meio reacional.

Para determinar-se o volume de água nas esferas de alginato de cálcio, 1 g do suporte de imobilização foi transferido para um cadinho previamente tarado, que foi mantido em estufa a 90-95°C, por de 24 horas. Posteriormente, o cadinho foi mantido em

dessecador a temperatura ambiente por 30 minutos para o resfriamento, seguindo-se a determinação da massa em balança analítica. A massa de água contida nas esferas foi determinada pela subtração do peso do cadinho contendo as esferas secas pelo peso do cadinho na ausência de esferas.

Posteriormente, o volume da solução de substratos para a primeira batelada de bioconversão foi determinado de acordo com a equação 2.

$$V_1 = V_{\text{total}} - \left(\frac{M_{\text{0esferas}} \times M_{\text{água}}}{1} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

V_1 , volume de solução para a primeira batelada de bioconversão (mL);

V_{total} , volume total da bioconversão (200mL);

M_{0esferas} , massa inicial das esferas na bioconversão (g);

$M_{\text{água}}$, massa da água contida em 1g de esfera (g).

Ao final de cada batelada de bioconversão é observado o aumento da massa das esferas, uma vez que ocorre a difusão de produtos, substratos e água para o seu interior. No caso de reutilização do biocatalisador imobilizado no processo de bioconversão, as esferas foram drenadas no final do processo, retirado o excesso de líquido com papel filtro e novamente pesadas, com o objetivo de estimar a quantidade de substâncias retidas no interior das esferas. O volume de solução de substratos foi calculado de acordo com a equação 3.

$$V_2 = V_1 - (M_{1esferas} - M_{0esferas}) \quad (\text{Eq.3})$$

Onde:

V_2 , volume de solução para a segunda batelada de bioconversão (mL);

V_1 , volume de solução para a primeira batelada de bioconversão (mL);

$M_{1esferas}$, massa das esferas após a primeira bioconversão (g);

$M_{0esferas}$, massa inicial das esferas na bioconversão (g).

3.8 Estabilidade do sistema enzimático glicose-frutose oxidoredutase e glicono- δ -lactonase imobilizado em alginato de cálcio

3.8.1 Estabilidade à estocagem

Para avaliar a estabilidade enzimática em função da condição de estocagem do sistema enzimático GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio, ao final da imobilização das células/enzimas, as esferas foram armazenadas a 4°C, em diferentes condições: em água destilada por 12 horas, em água destilada por 15 dias e em solução tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio pH 6,4, por 15 dias. Posteriormente, as esferas de alginato de cálcio foram utilizadas em ensaios de bioconversão com o par de substratos lactose/frutose (0,70mol/L) sob as condições operacionais padrão (pH 6,4; 39°C).

3.8.2 Estabilidade enzimática em ciclos repetidos de bioconversão

A estabilidade das células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio foi avaliada através da reutilização das esferas em ciclos repetidos de bioconversão. O processo de bioconversão foi conduzido nas condições operacionais padrão (pH 6,4; 39°C), utilizando-se 20g/L de biocatalisador imobilizado a partir de suspensão celular de 70g/L e solução de substratos contendo 0,70mol/L de lactose e 0,60mol/L de frutose. A cada 24 horas, as esferas foram separadas do meio reacional e colocadas em uma nova solução de substratos.

No intervalo entre as bateladas, as esferas de alginato de cálcio foram examinadas, com o fim de verificar-se eventual diminuição da rigidez, sendo aplicado, quando necessário, um tratamento com solução de CaCl_2 0,3mol/L.

3.9 Testes de difusividade

O teste de difusividade efetiva foi realizado com a adição de 500 esferas de alginato de cálcio, preparadas com diferentes concentrações de células de *Z. mobilis* (30, 50 e 70g/L), em um biorreator contendo 15mL de solução de glicose na concentração de 100g/L. O reator foi mantido sob agitação magnética e temperatura controlada em 39°C. A difusividade efetiva foi avaliada pela medida da concentração residual de glicose na solução em função do tempo, até atingir o equilíbrio (Tanaka *et al.*, 1984). Para esta avaliação, a concentração de glicose foi quantificada pelo método de DNS (Miller, 1959) e a constante de difusão (D_v) foi obtida conforme descrito por Paula *et al.*, (2010), utilizando a equação 4:

$$D_v = \left(\frac{r\theta}{6}\right)^2 \times \pi \quad (\text{Eq.4})$$

Onde:

D_v , constante de difusão;

r , raio da esfera;

θ , inclinação da região linear do gráfico de $\ln (M_t/M_\infty)$ versus \sqrt{t} ;

M_t , massa de substrato no tempo t ;

M_∞ , massa de substrato no equilíbrio.

3.10 Separação e purificação dos produtos de bioconversão

Para a separação dos produtos da mistura reacional de bioconversão foram realizadas sucessivas precipitações do lactobionato de sódio utilizando etanol (Murakami *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2007). À solução resultante do processo de bioconversão – contendo lactobionato de sódio, sorbitol e concentrações residuais de frutose e lactose – foi adicionado etanol com concentração de 90 a 96% (m/v) até uma concentração final de solvente na solução de 75% (m/v), sob agitação magnética. Posteriormente, acondicionaram-se as soluções em temperaturas inferiores a 0°C por no mínimo 12 horas. Após esse período, a mistura foi então centrifugada e os cristais ressolubilizados em água destilada, usando-se um volume de água de 42% do volume inicial de solução de bioconversão. Para a obtenção de elevado grau de pureza de lactobionato de sódio, os procedimentos de precipitação e ressolubilização foram repetidos até a totalização de três precipitações. O sobrenadante, resultado das etapas de precipitação, foi destilado para a recuperação do solvente (Silveira *et al.*, 2007).

3.11 Conversão de lactobionato de sódio em ácido lactobiônico

Para a conversão de lactobionato de sódio à sua forma ácida – ácido lactobiônico - foi utilizado o método de cromatografia por troca iônica, conforme proposto por Jones & Ho (2001), com algumas modificações. Primeiramente, a resina catiônica ácido forte Amberlite IRA-120 (Vetec Química Fina) foi mantida por aproximadamente 24 horas em água destilada. Posteriormente, cerca de 90mL de resina foram introduzidos na coluna, sendo feitas duas lavagens com água destilada. Para a ativação da resina, 100mL de HCl 1,0mol/L foram introduzidos na coluna e mantidos sob circulação, com auxílio de uma bomba peristáltica, por 20 minutos. A resina foi então lavada com água destilada, com o intuito de retirar o excesso de HCl, até ser atingido pH aproximado de 4,7. A amostra contendo solução de lactobionato de sódio foi introduzida na coluna e a coleta realizada após a queda do pH a 2,80. Ao final do processo, adicionou-se, água destilada para auxiliar na remoção do ácido lactobiônico que poderia ter sido retido na resina, sendo a coleta cessada quando observado o aumento do pH até 3,4. A solução de ácido lactobiônico obtida foi, então, liofilizada.

3.12 Cristalização do ácido lactobiônico

A cristalização do ácido lactobiônico foi realizada em liofilizador L101 (Liotop) operado com pressão de vácuo abaixo de 500mmHg e temperatura de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h. Ao final dessa etapa a massa de produto foi macerada, com auxílio de um almofariz e pistilo, e armazenada em dessecador para posteriormente ser utilizada nos testes de caracterização físico-química.

3.13 Avaliação das características físico-químicas do ácido lactobiônico e lactobionato de sódio

Os testes de caracterização físico-química foram realizados com as amostras obtidas por via biotecnológica - lactobionato de sódio e ácido lactobiônico liofilizado – em comparação com o ácido lactobiônico comercial Sigma-Aldrich (L2398), pureza não informada pelo fabricante.

Foram realizados testes de pureza, determinação do pH, do ponto de fusão, do desvio óptico, da quantidade de água e de açúcares redutores da amostra, de acordo com o preconizado na European Pharmacopeia (2008).

3.14 Métodos analíticos

3.14.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular nos frascos de produção de inóculo foi estimada, em triplicata, por densidade óptica. A 1mL da amostra em análise foi adicionado 0,2mL de HCl 2,0mol/L para a solubilização do carbonato de cálcio presente no meio para o controle do pH. Em seguida, a amostra foi diluída e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) a 560nm.

Para os cultivos em biorreator, a quantificação celular foi realizada, em duplicata, por gravimetria. Amostras de 3mL do meio de fermentação foram centrifugadas a 5836g por 10 minutos (Sigma, modelo 4-15), sendo o sobrenadante descartado e a massa obtida lavada duas vezes com água destilada. A massa de células centrifugada foi ressuspensa em um volume conveniente de água, sendo a suspensão, então, transferida para cadinhos de porcelana postos em estufa a 90-95°C por 24h. Os

cadinhos foram mantidos em dessecador, à temperatura ambiente por 30 minutos, para resfriamento e a massa celular foi determinada em balança analítica. A concentração celular foi calculada pela divisão da massa seca de células pelo volume de meio em fermentação utilizado para análise.

3.14.2 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram medidos durante o cultivo de *Z. mobilis*, nos testes difusionais e também estimados para amostras de lactobionato de sódio e ácido lactobiônico.

No cultivo de *Z. mobilis* uma alíquota de amostra, de aproximadamente 2mL, foi centrifugada a 5836g por 10 minutos e o sobrenadante, diluído conforme necessário, e então utilizado para a dosagem de açúcares redutores.

No teste de difusividade, 0,1mL de amostra foi retirado do meio reacional. Posteriormente, a amostra foi diluída e quantificada por dosagem de açúcares redutores.

Para as amostras de lactobionato de sódio e ácido lactobiônico, primeiramente preparou-se uma solução contendo 1% (m/v) dessas substâncias e, posteriormente, realizada a dosagem de açúcares redutores.

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitro-salicílico – DNS (Miller, 1959). Para esta análise, a 0,25mL de amostra previamente diluída foi adicionado 0,75mL de DNS. As amostras foram mantidas em banho a 100°C por 5 minutos, sendo posteriormente colocadas em banho de gelo por 2 minutos. Ao final desta etapa, foram adicionados 4mL de água destilada e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210), a 545nm, e convertidas para g/L empregando a curva padrão de glicose entre 0,1 - 1,0g/L.

3.14.3 Determinação de frutose

A quantificação de frutose foi realizada conforme descrito por Khan *et al.* (2006), com modificações. Para o preparo do reagente de Seliwanoff, 0,05% (m/v) de resorcinol foi diluído em HCl 4,0mol/L (Assumpção & Morita, 1968). Para a realização da análise, a 0,2mL de amostra previamente diluída foi adicionado 1,8mL de reagente de Seliwanoff e a mistura foi mantida em banho a 100°C por 15 minutos, sendo, posteriormente, colocada em banho de gelo por 2 minutos. Ao final desta etapa, foram adicionados à reação 3mL de água destilada, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) a 486nm e convertidas para g/L empregando a curva padrão de frutose entre 0,1 - 1,0g/L.

3.14.4 Determinação de sorbitol

A determinação de sorbitol na etapa de caracterização físico-química dos produtos de bioconversão recuperados foi realizada pelo método proposta por Venzon & Miron (2008). Para esta análise, a 0,2mL da amostra previamente diluída foram adicionados 1mL de formato de potássio 0,7mol/L e 2,0mL de periodato de potássio 3,5mM. Após 1 minuto, adicionou-se 1,5mL do Reagente I. O reagente I foi preparado pela mistura de 7g de acetato de amônio dissolvido em 20 mL de água destilada e 0,160 g de tiosulfato de sódio dissolvido em 10mL de água. À mistura, foi acrescentado 0,5 mL de acetilacetona, sendo o volume da solução completado para 50mL com água destilada.

Os tubos foram mantidos a 100°C por 2 minutos e, em seguida, colocados em banho de gelo por 2 minutos. As absorbâncias das amostras foram lidas em

espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210), a 412nm, e convertidas para mg/mL empregando a curva padrão de sorbitol entre 0,010 – 0,018mg/mL.

3.14.5 Estimativa da concentração de substratos e produtos em ensaios de bioconversão

A concentração de ácido lactobiônico formado nos ensaios foi calculada de acordo com o volume e a concentração de base utilizada durante a reação para o controle do pH.

Uma vez que ácido lactobiônico e sorbitol são formados em base equimolar, sendo estes os únicos produtos da reação, os substratos lactose e frutose são consumidos na mesma proporção. Sendo assim, as concentrações de sorbitol e dos substratos foram estimadas indiretamente em função do volume e da concentração da solução de NaOH utilizada para titular o ácido formado na reação.

A equação 5 foi empregada para determinar a quantidade de produtos na reação:

$$C_{\text{produto.formado}} = \frac{(V_{\text{base}} \times M \times PM)}{(V_{\text{total}} + V_{\text{base}})} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

$C_{\text{produto.formado}}$, concentração de produto formado (g/L);

V_{base} , volume de base (mL);

M , concentração de base (mol/L);

PM , massa molar do produto (para ácido lactobiônico - 358,3g/mol e para sorbitol 182,17g/mol);

V_{total} , volume total da bioconversão (200mL).

A equação 6 foi utilizada para determinar a quantidade de substratos consumido durante o processo de bioconversão:

$$C_{\text{substrato,cons.}} = C_{\text{substrato,0}} - \left[\frac{(V_{\text{base}} \times M \times PM_{\text{substrato}})}{(V_{\text{total}} + V_{\text{base}})} \right] \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo:

$C_{\text{substrato,cons.}}$, concentração de substrato consumido (g/L);

$C_{\text{substrato,0}}$, concentração de substrato inicial (g/L);

V_{base} , volume de base (mL);

M , concentração de base (mol/L);

$PM_{\text{substrato}}$, massa molar do substrato (para lactose - 360g/mol e para frutose - 180g/mol);

V_{total} , volume total da bioconversão (200mL).

Cabe salientar que estes procedimentos de quantificação de substratos e produtos também foram empregados por outros autores. Severo Junior (2008) e Pedruzzi *et al.* (2011) determinaram a concentração de produtos e substratos obtidos em processo de bioconversão com células permeabilizadas de *Z. mobilis* por cromatografia líquida (HPLC) e pelo método em que se baseia no volume e na concentração da base adicionada para controlar o pH reacional. Segundo esses autores, as medidas realizadas por ambos os métodos mostraram-se equivalentes. Através das análises cromatográficas, apenas sorbitol e ácido lactobiônico foram observados como produtos da reação.

3.14.6 Determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidoredutase e glicono- δ -lactonase

Para a determinação da atividade de GFOR/GL, foi utilizada a técnica que estima a atividade enzimática conjunta em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, conforme proposto por Malvessi *et al.* (2006b), com algumas modificações.

Os testes foram realizados em reator de 300 mL, com 100 mL de meio reacional, em banho termostaticado a 39°C, mantido sob agitação magnética, por 40 minutos. O pH foi automaticamente controlado em 6,4 pela adição de solução de NaOH contida em pipeta de 2 mL, utilizando pHstato. A concentração da solução de NaOH empregada foi dependente da velocidade reacional sendo utilizados valores entre 0,25 a 1,0 mol/L.

Nesses ensaios foi utilizada solução de lactose/frutose ou de glicose/frutose como substratos. Primeiramente determinou-se o volume de suspensão de celular, conforme concentração necessária (item 3.6), posteriormente, juntou-se a solução aquosa dos carboidratos nas concentrações desejadas. A concentração de ácido orgânico formado foi calculado a partir da variação do volume de álcali gasto no controle do pH em função do tempo.

Uma unidade enzimática de GFOR/GL (U) é definida como quantidade de enzima capaz de formar 1mmol de ácido orgânico, por hora, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células em base seca (U/g).

3.14.7 Determinações físico-químicas para o lactobionato de sódio e o ácido lactobiônico

3.14.7.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em amostra solubilizada em água MilliQ (1% m/v), a 25°C, em pHmetro (Consort, modeloR735), previamente calibrado com soluções pH 4,0 e 7,0. O resultado correspondeu à média de três determinações.

3.14.7.2 Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão de uma substância é a temperatura na qual a amostra encontra-se completamente fundida (European Pharmacopeia, 2008). A determinação do ponto de fusão foi realizada utilizando um medidor de ponto de fusão (PF1500 Gehaka), no qual uma pequena alíquota de pó foi introduzida nos capilares que foram colocados no orifício da câmara. A temperatura da câmara foi elevada à velocidade de 1°C / minuto, até a fusão completa do material.

3.14.7.3 Determinação do poder rotatório específico

A determinação do poder óptico serve para estabelecer tanto a identidade quanto a pureza de uma substância (European Pharmacopeia, 2008). A determinação do poder rotatório específico foi realizado com as amostras obtidas por via biotecnológica - lactobionato de sódio e ácido lactobiônico liofilizado - em comparação com o ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich). Para esta determinação, primeiramente dissolveu-se 5,0g da amostra em 50mL de água MilliQ. Após 24 horas, o desvio óptico foi medido, à temperatura de 20°C, utilizando polarímetro Polax 2L (Atago). Os

resultados foram obtidos com amostras em triplicata, usando a fórmula de rotação específica (Eq. 7), conforme descrito pela European Pharmacopeia (2008).

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{C \times c} \quad (\text{Eq. 7})$$

Sendo:

$[\alpha]_D^{20}$, poder rotatório específico;

α , ângulo de rotação;

C, concentração da substância (g/mL);

c, comprimento da cela do polarímetro (1dm).

3.14.7.4 Determinação da quantidade de água

A quantidade de água presente nas amostras obtidas por via biotecnológica - lactobionato de sódio e ácido lactobiônico liofilizado – em comparação com o ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich), foi determinada em balança de dessecação (Mettler Toledo HB43 Halogen Moisture Analyzer). A análise foi realizada com a disposição de 1,0g da substância na balança, à temperatura de 100°C, mantida até peso constante.

3.14.7.5 Determinação da pureza

A quantificação do lactobionato de sódio após a etapa de precipitação fracionada foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), conforme o método descrito por Pedruzzi *et al.* (2007).

Após a etapa de conversão do lactobionato de sódio em sua forma ácida em coluna de troca iônica, o ácido lactobiônico foi quantificado por HPLC (Pedruzzi *et al.*,

2007) e por titulação, conforme descrito pela European Pharmacopeia (2008). A titulação foi realizada adicionando uma alíquota de amostra à 30mL de água destilada e, posteriormente, titulada com hidróxido de sódio 0,1mol/L. Cada mL de hidróxido de sódio gasto seria equivalente a 35,83mg de ácido lactobiônico.

As análises em HPLC (Agilent Technology modelo 9100) foram realizadas utilizando a coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, 9 µm), fase móvel H₂SO₄ 0,50 mM, previamente filtrada (filtro de poliamida, 0,2µm). A análise consistiu no carregamento da amostra no volume do *loop* de injeção (20µL) e sua eluição a 0,6mL/min, a 60°C. O cromatograma gerado foi quantificado através da curva de calibração obtida por solução de referência com concentração máxima de 10g/L.

A pureza foi determinada pela quantidade de lactobionato de sódio ou ácido lactobiônico contido em 1g de amostra.

3.15 Parâmetros de avaliação do processo de bioconversão

3.15.1 Rendimento em produto

O rendimento em termos de formação de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão foi determinado da seguinte forma:

$$\rho = \frac{M_{ac.formado} \times 100}{M_{ac.esperado}} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:

ρ , rendimento (%);

$M_{ac.formado}$, massa de ácido lactobiônico formado (g);

$M_{ac.esperado}$, massa de ácido lactobiônico esperado para 100% de conversão (50,16g).

3.15.2 Produtividade volumétrica, produtividade mássica e produtividade específica

A produtividade volumétrica foi determinada, nos ensaios de bioconversão foi calculada através da Eq. 9.

$$p = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde:

p , produtividade volumétrica (g/L/h);

P_0 , concentração inicial de produto (g/L);

P_f , concentração final de produto (g/L);

t , tempo de processo (h).

A produtividade mássica, determinada nos ensaios de bioconversão, foi calculada da seguinte maneira:

$$p_m = \frac{M_{ac.formado} - M_{ac.inicial}}{t} \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde:

p_m , produtividade mássica;

$M_{ac.formado}$, massa de ácido lactobiônico formado;

$M_{ac.inicial}$, massa de ácido lactobiônico inicial;

t , tempo de processo.

Para o cálculo de produtividade específica (q), determinada em ensaios de bioconversão, a produtividade mássica, foi dividida pela respectiva massa celular em

gramas. Os valores de “q” foram expressos em g de produto por gramas de células secas por hora (g/g/h).

3.15.3 Velocidade específica de formação de ácido lactobiônico

A velocidade específica de formação de produto (μ_p) foi determinada apenas nos ensaios de bioconversão (equação 11).

$$\mu_p = \frac{1}{M_x} \times \frac{dM_p}{dt} \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde:

μ_p , velocidade específica de formação de produto (g/g/h);

M_x , massa de células (g);

dM_p/dt , derivada do produto em função do tempo (g/h).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção de biomassa e do complexo enzimático GFOR/GL, o cultivo descontínuo de *Z. mobilis* foi realizado em biorreator de mistura completa, em meio contendo glicose e nutrientes. A produção de biomassa/enzimas foi realizada sem alterações na formulação de meio e nos parâmetros operacionais do cultivo de *Z. mobilis*. Desta forma, os perfis cinéticos de crescimento, de consumo de substrato e de produção de enzimas nos cultivos em regime descontínuo, periodicamente realizados com este fim, foram semelhantes (ANEXO). Ao final da fermentação as células foram centrifugadas, permeabilizadas e, quando necessário, imobilizadas, sendo utilizadas nos ensaios enzimáticos e de bioconversão.

4.1 Cinética de glicose-frutose oxidoredutase e glicono- δ -lactonase para diferentes carboidratos

A cinética enzimática é uma ferramenta de estudo para avaliar-se como a velocidade reacional é influenciada pelas alterações nos parâmetros operacionais. Um dos principais fatores que afetam a velocidade reacional é a concentração de substrato presente no meio. Em uma reação enzimática na presença de excesso de substrato, verifica-se a existência de um período inicial, conhecido como período pré-estacionário, durante o qual a formação do complexo enzima-substrato aumenta até valores constantes de velocidade, alcançando o estado estacionário. O estado estacionário é uma aproximação, uma vez que a concentração de substrato vai diminuindo no decorrer da reação. No entanto, desde que a determinação da velocidade seja feita em um intervalo de tempo curto, em que a concentração de substrato não varie significativamente, pode-

se considerar que a formação do complexo enzima-substrato neste intervalo de tempo seja aproximadamente constante (Taipa & Gama, 2003). Para alcançar o estado estacionário, em uma condição em que a quantidade de substrato esteja em excesso, e assim, a enzima saturada, foi avaliado o efeito da concentração de células/enzimas permeabilizadas de *Z. mobilis* (entre 0,025 e 0,5g/L) sobre a atividade enzimática, utilizando-se solução padrão de lactose e frutose (0,70mol/L). Salienta-se que, devido à baixa solubilidade da lactose em água (European Pharmacopeia, 2008), a máxima concentração de lactose usada no meio reacional foi de 0,70mol/L (Figura 11).

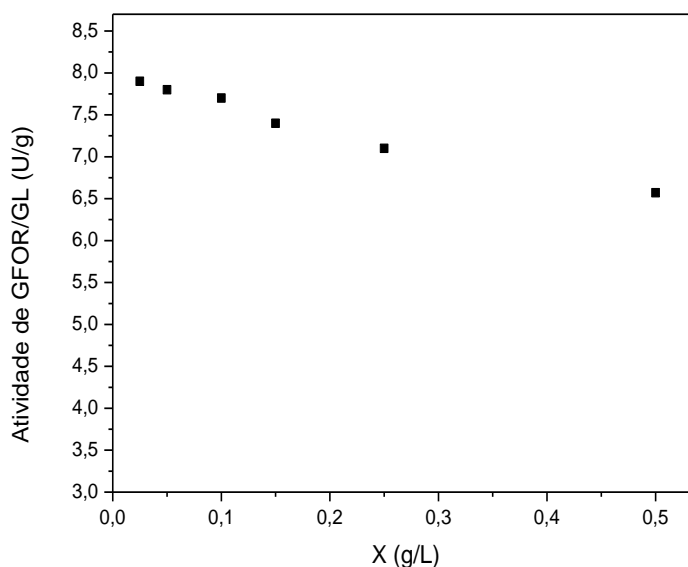


Figura 11: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL utilizando-se diferentes concentrações de células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. Solução equimolar de lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4.

Valores de atividade enzimática, em torno de 7,7 e 7,9U/g foram obtidos utilizando entre 0,025 e 0,1g/L de células permeabilizadas de *Z. mobilis*, sendo que nesta faixa de concentração o substrato encontra-se, provavelmente, em excesso em relação à concentração do biocatalisador (Figura 11). Com o aumento da concentração

celular de 0,15g/L para 0,5g/L, pode-se observar o queda proporcional da atividade específica de GFOR/GL, demonstrando que, possivelmente, não houve saturação da enzima nesta faixa de concentração de biocatalisador, havendo, portanto, sítios livres para acoplamento do substrato. Nos ensaios de atividade enzimática para a determinação de parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten ($V_{m\acute{a}x}$, K_M) foi utilizada a concentração de células/enzimas de 0,05g/L.

De acordo com Zachariou & Scopes (1986) e Hardman & Scopes (1988), a cinética de GFOR para o par glicose/frutose, em particular, segue a equação descrita por Michaelis-Menten. Neste modelo cinético, a velocidade reacional em função da concentração de substrato é representada por um segmento de uma hipérbole quando a concentração de um dos substratos é mantida constante e varia-se a concentração do outro substrato. Desta forma, os parâmetros cinéticos aparentes K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da equação de Michaelis-Menten (Eq. 1), cinética de mecanismo ping-pong, foram estimados através da inversão direta dos termos pela aplicação da equação de Lineaweaver-Burk (Eq. 12).

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_A}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[A]} + \frac{K_B}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[B]} \quad (\text{Eq. 12})$$

Nas reações enzimáticas utilizando como substratos glicose/frutose ou lactose/frutose, em que o substrato A (glicose ou lactose) estaria em excesso, o modelo seria representado de acordo com a Equação 12a. Por outro lado, em uma reação em que o substrato B (frutose) estaria em excesso, o modelo seria descrito de acordo com a equação 12b, quando utilizado glicose e frutose como substrato, ou de acordo com a equação 12c, em reações com lactose e frutose (Zachariou & Scopes, 1986; Hardman & Scopes, 1988).

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_F}{V_{\text{máx}}} \times \frac{1}{[F]} \quad (\text{Eq. 12a})$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_G}{V_{\text{máx}}} \times \frac{1}{[G]} \quad (\text{Eq. 12b})$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_L}{V_{\text{máx}}} \times \frac{1}{[L]} \quad (\text{Eq. 12c})$$

Sendo:

V, velocidade inicial;

$V_{\text{máx}}$, velocidade máxima;

K_F , constante de Michaelis para a frutose quando a glicose ou lactose se encontra em excesso;

K_G , constante de Michaelis para a glicose quando a frutose se encontra em excesso;

K_L , constante de Michaelis para lactose quando a frutose se encontra em excesso.

Como a glicose é considerada o substrato preferencial do complexo enzimático GFOR/GL, apresentando um valor de K_G relativamente baixo (Zachariou & Scopes, 1986; Hardman & Scopes, 1988; Carra *et al.*, 2007), primeiramente avaliou-se a cinética enzimática de GFOR/GL com o par glicose/frutose. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando a concentração de frutose constante em 0,7mol/L e diferentes concentrações de glicose (de 0,005 a 0,4mol/L) e, também, mantendo-se a concentração de glicose em 0,7mol/L empregando-se variadas concentrações de frutose (de 0,03 a 0,45mol/L). Os ensaios foram conduzidos em biorreator de mistura completa,

contendo 100mL de solução de substratos e 0,05g/L de células/enzimas permeabilizadas. Na Figura 12, são apresentados os dados experimentais obtidos nos ensaios e os respectivos ajustes previstos pela equação de Michaelis-Menten, obtidos com o auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0.

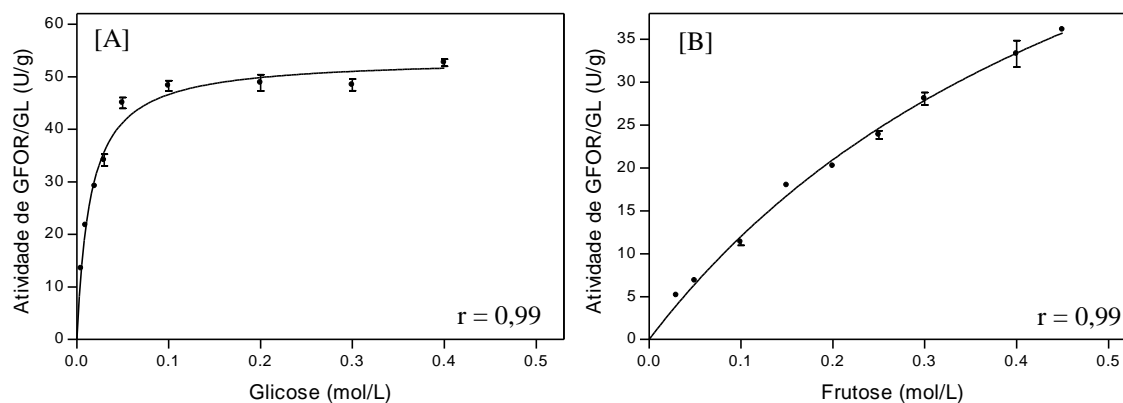


Figura 12: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, com diferentes concentrações de substratos, a 39°C e pH 6,4. [A] frutose (0,70mol/L) + glicose (0,005 a 0,4mol/L); [B] glicose 0,70mol/L + frutose (0,03 a 0,45mol/L).

(●) valores experimentais; (—) valores previstos pela equação de Michaelis-Menten.

Nos ensaios realizados com frutose 0,7mol/L, atividades crescentes foram alcançadas com o aumento da concentração de glicose até 0,1mol/L (Figura12A). Entre 0,1 e 0,4mol/L, resultados semelhantes foram obtidos: cerca de 48U/g. Quando utilizado 0,7mol/L de glicose em concentração constante, foi observado o incremento da atividade enzimática do complexo GFOR/GL com o aumento da concentração de frutose presente no meio reacional (Figura 12B).

Valores de coeficiente de correlação da ordem de 0,99 foram calculados para o ajuste dos pontos experimentais da equação de Michaelis-Menten. A partir dos dados obtidos (Figura 12), foram estimados os valores aparentes de K_F , K_G e $V_{m\acute{a}x}$ (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros cinéticos aparentes K_F , K_G e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* com glicose e frutose como substratos.

Parâmetros cinéticos	Valores estimados
$V_{m\acute{a}x}$ (U/g)	60
K_F (mol/L)	0,39
K_G (mol/L)	0,019

Em reações cinéticas de GFOR/GL com glicose e frutose, fica claro que a glicose é o substrato preferencial da enzima, sendo a frutose o substrato limitante da reação (Tabela 1). Os resultados estimados para K_F e K_G foram semelhantes ao relatado por Hardman & Scopes (1988), de 0,4 e 0,011mol/L, respectivamente, empregando GFOR purificada. Também com enzimas purificadas, Zachariou & Scopes (1986) relatam a obtenção de valores superiores para K_F e K_G , de 1,4 e 0,03mol/L respectivamente.

Em etapa posterior, os parâmetros cinéticos K_L , K_F e $V_{m\acute{a}x}$ da equação de Michaelis-Menten foram estimados para o par de substratos lactose e frutose, utilizados na reação enzimática em substituição à glicose e frutose. Na Figura 13, são apresentados os dados experimentais obtidos nos ensaios de atividade enzimática de GFOR/GL na presença de lactose e frutose no meio reacional e os respectivos ajustes previstos pela

equação de Michaelis-Menten, obtidos com o auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0. Na Figura 13A, os dados são relativos aos testes enzimáticos em que a concentração de frutose foi mantida em 0,7mol/L e as concentrações de lactose variadas de 0,15 a 0,35mol/L. Na Figura 13B, a concentração de lactose foi mantida constante em 0,7mol/L e as concentrações de frutose foram variadas de 0,05 a 0,4mol/L.

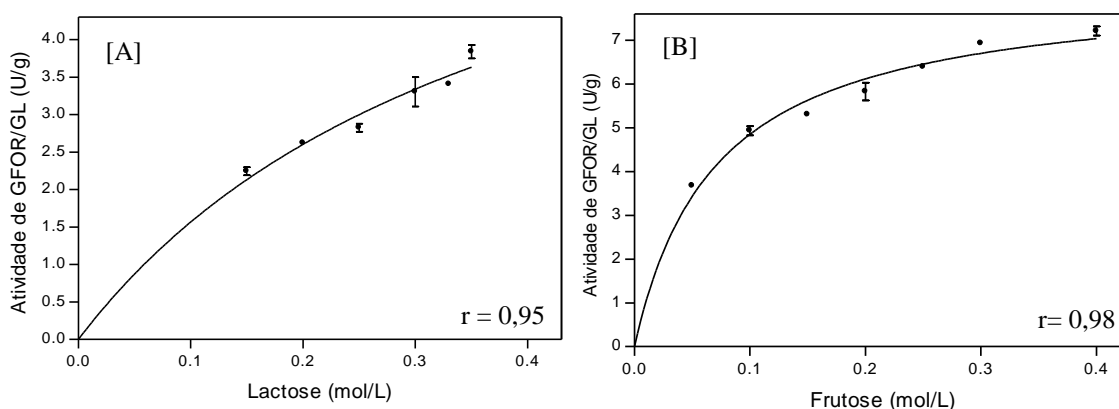


Figura 13: Variação de atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, com diferentes concentrações de substratos, a 39°C e pH 6,4. [A] frutose 0,70mol/L + lactose (0,15 a 0,35mol/L); [B] lactose 0,70mol/L + frutose (0,05 a 0,4mol/L).

(●) valores experimentais; (—) valores previstos pela equação de Michaelis-Menten.

Conforme observado na Figura 13, os valores dos coeficientes de correlação dos dados experimentais e os da equação descrita por Michaelis-Menten foram de 0,95 e 0,98, sugerindo que a velocidade reacional em função da concentração de substrato seria representada por uma hipérbole. Quando utilizado 0,7mol/L de frutose, atividades crescentes foram observadas com o aumento da concentração de lactose presente no meio (Figura 13A). Com o emprego de 0,7mol/L de lactose, um incremento na atividade enzimática foi observado até 0,3mol/L de frutose (Figura 13B) e em

concentrações superiores, valores semelhantes de atividade enzimática, em torno de 7,0U/g foram alcançadas (dados não mostrados).

A partir dos dados experimentais obtidos nos ensaios enzimáticos (Figura 13), foram estimados os valores das constantes cinéticas K_F , K_L e $V_{m\acute{a}x}$ para o par lactose e frutose (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros cinéticos aparentes K_F , K_L e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de *Zymomonas mobilis*, com lactose e frutose como substratos.

Parâmetros cinéticos	Valores estimados
$V_{m\acute{a}x}$ (U/g)	7,69
K_F (mol/L)	0,050
K_L (mol/L)	0,39

Quando utilizado lactose/frutose como substratos na avaliação cinética do complexo enzimático GFOR/GL, nas condições testadas foi observado que, em função dos resultados de K_L e K_F mostrados na Tabela 2, pode-se observar que a lactose é substrato limitante da reação. Valor de $V_{m\acute{a}x}$ de 7,69U/g e K_F de 0,050mol/L foram estimados, cerca de 7,8 vezes inferiores aos obtidos com o par glicose/frutose (Tabela 1). Esta queda nos valores destes parâmetros operacionais pode ter sido devido à menor afinidade da enzima GFOR para a lactose e/ou alterações conformacionais no sítio ativo da enzima, possivelmente causadas pela substituição de um monossacarídeo (glicose) por um dissacarídeo (lactose). De acordo com Zachariou & Scopes (1986), a enzima GFOR, que opera em um mecanismo do tipo ping-pong, possui um único sítio de ligação para os substratos (frutose e glicose). Desta forma, possíveis mudanças

conformacionais no sítio ativo da enzima acarretariam em mudança no acoplamento de ambos os substratos reacionais.

Para melhor avaliar o efeito da substituição da glicose por lactose na atividade enzimática de GFOR, a relação de $V_{m\acute{a}x}/K_M$ foi determinada. Na Tabela 3, estão apresentados os resultados compilados dos parâmetros cinéticos calculados para ambos os pares de substratos (lactose/frutose e glicose/frutose).

Tabela 3: Parâmetros cinéticos aparentes e a relação $V_{m\acute{a}x}/K_M$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* com os pares lactose/frutose e glicose/frutose como substratos.

Substratos	lactose/frutose	glicose/frutose
$V_{m\acute{a}x}$ (U/g)	7,69	60
K_F (mol/L)	0,050	0,39
K_L (mol/L)	0,39	--
K_G (mol/L)	--	0,019
$V_{m\acute{a}x}/K_F$ (U/g/mol.L ⁻¹)	154	154
$V_{m\acute{a}x}/K_L$ (U/g/mol.L ⁻¹)	20	--
$V_{m\acute{a}x}/K_G$ (U/g/mol.L ⁻¹)	--	3157

Como observado na Tabela 3, o valor de $V_{m\acute{a}x}/K_F$ para ambos os pares de substratos foi o mesmo, sugerindo que a eficiência catalítica da enzima no sentido da reação de frutose a sorbitol não teria sido afetada, o que indica, provavelmente, a não ocorrência de alterações conformacionais no sítio ativo da enzima. A relação $V_{m\acute{a}x}/K_G$ foi aproximadamente 150 vezes maior que a relação $V_{m\acute{a}x}/K_L$, demonstrando novamente a maior afinidade do complexo enzimático pelo substrato glicose.

Em estudo realizado por Satory *et al.* (1997), utilizando GFOR de *Z. mobilis* DSM473 purificada, valor de K_L de 1,2mol/L foi relatado, resultado superior ao encontrado neste estudo.

Com células permeabilizadas de *Z. mobilis* ATCC 29191, Pedruzzi *et al.* (2011) descreveram a cinética de GFOR/GL com lactose e frutose como substratos reacionais. Com o uso de frutose em concentração constante, a velocidade reacional apresentou comportamento sigmoidal em decorrência do aumento da concentração de lactose, diferenciando-se do comportamento hiperbólico esperado em uma cinética do tipo Michaelis-Menten. Segundo os autores, este comportamento é característico de enzimas do tipo regulatórias, sendo denominados como fenômenos de cooperatividade e/ou alostéricos. No presente trabalho, para a obtenção dos parâmetros cinéticos foi necessário, primeiramente, uma avaliação da relação enzima/substrato para que pudesse ser definida uma condição experimental em que a quantidade de substrato estivesse em excesso em relação à enzima (enzima saturada). Como demonstrado anteriormente, a saturação da enzima só foi obtida com a utilização de 0,7mol/L dos substratos e concentrações inferiores a 0,05g/L de células (Figura 11). No estudo realizado por Pedruzzi *et al.* (2011), foi utilizado 7,2g/L de células e concentrações crescentes de substratos até 0,7mol/L. Nestas condições, provavelmente a saturação da enzima não tenha sido atingida, sendo observado o comportamento sigmoidal, também explicado pela baixa afinidade do complexo enzimático GFOR/GL por lactose.

Apesar de a velocidade da reação ser mais baixa com a utilização de lactose como substrato reacional, devido à menor afinidade da enzima por este substrato, os ensaios apresentados a seguir foram realizados com o par lactose/frutose, dado o objetivo geral deste estudo.

4.2 Ensaio de bioconversão com células/enzimas permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*

Com o intuito de aumentar a velocidade reacional e assim diminuir o tempo de bioprocesso, foram avaliadas diferentes concentrações de biocatalisador (5, 10 e 20g/L) em processo de bioconversão utilizando lactose/frutose 0,70mol/L. Na Tabela 4, são mostrados os resultados gerais obtidos em cada condição. Salienta-se que as células/enzimas de *Z. mobilis* utilizadas em cada etapa de bioconversão foram provenientes de cultivos diferentes, que pode ter interferido, em algum nível, nos resultados encontrados.

Tabela 4: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão com diferentes concentrações de células livres de *Zymomonas mobilis* (lactose/frutose inicial, 0,70mol/L; 39°C; pH 6,4).

Células (g/L)	5,0	10,0	20,0
P_{\max} (g/L)	184	172	177
t (h)	96	48	24
ρ (%)	79	74	76
p (g/L/h)	1,9	3,6	7,4
q (g/g/h)	0,41	0,38	0,40
$\mu_{P,\max}$ (g/g/h)	1,95	1,71	1,91
S_f (mol/L)	0,12	0,17	0,15

P_{\max} , concentração máxima de ácido lactobiônico; t, tempo de processo; ρ , rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; $\mu_{P,\max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , lactose residual.

Na Figura 14 são apresentados os perfis cinéticos de formação de ácido lactobiônico em resposta às concentrações de células permeabilizadas de *Z. mobilis* utilizadas nos processos de bioconversão. Observa-se que, nos tempos estabelecidos para cada ensaio, concentrações de ácido lactobiônico semelhantes foram obtidas, com conversões em produto entre 74 e 79%. Por outro lado, o aumento da concentração celular (20g/L) resultou em redução do tempo de bioconversão, melhorando assim a produtividade (Tabela 4).

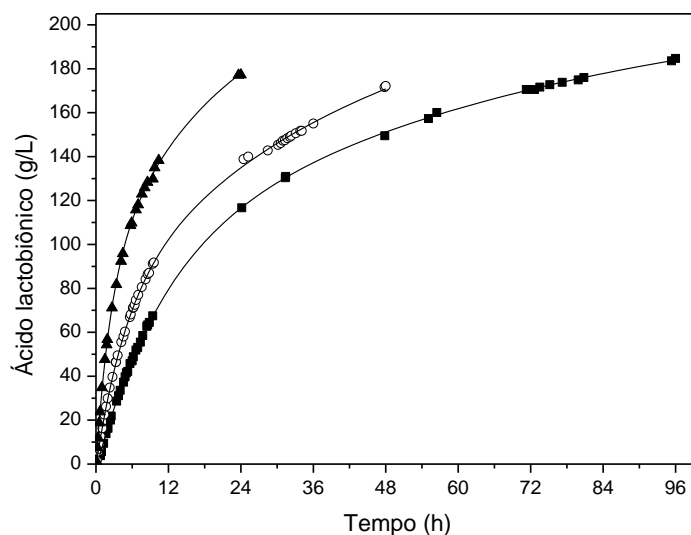


Figura 14: Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes concentrações de células livres de *Zymomonas mobilis* (Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4).

(■) 5g/L; (○) 10g/L; (▲) 20g/L.

Para verificar a influência do tempo relativo sobre a formação de ácido lactobiônico, calculado em relação ao tempo total de cada ensaio, a velocidade específica de formação de produto (μ_p) foi estimada nos ensaios com diferentes

concentrações de biocatalisador (Figura 15). Como pode ser observado, o perfil de variação da velocidade reacional em relação ao tempo relativo foi semelhante em todas as condições avaliadas, indicando que a queda de μ_p não foi devida ao tempo de exposição das células às condições operacionais. Observa-se ainda que os valores de produtividade específica, indicados anteriormente na Tabela 4, foram semelhantes em todas as condições avaliadas. Nidetzky *et al.* (1997) demonstraram que as células livres de *Z. mobilis* podem ser utilizadas por mais de 250 horas sem que ocorra a diminuição da atividade enzimática. Como as enzimas GFOR/GL estão presentes no periplasma de *Z. mobilis*, segundo estes autores, a célula microbiana fornece uma espécie de proteção às enzimas, aumentando assim a estabilidade do sistema.

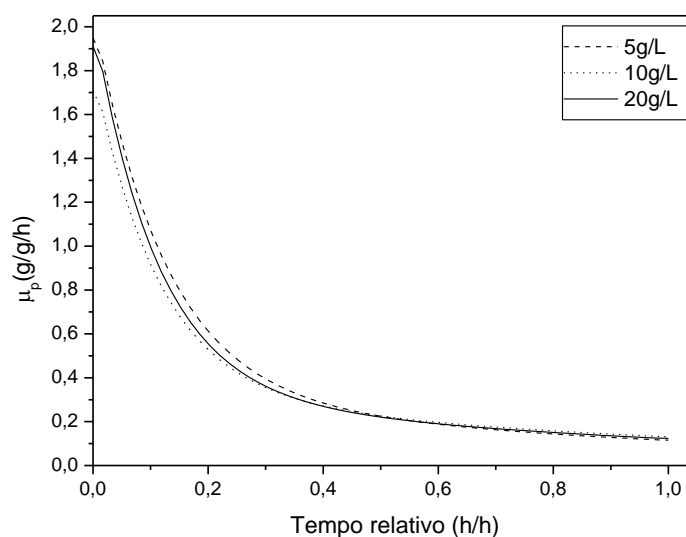


Figura 15: Velocidade específica de formação de produto (μ_p) em função do tempo relativo, em ensaios de bioconversão de ácido lactobiônico com diferentes concentrações de células/enzimas permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*.

(Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4).

Como a velocidade reacional do complexo GFOR/GL é influenciada pela concentração de substratos presente no meio reacional, foi então determinada a

velocidade específica de formação de produto (μ_p), em função da concentração de lactose ao longo do processo. A partir destes resultados, mostrados na Figura 16, fica claro que o perfil da velocidade está relacionado com a concentração de substrato disponível na reação, uma vez que, nas condições testadas, concentrações de lactose inferiores a 0,25mol/L (90g/L) levaram à redução do valor de μ_p . Este fato pode ser explicado pela baixa afinidade de GFOR pelo substrato lactose ($K_L = 0,39\text{mol/L}$), e pela já confirmada queda da velocidade reacional da reação quando a lactose está presente em baixas concentrações.

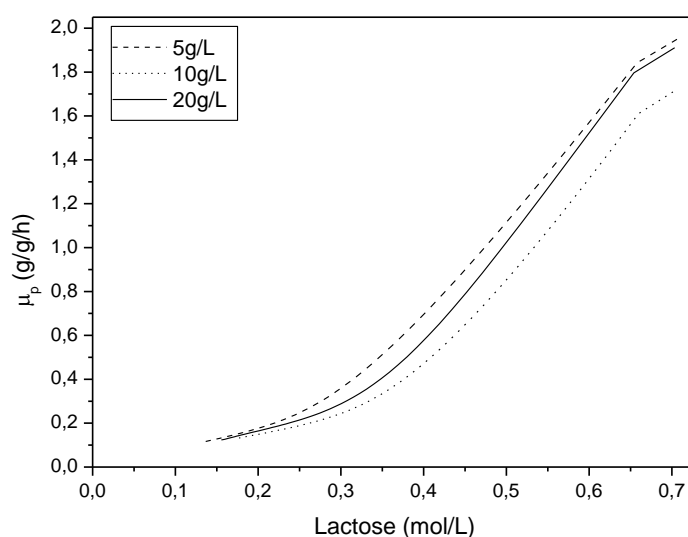


Figura 16: Velocidade específica de formação de produto (μ_p) em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão de ácido lactobiônico com diferentes concentrações de células/enzimas permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*. (Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4)

Utilizando-se 20g/L de células livres de *Z. mobilis* e 0,70mol/L de lactose, avaliou-se o efeito da concentração de frutose sobre a formação de ácido lactobiônico e sorbitol. Este estudo teve como objetivo diminuir a quantidade de substrato residual ao final no processo, facilitando, assim, a etapa de separação dos produtos e substratos. Na

Tabela 5, são apresentados os dados gerais obtidos referentes à produção de ácido lactobiônico e sorbitol em ensaios de bioconversão com o emprego de soluções contendo 0,70mol/L de lactose e diferentes concentrações de frutose (0,50 a 0,70mol/L) e na Figura 17, são ilustrados os respectivos perfis cinéticos de produção de ácido lactobiônico em função do tempo.

Tabela 5: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol nos ensaios de bioconversão utilizando 20g/L de células livres de *Zymomonas mobilis* (lactose inicial, 0,70mol/L; frutose inicial, 0,50 a 0,70 mol/L; 39°C; pH 6,4).

Frutose (mol/L)	0,50	0,55	0,60	0,70
P_{max.} (g/L)	154	156	170	175
P_{max. Sorb.} (g/L)	83	85	92	95
t (h)	24	24	24	24
ρ (%)	65	67	73	75
ρ_{Sorb.} (%)	91	85	84	75
p (g/L/h)	6,4	6,5	7,1	7,3
q (g/g/h)	0,34	0,35	0,38	0,39
μ_{P,max} (g/g/h)	1,85	1,78	2,0	2,0
S_{f Lac.} (mol/L)	0,24	0,23	0,19	0,17
S_{f Frut.} (mol/L)	0,04	0,07	0,09	0,17

P_{max.}, concentração máxima de ácido lactobiônico; P_{max.Sorb.}, concentração máxima de sorbitol; t, tempo de processo; ρ, rendimento em ácido lactobiônico; ρ_{Sorb.}, rendimento em sorbitol; p, produtividade; q, produtividade específica; μ_{P,max}, máxima velocidade específica de formação de produto; S_{f Lac.}, concentração residual de lactose; S_{f Frut.}, concentração residual de frutose.

Com relação à concentração final de sorbitol valores superiores foram obtidos com a utilização de 0,70mol/L de frutose, cerca de 95g/L (Tabela 5). Por outro lado, rendimento superior de conversão de frutose em sorbitol (91%) foi determinado quando utilizado 0,50mol/L de frutose inicial, sendo estimado cerca de 0,04mol/L de frutose residual ao final de 24 horas de processo. Neste caso, esta condição de bioconversão seria vantajosa levando-se em conta, especialmente, a separação e a purificação dos produtos do processo.

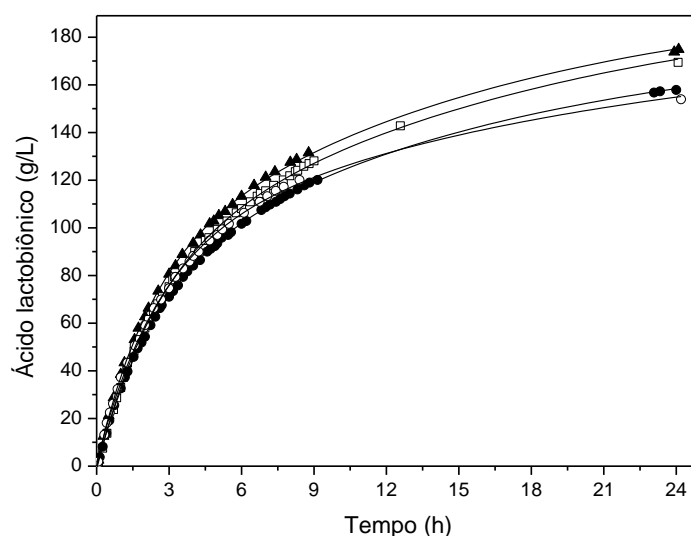


Figura 17: Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, com diferentes concentrações de frutose, utilizando 20g/L de células livres de *Zymomonas mobilis*. (Substrato inicial: lactose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4). Frutose: (▲) 0,70mol/L; (□) 0,60mol/L; (●) 0,55mol/L; (○) 0,50mol/L.

Pode-se observar que a bioprodução de ácido lactobiônico foi superior quando utilizadas concentrações elevadas de frutose no processo de bioconversão (Figura 17). Nos ensaios em que foram usadas as concentrações mais altas de frutose - 0,70 e 0,60mol/L - resultados semelhantes, em torno de 173g/L de ácido lactobiônico foram alcançados, atingindo cerca de 74% de rendimento e produtividade de 7,2g/L/h. Nestas condições, lactose residual em torno de 0,18mol/L foi estimada em 24 horas de processo. No entanto, quando utilizado 0,60mol/L de frutose, a concentração deste

substrato ao final do processo foi 50% inferior ao determinado na condição em que foi utilizado 0,70mol/L de frutose (Tabela 5). Conforme mostrado na Tabela 5, não foi observado efeito relevante com relação à máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico, uma vez que a reação é limitada pela concentração de lactose.

Pedruzzi *et al.* (2011) estudaram o efeito da concentração de substrato no processo de bioconversão com células permeabilizadas de *Z. mobilis*. Os ensaios foram realizados de duas formas distintas: utilizando 0,70mol/L de lactose e diferentes concentrações de frutose (0,35, 0,55 e 0,70mol/L) e, posteriormente com o emprego de 0,35mol/L de frutose e diferentes concentrações de lactose (0,40, 0,45, 0,55 e 0,70mol/L). Na representação gráfica de bioprodução de ácido lactobiônico em função do tempo de processo para o primeiro teste, foi relatada a sobreposição dos pontos experimentais nas primeiras 7 horas do processo, enquanto que, para o segundo teste, um incremento da velocidade reacional foi observado com o aumento da concentração de lactose. Segundo os autores, a presença da frutose não influenciou negativamente a velocidade inicial da reação, sendo essa dependente da concentração de lactose.

A partir dos resultados apresentados, de forma geral, maior eficiência de produção de ácido lactobiônico e sorbitol por *Z. mobilis* foi atingida com a utilização de 20g/L de células e concentrações de substratos de 0,7 e 0,6mol/L de lactose e frutose, respectivamente.

4.3 Bioprodução de ácido lactobiônico utilizando células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*

A bioprodução de ácido lactobiônico foi primeiramente avaliada quanto à concentração de células na etapa de imobilização, partindo de suspensões celulares contendo 30, 50 e 70g/L. Considerando as diferentes massas de sólidos presentes nas

esferas, o respectivo teor de água foi estimado em 93, 92 e 91% (m/m) para esferas contendo suspensões celulares de 30, 50 e 70g/L. Os ensaios preliminares de bioconversão foram realizados com a utilização de 5g/L de biocatalisador. Na Tabela 6, são resumidos os resultados de ensaios de bioconversão nas diferentes condições testadas, enquanto na Figura 18 são ilustrados os perfis cinéticos dos ensaios.

Tabela 6: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 30 a 70g/L, com 5g/L de biocatalisador em ensaios de bioconversão. (Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4).

Células na imobilização (g/L)	30	50	70
P_{max} (g/L)	172	166	148
t (h)	96	96	96
ρ (%)	73	71	63
p (g/L/h)	1,8	1,7	1,5
q (g/g/h)	0,38	0,37	0,33
μ_{P,max} (g/g/h)	1,0	0,77	0,78
S_f (mol/L)	0,17	0,19	0,24

P_{max}, concentração máxima de ácido lactobiônico; t, tempo de processo; ρ, rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; μ_{P,max}, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f, lactose residual.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6 e também na Figura 18, com o aumento da concentração de biocatalisador na etapa de imobilização, foi observada queda na bioprodução de ácido lactobiônico, afetando negativamente o

rendimento e a produtividade do processo. Estes resultados podem ser decorrentes da redução do fluxo de substratos e produtos através das esferas de alginato com as maiores massas de sólidos imobilizados, que, possivelmente, reduziriam a porosidade do suporte.

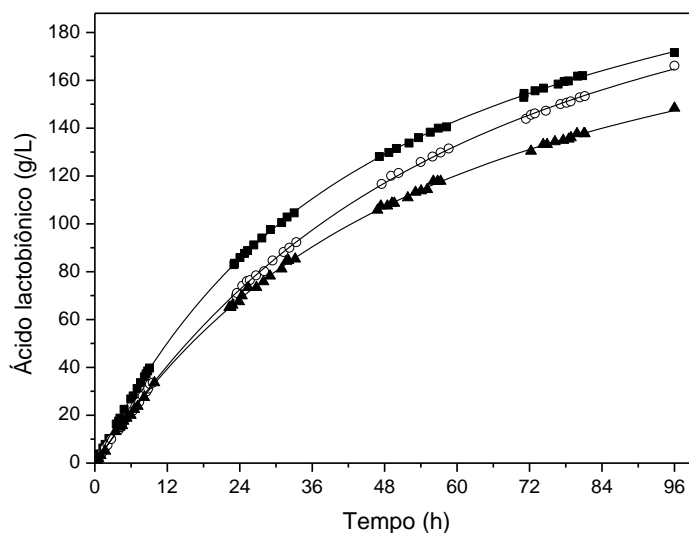


Figura 18: Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão com 5g/L de biocatalisador, utilizando diferentes concentrações de suspensão celular de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. (Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4). (■) 30g/L; (○) 50g/L; (▲)70g/L.

Para avaliar o transporte de massa através das esferas de alginato de cálcio, foi determinada a difusividade efetiva (D_v) para este sistema imobilizado, tendo glicose em meio aquoso como indicador. Nas condições testadas, o transporte de massa foi favorecido nas esferas que continham a menor quantidade de sólidos imobilizados (Figura 19). Os valores de D_v calculados foram de $1,0 \cdot 10^{-10}$, $0,89 \cdot 10^{-10}$, $0,36 \cdot 10^{-10}$ m^2/s , respectivamente, para as esferas contendo 30, 50 e 70g/L de suspensão celular de *Z. mobilis*.

Scott *et al.* (1989) avaliaram a difusividade efetiva com relação à concentração de microrganismos no interior do suporte de imobilização, no caso, κ -carragena. Os autores constataram que a concentração de microrganismos no interior das esferas é inversamente proporcional à difusão do soluto.

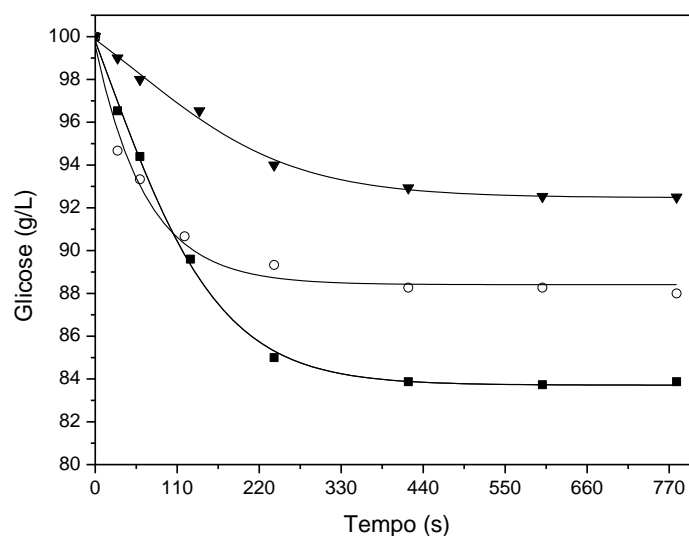


Figura 19: Variação da concentração de glicose em função do tempo em testes de difusividade de esferas de alginato de cálcio contendo células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em diferentes concentrações. (volume de solução 100g/L de glicose: 15mL; quantidade de esferas: 500, a 39°C). (■) 30g/L; (○) 50g/L; (▲)70g/L.

A barreira difusional representada pelo suporte de imobilização, além de dificultar o acesso do substrato à enzima, poderia ainda afetar negativamente a velocidade reacional devido ao acúmulo do produto próximo ao sítio ativo da enzima, levando a alterações de pH que desfavoreceriam a reação (Malvessi *et al.*, 2010).

A partir destes resultados, foi demonstrado que concentrações inferiores de suspensão celular imobilizada favorecem o transporte de massa pelas esferas de alginato de cálcio. Entretanto, nestas condições, o aumento da concentração de biocatalisador na reação poderia se dificultado, uma vez que o reator com agitação magnética usado neste

trabalho é eficiente apenas quando utilizada uma quantidade (massa) de esferas/enzimas que não comprometa os parâmetros operacionais como a agitação e o controle do pH.

Desta forma, foi avaliada a influência do aumento da concentração do biocatalisador no processo de bioconversão - até 30g/L - utilizando as esferas de alginato obtidas a partir de suspensões celulares de 30, 50 e 70g/L. Os resultados gerais destes ensaios estão apresentados na Tabela 7. Na Figura 20, são ilustrados os perfis cinéticos dos respectivos processos de bioconversão.

Concentrações finais de ácido lactobiônico semelhantes foram obtidas quando empregadas esferas contendo 30 e 50g/L de suspensão celular imobilizada e entre 5 a 20g/L de biocatalisador, cerca de 170g/L. Nestas condições, rendimento aproximado de 75% foi calculado, com cerca de 63g/L de lactose residual (Tabela 7). Pode-se observar que, com o aumento da concentração do biocatalisador, menor tempo de processo foi necessário para que cerca de 70% de rendimento fosse atingido, sendo, neste momento, interrompida a reação. Maior produtividade, cerca de 9,7g/L/h, foi obtida quando utilizado 30g/L de biocatalisador imobilizado a partir de 70g/L de suspensão celular de *Z. mobilis*. Por outro lado, valores semelhantes de produtividade específica foram estimados com células imobilizadas em 30 e 50g/L, de 0,38 e 0,35g/g/h, respectivamente, independentemente da concentração do biocatalisador usado na bioconversão (Tabela 7).

Salienta-se que, devido ao considerável volume ocupado pelas esferas contendo 30g/L de suspensão celular, a condução do processo no biorreator ficou limitada à utilização máxima de 10g/L de biocatalisador. Esta desvantagem poderia ser minimizada com o emprego de diferentes configurações de reatores tais como reatores de coluna com leito fixo ou leito fluidizado (Zanin & Moraes, 2004).

Tabela 7: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 30 a 70g/L e diferentes concentrações de biocatalisador na bioconversão (Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4).

Suspensão celular na imobilização (g/L)	30		50			70			
	5	10	5	10	20	5	10	20	30
P_{\max} (g/L)	172	175	166	173	168	148	168	156	156
t (h)	96	48	96	48	24	96	48	24	16
ρ (%)	73	75	71	74	72	63	72	66	66
p (g/L/h)	1,8	3,6	1,7	3,6	7,0	1,5	3,5	6,5	9,7
q (g/g/h)	0,38	0,39	0,37	0,39	0,37	0,33	0,37	0,35	0,34
$\mu_{P,\max}$ (g/g/h)	1,0	0,9	0,77	0,72	0,68	0,78	0,68	0,65	0,60
S_f (mol/L)	0,17	0,16	0,19	0,17	0,18	0,24	0,18	0,22	0,22

P_{\max} , concentração máxima de ácido lactobiônico; t, tempo de processo; ρ , rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; $\mu_{P,\max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , lactose residual.

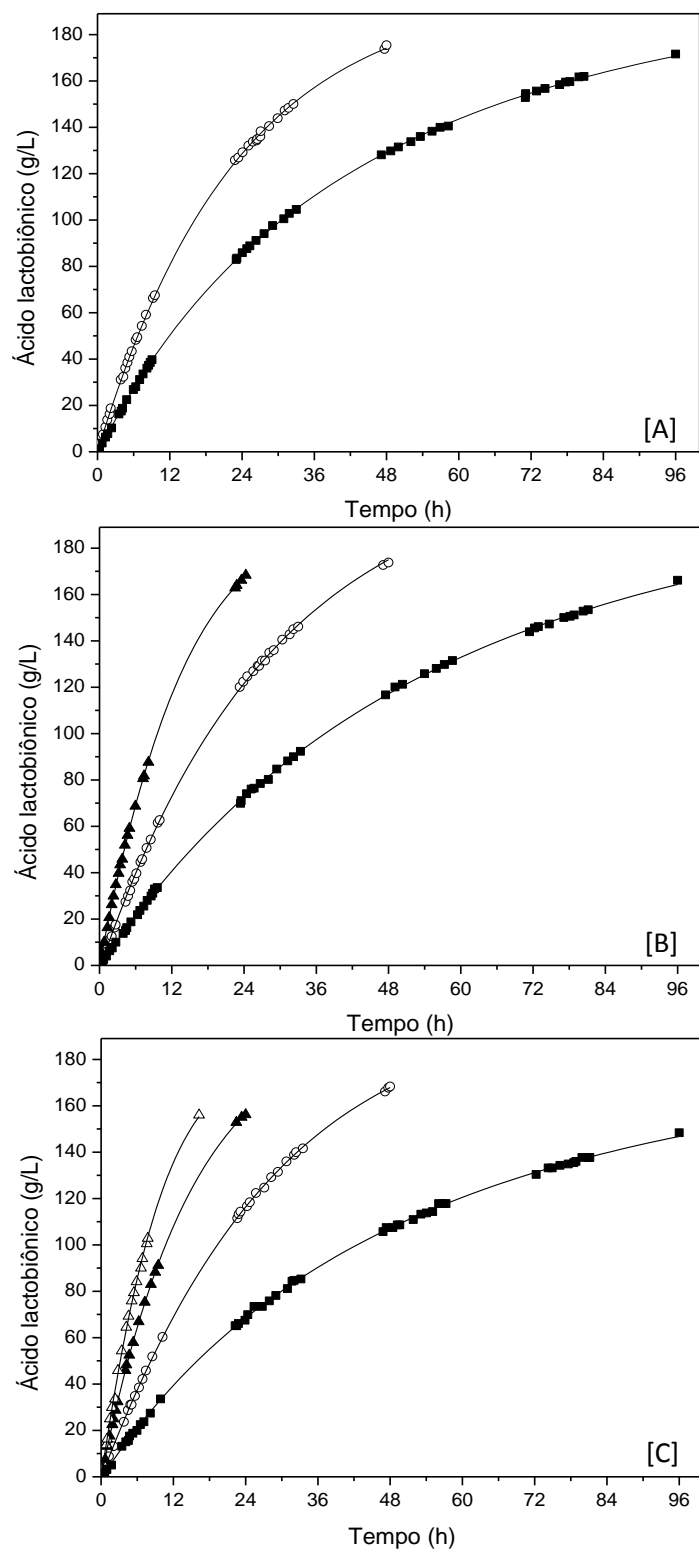


Figura 20: Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 30g/L [A], 50g/L [B] e 70g/L [C] e diferentes concentrações de biocatalisador. (Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4). (■) 5g/L; (O) 10g/L; (▲) 20g/L e (△) 30g/L.

Em geral, foi observado o aumento do tamanho das esferas ao final das bateladas de bioconversão. Como a quantidade de água presente no interior das esferas foi considerada no cálculo do volume reacional final (200mL), em geral, menor volume de água foi utilizado para a solubilização dos substratos a serem usados no bioprocessamento, salientando-se, novamente, a dificuldade relacionada a baixa solubilidade da lactose em água. Portanto, a utilização de concentrações superiores de suspensão celular (50 a 70g/L) no interior das esferas – no momento da imobilização - e, conseqüentemente, menores massas de esferas, proporcionaria um controle operacional do processo mais adequado. O emprego de concentrações elevadas do biocatalisador, em razão do grande volume ocupado pelas esferas de alginato de cálcio, levaria a dificuldades em relação à diminuição do volume disponível para a solubilização dos açúcares, homogeneidade da mistura e o controle do pH, parâmetro de grande importância na condução do processo em biorreator de mistura. Sendo assim, o sistema enzimático imobilizado com 70g/L de suspensão celular e 20g/L de biocatalisador na bioconversão foram definidos para a continuidade dos experimentos.

Adicionalmente, foram estudadas as condições de armazenamento das esferas de alginato de cálcio. Ao final da imobilização das enzimas, após o gotejamento da mistura de células/alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio, as esferas foram mantidas em água destilada ou em tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio pH 6,4, a 4°C, até a sua utilização. Para avaliar a manutenção da atividade enzimática em função do tempo de estocagem, foram empregadas esferas armazenadas a 4°C por 12 horas, 15 dias em água destilada, e também por 15 dias, a 4°C, em tampão fosfato. Os testes de bioconversão foram realizados com lactose/frutose 0,7mol/L. Na Tabela 8 são apresentados os resultados gerais destes ensaios, enquanto na Figura 22 são representados os perfis cinéticos dos respectivos processos de bioconversão.

Tabela 8: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão, relativos a diferentes condições de estocagem das esferas, utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 70g/L e 20g/L de biocatalisador nos ensaios (Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4).

Condições de armazenamento	12 h em água destilada	15 dias em água destilada	15 dias em solução tampão pH 6,4
P_{\max} (g/L)	170,5	156	177
t (h)	24,1	24	24
ρ (%)	73	66	76
p (g/L/h)	7,1	6,6	7,4
q (g/g/h)	0,38	0,35	0,39
$\mu_{P,\max}$ (g/g/h)	0,69	0,64	0,78
S_f (mol/L)	0,18	0,22	0,15

P_{\max} , concentração máxima de ácido lactobiônico; t, tempo de processo; ρ , rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; $\mu_{P,\max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , lactose residual.

Concentração de ácido lactobiônico cerca de 8% inferior foi obtida quando utilizadas as esferas mantidas em estoque por 15 dias em água destilada, cerca de 156g/L, em comparação com as armazenadas por 12 horas, 170g/L. Por outro lado, quando o sistema imobilizado foi armazenado em tampão pH 6,4, a 4°C, por 15 dias, concentração de produto de 177g/L foi obtida, sugerindo, portanto, a influência do pH

sobre a manutenção da atividade enzimática de GFOR/GL em função do tempo de estocagem (Figura 21 e Tabela 8).

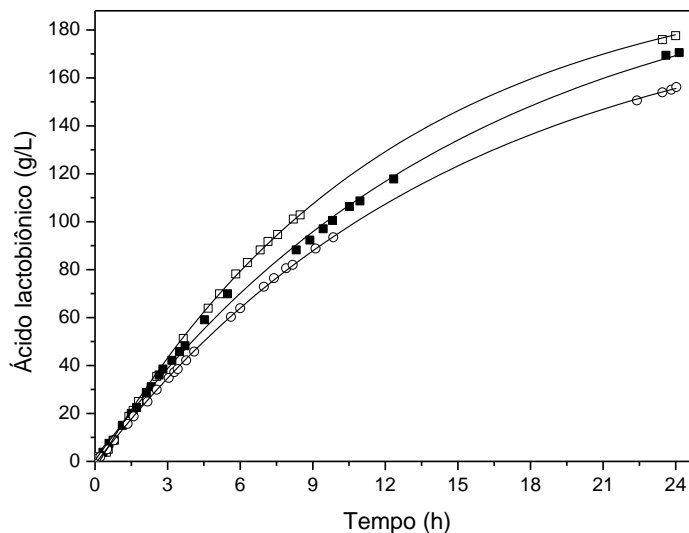


Figura 21: Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 70g/L e 20g/L de biocatalisador no processo, armazenadas em diferentes condições. (Substrato inicial: lactose/frutose 0,70mol/L, a 39°C, pH 6,4). (■) após 12 horas de armazenamento em água; (○) após 15 dias de armazenamento em água; (□) após 15 dias em tampão pH 6,4.

Os géis de alginato de cálcio são quimicamente instáveis na presença de alguns componentes como íons fosfato e citrato, o que pode levar à ruptura ou mesmo à dissolução do suporte de imobilização no meio (Covizzi *et al.*, 2007). Entretanto, mesmo após 15 dias de armazenamento das esferas de alginato de cálcio em tampão pH 6,4, tais efeitos não foram observados, mantendo-se íntegras nestas condições avaliadas. Ressalte-se que após os 15 dias de estocagem, a leitura de pH da solução tampão usada para o armazenamento das esferas foi de, aproximadamente, 6,4,

enquanto que na solução contendo as esferas armazenadas em água destilada, foi determinado o valor de pH de 5,2.

Na Figura 22, são apresentados os perfis de velocidade específica de formação de produto (μ_P) em função da concentração de lactose, nas diferentes condições de armazenamento do complexo imobilizado de *Z. mobilis*.

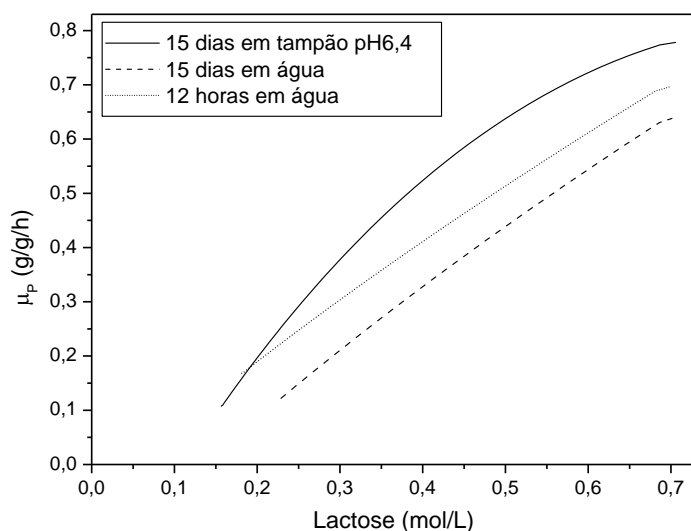


Figura 22: Velocidade específica de formação de produto (μ_P) em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão com 20g/L de biocatalisador, utilizando 70g/L de suspensão celular de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, armazenadas em diferentes condições. (Substrato inicial: lactose/frutose 0,7mol/L, a 39°C, pH 6,4).

A velocidade específica de formação de produto (μ_P) foi superior ao longo do processo nas esferas armazenadas em tampão pH 6,4 (Figura 22). Apesar disso, como descritos anteriormente na Tabela 8, valores semelhantes de rendimento, produtividade volumétrica e produtividade específica foram obtidos com biocatalisador armazenado em tampão por 15 dias e em água por 12h. Valores

inferiores de rendimento, produtividade volumétrica e produtividade específica foram observados quando mantidas as esferas em água por 15 dias. Estes resultados sugerem que a atividade do complexo enzimático GFOR/GL imobilizado pode ser mantida por períodos prolongados, desde que as enzimas não sejam expostas a condições adversas de pH, conforme relatado por Zanin & Moraes (2004) para sistemas enzimáticos em geral.

4.4 Bioprodução: reutilização do biocatalisador

A técnica de imobilização celular tem sido objeto de muitos estudos por permitir a reutilização do biocatalisador por sucessivas bateladas de bioconversão ou pela condução em regime contínuo.

Com o intuito de verificar a viabilidade da reutilização das células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio visando a produção de ácido lactobiônico, foram realizados sucessivos ciclos de bioconversão com duração média de 24 horas. Nestes ensaios, foram utilizados os parâmetros operacionais definidos anteriormente que levaram à obtenção de melhores resultados em termos de formação de produto: 20g/L de biocatalisador imobilizado a partir de suspensão celular de 70g/L e solução de substratos contendo 0,70mol/L de lactose e 0,60mol/L de frutose. A cada 24 horas, as esferas de alginato foram removidas do meio, tratadas com solução de cloreto de cálcio 0,3mol/L, quando necessário, e posteriormente, adicionadas em soluções preparadas com a mistura de ambos os substratos. Na Tabela 9 são mostrados os resultados gerais obtidos em cada batelada de bioconversão.

Tabela 9: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão, utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em suspensões de 70g/L, com 20g/L de biocatalisador, em sucessivas bateladas de 24 horas (Substrato inicial: 0,70mol/L de lactose e 0,60mol/L de frutose, a 39°C, pH 6,4).

Ciclos de bioconversão								
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
P_{max} (g/L)	168	155	167	150	142	161	135	148
t (h)	24	24	24	24	24	24	24,5	24
ρ (%)	72	66	71	66	60	68	59	63
p (g/L/h)	7,0	6,5	6,9	6,3	5,9	6,7	5,5	6,1
q (g/g/h)	0,38	0,34	0,37	0,35	0,31	0,36	0,30	0,33
S_f (mol/L)	0,20	0,24	0,20	0,22	0,28	0,22	0,27	0,26

P_{max}, concentração máxima de ácido lactobiônico; t, tempo de processo; ρ, rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; S_f, lactose residual.

Com o decorrer do processo de bioconversão, a perda da rigidez das esferas foi observada, sendo necessário, eventualmente, o tratamento com cloreto de cálcio 0,3mol/L por 5min. Neste tratamento, os íons Ca⁺ promoveriam a formação de ligações iônicas com o alginato, enrijecendo-as novamente. O tratamento foi realizado anterior à condução dos ciclos 2, 4, 5 e 7. Pode-se observar, em função dos resultados mostrados na Tabela 9, a queda da produção de ácido lactobiônico quando foi realizado o tratamento das células imobilizadas de *Z. mobilis*. Este fato pode ter sido devido a problemas de transferência de massa acarretados pela maior rigidez das esferas, efeito proporcionado pelo tratamento com cloreto de cálcio. Conforme

mostrado na Tabela 9, após o oitavo ciclo de bioconversão (193 horas de processo), observou-se a preservação de cerca de 85% da atividade enzimática inicial.

Tanaka *et al.* (1984) avaliaram o efeito da difusão de albumina em esferas preparadas com alginato de sódio 2 e 4% (m/v) em cloreto de cálcio 0,05 e 0,5mol/L. Os autores relatam que a difusão de albumina nas esferas foi pouco afetada pelo aumento da concentração de cloreto de cálcio, enquanto que considerável queda da difusão foi observada com o aumento da concentração do alginato.

Bertasso *et al.* (1996) estudaram a preservação da atividade de GFOR/GL contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando altas concentrações iniciais de substratos (glicose e frutose). Após 350 horas de ensaio, realizados em quatorze ciclos sucessivos com duração entre 24 e 31 horas, foi observada cerca de 21% de redução da atividade enzimática.

Rehr *et al.* (1991) avaliaram a estabilidade do complexo enzimático utilizando células permeabilizadas de *Z. mobilis* imobilizadas em κ -carragena, com posterior tratamento com glutaraldeído e polietilimina. Foi observada a redução de 3,5% da atividade enzimática após 75 dias de processo, sugerido, pelos autores, como resultado do efeito protetor da polietilimina.

4.5 Bioprodução: comparação de células/enzimas de *Zymomonas mobilis* livres e imobilizadas

Nesta etapa de experimentos, foi realizada a comparação do emprego de células de *Z. mobilis* livres ou imobilizadas na formação dos produtos. Na condução destes ensaios de bioconversão, a mesma concentração de biocatalisador (20g/L) foi utilizada, sendo que, no caso do sistema imobilizado, as esferas de alginato de cálcio foram preparadas a partir de suspensão celular de *Z. mobilis* com concentração de

70g/L. Salienta-se que as esferas empregadas nestes testes foram previamente armazenadas em solução tampão fosfato, como descrito no item 4.3.

Na Tabela 10 são mostrados os resultados comparativos destes ensaios e na Figura 23 são apresentados os respectivos perfis cinéticos de formação de produtos. Na comparação dos perfis cinéticos resultantes do bioprocesso com células livres ou imobilizadas, foram observadas diferenças em termos de velocidade reacional, embora a mesma concentração final de produto tenha sido obtida, cerca de 170g/L. Conseqüentemente, rendimentos e produtividades semelhantes foram estimados ao final de 24 horas de bioconversão. Estes resultados são de grande relevância em vista das vantagens da utilização do sistema enzimático de *Z. mobilis* imobilizado em alginato de cálcio.

Tabela 10: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão, utilizando células de *Zymomonas mobilis* livres ou imobilizadas em suspensões de 70g/L, com 20g/L de biocatalisador (Substrato inicial: 0,70mol/L lactose e 0,60mol/L de frutose, a 39°C, pH 6,4).

	Células livres	Células imobilizadas
P_{max} (g/L)	170	168
t (h)	24	24
ρ (%)	73	72
p (g/L/h)	7,1	7,0
q (g/g/h)	0,38	0,38
μ_{P,max} (g/g/h)	2,0	0,76
S_f (mol/L)	0,19	0,20

P_{max}, concentração máxima de ácido lactobiônico; t, tempo de processo; ρ, rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; μ_{P,max}, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f, lactose residual.

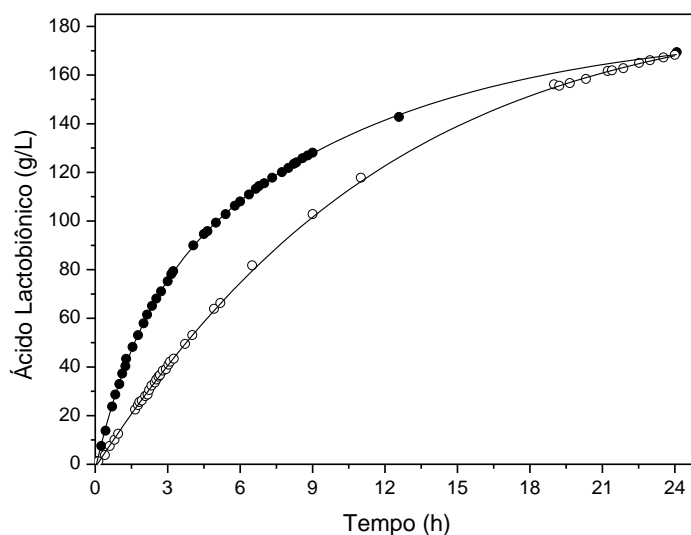


Figura 23: Ácido lactobiônico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão, com células de *Zymomonas mobilis* (●) livres e (○) imobilizadas em suspensões de 70g/L, com 20g/L de biocatalisador (Substrato inicial: 0,70mol/L de lactose e 0,60mol/L de frutose, a 39°C, pH 6,4).

A velocidade específica de formação de ácido lactobiônico (μ_p) em função do tempo foi avaliada utilizando células de *Z. mobilis* livres e imobilizadas (Figura 24).

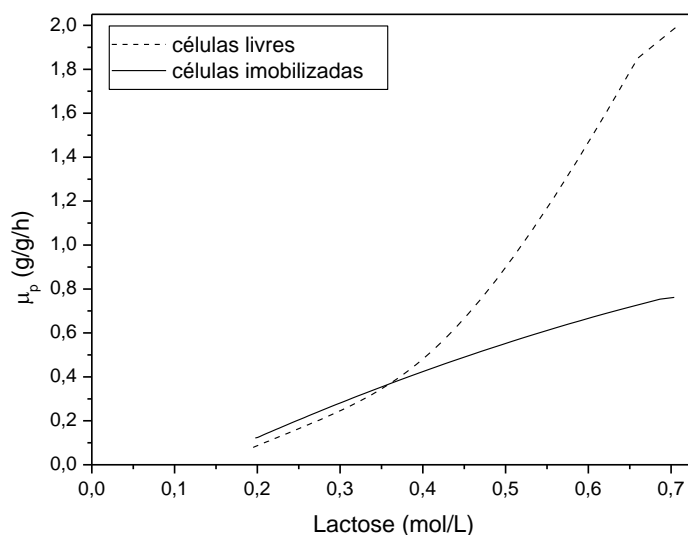


Figura 24: Velocidade específica de formação de produto (μ_p) em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão com 20g/L de biocatalisador, utilizando células de *Zymomonas mobilis* livres e imobilizadas em suspensão celular de 70g/L (Substrato inicial: frutose/lactose 0,7mol/L, a 39°C, pH 6,4).

Os valores de μ_p obtidos com emprego de células imobilizadas foram inicialmente mais baixos quando comparados aos obtidos com células livres, provavelmente em razão da barreira difusional imposta pelo suporte (Figura 24). Entretanto, a queda de μ_p foi menos acentuada quando comparado com o perfil obtido com a utilização de células livres, sugerindo a maior estabilidade do complexo imobilizado de GFOR/GL, demonstrada em função dos resultados finais praticamente idênticos atingidos.

Segundo Castro *et al.* (2008) utilizando enzimas purificadas, o processo de imobilização resulta invariavelmente em inativação parcial da enzima. Isso ocorre, segundo os autores, devido a alterações da estrutura tridimensional da proteína, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo. Em vista dos resultados aqui apresentados, sugere-se que a obtenção de produtividades semelhantes devem-se, dentre outros fatores, à dupla proteção do sistema enzimático, periplasmático e o envolvimento em uma matriz polimérica (suporte a base de alginato).

4.6 Recuperação e purificação do ácido lactobiônico obtido no processo de bioconversão

Uma vez que o ácido lactobiônico apresenta importantes aplicações comerciais e alto valor agregado, nesse estudo foi avaliada, preliminarmente, a recuperação do ácido lactobiônico.

No processo de bioprodução de ácido lactobiônico, o pH reacional deve ser rigorosamente controlado em valores em torno de 6,4. Como este controle foi realizado com a adição de solução de NaOH ao meio reacional, o produto foi formado na forma de sal de sódio. Caracteristicamente, ao final da bioconversão, concentrações

aproximadas de produtos - 160g/L lactobionato de sódio e 60g/L de sorbitol – e de substratos - 85g/L de lactose e 25g/L de frutose foram estimadas. Levando em conta a diferença de solubilidade dos compostos presentes ao final do processo de bioconversão, Silveira *et al.* (2007) demonstraram a possibilidade de recuperação do lactobionato de sódio por precipitação com etanol 75% (m/v) ou outros solventes orgânicos. De acordo com European Pharmacopeia (2008), a frutose é solúvel em etanol 96% (m/v) e a lactose e o sorbitol são praticamente insolúveis neste solvente.

A solubilidade de lactose, frutose, sorbitol e lactobionato de sódio em etanol 75% (m/v) foi avaliada qualitativamente através da adição parcelada do solvente a 1g de cada substância, à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Como mostrado na Tabela 11, a solubilidade em etanol nesta concentração, foi superior com frutose, sorbitol e lactose, nesta ordem. Conforme demonstrado, o lactobionato de sódio é praticamente insolúvel em etanol 75% (m/v), considerando-se o grande volume de etanol utilizado na tentativa de solubilizar a massa de 1 g de lactobionato de sódio.

Tabela 11: Solubilidade dos diferentes compostos presentes em meio reacional de bioconversão em etanol 75% (m/v).

	Volume aproximado de etanol (mL) por massa de soluto (g)	Solubilidade (conforme European Pharmacopeia, 2008)
Frutose	14	solúvel
Sorbitol	30	pouco solúvel
Lactose	4100	muito pouco solúvel
Lactobionato de sódio	>10000	praticamente insolúvel

Para a separação dos produtos da mistura reacional de bioconversão, foram realizadas sucessivas precipitações do lactobionato de sódio com etanol 75% (m/v). Ao final destas etapas, o precipitado foi seco por evaporação e o etanol presente na fase solúvel recuperado por destilação fracionada. Para avaliar o arraste de outras substâncias no precipitado, sorbitol, frutose e lactose foram quantificados, com a determinação de traços dessas substâncias.

Na Figura 25 é apresentado o perfil de separação cromatográfica do lactobionato de sódio recuperado e, como referência, o ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich).

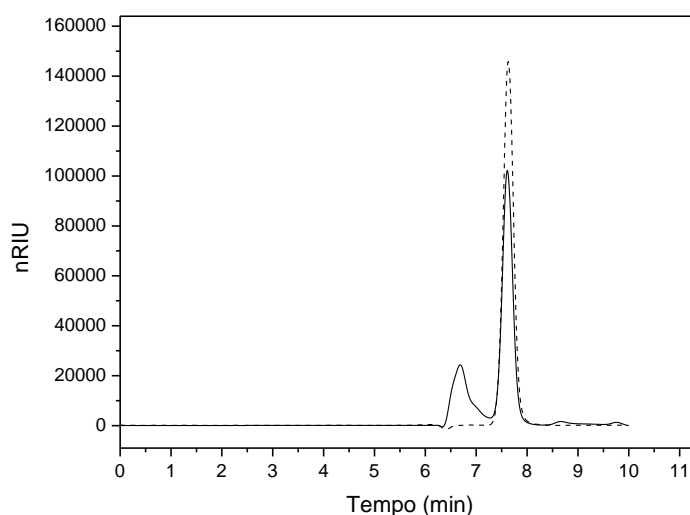


Figura 25: Perfil de separação cromatográfica (HPLC) de amostras de ácido lactobiônico. Coluna Aminex HPX87H (BioRad) fase móvel H_2SO_4 0,50mM, fluxo 0,6mL/min, 60°C. (—) 8g/L de ácido lactobiônico comercial; (-----) 8g/L de lactobionato de sódio recuperado por precipitação com etanol.

A principal diferença entre os cromatogramas apresentados na Figura 25 está relacionada à presença de um único pico da amostra do lactobionato de sódio

recuperado por precipitação com etanol, no tempo de retenção de aproximadamente 7,6 min. Na amostra comercial foram observados dois picos distintos, sendo o primeiro pico eluído em aproximadamente 6 min, representando a lactobionolactona, e o segundo pico, o ácido lactobiônico, corroborando com os dados relatados por Pedruzzi *et al.* (2007) e Pedruzzi (2010).

Os dados apresentados nessa etapa do processo ainda são preliminares, sendo que mais estudos deverão ser realizados para viabilizar a etapa de separação dos produtos e substratos da bioconversão e possível reutilização e aplicação dessas substâncias em outros processos.

Com o intuito de converter o lactobionato de sódio na sua forma ácida - ácido lactobiônico - visando, por exemplo, a potencial aplicação na formulação de cosméticos, foi utilizada a cromatografia por troca iônica.

O sistema utilizado para a conversão do lactobionato de sódio é mostrado na Figura 26. O sistema consistiu de uma coluna de vidro de capacidade aproximada de 100mL (1,6cm diâmetro x 50cm altura), tendo, na parte inferior, uma placa porosa para a retenção da resina, uma bomba peristáltica para regular a vazão do fluido, um pHmetro, utilizado inicialmente na indicação do pH da resina ativada, e posteriormente, no controle do pH do eluído, a fim de evitar-se a saturação da resina e o arraste do sódio retido na coluna, e, por fim, um sistema de coleta de amostra. O volume total do sistema foi de aproximadamente 138 mL. O sistema de coluna de troca iônica foi construído em circuito fechado, uma vez que, segundo Mendes (1999), a presença de ar reduz de forma drástica a transferência de massa e diminui a capacidade de troca iônica da coluna.

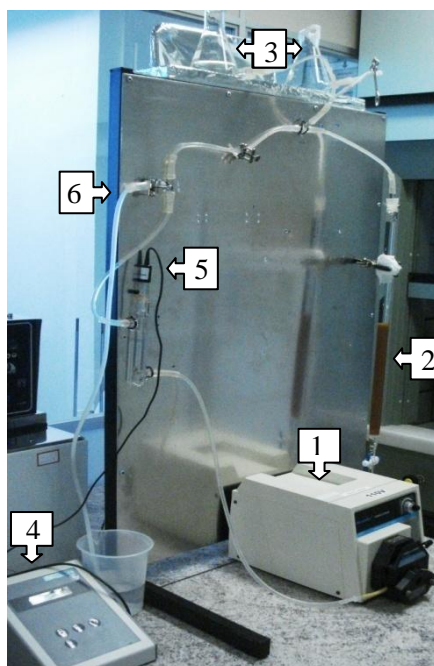


Figura 26: Sistema utilizado para cromatografia de troca iônica. (1) bomba peristáltica; (2) coluna de troca iônica; (3) entrada de amostra, água e ácido; (4) pHmetro; (5) eletrodo de pH; (6) sistema de coleta de amostras.

A metodologia usada para a conversão de lactobionato de sódio em sua forma ácida foi baseada na descrição de Jones & Ho (2001), com algumas modificações. Primeiramente, a resina catiônica ácido forte Amberlite IRA-120 (Vetec Química Fina) foi hidratada para facilitar a transferência dos íons. Posteriormente, foram introduzidos 90mL de resina na coluna de vidro. Para ativação da resina, foram adicionados 100mL de HCl 1mol/L como contra-íon desejado para conversão à forma pretendida, sendo esta solução mantida em circulação no sistema por 20 minutos até pH 1,0. Posteriormente, a fim de retirar-se o excesso de HCl do sistema, adicionou-se água até pH 4,7. A amostra contendo 20g de lactobionato de sódio foi introduzida no sistema e retirada apenas após a redução do pH para níveis aproximados de 2,8. Posteriormente, adicionou-se água destilada para evitar a retenção de componentes da

amostra na resina. A coleta foi suspensa após aumento do pH para 3,4, sendo então recuperados 320mL de solução de ácido lactobiônico.

Nas condições testadas, o pH da amostra eluída da coluna foi determinado em torno de 2,6, valor análogo ao pH do ácido lactobiônico comercial (Sigma). Este dado sugere que houve a conversão do sal de sódio para a forma ácida. Ao final do processo, a eficiência de recuperação foi de aproximadamente 80%, podendo ainda ser incrementada com o aprimoramento do método de recuperação do ácido lactobiônico.

Na Figura 27, é mostrado o perfil de separação do ácido lactobiônico obtido após o tratamento em coluna de troca iônica em comparação com o ácido lactobiônico comercial (Sigma).

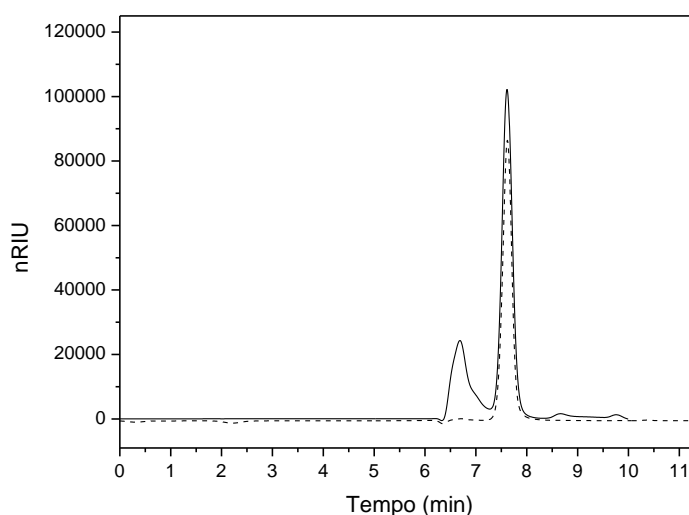


Figura 27: Perfil de separação cromatográfica (HPLC) de amostras de ácido lactobiônico. Coluna Aminex HPX87H (BioRad) fase móvel H_2SO_4 0,50mM, fluxo 0,6mL/min, 60°C. (—) ácido lactobiônico comercial; (.....) ácido lactobiônico obtido após tratamento em coluna de troca iônica.

Para a obtenção da matéria prima em sua forma sólida, a solução obtida após cromatografia de troca iônica, contendo aproximadamente 50g/L de ácido lactobiônico, foi cristalizada com o auxílio de liofilizador, sendo atingido uma eficiência na recuperação aproximada de 98%. No perfil cromatográfico apresentado na Figura 27, observa-se a eluição de um único pico, em tempo de retenção igual ao pico do ácido lactobiônico comercial, não sendo evidenciado o pico representativo da lactona. Estes resultados sugerem a viabilidade de obtenção do produto na sua forma ácida com o emprego de coluna de troca iônica.

4.7 Caracterização físico-química do ácido lactobiônico e do lactobionato de sódio

Para estabelecer os requisitos mínimos de qualidade dos produtos purificados obtidos, com vista às aplicações na área médica e cosmética, foram realizados testes físico-químicos preliminares com as amostras de lactobionato de sódio e ácido lactobiônico liofilizado em comparação com o ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich).

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados gerais obtidos nos testes físico-químicos. A pureza das amostras de ácido lactobiônico foi determinada pelo método de titulação (European Pharmacopeia, 2008) e por HPLC (Pedruzzi *et al.*, 2007). Resultados semelhantes, superiores a 99%, foram obtidos, indicando que a eficiência, simplicidade e baixo custo do método proposto pela European Pharmacopeia. Com relação ao ponto de fusão, valores semelhantes foram determinados para o ácido lactobiônico obtido por via biotecnológica e o ácido lactobiônico comercial, 125°C, corroborando o valor relatado na European Pharmacopeia (2008). Para o lactobionato de sódio, ponto de fusão de 172°C foi determinado.

Tabela 12: Resultados obtidos na avaliação físico-química nas amostras obtidas por via biotecnológica - lactobionato de sódio e ácido lactobiônico liofilizado – em comparação com o ácido lactobiônico comercial (Sigma-Aldrich).

	Lactobionato de sódio	Ácido lactobiônico liofilizado	Ácido lactobiônico comercial
Pureza (%)	> 99	> 99	> 99
Ponto de fusão (°C)	172	125	125
pH	6,38	2,96	3,04
Açúcar redutor (%)	< 0,2	< 0,2	<0,2
Água (%)	3,0	2,6	2,9
Desvio óptico (°)	+22,5	+23,4	+25,2

De acordo com a Tabela 12, os valores de pH das amostras de ácido lactobiônico foram semelhantes, indicando, mais uma vez, que a conversão do lactobionato para a forma ácida foi eficiente. Segundo a European Pharmacopoeia (2008), a quantidade de água presente nas amostras deve ser inferior a 5% (m/v) e de açúcares redutores de no máximo 0,2% (m/m). Com relação ao poder rotatório específico para o ácido lactobiônico são descritos valores entre +23° até +29° (European Pharmacopoeia, 2008). Pode-se observar que os resultados obtidos para todas as amostras se encontraram dentro da faixa preconizada. Entretanto, valores levemente superiores foram obtidos para o ácido lactobiônico comercial em comparação ao ácido lactobiônico obtido por via biotecnológica (Tabela 12). Esse fato pode ser justificado pela probabilidade do ácido lactobiônico comercial conter

substâncias racêmicas ou isômeros, como representado na Figura 28, no qual foram identificados dois picos distintos no cromatograma.

Em estudo realizado na Universidade da Região de Joinville (Valle, 2009), o lactobionato de sódio recuperado por precipitação com etanol neste trabalho foi avaliado, tendo sido determinado um grau de pureza próximo a 100% e ausência de qualquer substância isômera ou racêmica. Em princípio, estes resultados indicam que este composto pode vir a ser utilizado como padrão primário na vetorização de drogas.

Esses resultados prévios de caracterização sugerem a viabilidade do emprego do ácido lactobiônico obtido por bioconversão de lactose por células de *Z. mobilis* em produtos da área farmacêutica e médica. Entretanto, estudos complementares deverão ser realizados para avaliar a estabilidade desse composto visando às aplicações específicas.

4.8 Proposta de fluxo de produção de sorbitol e ácido lactobiônico por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*

A partir dos resultados do presente trabalho e do conhecimento previamente existente, foi possível a proposição de um fluxo de produção de sorbitol e ácido lactobiônico por via biotecnológica a partir de células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Toda a descrição a seguir é relativa a este fluxo de produção, representado na Figura 28.

O processo de obtenção de células/enzimas e etanol foi iniciado com o cultivo anaeróbio de *Z. mobilis*, em meio contendo glicose e nutrientes. Posteriormente, as células/enzimas foram concentradas, permeabilizadas e tratadas com glutaraldeído. Para o procedimento de imobilização, 70g/L de suspensão celular foram misturadas à

solução de alginato de sódio e gotejadas em solução 0,3mol/L de CaCl₂. As esferas de alginato de cálcio contendo *Z. mobilis* podem então ser armazenadas em tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio pH 6,4, a 4°C, ou conduzidas imediatamente para o processo de bioconversão. Para que o processo de bioconversão seja conduzido em reator agitado, sugere-se a utilização de 20g/L de biocatalisador, evitando-se assim problemas operacionais com a mistura e com o controle do pH. Com o intuito de diminuir a quantidade de substrato residual, uma vez que a lactose é o substrato limitante da reação, a bioconversão pode ser realizada com concentrações iniciais de 0,7mol/L de lactose e 0,6mol/L de frutose. Ao final do processo de bioconversão, a recuperação do lactobionato de sódio é realizada por precipitação fracionada utilizando-se o etanol proveniente do próprio cultivo de *Z. mobilis*. Entretanto, para recuperar o sorbitol e contornar a desvantagem da alta concentração de lactose residual, aprimorando assim o processo para futura aplicação industrial, testes adicionais de precipitação fracionada devem ser realizados. Tendo em vista que a solubilidade dos substratos e produtos em etanol é distinta, a separação dos compostos (lactose, sorbitol e lactobionato de sódio) poderia ser realizada durante as etapas de precipitação, variando-se, por exemplo, a concentração do etanol.

Após a recuperação do lactobionato de sódio, a conversão em sua forma ácida pode ser realizada por cromatografia de troca iônica, seguida de liofilização. Conforme preconizado pela ANVISA, para a utilização do ácido lactobiônico, obtido por via biotecnológica em produtos farmacêuticos, é necessária a caracterização físico-química dessa substância (Brasil, 2003). Entretanto, estudos de estabilidade devem ser realizados para fornecer indicações sobre o comportamento do produto frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término do período da validade do produto em questão.

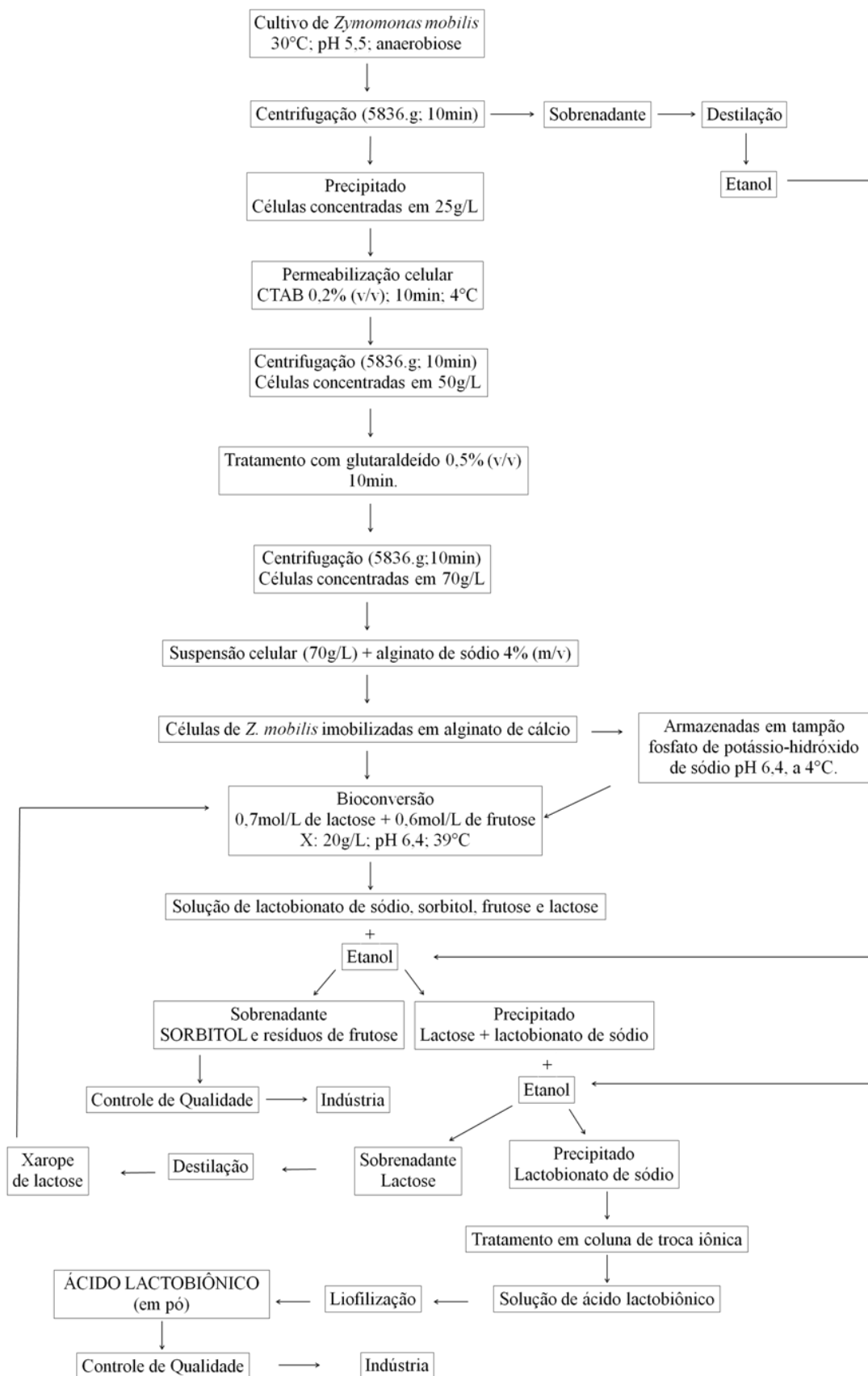


Figura 28: Fluxo de produção de ácido lactobiônico e sorbitol por células de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio.

5. CONCLUSÕES

Neste capítulo, são resumidas as principais conclusões deste trabalho.

Nos ensaios enzimáticos com os substratos lactose e frutose, os dados obtidos com o emprego do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, foram ajustados ao modelo cinético de Michaelis-Menten. A partir destes resultados, foi possível a identificação da lactose como substrato limitante da reação enzimática. Adicionalmente, o emprego de uma concentração inferior de frutose no início do processo de bioconversão proporcionou a diminuição da concentração de frutose residual, sem, no entanto, influenciar a produtividade global do processo. Da mesma forma, o aumento da concentração de biocatalisador proporcionou a diminuição do tempo de processo.

Na bioconversão com células imobilizadas, o aumento da concentração da suspensão celular na etapa de imobilização – ou seja, esferas de alginato de cálcio contendo maiores massas de sólidos imobilizados – afetou negativamente a velocidade reacional em decorrência da redução do fluxo de massa de substratos e produtos através das esferas de alginato. Entretanto, o uso do biocatalisador preparado a partir de suspensão celular contendo 70g/L proporcionou o emprego de menor quantidade (massa) de esferas necessária no processo de bioconversão. Assim, os problemas operacionais associados à mistura e ao controle de pH foram minimizados.

Com relação às condições de armazenamento, a velocidade específica de formação de ácido lactobiônico foi superior ao longo do processo quando o complexo enzimático GFOR/GL imobilizado foi mantido por até 15 dias em solução tampão pH 6,4.

Nos testes de reutilização das células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, foram obtidos resultados relevantes, com a preservação de cerca de 85% da atividade enzimática inicial após oito ciclos sucessivos de bioconversão, totalizando 193 horas de processo.

Quando comparado o processo de bioconversão empregando células livres ou imobilizadas, em razão da barreira difusional imposta pelo suporte, valores de velocidade de formação de produto (μ_p) inicialmente inferiores foram obtidos. Entretanto no decorrer do processo, a queda da velocidade foi mais acentuada com a utilização de células livres em razão da maior estabilidade do complexo enzimático imobilizado. No caso, resultados de produção de ácido lactobiônico praticamente idênticos foram alcançados ao final de 24 horas de processo, obtendo-se assim, a mesma produtividade.

A recuperação do lactobionato de sódio por precipitação com etanol e sua conversão à forma ácida por troca iônica apresentou-se como uma metodologia simples e eficiente para os tratamentos finais deste bioprocessamento.

O ácido lactobiônico obtido na bioconversão de lactose por células de *Z. mobilis* apresentou características físico-químicas semelhantes ao produto comercial. Estes resultados, ainda que preliminares, sugerem que o ácido lactobiônico obtido por via biotecnológica apresenta qualidades favoráveis para a utilização em produtos da área farmacêutica.

Como perspectivas para a continuidade desse estudo, sugerem-se as atividades listadas a seguir:

- . avaliar os parâmetros operacionais como pH e temperatura no processo de bioconversão com a utilização de 70g/L de suspensão celular imobilizada;
- . determinar uma metodologia para recuperação de sorbitol e de reutilização dos açúcares residuais do processo de bioconversão com células imobilizadas de *Z. mobilis*;
- . estudar a estabilidade físico-química do ácido lactobiônico com relação à temperatura e a exposição à radiação UV;
- . desenvolver formulações tópicas de uso cosmético – farmacêutico em geral – com a incorporação do ácido lactobiônico e avaliar a estabilidade físico-química dessas formulações com relação à temperatura e a exposição à radiação UV, tendo ácido lactobiônico obtido por via biotecnológica como matéria-prima.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adcos Cosmética de tratamento. **Disponível (online):** <http://www.adcos.com.br/> (18 de fevereiro).

Alonso, S.; Rendueles, M. Díaz, M. (2011). Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. **Biores. Technol.** 102:9730–9736.

Assumpção, R.M.V.; Morita, T.(1968). **Manual de soluções, reagentes e solventes.** São Paulo: E. Blücher, 1968. 627 p.

Barnell, W.O.; Yi, K.C.; Conway T. (1990). Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. **J. Bacteriol.** 72(12):7227-7240.

Barquet, A.P.; Finch, A.P.; Koesters, L.S. (2006). Comparação entre alfa-hidroxiácidos e poli-hidroxiácidos na cosmiatria e dermatologia. **Rev. Bras. Farm.** 87: 67-73

Beny, M.G. (2003). Considerações sobre pele seca. **Cosm. Toil.** 15:42-46.

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, **Anais** p.476, São Carlos, 1996.

Birkhed, D; Edwardsson, S.; Kalfas, S.; Svensäter, G. (1984). Cariogenicity of sorbitol. **Swed Dent. J.** 8(3):147-54.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos.** Brasília: Anvisa

Briden, E. (2004). Hidroxiácidos. Ayer, hoy y mañana: agentes terapéuticos en Dermatología. **Med. Cutan. Lat. Am.** 32(6): 265-270

British Pharmacopoeia Commission (2009). **British Pharmacopoeia**. London: The Stationery Office. CD-ROM Manual

Budavari, S.; O`neil, M.J.; Smith, A.; Heckelman, P.E.; Kinneary, J.F., eds. (1996). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12th ed., Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, p.2563.

Carra, S.; Concatto, K.; Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2003). Cinética da ação de glicose-frutose oxidorreductase e glucono- δ -lactonase de *Zymomonas mobilis* na presença de diferentes carboidratos. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações. T282-**Cd Rom**. Florianópolis, 2003.

Carra, S.; Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2007). Cinética do cultivo de *Zymomonas mobilis* em meios com diferentes concentrações de extrato de levedura. In.: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Cd Rom**. Curitiba, 2007.

Carvalho, M.R.D. (2006). Padrão de imunorreatividade de fatores de crescimento, metaloproteinases da matriz e seus inibidores no ameloblastoma. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Pará. Belém, Brasil.

Castro, H.F.; Zanin, G.M.; Moraes, F.F.; Pereira P.S. (2008). Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: Bom. E. P. S.; Ferrara, A. M.; Corvo, M. L.; Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A.; Alencastro, R. B.; Coelho, R. R. R. (2008). **Enzimas em biotecnologia**. Portugal: Interciência. pp123-147.

Chun, U.H.; Rogers, P.L. (1988). The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol.** 29:19-24.

Covizzi, L.G.; Giese, E.C.; Gomes, E.; Dekker, R.F.H.; Silva, R. (2007). Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. Londrina, 28(2): 143-160.

Cowan, D.A.; Fernandez-Lafuente, R. (2011). Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme Microb. Technol.** 49: 326– 346.

Deanda, K; Zhang, M; Eddy, C; Picataggio, S. (1996). Appl Env Microbiol 62:4465. In: Rogers, P.L.; Jeon Y.J.; Lee, K.L.; Lawford H.G. (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. **Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.** 108: 263-288.

Doelle, M.B.; Doelle, H.W., Kirk, L. et al. (1993). *Zymomonas mobilis*: science and industrial application. **Critical Rev. Biotechnol.** 13: 57-58.

Duvnjak, Z.; Turcotte, G.; Duan, Z. (1991). Production of sorbitol and ethanol from jerusalem-artichokes by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC-36859. **Appl. Microbiol. Biot.** 35:711-715.

Edward, M.; Islip, N. Y. (1952). Patente 2.746.916. In: Severo Júnior, J. B. (2008). Síntese biocatalítica do sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea por eletrodialise. **Dissertação de mestrado**. Ciências em Engenharia Química. Universidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

Erzinger, G. (1996). Influência da concentração de glicose e de etanol sobre a atividade de glicose-frutose oxidoreductase em *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêutica. Universidade de São Paulo. São Paulo.

European Pharmacopoeia Commission (2008). **European pharmacopoeia**. 6 ed. Strasbourg: Council of Europe.

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. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 89: 43-53.

Freitas, V.A. (1990). Produção de sorbitol: análise técnico-econômica dos processos eletroquímico e catalítico. Proposta de um projeto básico. **Dissertação de mestrado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Gibbs, M.; De Moss, R.D. (1954). Anaerobic dissimilation of C¹⁴ – labeled glucose on fructose by *Pseudomonas lindneri*. **J. Biol. Chem.** 207: 689-694.

Gollhofer, D.; Nidetzky, B.; Furlinger, M.; Kulbe, K.D. (1995). Efficient Protection of Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* Against Irreversible Inactivation During its Catalytic Action. **Enzyme Microb. Technol.** 17:235-240.

Green, B. (2005). After 30 years... the future of hydroxyacids. **J. Cosmet. Dermatol.** 4:44- 45.

Grimes, P.E.; Green, B.A.; Wildnauer, R.H.; Edison, B.L. (2004). The use of polyhydroxy acid (PHAs) in photoaged skin. **Cutis** 73: 3-13

Gutierrez, L.F.; Hamoudi, S.; Belkacemi, K. (2011). Selective production of lactobionic acid by aerobic oxidation of lactose over gold crystallites supported on mesoporous sílica. **Appl. Catal A: General.** 402:94– 103

Haidegger, E. (1977). The impostance of hydrogenation in the processing of carbohydrates. In: Silveira, M.M.; Jonas, R. (2002). The biotechnological production of sorbitol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59:400-408.

Harman, M. J.; Scopes, R.K. (1988). The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. **Eur. J. Biochem.** 173:203-209.

Hoffhine, C.E. (1956). Aqueous soluble salts of erythromycin. US Patent 2,761,859, 1956. In: Nordkvist, M., Nielsen, P. M. & Villadsen, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnol. Bioeng.** 97:694-707.

Jonas, R.; Silveira, M.M. (2004). Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 118: 321-336.

Jones, W.E.; Ho, C.Y. (2001). Novel techniques for the preparation and crystallization of 4-0-beta-d-galactopyranosyl-d-gluconic acid. European Patent Office. WO/2001/051498. United States. **Disponível online:** <http://www.wipo.int/> (08 de março).

Kempers, S.; Katz, H.I.; Wildnauer, R.; Green, B. (1998). An Evaluation of the effect of an alpha hidroxy acid- blend skin cream in the cosmetic improvement of symptoms of moderate to severe xerosis, epidermolytic hyperkeratosis, and ichthyosis. **Cutis** 61:347-350.

Khan, M.A.; Iqbal, Z.; Jan, M.R.; Shah, J.; Ahmad, W.; Haq, Z.U.; Obaidullah. (2006). A spectrophotometric method for quantitative determination of lactulose in pharmaceutical preparations. **J. Anal. Chem.** 61:32–36.

Koehntopp, P.I.; Pinheiro, H.M.V.; Silveira, M. M.; Jonas, R. Estudo da imobilização de *Zymomonas mobilis* em poliuretano visando a produção de sorbitol e ácido glucônico. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações – Sinaferm. São Carlos. **Livro de Resumos.** p.470.

Koka, R.; Mehnert, D.W.; Fritsch, R.J.; Steffan, W.; Habermeier, P.; Bradbury, A.G. W.; Pombo, A.W.; Rose, M.; Lynglev, G.B.; Hansen, H.P.H (2002). Processo para fabricar um produto de queijo contendo ácido lactobiônico, produto de queijo, processo para fabricar um produto laticínio contendo ácido lactobiônico, queijo do processo, e, processo para preparar o queijo do processo. **Patente de invenção**. INPI, PI0209467, Brasil.

Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I.M.; Merchant, R.; Koutinas, A.A. (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiol.** 21:377-397.

Lima, O.G.; Schumacher, I.E.; Araújo, J.M. (1972). New conservations about the antagonist effects of *Zymomonas mobilis* var *recifensis*, ecological aspects of some problems in microbiology. **Rev. I. Antibiot.** 12: 57-68.

Malvessi E. (2008). Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. **Tese de Doutorado**. Centro de Biotecnologia do estado do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

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 -lactone present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **J. Biotechnol. Bioeng.** 51: 1-6.

Malvessi E.; Carra, S.; Mioranza D.T; Possamai, N.; Bastiani S.; Silveira M.M. (2009). Bioprodução de ácido lactobiônico por enzimas presentes em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio. In: XVII Simpósio Nacional de Fermentações. **Cd Rom**. Natal.

Malvessi, E.; Concatto, K.; Carra, S.; Silveira, M.M. (2006b) Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 49: 139-144.

Malvessi, E.; Pasquali, F.C.; Carra, S.; Polidoro, T.A.; Silveira, M.M. (2006a) Bioconversão de ácido lactobiônico por endoenzimas presentes em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em diferentes configurações de biorreatores. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Resumos** p.64. Caxias do Sul, 2006.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.

Miyamoto, Y.; OOI, T.; Kinoshita, S. (2000). Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas* sp. LS13-1. **Biotechnol. Lett.** 22:427–430.

Murakami, H.; Seko, A.; Azumi, M.; Kiso, T.; Kiryu, T.; Kitahata, S.; Shimada, Y.; Nakano, H. (2003). Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. **J. Appl. Glycosci.** 50: 117-120.

Murzina, E.V.; Tokarev A.V.; Kordás K.; Karhu H.; Mikkola J.; Murzin, D.Y. (2008). D-Lactose oxidation over gold catalysts. **Catal. Today.** 131: 385-392.

NeoStrata Company. **Disponível (online):** <http://www.neostrata.com/> (18 de fevereiro).

Nidetzky, B.; Furlinger, M.; Gollhofer, D.; Scopes, R. K.; Haltrich, D.; Kulbe, K. D. (1997). Improved operational stability of cell-free glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* for the efficient synthesis of sorbitol and gluconic acid in a continuous ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnol. Bioeng.** 53:623-629.

Nishizuka, Y.; Hayaishi, O. (1962). Enzymic formation of lactobionic acid from lactose. **J. Biol. Chem.** 237: 2721-2728.

Nitschke, M.; Pastore, G.M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova.** 25: 772-776.

Nordkvist, M.; Nilesen, P.M.; Villadsen, J. (2007). Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnol. Bioeng.** 97: 694-707.

Nu Skin the Difference Demonstrated. **Disponível (online):** <http://www.nuskin.com/> (18 de fevereiro).

Palha, M.P.F.; Lopes, C.E.; Lima, M.A.G.A.; Pereira Jr, N. (2002). The influence of centrifugation on *Zymomonas mobilis* aggregation. **Electron. J. Biotechnol.** (5) 3:272-278. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/7>

Paula, H.C.B.; Oliveira, E.F.; Abreu, F.O.M.S.; Paula, R.C.M.; Morais, S.M.; Forte, M.M.C. (2010). Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeros.** 20(2): 112-120.

Pedruzzi I. (2010). Produção biotecnológica de sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea em sistema de leito móvel simulado. **Tese de doutorado.** Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. Porto, Portugal.

Pedruzzi, I.; Malvessi, E.; Mata, G.V.; Silva, E.A.; Silveira M.M.; Rodrigues, A.E. (2007). Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.** 1145:128-132.

Pedruzzi, I.; Silva, E.A.B.; Rodrigues, A.E. (2011). Production of lactobionic acid and sorbitol from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomonas mobilis* cells: a kinetic study. **Enzyme Microb. Technol.** 49 (2): 183-191.

Pinto, P.C.; Parreirão, C.; Rodrigues, L.M. (2009). A função barreira na pele sensível das mãos – um estudo piloto por método dinâmico. **Rev. Lusof. Cienc. Tecnol. Saude.** 1: 57-63.

Pojprasath, T.; Lohachit, C.; Techakumphu, M.; Stout, T.; Tharasanit, T. (2011). Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. **Theriogenology.** 75: 1742–1749

Prolife. **Disponível (online):** <http://www.prolifeimport.com.br/> (18 de fevereiro).

Rehr, B.; Wilhem, C.; Sahm, N. (1991). Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Microbiol. Biotechnol.** 35: 144-148.

Ritter, C. E. (2009). Produção de celulase e xilanases por *Penicilium echinulatum*, em processo submerso utilizando biorreatores de mistura completa e airlift de circulação interna. **Dissertação de mestrado.** Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul.

Rogers, P.L.; Jeon Y.J., Lee, K.L.; Lawford, H.G. (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. **Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.** 108:263-288

Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D. (2011). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol Adv.** doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.

Satory M.; Fuerling, M.; Haltrich, D.; Kulbe, K.D.; Pittner, F.; Nidetzky, B. (1997). Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnol. Lett.** 19: 1205-1208.

Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **Int. Dairy J.** 19: 458-465.

Scott, C.D.; Woodward, C.A.; Thompson, J.E. (1989). Solute diffusion in biocatalyst gel beads containing biocatalysis and other additives. **Enzyme Microb. Technol.** 11:258-263.

Severo Júnior, J. B. (2008). Síntese biocatalítica do sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea por eletrodialise. **Dissertação de mestrado**. Ciências em Engenharia Química. Universidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

Silveira, M.M.; Jonas, R. (2002). The biotechnological production of sorbitol. **Appl. Microbiol. Biotecnol.** 59:400-408.

Silveira, M.M.; Malvessi, E.; Carra, S.; Pasquali, F.C.; Polidoro, T.A. (2007). Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácidos orgânicos ou seus sais, preparação de elevada pureza isomérica de ácidos orgânicos ou seus sais. **Patente de invenção**. INPI, PI 0700421-4, Brasil.

Southard, J. D. H.; Belzer, F.O. (1995). Organ preservation. **Ann. Rev. Med.**, 46: 235-247.

Sprenger, G.A. (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some routes. **FEMS Microbiol Lett**, 145: 301-307.

Sumimoto, R.; Kamada, N. (1990). Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. **Transpl. Proc.** 22: 2198-2199.

Swings, J.; De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. **Bacteriol. Rev.** 41: 1-46.

Taipa M.A.; Gama, M. (2003). Estrutura e função das enzimas. In: Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M; R.; Gama, M. **Engenharia enzimática**. Editora: Lidel.

Tanaka, H.; Matsumura M.; Veliky, I.A. (1984). Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. **Biotechnol. Bioeng.** 26:53-58.

Valle, T.A. (2009). Ácido lactobiônico produzido por *Zymomonas mobilis*: uma alternative para vetorização de drogas. **Dissertação de mestrado**. Universidade da Região de Joinville. Joinville. Santa Catarina.

Van Scott, E.; Ditre, C.M.; Yu, R.J. (1996). Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. **Clin. Dermatol.** 14: 217-226.

Venzon, L.T.; Miron, D. (2008). Determinação de manitol em preparação injetável por reação colorimétrica. **Trabalho de conclusão** do Curso de Farmácia. Universidade de Caxias do Sul.

Viikari, L. (1984). Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24:471-476.

Viikari, L. (1986). By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Rev. Biotechnol.** 7: 237-261.

Viikari, L. (1988). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*. **CRS Crit. Rev. Biotechnol.** 7: 237-261.

Vujcic, Z.; Miloradovic, Z.; Milovanovic, A.; Bozic, N. (2011). Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel. **Food Chem.** 126:236–240.

Wanick, M.C.; Araújo, J.M.; Cavalcanti da silva, E.; Schumacher, I. E. (1970). Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis*. **Rev. I. Antibiot.** 10: 47-49.

Wilberg, K.Q.; Alves, T.L.M.; Nobrega, R. (1997). Enzymatic catalysis by permeabilized cells. **Braz. J. Chem. Eng.** 14:4.

Yu, R.; Van Scott, E. (2004). Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. **J. Cosmetic Dermatol.** 3: 76-87.

Zachariou, M.; Scopes, R.K. (1986). Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **J. Bacteriol.** 3: 863-869.

Zanin, G.M.; Moraes, F.F. (2004). **Enzimas imobilizadas**. In: Said, S. e Pietro, R.C.L.R. (Ed.) **Enzimas como agentes biotecnológicos**. São Paulo: Legis Summa, pp.35-85.

Zhang, M.; Eddy, C.; Deanda, K.; Finkelstein, M.; Picataggio, S. (1995) Science 267:240. In: Rogers, P.L.; Jeon Y.J., Lee, K.L., Lawford H.G. (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and Higher value products. **Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.** 108: 263-288.

ANEXO – Cultivo de *Zymomonas mobilis*

Cultivo de *Zymomonas mobilis* em biorreator de mistura completa

Tabela 1A: Resultados gerais do cultivo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo, com $S_0 = 150$ g/L glicose, a 30°C, pH 5,5.

Parâmetros do processo	
X_f (g/L)	4,9
P_f (g/L)	67
μ_{Xm} (h ⁻¹)	0,34
S_f (g/L)	1,6
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,031
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,440
ρ (%)	86
p (g/L/h)	5,5
t (h)	11,3
GFOR/GL (U/g)	5,7

X_f , concentração celular final; P_f , concentração final de etanol; μ_{Xm} , máxima velocidade específica de crescimento; S_f , concentração final de substrato; $Y_{X/S}$, fator de conversão de substrato em célula; $Y_{P/S}$, fator de conversão de substrato em produto; ρ , rendimento; p , produtividade volumétrica; t , tempo de processo; GFOR/GL, atividade específica de GFOR/GL.

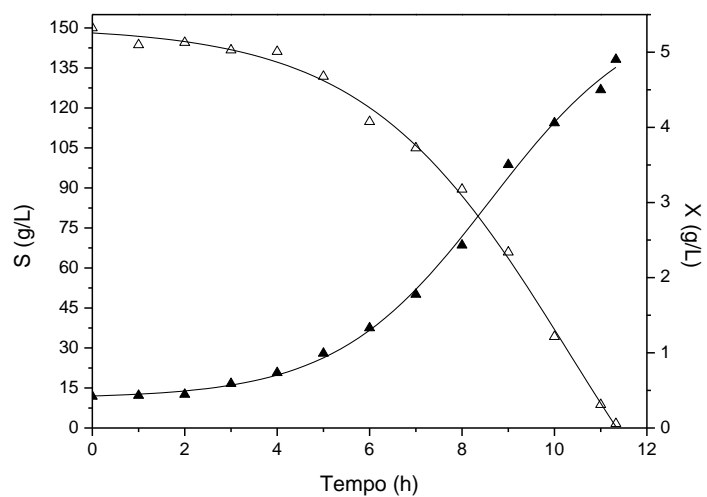


Figura 1A: Variação da concentração celular (X) e de açúcares redutores (S) em função do tempo, em cultivo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo.

$S_0 = 150$ g/L glicose, a 30°C , pH 5,5.