

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**USO DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE *Zymomonas mobilis* PARA
A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS MALTOBIÔNICO E LACTOBIÔNICO**

DIÓGENES LUNARDI GARIN

CAXIAS DO SUL, 2016

DIÓGENES LUNARDI GARIN

**USO DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE *Zymomonas mobilis* PARA
A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS MALTOBIÔNICO E LACTOBIÔNICO**

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

Orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi

Co-orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da
Silveira

Caxias do Sul, 2016

G232u Garin, Diógenes Lunardi

Uso do sistema enzimático de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácidos maltobiônico e lactobiônico / Diógenes Lunardi Garin. – 2016. 110 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientação: Eloane Malvessi.

Coorientação: Maurício Moura da Silveira.

1. *Zymomonas mobilis*. 2. Ácido maltobiônico. 3. Ácido lactobiônico. 4. Ácidos orgânicos. 5. Bioconversão. I. Malvessi, Eloane, orient. II. Silveira, Maurício Moura da, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DIÓGENES LUNARDI GARIN

**USO DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE *Zymomonas mobilis* PARA A
PRODUÇÃO DE ÁCIDOS MALTOBIÔNICO E LACTOBIÔNICO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Eloane Malvessi

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20 DE MAIO DE 2016.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eloane Malvessi

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

Prof^a Dr^a Aline Dettmer

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

*“Se vuoi qualcosa che non hai mai avuto,
devi fare qualcosa che non hai mai fatto.”*

Thomas Jefferson

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar tão longe, iluminando minhas decisões.

Aos meus pais, Marialva Lunardi e José Vanderlei Garin, agradeço pelo apoio incondicional, pela paciência dedicada a mim nas horas difíceis e por acreditarem sempre no meu potencial e capacidade, me incentivando sempre a continuar e lutar por meus objetivos, sem os quais essa conquista não seria possível.

Agradeço à Universidade de Caxias do Sul e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

À orientadora Profa. Dra. Eloane Malvessi pelos ensinamentos compartilhados, pela orientação e paciência para que esse projeto pudesse sair do papel. Ao Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira pelo apoio e incentivo constantes.

Aos professores da banca de acompanhamento, Dr. Aldo José Pinheiro Dillon e Dra. Mirian Salvador por todas as contribuições dadas ao trabalho. Aos membros da banca de avaliação, Dra. Aline Dettmer e Dr. Gilmar Sidnei Erzinger pela disponibilidade e colaboração com o trabalho.

Às colegas de laboratório Sabrina Carra, Maria Gabriele Delagustin, Lenara Meneghel e Analia Folle por toda a ajuda e disponibilidade.

Às amigas, colegas de laboratório e de profissão Caroline Reginatto e Caroline Hartman por todos os momentos de descontração e risadas que tornaram essa caminhada mais fácil.

Às bolsistas de iniciação científica Mônica Girardi, Victoria Baschera e Debora Guerra Salvador por terem participado da construção desse trabalho.

Ao amigo Bruno Maceda por toda a ajuda e apoio e ao amigo Israel Krindges por todas as contribuições oferecidas ao trabalho.

Agradeço, por fim, a todos os meus amigos que contribuíram com uma sugestão, uma risada, um abraço ou apenas me ouvindo nas horas em que precisei, tornando possível a realização desse objetivo.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	4
2.1 <i>Zymomonas mobilis</i> : CARACTERÍSTICAS E METABOLISMO	4
2.2 PRODUÇÃO DE SORBITOL E ÁCIDOS ALDÔNICOS.....	6
2.3 MATÉRIAS-PRIMAS PARA A BIOSÍNTESE De ÁCIDOS ALDÔNICOS	10
2.3.1 Lactose.....	10
2.3.2 Soro do leite	11
2.3.3 Maltose.....	14
2.3.4 Xarope de maltose	15
2.4 SORBITOL E ÁCIDOS ALDÔNICOS: APLICAÇÕES.....	17
2.5 IMOBILIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES E BIOCONVERSÃO	21
2.6 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIOCONVERSÃO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 MICRORGANISMO.....	25
3.2 MEIO DE CULTIVO	25
3.3 PRODUÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS E ETANOL.....	26
3.4 PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS DE <i>Zymomonas mobilis</i>	26
3.5 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS DE <i>Zymomonas mobilis</i>	27
3.6 ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE E GLICONO- δ - LACTONASE DE <i>Zymomonas mobilis</i>	28
3.7 ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO	29
3.7.1 Bioprodução de ácido maltobiônico.....	31
3.7.2 Bioprodução de ácido lactobiônico	31
3.8 DESPROTEINIZAÇÃO DO SORO DO LEITE.....	32
3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	32
3.10 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DE BIOCONVERSÃO	33

3.11 MÉTODOS ANALÍTICOS	34
3.11.1 Coleta e tratamento de amostras	34
3.11.2 Determinação da concentração celular.....	34
3.11.3 Determinação de açúcares redutores (AR).....	35
3.11.4 Determinação de etanol.....	35
3.11.5 Determinação de frutose	36
3.11.6 Determinação de sorbitol	36
3.11.7 Determinação da atividade do complexo enzimático GFOR/GL.....	37
3.11.8 Estimativa da concentração de substratos e produtos em ensaios de bioconversão.....	38
3.11.9 Parâmetros de avaliação do processo de bioconversão	39
3.11.9.1 Fator de produção específica	40
3.11.9.2 Produtividade molar e produtividade específica	40
3.11.9.3 Velocidade específica de formação de produto	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Processo global de obtenção de células/enzimas e etanol em cultivo de <i>Zymomonas mobilis</i>	41
4.2 Cinética do complexo enzimático GFOR/GL para diferentes carboidratos.....	42
4.3 Ensaio de bioconversão com células/enzimas permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> com diferentes aldoses.....	51
4.4 Bioprodução de ácido lactobiônico e maltobiônico empregando células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>.	56
4.5 Discussão geral do processo de produção de ácidos orgânicos	67
4.6 Efeito do pH e da temperatura NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO MALTOBIÔNICO POR células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>.	71
4.7 Recuperação dos ácidos aldônicos obtidos no processo de bioconversão	75
5 CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1.....	93
ANEXO 2.....	94
ANEXO 3.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição média e características físico-químicas do soro do leite em pó	13
Tabela 2: Tipos de xaropes de maltose comerciais e Dextrose Equivalente (DE)	16
Tabela 3: Parâmetros cinéticos aparentes K_F , K_{MA} e $V_{máx}$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i> com maltose e frutose como substratos.....	45
Tabela 4: Parâmetros cinéticos aparentes K_F , K_X e $V_{máx}$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i> com xarope de maltose e frutose como substratos.....	47
Tabela 5: Parâmetros cinéticos e relação $V_{máx}/K_M$ de ensaios enzimáticos de GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i> empregando-se maltose/frutose e xarope de maltose/frutose.....	50
Tabela 6: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido maltobiônico e lactobiônico nos ensaios de bioconversão com células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> utilizando diferentes matérias primas (aldose/frutose inicial 700 mmol/L; 39°C; pH 6,4).....	52
Tabela 7: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido maltobiônico nos ensaios de bioconversão com células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> utilizando diferentes aldoses (aldose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39°C; pH 6,4).	60
Tabela 8: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão com células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> utilizando diferentes aldoses (aldose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39°C; pH 6,4).	63
Tabela 9: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido lactobiônico nos ensaios de bioconversão com células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> utilizando soro do leite (lactose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39°C; pH 6,4).	65
Tabela 10: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido maltobiônico em ensaios de bioconversão conduzidos em diferentes valores de pH utilizando células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em alginato de cálcio (maltose/frutose inicial 700 mmol/L; 39°C).	72
Tabela 11: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido maltobiônico em ensaios de bioconversão conduzidos em diferentes temperaturas, utilizando células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em alginato de cálcio (maltose/frutose inicial 700 mmol/L; pH 6,4)	73
Tabela 12: Percentual de recuperação do caldo final da bioconversão, empregando-se diferentes aldoses, em ensaios de bioconversão com células/enzimas imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> , em solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4, após sucessivas etapas de precipitação com etanol.	78

Tabela 13: Composição do produto da recuperação (precipitado) do caldo final da bioconversão, empregando-se diferentes aldoses, em ensaios de bioconversão com células/enzimas imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, em solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4, após as sucessivas etapas de precipitação com etanol. 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conversão 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> .	5
Figura 2: Fórmula estrutural do ácido lactobiônico.	18
Figura 3: Fórmula estrutural do ácido maltobiônico.	19
Figura 4: Esquema do sistema empregado nos ensaios enzimáticos e nos processos de bioconversão.	30
Figura 5: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> , com diferentes concentrações de frutose e maltose, a 39°C e pH 6,4.	44
Figura 6: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> , com diferentes concentrações de frutose e xarope de maltose, a 39°C e pH 6,4.	46
Figura 7: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> , utilizando frutose 0,70 mol/L + soro do leite (0,05 a 0,7 mol/L de lactose), a 39°C e pH 6,4.	49
Figura 8: Formação de ácidos orgânicos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> , em solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4.	55
Figura 9: Imagens do sistema imobilizado de células/enzimas de <i>Zymomonas mobilis</i> em alginato de cálcio obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).	57
Figura 10: [A] Formação de ácidos orgânicos em função do tempo e [B] velocidade específica de formação de produto em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> , em solução 700 mmol/L de maltose/frutose, a 39°C e pH 6,4.	58
Figura 11: [A] Formação de ácidos orgânicos em função do tempo e [B] velocidade específica de formação de produto em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> , em solução 700 mmol/L de frutose/lactose (purificada ou soro do leite), a 39°C e pH 6,4.	61
Figura 12: [A] Formação de ácidos orgânicos em função do tempo e [B] velocidade específica de formação de produto em função do tempo, em ensaios de bioconversão com	

células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> , em solução 700 mmol/L de frutose/lactose (soro do leite comercial ou desproteínizado), a 39°C e pH 6,4.....	66
Figura 13: Bioprodução de ácidos orgânicos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células/enzimas de <i>Zymomonas mobilis</i>	68
Figura 14: Velocidade específica de formação dos ácidos orgânicos (μ_P) em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células/enzimas de <i>Zymomonas mobilis</i>	70
Figura 15: Velocidade específica de formação de ácido maltobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão conduzidos em diferentes temperaturas, com células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em alginato de cálcio (maltose/frutose inicial 700 mmol/L; pH 6,4).....	75
Figura 16: Diagrama qualitativo da precipitação dos produtos da bioconversão empregando-se células/enzimas imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> , em solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4, frente à diferentes compostos orgânicos.	77

RESUMO

Ácidos maltobiônico e lactobiônico são formados pela oxidação de maltose ou lactose, ao passo que, em base equimolar, sorbitol é formado pela redução de frutose, por meio da ação catalítica do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL), enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*, os quais têm importantes aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos. Este trabalho objetivou avaliar a síntese biocatalítica de sorbitol e dos ácidos maltobiônico e lactobiônico pelo complexo enzimático GFOR/GL utilizando células/enzimas de *Z. mobilis* permeabilizadas livres ou imobilizadas em alginato de cálcio e empregando, além de maltose e lactose, matérias-primas complexas como xarope de maltose (42% maltose) e soro do leite (79% de lactose). Em ensaios enzimáticos utilizando maltose e frutose, 0,19 e 0,22 mol/L foram obtidos, respectivamente, como constantes de Michaelis-Menten e $V_{\text{máx}}$ de 25 unidades de GFOR/GL por grama de células secas (U/g), onde U corresponde a mmol de produto formado por hora. As constantes cinéticas foram também definidas para xarope de maltose e frutose, com a obtenção de K_M de 0,03 e 0,39 mol/L, respectivamente, e $V_{\text{máx}}$ de 56 U/g, indicando o efeito da maior afinidade relativa à presença de glicose no xarope. Em bioconversões de maltose e xarope de maltose com células permeabilizadas livres, foram atingidas concentrações dos ácidos orgânicos de 550 e 600 mmol/L, com rendimentos médios de 80 e 90%, respectivamente. Utilizando-se lactose ou soro do leite liofilizado, nas mesmas condições de processo, foram atingidas concentrações finais de ácidos orgânicos de 490 e 430 mmol/L, nessa ordem, com rendimentos aproximados de 76 e 66%. Foram conduzidas, também, bioconversões com células imobilizadas, a partir de maltose e xarope de maltose, resultando 570 e 580 mmol/L em concentração de produto e rendimentos aproximados de 90%. Empregando-se lactose e soro do leite, nas mesmas condições operacionais, obteve-se 490 e 430 mmol/L de ácidos orgânicos com conversões de 76 e 65%, respectivamente. Frente aos resultados obtidos com maltose, avaliou-se o efeito do pH (entre 6,0 e 7,2) e da temperatura (de 36 a 47°C), com o sistema GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio. Condições mais favoráveis em termos de formação de produto foram pH 6,4 e 39°C. O controle do pH da bioconversão, por meio da adição de NaOH, resultou na formação dos sais de sódio, maltobionato ou lactobionato, de acordo com o substrato empregado. Esses sais foram precipitados com o uso de etanol, procedimento que demonstrou-se eficiente, favorecendo a recuperação/purificação dos produtos finais.

ABSTRACT

Maltobionic and lactobionic acid are formed through the oxidation of maltose and lactose, whereas sorbitol is formed in equimolar amount through the reduction of fructose, by means of the catalytic action of the glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- δ -lactonase (GL) enzymatic complex, periplasmic enzymes from *Zymomonas mobilis*, which have important applications in the pharmaceutical and cosmetic industries. This work aimed to evaluate the biocatalytic synthesis of sorbitol and maltobionic and lactobionic acids by the enzymatic complex GFOR/GL using permeabilized cells/enzymes of *Z. mobilis*, free or immobilized in calcium alginate, and employing, besides maltose and lactose, complex raw materials such as maltose syrup (42% maltose) and whey (79% lactose). In enzymatic assays using maltose and fructose, 0.19 and 0.22 mol/L were obtained, respectively, as Michaelis-Menten constants, and a V_{max} of 25 units of GFOR/GL per dry cell gram (U/g) was obtained, where U corresponds to mol of product formed per hour. Kinetic constants for maltose and fructose syrups were also defined, with the attainment of K_M of 0.03 and 0.39 mol/L, respectively, and V_{max} of 56 U/g, indicating the effect of higher affinity related to the presence of glucose syrup. In bioconversions of maltose and glucose syrup with free permeabilized cells, concentrations of organic acids of 550 and 600 mmol/L were achieved, with mean yields of 80 and 90 %, respectively. Using lactose or lyophilized whey, under the same process conditions, final concentrations of organic acids of 490 and 430 mmol/L were achieved, in this sequence, with approximate yields of 76 and 66%. Bioconversions with immobilized cells were also performed from maltose and maltose syrup, resulting in 570 and 580 mmol/L of products and a yield of approximately 90%. Employing lactose and whey, under the same operational conditions, 490 and 430 mmol/L of organic acids were obtained with conversions of 76 and 65%, respectively. In face of the results obtained with maltose, the effect of pH (between 6.0 and 7.2) and temperature (from 36 to 47°C) were evaluated, with the GFOR/GL system immobilized in calcium alginate. The most favorable conditions in terms of product formation were pH 6.4 and 39°C. The pH control of the bioconversion, through NaOH addition, resulted in the formation of maltobionic and lactobionic sodic salts, in accordance with the substrate employed. These salts were precipitated with ethanol, procedure that was demonstrated to be efficient, promoting the recuperation/purification of final products.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria anaeróbia *Zymomonas mobilis* é conhecida por sua potencialidade para a produção comercial de etanol. Em estudos sobre a utilização de diferentes carboidratos por esta bactéria, foi verificada, ainda, a formação de sorbitol e de ácido glicônico quando frutose e glicose, ou sacarose, eram utilizadas como substratos de fermentação. Posteriormente, identificaram-se as enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR), com a coenzima NADP acoplada, e glicono- δ -lactonase (GL), como responsáveis pela formação destes produtos.

A partir deste sistema enzimático, foi identificada a capacidade de oxidar substratos alternativos à glicose, possibilitando a composição de um conjunto de produtos de interesse (ácidos orgânicos e seus diferentes sais), como os ácidos lactobiônico e maltobiônico produzidos, respectivamente, com o uso de lactose e maltose, que têm aplicações voltadas para áreas farmacêutica, cosmética, química e de alimentos. Surge, nesse contexto, a perspectiva de uso de fontes alternativas de lactose e maltose, como xaropes comerciais com alta concentração de maltose e soro de leite liofilizado, entre outros, visando à redução no custo de obtenção desses produtos de interesse.

Ademais, a utilização de maltose e matérias-primas complexas, como o soro do leite liofilizado e xarope de maltose, na etapa de bioprodução de ácidos aldônicos, carece de estudos aprofundados considerando-se a potencialidade de aplicação desses produtos.

Para a obtenção dos ácidos orgânicos e sorbitol por *Z. mobilis*, é realizada, primeiramente, a etapa fermentativa de obtenção de biomassa celular com alta atividade de GFOR/GL, e de etanol. Na sequência, após a inativação da biomassa por permeabilização, a mesma é empregada na bioconversão, que consiste no uso do agente biológico ou biocatalisador - complexo enzimático GFOR/GL - na conversão de açúcares em produtos.

Destaca-se, nesta etapa, o emprego de imobilização celular, processo que envolve a retenção da célula/enzima em uma matriz polimérica, por proporcionar maior estabilidade enzimática e facilidade na separação dos produtos. Deste modo, tendo em vista as aplicações e valor de mercado dos produtos (ácido lactobiônico, maltobiônico e sorbitol), os custos da imobilização de células num processo em maior escala seriam facilmente absorvidos, o que caracteriza outra vantagem do processo de imobilização.

Na mistura reacional resultante da bioconversão de frutose e aldoses, estão presentes o sal, sorbitol e concentrações residuais dos substratos, sendo essas as substâncias que exigem atenção nas etapas de separação e de recuperação dos produtos do processo. Em função da diferença de solubilidade dos compostos, estes podem ser separados por precipitação com a adição de etanol à mistura reacional. O co-produto sorbitol é solúvel em etanol, podendo, posteriormente, ser recuperado a partir da destilação do etanol. Salienta-se o uso do etanol como uma alternativa em função de este ser obtido na etapa de fermentação de *Z. mobilis*, contribuindo, portanto, com a diminuição do custo de recuperação de produtos.

A UCS, desde 2007, tem depositado no INPI um pedido de patente para processo de produção biotecnológica de ácidos orgânicos por *Z. mobilis*. O tema da proposta, desenvolvido na UCS há cerca de 10 anos, está relacionado à avaliação do processo de bioprodução de ácidos orgânicos (ou seus sais) e sorbitol, a exemplo do ácido lactobiônico ou lactobionato de sódio.

Nesse contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar as condições do processo de produção de sorbitol e dos ácidos lactobiônico e maltobiônico pelo complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase / glicono-lactonase (GFOR/GL) de *Zymomonas mobilis*. Para alcançar este objetivo, algumas atividades foram desenvolvidas, elencadas como objetivos específicos, relacionados a seguir:

- avaliar o ajuste do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* ao modelo de Michaelis-Menten frente ao uso de maltose e matérias-primas complexas (xarope de maltose e soro de leite liofilizado);

- avaliar a ação catalítica do sistema GFOR/GL, contido em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, na conversão de frutose e substratos purificados – lactose e maltose - ou matérias-primas complexas - soro de leite liofilizado e xarope de maltose, em sorbitol e respectivos ácidos orgânicos (ou sais);

- estabelecer as condições de produção de ácidos orgânicos utilizando células/enzimas permeabilizadas e imobilizadas em alginato de cálcio frente aos substratos purificados e matérias-primas complexas;

- identificar os efeitos do pH e da temperatura sobre a ação de GFOR/GL presente em células permeabilizadas e imobilizadas de *Z. mobilis*, em ensaios de produção de ácido maltobiônico;

- realizar a etapa de recuperação dos ácidos lactobiônico e maltobiônico e de sorbitol por precipitação com solventes orgânicos.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 *Zymomonas mobilis*: CARACTERÍSTICAS E METABOLISMO

Bactéria anaeróbia, Gram-negativa, *Zymomonas mobilis* tem dimensões que variam de 1 a 6µm de comprimento e 1 a 1,4µm de diâmetro. Essa bactéria pode se apresentar de forma isolada, aos pares ou em cadeia; não forma cápsulas tampouco esporos (Swings & De Ley, 1977; Viikari, 1984).

Z. mobilis se desenvolve preferencialmente em anaerobiose, sendo, entretanto, capaz de tolerar a presença de oxigênio. A bactéria utiliza, como fontes de carbono, somente glicose, frutose e sacarose, substratos metabolizados pela via de Entner-Doudoroff, com rendimentos aproximadamente equimolares de etanol e CO₂ (Doelle *et al.*, 1993).

Viikari (1984) verificou a presença de sorbitol e ácido glicônico quando sacarose ou uma mistura de frutose e glicose eram utilizadas como substratos de fermentação. Entretanto, a elucidação deste mecanismo bioquímico de obtenção dos compostos foi, posteriormente, descrita por Zachariou & Scopes (1986). Os autores identificaram a presença de glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) (E.C. 1.1.1.99), enzima presente no periplasma das células de *Z. mobilis*, responsável pela oxidação de glicose à glicono-lactona e redução de frutose a sorbitol. A glicono-lactona é, então, convertida a ácido glicônico (gliconato) pela enzima glicono-lactonase (GL) (E.C. 3.1.1.17). Este processo catalítico de GFOR, demonstrado na Figura 1, opera num clássico mecanismo *ping-pong*, onde duas meias-reações são envolvidas. Com a oxidação da glicose à glicono-lactona a coenzima NADP⁺ é reduzida a NADPH, que é posteriormente reoxidada em função da redução da frutose a sorbitol (Hardman & Scopes, 1988).

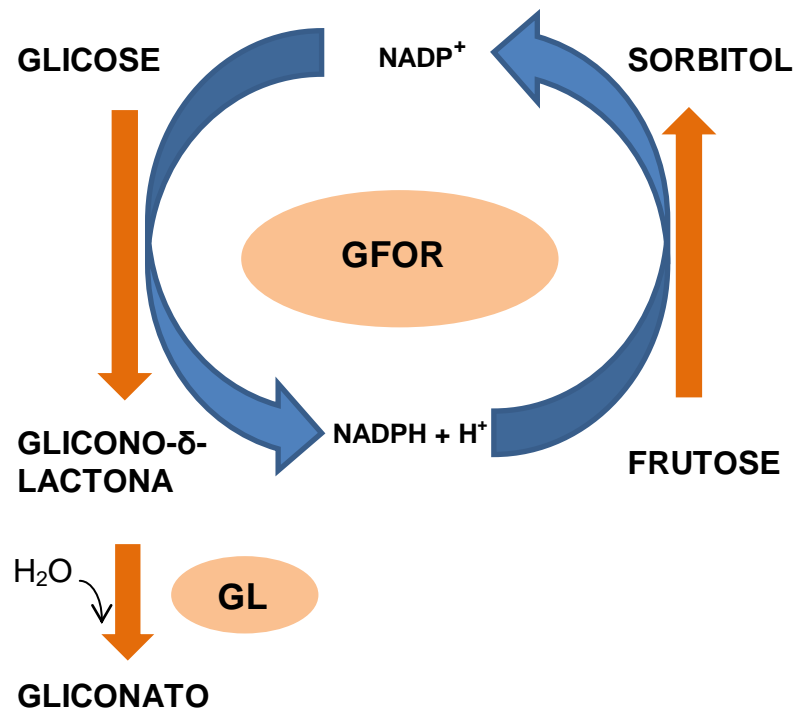


Figura 1: Conversão de glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, pelas enzimas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono-δ-lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*. Fonte: Adaptado de Zachariou & Scopes (1986)

O processo fermentativo para o crescimento celular/produção de enzimas e de etanol por *Z. mobilis* pode ser conduzido em regime descontínuo ou descontínuo alimentado. Efeitos relacionados à inibição pela concentração de substrato foi relatado por Erzinger (1996) e Wisbeck *et al.* (1997), que destacam que altas concentrações iniciais de glicose, em cultivo de *Z. mobilis* em regime descontínuo, levam à significativa redução da produtividade. Malvessi (2008) relata que a inibição do crescimento de *Z. mobilis* ATCC 29191 por glicose pôde ser evitada com a condução do processo em regime descontínuo alimentado, o que permite a obtenção de elevados rendimentos em etanol - próximos a 95% - e de alta atividade do complexo enzimático GFOR/GL.

Com relação às fontes de carbono e nitrogênio, Swings & De Ley (1977), em estudos comparativos de diferentes cepas de *Z. mobilis*, observaram que a maioria apresentava capacidade de crescer em meio contendo 30 a 40% (m/v) de glicose, destacando, ainda, a sua dependência de vitaminas como biotina e ácido pantotênico (Erzinger *et al.*, 2003). Nesse sentido, surge a possibilidade do uso de extrato de levedura bruto (Prodex Lac[®]) como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico (Malvessi *et al.*, 2006).

A temperatura empregada em processos visando ao crescimento, à produção de enzimas e etanol por *Z. mobilis*, é relatada entre 25 e 35°C, sendo a cultura caracterizada por possuir tolerância a meios ácidos e por crescer na ampla faixa de pH de 3,5 a 7,5 (Swings & De Ley, 1977).

2.2 PRODUÇÃO DE SORBITOL E ÁCIDOS ALDÔNICOS

Dentre as diferentes formas de produção de sorbitol destaca-se, do ponto de vista industrial, a síntese por meio de hidrogenação catalítica do xarope de glicose, em concentração 70% (m/v). O catalisador empregado no processo é o níquel (Ni²⁺), em temperatura e pressão média de 120-150°C e 40-50 atm, respectivamente. Ao final do processo, o xarope de sorbitol resultante da reação sofre resfriamento, com a eliminação do catalisador por meio de precipitação e filtração. O sorbitol, por sua vez, é purificado empregando-se cromatografia de troca iônica e carvão ativado (Haidegger, 1977, *apud* Silveira & Jonas, 2002).

Outrossim, diferentes mecanismos podem ser utilizados para a produção de ácido glicônico e seus sais, dentre eles: processos químicos, eletrolíticos, catalíticos ou biológicos. Diversas desvantagens são enfrentadas quando da utilização de mecanismos que envolvam processos químicos, eletroquímicos e catalíticos uma vez que os mesmos apresentam baixo

rendimento (60 a 80%), resultam produtos indesejáveis juntamente com o produto de interesse, são de difícil isolamento e purificação e apresentam problemas ambientais com agentes oxidantes (Hustede *et al.*, 1985).

Por outro lado, o uso de processos biotecnológicos para a obtenção de produtos industriais apresenta vantagens em relação a outras rotas de produção. Isso se dá, principalmente, no que tange à preservação ambiental, visto que os bioprocessos são, em geral, conduzidos em condições operacionais mais amenas e com reduzida formação de subprodutos, o que facilitaria a etapa de separação, minimizando, ainda, os impactos ambientais relacionados à geração de efluentes industriais (Borzani *et al.*, 2001).

Desse modo, em processos biotecnológicos em escala industrial, os microrganismos comumente empregados para a produção de ácido glicônico são *Aspergillus niger* e *Gluconobacter suboxydans*. Quando *A. niger* é utilizado na produção de ácido glicônico, o mesmo é produzido por meio da desidrogenação da glicose em reação catalisada pela enzima glicose oxidase, com a obtenção de rendimento médio da ordem de 80% em relação ao valor máximo teórico (Hustede *et al.*, 1985).

A partir dos relatos de Zachariou & Scopes (1986) sobre o mecanismo bioquímico de obtenção de sorbitol e ácido glicônico pela ação de GFOR/GL de *Z. mobilis*, mencionado anteriormente, houve um aumento do interesse de grupos de pesquisa no desenvolvimento de alternativas biotecnológicas para a produção simultânea de ambas as substâncias. Em decorrência disso, um expressivo número de artigos científicos foi publicado, resultando no incremento do número de depósitos de patentes relacionados à produção de sorbitol e ácido glicônico ou seus sais (Hardman & Scopes, 1988; Rehr *et al.*, 1991; Silveira *et al.*, 2007).

Em um cultivo de *Z. mobilis* utilizando sacarose ou mistura em concentração equimolar de glicose e frutose, em batelada convencional, etanol é o principal produto e o acúmulo de sorbitol corresponde a cerca de 11% do substrato consumido (Viikari, 1984).

Visto que a ação do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* resulta na formação equimolar de seus produtos de oxidação e redução, seu uso industrial é ainda inviável devido à menor demanda comercial de ácido glicônico em relação ao sorbitol (Jonas & Silveira, 2004). Entretanto, cabe salientar que o complexo GFOR/GL pode ser usado na produção de outras aldolactonas além de gliconolactona (Zachariou & Scopes, 1986; Satory *et al.*, 1997).

Em ensaios de bioconversão de substratos em produtos via GFOR/GL, Satory *et al.* (1997), Malvessi (2008) e Malvessi *et al.* (2013) demonstraram que GFOR é capaz de catalisar a oxidação de diversas aldoses aos seus respectivos ácidos aldônicos, bem como de reduzir várias cetoses aos seus respectivos polióis. Os autores testaram vários substratos alternativos na reação de oxidação catalisada por GFOR, onde a frutose foi utilizada como substrato aceptor de elétrons e outros carboidratos redutores foram utilizados em substituição à glicose como, por exemplo, maltose, galactose e lactose. Por meio destes resultados, é possível verificar que, embora haja uma ampla gama de substratos que pode ser utilizada por GFOR objetivando a produção dos seus ácidos correspondentes, a afinidade por estes deve ser considerada. O uso de GFOR para a produção dos ácidos aldônicos, como é o caso dos ácidos lactobiônico e maltobiônico é muito promissor, pois a enzima tem a capacidade de catalisar a conversão de soluções de açúcares em produtos que apresentam potencial de aplicação em áreas diversas.

A produção de ácidos orgânicos pode ocorrer por meio de diversos processos. Para a produção de ácido lactobiônico via processo bioquímico, a conversão da lactose com o emprego de enzimas de *Pseudomonas graveolens* foi relatada por Nishizuka & Hayaishi (1962). Na referida reação, a oxidação da lactose a lactobiono- δ -lactona é seguida da hidrólise, por ação enzimática da lactonase, a ácido lactobiônico.

Outra forma de obtenção de ácido lactobiônico foi estudada por Miyamoto *et al.* (2000) que, em cultivo de *Pseudomonas* sp LS13 em meio contendo soro de leite, com

aproximadamente 50 g/L de lactose e 5 g/L de peptona, foi obtido aproximadamente 44 g/L de ácido lactobiônico em 60 horas de processo. Outros testes foram realizados e, utilizando-se concentrações crescentes de lactose, rendimentos de 90% foram alcançados com 150 ou 200 g/L de lactose. Além disso, os autores relatam a baixa eficácia do emprego do soro do leite em batelada alimentada em função do aumento de viscosidade do meio. Contudo, os autores relatam a obtenção de 290 g/L de ácido lactobiônico ao final de 155 horas de cultivo utilizando 150 g/L de lactose inicial com adição intermitente de 50 g de lactose + 0,8 g de peptona.

O estudo realizado por Severo (2008) vem ao encontro do uso de outras aldoses para a produção dos respectivos ácidos aldônicos, em alternativa ao uso da glicose, ao trabalhar com a produção de ácido lactobiônico a partir de lactose como carboidrato redutor. Nesse sentido, o autor demonstrou que a principal vantagem do uso do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* em relação aos processos tradicionais de obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol é a operação em condições mais amenas, resultando um menor gasto energético.

Ainda, empregando soro de leite como matéria-prima, Alonso *et al.* (2011) avaliaram, em cultivo de *Pseudomonas taetrolens*, o efeito do pH sobre a produção de ácido lactobiônico. Para tanto, com o pH do cultivo mantido acima de 6,5 durante a fase de crescimento celular e controlado em 6,5 no período da formação do ácido, produtividade de 1,12 g/L/h foi atingida. Igualmente, Alonso *et al.* (2015) demonstraram a possibilidade de obtenção de ácido lactobiônico em um sistema de co-metabolismo, empregando soro do leite juntamente com glicose, glicerol ou lactose. Conforme a alteração do co-substrato empregado juntamente com o soro de leite, diferentes resultados foram observados ao final da fermentação realizada por *P. taetrolens*. Dessa forma, utilizando-se soro de leite e glicose, o resultado da fermentação foi a produção simultânea de ácido lactobiônico e glicônico; com o uso de soro do leite com glicerol como co-substrato, foi obtida maior biomassa em detrimento

do ácido lactobiônico formado e, ainda, utilizando-se soro do leite e lactose, a fermentação resultou em maior quantidade de ácido lactobiônico formado em comparação aos demais experimentos.

Mirescu (2007) relata a produção de ácido lactobiônico e maltobiônico por meio da oxidação química de lactose e maltose, respectivamente, por catálise química empregando ouro como catalisador. Embora o uso de processos biotecnológicos apresentem diversas vantagens frente aos processos químicos, são raros os relatos na literatura especializada referentes à bioprodução de ácido maltobiônico.

Meiberg *et al.* (1990) relatam a utilização de maltose e lactose em processo fermentativo de *Pseudomonas cepacia* para a produção de ácido maltobiônico, lactobiônico e respectivos sais. Nesse sentido, os autores conduziram os ensaios de fermentação com o pH mantido na neutralidade por meio da adição de soluções aquosas alcalinas, formando os sais referentes aos respectivos ácidos aldônicos. Por fim é relatada etapa de separação do produto da biomassa por filtração, sendo atingida conversão entre 70 a 95% de ácido lactobiônico.

Também com o uso de bactérias do gênero *Pseudomonas*, Byford & Stodola (2011), reportam a oxidação de maltose a ácido maltobiônico por *P. graveolens*, onde o principal interesse foi a obtenção dos respectivos sais de cálcio, seguido da etapa de precipitação com o uso de etanol visando sua potencialidade de aplicação na indústria farmacêutica.

2.3 MATÉRIAS-PRIMAS PARA A BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS ALDÔNICOS

2.3.1 Lactose

Formada pela condensação de monossacarídeos - a partir de uma molécula de glicose e uma de galactose - esse dissacarídeo (Figura 2) presente no leite, sintetizado naturalmente, é

responsável por conferir a ele sabor levemente adocicado (Budavari, *et al.*, 1996). A lactose, de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$, é um pó branco, cristalino, solúvel em água e insolúvel em álcool e éter. Conforme Carminatti (2001), a molécula de lactose torna-se sensível às modificações enzimáticas e/ou químicas em função do seu número de sítios ativos. É essa característica que permite que sejam aplicados processos de modificação enzimática e/ou química para a obtenção de produtos de diversas aplicações, a exemplo do ácido lactobiônico.

A lactose pode ser obtida do soro do leite bovino industrial, por meio de purificação, retirando-se proteínas, gorduras, vitaminas e minerais. A utilização do soro do leite para a obtenção de lactose é um processo que encontra justificativa no fato deste ser um resíduo da indústria de queijo que não pode ser descartado sem tratamento prévio (Brito, 2007).

Sob a ótica industrial, a lactose encontra aplicação, sobretudo, na indústria alimentícia, no preparo de leites melhorados, farinhas, entre outros. Não obstante, a mesma pode ser empregada na indústria biotecnológica, em meios de cultura e, ainda, pode ser amplamente utilizada na indústria farmacêutica, no preparo de formulações, em injeções intravenosas entre outros (Rowe *et al.*, 2009).

Biologicamente, lactose encontra também aplicação na produção de etanol como relata Murari (2013), que empregou lactose oriunda do soro do leite para a produção desse combustível utilizando *Kluyveromyces marxianus* 229.

2.3.2 Soro do leite

O soro do leite ou soro do queijo é um subproduto da indústria queijeira, originado durante o processo de produção de queijos, sendo caracterizado como o líquido restante da precipitação e remoção da caseína do leite, por meio do processo de coagulação ácida ou enzimática. O soro do leite representa, aproximadamente, 85 a 90% do volume de leite

utilizado para a transformação em queijo, conservando cerca de 55% dos nutrientes presentes no leite (Guimarães *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2013). Ainda, o soro em pó é definido como o produto adequado para o consumo humano oriundo da desidratação do soro ou soro ácido, por meio de processos industriais tecnologicamente compatíveis (Codex Alimentarius, 2005).

Para que seja produzido o soro do leite em pó, diferentes operações unitárias podem ser empregadas. Dentre elas, as principais são a separação por membranas, a evaporação a vácuo, a cristalização e a secagem em *spray dryer* (Perrone, 2010).

O crescimento da produção de queijo traz, por consequência, o aumento da geração de soro do leite, subproduto dessa indústria. Esse subproduto é um poluente em potencial e, quando descartado de forma incorreta, pode causar grandes impactos no meio ambiente, vez que o mesmo possui grande carga orgânica, oferecendo riscos à natureza.

Nesse sentido, o aproveitamento do soro do leite como matéria prima para a indústria de laticínios já foi considerado oneroso. Porém, com as constantes modificações e restrições impostas pela legislação ambiental, proibindo o descarte desse material *in natura* em função do seu potencial poluidor, relacionado à grande Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e, com as comprovações científicas do valor nutricional de seus componentes, aliadas ao avanço na tecnologia de fracionamento, o soro do leite tem se tornado largamente requisitado como ingrediente ou, ainda, como precursor de ingredientes na indústria alimentícia (Gernigon, *et al.*, 2010 *apud* Perrone, 2010).

Nesse contexto, o soro pode ter, basicamente, três principais destinos. O primeiro seria o processamento do mesmo até produtos diversos, em função de suas propriedades alimentares, dentre os quais pode-se citar iogurtes, sorvetes, bebidas lácteas, alimentos infantis. O segundo destino seria sua utilização diretamente na alimentação animal, também muito usado pelas indústrias, já que algumas possuem, junto à produção de queijo, a produção leiteira. Haveria também a possibilidade do emprego de técnicas de tratamento

químico/biológico do soro do leite para posterior lançamento no esgoto ou recurso hídrico permitido (Brandão, 1994 *apud* Carminatti, 2001).

Conforme Perrone (2010), a variação na composição do leite ao longo do ano, assim como as diferentes tecnologias empregadas nas indústrias de queijo, tem por consequência grandes variações na composição físico-química do soro de leite produzido. Na Tabela 1 é apresentada a composição média e algumas características físico-químicas do soro do leite em pó.

Tabela 1: Composição média e características físico-químicas do soro do leite em pó

Característica físico-química ou constituinte	Concentração
Sedimentos	Máximo 200 mg.L ⁻¹
pH (após dissolução)	Mínimo 6,3
Acidez titulável (após dissolução)	Máximo 0,12%
Ácido Láctico	Máximo 200 mg.L ⁻¹
Gordura	Máximo 0,05%
Lactose	70 – 74%
Proteínas	Mínimo 12%
Cálcio	Máximo 300 mg.L ⁻¹
Magnésio	Máximo 100 mg.L ⁻¹
Cloro	Máximo 1200 mg.L ⁻¹

Fonte: Westergaard (2001)

Em se tratando de composição do soro do leite, segundo Mizubuti (1994), a quantidade média de proteínas presentes no soro é de 0,7%, o que equivale a, aproximadamente, 20 a 25% do total de proteínas encontradas no leite.

Do mesmo modo, o carboidrato mais importante presente no leite e, conseqüentemente, no soro do leite, é a lactose, sendo identificadas, ainda, concentrações muito baixas de outros monossacarídeos, a exemplo da glicose e da galactose (Perrone, 2010).

Em função da composição rica em proteínas, nutrientes e carboidratos, o soro do leite encontra emprego, atualmente, como substrato alternativo e de baixo custo para a condução de bioprocessos. Inúmeras pesquisas têm corroborado o potencial de uso desse substrato em processos biotecnológicos, tais como na produção bioetanol (Gabardo, 2015), de enzimas (Zhou *et al.*, 2013), de ácidos orgânicos (Ramchandran *et al.*, 2012), de biogás (Perna *et al.*, 2013), de polissacarídeos (Silva *et al.*, 2009), dentre outros compostos.

Ainda no contexto biotecnológico, Burlani (2014) relata a obtenção de concentrações entre 10 e 15 g/L de bioetanol a partir do soro do leite por *K. marxianus* como alternativa ao descarte deste subproduto da indústria de queijo.

Outro emprego do soro do leite na indústria biotecnológica é para a produção de bioaromas. Luz (2010) descreve o emprego de soro do queijo para a produção dos principais constituintes do aroma de queijo suíço por meio de processo fermentativo com *Propionibacterium freudenreichii*.

2.3.3 Maltose

Formada por duas moléculas de glicose unidas por ligações α -1,4, a maltose é um dissacarídeo redutor. A maltose possui higroscopicidade muito baixa, em todas as umidades relativas, se comparada aos sacarídeos com maior grau de polimerização. Dessa forma, pode ser aplicada na química de alimentos, no controle da atividade de água. Atualmente, um novo mercado para o uso de maltose está vinculado ao uso de malto-oligosacarídeos como forma

de fonte de energia e fibra alimentar para bactérias lácticas probióticas (Gaouar *et al.*, 1997 *apud* Limberger, 2012; Marchal *et al.*, 1999; Cereda & Vilpoux, 2003).

Esse dissacarídeo também tem aplicação na indústria farmacêutica, em formulações orais e parenterais e é, de forma genérica, considerado uma substância atóxica e não irritante (Rowe *et al.*, 2009).

Na área da biotecnologia, há relatos do emprego de maltose como substrato para o cultivo de leveduras produtoras de etanol (Silveira, 2013) e, também, alusão à fermentação de maltose realizada por *Saccharomyces cerevisiae* (Hollatz, 2004). Ademais, maltose encontra aplicação na produção de ácido maltobiônico por rota biotecnológica, por meio de linhagens de *Pseudomonas* (Meiberg *et al.*, 1990; Byford & Stodola, 2011).

2.3.4 Xarope de maltose

Tradicionalmente, o xarope de maltose é obtido por meio da hidrólise ácida ou enzimática do amido de milho, utilizado como fonte de carboidrato. Contudo, outras fontes de carboidrato podem ser utilizadas para a produção de xarope de maltose, a exemplo do emprego de arroz e mandioca, largamente cultivada no Brasil (Eduardo, 2002; Limberger, 2012).

De forma geral, o xarope de maltose é produzido em três fases, quais sejam, gelatinização e liquefação em altas temperaturas, seguidas pela etapa de sacarificação, com o emprego de α -amilase e β -amilase. Por meio desses processos, é possível a obtenção de xaropes com até 60% de maltose. Cabe salientar que o uso de enzimas para a produção de xarope de maltose agrega diversos benefícios, a exemplo da operação em condições mais brandas, havendo menos reações secundárias e evitando o escurecimento do produto desejado. Relatos da literatura demonstram a possibilidade de se produzir um xarope com altíssimo teor

de maltose (cerca de 85% de maltose) por meio do uso de enzimas desramificadoras, a exemplo da isoamilase, que rompem a ligação glicosídica da amilopectina, juntamente com a α -amilase que, por sua vez, não tem capacidade de rompê-las (Maldonado & Lopez, 1995 *apud* Eduardo, 2002).

Diferentes tipos de maltose podem ser produzidos industrialmente e classificados de acordo com sua composição. A Tabela 2 apresenta os três diferentes tipos de xarope produzidos na indústria de maltose e sua Dextrose Equivalente (DE) que, por sua vez, expressa a quantidade de açúcares redutores presentes no produto, apresentada em porcentagem do total da substância.

Tabela 2: Tipos de xaropes de maltose comerciais e Dextrose Equivalente (DE)

Xarope	Glicose (%)	Maltose (%)	DE (%)
Xarope de alta conversão	35	30-45	62-63
Xarope de alta concentração de maltose	5	48-52	48-52
Xarope de altíssima concentração de maltose	5	70-85	50-60

Fonte: Adaptado de Limberger (2012)

O xarope de maltose, em virtude de suas características singulares, encontra aplicação em diversos processos industriais na área de alimentos, a exemplo dos processos de fermentação, panificação, confeitaria e na indústria de bebidas. Relatos na literatura apontam para o uso de xarope de maltose para fins farmacêuticos, como veículo de transporte de vacinas, antibióticos, nutrientes intravenosos e para a produção de adoçante maltitol sendo, esse último uso, restrito ao xarope com teor de maltose superior a 70% (Eduardo, 2002; Limberger, 2012; Shaw & Sheu, 2014).

Outrossim, Venturini Filho e Cereda (1998) relatam que, na indústria cervejeira, é possível realizar a substituição parcial do malte, utilizado para a produção de cerveja, por xaropes de alto teor de maltose com a finalidade de se reduzir os custos de produção, constituindo nisso, outro emprego industrial para o xarope de maltose.

Não obstante, conforme o descrito, o xarope de maltose é uma fonte predominantemente de maltose que tem potencial de aplicação, ainda, na produção de ácido maltobiônico por meio do uso do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*.

2.4 SORBITOL E ÁCIDOS ALDÔNICOS: APLICAÇÕES

Sorbitol é um poliálcool, também conhecido como D-sorbitol ou D-glicitol, amplamente encontrado na natureza, em várias espécies vegetais, principalmente em frutas (Freitas, 1990). É largamente utilizado na indústria de alimentos como edulcorante, como condicionador de umidade e inibidor da cristalização de açúcares. É também empregado industrialmente como biossurfactante em produtos de limpeza, como matéria-prima básica para produção do ácido ascórbico e como emoliente em cosméticos (Silveira & Jonas, 2002; Nitschke & Pastore, 2002; Jonas & Silveira, 2004).

Entre os ácidos orgânicos, destaque é dado ao ácido lactobiônico, resultado da oxidação da lactose, devido ao seu alto valor comercial e importantes aplicações nas áreas médica, farmacêutica, química, de alimentos e nanotecnologia (Gutiérrez *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2013).

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, conforme pode ser observado na Figura 2 (Budavari *et al.*, 1996). Devido às suas atividades farmacológicas, o ácido lactobiônico apresenta possibilidades de aplicações em

formulações cosméticas em função do seu poder hidratante, cicatrizante e anti-radicaís livres, bem como pode ser aplicado no melhoramento da solubilidade de antibióticos tais como a eritromicina e a claritromicina (Tasic-kostov *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2013).

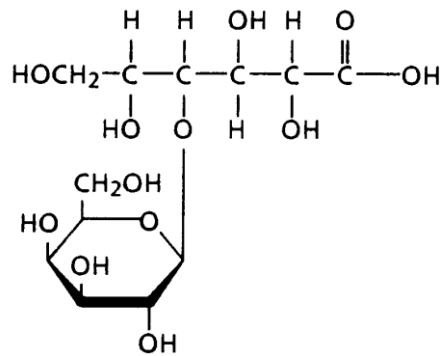


Figura 2: Fórmula estrutural do ácido lactobiônico. Fonte: Budavari *et al.* (1996)

Ainda no contexto farmacêutico, o ácido lactobiônico pode ser empregado em formulações destinadas à suplementação de cálcio e como ingrediente em desinfetante à base de clorexidina (Gutiérrez *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2013). O ácido lactobiônico é também empregado como componente de soluções usadas na estabilização de órgãos antes de serem transplantados, capaz de suprimir os danos causados aos tecidos pelos radicais livres, contribuindo para a preservação extra-corpórea de órgãos por até 48 horas (Sumimoto & Kamada, 1990). É empregado, ainda, na vetorização de drogas, como estratégia terapêutica de liberação do princípio ativo em sítios específicos de ação como, por exemplo, no fígado (Kim & Kim, 2002; Kim *et al.*, 2004; Valle *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2013) e, ainda, com possíveis efeitos pré-bióticos (Schaafsma, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2012).

No âmbito alimentício, o ácido lactobiônico encontra aplicação sob a forma de acidulante na produção de queijos (Koka *et al.*, 2002), como agente de endurecimento, portador de cálcio em bebidas funcionais, atua na redução de acidificação e tempo de maturação para a produção de queijo e iogurte, é usado no aperfeiçoamento de sabores, na

melhoria do gosto amargo ou azedo de alguns alimentos, na preservação do aroma e frescor e, também, na preparação de produtos lácteos com reduzido teor de lactose (Merril & Singh, 2009; Nakano *et al.*, 2010; Playne & Crittenden, 2009; Gutierrez *et al.*, 2012).

Já nas esferas química e nanotecnológica, o ácido lactobiônico obtém destaque como íon sequestrante em soluções detergentes, como co-constituente biodegradável em sabões em pó, nos revestimentos anti-corrosivos, sob a forma de seletor quiral para a separação de fármacos básicos por eletroforese capilar (claritromicina, lactobionato) e na engenharia de tecidos (Gerling, 1998; Yu *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2012).

Ainda como alternativa ao uso de glicose ou lactose como fonte doadora de elétrons, há relatos da conversão de maltose a ácido maltobiônico pela ação do complexo enzimático GFOR/GL (Satory *et al.*, 1997; Malvessi *et al.*, 2013). O ácido maltobiônico, por sua vez, (Figura 3) pode ser usado para ajudar a preservar o colágeno e proteger células da pele do estresse oxidativo, atuando com função antioxidante. O ácido maltobiônico tem alta capacidade umectante, com maior capacidade de retenção de água quando comparado ao ácido lactobiônico e a outros agentes hidratantes tradicionais. Segundo os autores, é ainda, anti-alérgico, não-irritante para a pele humana, melhora a textura da pele e auxilia na redução de linhas e rugas (Green & Briden, 2009; Brouda, *et al.*, 2010).

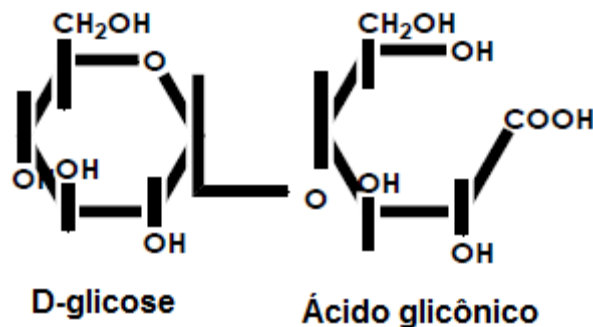


Figura 3: Fórmula estrutural do ácido maltobiônico. Fonte: Neostrata Company (2010).

Farris *et al.* (2012) testaram formulações de cosméticos contendo ácido maltobiônico, para o melhoramento da pele, contemplando parâmetros como a aparência, rugas, pigmentações irregulares e perda de firmeza. Os testes apresentam resultados positivos na melhora da pele, demonstrando que o ácido maltobiônico, devido as suas propriedades, apresenta potencial de aplicação na indústria farmacêutica e vem ganhando espaço nas tecnologias que dizem respeito à indústria cosmetológica.

Nesse sentido, foi registrada uma patente que compreende o uso de ácido maltobiônico para a formulação de produtos com a finalidade cosmetológica e dermatológica. Esses produtos são empregados nos cuidados gerais com o corpo amenizando eritemas cutâneos e nos cuidados com a pele, cabelo, unhas, mucosas oral e vaginal, incluindo sua utilização nos processos associados ao envelhecimento de origem intrínseca e extrínseca, a exemplo dos danos causados por fatores como a luz solar, radiação, poluição do ar, vento, frio, calor, umidade, produtos químicos, fumaça e em decorrência do tabagismo (Yu & Van Scott, 2006).

Estudos revelam o uso de complexos de baixo peso molecular entre ferro e ácido maltobiônico, que podem ser administrados por via parenteral, intramuscular ou por via subcutânea, no tratamento de estados anêmicos, causadas por deficiência de ferro e em formulações farmacêuticas indicadas para este uso (Modena, *et al.*, 2013).

Contudo, o uso de maltose na etapa de bioconversão para ácido maltobiônico pelo complexo enzimático GFOR/GL estaria condicionada à obtenção de matérias-primas complexas em substituição à maltose purificada, como xaropes para fins de aplicação industrial, ou ainda, hidrolisados enzimáticos, de modo a minimizar os custos de produção. Este aspecto diz respeito também à lactose, com a identificação de outras fontes complexas contendo lactose, a serem empregadas na bioprodução de ácido lactobiônico.

2.5 IMOBILIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES E BIOCONVERSÃO

A imobilização de biocatalisadores está relacionada ao confinamento físico de células e/ou enzimas numa certa região ou ligadas a uma matriz, de forma que sua atividade catalítica esteja preservada total ou parcialmente e que possam ser utilizadas contínua e repetidamente (Szczo drak, 2000; Kourkoutas *et al.*, 2004). A utilização de células imobilizadas em bioprocessos é relativamente recente, cujas vantagens estão relacionadas à possibilidade de uso de altas concentrações celulares no reator, eliminação de ciclos externos de células, obtenção de maiores fatores de conversão de substrato em produto, maior facilidade em termos de controle do processo, melhor uniformidade do produto, e ainda, o emprego de altas taxas de diluição sem que haja o arraste das células (Zanin & Moraes, 2004).

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. Essas 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 (Zanin & Moraes, 2004).

Na maioria dos casos estudados e relatados na literatura, o processo de imobilização atua no sentido de aumentar a estabilidade da atividade catalítica das enzimas (Cowan & Fernandez-Lafuente, 2011).

Para a implementação da tecnologia de imobilização em escala industrial, os custos do processo devem ser compensados com o aumento do rendimento em produto, sendo, portanto, avaliados suportes de baixo custo para simplificar o processo fermentativo, principalmente no que diz respeito às condições operacionais (Vignoli *et al.*, 2006).

De um modo geral, o sucesso da tecnologia de imobilização mostra que as vantagens deste processo superam suas limitações. Porém, alguns fatores devem ser destacados, não como uma desvantagem do processo, mas sim como pontos a serem evitados ou prevenidos. Dentre esses 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 (Zanin & Moraes, 2004; Kourkoutas *et al.*, 2004). Esses 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).

Para a imobilização por encapsulamento do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, é descrito o emprego de suportes como alginato de cálcio (Chun & Rogers, 1988; Bertasso *et al.*, 1996; Malvessi *et al.*, 2010), κ -carragena (Rehr *et al.*, 1991) e ainda diferentes polímeros (Ferraz *et al.*, 2000).

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 (Sassolas *et al.*, 2011).

Rehr *et al.* (1991), comparando o uso de células de *Z. mobilis* ATCC 29191, permeabilizadas e imobilizadas em κ -carragena, em processo descontínuo, relatam a obtenção de velocidades máximas específicas de produção de sorbitol e ácido glicônico de 1,8 e 2,1

g/g.h, para células livres e de 1,4 e 1,8 g/g.h, para células imobilizadas em κ -carragena respectivamente. Os autores sugerem que os valores inferiores obtidos com células imobilizadas foram devidos a problemas difusionais ou ainda causados pela inativação parcial da enzima durante a imobilização. Em ensaio em biorreator de leito fluidizado, as esferas de κ -carragena foram tratadas com glutaraldeído e polietilamina, substâncias que têm a função de estabilizar a atividade da enzima e reforçar a reticulação das esferas de κ -carragena, prevenindo o extravasamento das células. A estabilidade operacional foi marcadamente afetada, pois apenas 3,5% de perda de atividade foi observada em um período de 75 dias de processo contínuo.

Utilizando células imobilizadas em suporte de alginato de cálcio, Malvessi *et al.* (2010) relatam a estabilidade do sistema enzimático ao ser utilizado em operações de longo prazo. Os autores observaram, ainda, em função da barreira difusional representada pelas esferas de alginato de cálcio, o transporte de ácido glicônico do interior das esferas para o meio externo foi dificultado. Esse fato acarretou, possivelmente, a formação de ambiente inadequado para a ação das enzimas, sugerindo a necessidade de maiores estudos acerca do tema com o emprego de outras técnicas e/ou suportes de imobilização e a definição de biorreatores mais eficientes.

2.6 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIOCONVERSÃO

Silveira *et al.* (2007) demonstraram a possibilidade de separar os produtos finais da reação utilizando sucessivas precipitações com solventes orgânicos comuns como etanol, metanol, ácido acético glacial, dentre 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 seriam praticáveis porque os compostos formados no processo –

lactobionato e/ou maltobionato de sódio - são praticamente insolúveis e sorbitol é solúvel em etanol. De acordo com Valle *et al.* (2013), a utilização desta técnica de recuperação proporciona a obtenção de elevada pureza isomérica do lactobionato de sódio.

Além disso, há relatos do emprego de etanol para a precipitação dos respectivos sais de sódio ou de cálcio dos ácidos lactobiônico e maltobiônico, como forma de recuperação dos produtos de fermentação por diferentes microrganismos (Meiberg *et al.*, 1990; Byford & Stodola, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

Foi utilizada a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (adquirida do DSM 3580), cedida pelo *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Braunschweig, Alemanha). As culturas foram mantidas em meio líquido, repicadas mensalmente e estocadas a 4°C (Malvessi *et al*, 2006).

3.2 MEIO DE CULTIVO

Para as etapas de ativação e conservação das culturas, preparo de inóculo e na produção de biomassa/enzimas foi utilizado o meio líquido descrito por Malvessi *et al.* (2006) que continha em sua composição (g/L): (NH₄)₂SO₄, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 1,0; KH₂PO₄, 3,5; extrato de levedura bruto (Prodex Lac®, Prodesa S.A, Brasil), 7,5.

No preparo do meio de ativação e conservação da cultura foram adicionados 20 g/L de glicose e o pH ajustado para 5,5. Para a produção de inóculo, a concentração de glicose presente no meio foi de 100 g/L, com a suplementação de 5 g/L de CaCO₃ com a finalidade de manter-se o pH em torno de 5,5. Para os cultivos em biorreator de bancada, foi preparada uma solução concentrada de glicose (500 g/L), sendo adicionado ao meio o volume necessário desta solução para atingir-se a concentração desejada (150 g/L).

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

3.3 PRODUÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS E ETANOL

O inóculo foi preparado em frascos de 500 mL contendo 450 mL de meio, inoculados com 45 mL da cultura previamente ativada. Os meios foram mantidos sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U/H – B. Braun Biotech, Sartorius), a 30°C, por cerca de 12 horas, em condição de anaerobiose. Os frascos eram dotados de filtros esterilizados, que permitiam a liberação de CO₂ decorrente do metabolismo microbiano.

A produção de biomassa e enzimas foi realizada em regime descontínuo, em biorreator de bancada com agitação mecânica, de 7,0 litros de volume total e 5,5 litros de volume útil. O meio de cultivo foi inoculado com o volume necessário para obter-se uma suspensão celular de 20 unidades de D.O. (densidade ótica). A temperatura foi mantida a 30°C, com controle de pH em 5,5 pela adição automática de NaOH 5 mol/L. Com a finalidade de garantir a anaerobiose, durante a primeira hora de cultivo foi borbulhado nitrogênio gasoso no meio, à vazão de 0,5 L/min. Após, a anaerobiose foi proporcionada pelo CO₂ produzido pelo próprio microrganismo.

Ao término do cultivo, o meio fermentado foi recolhido e centrifugado (Centrífuga Sigma 4K-15), a 5836 xg, por 10 minutos. Determinada alíquota de sobrenadante foi estocada visando a posterior análise do etanol formado. A biomassa concentrada foi ressuspensa em água destilada, permeabilizada, estocada para a utilização e, quando necessário, imobilizada em alginato de cálcio.

3.4 PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS DE *Zymomonas mobilis*

A permeabilização celular foi feita com o intuito de inativar o metabolismo fermentativo e evitar que, em ensaios enzimáticos e de bioconversão, ocorresse crescimento

celular e a conversão do substrato em etanol. Este procedimento, entretanto, não exerce efeito negativo sobre a atividade de GFOR, uma vez que trata-se de uma enzima periplasmática e, ainda, o NADP^+ , cofator essencial para a enzima, permanece ligado à proteína. A permeabilização celular foi realizada com base na metodologia descrita por Rehr *et al.* (1991), com algumas modificações. A uma suspensão de células de concentração 25 g/L, foi adicionado igual volume de solução 0,2% (m/v) de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB). A mistura foi mantida a 4°C, sob agitação magnética, por 10 minutos. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada (Centrífuga Sigma 4K-15), a 5836 xg, por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e a biomassa centrifugada ressuspensa em água destilada.

3.5 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS DE *Zymomonas mobilis*

A metodologia empregada para o encapsulamento de *Z. mobilis* em alginato de cálcio seguiu a metodologia descrita por Carra (2012). Primeiramente, o alginato de cálcio foi dissolvido em água (4% m/v) e mantido sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Após esse período, à solução de alginato de cálcio, foi adicionado igual volume de suspensão de células de *Z. mobilis* permeabilizadas em 70 g/L, previamente tratada com glutaraldeído 0,5% (m/v). A mistura foi novamente mantida sob agitação por cerca de 2 horas para a perfeita homogeneização. Para a formação das esferas de alginato de cálcio e imobilização das células, todo o volume da suspensão foi lentamente gotejado através de agulhas hipodérmicas, com auxílio de uma bomba peristáltica, em solução de CaCl_2 0,3 mol/L. Após essa etapa, as esferas foram reticuladas com glutaraldeído 0,5% (m/v), sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 10 minutos, objetivando-se tornar a estrutura mais rígida para impedir o extravasamento das células. As esferas foram lavadas e, posteriormente, armazenadas em água, a 4°C.

3.6 ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE E GLICONO- δ -LACTONASE DE *Zymomonas mobilis*

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em reator de 200 mL, contendo 100 mL de solução de substratos. Os substratos avaliados em associação à frutose e utilizados em diferentes concentrações, foram maltose monohidratada (Sigma-Aldrich/SP, 99% de pureza) e as matérias-primas complexas xarope de maltose (Malteggill 45/82, gentilmente cedido por Cargill Agrícola S.A./SP.) e soro de leite (cedido por Laticínios Porto Alegre Ind. e Com. Ltda, MG). Os laudos de análise das referidas matérias-primas são apresentados nos Anexos 1 e 2.

A temperatura da reação foi mantida em 39°C por meio de banho termostaticado e o pH foi controlado em 6,4 pela adição automática de solução de NaOH contida em uma bureta, acoplada ao controlador de pH. A concentração da solução de NaOH empregada foi dependente da velocidade reacional, sendo utilizadas soluções entre 0,25 e 1,0 mol/L.

Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da equação de Michaelis-Menten foram estimados utilizando-se, para tanto, soluções de maltose/frutose, xarope de maltose/frutose e soro de leite/frutose, em testes com células/enzimas livres, previamente permeabilizadas com CTAB. A concentração de biocatalisador utilizada foi de 0,05 g/L, conforme definido por Carra (2012) para os substratos lactose e glicose. Na condução dos ensaios enzimáticos, a concentração de um dos substratos foi mantida constante e alta (0,7 mol/L), enquanto a concentração do outro substrato foi variada, seguindo a metodologia descrita por Zachariou & Scopes (1986).

Para os testes empregando-se maltose e frutose, a atividade enzimática foi avaliada: i) fixando-se a concentração inicial de maltose em 0,7 mol/L e variando-se a concentração

inicial de frutose de 0,08 a 0,7 mol/L; ii) fixando-se a concentração inicial de frutose em 0,7 mol/L e variando-se a concentração inicial de maltose entre 0,05 e 0,7 mol/L.

Nos ensaios enzimáticos com o uso de xarope de maltose e frutose, a quantidade de xarope (utilizada em solução) foi determinada de forma a conter a massa de maltose desejada, visto que o xarope comercial utilizado possuía, aproximadamente, 42% de maltose. Nestas condições, a atividade enzimática foi avaliada: i) fixando-se a concentração inicial de maltose presente no xarope de maltose em 0,7 mol/L e variando-se a concentração inicial de frutose de 0,02 a 0,7 mol/L; ii) fixando-se a concentração inicial de frutose em 0,7 mol/L e variando-se a concentração inicial de maltose (contida no xarope) entre 0,01 e 0,7 mol/L.

Da mesma forma, os ensaios utilizando-se soro do leite e frutose foram conduzidos de modo que a quantidade de soro do leite foi determinada a partir da concentração de lactose presente no soro do leite liofilizado (aproximadamente 79%).

A atividade enzimática foi avaliada: i) mantendo-se constante a concentração inicial de lactose (contida no soro de leite) em 0,7 mol/L e variando-se a concentração inicial de frutose entre 0,02 e 0,7 mol/L; ii) mantendo-se constante a concentração inicial de frutose em 0,7 mol/L e variando-se a concentração de lactose (contida no soro) de leite entre 0,01 e 0,7 mol/L.

Os parâmetros cinéticos (K_M e $V_{m\acute{a}x}$) da equação de Michaelis-Menten foram calculados pelo método de linearização de Lineweaver-Burk (duplo recíproco), com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

3.7 ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO

Com o intuito de avaliar a formação dos produtos via ação do sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* frente aos diferentes substratos, foram realizados ensaios de

bioconversão com células permeabilizadas livres e também, posteriormente, com o biocatalisador imobilizado em alginato de cálcio. Os resultados apresentados demonstram a média dos valores obtidos para os diversos ensaios realizados.

O sistema utilizado para a determinação da atividade do complexo enzimático GFOR/GL e nos ensaios de bioconversão está ilustrado na Figura 4.

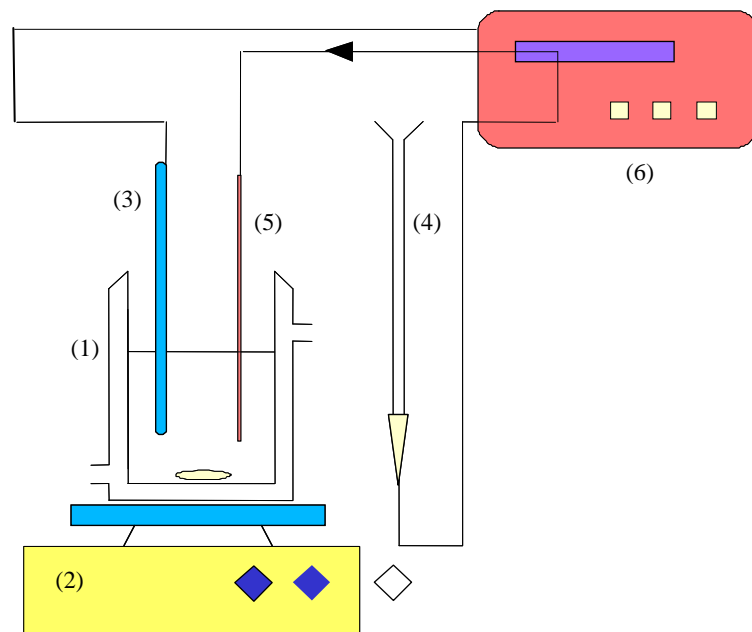


Figura 4: Esquema do sistema empregado nos ensaios enzimáticos e nos processos de bioconversão. (1) biorreator enzimático, sob temperatura controlada; (2) agitador magnético; (3) eletrodo de pH; (4) bureta contendo NaOH; (5) adição de NaOH; (6) controlador de pH.

Fonte: Malvessi (2008)

Os ensaios de bioconversão foram realizados em reator com agitação magnética contendo 100 mL de meio reacional. As condições experimentais padrão de pH e temperatura foram 6,4 e 39°C, respectivamente e foram utilizados 20 g/L de biocatalisador – livre ou imobilizado em alginato de cálcio. A mistura reacional foi mantida com pH controlado pela

adição automática de solução alcalina (NaOH 7 mol/L), proveniente de uma bureta de 50 mL, acoplada ao controlador de pH.

3.7.1 Bioprodução de ácido maltobiônico

Para a avaliação da produção de ácido maltobiônico foram conduzidos, nas condições supracitadas, ensaios de bioconversão com células livres e, ainda, com células/enzimas imobilizadas em alginato de cálcio. Os ensaios foram procedidos com concentração inicial de maltose e frutose de 700 mmol/L. Como fontes de maltose para a produção de ácido maltobiônico foram empregadas, respectivamente, maltose monohidratada e xarope de maltose. Salienta-se que, quando do uso de xarope de maltose a concentração de 700 mmol/L foi definida em relação ao teor de maltose presente no xarope.

A fim de se determinar o efeito do pH e da temperatura na ação catalítica do sistema GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio, foram realizados ensaios de bioconversão com a utilização de 700 mmol/L de maltose monihidratada + frutose e 20 g/L de biocatalisador. O efeito do pH foi avaliado mantendo-se a temperatura da reação enzimática constante em 39°C, em valores de pH de 6,0; 6,4; 6,8 e 7,2. Para a determinação do efeito da temperatura na produção de ácido maltobiônico, o pH reacional foi mantido constante em 6,4 e a reação foi conduzida a 36, 39, 43 e 47°C.

3.7.2 Bioprodução de ácido lactobiônico

A avaliação da produção de ácido lactobiônico, frente ao uso dos substratos lactose monohidratada (Vetec/RJ) e soro do leite liofilizado, foi realizada por meio de ensaios de bioconversão com células permeabilizadas livres e imobilizadas em alginato de cálcio. Todos

os ensaios foram conduzidos em temperatura padrão de 39°C e pH 6,4, empregando-se 20 g/L de biocatalisador livre ou imobilizado, em meio reacional de 100 mL, contendo concentrações de substrato de 700 mmol/L de lactose e frutose.

É importante ressaltar que, quando foi empregado soro do leite como fonte de lactose nos ensaios de bioconversão, a concentração de soro do leite foi determinada de acordo com a concentração de lactose contida no soro do leite, para que houvesse, no início da bioconversão, 700 mmol/L de lactose.

3.8 DESPROTEINIZAÇÃO DO SORO DO LEITE

A precipitação das proteínas presentes no soro de leite foi realizada por meio de método químico, com acidificação do meio até o ponto isoelétrico das proteínas solúveis presentes em maior concentração (pH 5,1) com ácido láctico (84,5 – 85,5%) P.A. (Vetec), sob agitação constante, à temperatura ambiente, seguindo metodologia adaptada de Barbosa(2007).

Após realizada a acidificação da solução de soro de leite, foram separadas as proteínas precipitadas por centrifugação, realizada por 10 minutos (Sigma, modelo 4-15). O sobrenadante foi recolhido para concentração da solução em rotaevaporador (Buchi Vacuum Controler V-850) à temperatura de 60°C e, posteriormente, utilizado em testes de bioconversão. A massa de proteína precipitada foi descartada.

3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As esferas de alginato de cálcio foram submetidas à análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Laboratório Central de Microscopia Professor Israel Baumvol da

Universidade de Caxias do Sul, antes e após os ensaios de bioconversão. Para tanto foi utilizado microscópio Shimadzu modelo SSX 550. O preparo das amostras foi realizado conforme a metodologia descrita por Fernandes (2013) adaptada de Echlin (2009).

3.10 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DE BIOCONVERSÃO

No decorrer do processo de bioconversão o pH da reação foi controlado pela adição de hidróxido de sódio (NaOH 7 mol/L), conforme descrito anteriormente. A adição de solução alcalina ao meio implica a formação dos sais correspondentes, ou seja, para o ácido maltobiônico o sal formado foi maltobionato de sódio e, de igual maneira, para o ácido lactobiônico, o sal formado foi o lactobionato de sódio.

A separação dos sais de sódio e do sorbitol presentes no meio reacional ao final do processo de bioconversão foi preliminarmente avaliada utilizando-se os solventes etanol, metanol, éter, acetona e ácido acético. Após a identificação do melhor agente precipitante, a separação foi realizada por meio de sucessivas precipitações do sal (lactobionato ou maltobionato de sódio) utilizando-se etanol (Murakami *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2007).

Foi adicionado à solução resultante do processo de bioconversão (contendo o sal de interesse, sorbitol e concentrações residuais dos substratos utilizados) etanol em concentração de 90 a 96% (m/v) até uma concentração final de solvente na solução de 75% (m/v). A etapa de precipitação foi conduzida à temperatura constante de 45°C por meio de banho termostaticado, sob agitação magnética e a vazão de adição de etanol foi mantida constante em 9 mL/min, controlada por meio do auxílio de bomba peristáltica (Oliveira *et al.*, 2015). Posteriormente, a solução foi mantida em temperatura inferior a 0°C pelo período mínimo de 12 horas. Transcorrido esse período, as duas fases formadas foram separadas e os cristais

depositados foram ressolubilizados em água destilada, até obter-se volume igual ao volume inicial de solução de bioconversão utilizada.

Com o objetivo de obter-se maior grau de pureza dos produtos da bioconversão, a etapa de precipitação e ressolubilização supra descrita foi repetida até a totalização de três precipitações. O sobrenadante, resultado das etapas de precipitação, foi destilado para a recuperação do solvente.

3.11 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.11.1 Coleta e tratamento de amostras

As amostras dos cultivos de *Z. mobilis* foram retiradas periodicamente para a determinação da concentração de açúcares redutores e formação de biomassa. Ao término dos cultivos, o meio foi submetido à centrifugação, a 11.180 xg por 10 minutos, as células concentradas foram ressuspensas em água destilada e armazenadas sob refrigeração, a 4°C.

3.11.2 Determinação da concentração celular

Para os cultivos em biorreator, a determinação da concentração celular foi realizada diretamente por gravimetria, onde, um volume conhecido de amostra foi submetido à centrifugação, em tubo Eppendorf, por 10 minutos a 11.180 xg, após, os sólidos centrifugados foram lavados, novamente centrifugados e transferidos para um cadinho previamente limpo, seco e pesado. O cadinho foi seco em estufa a 90°C por 24 horas e, após o resfriamento em desumidificador, a massa de células secas foi estimada por pesagem, descontando-se a massa

inicial do cadinho. Dessa forma, a concentração celular foi determinada pela divisão da massa de células secas pelo volume da amostra.

Em ensaios fermentativos, a concentração celular foi também determinada pela medida da absorvância, a 560nm, de suspensões diluídas de células e convertida em concentração, massa de matéria seca por unidade de volume, por uma curva de calibração.

3.11.3 Determinação de açúcares redutores (AR)

Os carboidratos solúveis redutores foram analisados pelo método do ácido 3,5 di-nitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). Para tanto, as amostras foram convenientemente diluídas em água destilada, levando-se em consideração o tempo de cultivo. Em tubo de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de amostra diluída a 0,75 mL de solução DNS. O branco foi feito substituindo-se o volume de amostra diluída por água destilada. Os tubos foram colocados em banho a 100°C por 5 minutos, sendo, em seguida, resfriados em banho de gelo e, após, foram acrescentados 4mL de água destilada às preparações. Desse modo, a absorvância das preparações foi lida em espectrofotômetro (Aurora Instruments, EUA) a 545 nm e a concentração de açúcares redutores presente nas amostras foi determinada através de curva de calibração construída com soluções de glicose entre 0,1 e 1,0 g/L, submetidas ao mesmo procedimento.

3.11.4 Determinação de etanol

O teor de etanol obtido ao final do cultivo de *Z. mobilis* foi determinado em equipamentos acoplados Densimat e Alcomat (Gibertini, Italy), em que a concentração do álcool é obtida com base na densidade da solução.

3.11.5 Determinação de frutose

O método utilizado para a quantificação de frutose no meio reacional após a etapa de bioconversão foi aquele 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 4,0 mol/L (Assumpção & Morita, 1968). A análise foi realizada adicionando-se 1,8 mL de reagente de Seliwanoff a 0,2 mL de amostra previamente diluída. A mistura foi mantida em banho, a 100°C, por 15 minutos, sendo, posteriormente, resfriada em banho de gelo por 2 minutos. Após realizada essa etapa, 3 mL de água destilada foram adicionados à solução e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210), a 486 nm. A concentração foi definida a partir curva de calibração construída com solução de frutose entre 0,1 e 1,0 g/L.

3.11.6 Determinação de sorbitol

A determinação de sorbitol foi realizada seguindo-se o método proposto por Venzon & Miron (2008). Para tanto, 1 mL de formato de potássio 0,7 mol/L e 2,0 mL de periodato de potássio 3,5 mM foram adicionados à 0,2 mL de amostra previamente diluída. Após transcorrido 1 minuto, foi adicionado 1,5 mL do Reagente I. O preparo do Reagente I consistiu na mistura de 7 g de acetato de amônio dissolvido em 20 mL de água destilada e 0,160 g de tiosulfato de sódio dissolvido em 10 mL de água. Foi então acrescentado 0,5 mL de acetilacetona à mistura e, após, o volume da solução foi completado para 50 mL com água destilada.

Os tubos contendo a mistura reacional foram mantidos a 100°C por 2 minutos e, na sequência, colocados em banho de gelo por 2 minutos. A absorbância das amostras foi lida em

espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210), a 412 nm, e convertida em concentração com o uso de curva padrão de sorbitol entre 0,010 – 0,018 mg/mL.

3.11.7 Determinação da atividade do complexo enzimático GFOR/GL

O método empregado se baseia na capacidade de conversão de frutose/aldose, por células de *Z. mobilis*, em sorbitol e respectivo ácido orgânico, em reações catalisadas pelas enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL). O procedimento para a determinação da atividade de GFOR/GL foi baseado no proposto por Malvessi *et al.* (2006) onde, uma vez determinado volume de suspensão de células permeabilizadas, correspondente à concentração de 4 g/L (células livres), foi adicionado à solução 0,7 mol/L dos carboidratos (100 mL de frutose/aldose), preparada em água destilada. Os testes foram realizados em reator de 300 mL, com 100 mL de meio reacional, em banho termostaticado, mantido sob agitação magnética, por 40 minutos e o pH foi controlado pela adição de solução de NaOH 1mol/L contida em pipeta de 10 mL, utilizando controlador de pH, sendo as condições básicas de reação pH 6,4 e 39°C. Assim, a partir da variação do volume de álcali gasto no controle do pH com o tempo, foi determinada a velocidade de formação do ácido orgânico avaliado.

Uma unidade de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol de ácido orgânico por hora, nas condições de teste, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células em base seca (U/g) (Malvessi, 2008).

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

Uma vez que o ácido aldônico e o sorbitol são formados em base equimolar, sendo estes os únicos produtos da reação enzimática, maltose ou lactose e frutose são consumidos na mesma proporção. Dessa forma, foram estimadas, indiretamente, as concentrações dos produtos e do sorbitol em função do volume e concentração da solução de NaOH utilizada para neutralizar o ácido formado na reação.

Para determinar a quantidade de produtos da reação foi utilizada a Equação 1.

$$C_P = \frac{V_b \times M \times M_M}{(V_T + V_b)} \quad (1)$$

Sendo:

C_P : concentração de produto formado (g/L);

V_b : volume de base (mL);

M : concentração de base (mol/L);

M_M : massa molar do produto (ácido lactobiônico/maltobiônico = 358,3 g/mol; sorbitol = 182,17 g/mol);

V_T : volume total da bioconversão (100 mL).

Para a determinação da quantidade de substrato consumido durante a bioconversão foi empregada a Equação 2.

$$C_{S,f} = C_{S,i} - \frac{V_b \times M \times M_{MS}}{(V_T + V_b)} \quad (2)$$

Onde:

$C_{S,f}$: concentração de substrato consumido (g/L);

$C_{S,i}$: concentração de substrato inicial (g/L);

V_b : volume de base (mL);

M : concentração de base (mol/L);

M_{MS} : massa molar do substrato (lactose/maltose = 360 g/mol; frutose = 180 g/mol);

V_T : volume total da bioconversão (100 mL).

Cumprе ressaltar que os procedimentos de determinação de substratos e produtos também foram utilizados por outros autores. Severo Junior (2008) e Pedruzzi *et al.* (2011), por meio de cromatografia líquida (HPLC), determinaram a concentração de produtos e substratos resultantes do processo de bioconversão realizado com células permeabilizadas de *Z. mobilis*. Os autores determinaram as referidas concentrações, também, por meio de inferência a partir do volume e concentração de álcali empregado para controle do pH reacional no processo. Nesse sentido, segundo os autores, os dois métodos de determinação dos produtos e substratos residuais da bioconversão são equivalentes. Apenas sorbitol e ácido lactobiônico foram observados como produtos da bioconversão, por meio das análises cromatográficas.

3.11.9 Parâmetros de avaliação do processo de bioconversão

A seguir são apresentados os parâmetros utilizados para a avaliação do processo de bioconversão.

3.11.9.1 Fator de produção específica

O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S0}$) foi determinado pela divisão do número de mols de produto formado pelo número de mols de substrato inicial na solução, definido por mmol de produto/mmol de substrato inicial).

3.11.9.2 Produtividade molar e produtividade específica

A produtividade molar (p) foi calculada pela divisão do número de mols de produto formado pelo tempo de processo, expresso em mmol de produto/h. A produtividade específica (q), foi expressa em mmol de produto por grama de células secas por hora (mmol/g/h).

3.11.9.3 Velocidade específica de formação de produto

A máxima velocidade específica de formação de produto ($\mu_{p,m\acute{a}x}$), diretamente relacionada à atividade de GFOR/GL, foi determinada nas primeiras horas do processo de bioconversão, quando a variação da concentração de produto com o tempo é aproximadamente constante. No cálculo, foi determinada graficamente, por regressão linear, a velocidade de formação do ácido orgânico produzido neste período inicial, sendo este valor dividido pela concentração celular utilizada no ensaio. Os valores de $\mu_{p,m}$ foram expressos em mmol de produto por grama de células secas por hora (mmol/g/h).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo tem por objetivo apresentar e discutir os resultados obtidos no decorrer deste trabalho. Primeiramente, é apresentada uma descrição geral do cultivo para a obtenção de células/enzimas GFOR/GL e etanol por *Z. mobilis*. Na sequência, são apresentados os testes enzimáticos, visando a obtenção dos parâmetros cinéticos aparentes K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da equação de Michaelis-Menten para os diferentes pares de substratos, os ensaios de bioconversão com células/enzimas permeabilizadas livres e imobilizadas de *Z. mobilis* com as diferentes aldoses ou matérias-primas complexas e os estudos relacionados ao efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de GFOR/GL para maltose e frutose, utilizando células imobilizadas de *Z. mobilis*.

Para finalizar, foram realizados estudos comparativos de bioprodução de ácido lactobiônico e maltobiônico empregando células livres ou imobilizadas de *Z. mobilis*, seguidos da etapa de recuperação dos ácidos orgânicos obtidos no processo de bioconversão.

4.1 PROCESSO GLOBAL DE OBTENÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS E ETANOL EM CULTIVO DE *Zymomonas mobilis*

Para a realização dos ensaios descritos nesse trabalho, a biomassa/enzimas de *Z. mobilis* foi obtida em regime descontínuo, em cultivos em biorreator de mistura completa, utilizando o meio que continha glicose e sais nutrientes, sem alterações nos parâmetros operacionais, seguindo a metodologia descrita no item 3.3 (Anexo 3). Nesse sentido, ao final do cultivo a biomassa foi centrifugada, permeabilizada e/ou imobilizada, conforme a proposta de uso do catalisador para ensaios enzimáticos ou de bioconversão.

4.2 CINÉTICA DO COMPLEXO ENZIMÁTICO GFOR/GL PARA DIFERENTES CARBOIDRATOS

Um modelo aplicável para se determinar a cinética de reações catalisadas por enzimas é o modelo proposto por Leonor Michaelis e Maud Menten. A equação de Michaelis-Menten é demonstrada por um segmento de hipérbole retangular, relacionando a velocidade da reação em função da concentração de substrato. Contudo, utilizando-se esse modelo matemático, é difícil determinar com precisão a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante cinética (K_M). Nesse sentido, uma transformação linear usual, aplicável à equação de Michaelis-Menten, é a linearização de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) descrita na equação 3 (Schmidell, *et al.*, 2001).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

Sendo:

K_M : constante de Michaelis-Menten

V: velocidade inicial

$V_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima

S: concentração de substrato

Cabe ressaltar que a constante de Michaelis-Menten (K_M) é única para cada par enzima-substrato. Dessa forma, diferentes substratos que reagem com a mesma enzima o fazem com valores diferentes de K_M (Raimundo, 2003).

A formação do complexo enzima/substrato pode ser considerada constante, contanto que a velocidade da reação seja determinada em um intervalo de tempo curto, com variação insignificante da concentração do substrato (Taipa & Gama, 2003 *apud* Carra, 2012). Dessa

forma, para a determinação dos parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten, foi utilizada a concentração de células/enzimas de *Z. mobilis* de 0,05 g/L, determinada por Carra (2012), onde o substrato encontra-se, provavelmente, em excesso em relação à concentração do biocatalisador.

A cinética de GFOR/GL para o par de substratos glicose/frutose segue a equação de Michaelis-Menten podendo-se determinar os parâmetros cinéticos aparentes pela equação 3 desde que seja mantida fixa a concentração de um dos substratos (Zachariou & Scopes, 1986; Hardman & Scopes, 1988). Destarte, os parâmetros cinéticos para as reações enzimáticas conduzidas utilizando-se maltose (purificada ou contida no xarope de maltose) foram calculados a partir da mesma equação, substituindo-se o K_M por K_F (constante de Michaelis-Menten para frutose), K_{MA} (constante de Michaelis-Menten para maltose) ou K_X (constante de Michaelis-Menten para a maltose contida no xarope de maltose) e substituindo-se o substrato S por F (frutose), MA (maltose purificada) ou X (maltose proveniente de xarope de maltose).

Dessa forma, primeiramente foi avaliada a cinética enzimática de GFOR/GL com o par de substratos maltose/frutose. Os ensaios enzimáticos foram realizados com concentração de frutose constante em 0,7 mol/L e variando-se a concentração de maltose de 0,05 a 0,7 mol/L e, também, mantendo-se a concentração de maltose em 0,7 mol/L e variando-se a concentração de frutose (0,08 a 0,7 mol/L). Os ensaios foram conduzidos em biorreator, sob agitação magnética, contendo 100 mL de solução de substratos e 0,05 g/L de células/enzimas permeabilizadas. Na Figura 5 são apresentados os dados experimentais obtidos nos ensaios e os ajustes previstos pela equação de Michaelis-Menten.

Nos ensaios conduzidos com o emprego de concentração de maltose fixa em 0,7 mol/L, pode ser observado um incremento na atividade enzimática à medida que a concentração de frutose foi sendo aumentada, até aproximadamente 0,5 mol/L. A partir dessa concentração, valores semelhantes em termos de atividade foram observados, em torno de 17

U/g (Figura 5A). Nos ensaios enzimáticos onde a concentração de frutose foi fixada em 0,7 mol/L, verificou-se um perfil semelhante, porém, à medida que ocorreu incremento na concentração de maltose houve, também, aumento na atividade enzimática (Figura 5B).

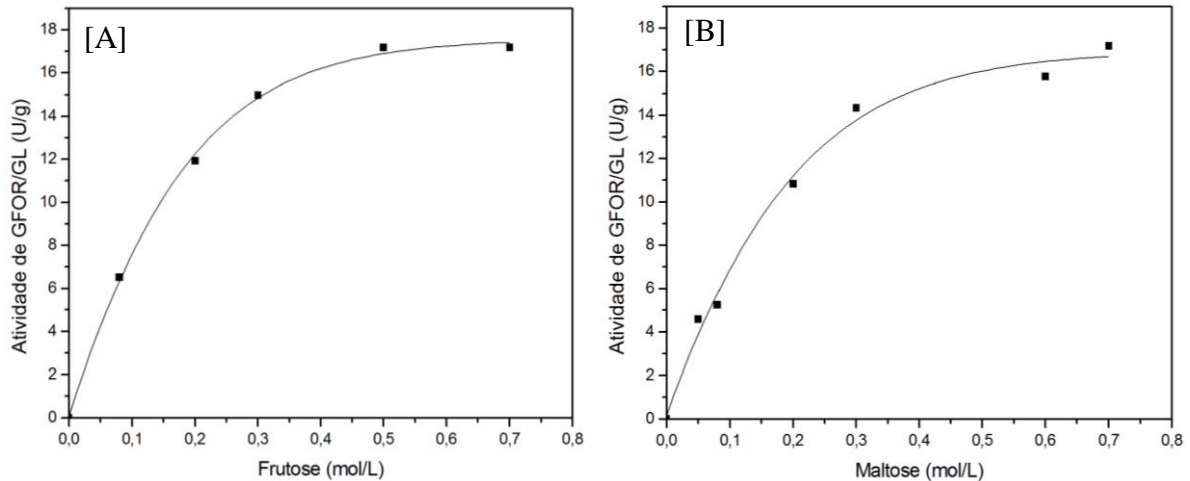


Figura 5: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*, com diferentes concentrações de frutose e maltose, a 39°C e pH 6,4. [A] maltose (0,70 mol/L) + frutose (0,08 a 0,7 mol/L); [B] frutose 0,70 mol/L + maltose (0,05 a 0,7 mol/L).

(■) valores experimentais; (—) valores do ajuste para a equação de Michaelis-Menten.

Resultados semelhantes de atividade enzimática, em torno de 18 U/g, foram relatados por Malvessi (2008) avaliando a atividade de GFOR/GL frente à maltose, empregando também células livres e permeabilizadas de *Z. mobilis* em solução de maltose/frutose com concentração de 0,7 mol/L.

Na Tabela 3 são apresentados os valores aparentes de K_F , K_{MA} e $V_{m\acute{a}x}$, estimados a partir dos dados obtidos nos ensaios enzimáticos de maltose e frutose. De acordo com os resultados, pode-se supor que o uso de maltose levaria à obtenção de maior velocidade de acoplamento ao complexo enzimático quando comparada à frutose, com K_{MA} de 0,19 mol/L,

embora, como observado na Tabela 3, os valores obtidos de K_M tenham sido muito próximos para ambos os substratos.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos aparentes K_F , K_{MA} e $V_{máx}$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* com maltose e frutose como substratos.

Parâmetros cinéticos	Valor estimado
$V_{máx}$ (U/g)	25
K_F (mol/L)	0,22
K_{MA} (mol/L)	0,19

$V_{máx}$, velocidade máxima; K_F , constante de Michaelis-Menten para frutose; K_{MA} , constante de Michaelis-Menten para maltose.

Utilizando maior concentração de biocatalisador, 4 g/L de células/enzimas permeabilizadas de *Z. mobilis*, Malvessi (2008) relata a obtenção de valor superior de $V_{máx}$ e K_M empregando maltose/frutose como substratos, sendo atingidos valores da ordem de 47 U/g e 2 mol/L, respectivamente. Ainda, Carra (2012) descreve valor de K_M de 0,019 mol/L para o par glicose/frutose, em ensaios realizados nas mesmas condições do presente trabalho, o que indica a alta afinidade entre GFOR e o substrato glicose. Se comparados, a afinidade de GFOR por glicose seria cerca de 10 vezes superior à obtida com maltose.

Em um segundo momento, os parâmetros cinéticos K_F , K_X e $V_{máx}$, relativos à equação de Michaelis-Menten, foram determinados empregando-se xarope de maltose como fonte de maltose, levando-se em consideração o teor médio de 42% de maltose. A quantidade de xarope empregado nos ensaios foi determinada para que, fixando-se frutose em 0,7 mol/L, a maltose presente no meio fosse variada de 0,01 a 0,7 mol/L. Ainda, quando a concentração de maltose presente no xarope foi fixada em 0,7 mol/L, a concentração inicial de frutose foi

variada de 0,02 a 0,7 mol/L. Na Figura 6 são apresentados os dados relativos aos ensaios enzimáticos realizados utilizando-se xarope de maltose e frutose.

A partir da Figura 6 pode-se observar que, fixando-se a concentração de maltose (presente no xarope de maltose) em 0,7 mol/L e variando-se a frutose, foi identificado o perfil crescente da atividade enzimática de GFOR/GL ao passo que a concentração inicial de maltose é aumentada (Figura 6A). Por outro lado, na Figura 6B, é mostrado que com o uso de frutose fixa em 0,7 mol/L e com a concentração de xarope variada, a atividade é crescente até 0,3 mol/L de maltose, seguida de um patamar em valores próximos a 55 U/g na presença de concentrações de maltose ainda superiores.

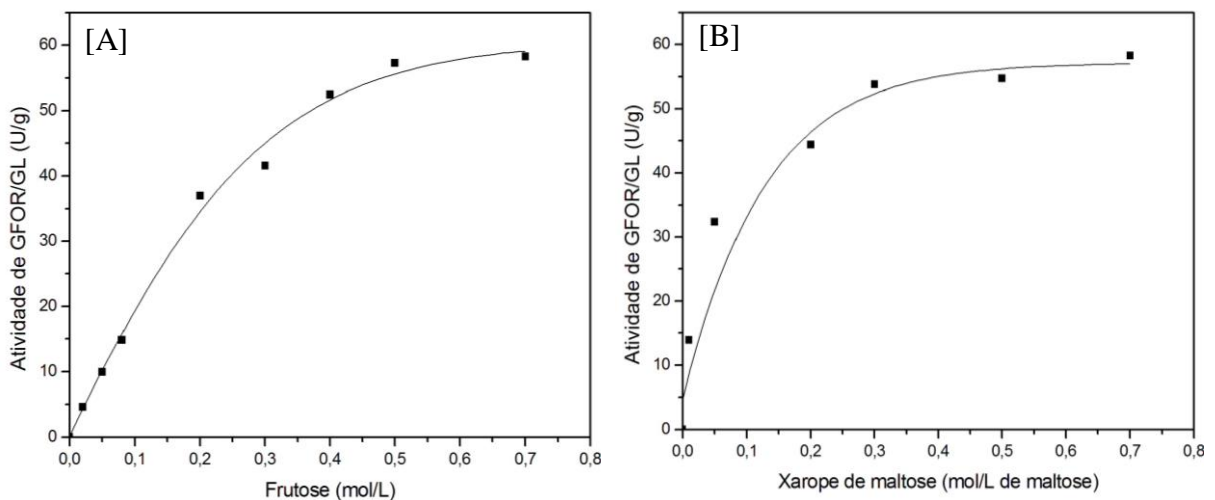


Figura 6: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*, com diferentes concentrações de frutose e xarope de maltose, a 39°C e pH 6,4. [A] xarope de maltose (0,70 mol/L de maltose) + frutose (0,02 a 0,7 mol/L); [B] frutose 0,70 mol/L + xarope de maltose (0,01 a 0,7 mol/L de maltose).

(■) valores experimentais; (—) valores do ajuste para a equação de Michaelis-Menten

Com base nos resultados obtidos nos ensaios enzimáticos apresentados na Figura 6, foram estimados os valores das constantes cinéticas aparentes K_F , K_X e $V_{m\acute{a}x}$ para o par xarope de maltose/frutose, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos aparentes K_F , K_X e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* com xarope de maltose e frutose como substratos.

Parâmetros cinéticos	Valor estimado
$V_{m\acute{a}x}$ (U/g)	56
K_F (mol/L)	0,39
K_X (mol/L)	0,03

$V_{m\acute{a}x}$, velocidade máxima; K_F , constante de Michaelis-Menten para frutose; K_X , constante de Michaelis-Menten para xarope de maltose.

Quando utilizados xarope de maltose/frutose na avaliação cinética de GFOR/GL fica evidenciado que, a partir dos valores de K_F e K_X determinados, os componentes presentes no xarope de maltose são os substratos que têm maior afinidade com o complexo enzimático, com K_X de 0,03 mol/L e a frutose é o substrato limitante ($K_F = 0,39$ mol/L).

Pode-se observar ainda, a partir do uso de xarope de maltose/frutose como substratos para os ensaios de atividade enzimática, que a velocidade máxima obtida foi semelhante à relatada por Malvessi (2008) e Carra (2012), 52 e 60 U/g, respectivamente, com a utilização do par glicose/frutose, substratos preferenciais para o sistema GFOR/GL. Destaca-se o fato de que Malvessi (2008), para a determinação dos parâmetros cinéticos com o par glicose/frutose, utilizou soluções dos dois substratos em concentrações equimolares, sendo verificado resultado próximo ao alcançado no presente estudo.

O aumento no valor desse parâmetro operacional, aproximando-se ao relatado para o par glicose/frutose, acredita-se ser devido ao uso do xarope de maltose em substituição à

maltose purificada, uma vez que, na composição daquela matéria-prima, conforme Limberger (2012), estão presentes outros carboidratos além da maltose, a exemplo de dextrose, glicose e maltotriose, que poderiam estar sendo utilizados preferencialmente na reação enzimática na conversão de outros compostos, como ácidos aldônicos. Isso ocorre em função da maior afinidade de GFOR por glicose, que tende a ser convertida primeiramente em ácido glicônico para que ocorra, na sequência, a conversão dos demais açúcares nos respectivos ácidos orgânicos, impactando, dessa forma, nas constantes cinéticas encontradas.

Cumprе ressaltar que a determinação das constantes cinéticas aparentes K_F , K_X e $V_{máx}$, para o par xarope de maltose/frutose, foi realizada em função apenas da maltose presente no meio reacional (42%). Ou seja, para a determinação da concentração de xarope de maltose a ser empregado, levou-se em consideração somente o teor de maltose presente nessa matéria-prima, sem levar em conta os demais carboidratos existentes, a exemplo da glicose que representa, em média, 5% desse material (Limberger, 2012).

Dessa forma, a presença de outros carboidratos, cuja afinidade do sistema enzimático é possivelmente superior, interferiu de forma relevante nos resultados obtidos para as constantes cinéticas aparentes, tendo em vista que implicaram o aumento da velocidade máxima e diminuição da constante de Michaelis-Menten (aumento da afinidade com esse substrato). Assim, deve-se atentar para tal fato quando da comparação desses resultados ($K_X = 0,03$ mol/L) com os obtidos nos testes enzimáticos utilizando maltose purificada ($K_{MA} = 0,19$ mol/L).

Em um segundo momento, em substituição aos substratos maltose/frutose, foram procedidos ensaios de atividade enzimática empregando-se o par soro do leite (como fonte de lactose) e frutose, também com o intuito de definir as constantes K_M e V_M no que tange à formação de ácido lactobiônico. Entretanto, os resultados obtidos nos testes enzimáticos realizados neste trabalho, com o par de substratos soro do leite/frutose, apresentaram perfil

sigmoidal (Figura 7) e não se ajustaram ao modelo cinético de Michaelis-Menten não sendo possível, portanto, nas condições de condução dos ensaios, determinar os parâmetros cinéticos K_S , K_F e $V_{,máx}$.

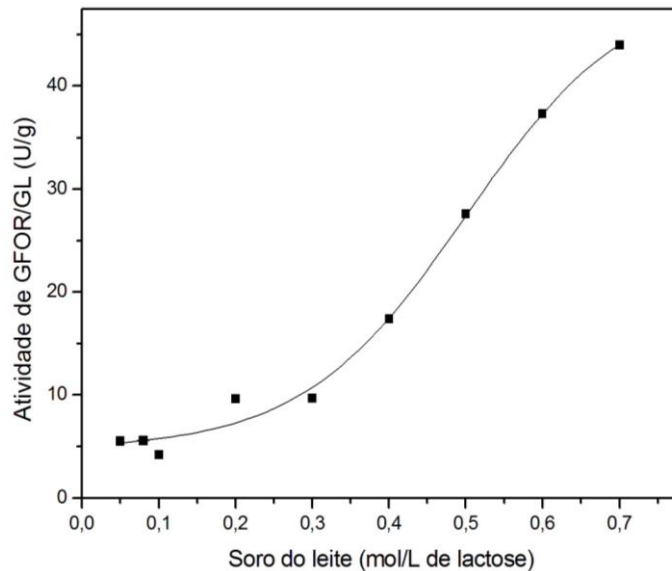


Figura 7: Atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*, utilizando frutose 0,70 mol/L + soro do leite (0,05 a 0,7 mol/L de lactose), a 39°C e pH 6,4.

Esse resultado corrobora o que Malvessi (2008) obteve realizando ensaios de atividade enzimática com 4 g/L de células permeabilizadas de *Z. mobilis*, utilizando soluções com diferentes concentrações equimolares de lactose/frutose, onde os resultados alcançados não se ajustaram ao modelo cinético de Michaelis-Menten.

Pedruzzi *et al.* (2011), de forma semelhante, constataram que a cinética de GFOR/GL de células permeabilizadas de *Z. mobilis* em concentração de 7,2 g/L, na presença do par de substratos lactose/frutose, apresentou um comportamento sigmoidal em decorrência do aumento da concentração de lactose, diferenciando-se do comportamento hiperbólico característico da cinética de Michaelis-Menten.

Visando-se comparar o efeito da utilização de diferentes substratos purificados e também substratos alternativos na atividade enzimática de GFOR/GL, determinou-se a relação $V_{m\acute{a}x}/K_M$, indicador da efici\ecia catal\eticica do processo. Os par\ametros cin\eticos para os pares de substratos avaliados neste estudo est\ao apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Par\ametros cin\eticos e rela\cao $V_{m\acute{a}x}/K_M$ de ensaios enzim\aticos de GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* empregando-se maltose/frutose e xarope de maltose/frutose.

Par\ametros cin\eticos	Substratos	
	maltose/frutose	xarope de maltose/frutose
$V_{m\acute{a}x}$ (U/g)	25	56
K_F (mol/L)	0,22	0,39
K_X (mol/L)	-	0,03
K_{MA} (mol/L)	0,19	-
$V_{m\acute{a}x}/K_F$ (U.L/g.mol)	114	144
$V_{m\acute{a}x}/K_X$ (U.L/g.mol)	-	1867
$V_{m\acute{a}x}/K_{MA}$ (U.L/g.mol)	132	-

$V_{m\acute{a}x}$, velocidade m\axima; K_F , constante de Michaelis-Menten para frutose; K_{MA} , constante de Michaelis-Menten para maltose; K_X , constante de Michaelis-Menten para xarope de maltose.

A rela\cao $V_{m\acute{a}x}/K_X$ \e\ cerca de 15 vezes superior do que a rela\cao $V_{m\acute{a}x}/K_{MA}$, o que indica a maior afinidade entre o complexo enzim\atico GFOR/GL e o par de substratos xarope de maltose/frutose em rela\cao ao par maltose/frutose. Esse fato pode contribuir para justificar a maior velocidade m\axima obtida em ensaios conduzidos empregando-se xarope de maltose, uma vez que a presen\ca de carboidratos preferenciais, como a glicose, induziria a forma\cao de outros \acidos org\nicos al\em do maltobi\onico. N\ao obstante, a diferen\ca encontrada entre a

relação $V_{\text{máx}}/K_F$ para os dois pares de substratos, com maiores valores para xarope de maltose (144 U.L/g.mol), pode indicar o aumento da eficiência catalítica quando utilizado xarope de maltose.

4.3 ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO COM CÉLULAS/ENZIMAS PERMEABILIZADAS DE *Zymomonas mobilis* COM DIFERENTES ALDOSES

Uma vez identificada a relação de afinidade do complexo GFOR/GL e o substrato maltose, foi avaliado o perfil de bioprodução do respectivo ácido orgânico nas condições padrão de pH e temperatura, empregando células de *Z. mobilis*, permeabilizadas e não imobilizadas.

Além da utilização de maltose e do xarope de maltose visando à bioprodução de ácido maltobiônico, foi também avaliada a formação de ácido lactobiônico com o uso das fontes de lactose. Apesar de não ter sido possível a determinação de K_M e $V_{\text{máx}}$ para o substrato soro de leite liofilizado (conforme apresentado e discutido no item 4.2), a sua conversão em ácido lactobiônico foi avaliada em comparação à utilização de lactose, sendo este último substrato empregado como substrato padrão purificado.

Foram então realizados os ensaios de bioconversão para os seguintes pares de substrato: i) maltose/frutose; ii) xarope de maltose/frutose; iii) lactose/frutose; iv) soro do leite/frutose, em solução de concentração equimolar (0,7 mol/L), com 20 g/L de biocatalisador, em reações conduzidas a 39°C e pH controlado em 6,4.

Necessário ressaltar que a concentração de 0,7 mol/L de xarope de maltose refere-se à maltose presente nessa matéria-prima. O mesmo ocorre com o uso de soro do leite, sendo a concentração de 0,7 mol/L, a concentração de lactose presente nesse substrato complexo.

A Tabela 6 demonstra os resultados gerais da produção de ácido maltobiônico e lactobiônico obtidos para cada par de substratos empregado. Cumpre referir que as células/enzimas de *Z. mobilis* utilizadas nas etapas de bioconversão foram oriundas de diferentes cultivos o que pode, em algum nível, ter interferido nos resultados obtidos. Não obstante, para a realização dos ensaios buscou-se utilizar sempre células/enzimas que tenham apresentado resultados semelhantes em testes de atividade enzimática, procedidos com células permeabilizadas, realizados previamente à etapa de bioconversão.

Tabela 6: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácidos orgânicos nos ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* utilizando diferentes matérias primas (aldose/frutose inicial 700 mmol/L; 39°C; pH 6,4).

Parâmetros de processo	Substratos			
	maltose/frutose	xarope de maltose/frutose	lactose/frutose	soro do leite/frutose
$P_{\text{máx}}$ (mmol/L)	550	600	490	430
t (h)	24	24	24	24
Y_{p/S_0} (mmol/mmol)	0,84	0,94	0,76	0,66
p (mmol/h)	2,47	2,74	2,21	1,91
q (mmol/g/h)	1,24	1,37	1,10	0,96
$\mu_{P,\text{máx}}$ (mmol/g/h)	11,16	18,13	3,81	2,45
S_f (mmol/L)	97,9	38,8	157,9	225,8

$P_{\text{máx}}$, concentração máxima de ácido orgânico; t, tempo de processo; Y_{p/S_0} , fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade molar; q, produtividade específica; $\mu_{P,\text{máx}}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , aldose residual.

Conforme a Tabela 6, foram obtidos maiores valores de concentração final de produto (ácidos orgânicos, predominantemente ácido maltobiônico) empregando-se o par xarope de maltose/frutose (aproximadamente 600 mmol/L). Ao passo que a maior conversão de substrato em produto foi aquela encontrada com o uso de xarope de maltose (com a possível interferência da glicose presente no meio, conforme já comentado), menores conversões foram obtidas com os outros substratos onde a maltose foi seguida pela lactose e pelo soro do leite, resultando concentrações finais aproximadas de 550, 490 e 430 mmol/L de produto, respectivamente. A menor concentração final de produto obtida utilizando-se soro do leite está relacionada, de forma provável, à composição dessa matéria-prima que apresenta, além de lactose, proteínas, gorduras, sedimentos, cálcio, magnésio, cloro, dentre outros, que podem estar interferindo negativamente no processo de bioconversão. Ademais, resta claro que a maior concentração final de produto obtida com o uso de xarope de maltose está relacionada à presença de glicose nessa matéria-prima, indicando que há a formação de ácido glicônico juntamente com ácido maltobiônico no meio reacional.

Outrossim, valores decrescentes de produtividade específica foram atingidos à medida que aldoses ou os substratos presentes nas matérias primas complexas com menores afinidades a GFOR/GL foram empregadas. Isso ocorre porque, ao longo do processo de produção as concentrações de substrato decrescem e, quanto menor for a afinidade entre complexo enzimático e substrato, representada por maiores valores de K_M , mais é afetada a velocidade global do processo e, conseqüentemente, a produtividade é fortemente afetada, fato evidenciado pela quantidade de substrato residual, maior nesses casos.

Entre as aldoses testadas no processo de bioconversão, valor superior de máxima velocidade específica de formação de produto (18 mmol/g/h) e de conversão (94%) foi alcançado com o emprego de xarope de maltose, fato esse que indica a maior afinidade do

complexo enzimático por essa matéria-prima como um todo e é devido, também, à presença de carboidratos como glicose não contabilizados na concentração de 700 mmol/L de maltose.

Também foram obtidos resultados relevantes na bioconversão com o uso de maltose como carboidrato (cerca de 11 mmol/g/h de ácido maltobiônico), corroborando os resultados obtidos por Malvessi (2008), que constatou, em ensaios de bioconversão com células permeabilizadas de *Z. mobilis* que, após a glicose, o substrato testado que apresentou maior afinidade com o complexo GFOR/GL foi a maltose purificada.

Com relação à produção de ácido lactobiônico, melhores resultados foram obtidos empregando-se lactose purificada em comparação ao uso de soro do leite como fonte de lactose, uma vez que, para o primeiro substrato foram obtidos maiores valores de máxima velocidade específica de formação de produto, produtividade específica e, conseqüentemente, maiores conversões, conforme demonstrado na Tabela 6. Contudo, o emprego de soro do leite para o processo de bioprodução de ácido lactobiônico, com conversão de 66% (Tabela 6), deve ser considerado, uma vez que esse substrato é um subproduto das indústrias de queijo e derivados e, dessa forma, consiste em uma alternativa que pode viabilizar a produção industrial do ácido lactobiônico por rota biotecnológica.

A Figura 8 apresenta o perfil de formação de ácidos orgânicos ao longo do processo de bioconversão em função do tempo de processo. Pode-se observar, na Figura 8A, que o par xarope de maltose/frutose foi o que atingiu maiores valores de concentração de ácidos orgânicos formados, seguido pelo par maltose/frutose que apresentou concentração de produto na ordem de 550mmol/L ao final de 24 horas de bioconversão.

No que tange à produção de ácido lactobiônico, o par lactose/frutose proporcionou a obtenção de maiores concentrações de ácido orgânico formado ao longo de todo o processo de bioconversão, resultando maior quantidade de produto final formado, como mostrado na Figura 8B. Ainda, em razão de sua composição complexa, o menor perfil de formação de

ácido orgânico com concentrações de produto inferiores foi obtido com a utilização do par soro do leite/frutose. Cumprе ressaltar que, embora o resultado mostrado para a formação de ácidos orgânicos em função do tempo utilizando-se lactose/frutose (Figura 8B), seja composto por poucos pontos amostrais, os resultados apresentados por Malvessi (2008) e Carra (2012) indicam perfil semelhante de formação de ácido lactobiônico em função do tempo.

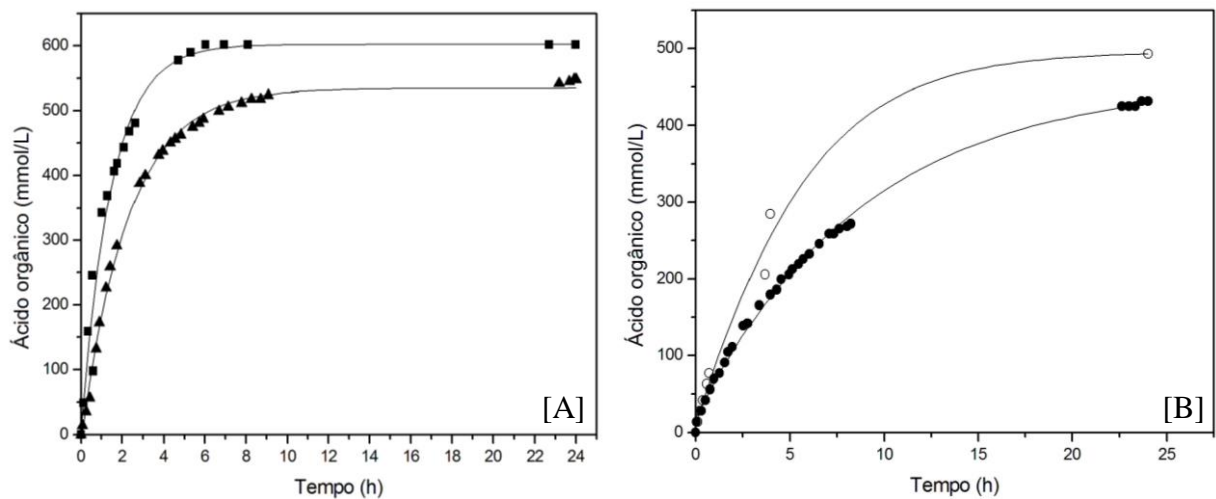


Figura 8: Formação de ácidos orgânicos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis*, em solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4.

[A] (■) xarope de maltose/frutose; (▲) maltose/frutose; [B] (○) lactose/frutose; (●) soro do leite/frutose.

Com base nos resultados obtidos para soro do leite pode-se inferir que, além da menor afinidade entre o complexo enzimático e o substrato lactose, pode haver outros interferentes no processo de bioconversão uma vez que a solução contendo soro do leite apresenta-se muito mais viscosa do que aquela empregando lactose purificada, o que pode dificultar as transferências de massa. Ainda, há quantidades consideráveis de proteína nesse meio que, apesar de não quantificadas, podem, em algum nível, interferir negativamente no processo de

bioconversão, diminuindo a velocidade de formação de produto, bem como a concentração de produto ao final das 24 horas de bioconversão.

4.4 BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO E MALTOBIÔNICO EMPREGANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Zymomonas mobilis*.

O processo de imobilização do complexo enzimático GFOR/GL está relacionado ao confinamento físico de células/enzimas em uma matriz polimérica de alginato de cálcio, de forma que a atividade enzimática seja preservada total ou parcialmente. Esse procedimento apresenta vantagens como a possibilidade de uso contínuo e repetido, de emprego de altas concentrações celulares no reator, a estabilidade catalítica, a facilidade de separação dos produtos da bioconversão, entre outras (Kourkoutas *et al.*, 2004; Zanin & Moraes, 2004).

Nesse contexto, na Figura 9 são apresentadas imagens produzidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) das células imobilizadas em alginato de cálcio antes e após o processo de bioconversão, para que se possa avaliar os possíveis efeitos desse processo sobre o sistema imobilizado, em se tratando da conformação das células/enzimas na matriz polimérica. Ainda, os resultados apresentados são um exemplo do que foi obtido experimentalmente, tendo em vista que o ensaio foi realizado com várias amostras.

Como pode-se observar nas Figuras 9 A e B, antes da bioconversão o sistema imobilizado em alginato apresenta conformação esférica e as células/enzimas estão dispostas com alta densidade e uniformemente na matriz.

Ainda, após a etapa de bioconversão (Figuras 9 C e D) o sistema imobilizado apresentou pequena diferença na conformação esférica em relação à imagem anterior. Atribuiu-se isso ao preparo das amostras, uma vez que o material é um gel, de difícil manipulação e as células/enzimas continuam dispostas uniformemente na matriz, da mesma

forma percebida na imagem relativa ao sistema, previamente à bioconversão, indicando que o processo de biossíntese não altera significativamente o sistema de imobilização.

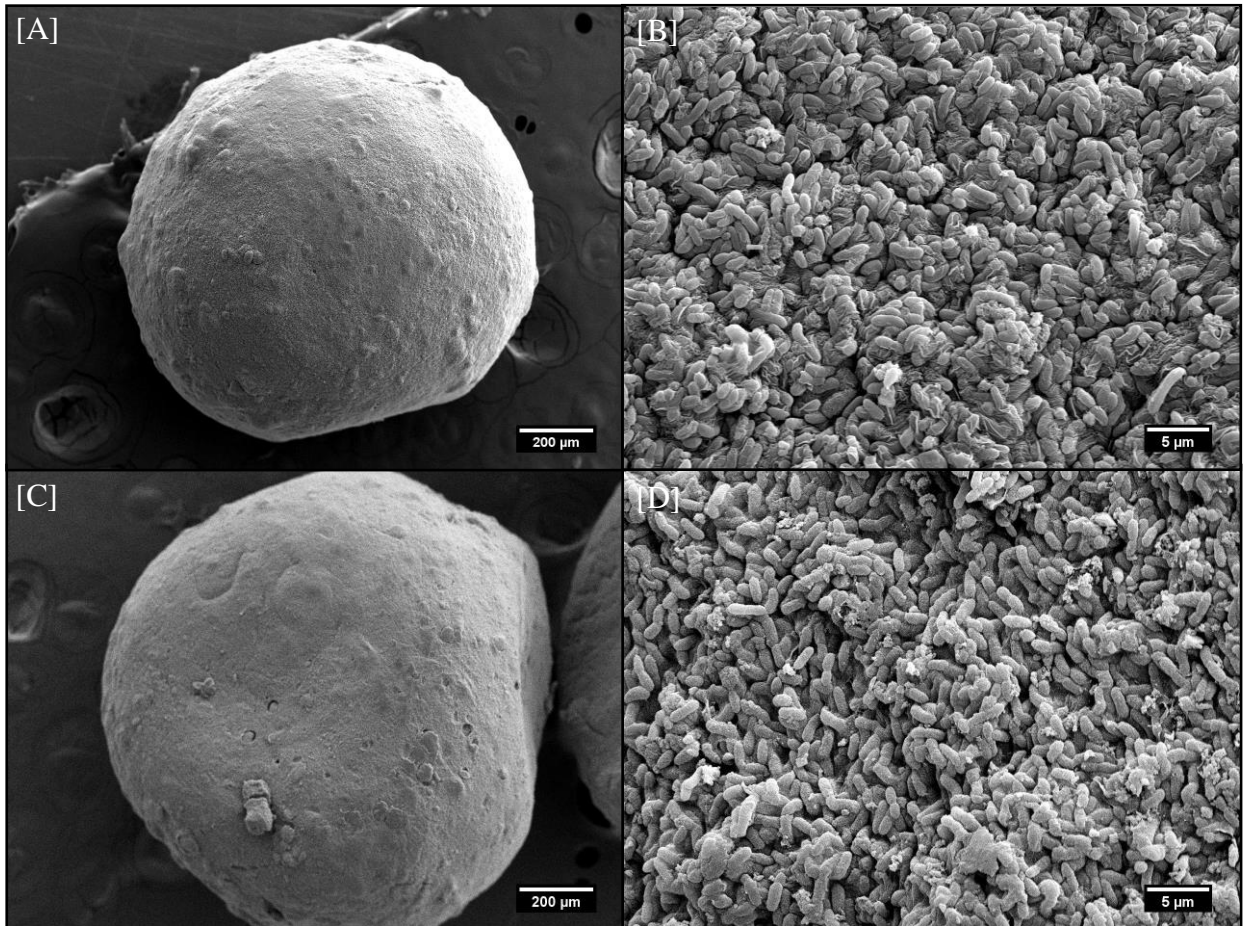


Figura 9: Imagens do sistema imobilizado de células/enzimas de *Zymomonas mobilis* em alginato de cálcio obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

[A] e [B] antes do processo de bioconversão; [C] e [D] após o processo de bioconversão.

Dando-se continuidade aos experimentos, os ensaios de bioconversão foram conduzidos visando-se avaliar a produção de ácidos aldônicos frente ao emprego de células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Para tanto, empregou-se o sistema enzimático imobilizado com 70 g/L (concentração da suspensão celular no momento

da imobilização), compreendendo 20 g/L de biocatalisador na reação de bioconversão (Anexo 4), conforme definido por Carra (2012).

Na Figura 10 é apresentado o perfil de formação de ácidos orgânicos e a velocidade específica de formação de produto em função do tempo de bioconversão, conduzidos com o emprego de xarope de maltose e maltose purificada.

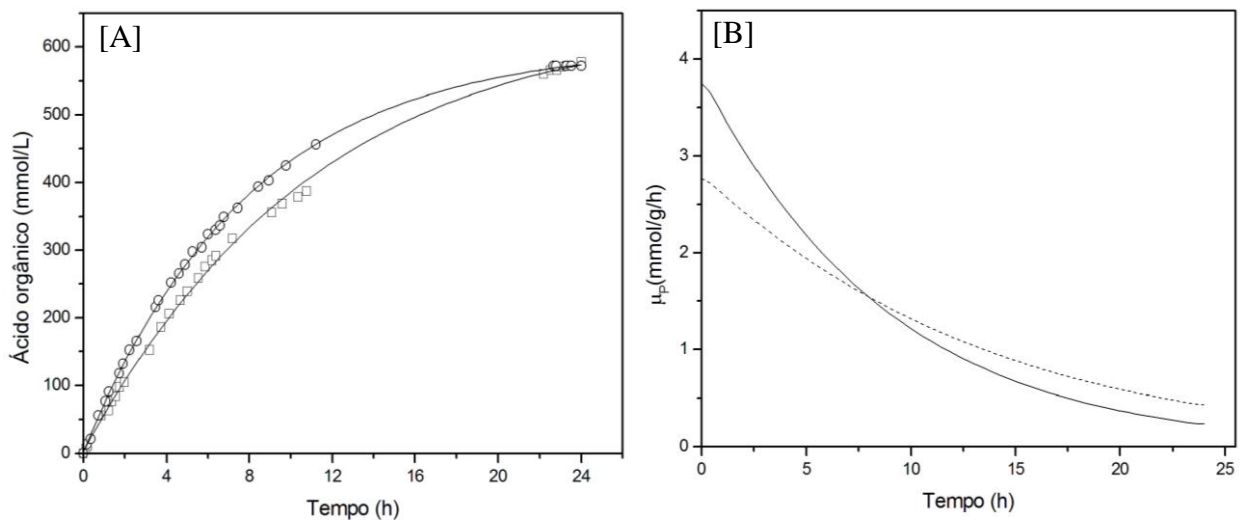


Figura 10: [A] Formação de ácidos orgânicos em função do tempo e [B] velocidade específica de formação de produto em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, em solução 700 mmol/L de maltose/frutose, a 39°C e pH 6,4.

(○, —) xarope de maltose/frutose; (□, - - - -) maltose/frutose.

Como é possível constatar, perfis de formação de ácidos orgânicos em função do tempo foram obtidos empregando-se o par maltose/frutose e o par xarope de maltose/frutose, mantendo-se a concentração inicial de maltose em 0,7 mol/L em ambos os casos (Figura 10A).

Como observado, durante parte do processo de bioconversão as concentrações de ácidos orgânicos formados, utilizando-se xarope de maltose, mantiveram-se acima daquelas obtidas quando maltose purificada foi utilizada como substrato de bioconversão. Entretanto, à medida que transcorreu o tempo e aproximou-se de 24 horas de processo, concentrações muito próximas de produto foram obtidas para ambos os substratos.

Nesse contexto, na Figura 10B observa-se que, embora a velocidade inicial tenha sido maior com o emprego de xarope de maltose, o que provavelmente ocorreu em função do consumo preferencial da glicose presente no meio, essa apresentou uma queda mais acentuada. A velocidade específica obtida com o emprego de xarope de maltose é superada por aquela envolvendo o uso de maltose purificada, a partir de aproximadamente 8 horas de processo, indicando que, se este fosse conduzido por um tempo mais prolongado, a formação de ácidos orgânicos seria superior quando empregada maltose purificada.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados dos ensaios de bioconversão de células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio em relação ao emprego de diferentes combinações dos carboidratos, quais sejam: maltose/frutose e xarope de maltose/frutose.

Embora perfis semelhantes de concentração de ácidos aldônicos em função do tempo tenham sido obtidos, foram alcançadas concentrações de produto final maiores empregando-se maltose purificada e frutose e, conseqüentemente, maior produtividade e menores concentrações residuais de substrato. Os resultados alcançados indicam que o emprego de xarope de maltose, em substituição à maltose purificada, para a produção de ácido maltobiônico, levando-se em consideração o custo desses substratos, demonstra-se uma alternativa viável, ainda que haja a formação concomitante de ácido glicônico em função da composição dessa matéria-prima, conforme descrito anteriormente. É válido mencionar que a

velocidade específica de formação de produtos sofreu influência dos carboidratos presentes no xarope de maltose e não incluídos na concentração de 0,7 mol/L de aldose.

Tabela 7: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácidos orgânicos nos ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* utilizando xarope de maltose e maltose (aldose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39°C; pH 6,4).

Parâmetros de processo	Substratos	
	Xarope de maltose/frutose	maltose/frutose
$P_{m\acute{a}x}$ (mmol/L)	570	580
t (h)	24	24
$Y_{p/S0}$ (mmol/mmol)	0,89	0,90
p (mmol/h)	2,59	2,62
q (mmol/g/h)	1,2	1,3
$\mu_{P,m\acute{a}x}$ (mmol/g/h)	3,75	2,77
S_f (mmol/L)	72	65

$P_{m\acute{a}x}$, concentração máxima de ácido orgânico; t, tempo de processo; $Y_{p/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade molar; q, produtividade específica; $\mu_{P,m\acute{a}x}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , aldose residual.

Conquanto, considerando-se os valores de máxima velocidade específica de formação de produtos atingidos, superiores para o par xarope de maltose/frutose e, ainda, a concentração de produto final obtida para as duas combinações de aldoses, os resultados sugerem maior estabilidade do complexo enzimático quando do uso de maltose purificada já que a queda da velocidade foi menor nesse caso.

Esse perfil de decaimento da velocidade mais acentuado empregando-se xarope de maltose demonstra que, quando a velocidade de formação de produto é maior, há maior

consumo de substrato do meio reacional e, dessa forma, quando compara-se ao uso de maltose purificada, em um intervalo de tempo menor, maior quantidade de substrato foi consumida o que implica menores quantidade de substrato disponíveis para a biossíntese. Isso pode não ser vantajoso em termos de processo visto que os últimos dois terços do processo apresentam velocidade de formação de produto inferior à obtida com o uso de maltose purificada.

Na sequência, foi avaliado o processo de bioconversão de lactose/frutose e soro do leite/frutose em ácidos orgânicos via células/enzimas imobilizadas em alginato de cálcio.

A Figura 11 apresenta a velocidade específica de formação de produto em função do tempo e o perfil de formação de ácidos orgânicos (predominantemente ácido lactobiônico) ao longo do processo de bioconversão empregando-se lactose e soro do leite como substratos juntamente com frutose, ambos em concentração de 0,7mol/L.

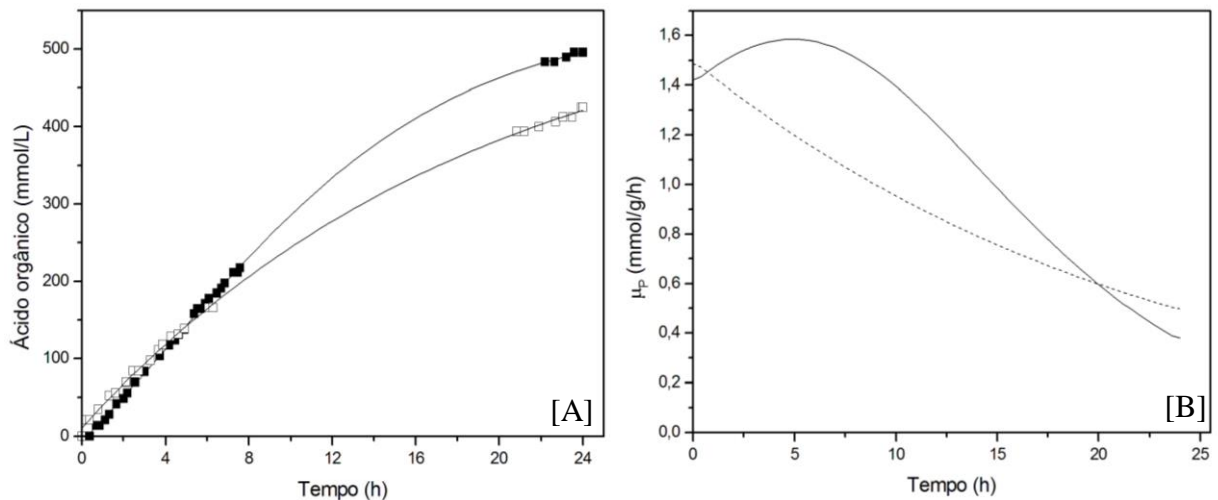


Figura 11: [A] Formação de ácidos orgânicos em função do tempo e [B] velocidade específica de formação de produto em função do tempo (μ_P), em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, em solução 700 mmol/L de frutose/lactose (purificada ou soro do leite), a 39°C e pH 6,4.

(■, —) lactose/frutose; (□, -----) soro do leite/frutose.

Assim como nos ensaios anteriores, empregando células permeabilizadas, o uso de soro do leite resulta concentração máxima de produto inferior à obtida quando empregada lactose purificada (Figura 11A). Justifica-se esse perfil mais baixo ao longo da bioconversão em função da viscosidade do meio contendo soro do leite (que pode dificultar a transferência de massa) e da composição do mesmo (Tabela 1), que podem interferir negativamente no processo de bioconversão. Salienta-se que o meio de reação preparado com soro do leite liofilizado foi previamente analisado com o intuito de determinar a concentração de glicose, entretanto, não foi detectada a presença da mesma nessa matéria-prima complexa (dados não mostrados).

Perfil semelhante para a produção de ácido lactobiônico ao longo do tempo, com valores de concentração máxima de ácido formado muito próximos (aproximadamente 480 mmol/L), foi também obtido por Malvessi (2008), em ensaios de bioconversão empregando concentração inicial de lactose e frutose de 0,7 mol/L, com células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, conduzidos a pH 6,4 e 39°C.

Não obstante, na avaliação dos perfis de velocidade específica de formação de ácidos orgânicos em função do tempo (Figura 11B), foi observada uma queda menos pronunciada de μ_p empregando-se soro do leite. Embora as velocidades iniciais tenham sido maiores com o emprego de lactose purificada, a partir de 20 horas de processo, percebeu-se que a velocidade de formação de ácidos orgânicos utilizando-se lactose foi superada por aquela obtida quando empregado soro do leite.

Embora a composição e viscosidade do soro do leite possam ter influenciado de alguma forma o processo de bioconversão, o perfil de velocidade de formação de produto foi mais constante ao longo do tempo se comparado ao processo conduzido com o substrato lactose. Ainda, o uso do soro do leite demonstra-se promissor como forma de agregar valor a esse subproduto.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados gerais dos processos de bioconversão com células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, conduzidos empregando-se lactose/frutose ou soro do leite/frutose.

Tabela 8: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácidos orgânicos nos ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* utilizando lactose e soro do leite (aldose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39°C; pH 6,4).

Parâmetros de processo	Substratos	
	lactose/frutose	soro do leite/frutose
$P_{\text{máx}}$ (mmol/L)	495	425
t (h)	24	24
$Y_{p/S0}$ (mmol/mmol)	0,76	0,65
p (mmol/h)	2,22	1,89
q (mmol/g/h)	1,11	0,94
$\mu_{P,\text{máx}}$ (mmol/g/h)	1,58	1,48
S_f (mmol/L)	155	233

$P_{\text{máx}}$, concentração máxima de ácidos orgânicos; t, tempo de processo; $Y_{p/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade molar; q, produtividade específica; $\mu_{P,\text{máx}}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , aldose residual.

Maior produtividade (2,22 mmol/h) e maior concentração de ácido lactobiônico formado (495 mmol/L) foram atingidos empregando-se lactose purificada quando comparados ao emprego de soro do leite que, por sua vez, resultou em produtividade média de 1,89 mmol/h e concentração de ácido orgânico formado de 425 mmol/L, sendo ambos os processos conduzidos por 24 horas. Isso corrobora, novamente, o entendimento de o complexo

enzimático GFOR/GL ter sua eficiência reduzida na presença da matéria-prima complexa soro do leite (Tabela 8).

Outrossim, os resultados obtidos no presente estudo, empregando-se lactose e, principalmente soro do leite, são relevantes em se tratando de produção de ácido lactobiônico. Esse fato pode ser justificado com base em relatos da literatura especializada, a exemplo dos resultados obtidos com o uso, em particular, de lactose purificada, descritos por Malvessi (2008), Pedruzzi, *et al.* (2011), Carra (2012), Malvessi *et al.* (2013) com células/enzimas de *Z. mobilis*. Alonso (2015) referencia o uso de soro do leite juntamente com glicose ou lactose, em sistema de co-fermentação empregando *Pseudomonas taetrolens* e obtendo, para o primeiro caso, a formação concomitante de ácido glicônico (8,8 g/L) e ácido lactobiônico (78 g/L) e, para o segundo caso, aumento na produtividade volumétrica de ácido lactobiônico (2,05 g/L/h), indicando a potencialidade do uso de soro do leite.

Todavia, o processo de bioprodução de ácido lactobiônico a partir de soro do leite, utilizando células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio é promissor uma vez que a separação dos produtos de bioconversão é facilitada pelo emprego de biocatalisador imobilizado e, além disso, há a produção concomitante de sorbitol, o que pode viabilizar ainda mais o emprego desse processo na produção de ácido lactobiônico a partir de soro do leite.

Com o objetivo de avaliar a influência das proteínas presentes no meio reacional, na etapa de bioconversão, em soluções feitas com soro do leite sobre a produção de ácidos orgânicos, foi procedida à precipitação ácida de proteínas do soro do leite e realizada a bioconversão em meio reacional produzido a partir de soro do leite desproteínizado, levando-se em consideração o teor de lactose presente no mesmo para a determinação da quantidade de substrato a ser empregada.

Os resultados desses ensaios comparativos de produção de ácido lactobiônico com soro do leite desproteínizado e com soro do leite liofilizado comercial estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácidos orgânicos nos ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* utilizando soro do leite comercial e desproteínizado (lactose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39°C; pH 6,4).

Parâmetros de processo	Substratos	
	soro do leite/frutose	soro do leite desproteínizado/frutose
$P_{máx}$ (mmol/L)	422	415
t (h)	24	24
$Y_{p/S0}$ (mmol/mmol)	0,65	0,64
p (mmol/h)	1,87	1,86
q (mmol/g/h)	0,94	0,92
$\mu_{P,máx}$ (mmol/g/h)	2,18	2,75
S_f (mmol/L)	235	250

$P_{máx}$, concentração máxima de ácidos orgânicos; t, tempo de processo; $Y_{p/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade molar; q, produtividade específica; $\mu_{P,máx}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , aldose residual.

Constatou-se a partir da Tabela 9, concentrações finais de produto semelhantes foram obtidas para o uso de soro do leite liofilizado comercial e desproteínizado e, por conseguinte, valores muito próximos de produtividade e conversão em produto foram obtidos.

Contudo, diferentes valores de máxima velocidade específica de formação de produto foram obtidos para esses ensaios, onde o processo conduzido com soro do leite

desproteínizado resultou maiores valores de $\mu_{P,m\acute{a}x}$ quando comparado ao processo conduzido com soro do leite liofilizado comercial.

Na Figura 12 é apresentado o perfil de formação de ácidos orgânicos e a velocidade específica de formação de ácidos orgânicos em função do tempo, em reações empregando-se soro do leite liofilizado comercial ou desproteínizado.

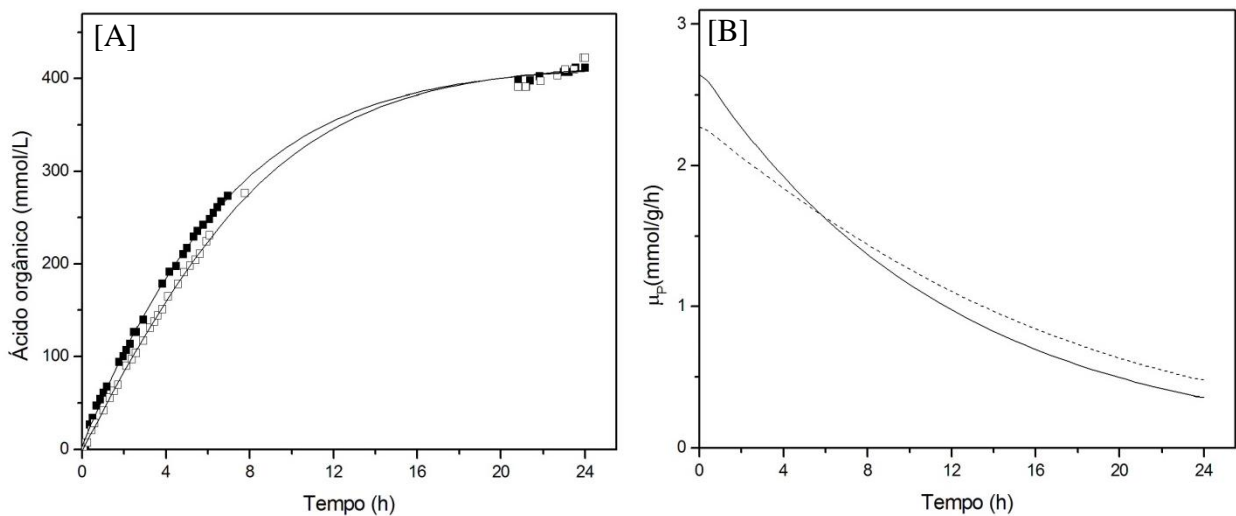


Figura 12: [A] Formação de ácidos orgânicos em função do tempo e [B] velocidade específica de formação de produto em função do tempo (μ_P), em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, em solução 700 mmol/L de frutose/lactose (soro do leite comercial ou desproteínizado), a 39°C e pH 6,4.

(■, —) Soro do leite desproteínizado/frutose; (□, ----) soro do leite/frutose.

Perfil semelhante de formação de ácidos orgânicos foi obtido para os ensaios realizados frente aos diferentes substratos (Figura 12 A). No que tange à velocidade específica de formação de produto (Figura 12B), embora o soro do leite desproteínizado tenha iniciado com maior velocidade, houve uma queda desse parâmetro mais acentuada para esse substrato demonstrando que a desproteínização pode não ser vantajosa em termos de catálise pois, a partir de 6 horas de processo, a velocidade de formação de produto obtida com soro do leite

desproteínezado é ligeiramente superada por aquela obtida empregando-se soro do leite liofilizado comercial resultando, para esse último, maiores concentrações finais de ácido orgânico formado.

Com base nos resultados apresentados, nas condições testadas, a etapa de desproteínezado do soro de leite proposta não trouxe vantagens aparentes aos ensaios de bioconversão em se tratando de produto formado e, conseqüentemente, de produtividade e rendimento. Entretanto, é importante citar que a desproteínezado poderia influenciar positivamente na etapa de recuperação dos produtos da bioconversão e, dessa forma, consiste em um processo que ainda demanda estudos.

4.5 DISCUSSÃO GERAL DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os resultados aqui abordados já foram apresentados anteriormente nos itens que se referem à bioprodução de ácidos orgânicos a partir de substratos purificados e de matérias-primas complexas, tanto para células de *Z. mobilis* livres como imobilizadas. Deste modo, esses resultados serão discutidos em outro contexto, visando facilitar a comparação do emprego de células livres e imobilizadas de *Z. mobilis* na bioprodução de ácidos orgânicos. Cabe salientar algumas vantagens do processo de imobilização, relacionadas à possibilidade de reutilização do biocatalisador, uso de altas concentrações celulares no reator, maior facilidade em termos de controle do processo, melhor uniformidade do produto, e ainda, o emprego de altas taxas de diluição sem que haja o arraste das células (Zanin & Moraes, 2004).

Na Figura 13 são apresentados os perfis globais de formação dos ácidos aldônicos em função do tempo para células livres e imobilizadas de *Z. mobilis*.

Comparando-se os perfis cinéticos, é possível observar diferenças em termos de velocidade reacional, ainda que as concentrações finais de produto sejam muito próximas em

todos os casos (Figura 13). Por conseguinte, rendimentos e produtividades semelhantes foram estimados, ao final de 24 horas, confrontando-se os processos utilizando células livres e imobilizadas, para cada um dos substratos empregados.

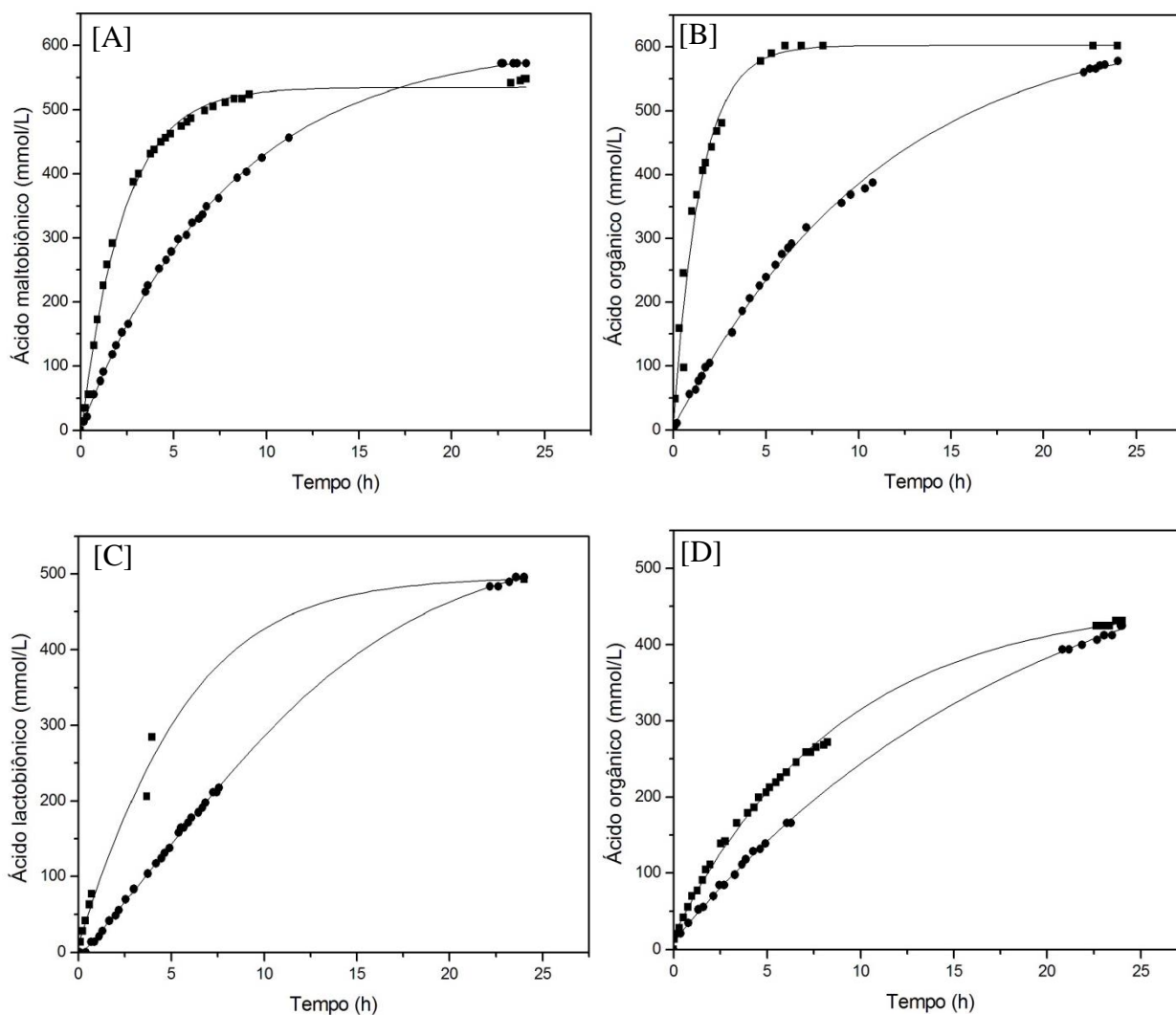


Figura 13: Perfil de formação de ácidos orgânicos para células/enzimas livres e imobilizadas.

[A] formação de ácido maltobiônico empregando-se maltose/frutose; [B] formação de ácidos orgânicos empregando-se xarope de maltose/frutose; [C] formação de ácido lactobiônico empregando-se lactose/frutose; [D] formação de ácidos orgânicos empregando-se soro do leite/frutose. Solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4.

(■) células livres; (●) células imobilizadas.

Em vista dos resultados semelhantes obtidos para o sistema livre e imobilizado, em termos de produtividade, sugere-se que, dentre outros fatores, estes podem estar relacionados à proteção do sistema enzimático periplasmático, uma vez que as células que contém as enzimas é que são imobilizadas na matriz polimérica (alginato de cálcio), formando uma dupla camada protetiva que poderia atuar evitando possíveis alterações na estrutura tridimensional da enzima, que poderia causar inativação parcial da mesma.

Foi avaliada, ainda, a velocidade específica de formação de ácidos orgânicos, em função do tempo, empregando-se células livres e imobilizadas de *Z. mobilis* (Figura 14).

Empregando-se células livres, os valores de velocidade específica de formação de produto foram inicialmente mais altos se comparados àqueles obtidos com o uso de células imobilizadas, efeito provavelmente devido à barreira difusional ocasionada pelo suporte empregado para a imobilização, conforme pode-se confirmar com a Figura 14.

Todavia, para todos os substratos avaliados, a queda da velocidade específica de formação de ácidos orgânicos foi menos acentuada quando utilizadas células imobilizadas em comparação ao uso de células livres, o que sugere maior estabilidade do complexo enzimático, evidenciada em função dos resultados finais muito próximos obtidos para os dois casos.

No caso do uso de fontes de maltose (Figura 14A e Figura 14B) ou de lactose (Figura 14C e Figura 14D), podem ser observados os diferentes perfis de μ_P no decorrer da reação, cujas variações são influenciadas também, em algum grau, pela afinidade enzima/substrato. Mais uma vez destacam-se as vantagens do emprego do sistema enzimático imobilizado de *Z. mobilis* na condução dos processos de bioconversão propostos.

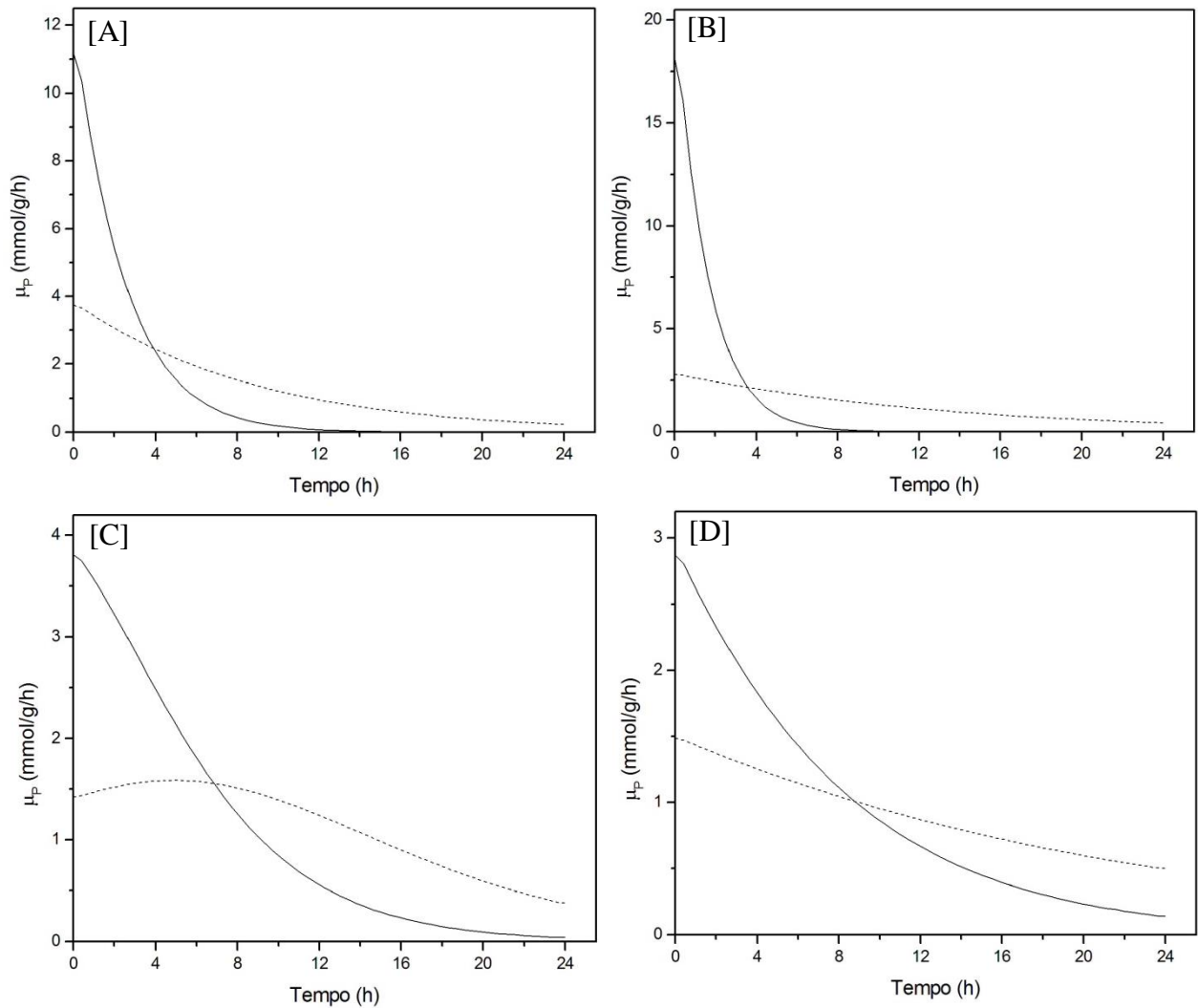


Figura 14: Velocidade específica de formação dos ácidos orgânicos (μ_p) para células/enzimas livres e imobilizadas. [A] velocidade específica de formação de ácido maltobiônico empregando-se maltose/frutose; [B] velocidade específica de formação de ácidos orgânicos empregando-se xarope de maltose/frutose; [C] velocidade específica de formação de ácido lactobiônico empregando-se lactose/frutose; [D] velocidade específica de formação de ácidos orgânicos empregando-se soro do leite/frutose.

Solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4. (—) células livres; (-----) células imobilizadas.

4.6 EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO MALTOBIÔNICO POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Zymomonas mobilis*.

Em função dos resultados atingidos com maltose para os ensaios de bioconversão com células imobilizadas, foram realizados testes relativos aos efeitos do pH e temperatura, parâmetros que exercem grande influência sobre a ação catalítica das enzimas GFOR/GL. Posto isso, o efeito dessas variáveis sobre o complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizado em alginato de cálcio foi avaliado com o intuito de verificar as melhores condições operacionais, para a bioprodução de ácido maltobiônico, tendo em vista, ainda, as vantagens relacionadas ao emprego de imobilização de biocatalisadores.

Trabalhos anteriores relatam as condições mais favoráveis - pH 6,4 e 39°C - em termos de ação catalítica de GFOR/GL para o par glicose/frutose e também com o uso de lactose/frutose (Zachariou & Scopes, 1986; Malvessi, 2008; Carra, 2012). Por conseguinte, pH 6,4 e 39°C foram utilizados como condições padrão para proceder aos testes do efeito de pH e temperatura na bioprodução de ácido maltobiônico a partir de maltose purificada.

Na primeira etapa dos ensaios foi avaliado o efeito do pH, compreendendo a faixa entre 6,0 e 7,2 na conversão de maltose. Os ensaios foram conduzidos empregando-se 20 g/L de biocatalisador imobilizado, estando os resultados gerais desses experimentos, apresentados na Tabela 10.

Pode-se observar, na Tabela 10, que o maior valor de máxima velocidade específica de conversão de substrato em produto ($\mu_{P,máx}$) foi obtido na reação conduzida em pH 6,4. Embora tenham sido obtidos iguais valores de produtividade e concentração máxima de produto nos ensaios realizados em pH 6,0 ou 6,4, para o primeiro caso, valor de $\mu_{P,máx}$ inferior foi atingido, de 3,06 mmol/g/h comparado a 4,40 mmol/g/h, respectivamente.

Tabela 10: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido maltobiônico em ensaios de bioconversão conduzidos em diferentes valores de pH utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio (maltose/frutose inicial 700 mmol/L; 39°C).

Parâmetros de processo	pH			
	6,0	6,4	6,8	7,2
$P_{\text{máx}}$ (mmol/L)	590	590	553	546
t (h)	24	24	24	24
Y_{p/S_0} (mmol/mmol)	0,92	0,91	0,86	0,85
p (mmol/h)	2,68	2,68	2,50	2,48
q (mmol/g/h)	1,34	1,34	1,25	1,24
$\mu_{P,\text{máx}}$ (mmol/g/h)	3,06	4,40	3,39	3,37
S_f (mmol/L)	52,6	52,6	92,5	101,2

$P_{\text{máx}}$, concentração máxima de ácido maltobiônico; t, tempo de processo; Y_{p/S_0} , fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade molar; q, produtividade específica; $\mu_{P,\text{máx}}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , aldose residual.

Ainda, para valores de pH superiores a 6,4, à medida que foi aumentado o pH, foi observada a redução dos valores de $\mu_{P,\text{máx}}$, conversão de substrato em produto e produto máximo formado, indicando que, nas condições testadas, o pH 6,4 seria o mais favorável em termos de catálise. Contudo, o resultado obtido vem de encontro aos resultados relatados por Malvessi (2008) utilizando células imobilizadas de *Z. mobilis* para a produção de ácido lactobiônico que, por sua vez, constatou que quanto maior o pH da solução, externo às células/enzimas, mais próximo o pH do microambiente criado – em função da produção de ácido orgânico e da transferência de massa no sistema imobilizado – chegará dos níveis de pH ideal para o sistema não imobilizado, favorecendo a reação.

Com o intuito de avaliar o efeito da temperatura na bioprodução de ácido maltobiônico, foi testada a faixa compreendida entre 36 e 47°C. Como pode ser observado na Tabela 11, os valores de $\mu_{P,m\acute{a}x}$ foram aumentando com o incremento da temperatura, ou seja, quando a temperatura usada foi 36°C, obteve-se 3,69 mmol/g/h e quando a temperatura foi aumentada para 47°C, o $\mu_{P,m\acute{a}x}$ obtido foi de 5,63 mmol/g/h; fato esse que pode estar relacionado à influência positiva da temperatura na difusão de substratos e produtos através das esferas de alginato de cálcio, aumentando a transferência de massa nas esferas.

Tabela 11: Resultados gerais referentes à bioprodução de ácido maltobiônico em ensaios de bioconversão conduzidos em diferentes temperaturas, utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio (maltose/frutose inicial 700 mmol/L; pH 6,4)

Parâmetros de processo	Temperatura (°C)			
	36	39	43	47
$P_{m\acute{a}x}$ (mmol/L)	572	590	565	415
t (h)	24	24	24	24
$Y_{p/S0}$ (mmol/mmol)	0,89	0,91	0,88	0,64
p (mmol/h)	2,59	2,68	2,56	1,86
q (mmol/g/h)	1,29	1,34	1,28	0,93
$\mu_{P,m\acute{a}x}$ (mmol/g/h)	3,69	4,40	4,88	5,63
S_f (mmol/L)	72,5	52,6	79,1	244,3

$P_{m\acute{a}x}$, concentração máxima de ácido maltobiônico; t, tempo de processo; $Y_{p/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade molar; q, produtividade específica; $\mu_{P,m\acute{a}x}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , aldose residual.

O incremento na temperatura da reação poderia induzir o aumento do tamanho dos poros do suporte, o que facilitaria o acesso do substrato à enzima e, como consequência,

proporcionaria maior velocidade de conversão. Entretanto, entre as condições de temperatura avaliadas, maiores valores de formação de produto e, conseqüentemente, de conversão, foram alcançados na reação conduzida a 39°C.

Na Figura 15 são apresentados os perfis cinéticos de velocidade específica de formação de ácido maltobiônico em função do tempo. Pode ser observado que, ao passo que foi elevada a temperatura da reação, a queda da velocidade reacional foi mais acentuada, aumentando-se a declividade de μ_P em relação ao tempo de processo. Malvessi (2008) obteve perfis diferentes de temperatura, que apontam para o uso de temperaturas entre 47 e 50°C para a produção de ácido lactobiônico empregando células imobilizadas de *Z. mobilis* em alginato de cálcio. Entretanto, com base nos resultados obtidos neste trabalho, este perfil pode ser justificado pela provável inativação da enzima, fato esse que corrobora o uso de temperaturas mais amenas, próximas aos 39°C. Visto que umas das vantagens do emprego de biocatalizadores imobilizados é a promoção de bateladas sucessivas, é importante que sejam definidas condições de processo que causem menor impacto na eficiência catalítica, buscando diminuir a degradação da enzima ao longo do processo.

Os resultados obtidos pressupõem o uso de pH em torno de 6,4 e temperatura aproximada de 39°C como condições de operação do processo de bioconversão empregando células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, para a conversão de maltose e frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, respectivamente. Dessa forma, em função da composição dessa matéria-prima, com predominância de maltose e presença de carboidratos como glicose, infere-se que as mesmas condições de pH e temperatura poderiam ser empregadas para o uso de xarope de maltose no processo de produção biotecnológica de ácidos orgânicos por *Z. mobilis*.

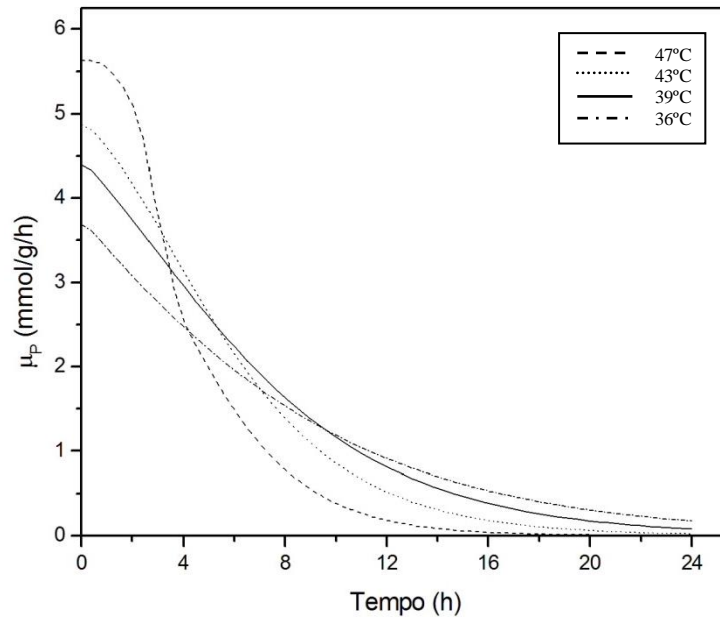


Figura 15: Velocidade específica de formação de ácido maltobiônico em função do tempo (μ_P), em ensaios de bioconversão conduzidos em diferentes temperaturas, com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio (maltose/frutose inicial 700 mmol/L; pH 6,4).

4.7 RECUPERAÇÃO DOS ÁCIDOS ALDÔNICOS OBTIDOS NO PROCESSO DE BIOCONVERSÃO

Foi avaliada, nesta etapa, a recuperação dos ácidos orgânicos dos respectivos meios reacionais finais da etapa de bioconversão, processos previamente conduzidos com a utilização do sistema enzimático imobilizado de *Z. mobilis*. A maior facilidade, em separar o biocatalisador do produto a ser recuperado constitui uma das vantagens do emprego de células/enzimas imobilizadas. Ainda, a realização dessa etapa é também devida às diversas aplicações dos ácidos orgânicos produzidos e do sorbitol, conforme já mencionado, e do alto valor comercial dos produtos em questão.

Como abordado anteriormente, a reação de conversão dos açúcares em produtos deve ser realizada em pH rigorosamente controlado em valores próximos a 6,4, para que se mantenham condições adequadas para catálise enzimática.

Dessa forma, a adição de NaOH ao meio reacional, com a função de controlar o pH do meio, neutralizando o ácido formado no processo, leva à formação de sais de sódio como produto da bioconversão. Assim, esses sais, como maltobionato e lactobionato de sódio presentes no caldo resultante do processo de bioconversão, é que serão recuperados.

Buscando-se avaliar, de forma preliminar, a precipitação do produto da bioconversão com o uso de compostos orgânicos, foram testados etanol, metanol, éter, acetona e ácido acético. Os resultados qualitativos estão apresentados na Figura 16. É possível constatar que melhores resultados para a precipitação foram obtidos utilizando-se etanol, motivo esse que, aliado ao fato deste composto ser produzido na etapa inicial do cultivo para a obtenção de biomassa/enzimas, determinou a opção por seu uso como solvente orgânico na etapa de recuperação.

O emprego de etanol para a recuperação dos sais resultantes da bioconversão, por precipitação, foi demonstrado por Silveira *et al.* (2007), por meio da diferença de solubilidade dos compostos presentes no caldo oriundo da bioconversão, uma vez que os produtos do processo (maltobionato, lactobionato de sódio e outros sais de sódio) são praticamente insolúveis em etanol e o sorbitol, por sua vez, é solúvel. Carra (2012) avaliou a solubilidade de sorbitol, lactobionato de sódio, lactose e frutose frente ao etanol e concluiu que o lactobionato de sódio é praticamente insolúvel nesse composto e que a solubilidade em etanol é superior frente a frutose, sorbitol e lactose, nessa ordem, o que viabiliza a etapa de recuperação de produtos empregando esse solvente orgânico.

Composto orgânico	Ocorrência de precipitação
Etanol	+
Metanol	+/-
Éter	-
Acetona	-
Ácido Acético	-

Figura 16: Diagrama qualitativo da precipitação dos produtos da bioconversão empregando-se células/enzimas imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, em solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4, frente à diferentes compostos orgânicos sendo (+) para a presença de precipitação e (-) para a ausência de precipitação.

A separação dos produtos da mistura reacional da bioconversão foi realizada procedendo-se sucessivas repetições de precipitação do sal de sódio com etanol 75% (m/v). Posteriormente, o precipitado resultante foi seco por evaporação e o etanol presente no sobrenadante reservado para posterior destilação e recuperação.

Para verificar o arraste de outros compostos para o precipitado, que não o sal desejado, foram determinadas as concentrações de sorbitol, frutose e aldose, a título de impurezas presentes, seguindo as metodologias anteriormente descritas. Foram determinados também, no sobrenadante oriundo de cada uma das repetições da precipitação, sorbitol, frutose e aldose, a fim de verificar, em relação ao total separado, quanto estava sendo removido a cada precipitação realizada.

Na Tabela 12 são apresentados os percentuais de sorbitol, frutose e aldose residual presentes no sobrenadante de cada repetição de precipitação realizada, sempre em relação ao total removido de cada componente ao final do processo de recuperação.

É possível constatar, ao observar a Tabela 12 que, para todos os substratos avaliados na produção de ácidos aldônicos, a primeira etapa de precipitação foi responsável, de forma geral, por separar para o sobrenadante cerca de 60% do sorbitol, da frutose e da aldose, seja ela lactose ou maltose, presentes no meio reacional. A primeira etapa foi seguida, em percentual de recuperação, da segunda e da terceira, onde as menores parcelas de sorbitol, frutose e aldose foram separadas para o sobrenadante (em torno de 10%).

Tabela 12: Percentual de recuperação do caldo final da bioconversão, empregando-se diferentes aldoses, em ensaios de bioconversão com células/enzimas imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, em solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4, após sucessivas etapas de precipitação com etanol.

Etapa da recuperação	Substratos da bioconversão	Sorbitol (%)	Frutose residual (%)	Aldose residual (%)
1ª precipitação	Maltose/ frutose	61,37	65,73	62,01
	Xarope de maltose/ frutose	54,29	57,64	46,45
	Lactose/ frutose	62,02	76,20	57,26
2ª precipitação	Maltose/ frutose	28,53	25,42	27,65
	Xarope de maltose/ frutose	34,60	33,11	37,45
	Lactose/ frutose	24,33	18,68	25,75
3ª precipitação	Maltose/ frutose	10,09	8,85	10,35
	Xarope de maltose/ frutose	11,11	9,25	16,11
	Lactose/ frutose	13,66	5,11	17

Cumprе ressaltar que não estão sendo mostrados os resultados referentes ao processo de precipitação realizado com o produto das bioconversões utilizando soro do leite/frutose em

função de não ter ocorrido precipitação, não sendo possível a recuperação dos produtos dessa bioconversão com a metodologia proposta. Isso se deu, possivelmente, em função da composição complexa do soro do leite, a exemplo das proteínas presentes, que podem ter afetado, em algum nível, o processo de recuperação.

Objetivando-se avaliar a eficiência do processo de recuperação dos produtos da bioconversão, foram analisadas as concentrações de impurezas no produto recuperado (sorbitol, frutose e aldose residual), resultante das três precipitações com etanol realizadas. A quantidade percentual de ácido aldônico foi inferida a partir dos resultados das análises, descontando as impurezas residuais.

Na Tabela 13 são resumidos os resultados das análises do material precipitado das bioconversões realizadas empregando-se maltose/frutose, xarope de maltose/frutose e lactose/frutose, após procedidas as três precipitações com solvente orgânico. O processo de recuperação procedido com o par maltose/frutose resultou composição de, aproximadamente, 92% de maltobionato de sódio. Entretanto, mesmo após a terceira etapa de recuperação, cerca de 8% do precipitado era formado por impurezas arrastadas no processo de precipitação empregando-se etanol. Nesse sentido, uma forma de se obter maior pureza no precipitado é aumentar o número de precipitações sucessivas visto que, a cada precipitação, mais impurezas foram removidas do produto recuperado.

Por outro lado, como observado na Tabela 13, em se tratando de sais de sódio recuperados a partir da bioconversão realizada empregando-se o par xarope de maltose/frutose, valores inferiores de produto presente no precipitado foram obtidos (aproximadamente 63%), uma vez que maiores quantidades de impurezas foram arrastadas para o precipitado após a terceira etapa de precipitação com etanol (em torno de 37%).

Tabela 13: Composição do produto da recuperação (precipitado) do caldo final da bioconversão, empregando-se diferentes aldoses, em ensaios de bioconversão com células/enzimas imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, em solução 700 mmol/L de aldose/frutose, a 39°C e pH 6,4, após as sucessivas etapas de precipitação com etanol.

Bioconversão	Ácido aldônico (%)	Impurezas (%)
Maltose/ frutose	92	8
Xarope de maltose/ frutose	63	37
Lactose/ frutose	97	3

A quantidade de açúcares arrastados na precipitação pode estar relacionada ao método de análise ou ainda à composição do xarope de maltose, uma vez que podem estar sendo quantificados outros açúcares residuais que não a maltose e que, de alguma forma, não foram convertidos durante a reação enzimática. Desta forma, estes açúcares poderiam ter contribuído para o aumento da relação percentual de açúcar residual e conseqüente aumento da fração de impurezas no precipitado.

Não obstante, a recuperação do caldo da bioconversão de lactose e frutose resultou valores próximos a 97% de lactobionato no precipitado, com arraste de impurezas de aproximadamente 3%, indicando uma maior eficiência no processo de recuperação. É importante salientar que o precipitado do lactobionato de sódio resultou na formação de cristais. Já os precipitados obtidos empregando-se maltose e xarope de maltose, por sua vez, possuíam aspecto de gel, com aparente retenção de água.

Destarte, nas condições avaliadas, a recuperação dos ácidos orgânicos obtidos nas etapas de bioconversão a partir dos substratos maltose, lactose ou, ainda, fontes complexas como xarope de maltose, por meio da técnica de precipitação com etanol, pode ser muito promissora em função dos resultados aqui apresentados. Adicionalmente, abre a perspectiva

para a avaliação do aumento do número de precipitações, bem como outros solventes a serem utilizados para aprimorar a recuperação desses produtos.

5 CONCLUSÕES

Em linhas gerais, o resultado mais expressivo do presente estudo demonstra a potencialidade do emprego do complexo GFOR/GL, presente em células de *Z. mobilis*, na bioconversão de maltose e frutose em ácido maltobiônico e sorbitol, respectivamente. São raras as informações na literatura que relatem o uso de GFOR/GL ou de outro sistema biológico na bioprodução de ácido maltobiônico. Ainda, foram obtidas informações a respeito da conversão de matérias primas complexas (xarope de maltose e soro do leite liofilizado comercial) para a produção de ácidos orgânicos, predominantemente ácidos maltobiônico e lactobiônico, respectivamente.

Na etapa inicial, foram abordados os ensaios enzimáticos empregando-se os pares de substratos maltose/frutose ($K_{MA} = 0,19$ mol/L; $K_F = 0,22$ mol/L) e xarope de maltose/frutose ($K_X = 0,03$ mol/L; $K_F = 0,39$ mol/L). Os resultados obtidos a partir da ação do complexo GFOR/GL presente em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, para esses substratos, ajustam-se à cinética de Michaelis-Menten. Com base nesses resultados, identifica-se a frutose como substrato limitante da reação enzimática e comprova-se a alta afinidade do complexo enzimático por maltose.

A partir do uso de maltose, xarope de maltose, lactose e soro do leite liofilizado, associados à frutose, em ensaios de bioconversão promovida pelo complexo enzimático GFOR/GL contido em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, demonstrou-se ser possível a obtenção de 550 e 600 mmol/L de ácido orgânico formado a partir de maltose e xarope de maltose e, ainda, 490 e 430 mmol/L de ácido orgânico produzido com o uso respectivo de lactose e soro do leite. Conversões da ordem de 84, 94, 76 e 66% em produtos são alcançadas para o emprego de maltose, xarope de maltose, lactose e soro do leite, nesta ordem.

Com a utilização do complexo enzimático imobilizado em alginato de cálcio a partir dos substratos supracitados, obtêm-se concentrações de produto de 570 e 580 mmol/L de ácido orgânico, com o uso de maltose e xarope de maltose e, ainda, 496 e 425 mmol/L de ácido orgânico a partir do uso de lactose e soro do leite, na devida ordem. Não obstante, conversões muito próximas àquelas obtidas com células permeabilizadas são atingidas nos processos conduzidos com células/enzimas imobilizadas.

A avaliação do pH e da temperatura sobre a ação do complexo GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio confirmam o uso de pH 6,4 e temperatura de 39°C como condições de operação adequadas à produção de ácido maltobiônico.

No processo de recuperação dos sais de sódio resultantes da bioconversão, por meio de precipitação com o uso de etanol, obtêm-se cerca de 90% de pureza em função do ácido aldônico formado. Esse procedimento deve ser considerado, uma vez que etanol é formado na etapa de obtenção de células/enzimas, demonstrando-se uma metodologia simples e eficiente, destacando-se a possibilidade de redução dos custos de purificação dos produtos.

Como perspectivas para a continuidade dos estudos de produção e recuperação de ácidos orgânicos obtidos via células/enzimas de *Z. mobilis*, sugerem-se:

- analisar a potencialidade do emprego de xarope de maltose com maior teor de maltose ou outras fontes naturais para a etapa de produção de ácidos orgânicos;
- avaliar outras técnicas para a precipitação das proteínas do soro do leite;
- verificar o emprego da lactose recuperada do soro do leite *in natura* na etapa de produção de ácidos orgânicos;

- estabelecer melhores condições de recuperação e purificação dos ácidos aldônicos formados por meio da variação da concentração de etanol empregada, do fluxo de adição do solvente e da temperatura reacional;

- caracterizar as matérias primas utilizadas e os respectivos produtos gerados no processo de bioconversão por meio de técnicas de cromatografia e ou outras metodologias a serem implementadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, S.; Rendueles, M.; Díaz, M. (2015). Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. **Biores. Technol.** 1873-2976.
- 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.
- Alonso, S.; Rendueles, M.; Díaz, M. (2013) Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. **Biotechnol. Adv.** 31: 1275 – 1291.
- Assumpção, R.M.V.; Morita, T. (1968). **Manual de soluções, reagentes e solventes**. São Paulo: E. Blücher, 1968. 627 p.
- Barbosa, M. R. (2007). Estudo da produção da enzima lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentosos *Aspergillus niger*. **Hor. Cient.**, v. 1, n. 1.
- 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.
- Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. (2001). **Biotecnologia Industrial**. Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.1, 2001.
- Brito, A. B. N. (2007). Estudo da cristalização de lactose em diferentes solventes. **Tese de Doutorado**. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP.
- Brouda, I. B.; Edison, B. L.; Weinkauf, R. L.; Green, B. A. (2010). Maltobionic acid, a powerful yet gentle skincare ingredient with multiple benefits to protect skin and reverse the visible signs of aging. In: **Summer Acad. Meeting of the Am. Acad. of Dermatology**, Chicago.
- 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.
- Burlani, E. L. (2014). Avaliação do potencial da levedura *Kluyveromyces* spp. para a biotransformação da lactose do soro da ricota e permeado do soro de queijo em etanol. **Dissertação de Mestrado**. Centro Universitário Univates. Lajeado.
- Byford, L. L.; Stodola, F. H. (2011). Process of culturing bacteria. **US Patent**. 2496297 A.
- Carminatti, A. C. (2001). Ensaio de hidrólise enzimática de lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. **Dissertação de Mestrado**. Centro Tecnológico. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

- Carra, S. (2012). Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS.
- Carvalho, F.; Prazeres, A. R.; Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. **Sci. Total Environ.** 445-446: 385-396.
- Cereda, M. P.; Vilpoux, O. F. (2003). **Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. Vol. 3. São Paulo: Fundação Cargill. 711 p.
- 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.
- Chung, T. W.; Yang, J.; Akaike, T.; Cho, K. Y.; Nah, J. W.; Kim, S. I. (2002). Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. **Biomaterials.** 23: 2827-2834.
- Codex Alimentarius (2005). **Codex Alimentarius** Disponível: <<http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/>>. Acesso em: 13 out. 2015.
- 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.
- Doelle, H. W.; Gumbira-Sa'id, E.; Greenfield, P. F.; Mitchell, D. A. (1993). Operational parameters for packed beds in solid-state cultivation. **Biotechnol. Adv.** 11: 599-610.
- Eduardo, M. de P. (2002). Hidrólise enzimática de mandioca e puba para a obtenção de xarope de maltose. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- 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 Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Erzinger, G. S.; Silveira, M. M.; Lopes da Costa, J. P. C.; Vitolo, M.; Jonas, E. (2003). Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. **Braz. J. Microbiol.** 34: 329-333.
- Farris, P. K.; Edison, B. L.; Brouda, I.; Weinkauff, R. L.; Green, B. A. (2012). A high-potency, multimechanism skin care regimen provides significant antiaging effects: results from a double-blind, vehicle-controlled clinical trial. **J. Drugs Dermatology.** 11: 1447-1454.
- Fernandes, D. (2013). Avaliação do uso de módulo de membrana cerâmica em processos fermentativos para a separação de etanol e concentração de biomassa de *Zymomonas mobilis*. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Caxias do Sul.

- 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.
- Gabardo, S. (2015). Engenharia de biorreatores contínuos com células imobilizadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo à bioetanol. **Tese de Doutorado**. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
- Gaouar, O.; Aymard, C.; Zakhia, N.; Rios, G. M. (1997). Enzymatic hydrolysis of cassava starch into maltose syrup in a continuous membrane reactor. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 69: 367-375.
- Gerling, K. G. (1998). Large scale production of lactobionic acid use and new applications. **Int. Dairy Fed.** 251 – 261.
- Green, B. A.; Briden, M. E. (2009). Procedures in Cosmetic Dermatology: Cosmeceuticals. **Elsevier.** 2: 209-215.
- Guimarães, P. M. R.; Teixeira, J. A.; Domingues L. (2010). Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnol. Adv.** 28: 375-384.
- Gutiérrez, L. F.; Hamoudi, S.; Belkacemi, K. (2012). Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **Int. Dairy J.** 26: 103-111.
- Hardman, M. J.; Scopes, R. K. (1988). The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. **Eur. J. Biochem.** 173:203-209.
- Hollatz, C. (2004). Análise da fermentação de maltose e maltotriose por *saccharomyces cerevisiae*. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.
- Hustede, H.; Haberstroh, H. J.; Schinzic, E. (1985). Gluconic acid. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.** 12: 2449-2456.
- Jonas, R.; Silveira, M.M. (2004). Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 118: 321-336.
- 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.
- Kim, I. S.; Kim, S. H. (2002). Development polymeric nanoparticulate drug delivery system: in vitro characterization of nanoparticles based on super-containing conjugates. **Int. J. Pharm.** 245: 67-73.

Kim, T. H.; Park, I. K.; Nah, J. W.; Choi, Y. J.; Cho, C. S. (2004). Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. **Biomaterials**. 25: 3783 – 3792.

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.

Limberger, V. M. (2012). Extração de β -Glucanas de cevada e produção de xarope de maltose a partir do amido residual. **Tese de Doutorado**. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

Luz, M. P. (2010). Produção de bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Lavras. Lavras.

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.; Pasquali, F. C.; Kern, D. B.; Silveira, M. M.; Ayub, M. A. Z. (2013). Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**. 40:1–10.

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 -lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Biochem. Eng. J**. 51: 1-6.

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

Marchal, L. M.; Beeftink. H. H.; Tramper, J. (1999) Towards a rational design of commercial maltodextrins. **Trends Food Sci. Tec**. Vol. 10, pp. 345-355.

Meiberg, J. B. M.; Bruinenberg, P. M.; Sloots. Boelem (1990) A process for the fermentative oxidation of reducing disaccharides. **Patent application**. EP0384534 B1.

Merrill, R. K.; Singh, M. (2009). Food ingredients and food products treated with an oxidoreductase and methods for preparing such food ingredients and food products. **Patent application**. EP 2 123 294 A1.

- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Mirescu, A. (2007). A new environmental friendly method for the preparation of sugar acids via catalytic oxidation on gold catalysts. **Science Direct.** 70: 644-652.
- Miyamoto, Y.; Ooi, T.; Kinoshita, S. (2000). Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas* sp. LS13-1. **Biotechnol. Lett.** 22:427-430.
- Mizubuti, I. Y. (1994). Soro do leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semia.** 15: 80-94.
- Modena, M. A.; Reggiolo, D. B.; Modena, A. L. S.; Di Reno, E. M. C. (2013). New low molecular complexes between iron and maltobionic acid, use therefore for intramuscular or subcutaneous administration in the treatment of anemic states, and new pharmaceutical compositions adapted for these uses. **US Patent.** 0079298 A1.
- 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.
- Murari, C. S. (2013). Estudo da bioconversão da lactose do soro de leite em bioetanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto. São Paulo.
- Nakano, H.; Kiryu, T.; Kiso, T.; Murakami, H. (2010). Biocatalytic production of lactobionic acid. **Biocatal. Biomol. Eng.** 391-404.
- Neostrata Company (2010). **Technical Information Bulletin:** Maltobionic Acid. Inc., 307 College Road East, Princeton, New Jersey, USA.
- 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.
- Oliveira, A.; Demoliner, M.; Carra, S; Silveira, M. M.; Malvessi, E. (2015). Recuperação e Purificação de Lactobionato de Sódio Obtido por Rota Enzimática. **XXIII Encontro de Jovens Pesquisadores.** UCS.
- 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. **Enz. and Microb. Technol.** 49: 183-191
- Perna, V.; Castelló, E.; Wenzel, J., Zampol, C; Fontes Lima, D. M.; Borzacconi, L.; Varesche, M. B.; Zaiat, M.; Etchebere, C. (2013). Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **SciVerse ScienceDirect.** 38: 54-62.

- Perrone, I. T. (2010). Soro de leite: concentração, cristalização da lactose e secagem. **Tese de Doutorado**. Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
- Playne, M. J.; Crittenden, R. G. (2009). Galacto-oligosaccharides and other products derived from lactose. **Advan. Dairy Chem.** 3: 121-201
- Raimundo, G. M. (2003). Desenvolvimento do processo contínuo de produção de xaropes concentrados de açúcar invertido. **Dissertação de Mestrado**. Centro de Tecnologia e Geociências. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE.
- Ramchandran, L.; Sanciolo, P.; Vasiljevic, T.; Broome, M.; Powell, I.; Duke, M. (2012). Improving cell yield and lactic acid production of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* by a novel submerged membrane fermentation process. **J. Membrane Sci.** 403-404: 179-187.
- Rehr, B.; Wilhem, C.; Sahm, N. (1991). Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Microbiol. Biotechnol.** 35: 144-148.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. (2009). **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6 ed. London, UK: Pharmaceutical Press. Washington, DC: American Pharmacists Association.
- 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.
- 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.
- Shaw, J. F.; Sheu, J. R. (2014). Production of high-maltose syrup and high-protein flour from rice by an enzymatic method. **Biosci. Biotech. Bioch.** 56(7): 1071-1073.
- Silva, M. F.; Fornari, R. C. G.; Mazutti, M. A.; Oliveira, D.; Padilha, F. F.; Cichoski, A. J.; Cansian, R. L.; Luccio, M.; Treichel, H. (2009). Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **J. Food Eng.** 90: 119-123.
- Silveira, M. M.; Jonas, R. (2002). The biotechnological production of sorbitol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59:400-408.
- Silveira, E. A. (2013). Caracterização bioquímica de leveduras industriais produtoras de etanol cultivadas em diferentes açúcares. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, SP.

- 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.
- Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). **Biotechnol. Ind.** São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.2.
- 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.
- Szczodrak, J. (2000) Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized b-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Molec. Catal.** 10:631-637.
- Tasic-Kostov, M.; Pavlovic, D.; Lukic, M.; Jaksic, I.; Arsic, I.; Savic, S. (2012). Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside-based topical emulsions: the colloidal structure, stability and efficacy evaluation. **Int. J. Cosmet. Sci.** 34: 424-34.
- Valle, T. A.; Ruzza, A. A.; Mastroeni, M. F.; Malvessi, E.; Silveira, M. M.; Souza, O.; Erzinger, G. S. (2013). Lactobionic acid produced by *Zymomonas mobilis*: alternative to prepare targets nanoparticles. **Pharm. Anal Acta.** 4: 220.
- Venturini Filho, W. G.; Cereda, M. P. (1998). Hidrolisado de fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja: avaliação química e sensorial. **Ciên. Tec. Alimen.** Vol. 18 (2). Campinas, SP.
- 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. Caxias do Sul, RS.
- Vignoli, J. A.; Celligoi, M. A. P. C., Silva, R. S. F.; Barros, M. (2006). The production of sorbitol by permeabilized and immobilized cells of *Zymomonas mobilis* in sucrose. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 49: 683-687.
- Viikari, L. (1984). Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24:471-476.
- Villa, R.; Cerroni, B.; Viganò, Lucia; Margheritelli, S.; Abolafio, G.; Oddo, L; Paradossi, G.; Zaffaroni, N. (2013). Targeted doxorubicin delivery by chitosan-galactosylated modified polymer microbubbles to hepatocarcinoma cells. **Colloid. Surfaces B.** 110: 434– 442
- Westergaard, V. (2001). Evaporación y secado por atomización. **Tecnol. Leche en Polvo.** Copenhagen: Niro A/S, 166 p.
- Wisbeck, E.; Silveira, M. M.; Ninow, J.; Jonas, R. (1997). Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. **J. Basic Microbiol.** 37: 445-449

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

Yu, R.; Van Scott, E. (2006). Oligosaccharide aldonic acids and their topical use. **Patent application.** WO2001001932 A2.

Yu, T.; Du, Y. X.; Chen, B. (2011). Evaluation of clarithromycin lactobionate as a novel chiral selector for enantiomeric separation of basic drugs in capillary electrophoresis. **Electrophoresis.** 32: 1898-1905.

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.

Zhou, H. X.; Xu, J. L.; Chi, Z.; Liu, G. L.; Chi, Z. M. (2013) β -Galactosidase over-production by a *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. **Biochem. Eng. J.** 76: 17-24.

ANEXO 1

Laudo de análise do xarope de maltose utilizado

Certificado de Análises



CQM021 REVISÃO: 2

Data de Produção : 27/03/2014
Lote(s) : 201403270038
Produto : Xar. Glucose Milho-Maltegill 4582

Análises Físico-Químicas	Especificação		Resultados
	Mínima	Máxima	
Matéria Seca (DS) (%).....	81,50	82,50	81.95
I2.....	-	-	Yellow
SO2 (ppm).....	-	80,00	45.24
Cinzas (%).....	-	0,25	0.25
Proteína (%).....	-	0,09	0.08
Dextrose (Dp1) (%).....	-	13,00	11.96
Maltose (Dp2) (%).....	41,00	-	43.28
Maltotriose (Dp3) (%).....	-	22,00	20.77
Açúcares Superiores (Dp4) (%).....	-	28,00	23.99
pH (Sol. 1:1).....	4,50	5,50	4.95

Em casos de Emergência ligar para 0800 940 1455 (24 horas).

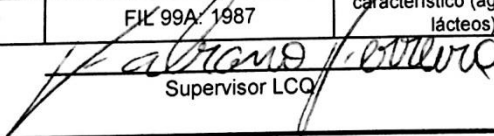
Prazo de Validade : 4 Meses após data de produção

Cargill Agrícola S/A
 Rua Will Cargill 880 Distrito Industrial
 Uberlândia MG 38402350
 Telefone 34.3218.5344 Fax 34.3218.5353
 EMail jose_ribamar@cargill.com
 CNPJ 60.498.706/0134-88Inscrição Estadual 702.024.703.0776

Responsável Técnico : José de Ribamar Pires Ferreira Filho CRQ 02302160
 * Documento impresso eletronicamente.

ANEXO 2

Laudo de análise do soro do leite utilizado

Laudo N° 0304L02			
Produto: Soro de Leite em Pó Desmineralizado			
Marca: PORTO ALEGRE LATICÍNIOS PORTO ALEGRE IND E COM LTDA Av. Mario Martins de Freitas 6000 - Ponte Nova /MG - CEP 35432-077 Tel (0XX) 31 3819-3200 Fax (0XX) 31 3819-3215 lcq@laticiniosportoalegre.com.br			
Data de Fabricação:	03/04/2014	Cliente:	amostra
Data de Validade:	03/04/2015		
Data de emissão:	04/04/2014 10:25		
Lote:	2		
Aspecto:	Pó homogêneo e isento de materiais estranhos grumos e sem pontos pretos visíveis.		
Embalagem:	Primária: Sacos de polietileno termossoldados Secundária: Sacos Kraft (03 folhas) costurados		
Peso Líquido:	25 Kg		
Análise	Método	Resultados	Unidade
Aparencia	FIL 99A: 1987	Característico	Faixa
Sabor	FIL 99A: 1987	Característico	Faixa
Umidade	FIL 26A: 1993	2,00	%
Proteína	FIL 20B: 1993	12,48	%
Gordura	FAO, 1976	0,50	%
Cinzas	AOAC 15 th , 1990	5,35	%
Acidez	FIL 81: 1981	0,15	% de ácido láctico
Cloreto	LANARA	1,10	%
Lactose	Cálculo	79,67	
Peso Especifico	Niro Atomizer	0,688	
PH (Sol. 10% a 20°C)	Adolfo Lutz	6,20	
Antibiótico	Enzimático	Ausente	Faixa
Aflatoxina	Enzimático	Ausente	Faixa
Partículas Queimadas	ADMI boletim 916	A	Máx. B
Cont. Total Mesófilas	AOAC	1,0 x 10 ²	UFC/g
Bolores e Leveduras	Compact Dry	< 1 x 10 ¹	UFC/g
<i>Staphylococcus coag. posit.</i>	AOAC	< 1 x 10 ¹	UFC/g
<i>Bacillus cereus</i>	AOAC 15 th , 1990	< 1 x 10 ²	UFC/g
Coliformes total	AOAC	< 1 x 10 ¹	UFC/g
Coliformes fecal	AOAC	< 1 x 10 ¹	UFC/g
E. coli	AOAC	Ausente	UFC/g
Salmonella sp	NT 076 (Bax)	Ausente em 250g	UFC/250g
Odor e Sabor	FIL 99A: 1987	característico (agradável e lácteos)	característico
 Supervisor LCC			

ANEXO 3

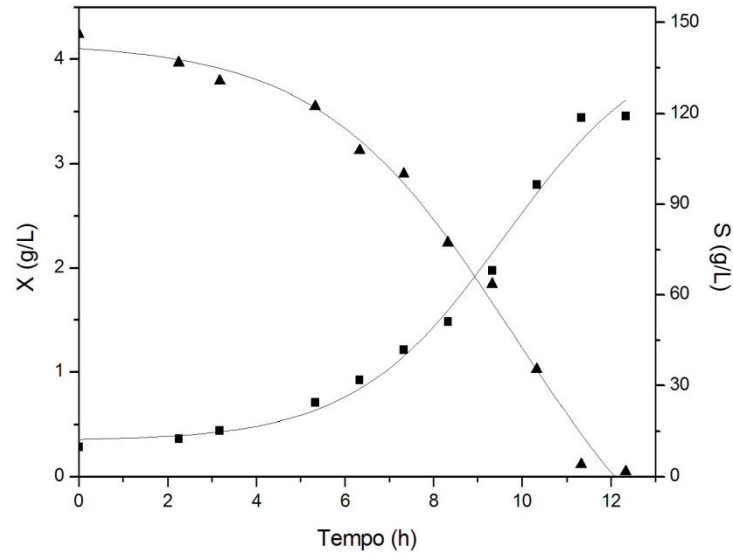
Cultivo de *Zymomonas mobilis* em biorreator de mistura completa

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

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

(■) concentração celular, (▲) açúcares redutores

Tabela 1A: Resultados gerais do cultivo de *Zymomonas mobilis* em regime descontínuo, com

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

Parâmetros de processo	Valor estimado
X_f (g/L)	3,6
P_f (g/L)	69
$\mu_{X,m}$ (h^{-1})	0,33
S_f (g/L)	1,65
t (h)	12,3

X_f , concentração celular final; P_f , concentração final de etanol; $\mu_{X,m}$, máxima velocidade específica de crescimento; S_f , concentração final de substrato; t, tempo de processo.

ANEXO 4

Esquema da imobilização de células/enzimas de *Zymomonas mobilis* em alginato de cálcio

