

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Purificação de ácido lactobiônico obtido com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*

Sabrina Carra^{1,2}, Alana Peres de Oliveira¹, Melissa Demoliner¹, Marina Alberti¹,
Mauricio Moura da Silveira¹, Valquíria Linck Bassani², Eloane Malvessi¹

¹Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia

Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: scarra@ucs.br

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

RESUMO

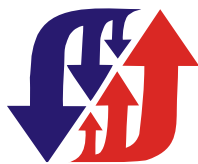
O ácido lactobiônico é um polihidroxiácido, com importantes aplicações, que pode ser obtido em associação com o sorbitol, tendo como substratos lactose e frutose, respectivamente, em reações catalisadas pelo complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase/gliconolactonase, presente em células de *Zymomonas mobilis*. Na bioconversão, o controle do pH é feito com NaOH, havendo a formação do lactobionato de sódio. A recuperação e a purificação deste produto pode ser realizada por precipitação com etanol, tendo em conta a diferença de solubilidade entre os compostos em solução. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi otimizar a recuperação e a purificação deste composto, utilizando-se ferramenta estatística Box-Behnken design (BBD), com três níveis e três fatores: temperatura (°C) 5, 25, 45; teor de etanol na mistura (% v/v) 55, 65, 75; vazão específica de adição do solvente (mL/mL/min), 0,1, 0,3, 0,5. A recuperação e a purificação do lactobionato foi favorecida com 0,5mL/mL/min, 65% (v/v), a 45°C.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*, glicose-frutose oxidoreductase/glicono-lactonase, etanol, sal de ácido lactobiônico.

INTRODUÇÃO

As enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono-lactonase (GL), presentes na bactéria *Zymomonas mobilis*, têm a capacidade de converter lactose em ácido lactobiônico e frutose em sorbitol (Zachariou & Scopes, 1986; Satory et al., 1997; Malvessi et al., 2006). Nesta bioconversão, realizada com células inativadas de *Z. mobilis*, o controle do pH reacional, para promover a ação catalítica, pode ser feito com NaOH. No caso, o produto da oxidação da lactose é o lactobionato de sódio (Malvessi *et al.*, 2013). Ácido lactobiônico e/ou seu sal de sódio apresentam importantes aplicações, como agente de vetorização hepático, em soluções de conservação de órgãos para transplante e em cosméticos anti-idade (Sumimoto & Kamada, 1990; Yu e Van Scott, 2004; Chernyy et al., 2013).

Para a purificação dos produtos da mistura final da bioconversão, é relatado o uso da técnica de precipitação com solventes orgânicos como etanol, metanol e ácido acético glacial, entre outros (Silveira *et al.*, 2007). Destaque é dado para a utilização de etanol, uma vez que este solvente é obtido no cultivo de *Z. mobilis* em glicose, contribuindo, portanto, com a diminuição do custo de recuperação de produtos. Conforme estudos anteriores do grupo, a separação e a precipitação são possíveis porque o lactobionato de sódio é praticamente insolúvel em etanol, enquanto o coproduto sorbitol é levemente solúvel neste álcool (Carra,



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

2012). Entretanto, foi observado que a vazão de adição do solvente, o teor de etanol, a temperatura e as condições de mistura influenciam a eficiência da recuperação, acarretando em diferenças significativas entre os lotes de matéria-prima avaliados. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi otimizar o método de purificação e recuperação de lactobionato de sódio por precipitação com etanol fazendo uso da ferramenta estatística Box-Behnken *design*.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaios fermentativos e de bioconversão

O microrganismo utilizado foi *Z. mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580), adquirido do *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (RFA). O meio líquido utilizado para a ativação e conservação da cultura, preparo de inóculo e cultivo da bactéria foi descrito por Malvessi *et al.* (2006). Os cultivos para a obtenção de células/enzimas foram realizados em regime descontínuo, em biorreator de agitação mecânica com 5,5 litros de volume útil de meio, a 30°C e pH 5,5. Ao término dos cultivos, a biomassa foi concentrada e imobilizada em alginato de cálcio, de acordo com metodologia proposta por Carra (2012).

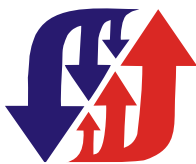
Os ensaios de bioprodução de ácido lactobiônico foram realizados em reator encamisado, contendo 2500 mL de solução de substratos 700 mmol/L de lactose e 600 mmol/L de frutose e 20 g/L de células imobilizadas. A reação de bioconversão foi conduzida sob agitação mecânica de 200 rpm e pH controlado em 6,4 pela adição de NaOH 7,0 mol/L.

Purificação e recuperação do sal de ácido lactobiônico

O teste de recuperação e purificação do lactobionato de sódio foi realizado por precipitação com etanol variando-se os seguintes parâmetros: temperatura, teor do solvente na mistura e vazão específica de adição (mL de solvente/mL de caldo/min). O ensaio foi realizado utilizando 30mL de caldo de bioconversão, sob agitação magnética. A otimização dos parâmetros foi analisada utilizando-se a ferramenta Box-Behnken design (BBD), sendo processados com o auxílio do programa estatístico Minitab 16. O desenho experimental foi realizado com três fatores e três níveis: A1, temperatura (°C): 5 (-1), 25 (0), 45 (+1); A2, teor de solvente (% v/v): 55 (-1), 65 (0), 75 (+1); A3, vazão específica de adição solvente (mL/mL/min): 0,1 (-1), 0,3 (0), 0,5 (+1). A pureza do sal de ácido lactobiônico foi determinada em função da quantidade desse composto identificada em uma solução 10 g/L, enquanto a recuperação foi quantificada considerando a massa do composto obtido em relação ao inicial. As amostras foram analisadas por cromatografia em fase líquida (CLAE), de acordo com Carra (2012).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A cinética da bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico (sal sódico) e sorbitol, respectivamente, conduzida por 22 h, é ilustrada na Figura 1. A máxima velocidade específica de formação de produto ($\mu_{pm\acute{a}x}$), determinada nas horas iniciais de reação, foi estimada em 1,9 mmol/L/h, obtendo-se ainda 76% de conversão de lactose em produto. Ao final do processo foram atingidos 495 mmol/L de produto (ácido lactobiônico ou sorbitol) e medidas concentrações residuais médias de 154 e 60 mmol/L de lactose e frutose.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

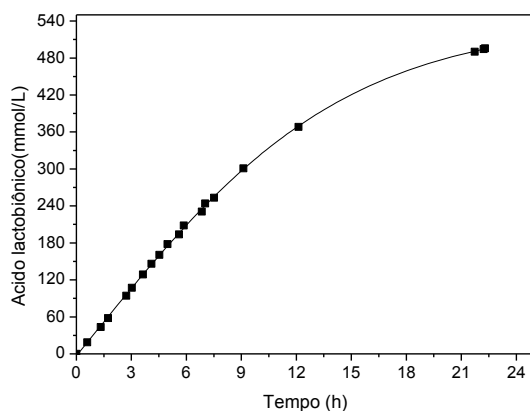


Figura 1: Ácido lactobiónico formado em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando 20 g/L de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* (Substrato inicial: 700 mmol/L lactose e 600 mmol/L de frutose, a 39°C, pH 6,4).

Na etapa de recuperação e purificação do sal de ácido lactobiónico, fazendo uso da ferramenta de otimização de resposta, foi observado que vazão superior da adição de etanol (0,5 mL/mL/min) favoreceu a recuperação e purificação desse composto. No gráfico de contorno apresentado na Figura 2, são identificadas as possíveis interações entre as variáveis de teor de etanol empregado e temperatura.

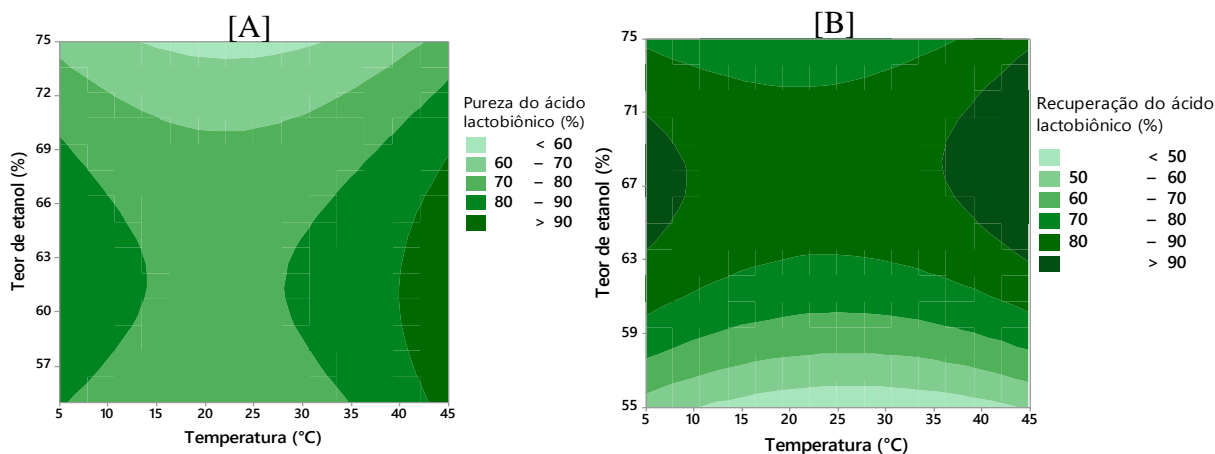
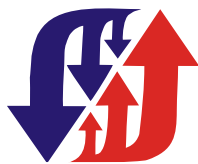


Figura 2: Gráfico de contorno de purificação [A] e de recuperação [B] do lactobionato de sódio, relacionando o teor do solvente e a temperatura, em vazão de etanol fixa de 0,5mL/mL/min.

Com relação à purificação, a utilização de teor de etanol entre 55 e 70% (v/v) e da temperatura de 45°C foram mais favoráveis para a obtenção de elevado grau de pureza de lactobionato de sódio (>90%), constatando-se baixas concentrações residuais de lactose e sorbitol. Nestes testes, não foi identificada a presença de frutose, o que provavelmente está relacionado à maior solubilidade desse composto em etanol (Figura 2A). Quando analisada a recuperação, as condições mais indicadas de precipitação foram relacionadas ao uso de 61 a 73% (v/v) de etanol, a 45°C, ou 65 a 70% (v/v), a baixa temperatura (5°C) (Figura 2B).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A fim de avaliar a condição que levaria ao equilíbrio entre a purificação e a recuperação do produto, foram realizados testes adicionais com as melhores condições obtidas: 0,5 mL/mL/min, a 45°C, e teor de etanol intermediários (60 e 65% v/v). Com o intuito de obter elevado grau de pureza de lactobionato de sódio, foram realizadas três precipitações consecutivas. Valores superiores de recuperação e purificação foram atingidos com 65% (v/v) de etanol. Nessa condição, 79, 77 e 68% de recuperação e 75, 88 e 100% de pureza do lactobionato de sódio foram alcançados na primeira, segunda e terceira precipitação, respectivamente.

Dependendo da utilização a ser dada ao sal de ácido lactobiônico, apenas duas precipitações poderiam ser suficientes, permitindo, assim, reduzir a perda durante o processo. Por outro lado, foi demonstrado que, através das precipitações sucessivas, é possível obter-se esse sal com elevado grau de pureza, superior mesmo ao disponível comercialmente (97%).

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitiram determinar os parâmetros ideais para a precipitação de lactobionato de sódio com etanol - vazão, 0,5 mL/mL/min; temperatura, 45°C; teor do solvente em água; 65% - proporcionando a obtenção de resultados elevados em termos de recuperação e de purificação do produto.

Estes resultados servem como base para o desenvolvimento de estudos de purificação/recuperação do lactobionato de sódio em maior escala, tendo em vista a sua potencial aplicação na área farmacêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carra, S., 2012. Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. *Dissertação de mestrado*. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS.
- Chernyy S, Jensen BEB, Shimizu K, Ceccato M, Pedersen SU, Zelinkin AN, Daasbjerg K, Iruthayaraj J. 2013. Surface grafted glycopolymer brushes to enhance selective adhesion of HepG2 cells. *J Col Int Science*. 404: 207-214.
- Malvessi E, Concatto K, Carra S, Silveira MM. 2006. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 49: 139-144.
- Malvessi E, Carra S, Pasquali FC, Kern DB, Silveira MM, Ayub MAZ. 2013. Production of organic acids by periplasmic enzymes presents in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 40: 1-10.
- 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.
- Silveira MM, Malvessi E, Carra S, Pasquali FC, Polidoro TA. 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.
- Sumimoto R, Kamada N. 1990. Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. *Transpl. Proc*. 22: 2198-2199.
- Yu R, Van Scott E, 2004. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *J. Cosmetic Dermatol*. 3: 76-87.
- Zachariou M, Scopes RK, 1986. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol*. 3: 863-869.