

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Reutilização de células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio para a obtenção e posterior purificação de lactobionato de potássio

Eduarda Gonçalves¹, Maria G. Delagustin¹, Sabrina Carra¹, Eloane Malvessi¹ e
Maurício M. Silveira¹

¹Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: egoncalves2@ucs.br

RESUMO

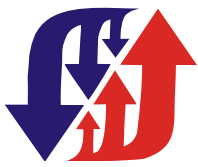
O ácido lactobiônico e seus sais, como o lactobionato de potássio, são substâncias de alto valor comercial e com importantes aplicações na área farmacêutica. Estes compostos podem ser obtidos em associação com sorbitol, via conversão de lactose e frutose, respectivamente, pelas enzimas glicose-frutose-oxidoreductase (GFOR) e gliconolactonase (GL), presentes em células de Zymomonas mobilis. No processo de obtenção destes compostos, destaca-se a utilização da imobilização celular, que apresenta como vantagens a possibilidade de reutilização do biocatalisador e a facilidade de recuperação dos produtos do caldo final de bioconversão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a obtenção de lactobionato de potássio em bateladas sucessivas e posterior purificação do produto. Como resultados da bioconversão, foram atingidos 474 e 484 mmol/L de produto em 33 e 55h de processo, respectivamente, na primeira e segunda batelada, com rendimento médio de 74%. A purificação com etanol resultou em um produto com pureza aproximada de 90% (m/v).

Palavras-chave: Lactobionato de potássio, ácido lactobiônico, *Zymomonas mobilis*, glicose-frutose oxidoreductase (GFOR)/glicono-lactonase (GL), purificação.

INTRODUÇÃO

O ácido lactobiônico é um composto de suma importância para a indústria farmacêutica, pois além das propriedades hidratantes, anti-idade e antioxidantes (Yu & Van Scott, 2004), é utilizado em solução conservante de órgãos para transplante (Sumimoto & Kamada, 1990) e na vetorização de drogas (Kim *et al.*, 2004). Uma das formas de obtenção deste ácido é através da ação do complexo enzimático periplasmático de *Zymomonas mobilis* - glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e gliconolactonase (GL). GFOR atua na oxidação da lactose à lactobiono-lactona e redução da frutose a sorbitol. Por ação da GL, a lactona é convertida a ácido lactobiônico (Zachariou & Scopes, 1986; Malvessi *et al.*, 2013). Durante a bioconversão, em função da formação do ácido lactobiônico, há uma queda do pH reacional. Com isso, torna-se necessário o controle do pH com uma solução alcalina, como por exemplo, o hidróxido de potássio (Zagonel, 2013) hidróxido de sódio (Malvessi *et al.*, 2013) ou hidróxido de cálcio (Murakami *et al.*, 2008), levando à formação dos respectivos sais (lactobionatos).

A imobilização de células em alginato de cálcio tem sido utilizada na etapa de bioconversão, pois apresenta vantagens como a facilidade de separação das células/enzimas do produto final e a possibilidade de reutilização do biocatalisador imobilizado em bateladas repetidas de conversão (Carra *et al.*, 2015). Uma vez formado, o lactobionato pode ser



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

purificado com o uso de solventes orgânicos, como por exemplo, o etanol. Além de ser uma técnica simples, o etanol é um dos produtos gerados no cultivo de *Z. mobilis*. O que garante a separação do produto é a diferença de solubilidade dos compostos no solvente, sendo que o lactobionato é praticamente insolúvel em etanol e os substratos residuais, lactose e frutose, tem elevada solubilidade (Carra, 2012). Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de lactobionato de potássio utilizando de células imobilizadas de *Z. mobilis* em bateladas consecutivas e a posterior purificação do produto final.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção e imobilização de células/enzimas: O microrganismo utilizado neste ensaio foi *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. As células foram cultivadas em biorreator (Biostat B, B. Braun Biotech, Sartorius), com 5L de meio, 30°C, agitação em 450 rpm e pH controlado em 5,5 (Malvessi et al., 2006). Ao final do cultivo, as células foram concentradas, permeabilizadas em CTAB e imobilizadas em alginato de cálcio (Carra, 2012).

Bioprodução de ácido lactobiônico/lactobionato de potássio: A etapa de bioconversão foi realizada em biorreator com agitação mecânica, contendo 1,3L de solução de lactose (700 mol/L) e frutose (600 mol/L), 20 g/L de biocatalisador imobilizado, a 39°C e pH controlado automaticamente em 6,4 com a adição de KOH 7 mol/L. Finalizado o primeiro ciclo, as esferas foram drenadas do meio de reação, tratadas com CaCl₂ 0,3 mol/L e lavadas com água pH 7,0. A batelada foi repetida, sendo conduzida por um período necessário para que fosse atingido rendimento mínimo de 70% em produto.

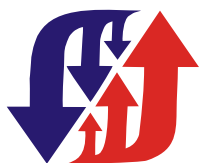
Purificação do produto: Foi utilizado 1L do caldo final da bioconversão e adicionado etanol 70% (m/v), a vazão de 500 mL/min, sob agitação mecânica, a 45°C (Oliveira et al, 2015). Posteriormente, a mistura foi mantida em temperatura inferior a 0°C durante 24h e, na sequência, o precipitado foi ressuspenso em água destilada. Este procedimento foi repetido nas três etapas de precipitação.

Parâmetros cinéticos: A concentração máxima de produto (P_{max}) foi calculada em função do volume e concentração da solução de KOH usada na reação; a conversão de substrato em produto ($Y_{P/S0}$) foi determinada pela relação entre o produto formado e a lactose inicial; a produtividade molar (P_m) pela divisão do lactobionato de potássio formado pelo tempo de processo; a produtividade específica (q), pela divisão de P_m pela concentração celular; a velocidade específica de formação de ácido lactobionato de potássio função do tempo, sendo os valores de velocidade divididos pela massa celular.

Métodos analíticos: A determinação das concentrações do ácido lactobiônico, sorbitol, lactose e de frutose foi realizada por cromatografia em fase líquida (Carra, 2012). A concentração de ácido lactobiônico foi convertida para lactobionato de potássio.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A obtenção do lactobionato de potássio foi realizada via ação de células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Na Tabela 1, pode ser observado que valores de produtividade máxima de 474 e 484 mmol/L e rendimento de 73% e 75%, respectivamente, foram atingidos na primeira e na segunda batelada de bioconversão. Embora semelhantes, quando considerado os valores de produtividade molar e específica, parâmetros que levam em consideração o tempo de processo, ressalta-se que valores superiores de P_m (20 mmol/h) e de q (0,77 mmol/g/h) foram atingidos na primeira batelada.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1: Produção de lactobionato de potássio por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ($S_0 = 700$ mmol/L de lactose e 600 mmol/L de frutose, $X = 20$ g/L, pH 6,4, 39°C).

Parâmetros cinéticos	Batelada 2	Batelada 1
P_{\max} (mmol/L)	474	484
t (h)	33,3	55,5
Y_{P/S_0} (mmol/mmol)	0,73	0,75
P_m (mmol/h)	20,0	12,3
q (mmol/g/h)	0,77	0,47
$\mu_{P,\max}$ (mmol/g/h)	1,1	0,7
S_f (mmol/L)	171	161

P_{\max} , concentração máxima de ácido lactobiônico; t , tempo de processo; Y_{P/S_0} , conversão em relação ao substrato inicial; P_m , produtividade molar; q , produtividade específica; $\mu_{P,\max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , lactose residual.

Na Figura 1, são apresentados os perfis de produção de lactobionato de potássio e as velocidades específicas de formação de produto em função do tempo de bioconversão.

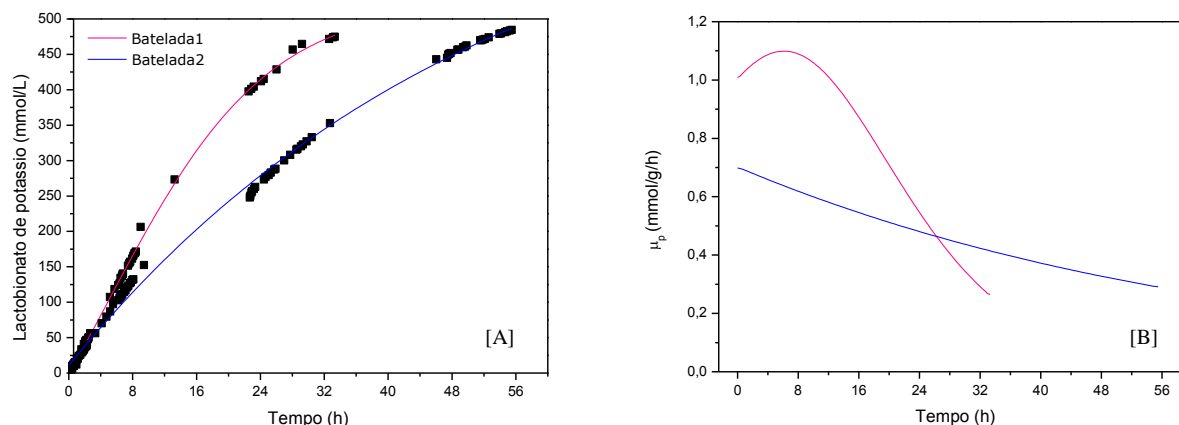
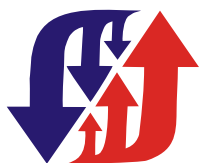


Figura 1: Lactobionato de potássio formado [A] e velocidade específica de formação de produto (μ_p) [B] em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em bateladas consecutivas ($S_0 = 700$ mmol/L de lactose e 600 mmol/L frutose, $X = 20$ g/L, pH 6,4, 39°C, volume reacional 1,3L).

De acordo com os perfis cinéticos apresentados na Figura 1A, verifica-se que a formação de produto na segunda batelada ocorreu de forma mais lenta. Entretanto, no final foi atingido o mesmo valor em termos de rendimento (~74%). Isso pode ser observado também ao analisar o perfil de μ_p , apresentado na Figura 1B. Na primeira batelada a velocidade máxima de 1,1 mmol/g/h é alcançada em cerca de 8h de processo e após, tende a cair rapidamente. Na segunda batelada, a velocidade máxima de 0,7 mmol/g/h é identificada no início da reação e após, é observada a redução gradual da velocidade até o final da bioconversão, em torno de 55h. Este fato poderia estar relacionado ao tratamento das esferas com CaCl_2 , que levam ao aumento da rigidez e na diminuição da transferência de massa ou, ainda, queda da estabilidade da enzima, provavelmente devido à exposição prolongada às condições da bioconversão.

Os testes de purificação foram realizados com o intuito de separar o lactobionato de potássio dos substratos residuais, lactose, frutose e o sorbitol, presentes no caldo final de bioconversão (Tabela 2).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 2: Dados gerais da purificação de lactobionato de potássio do caldo da bioconversão.

Produtos/substratos	Caldo final da bioconversão		Produto final (10 g/L)	
	g/L	% (m/v)	g/L	% (m/v)
Lactobionato de potássio	209	60,3	8,4	91,3
Lactose	34,9	10,1	0,6	6,5
Sorbitol	102,5	29,6	0,2	2,2
Frutose	*	*	*	*

* Não detectado

Cerca de 209 g/L de lactobionato de potássio foi determinada no caldo final da bioconversão, representando aproximadamente 60% (m/v) do volume total; lactose (~35 g/L) e sorbitol (~102 g/L), em torno de 10 e 30% (m/v) da mistura, respectivamente (Tabela 2). Finalizadas as três etapas de precipitação com etanol, a partir de uma solução com concentração teórica de 10 g/L, cerca de 8 g/L de produto foi quantificado, o que representa uma pureza de 90% (m/v). Concentrações residuais de 0,6 e 0,2 g/L de lactose e de sorbitol, respectivamente, foram medidas. Frutose não foi detectada em ambas as amostras - no caldo de bioconversão e no produto final - em função da baixa concentração, inferior ao limite de detecção e quantificação pelo método proposto.

CONCLUSÕES

Na bioprodução do lactobionato de potássio pelo complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizado em alginato de cálcio, foi atingido rendimento de 74% em produto nas duas bateladas consecutivas de conversão. Com a utilização de etanol na etapa de purificação proposta, lactobionato de potássio com grau de pureza de 90% (m/v) foi obtido.

AGRADECIMENTOS: UCS, PROCAD/CAPES, CNPq e FAPERGS.

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.
- Carra S, Rodrigues DC, Beraldo NMC, Silveira MM, Bassani VL, Malvessi E. 2015. Reuso de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácido lactobiônico. XX SINAFERM, Fortaleza, CE.
- Kim TH, Park IK., Nah JW, Choi, YJ, Cho CS. 2004. Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. *Biomaterials*. 25: 3783-3792.
- 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 present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40: 1-10.
- Murakami H, Kiryu T, Kiso T, Nakano H. 2008. Production of Calcium Lactobionate by a Lactose-oxidizing Enzyme from *Paraconiothyrium* sp. KD-3. *J. Appl. Glycosci.* 55: 127-132.
- Oliveira AP, Demoliner M, Carra S, Silveira MM, Malvessi E. 2015. Recuperação e purificação de lactobionato de sódio obtido por rota enzimática. XXIII Encontro de Jovens Pesquisadores. UCS, Caxias do Sul, RS.
- Sumimoto R, Kamada N. 1990. Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. *Transpl. Proc.* 22: 2198-2199.
- Yu RJ, Van Scott EJ. 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.
- Zagonel TP. 2013. Obtenção de ácido lactobiônico por processo de transformação utilizando *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Paraná, PR.