

AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBÍÔNICO E SORBITOL POR CÉLULAS DE *Zymomonas mobilis* IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO

S. CARRA^{1,2}, D.C. RODRIGUES¹, N.M.C. BERALDO¹, P.F. FOREST¹, C. REGINATTO¹,
V. L. BASSANI², M. M. SILVEIRA¹, E. MALVESSI¹

¹ Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Bioprocessos, Caxias do Sul-RS

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre-RS
E-mail para contato: scarra@ucs.br

RESUMO: As enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis* glicose-frutose oxidoredutase e gluconolactonase convertem lactose em ácido lactobiônico e frutose em sorbitol. Neste sistema, células inativadas contendo as enzimas são imobilizadas para permitir sua reutilização. As enzimas são influenciadas pela temperatura, tanto com respeito à velocidade reacional quanto à termoestabilidade. O objetivo desse estudo foi avaliar a formação de produtos sob temperaturas de 36, 39, 43 e 47°C, utilizando 20g/L de células imobilizadas em alginato de cálcio, com pH de 6,4. A 43°C, maiores concentração de produtos (510mmol/L) e produtividade (21,3mmol/L/h) foram atingidos. A máxima velocidade específica de formação de produtos, no início do processo, foi favorecida com o aumento da temperatura devido ao maior fluxo de produtos e substratos pelas esferas de alginato. A 47°C, observou-se queda acentuada na velocidade, causada, possivelmente, pela desnaturação das enzimas.

1. INTRODUÇÃO

Glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e gluconolactonase (GL), enzimas presentes no periplasma da bactéria *Zymomonas mobilis*, têm a capacidade de converter lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente (Satory *et al.*, 1997). Ácido lactobiônico apresenta importantes aplicações na área da cosmética – com função hidratante, cicatrizante e anti-radicaís livres –, na área médica – como componente majoritário de soluções de conservação de órgãos a serem transplantados e vetorização de drogas – e como acidulante na indústria de alimentos (Sumimoto & Kamada, 1990; Yu & Van Scott, 2004; Murzina *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Chernyy *et al.*, 2013). Sorbitol é um poliálcool utilizado como edulcorante não cariogênico na indústria de alimentos, emoliente em cosméticos e como matéria-prima básica para produção do ácido ascórbico (Birkhed *et al.*, 1984; Budavari *et al.*, 1996; Silveira & Jonas, 2002; Jonas & Silveira, 2004).

Levando em conta a preservação do meio ambiente e sustentabilidade, a obtenção por via biotecnológica de ácido lactobiônico e sorbitol vem sendo avaliada frente à síntese

química. Para a produção desses compostos pelas enzimas GFOR/GL de *Z. mobilis*, diferentes técnicas e suportes para a imobilização celular têm sido empregados (Chun and Rogers, 1988, Rehr *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 1992; Bertasso *et al.*, 1996, Pedruzzi, 2010, Malvessi *et al.*, 2010, 2013). A imobilização consiste na retenção da enzima/células em uma matriz polimérica a fim de proporcionar o aumento da concentração do catalisador no sistema reacional, maior estabilidade, facilidade na separação dos produtos, além de permitir o reaproveitamento do biocatalisador em repetidos ciclos de bioconversão. Por outro lado, devido a restrições difusionais do próprio suporte, há relatos de diminuição da velocidade reacional, que pode ser evitada ou minimizada através da escolha criteriosa de suportes e da definição de parâmetros operacionais (Zanin e Moraes, 2004).

Carra (2012) avaliou a bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol pelo sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizado em esferas de alginato de cálcio, com respeito à massa celular imobilizada nas esferas do suporte (43, 56 e 64% de massa celular seca por massa total da mistura). A utilização de 64% (m/m) possibilitou o aumento da concentração de biocatalisador na reação (20g/L), proporcionando a obtenção de maior produtividade. Entretanto, menor transferência de substratos e produtos através das esferas foi observada, o que poderia ter acarretado em alterações do pH e da temperatura no microambiente da enzima. Dessa forma, a avaliação da temperatura reacional, se faz necessária a fim de manter-se o sistema imobilizado em condições ideais de catálise.

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da temperatura sobre a produção de ácido lactobiônico e sorbitol utilizando células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção de células/enzimas

O microrganismo utilizado nesse estudo foi *Z. mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580), adquirida do *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (RFA).

Neste trabalho, foi utilizado o meio líquido previamente descrito por Malvessi *et al.* (2006), com a seguinte composição: glicose, 20 (manutenção), 100 (inóculo), 150 (produção de células/enzimas); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; KH_2PO_4 , 1,0; extrato de levedura bruto (Prodex Lac®, Prodesa S.A., Brazil), 7,5. Soluções concentradas de sais, extrato de levedura e de glicose foram preparadas separadamente, autoclavadas a 1 atm por 15 minutos e assepticamente misturadas nas devidas proporções antes da inoculação.

A ativação de culturas foi realizada adicionando-se 2mL de suspensão bacteriana em estoque a um tubo contendo 18mL de meio de ativação, mantidos a 30°C por 12 horas. Para a produção do inóculo, 45 mL dessa cultura foram transferidos para frascos contendo 450mL de meio total, mantido sob agitação orbital de 200rpm (Certomat U/H – B. Braun Biotech, RFA), a 30°C, sob anaerobiose, por 10 horas.

O cultivo microbiano foi realizado em regime descontínuo, em fermentador de bancada de 7,0 litros de volume total, construído na Universidade de Caxias do Sul, contendo 5,5 litros de meio. O meio de cultivo foi inoculado com o volume necessário para obter-se uma suspensão celular de 20 unidades de D.O. (densidade óptica) a 560 nm. A temperatura do cultivo foi mantida a 30°C e de pH em 5,5 pela adição automática de NaOH 5mol/L.

Após o término do cultivo, o caldo fermentado foi recolhido e concentrado por centrifugação, a 5836xg, por 10 minutos. A biomassa, concentrada a 25g/L foi, em seguida, submetida à permeabilização com 0,2% (m/v) de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), seguindo a metodologia proposta por Rehr *et al.* (1991) com algumas modificações.

2.2 Imobilização celular

Para o encapsulamento de *Z. mobilis* em alginato de cálcio, foi utilizada a técnica descrita por Carra (2012). Alginato de sódio Algogel 5540 (Degussa Flavors & Fruit Systems do Brasil Ltda) foi dissolvido em água (4% m/v) e mantido sob agitação por 12 horas. Paralelamente, 50g/L (em base seca) de células de *Z. mobilis* permeabilizadas foram tratadas com glutaraldeído 0,5% (m/v), sob agitação, por 10 minutos. Ao final desse processo, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 70g/L. À solução de alginato de sódio, foi adicionado igual volume de suspensão celular de *Z. mobilis*, sendo obtido, nesse sistema heterogêneo, 64% de massa celular seca por massa total da mistura (% m/m). A mistura foi novamente mantida sob agitação e, para a imobilização das células, a mistura foi lentamente gotejada em solução de CaCl₂ 0,3mol/L. As esferas produzidas foram, posteriormente, reticuladas com glutaraldeído 0,5% (m/v) e armazenadas em água, a 4°C. O diâmetro médio das esferas de alginato de cálcio foi de 2,36.10⁻³ m, determinado com o auxílio de um tamis de 6 a 16 mesh.

2.3 Ensaios de bioconversão

Os ensaios foram realizados com 20g/L de células, em reator de 600mL, contendo 200mL de meio reacional. A solução de substratos foi preparada a partir de lactose e frutose (700+600mmol/L, respectivamente). O volume de solução de substratos foi calculado considerando a quantidade de água presente nas esferas (Carra, 2012). A condição operacional padrão de pH foi de 6,4 (Malvessi *et al.*, 2006) e o processo foi conduzido sob diferentes temperaturas: 36, 39, 43 e 47°C. O reator encamisado foi acoplado a um banho termostatizado, mantido sob agitação magnética com pH reacional controlado pela adição automática de solução de NaOH 7,0mol/L, contido em uma bureta de 50mL, através de um controlador de pH. Os ensaios foram conduzidos pelo tempo necessário para que fosse atingido aproximadamente 70% de conversão de substratos em produtos.

2.4 Métodos Analíticos

A concentração celular no meio de fermentação foi determinada indiretamente pela medida da absorbância de suspensões celulares, a 560 nm, e diretamente por gravimetria.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas diferentes temperaturas da reação de bioconversão sobre a produção de ácido lactobiônico e sorbitol. Na Figura 1, são apresentados os perfis cinéticos de formação de produto em resposta às diferentes temperaturas de processo utilizadas e na Tabela 1 são mostrados os resultados gerais obtidos em cada condição.

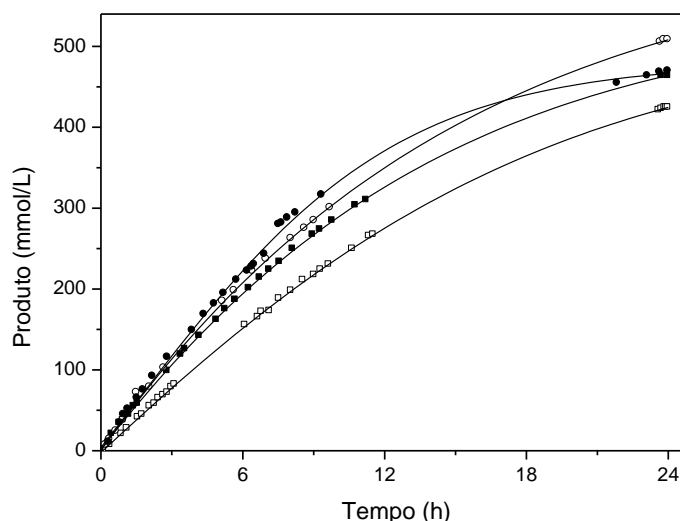


Figura 1 – Concentração de produto (ácido lactobiônico ou sorbitol) em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* utilizando 64% de massa de células em relação à massa da mistura células + alginato de sódio, em diferentes temperaturas (Substrato inicial: lactose 700mmol/L e frutose 600mmol/L, pH 6,4; 20g/L de biocatalisador). (□) 36°C; (■) 39°C; (○) 43°C; (●) 47°C.

Observa-se que, em 24 horas de processo, concentrações crescentes de produto foram obtidas com o aumento da temperatura de 36 para 43°C (Tabela 1). Conversões em produto de 65, 71 e 78% foram estimadas nos processos conduzidos a 36, 39 e 43°C, respectivamente. Na bioconversão realizada a 43°C, concentração de produto de 510mmol/L foi obtida, correspondendo a 183g/L de ácido lactobiônico e 93g/L de sorbitol. Salienta-se ainda, nesta condição a determinação de menor concentração de lactose residual, de 150mmol/L. Por outro lado, o incremento da temperatura de processo para 47°C resultou em queda média de 8% na produção, assim como no rendimento, quando comparado com os dados obtidos na reação realizada a 43°C.

Tabela 1- Resultados gerais em ensaios de bioconversão conduzidos sob diferentes temperaturas, utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio (Substrato inicial: lactose 700mmol/L e frutose 600mmol/L, pH 6,4, X= 20g/L).

Parâmetros	Temperaturas (°C)			
	36	39	43	47
P _{max} (mmol/L)	424	463	510	468
t (h)	24	24	24	24
ρ (%)	65	71	78	72
p (mmol/L/h)	17,6	19,3	21,3	19,5
q (mmol/g/h)	0,88	0,96	1,06	0,81
μ _{P,max} (mmol/g/h)	1,37	1,88	2,06	2,63
S _f (mmol/L)	250	200	150	200

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

Com relação à máxima velocidade específica de formação de produto (μ_{Pmáx}), determinada no início do processo, valores superiores foram obtidos com o incremento da temperatura, alcançando em 47°C, 2,63mmol/g/h (Tabela 1). Esse fato pode estar relacionado à influência positiva da temperatura na difusão de substratos e produtos através das esferas de alginato de cálcio. O incremento na temperatura induziria ao aumento do tamanho dos poros do suporte, facilitando o acesso do substrato à enzima e, como consequência, proporcionaria maior velocidade reacional. Teixeira (2011), fazendo uso de análises termogravimétricas, caracterizou o suporte de alginato de cálcio empregado na imobilização de lipases. Segundo o autor, menores temperaturas aumentam a resistência à transferência de massa, acarretando em menor difusividade de substâncias pelo suporte.

Na Figura 2, estão apresentados os perfis de velocidade específica de formação de produto (μ_P) frente às temperaturas reacionais da bioconversão de substratos em produtos. Como a velocidade reacional do complexo GFOR/GL é influenciada pela concentração de substratos presente no meio reacional, o μ_P foi avaliado em função da concentração de lactose ao longo do processo. No início do processo, a velocidade específica de formação de produto foi favorecida com a utilização de 47°C, entretanto, a queda foi mais acentuada em relação aos demais testes. Esse fato pode ter ocorrido em virtude da possível desnaturação da enzima. Perfis de diminuição de μ_P menos acentuados foram observados com a utilização de temperaturas inferiores a 47°C.

Zachariou & Scopes (1986) e Malvessi *et al.* (2013) relataram a temperatura de 39°C como favorável para a conversão de substratos em produtos pelo complexo enzimático GFOR/GL, com a utilização de células livres de *Z. mobilis*. Como pôde ser observado, em se tratando de um sistema imobilizado, o fluxo da solução de substratos e produtos tem o comportamento afetado pela barreira representada pelo suporte, em elevada concentração celular no interior das esferas. Devido a esse fato, nas condições testadas, a temperatura de

43°C proporcionou a obtenção de maior rendimento em produto e a manutenção da velocidade reacional do sistema imobilizado de *Z. mobilis*.

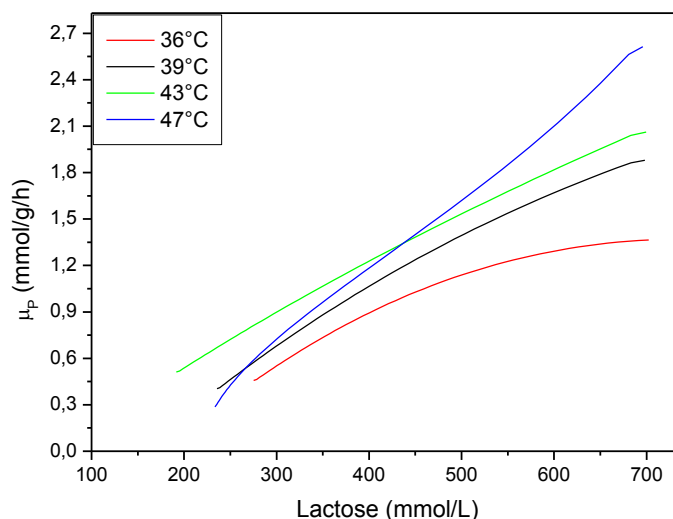


Figura 2 - Velocidade específica de formação de produto (μ_p) em função da concentração de lactose, em ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis*, utilizando 64% de massa de células em relação à massa da mistura células + alginato de sódio, em diferentes temperaturas (Substrato inicial: lactose 700mmol/L e frutose 600mmol/L, pH 6,4; 20g/L de biocatalisador).

4. CONCLUSÃO

Nos testes de avaliação da temperatura no processo de bioconversão de substrato em produtos, foi identificado o incremento em termos de velocidade específica de formação de produto com o aumento da temperatura reacional. Entretanto, no decorrer do processo, a queda da velocidade foi mais acentuada com a utilização de 47°C em razão da menor estabilidade do complexo enzimático imobilizado em elevadas temperaturas. Nas condições avaliadas, foi constatada a temperatura de 43°C como favorável à condução do processo de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, com células imobilizadas de *Z. mobilis* em alginato de cálcio.

5. AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro da UCS, UFRGS, CNPq, FAPERGS, CAPES

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertasso, M., Silveira, M.M., Mancilha, I.M. Preservação da atividade da enzima glicose-frutose oxidoreductase em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações, **Anais** p.476, São Carlos, 1996.

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

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

Carra S. 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, Brasil, 2012.

Chernyy, S.; Jensen, B. E. B.; Shimizu, K.; Ceccato, M.; Pedersen, S. U.; Zelikin, A. N.; Daasbjerg, K.; Iruthayaraj. Surface grafted glycopolymer brushes to enhance selective adhesion of HepG2 cells. **Journal of Colloid and Interface Science**. 404:207–214, 2013.

Chun, U.H., Rogers, P.L. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 29:19-24, 1988.

Jang, K. H., Park, C., CHUN, U. H. Improvement of oxidoreductase stability of cethyltrimethylammoniumbromide permeabilized cells of *Zymomonas mobilis* through glutaraldehyde crosslinking. **Biotechnology Letters** 14:311-316, 1992.

Jonas, R.; Silveira, M.M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. **Applied Microbiology and Biotechnology** 118: 321-336, 2004.

Malvessi, E., Concatto, K., Carra, S.; Silveira, M.M. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49: 139-144, 2006.

Malvessi E.; Carra, S.; Silveira, M. M.; Ayub, M. A. Z. J. Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose–fructose oxidoreductase/gluconolactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Biochemical Engineering Journal** 51. 1–6, 2010.

Malvessi E.; Carra, S.; Pasquali, F. C.; Kern, D. B.; Silveira, M. M.; Ayub, M. A. Z. J. Production of organic acids by periplasmic enzymes presente in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology** 40:1-10, 2013.

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

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

Rehr, B.; Wilhem, C. Sahm, N. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 35: 144-148, 1991.

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

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

Silveira, M.M., Jonas, R. The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology** 59:400-408, 2002.

Sumimoto, R., Kamada, N. Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. **Transplant Process** 22: 2198-2199, 1990.

Teixeira, V. F. T. Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

Yu, R., Van Scott, E. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. **Journal of Cosmetic Dermatology** 3: 76-87, 2004.

Zachariou, M., Scopes, R.K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **Journal of Bacteriology**. 3: 863-869, 1986.

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

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