

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção e Purificação de Lactobionato de Cálcio Obtido por Células Imobilizadas de *Zymomonas mobilis*

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

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

RESUMO

O ácido lactobiônico e seus sais, como o lactobionato de cálcio, têm aplicações voltadas para a área farmacêutica e de alimentos. Este insumo pode ser obtido via ação do sistema enzimático glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono-lactonase (GL) presente no periplasma de células de *Zymomonas mobilis*. GFOR/GL são responsáveis pelas reações de oxidação e de redução dos substratos lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente. Visando ao potencial uso industrial, o lactobionato de cálcio deve ser purificado. Neste contexto a bioprodução deste sal pelo sistema GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio foi avaliada, seguida da purificação do produto final por precipitação com etanol. Em 30 horas de reação, com o pH controlado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, foram atingidos 261 mmol/L de lactobionato de cálcio, com rendimento de 75%. A purificação foi realizada por três etapas sucessivas de precipitação com etanol, resultando em um produto com 96% (m/v) de pureza.

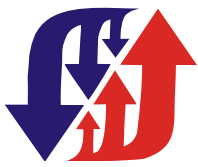
Palavras-chave: Lactobionato de cálcio, ácido lactobiônico, *Zymomonas mobilis*, GFOR/GL, imobilização, purificação.

INTRODUÇÃO

O ácido lactobiônico é classificado como um ácido biônico, sendo formado por um poli-hidroxiácido, o ácido glicônico, ligado a um açúcar, a galactose. Este insumo é empregado na área cosmética, com ação hidratante, anti-idade e capacidade quelante de íons de ferro (Yu & Van Scott, 2004). Além disso, é relatada a sua utilização em solução de preservação de órgãos a serem transplantados e para aumentar a solubilidade de fármacos (Alonso *et al.*, 2013). O ácido lactobiônico pode se apresentar na forma de sal, como por exemplo, o lactobionato de sódio (Malvessi *et al.*, 2013), potássio (Zagonel, 2013) ou cálcio (Murakami *et al.*, 2008). O lactobionato de cálcio é um sal solúvel em água, sendo desejável visto que sais de cálcio geralmente apresentam baixa solubilidade, o que pode ocasionar precipitação destes durante a estocagem de alimentos e bebidas (Murakami *et al.*, 2008; Vavrusova *et al.*, 2013).

A síntese enzimática do ácido lactobiônico é realizada, pela ação do complexo glicose-frutose oxidoreductase (GFOR)/glicono-lactonase (GL) presentes no periplasma da bactéria *Zymomonas mobilis*. Estas enzimas operam em mecanismo *ping-pong*, onde a lactose sofre oxidação a lactobiono-lactona e a frutose redução a sorbitol. Após, pela ação da GL, a lactobiono-lactona é hidrolisada a ácido lactobiônico (Zachariou & Scopes, 1986, Malvessi *et al.*, 2013). A técnica de imobilização celular em alginato de cálcio, aplicada na produção de ácido lactobiônico, apresenta como principais vantagens a possibilidade de reutilização do biocatalisador e a facilidade de separação dos produtos (Carra, 2012).

Como resultado do processo de bioconversão catalisado por GFOR/GL, são obtidos o sal (lactobionato) correspondente ao cátion presente na solução alcalina usada no controle do pH,



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

sorbitol e quantidades residuais de lactose e frutose. A purificação do lactobionato pode ser realizada pela técnica de precipitação, baseada na diferença de solubilidade dos compostos na presença de solventes orgânicos (Silveira *et al.*, 2007; Carra, 2012). Visando a potencial utilização do insumo farmacêutico, a pureza deve ser determinada e, para isso, são utilizadas técnicas cromatográficas. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar os parâmetros cinéticos da bioprodução e a etapa de purificação do lactobionato de cálcio produzido.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção e imobilização de células/enzimas: Foi utilizada a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580). Os meios de cultivo utilizados foram descritos por Malvessi *et al.* (2006). Para a produção da biomassa, o cultivo foi realizado em biorreator de agitação mecânica (Biostat B, B. Braun Biotech, Sartorius), a 450 rpm, 30°C e controle de pH em 5,5. Após, as células foram permeabilizadas e imobilizadas em alginato de cálcio (Carra, 2012).

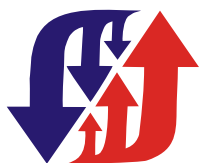
Ensaio de bioconversão e purificação: Os ensaios foram realizados com 0,40L de solução de substratos (700 mmol/L de lactose e 600 mmol/L de frutose), 20 g/L células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, pH 6,4 controlado pela adição de Ca(OH)_2 , a 39°C. A etapa de purificação foi realizada adicionando-se etanol 75% (m/v), com vazão de 9 mL/min a 30mL do caldo final da bioconversão, a 25°C. Após, a suspensão foi mantida em temperatura inferior a 0°C por 24h e, ao final, o precipitado foi ressuspensão em água destilada, sendo este processo realizado em três etapas consecutivas (Carra, 2012).

Parâmetros cinéticos: A concentração máxima de produto (P_{max}), foi calculado em função da massa adicionada de Ca(OH)_2 . A conversão de substrato em produto (Y_{P/S_0}) foi determinada pela relação entre o lactobionato de cálcio formado e a lactose inicial; a produtividade molar (P_m) pela divisão do lactobionato de cálcio formado pelo tempo de processo; a produtividade específica (q), calculada pela divisão de P_m pela biomassa celular; a velocidade específica de formação de lactobionato de cálcio ($\mu_{P,\text{máx}}$), determinada pela derivação de curvas relacionando mmol de produto formado em função do tempo, sendo os valores de velocidade obtidos divididos pela massa celular utilizada nos ensaios.

Métodos analíticos A determinação das concentrações de ácido lactobiônico, sorbitol, lactose e frutose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Technology 9100), coluna Aminex HPX-87H (BioRad), fase móvel H_2SO_4 0,05 mmol/L, fluxo de 0,4 mL/min, a 60 °C, detector índice de refração. A concentração de ácido lactobiônico foi convertida para lactobionato de cálcio. A quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método espectrofotométrico de DNS (ácido 3,5-di-nitro-salicílico) (Miller, 1959). Para determinação espectrofotométrica de frutose e sorbitol foi utilizada metodologia descrita por Carra (2012).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1, são apresentados os resultados da bioprodução de lactobionato de cálcio utilizando o sistema imobilizado de *Z. mobilis*. Salienta-se que o pH da reação foi controlado com o uso de Ca(OH)_2 , sendo formado, portanto, lactobionato de cálcio. Em aproximadamente 30h de processo foram alcançados 261 mmol/L de lactobionato de cálcio, com rendimento final de 74% e 177 mmol/L de lactose residual. Em estudos anteriores de bioprodução de lactobionato de sódio, Carra (2012) relata a obtenção de 72% de rendimento em 24h de reação e na obtenção de lactobionato de potássio, por sua vez, foi atingido rendimento de 76% em 24h de reação (dados não publicados). O controle do pH da reação de



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

bioconversão é realizado com adição de solução de NaOH ou KOH. No caso da síntese de lactobionato de cálcio, o pH reacional é controlado pela adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em pó, composto de baixa solubilidade em água, impedindo a solubilização completa de uma solução concentrada. Desta forma, durante a bioconversão, o pH da reação chegou a atingir valores aproximados de 9,0, superior ao pH 6,4, ideal para a ação de GFOR/GL. Sendo assim, esse fator possivelmente teve influência no rendimento final do processo de bioconversão.

Tabela 1: Resultados referentes à bioprodução de lactobionato de cálcio a partir de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ($S_0=700$ mmol/L de lactose e 600 mmol/L frutose, $X=20$ g/L, pH 6,4, 39°C).

Parâmetros cinéticos	
P _{max}	261 mmol/L
t	30,8 h
Y _{P/S0}	0,37 mmol/mmol
P _m	3,39 mmol/h
q	0,42 mmol/g/h
μ _{P,max}	0,87 mmol/g/h
S _f	177 mmol/L

P_{max}, concentração máxima de lactobionato de cálcio; t, tempo de processo; Y_{P/S0}, conversão em relação ao substrato inicial; P_m, produtividade molar; q, produtividade específica; μ_{P,max}, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f, lactose residual.

Com relação a Y_{P/S0}, foi atingido 0,37mmol/mmol, ou seja, para cada mmol de substrato consumido (lactose), 0,37 mmol de produto (lactobionato de cálcio) foi formado. Em relação a P_m, foi produzido 3,39 mmol de lactobionato de cálcio por hora de reação, sendo que 0,42 mmol foram obtidos por grama de célula por hora. Máxima velocidade de formação de produto (μ_{P,max} 0,87mmol/g/h) foi observada no início da reação seguida de queda gradual com o decorrer do tempo (Tabela 1).

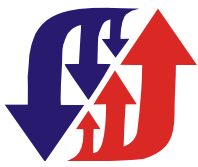
Na etapa de purificação, o lactobionato de cálcio é separado do sorbitol - formado em base equimolar na reação – e dos substratos residuais lactose e frutose. Analisando a Tabela 2, observa-se que, inicialmente, no caldo final da bioconversão, o lactobionato de cálcio representava cerca de 56% (m/v) em relação ao volume total e o sorbitol, lactose e frutose, aproximadamente 17, 26 e 2% (m/v), respectivamente. Para avaliar a pureza do produto final, foi preparada uma solução 10g/L, sendo determinada em 96% (m/v).

Tabela 2: Resultados referentes à purificação do caldo final da bioconversão.

Produtos/substratos	Caldo final da bioconversão *		Solução final (10g/L)	
	% (m/v)		g/L	% (m/v)
Lactobionato de cálcio	55,75		9,30*	96,64
Lactose	16,84		0,12 [#]	1,18
Sorbitol	25,67		0,19 [#]	1,88
Frutose	1,74		0,03 [#]	0,30

[#] Determinado por método espectrofotométrico; *determinado por método cromatográfico

Na Figura 1, são apresentados os cromatogramas das amostras do caldo final da bioconversão e da solução 10g/L do composto purificado. Na Figura 1A, são identificados o ácido lactobiônico, a lactose e o sorbitol presentes no caldo final da bioconversão, em 30h de reação. Como a amostra foi diluída, não foi possível a identificação do pico de frutose. Na Figura 1B, pode ser observado o pico do ácido lactobiônico, não sendo identificados a lactose,



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

a frutose e o sorbitol, uma vez que o limite de detecção do método cromatográfico proposto é de 0,5 g/L.

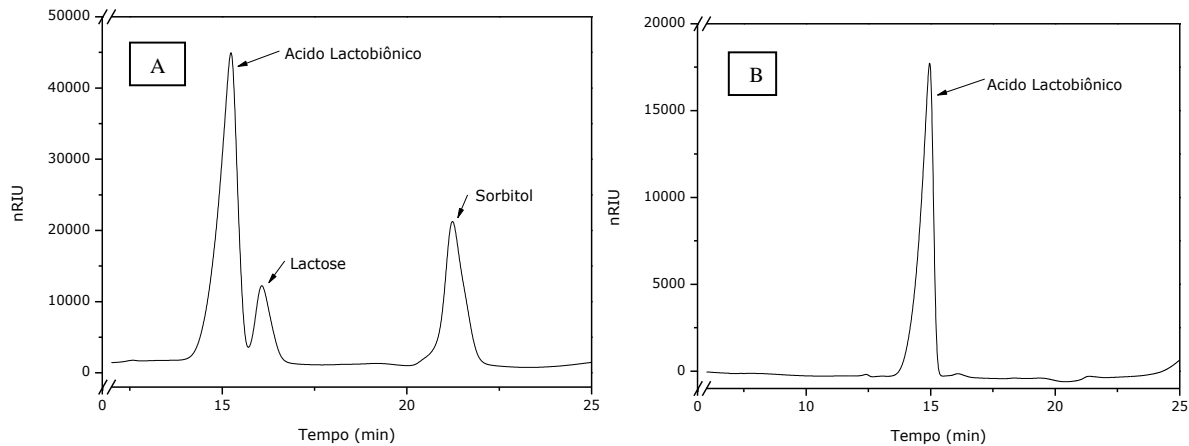


Figura 1: Cromatogramas obtidos de amostra do caldo final da bioconversão [A] e após a etapa de purificação do produto [B]. Coluna Aminex HPX-87H (BioRad), fase móvel H₂SO₄ 0,05 mmol/L, 0,4 mL/min, a 60°C, detector por índice de refração.

CONCLUSÕES

Nas condições propostas de produção de lactobionato de cálcio, por células/enzimas imobilizadas de *Z. mobilis*, com o pH controlado por Ca(OH)₂ foi atingido 261 mmol/L de produto, representando um rendimento de 76% (m/v) em 30 horas de reação. Nas condições de purificação propostas, alcançou-se um produto final com pureza de 96% (m/v).

AGRADECIMENTOS: Ao apoio financeiro e estrutural da UCS, CNPq, FAPERGS e CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso S, Rendueles M, Díaz M. 2013. Bio-production of lactobionic acid: current status, applications and future prospects. *Biotechnol Adv.* 31:1275–129.
- 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.
- Malvessi E, Concato 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 MA.Z. 2013. Production of organic acids by periplasmic enzymes presents in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40:1-10.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- 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.
- 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.
- Vavrusova M, Munk MB, Skibsted LH. 2013. Aqueous solubility of calcium L-lactate, calcium D-gluconate, and calcium D-lactobionate: importance of complex formation for solubility increase by hydroxycarboxylate mixtures. *J. Agric. Food Chem.* 61:8207–8214.
- 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.