

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Avaliação de produção de ácido lactobiônico e sorbitol em condições operacionais aplicáveis à escala industrial

Sabrina Carra<sup>1,2</sup>, Alana Peres de Oliveira<sup>1</sup>, Marina Alberti<sup>1</sup>, Mauricio Moura da Silveira<sup>1</sup>, Valquíria Linck Bassani<sup>2</sup>, Eloane Malvessi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia

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

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

#### RESUMO

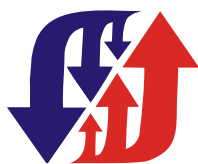
*O ácido lactobiônico tem merecido destaque devido às suas importantes aplicações. As enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidoredutase e gliconolactonase de *Zymomonas mobilis* são responsáveis pela conversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico (ou seus sais) e sorbitol, respectivamente. Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento do sistema enzimático imobilizado em alginato de cálcio, em condição operacional que representasse aquela prevista para a escala industrial, tendo sido realizadas três bateladas consecutivas em biorreator mecanicamente agitado, com volume reacional de 2,5 L. Nestas condições, concentração final de cerca de 490 mmol/L em produtos foi atingida nas três bateladas e, apesar da queda da velocidade de formação de produto com o reuso do biocatalisador, o sistema se manteve eficiente por 82 h de operação.*

Palavras-chave: Ácido lactobiônico, *Zymomonas mobilis*, avaliação do processo.

#### INTRODUÇÃO

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 (European Pharmacopoeia, 2008). Esse composto apresenta importantes aplicações, como agente de vetorização hepático, composto majoritário em soluções de conservação de órgãos a serem transplantados, antioxidante em cosméticos anti-idade, acidulante na fabricação de queijos e agente de solubilização em antibióticos (Sumimoto e Kamada, 1990; Koka *et al.*, 2002; Yu e Van Scott, 2004; Nordkvist *et al.*, 2007; Chernyy *et al.*, 2013). Na perspectiva de preservação do meio ambiente e de sustentabilidade, a obtenção por via biotecnológica desse composto vem sendo avaliada frente à síntese química. São escassas as informações na literatura especializada sobre a produção de ácido lactobiônico em escala industrial, como, da mesma forma, não há uma avaliação precisa sobre o seu mercado. De acordo com Affertsholt-Allen (2007), a comercialização média de ácido lactobiônico se aproximava de 17.000 toneladas/ano, havendo, à época, um esperado aumento anual de 5% (Gutiérrez *et al.*, 2012).

Em estudos em escala de laboratório, Carra (2012) e Malvessi *et al.* (2013) demonstraram a possibilidade de obtenção de misturas de ácido lactobiônico e sorbitol a partir de lactose e frutose, utilizando as enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidoredutase e gliconolactonase presentes em células inativadas de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Em 24 h de processo, os autores relataram a obtenção de 70% de conversão



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

de lactose em ácido lactobiônico, correspondendo a 490 mmol/L de produto, com equivalente formação de sorbitol a partir de frutose. Valle *et al.* (2013) destacam que o ácido lactobiônico obtido com o sistema enzimático de *Z. mobilis* apresenta configuração de cadeia aberta e ausência de substâncias racêmicas, o que favoreceria a sua aplicação na indústria farmacêutica.

Neste contexto, tendo em vista as importantes aplicações do ácido lactobiônico e o potencial de uso industrial do sistema enzimático em questão, esse estudo teve como objetivo avaliar o comportamento do sistema enzimático de *Z. mobilis* imobilizado em alginato de cálcio, em condição operacional que representasse aquela prevista para a escala industrial, tendo sido realizadas três bateladas consecutivas em biorreator mecanicamente agitado, com volume reacional de 2,5 L.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Produção e imobilização de células/enzimas de *Zymomonas mobilis*

O microrganismo utilizado foi *Z. mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580). 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, tratada com glutaraldeído e imobilizada em alginato de cálcio, de acordo com a metodologia proposta por Carra (2012).

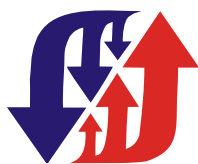
#### Ensaio de bioprodução de ácido lactobiônico

Os ensaios de produção de ácido lactobiônico foram realizados em reator encamisado, em volume de 2,5L. O meio reacional inicial foi composto de lactose (700 mmol/L) e frutose (600 mmol/L) e 20 g/L de células/enzimas imobilizadas em alginato de cálcio.

A reação de bioconversão foi conduzida sob agitação mecânica de 200 rpm, a 39°C e pH controlado em 6,4 pela adição de NaOH 7,0 mol/L. Ao final de cada batelada, as esferas de alginato foram drenadas do meio de reação e tratadas com CaCl<sub>2</sub> 0,3 mol/L, por 10 minutos, visando ao enrijecimento do suporte. O sistema imobilizado foi utilizado em três bateladas sucessivas, pelo período necessário para que cerca de 70% de lactose fossem convertidos em ácido lactobiônico.

#### Parâmetros de avaliação

A conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S_0}$ ) foi determinada pela relação entre as quantidades molares de ácido lactobiônico formado e de lactose inicial (mmol/mmol). A produtividade molar ( $p_m$ ) foi determinada pela divisão da quantidade de ácido lactobiônico formado, em mmol, pelo tempo de processo, enquanto as produtividades específicas ( $q$ ) foram calculadas pela divisão de " $p_m$ " pela massa de biomassa celular seca utilizada. A velocidade específica de formação de ácido lactobiônico ( $\mu_p$ ) foi determinada pela derivação de curvas relacionando mmol de produto formado em função do tempo de processo, sendo os valores de velocidade obtidos divididos pela massa celular utilizada nos ensaios.



## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os perfis cinéticos de produção de ácido lactobiônico e respectivas velocidades específicas de formação de produto nas três bateladas sucessivas de bioconversão são apresentados na Figura 1, enquanto na Tabela 1 são resumidos os resultados gerais obtidos nestes testes.

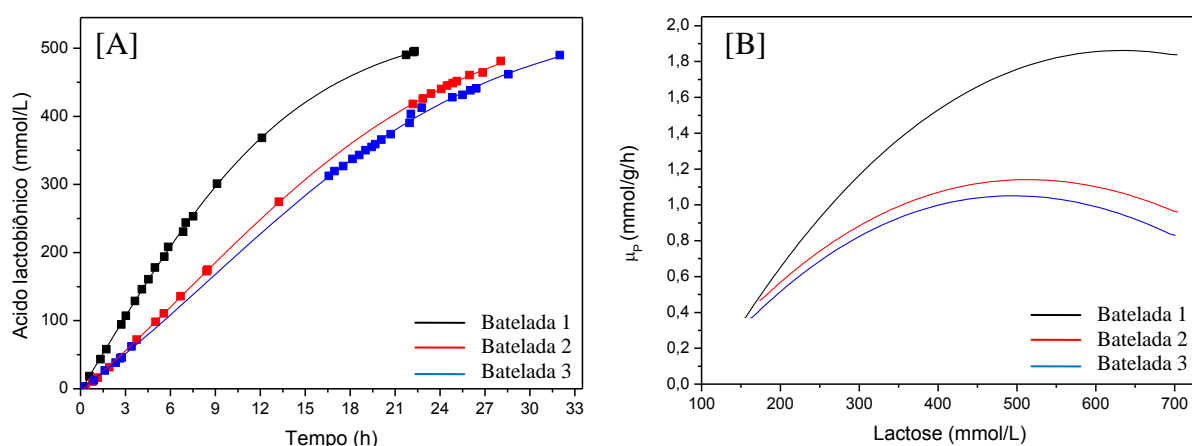


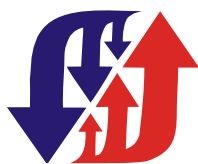
Figura 1: Ácido lactobiônico formado em função do tempo [A] e velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ) em função da concentração de substrato [B], obtidos nas bateladas sucessivas 1, 2 e 3 de bioconversão (Substrato inicial: 700 mmol/L de lactose e 600 mmol/L frutose; 39°C; pH 6,4; X= 20 g/L).

Como observado na Figura 1A, concentrações de ácido lactobiônico semelhantes foram obtidas ao final do processo de bioconversão nas bateladas 1, 2 e 3, cerca de 490 mmol/L. Esses resultados corroboram os dados apresentados nos estudos de Carra (2012) e Malvessi *et al* (2013), em reator com agitação magnética e volume reacional 12,5 vezes inferior ao utilizado no presente trabalho, indicando que o sistema possa vir a manter o comportamento esperado em maiores escalas.

Tabela 1: Resultados gerais de produção de ácido lactobiônico em bateladas sucessivas de bioconversão, utilizando 20 g/L de células *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio ( $S_0= 700$  mmol/L de lactose e 600 mmol/L frutose, pH 6,4, 39°C).

	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3
$P_{max}$ (mmol/L)	495	481	490
t (h)	22	28	32
$Y_{P/S_0}$ (mmol/mmol)	0,71	0,69	0,70
$p_m$ (mmol/h)	60	46	41
q (mmol/g/h)	1,19	0,92	0,82
$\mu_{P,max}$ (mmol/g/h)	1,86	1,13	1,04
$S_f$ (mmol/L)	154	169	160

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



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Com a reutilização do biocatalisador, foi identificada a queda da velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ), e, como observado na Figura 1B, o tempo necessário para que conversão média de 70% do substrato inicial em produto fosse atingida foi incrementado do primeiro para o terceiro ciclo de reação (22, 28 e 32h, respectivamente). Como consequência, produtividades decrescentes foram determinadas no decorrer das bateladas (Tabela 1). Esse fato pode ser justificado pelo aumento da rigidez das esferas, decorrente do seu tratamento com cloreto de cálcio, realizado entre as bateladas, como observado por Carra *et al.* (2015) e/ou a diminuição da estabilidade do complexo enzimático GFOR/GL por períodos prolongados de reação. Entretanto, levando em consideração o reuso do biocatalisador, cerca de 1418 g de ácido lactobiônico foram obtidos em 7,5 L de volume total de bioconversão ao final das 82 h de teste.

### CONCLUSÕES

O bioprocesso de conversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, em reações catalisadas pelo sistema enzimático glicose-frutose oxidorreductase e gliconolactonase, contido em células inativadas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, foi conduzido em reator mecanicamente agitado, com volume reacional 12,5 vezes maior que o anteriormente testado em laboratório, sendo atingidos resultados semelhantes aos da pequena escala em três bateladas consecutivas. Os resultados indicam a consistência do sistema após aumento de escala e reforçam seu potencial de aplicação em nível de produção industrial.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Affertsholt-Allen T. 2007. Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives. In Proceedings of the International Dairy Federation symposium "lactose and its derivatives". Moscow, Russia, 14e16 May. Available from [http://lactose.ru/present/1Tage\\_Affertsholt-Allen.pdf](http://lactose.ru/present/1Tage_Affertsholt-Allen.pdf).
- 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.
- European Pharmacopoeia Commission. 2008. European pharmacopoeia. 6 ed. Strasbourg: Council of Europe.
- Gutiérrez LF, Hamoudi S, Belkacemi K. 2012. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical application. *Int. Dairy J*. 26:103-111.
- Koka R, Mehnert DW, Fritsch RJ, Steffan W, Habermeier P, Bradbury AGW, Pombo AW, Rose M, Lynglev GB, Hansen HPH. 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.
- 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 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.
- Nordkvist M, Nilesen PM, Villadsen J. 2007. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. *Biotechnol. Bioeng*. 97: 694-707.
- Sumimoto R, Kamada N. 1990. Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. *Transpl. Proc*. 22: 2198-2199.
- Valle TA, Ruzza AA, Mastroeni MF, Malvessi E, Silveira MM. 2013. Lactobionic Acid Produced by *Zymomonas mobilis*: Alternative to Prepare Targeted Nanoparticles. *Pharmaceut Anal Acta*. 4:220, 2013.
- Yu R, Van Scott E, 2004. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *J. Cosmetic Dermatol*. 3: 76-87.