

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**PRODUÇÃO DE SORBITOL E ÁCIDOS ORGÂNICOS POR**  
*Zymomonas mobilis*

**Eloane Malvessi**

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular da UFRGS  
como requisito à obtenção do grau de Doutor  
em Ciências.**

**Orientadores: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, PhD**

**Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira**

**Porto Alegre, Julho de 2008**

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Bioprocessos (Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, RS) e contou com recursos de financiamento e bolsas da FAPERGS e CNPq.

**“O conhecido é finito, o desconhecido infinito; intelectualmente, estamos numa ilha no meio dum oceano ilimitado de inexplicabilidade. O nosso dever em cada geração é recuperar um pouco mais de terra”.**

**T. H. Huxley**

## AGRADECIMENTOS

---

Aos professores Dr. Marco Antônio Záchia Ayub e Dr. Maurício Moura da Silveira, pela orientação, dedicação, confiança, incentivo, paciência e amizade, meu eterno agradecimento e grande admiração.

Aos membros da Comissão de Acompanhamento, professores Célia R. R. S. Carlini e Carlos Termignoni, pelas sugestões e contribuições ao trabalho.

Ao professor Carlos Termignoni pela revisão da tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, pela oportunidade, apoio financeiro e estrutura física.

A Silvia e Luciano, incansáveis funcionários da secretaria do PPGBCM, pelo grande apoio, carinho, amizade e valiosas contribuições durante este período.

A Universidade de Caxias do Sul por disponibilizar de natureza financeira e estrutura física.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelos recursos concedidos.

A Prodesa S.A. (SP) e Cargill (SP), ao apoio na disponibilização de amostras de Prodex Lac e alginato de sódio, usados nos ensaios fermentativos e de imobilização celular, respectivamente.

Meu grandioso agradecimento às queridas bolsistas que por aqui passaram neste período, Karina Concatto e Denise Bizarro Kern e em especial para Sabrina Carra e Simone Bastiani, que me acompanham ainda neste momento, meu agradecimento especial pela dedicação e zelo na execução dos experimentos.

Meu agradecimento ao Engenheiro Químico Tomás Augusto Polidoro, pela presteza, paciência e carinho com as biólogas e farmacêuticas do laboratório, afinal, estamos todos no mesmo barco.

Aos amigos do Laboratório de Separação e Reacção da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Portugal, representados pelo meus tutores professores Alírio Egídio Rodrigues e Vera Gomes Mata, pela oportunidade, calorosa recepção e transmissão de conhecimentos técnicos-

científicos, essenciais para a execução de análises em cromatografia líquida, além da harmoniosa e feliz convivência da qual me permitiram compartilhar com os colegas Simone Cavenatti, Carlos A. Grande, Miguel A. Granato, Paula C. S. Gomes, Michal Zabka e tantos outros colegas dos mais diversos países. Foi muito bom tê-los conhecido.

Meu sincero agradecimento ao colega Israel Pedruzzi pela amizade, companheirismo e sua disposição em sempre colaborar nas análises cromatográficas, e também aos colegas do LAREN (Laboratório de Referência Enológica).

A todos os colegas do Laboratório de Bioprocessos e vizinhos do Laboratório de Enzimas e Biomassa, pelos felizes momentos de descontração partilhados, de tão grande importância para a manutenção do meu equilíbrio emocional;

Aos meus amigos e mais amigos, obrigado pela paciência e imensuráveis apoio e carinho.

A toda minha família, enorme em número e compaixão, amo vocês. Especial agradecimento ao meu pai (*in memoriam*), meu grande mestre, e minha mãe, pessoa de imenso coração, todo meu sincero agradecimento pelo amparo e força em mais esta etapa.

Enfim, a Deus, pela vida!

# ÍNDICE

---

	Página
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	iv
<b>NOMENCLATURA .....</b>	xi
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	xiii
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	xix
<b>RESUMO .....</b>	xxii
<b>ABSTRACT .....</b>	xxiv
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	4
<b>2.1 <i>Zymomonas mobilis</i> .....</b>	4
<b>2.2 Metabolismo de carboidratos .....</b>	5
<b>2.3 Meios e condições de cultivo para <i>Zymomonas mobilis</i> .....</b>	8
<b>2.4 Enzimas glicose-frutose oxidorreductase e glucono-<math>\delta</math>-lactonase de <i>Zymomonas mobilis</i>.....</b>	10
<b>2.5 Imobilização de biocatalisadores .....</b>	13

<b>2.6 Produção de sorbitol, ácido glucônico e ácido lactobiônico.....</b>	<b>15</b>
2.6.1 Uso do complexo GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i> .....	20
<b>2.7 Sorbitol, ácido glucônico e ácido lactobiônico: características e aplicações .....</b>	<b>25</b>
2.7.1 Sorbitol .....	25
2.7.2 Ácido glucônico .....	26
2.7.3 Ácido lactobiônico .....	27
2.7.3.1 Ácido lactobiônico como agente antioxidante .....	29
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Instalações .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Microrganismo .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Meios de cultivo .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Preparo de inóculo .....</b>	<b>36</b>
<b>4.5 Cultivo de <i>Zymomonas mobilis</i> em biorreator de bancada .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6 Permeabilização de células de <i>Zymomonas mobilis</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>4.7 Imobilização de células de <i>Zymomonas mobilis</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>4.8 Ensaio enzimáticos .....</b>	<b>42</b>
<b>4.9 Ensaio de bioconversão .....</b>	<b>43</b>
<b>4.10 Métodos analíticos .....</b>	<b>44</b>
4.10.1 Coleta e preparo das amostras .....	44
4.10.2 Concentração celular .....	45
4.10.3 Determinação de açúcares redutores .....	46
4.10.4 Determinação de etanol .....	46

4.10.5 Determinação da atividade enzimática do complexo GFOR/GL.	47
4.10.6 Estimativa da concentração de produtos em ensaios de bioconversão .....	48
<b>4.11 Parâmetros de avaliação do processo fermentativo e bioconversão.....</b>	<b>49</b>
4.11.1 Velocidade específica de crescimento .....	49
4.11.2 Fator de conversão de substrato em células .....	49
4.11.3 Fator de conversão de substrato em produto .....	49
4.11.4 Rendimento em produto.....	50
4.11.5 Produtividade e produtividade específica.....	50
4.11.6 Máxima velocidade específica de formação de ácido orgânico..	51
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 RESULTADOS I – Efeito da concentração de extrato de levedura sobre a produção de etanol e do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase/glucono-<math>\delta</math>-lactonase (GFOR/GL) por <i>Zymomonas mobilis</i></b>	<b>55</b>
<b>5.2 RESULTADOS II – Produção de glicose-frutose oxidorreductase / glucono-<math>\delta</math>-lactonase e etanol por <i>Zymomonas mobilis</i> cultivada em regimes descontínuo e descontínuo alimentado .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3 RESULTADOS III – Produção biotecnológica de sorbitol e ácidos orgânicos por <i>Zymomonas mobilis</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>5.4 RESULTADOS IV – Bioconversão de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico por células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>.</b>	<b>101</b>
<b>5.5 RESULTADOS V – Avaliação de glicose-frutose oxidorreductase / glucono-<math>\delta</math>-lactonase presentes em células de <i>Zymomonas mobilis</i></b>	

imobilizadas em alginato de cálcio na produção de ácido lactobiônico.....	119
<b>5.6 RESULTADOS VI – Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase / glucono-<math>\delta</math>-lactonase present in calcium alginate – immobilised <i>Zymomonas mobilis</i> cells.....</b>	<b>143</b>
<b>6 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>163</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>166</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>168</b>
<b>9 APÊNDICES .....</b>	<b>183</b>
<b>9.1 Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by <i>Zymomonas mobilis</i> .....</b>	<b>185</b>
<b>9.2 Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography .....</b>	<b>192</b>
<b>CURRICULUM VITAE RESUMIDO .....</b>	<b>198</b>

## NOMENCLATURA

---

GFOR – glicose-frutose oxidorreductase (U/g)

GL – glucono- $\delta$ -lactonase (U/g)

$K_M$  – constante de Michaelis-Menten para glicose-frutose oxidorreductase (mol/L)

$p$  – produtividade específica (mmol/g/h)

PM – massa molecular do ácido (g/mol)

$P_0$  – concentração ou massa inicial de produto (g/L ou g)

$P_f$  – concentração ou massa final de produto (g/L ou g)

$S_0$  – concentração ou massa inicial de substrato (g/L ou g)

$S_f$  – concentração ou massa final de substrato (g/L ou g)

$T$  – temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )

$t$  – tempo de processo (h)

$V_b$  – volume de base (mL)

$v_m$  – máxima velocidade específica de formação de produto (mmol/g/h)

$V_{\max}$  – velocidade máxima de reação para glicose-frutose oxidorreductase, da equação de Michaelis-Menten (U/g)

$X_0$  – concentração ou massa inicial de biomassa (g/L ou g)

$X_f$  – concentração ou massa final de biomassa (g/L ou g)

$Y_{P/S}$  – fator de conversão de substrato em etano (g/g)

$Y_{X/S}$  – fator de conversão de substrato em células (g/g)

$\mu_{X,m}$  – máxima velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

## LISTA DE FIGURAS

---

	Página
<b>Figura 1.</b> Vias metabólicas de formação de produtos da fermentação de carboidratos por <i>Zymomonas mobilis</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Conversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glucônico, respectivamente, pelas enzimas glicose frutose oxidoreductase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL) de <i>Zymomonas mobilis</i> .....	12
<b>Figura 3.</b> Estrutura molecular do sorbitol .....	25
<b>Figura 4.</b> Estrutura molecular do ácido glucônico .....	26
<b>Figura 5.</b> Estrutura molecular do ácido lactobiônico .....	27
<b>Figura 6.</b> Produção de inóculo de <i>Zymomonas mobilis</i> em frascos agitados .....	37
<b>Figura 7.</b> Sistema utilizado para a produção de células/enzimas em ensaios fermentativos .....	39
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo da etapa de imobilização de células	

de *Zymomonas mobilis* em alginato de cálcio ..... 41

**Figura 9.** Esquema representativo do sistema utilizado na determinação da atividade enzimática de GFOR/GL e em processos de bioconversão..... 44

## RESULTADOS I

**Figura 1.** Biomassa celular e glicose em função do tempo de cultivo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo, em meio com diferentes concentrações de extrato de levedura bruto..... 62

**Figura 2.** Velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) em função do tempo de cultivo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo, em meio com diferentes concentrações de extrato de levedura bruto..... 63

**Figura 3.** Atividade de GFOR/GL, em unidades enzimáticas por volume de meio (U/L), presente em células livres de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em função das diferentes concentrações de extrato de levedura bruto, utilizadas no meio de cultivo ..... 65

## RESULTADOS II

**Figura 1.** Biomassa celular e glicose em função do tempo de cultivo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo,  $S_0= 150$  g/L glicose, a 30°C, pH 5,5 ..... 77

**Figura 2.** Biomassa celular e glicose em função do tempo, em cultivos de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo alimentado, a 30°C, pH 5,5..... 78

## RESULTADOS III

<b>Figura 1.</b> Atividade enzimática de GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191, em solução equimolar de frutose e diferentes aldoses (0,7 mol/L), a 39°C e pH 6,4.....	89
<b>Figura 2.</b> Atividade enzimática de GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191, com o pH, a 39°C, e com a temperatura, em pH 6,4, utilizando soluções equimolares (0,7 mol/L) de frutose/aldoses .....	91
<b>Figura 3.</b> Atividade enzimática de GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC29191, medida para glicose/frutose e lactose/frutose, em função do tempo de exposição às temperaturas de 39, 43 e 45°C.....	92
<b>Figura 4.</b> Atividade enzimática de GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191, em função da concentração de substratos, a 39°C e pH 6,4.....	93
<b>Figura 5.</b> Formação de ácidos orgânicos e produtividade específica em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191, em solução 0,7 mol/L de frutose/aldoses (glicose, maltose, galactose e lactose), a 39°C e pH 6,4 .....	95

#### **RESULTADOS IV**

<b>Figura 1.</b> Concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando células permeabilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191, em soluções de concentração equimolar de lactose/frutose, a 39°C e pH 6,4.....	108
--	-----

**Figura 2.** Concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em mistura de lactose/frutose 0,7 mol/L, utilizando diferentes concentrações celulares, em pH 6,4 e 39°C..... 111

**Figura 3.** Concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em mistura de lactose/frutose 0,7 mol/L, em diferentes temperaturas, pH 6,4..... 113

## **RESULTADOS V**

**Figura 1.** Atividade enzimática do complexo enzimático GFOR/GL presente em células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, imobilizadas em alginato de cálcio, em função das concentrações relativas de lactose/frutose (39°C, pH 6,4) ..... 127

**Figura 2.** Duplo-recíproco da atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, imobilizadas em alginato de cálcio, em função da concentração de lactose/frutose (pH 6,4, 39°C)..... 128

**Figura 3.** Influência do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando solução lactose/ 0,7 mol/L..... 130

**Figura 4.** Máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico ( $v_m$ ) medida para a mistura de lactose/frutose (0,7 mol/L), utilizando células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em

ciclos consecutivos de bioconversão de 3 horas de duração, em diferentes valores de pH, a 39°C. .... 133

**Figura 5.** Máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico ( $v_m$ ) medida para a mistura de lactose/frutose (0,7 mol/L), utilizando utilizando células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em ciclos consecutivos de bioconversão de 3 horas de duração, em diferentes temperaturas, pH 6,4..... 134

**Figura 6.** Variação da concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 imobilizadas em alginato de cálcio, em mistura de lactose/frutose 0,7 mol/L, a 39°C e 47°C, em pH 6.4 e 7,5..... 137

## RESULTADOS VI

**Figure 1.** Variation of the activity of GFOR/GL in calcium alginate-immobilised *Zymomonas mobilis* cells with the concentration of glucose and fructose. The reactions were performed at pH 6.4 and 39°C..... 151

**Figure 2.** Influence of pH, at 39°C, and temperature at pH 6.4, on the enzymatic activity of the GFOR/GL complex present in calcium alginate - immobilised *Zymomonas mobilis*. Reactions were carried out in 0.7 mol l<sup>-1</sup> glucose/fructose solution ..... 152

**Figure 3.** Time course of gluconic acid production at different pH and temperatures values with calcium alginate - immobilised *Zymomonas mobilis* cells. For all cases, initial glucose/fructose concentration of 0.7mol l<sup>-1</sup> was used. .... 156

**Figure 4.** Remaining specific gluconic acid formation rates measured

after four successive 3-hour bioconversion runs with calcium alginate - immobilised *Zymomonas mobilis* cells, at different pH values and temperatures. Initial glucose/fructose concentration of 0.7mol l<sup>-1</sup> was used in each cycle. .... 158

**Figure 5.** Time course of gluconic acid production at different pH and temperatures values with calcium alginate - immobilised *Zymomonas mobilis* cells..... 159

## LISTA DE TABELAS

---

	Página
<b>Tabela 1.</b> Características físico-químicas do ácido lactobiônico .....	27
<b>RESULTADOS II</b>	
<b>Tabela 1:</b> Resultados gerais dos cultivos de <i>Zymomonas mobilis</i> em regime descontínuo (RD), com concentração inicial de glicose de 150 g/L, e em regime descontínuo alimentado, com concentração de glicose equivalente a 200 g/L (RDA1, alimentação com solução 610 g/L de glicose; RDA2, alimentação com solução 610 g/L de glicose suplementada com nutrientes do meio SS) .....	76
<b>RESULTADOS III</b>	
<b>Tabela 1.</b> Valores de parâmetros cinéticos aparentes $K_M$ e $V_{max}$ obtidos para o complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) de <i>Zymomonas mobilis</i> com diferentes pares de substratos.....	94
<b>Tabela 2.</b> Resultados gerais da bioconversão com frutose/aldoses	

(glicose, maltose, galactose e lactose) visando a obtenção dos respectivos ácidos orgânicos, pela ação do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase / glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL), a 39°C e pH 6,4..... 97

#### RESULTADOS IV

**Tabela 1.** Resultados gerais dos ensaios de bioconversão visando a produção de ácido lactobiônico, utilizando células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 e diferentes concentrações de substratos, a 39°C, pH 6,4, após 24 horas de processo..... 108

**Tabela 2.** Resultados gerais dos ensaios de bioconversão visando a obtenção de ácido lactobiônico, utilizando diferentes concentrações de células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*, a 39°C e pH 6,4, após 24 horas de processo..... 111

**Tabela 3.** Resultados gerais dos ensaios de bioconversão visando a produção de ácido lactobiônico, utilizando células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, conduzidos em diferentes temperaturas, pH 6,4, após 24 horas de processo..... 113

#### RESULTADOS V

**Tabela 1.** Resultados dos ensaios de bioconversão visando a produção de ácido lactobiônico, com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, conduzidos em diferentes temperaturas e pH..... 136

**Tabela 2.** Valores de pH interno das esferas de alginato de cálcio, após 24 horas de bioconversão de lactose/frutose 0,7 mol/L em diferentes condições de pH e temperatura ..... 138

## RESULTADOS VI

<b>Table 1.</b> Effect of combined values of temperature and pH on the GFOR/GL activity in calcium alginate immobilised <i>Zymomonas mobilis</i> cells. The activities are presented in relation to that measured at the standard conditions (pH 6.4 and 39°C) .....	153
<b>Table 2.</b> Internal pH of calcium alginate beads containing CTAB-permeabilised <i>Zymomonas mobilis</i> cells after 5 hours of bioconversion at different temperature and pH values. Reactions were carried out in 0.7 mol l <sup>-1</sup> glucose/fructose solution .....	154
<b>Table 3.</b> Results of bioconversion runs carried out at different temperatures and pH values with calcium alginate immobilised <i>Zymomonas mobilis</i> cells. For all cases, initial glucose/fructose concentration 0.7 mol l <sup>-1</sup> was used .....	155

## RESUMO

---

Sorbitol e ácido glucônico são obtidos equimolarmente em reação catalisada por glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL), enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. Visto que a demanda comercial do sorbitol é muito superior à do ácido glucônico, este trabalho objetivou aprofundar o conhecimento sobre a capacidade do complexo GFOR/GL de oxidar outras aldoses a seus respectivos ácidos orgânicos. O cultivo de *Z. mobilis* foi analisado visando a obtenção de biomassa, GFOR/GL e etanol. Em cultivo descontínuo em meio com 7,5 a 10,0 g/L de extrato de levedura bruto, obtiveram-se cerca de 24 unidades de GFOR/GL por grama de células secas (U/g). Em regime descontínuo alimentado, atividade de 27 U/g e rendimento em etanol de 95% foram atingidos. A ação de GFOR/GL sobre diferentes pares frutose/aldoses foi avaliada com células permeabilizadas livres ou imobilizadas em alginato de cálcio. Com 0,7 mol/L de frutose/glicose, em sistema imobilizado, as mais altas atividades foram medidas entre 47 e 50°C com pH de 7,8 a 8,2, constatando-se

que um valor de pH mais alto no meio permite a ocorrência de um pH próximo ao ideal (6,4) no interior das esferas de alginato. Conforme os substratos são consumidos, com conseqüente redução da velocidade reacional, pHs mais baixos no meio externo são exigidos. Entre as aldoses testadas, a maior afinidade enzima / substrato foi observada com maltose e a menor com lactose. Devido às aplicações comerciais do seu produto de oxidação – ácido lactobiônico – lactose foi estudada em detalhes. Com 0,7 mol/L de lactose/frutose, a máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico foi, em média, de 4,0 mmol/g/h, com células livres, a 39°C e pH 6,4, e de 2,0 mmol/g/h, com o sistema imobilizado, a 47°C e pH 6,4. Os resultados indicam a viabilidade da produção de ácido lactobiônico por este processo, já que conversões superiores a 85 % são obtidas.

## ABSTRACT

---

Sorbitol and gluconic acid can be obtained, in equimolar basis, by reaction catalysed by the periplasmic enzymes glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- $\delta$ -lactonase (GL) of *Zymomonas mobilis*. Since the commercial demand for sorbitol is much larger than that for gluconic acid, the aim of this work was to achieve a deeper knowledge on the capacity of GFOR/GL complex in oxidising other aldoses to their respective organic acids. *Z. mobilis* cultivation was analysed with respect to growth and GFOR/GL and ethanol production. In batch cultivation in medium with 7.5 and 10.0 g/L of non-purified yeast extract, ca. of 24 GFOR/GL units per gram of dry cells (U/g) were obtained. In fed-batch mode, an activity of 27 U/g and an ethanol yield over 95% were achieved. The action of GFOR/GL on different fructose/aldose pairs was assessed with permeabilised cells, either free or immobilised in calcium alginate. With 0.7 mol/L of fructose/aldose, in immobilised system, the highest activities were measured between 47 and 50°C at pH 7.8-8.2, observing that higher pH values in the reaction medium led to the occurrence of pH values close to the optimum (6.4) in

the inner space of alginate beads. As substrates were consumed, and as a consequence the reaction rate decreased, lower pH values in the external medium were needed. Among the aldoses tested, the highest enzyme - substrate affinity was observed for maltose and the lowest for lactose. Due to the commercial uses of its oxidation product – lactobionic acid – lactose was studied in details. With 0.7 mol/L of lactose/fructose, the maximum lactobionic acid specific production rate was in average 4.0 mmol/g/h with free cells, at 39°C and pH 6.4, and 2.0 mmol/g/h with immobilised system, at 47°C and pH 6.4. The results indicate the feasibility of producing lactobionic acid by this process, since conversion over 85% are obtained.

# 1 INTRODUÇÃO

---

A bactéria anaeróbia *Zymomonas mobilis* é conhecida por sua potencialidade para a produção de etanol. Em estudos sobre a utilização de diferentes carboidratos por esta bactéria, foi verificada a formação de quantidades apreciáveis de sorbitol e de ácido glucônico quando frutose e glicose, ou sacarose, foram utilizadas como substratos de fermentação. Posteriormente, identificaram-se as enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR), com a coenzima NADP acoplada, e glucono- $\delta$ -lactonase (GL) como as responsáveis pela formação destes produtos.

A partir deste sistema enzimático, buscou-se o desenvolvimento de bioprocessos de produção de sorbitol e ácido glucônico, em que o foco recaía especialmente sobre o poliol, industrialmente produzido por hidrogenação catalítica de glicose, tendo em vista que esta substância tem várias aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Em todas estas propostas de processo são utilizadas as enzimas GFOR e GL contidas em células de *Z. mobilis* previamente cultivadas em glicose, sendo exigida a presença de ambos os

substratos – glicose e frutose – para que a reação ocorra. Através desta técnica, concentrações de sorbitol e ácido glucônico superiores a 30% (m/v) são alcançadas, em cerca de 8 horas de bioconversão com rendimentos superiores a 90% em relação ao máximo teórico.

Como estes produtos são formados em base equimolar, a aplicação prática do sistema enzimático GFOR/GL torna-se industrialmente inviável em razão da desproporcionalidade entre as demandas comerciais do sorbitol e do ácido glucônico, cerca de 15 a 20 vezes maior para o primeiro.

Relatos posteriores na literatura especializada evidenciaram que o sistema GFOR/GL de *Z. mobilis* tem a capacidade de oxidar outras aldoses além da glicose, levando à formação de seus respectivos ácidos orgânicos, abrindo perspectivas para o processo de bioconversão catalisado por estas enzimas. No caso, através da utilização de substratos alternativos à glicose, seria possível compor um conjunto de produtos (ácidos orgânicos e seus diferentes sais) que proporcionariam um equilíbrio com a produção do sorbitol.

No processo, primeiramente é realizada a etapa de produção de biomassa celular de *Z. mobilis* com alta atividade das enzimas GFOR/GL e etanol, produto importante no balanço econômico do processo. Em seguida, o complexo enzimático é usado na bioconversão de frutose e aldoses em sorbitol e respectivos ácidos orgânicos. Na literatura é relatado o emprego de células livres permeabilizadas ou ainda permeabilizadas e imobilizadas em diferentes tipos de suportes na etapa de bioconversão.

Como a produtividade do processo de bioconversão depende, diretamente, da atividade do complexo GFOR/GL presente em células de *Z. mobilis*, torna-se

importante estabelecer condições de cultivo do microrganismo que resultem em mais altas atividades enzimáticas. Adicionalmente, é preciso aprimorar a técnica de bioconversão de frutose e aldoses em sorbitol e respectivos ácidos orgânicos.

Neste contexto, o presente trabalho teve como finalidade contribuir para a viabilização técnica do processo através de estudos que enfocaram a produção de GFOR/GL e de etanol por *Z. mobilis*, a caracterização do complexo enzimático com relação a alguns parâmetros fundamentais e, ainda, o processo de bioconversão de frutose e aldoses em sorbitol e ácidos orgânicos, respectivamente, com células bacterianas livres e imobilizadas em alginato de cálcio.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 *Zymomonas mobilis*

*Zymomonas mobilis* é uma bactéria anaeróbia, Gram-negativa, podendo se apresentar de forma isolada, aos pares ou em cadeia. Suas dimensões variam de 1 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1 a 1,4  $\mu\text{m}$  de diâmetro, Não formam cápsulas nem esporos (SWINGS & DE LEY, 1977, VIKARI, 1986). Em contraste com outras bactérias anaeróbias, *Z. mobilis* é relativamente insensível ao oxigênio (VIKARI, 1986).

Bactérias do gênero *Zymomonas* são microrganismos encontrados no meio ambiente, em áreas tropicais da América, África e Ásia, em associação com plantas com alto teor de açúcares nas seivas (SWINGS & DE LEY, 1977, VIKARI, 1986). *Z. mobilis* apresenta efeito antagônico contra numerosas espécies de bactérias e fungos, como por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*; porém, não é patogênica para seres humanos e animais (WANICK *et al.*, 1970, LIMA *et al.*, 1972). A resistência a grande variedade de

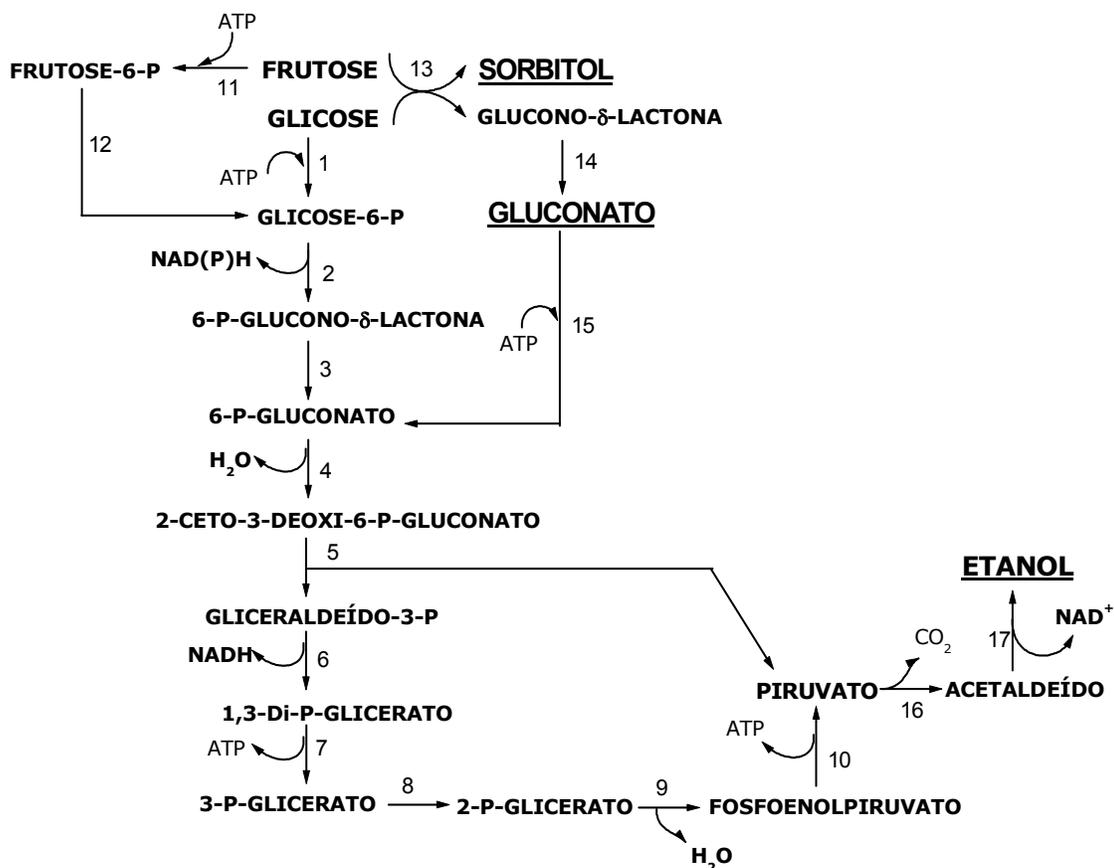
antibióticos por várias linhagens de *Z mobilis* foi relatada por SWINGS & DE LEY (1977).

## 2.2. Metabolismo de carboidratos

*Zymomonas mobilis* é obrigatoriamente fermentativa, anaeróbia, apresentando aerotolerância. Como fontes de carbono, *Z. mobilis* utiliza somente glicose, frutose e sacarose, apresentando tolerância a altas concentrações de açúcares e etanol (VIIKARI, 1988; SPRENGER, 1996). Glicose, frutose e sacarose são metabolizadas na mesma via bioquímica, a via de Entner-Doudoroff (Figura 1), característica marcante do gênero *Zymomonas*, sendo também identificada como única bactéria anaeróbia a utilizar esta rota metabólica (GIBBS & DE MOSS, 1954; VIIKARI, 1984).

STOKES *et al.* (1981) sugeriram que *Zymomonas* seria descendente de organismos aeróbios, que teria perdido a capacidade de sintetizar certas enzimas do ciclo de Krebs. A via de Entner-Doudoroff segue até a formação de piruvato (GIBBS & DE MOSS, 1954), com a obtenção de apenas um mol de ATP por mol de glicose metabolizada. Em comparação com as outras vias metabólicas, a via de Entner-Doudoroff é que produz menos energia (DOELLE, 1975).

*Z. mobilis*, principalmente na década de 80, foi citada por vários autores em função de sua potencialidade na produção de etanol em larga escala, (LYNESS *et al.*, 1981; FEIN *et al.*, 1983; DOELLE & GREENFIELD, 1985; VIIKARI & KORHOLA, 1986; BUCCHOLZ *et al.*, 1987).



**Figura 1.** Vias metabólicas de formação de produtos da fermentação de carboidratos por *Zymomonas mobilis*. 1 - Glucoquinase; 2 - Glucose-6-P-desidrogenase; 3 - 6-P-gluconolactonase; 4 - 6-P-gluconato desidratase; 5 - Aldolase; 6 - Gliceraldeído-P-desidrogenase; 7 - fosfoglicerato quinase; 8 - Fosfoglicerato mutase; 9 - Enolase; 10 - Piruvato quinase; 11 - Frutoquinase; 12 - Glicose 6-P isomerase; 13 - Glicose-frutose oxidorreductase GFOR; 14 - Gluconolactonase (GL); 15 - Gluconato quinase; 16 - Piruvato descarboxilase; 17 - Álcool desidrogenase. Fonte: adaptado de SPRENGER (1996).

Utilizando glicose como fonte de carbono, a produção de etanol por *Z. mobilis* representa cerca de 95% do valor máximo teórico, havendo a formação de outros produtos como acetoína, acetaldeído, glicerol, ácido acético e ácido láctico, mas em pequenas concentrações (VIKARI, 1988). Rendimentos inferiores em

etanol são atingidos com o uso de sacarose, frutose ou de uma mistura de glicose e frutose, principalmente em altas concentrações (DOELLE & GREENFIELD, 1985; VIIKARI & KORHOLA, 1986). Com a utilização de frutose como substrato, VIIKARI (1988) relatam que a produção de etanol por *Z. mobilis* atinge cerca de 90% do valor máximo teórico, sendo observado a formação de dihidroxiacetona e manitol além dos mesmos subprodutos formados com o uso de glicose. Com sacarose, é observada uma redução mais acentuada na produção de etanol, cerca de 75-80% do máximo teórico. Levana e sorbitol são os principais subprodutos formados na fermentação alcoólica de sacarose por *Z. mobilis* (VIIKARI, 1984).

ERZINGER (1996) e WISBECK *et al.* (1997) relatam conversões de glicose em etanol superiores a 90%, em cultivos com diferentes linhagens de *Z. mobilis*, destacando, porém, a significativa redução da produtividade em processo em batelada usando altas concentrações iniciais de glicose. Também já foi mostrado que concentrações elevadas de glicose levam, ainda, à inibição do crescimento microbiano (ROGERS *et al.*, 1982; VIIKARI, 1986). SIVA KESAVA *et al.* (1995) estudaram a produção de etanol por *Z. mobilis* ATCC10988 utilizando diferentes concentrações de glicose. Neste trabalho os autores relatam o aumento da duração da fase *lag* e a diminuição do rendimento em etanol com utilização de concentrações de glicose acima de 200 g/L. ERZINGER *et al.* (2003) relatam a eficiência do uso do regime descontínuo alimentado de fermentação como alternativa para evitar a inibição pelo substrato e incrementar a produção de etanol por *Z. mobilis*.

Tradicionalmente, o etanol tem sido obtido por fermentações em batelada com cepas de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, que normalmente não toleram altas concentrações de etanol. Com isso, novos programas de melhoramento vêm sendo desenvolvidos para a obtenção de cepas tolerantes ao etanol (JOACHIMSTHAL *et al.*, 1998; MOHAGHEGHI *et al.*, 2004). Assim, *Z. mobilis* é considerada uma alternativa para a produção de etanol em larga escala, com vantagens em relação ao uso de leveduras, que incluem melhor rendimento na conversão de açúcares a etanol, menor produção de biomassa, maior tolerância ao etanol e facilidade de manipulação genética para melhoramento (SHENE & BRAVO, 2001; LIN & TANAKA, 2006; MOHAGHEGHI *et al.*, 2004). A única limitação de *Zymomonas* com relação às leveduras é sua limitada faixa conversão de carboidratos complexos, ficando restrita a glicose, frutose e sacarose (SPRENGER, 1996; GUNASEKARAN & CHANDRA, 1999).

### **2.3 Meios e condições de cultivo para *Zymomonas mobilis***

A composição do meio de cultura é fator determinante no crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol por *Z. mobilis*. Um problema relacionado ao uso industrial de *Z. mobilis* reside na sua dependência de vitaminas como biotina e ácido pantotênico (SWINGS & DE LEY, 1977). VAN PEE *et al.* (1974) observaram que determinadas linhagens de *Z. mobilis* apresentam bom crescimento celular na presença de apenas uma destas vitaminas ou mesmo na total ausência destes compostos. Segundo LAWFORD *et al.* (1982), o crescimento desta bactéria é favorecido na presença de biotina e pantotenato de cálcio.

Com o objetivo de suprir esta necessidade, a inclusão de extrato de levedura no meio de cultivo de *Z. mobilis* já foi relatada. Ainda na década de 70, SWINGS & DE LEY (1977) mostraram que, em meio de cultivo complexo – contendo extrato de levedura – cerca de 98% da glicose consumida por *Z. mobilis* era convertida em etanol e CO<sub>2</sub>. De acordo com FEIN *et al.* (1983), o uso de extrato de levedura no meio de cultivo fornece as vitaminas necessárias para o crescimento de *Z. mobilis*.

Vários autores destacam o uso de extrato de levedura no meio de cultura de *Z. mobilis*, porém, devido ao seu preço elevado, a utilização deste componente se limita à escala laboratorial. Como alternativa MALVESSI *et al.* (2006) destacam a utilização de uma fonte comercial de extrato de levedura bruto em substituição ao extrato purificado, usado como fonte de nitrogênio orgânico e vitaminas para o crescimento de *Z. mobilis*.

Foi demonstrado por LAWFORD & ROUSSEAU (1997) que a água de maceração de milho (milhocina), um resíduo agroindustrial de baixo custo, pode ser usada em substituição ao extrato de levedura purificado no processo fermentativo de *Z. mobilis* visando a produção de etanol. SILVEIRA *et al.* (2001) mostraram que a milhocina também pode ser utilizada para a multiplicação de células de *Z. mobilis* a serem empregadas no processo de bioconversão de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente. Por outro lado, a milhocina é uma matéria-prima que pode ser facilmente contaminada por microrganismos e, por isso, necessita de cuidados especiais na sua estocagem.

Com relação às fontes de carbono, SWINGS & DE LEY (1977), em estudos comparativos de diferentes cepas de *Z. mobilis*, observaram que a maioria

apresentava capacidade de crescer em meio contendo 30 a 40% (m/v) de glicose. *Z. mobilis*, em seu *habitat* natural, encontra-se exposta a altas concentrações de sacarose (SWINGS & DE LEY, 1977). STRUCH *et al.* (1991) observaram que a tolerância a concentrações elevadas de açúcares observada em cultivos com *Z. mobilis* ATCC 29191 seria devida à sua capacidade de regulação osmótica e ao eficiente sistema de transporte de glicose. LOOS *et al.* (1994) relatam que, pela ação da enzima periplasmática glicose-frutose oxidoredutase (GFOR), o sorbitol é produzido e acumulado pelas células, apresentando como função fisiológica a proteção das células do estresse osmótico causado pelas altas concentrações de açúcar.

A faixa de temperatura utilizada em processos fermentativos com *Z. mobilis*, visando ao consumo de glicose (crescimento celular), produção de enzimas e etanol, fica entre 25 e 35°C, sendo que o crescimento é praticamente interrompido em temperaturas superiores. *Z. mobilis*, quando exposta a 60°C por 5 minutos, é totalmente inativada.

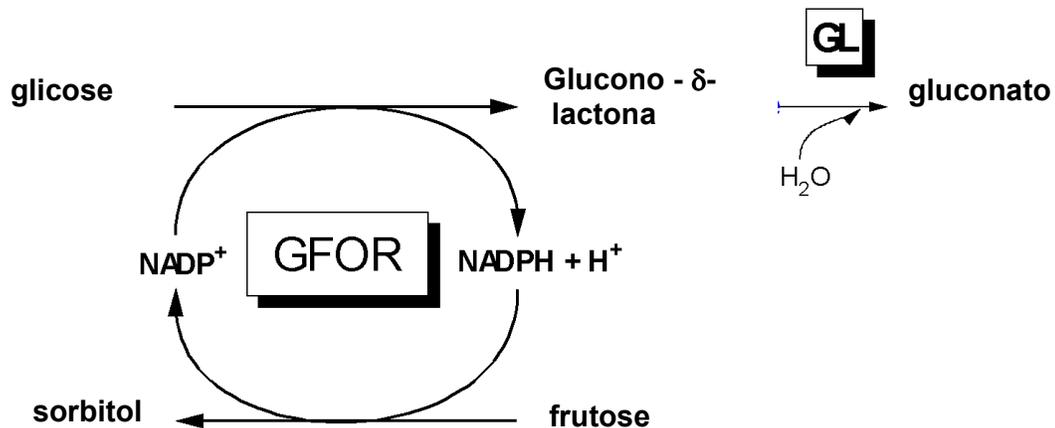
A bactéria *Z. mobilis* é caracterizada por possuir uma relativa tolerância a meios ácidos e por crescer na ampla faixa de pH de 3,5 a 7,5 (SWINGS & DE LEY, 1977).

#### **2.4 Enzimas glicose-frutose oxidoredutase e glucono- $\delta$ -lactonase de *Zymomonas mobilis***

Glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) de *Z. mobilis* é um tetrâmero consistindo de quatro sub-unidades similares, de massa molecular média de 40

kDalton, localizada na região periplasmática da célula da bactéria (ZACHARIOU & SCOPES, 1986, LOOS *et al.*, 1991). Análises por cristalografia e por difração de raios X mostraram que GFOR contém a coenzima NADP<sup>+</sup> acoplada. Uma vez que GFOR contém a coenzima NADP<sup>+</sup> acoplada à sua estrutura, a reação se dá independentemente da adição de qualquer cofator e mesmo com células inviáveis (HARDMAN & SCOPES, 1988).

VIIKARI (1984) e LEIGH *et al.* (1984) verificaram a presença de sorbitol e ácido glucônico quando sacarose ou uma mistura de frutose e glicose eram utilizadas como substratos de fermentação. A elucidação do mecanismo bioquímico de obtenção destes compostos foi posteriormente descrita por ZACHARIOU & SCOPES (1986), que identificaram a presença da glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) (E.C. 1.1.1.99), responsável pela redução de frutose a sorbitol concomitantemente com a oxidação de glicose a glucono- $\delta$ -lactona. A glucono- $\delta$ -lactona é, então, convertida à ácido glucônico (gluconato) pela enzima glucono- $\delta$ -lactonase (GL) (E.C. 3.1.1.17) (Figura 2). Dependendo das condições do meio, o gluconato retorna à via de Entner-Doudoroff por ação da gluconato quinase (Figura 1). Este processo catalítico de GFOR opera num clássico mecanismo *ping-pong*, onde duas meia-reações são envolvidas, ocorrendo a oxidação da glicose a glucono- $\delta$ -lactona pela redução do NADP<sup>+</sup> a NADPH, sendo a coenzima reoxidada pela redução da frutose a sorbitol (HARDMAN & SCOPES, 1988).



**Figura 2.** Conversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glucônico, respectivamente, pelas enzimas glicose frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono-δ-lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*. Adaptado de ZACHARIOU & SCOPES (1986)

Para a enzima GFOR purificada, ZACHARIOU & SCOPES (1986) observaram que GFOR apresenta maior ação catalítica entre 39 e 42°C e pH na faixa 6,2 a 6,4. Estes autores constataram ainda que, GFOR juntamente com GL, são capazes de converter quase totalmente (> 99%) soluções equimolares de glicose e frutose em sorbitol e gluconato de sódio. Apesar de ter como substratos a glicose e a frutose, é preferencialmente induzida por glicose. Como a produtividade do processo de bioconversão de frutose e glicose em sorbitol e glucono-δ-lactona depende, diretamente, da atividade de GFOR das células de *Z. mobilis*, torna-se importante avaliar a condição de cultivo do microrganismo, relatado anteriormente, particularmente em relação à fonte de carbono e sua concentração. ZACHARIOU & SCOPES (1986) compararam extratos celulares de *Z. mobilis*, cultivadas com diferentes substratos, e concluíram que a enzima é

induzida, em maior grau, pela presença de glicose e que concentrações crescentes deste açúcar proporcionam um aumento da atividade da enzima.

O complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* pode ser usado na produção de outras aldonolactonas além de gluconolactona (ZACHARIOU & SCOPES, 1986; SATORY *et al.*, 1997). SATORY *et al.* (1997) mostraram que o complexo enzimático GFOR/GL, extraído de células de *Z. mobilis* cultivadas em glicose, têm a capacidade de oxidar, além da glicose, outras sete aldoses (xilose, galactose, arabinose, manose, maltose, celobiose e lactose), na presença de frutose, levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos além de sorbitol. Os autores determinaram o valor de  $K_M$  de GFOR para o substrato lactose de 1,2M (a 30°C e pH 6,2), cerca de 80 vezes superior ao  $K_M$  encontrado para a glicose. Embora o produto da oxidação da lactose, o ácido lactobiônico, tenha apresentado a menor conversão, esta substância foi a que recebeu a maior atenção no trabalho de SATORY *et al.* (1997) em razão das suas importantes aplicações conforme é detalhado adiante nesta revisão.

## **2.5 Imobilização de biocatalisadores**

A imobilização de biocatalisadores – enzimas, células – é uma técnica utilizada em diversos processos, tanto em laboratório como em escala industrial, que consiste no confinamento físico de células íntegras e cataliticamente ativas, em um sistema reacional, impedindo que estas passem para a fase solúvel, onde estão contidos o substrato e o produto (KAREL *et al.*, 1985 apud KOURKOUTAS *et al.*, 2004). De um modo geral, a imobilização proporciona o aumento da

estabilidade operacional, onde enzimas ou células podem ser utilizadas por períodos prolongados (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Segundo RAMAKRISHNA & PRAKASHAM (1999), a imobilização permite o uso de elevadas concentrações celulares no reator, sendo que o emprego de diferentes configurações e regimes de operação de biorreatores foi relatado por JANG *et al.* (1996) e FERRAZ *et al.*, (2000). Os sistemas em que ocorre a imobilização de enzimas são mais viáveis economicamente do que os sistemas em que estas permanecem solúveis, em função da possibilidade de o processo ser conduzido continuamente, proporcionar a reutilização das enzimas, além de facilitar a separação dos biocatalisadores da fase líquida na qual se encontram os produtos (SZCZODRAK, 2000).

Em geral, as vantagens da imobilização superam as suas limitações. Entretanto, alguns fatores devem ser mencionados como aspectos a serem prevenidos e/ou evitados, como a perda da atividade catalítica durante o processo de imobilização, problemas difusionais e a estabilidade do biocatalisador (ZANIN & MORAES, 2004; KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Os principais aspectos a considerar em um sistema imobilizado são a enzima, o suporte e o modo de ligação ao suporte. Entre a grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização, a definição de um método específico aplicável a todas as enzimas é difícil, devido, principalmente, às diferentes características e composição química destas moléculas, às propriedades do substrato e do produto e à finalidade de aplicação do produto resultante (SZCZODRAK, 2000).

Para a implementação da tecnologia de imobilização em escala industrial, os custos do processo devem ser compensados com o aumento do rendimento em produto, sendo, portanto, avaliados suportes de baixo custo para simplificar o processo fermentativo, principalmente no que diz respeito às condições operacionais (VIGNOLI *et al.*, 2006).

Com relação à obtenção de sorbitol e ácido glucônico com células e *Z. mobilis*, alguns estudos de laboratório, com o uso de k-carragena como matriz para imobilização das células, resultaram em patentes industriais (REHR *et al.*, 1991, JANG *et al.*, 1992, REHR & SAHM, 1992). Como suportes de imobilização utilizados na bioprodução de sorbitol e ácido glucônico por *Z. mobilis* são ainda descritos na literatura alginato de sódio (CHUN & ROGERS, 1988, BERTASSO *et al.*, 1996) e diferentes polímeros (KOEHNTOPP *et al.*, 1996, FERRAZ *et al.*, 2001, MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005, VIGNOLI *et al.*, 2006). Nesta revisão, são apresentados mais detalhes de alguns destes trabalhos.

## **2.6 Produção de sorbitol, ácido glucônico e ácido lactobiônico**

A produção industrial de sorbitol é realizada por processo que envolve a hidrogenação catalítica do xarope de glicose, numa concentração de 70% (m/v), catalisado por níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), a temperatura e pressão médias de 120-150°C e 40-50 atm, respectivamente (HAIDEGGER, 1977, apud SILVEIRA & JONAS, 2002). O xarope de sorbitol obtido é resfriado e o catalisador eliminado por precipitação e filtração. A purificação da solução de sorbitol é realizada por cromatografia de troca iônica e carvão ativado.

O ácido glucônico e seus sais podem ser obtidos por diferentes mecanismos: químico, eletrolítico, catalítico ou biológico. Os métodos químico, eletrolítico e catalítico apresentam uma série de desvantagens. De um modo geral, apresentam baixos rendimentos (60 a 80 %), formação de produtos indesejáveis, isolamento e purificação difíceis e problemas ambientais com agentes oxidantes (HUSTEDE *et al.*, 1985).

Em processos fermentativos, em escala industrial, os microrganismos empregados na produção de ácido glucônico são *Aspergillus niger* e *Gluconobacter suboxydans* (HUSTEDE *et al.*, 1985). Com *Aspergillus niger*, o ácido glucônico é produzido pela desidrogenação da glicose em reação catalisada pela enzima glicose oxidase, com rendimento na ordem de 80% do valor máximo teórico.

MUKHOPADHYAY *et al.* (2005) relatam a utilização de soro de leite desproteinizado suplementado com glicose na produção de ácido glucônico por *Aspergillus niger*, atingindo cerca de 60% de conversão dos açúcares em ácido glucônico. Neste mesmo trabalho, os autores usaram *A. niger* imobilizado em espumas de poliuretano, que proporcionou um incremento de 33% na produção de ácido glucônico em relação ao uso de células livres.

Com relação ao ácido lactobiônico, não há informações na literatura especializada sobre a produção do ponto de vista industrial. Entretanto, alguns trabalhos na área biotecnológica, não envolvendo particularmente o sistema GFOR/GL de *Z. mobilis*, são encontrados na literatura, conforme descrito a seguir.

A utilização de *Pseudomonas graveolens* 14 e *P. fragi* 25 como capazes de oxidar a lactose a ácido lactobiônico foram primeiramente relatados por

STODOLA & LOCKWOOD (1947). KLUYVER *et al.* (1951) identificaram outras duas espécies de *Pseudomonas* como boas produtoras de ácido lactobiônico, *Pseudomonas calco-acetica* e *Pseudomonas quercito-pyrogallica*. Neste trabalho, cerca de 90% de rendimento em lactobionato de cálcio foi obtido em cerca de 4 dias, em ensaios em frascos agitados, utilizando 10% (m/v) de lactose, extrato de levedura, sais nutrientes e CaCO<sub>3</sub>.

Na década de 60, NISHIZUKA & HAYAISHI (1962) descrevem a purificação da lactose desidrogenase, obtida de células de *Pseudomonas graveolans*. Esta enzima catalisa a oxidação da lactose a lactobiono- $\delta$ -lactona, que, conseqüentemente, é hidrolisada a ácido lactobiônico por uma outra enzima, a lactonase. Esta enzima apresentava capacidade de utilizar várias outras aldoses como substrato, mostrando, entretanto, atividade cerca de 4 a 5 vezes superior em glicose e galactose quando comparada com lactose.

MIYAMOTO *et al.* (2000), em meio contendo soro de leite (~50 g/L de lactose) e 5 g/L de peptona, obtiveram cerca de 44 g/L de ácido lactobiônico em 60 horas de processo com *Pseudomonas* sp LS13-1. Em testes com concentrações crescentes de lactose, rendimentos de 90% foram alcançados com 150 ou 200 g/L de lactose. Em batelada alimentada, os autores relatam a baixa eficácia do soro de leite em função do aumento da viscosidade do meio. Entretanto, com lactose (150 g/L inicial) e adição intermitente de 50 g de lactose + 0,8 g de peptona, destacam a obtenção de 290 g/L de ácido lactobiônico ao final de 155 horas de cultivo.

MURAKAMI *et al.* (2002) relatam a etapa de seleção e isolamento de *Burkholderia cepacia* No. 216 entre vários microrganismos potenciais produtores

de ácido lactobiônico e a eficiência desta linhagem em oxidar diferentes aldoses visando a obtenção de ácidos aldônicos. Glicose foi o substrato mais eficiente para a enzima, sugerindo que esta seja uma glicose oxidase, e com ampla faixa de especificidade. Esta glicose oxidase de *Burkholderia cepacia*, diferentemente da notória especificidade da glicose oxidase, atua não apenas na catálise de aldohexoses, mas também sobre aldopentoses e oligossacarídeos, como xilose, arabinose, celobiose, não atuando, entretanto, sobre cetoses e açúcares não redutores.

Posteriormente, MURAKAMI *et al.* (2003), comparam a utilização da linhagem selvagem *Burkholderia cepacia* No. 216 e a linhagem mutante *Burkholderia cepacia* No. 24, com alta tolerância a lactose e atividade negativa para  $\beta$ -galactosidase, na bioprodução de ácido lactobiônico em regime descontínuo e descontínuo alimentado. Neste trabalho, em regime descontínuo e com a linhagem selvagem, foi obtido 150 g/L de ácido lactobiônico em 10 dias de processo. Usando a linhagem mutante *Burkholderia cepacia* No. 24, cerca de 100% de conversão foi obtida, porém, em 4 dias de processo. Com esta mesma linhagem, em regime descontínuo alimentado, após seis alimentações de solução de lactose (a partir de 24 horas de cultivo), 400 g/L de ácido lactobiônico foi obtido, cerca de 100% de conversão, em 10 dias de processo. Os autores destacam a aplicabilidade do processo em escala industrial.

MURAKAMI *et al.* (2006) estudaram a conversão de lactose a ácido lactobiônico por células de *Burkholderia cepacia* No. 24. Para a obtenção de células, foi usado meio a base de lactose, milhocina, extrato de levedura, sais minerais e  $\text{CaCO}_3$ , este último usado para o controle do pH reacional. As células

obtidas mostraram-se estáveis entre pH 5,0 e 9,0 e entre 30 e 40°C. Segundo os autores, na condição otimizada – 15% (m/v) de lactose e 2 U/mL de células – o processo foi conduzido em cinco bateladas sucessivas, a 30, 35 e 40°C, usando as mesmas células. A velocidade de conversão foi proporcional a temperatura utilizada, chegando a 100% em 27, 18 e 15 horas, a 30, 35 e 40°C respectivamente. Entretanto, para atingir a total conversão do substrato ao produto final no 5º ciclo, os autores destacam o aumento do período reacional para 54, 36 e 30 horas, respectivamente.

O ácido lactobiônico pode ser produzido a partir da oxidação da lactose pela ação de carboidrato oxidases. As enzimas carboidrato oxidases, como lactose oxidase, glucose oxidase - citada anteriormente por MURAKAMI *et al.* (2002) - entre outras, são enzimas de grande importância na indústria, em função de sua habilidade em catalisar a oxidação de mono, oligo e polissacarídeos.

A oxidação da lactose a ácido lactobiônico pela ação da enzima carboidrato oxidase de *Microdochium nivale* foi descrita por NORDKVIST *et al.* (2007). O valor de  $K_M$  para lactose, obtido no ensaio enzimático a pH 6,4 e 38°C foi de 0,066 mM. Segundo os autores, este valor é significativamente inferior aos obtidos para outras enzimas capazes de oxidar lactose a ácido lactobiônico, onde destacam o trabalho de SATORY *et al.* (1997), que obtiveram valor de  $K_M$  de 1,2 M para a enzima glicose-frutose oxidorreductase de *Zymomonas mobilis*. Ainda citado por estes autores, NISHIZUKA & HAYAISHI (1962) obtiveram valor de  $K_M$  de 11 mM para lactose desidrogenase de *Pseudomonas graveolans* e para a hexose oxidase de *Chondrus crispus*, valores de 97 e 1,7 mM foram obtidos por SAVARY *et al.* (2001) e GROEN *et al.* (1997), respectivamente.

HUA *et al.* (2007) estudaram a oxidação da lactose a ácido lactobiônico pela enzima carboidrato oxidase (lactose oxidase) de *Microdochium nivale* em escala piloto de 600 litros, utilizando um “*rotary jet head system*”, reator que proporcionou eficiente mistura e transferência de massa. O processo de oxidação enzimática foi realizado a 38°C, pH 6,4, sendo necessário o uso de catalase para eliminar a formação de peróxido de hidrogênio. Neste trabalho, os autores descrevem a obtenção de 98% de conversão em ácido lactobiônico, não sendo observada a inativação ou inibição da atividade enzimática nas condições operacionais testadas.

### **2.6.1 Uso do complexo GFOR/GL de *Zymomonas mobilis***

A partir da descrição do mecanismo bioquímico de obtenção de sorbitol e ácido glucônico pela ação do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* segundo ZACHARIOU & SCOPES (1986), vários grupos de pesquisa procuraram desenvolver uma alternativa biotecnológica para produção simultânea destas substâncias. Em decorrência, um expressivo número de artigos científicos foi publicado, resultando em significativo número de depósitos de patentes relacionados à produção de sorbitol e ácido glucônico ou seus sais (SCOPES *et al.*, 1988; BRINGER-MEYER & SAHM, 1991; REHR & SAHM, 1991; SILVEIRA *et al.*, 1994). Alguns aspectos relevantes relacionados a este bioprocessos são discutidos na seqüência.

Em um cultivo de *Z. mobilis*, utilizando sacarose ou mistura em concentração equimolar de glicose e frutose, em batelada convencional, etanol é

o principal produto e o acúmulo de sorbitol corresponde a cerca de 11% do substrato consumido. O ácido glucônico produzido serve como substrato para o próprio microrganismo, sendo metabolizado no sentido da formação de etanol pela via de Entner-Doudoroff (CHUN & ROGERS, 1988).

A utilização do ácido glucônico formado no processo pode ser evitada com a permeabilização da parede celular. Com a permeabilização de células previamente cultivadas de *Z. mobilis* ZM4 (ATCC 31821) com tolueno 10% (v/v), CHUN & ROGERS (1988) impediram o consumo do ácido glucônico formado em razão da liberação para o meio externo de substâncias essenciais à formação de etanol. Este procedimento, entretanto, não exerce efeito negativo sobre a atividade de GFOR, uma vez que o NADPH, cofator essencial para a enzima, permanece ligado à proteína.

Na literatura especializada, a utilização de células permeabilizadas é constantemente destacada. Entretanto, o uso de células não permeabilizadas de *Z. mobilis* já foi descrito por SILVEIRA *et al.* (1994, 1999), que desenvolveram um processo com células não permeabilizadas de *Z. mobilis* ATCC 29191, previamente obtidas e concentradas, em que a conversão do ácido glucônico produzido em etanol, na etapa de bioconversão era evitada com o uso de altas concentrações iniciais de glicose e frutose no meio. A inibição do metabolismo bacteriano pelos substratos (glicose e frutose) e na seqüência, pelas altas concentrações de produto (ácido glucônico e sorbitol), impedia a conversão de ácido glucônico a etanol, levando à preferencial utilização dos substratos via sistema GFOR/GL. Neste processo, entretanto, novas células bacterianas contendo o complexo enzimático devem ser obtidas para serem usadas na bioconversão,

podendo favorecer a economia do processo se for considerado o aproveitamento do etanol produzido no cultivo em associação ao crescimento celular.

REHR *et al.* (1991), usando células de *Z. mobilis* ATCC 29191, permeabilizadas com brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB) e imobilizadas em k-carragena, em processo descontínuo, obtiveram valores de velocidades específicas máximas de produção de sorbitol e ácido glucônico de 1,8 e 2,1 g/g.h, para células livres e de 1,4 e 1,8 g/g.h, para células imobilizadas em k-carragena respectivamente. Os autores sugerem que os menores valores obtidos com células imobilizadas foram devido a problemas difusionais ou ainda causados pela inativação parcial da enzima GFOR durante a imobilização. Em ensaio em biorreator de leite fluidizado, as esferas de k-carragena foram tratadas com glutaraldeído e polietilamina, substâncias que têm a função de estabilizar a atividade da enzima e reforçar a reticulação das esferas de k-carragena, prevenindo o extravasamento das células. A estabilidade operacional foi marcadamente afetada, pois apenas 3,5% de perda de atividade foi observada em um período de 75 dias de processo contínuo.

JANG *et al.* (1996) estudaram a produção de sorbitol por células permeabilizadas em CTAB e imobilizadas em k-carragena. Neste trabalho, os autores mostraram que o uso de esferas de k-carragena secas e desidratadas - mantidas a 20°C, a 60% de umidade, por 2 semanas, seguidas de re-hidratação em solução de substratos - e o tratamento com polióis, como glicerol e polipropileno glicol, usados para aumentar a rigidez das esferas, proporcionaram a melhora na estabilidade operacional das esferas. O tratamento com polióis

permitiu a obtenção de 90% de conversão de frutose em sorbitol em 10 horas de bioprocesso, a 39°C e pH 6,2.

BERTASSO *et al.* (1996), usando *Z. mobilis* imobilizada em alginato de cálcio, relatam a viabilidade do uso de sistemas imobilizados no processo de bioconversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glucônico, tendo sido constatado a manutenção da atividade de GFOR por longos períodos. Neste trabalho, após cerca de 350 horas de processo em batelada, cerca de 80% da atividade inicial havia sido preservada.

KOEHNTOPP *et al.* (1996) avaliaram a imobilização de células de *Z. mobilis* em polímeros sintéticos (poliuretano). Segundo os autores, este método de oclusão proporcionaria alta resistência mecânica e, devido à grande porosidade, boa difusão do meio reacional. Em ensaios de bioconversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glucônico, em três ciclos sucessivos de 24 horas, a 39°C e pH 6,4, rendimentos próximos a 100% e velocidades específicas de 2,3 g/g/h foram obtidas, embora tenha sido observado a liberação de células para a fase líquida do sistema.

FERRAZ *et al.* (2000), como alternativa ao alginato de cálcio como suporte de imobilização, relatam o uso da técnica que consiste em confinar as células nos microporos de membranas de fibras ocas. Neste caso, os poros da membrana são menores que as células e oferecem baixa resistência ao transporte de substratos e produtos. Segundo os autores, os problemas de transferência de massa foram reduzidos em sistema em membranas quando comparado com o bioprocesso conduzido com células imobilizadas em alginato de cálcio, atingindo, no primeiro caso, taxa de reação (g gluconato/g proteína/h) cerca de oito vezes

superior, sendo que ambos processos foram realizados nas mesmas condições de pH e temperatura (pH 6,2 e 39°C).

Posteriormente, como já mencionado neste trabalho, SATORY *et al.* (1997) mostraram ser possível, com GFOR/GL extraída de *Z. mobilis*, a obtenção de diferentes ácidos orgânicos e sorbitol, a partir de aldoses alternativas à glicose e frutose, respectivamente. Os autores relatam conversão de lactose em ácido lactobiônico da ordem de 90%, tanto em sistema descontínuo como em descontínuo alimentado, embora em tempo de processo longo (60 e 150 horas, respectivamente).

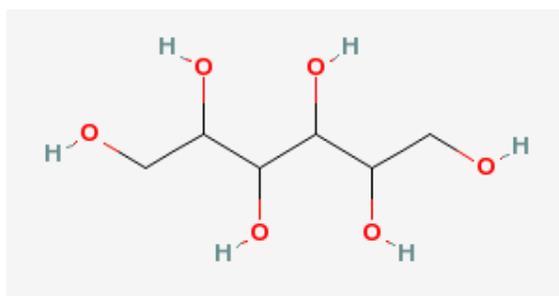
MALVESSI *et al.* (2002) e CARRA *et al.* (2003), por sua vez, demonstraram que o complexo GFOR/GL contido em células permeabilizadas de *Z. mobilis* pode ser usado na bioconversão de misturas de diferentes aldoses e frutose em outros ácidos/sais orgânicos, alternativos ao ácido glucônico/gluconatos e sorbitol, respectivamente. Entre estes, rendimentos aproximados de 85% foram obtidos para o ácido lactobiônico.

O interesse na obtenção, juntamente com sorbitol, de outros ácidos orgânicos além do ácido glucônico, com o complexo GFOR/GL de *Z. mobilis*, desperta um particular interesse devido ao fato de haver uma grande desproporção entre as demandas de sorbitol e ácido glucônico (JONAS & SILVEIRA, 2004). Este aspecto é fundamental para o contexto deste trabalho, uma vez que no processo biotecnológico com *Z. mobilis*, a formação dos produtos se dá em base equimolar.

## 2.7 Sorbitol, ácido glucônico e ácido lactobiônico: características e aplicações

### 2.7.1 Sorbitol

O sorbitol – também referido como D-sorbitol ou D-glucitol, apresenta fórmula molecular  $C_6H_{14}O_6$ , peso molecular de 182 g/mol, ponto de fusão de 90 a 96°C e valor calórico de 2,4 kcal/g (Figura 3).



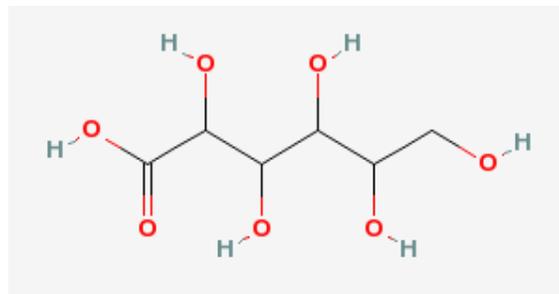
**Figura 3.** Estrutura molecular do sorbitol

Sorbitol é uma substância amplamente encontrada na natureza, em várias espécies vegetais, principalmente em frutas como pêra, maçã, pêssegos e ameixas. Trata-se de uma substância não cariogênica, com poder edulcorante de 50 a 60% em relação à sacarose, isenta de odor e de sabor residual (FREITAS, 1990, BUDAVARI *et al.*, 1996). Em processos industriais, o sorbitol tem aplicações na indústria de alimentos, como condicionador de umidade, inibidor da cristalização de açúcares; na indústria farmacêutica, usado em xaropes e pastas medicinais, como matéria-prima básica para produção do ácido ascórbico e como

emoliente na produção de cosméticos. Apresenta, ainda, aplicações na indústria de fumo, resinas, adesivos, couro, papel, têxtil, galvanoplastia, entre outras (BUDAVARI *et al.*, 1996; SILVEIRA & JONAS, 2002; VOGEL, 2003; JONAS & SILVEIRA, 2004).

### 2.7.2 Ácido glucônico

O ácido glucônico, de fórmula molecular  $C_6H_{12}O_7$ , é também referido na literatura como D-gluconato ou ácido glucono-lactona (Figura 4).

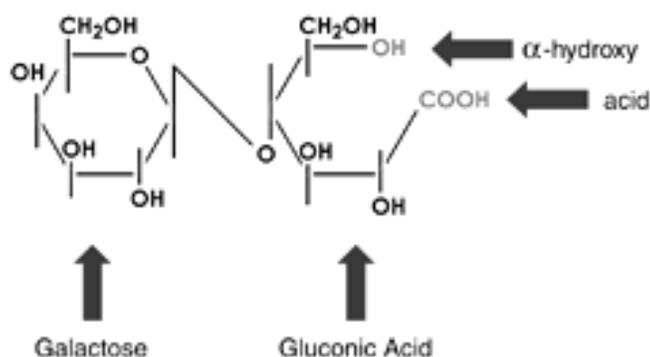


**Figura 4.** Estrutura molecular do ácido glucônico

As principais aplicações do ácido glucônico e seus sais são voltadas para a indústria de alimentos, como acidulante e estabilizante, na remoção de incrustações provocadas por oxidação em ferro galvanizado, ligas de magnésio ou aço inoxidável; em concretagem, gluconato de sódio é um efetivo agente para retardamento de cura o que produz um concreto mais homogêneo e com maior resistência a água, gelo e rachaduras, entre outras (HUSTEDE *et al.*, 1985, HUSTEDE *et al.*, 2003).

### 2.7.3 Ácido lactobiônico

O ácido lactobiônico (ácido 4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucônico) é composto por uma unidade de galactose quimicamente unida por uma ligação éter a outra de ácido glucônico (Figura 5).



**Figura 5.** Estrutura molecular do ácido lactobiônico

É um produto obtido a partir da oxidação química ou microbiana da lactose, apresentando alto valor agregado e importantes aplicações comerciais.

As principais propriedades físico-químicas do ácido lactobiônico são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características físico-químicas do ácido lactobiônico

Fórmula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>
Peso molecular (g/mol)	358
pKa	~3,8
Ponto fusão (°C)	113-118
Solubilidade	Solúvel em água, levemente solúvel em metanol, etanol e ácido acético glacial

Fonte: BUDAVARI *et al.* (1996)

Em virtude de o ácido lactobiônico ser o principal foco da pesquisa realizada no presente trabalho, um maior aprofundamento sobre suas aplicações é apresentado a seguir.

Entre os produtos mais utilizados na indústria cosmética estão os alfa-hidroxiácidos (AHA) e os polihidroxiácidos (PHAs), denominados a nova geração dos alfa-hidroxiácidos (BARQUET *et al.*, 2006). Os efeitos benéficos dos alfa-hidroxiácidos (AHA) no tratamento da pele (hidratantes e refrescantes), bem como o grande sucesso comercial desde sua introdução no início dos anos 70, se devem a VAN SCOTT & YU (1974). Desde então, o uso dos AHAs foi ampliado para diversos tratamentos dermatológicos, como acne, queratoses, verrugas, pigmentação, rugas finas e pele fotoenvelhecida (VAN SCOTT *et al.*, 1996, DITRE *et al.*, 1996, BERGFELD *et al.*, 1997).

AHAs são ácidos orgânicos que apresentam um grupo carboxila terminal com um ou dois grupamentos hidroxila na posição alfa e uma cadeia carbônica de comprimento variável. Muitos AHAs não são tóxicos e ocorrem naturalmente em diversas frutas e cana-de-açúcar (VAN SCOTT *et al.*, 1996). Estes compostos produzem efeitos sobre o estrato córneo, a epiderme, papila dérmica e folículos pilosebáceos; porém, por apresentarem moléculas de baixo peso molecular, penetram rapidamente na pele, podendo, por este motivo, provocar ardências e irritações. Como exemplos de AHAs tradicionalmente usados em dermatologia, como agentes esfoliantes e emolientes da pele, estão o ácido glicólico (menor estrutura molecular, 2 carbonos) e o ácido láctico, entre outros (VAN SCOTT *et al.*, 1996; BERGFELD *et al.*, 1997, YU & VAN SCOTT, 2004, GREEN, 2005).

Alguns AHAs são antioxidantes. Um antioxidante pode ser definido como um composto que é capaz de prevenir ou inibir a oxidação de outra substância, citando-se como exemplos, os ácidos málico, tartárico, ascórbico e como substâncias não oxidantes, os ácidos glicólico e lático (VAN SCOTT *et al.*, 1996).

#### 2.7.3.1 Ácido lactobiônico como agente antioxidante

O excesso de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode causar uma condição denominada de estresse oxidativo, a qual está associada a diversas condições fisio-patológicas, incluindo os processos de envelhecimento, infecciosos e inflamatórios e o câncer, entre outras. A exposição à radiação, fumo e poluentes ambientais, além do próprio envelhecimento natural, são fatores que podem aumentar o estresse oxidativo (DRÖGE, 2000; SOARES *et al.*, 2005). Em vista disso, produtos com atividade antioxidante vêm sendo cada vez mais utilizados como forma de prevenir e/ou melhorar a saúde da população e colaborar na área da medicina estética.

A constante busca por novas matérias-primas que contornassem os efeitos adversos provocados pelos AHAs permitiram a descoberta dos polihidroxiácidos (PHA). PHAs são ácidos carboxílicos que contêm dois ou mais grupos hidroxila, não necessariamente na posição alfa, formando uma estrutura molecular alifática ou acíclica (YU & VAN SCOTT, 1996, GREEN *et al.*, 2001). Os PHAs apresentam efeitos comparáveis aos dos AHAs tradicionais (ácido glicólico, ácido lático, etc), com a vantagem de não causarem irritação na pele e possuírem ação hidratante e antioxidante.

Embora ainda pouco estudados, sabe-se que alguns PHAs possuem importante atividade antioxidante, como é o caso da gluconolactona e do já mencionado ácido lactobiônico. O ácido lactobiônico mostrou-se capaz de quelar íons ferro e seqüestrar radicais hidroxila diminuindo, desta forma, os danos causados pelas ERO (CHARLOUX *et al.*, 1994; CHARLOUX *et al.*, 1995). Tem merecido destaque na área cosmética em função do alto poder antioxidante, hidratante e cicatrizante. Estas propriedades tornam o ácido lactobiônico um agente importante, também, na preservação dos danos causados pela isquemia-reperfusão de órgãos transplantados (CHARLOUX *et al.*, 1995; SOUTHARD e BELZER, 1995, SOUTHARD, 2005). Além disso, tem a capacidade de ligar-se fortemente à água, formando uma película geleificante. Esta propriedade de formação de filme fornece a maciez desejada à pele (GREEN *et al.*, 2001; GRIMES *et al.*, 2004; YU & VAN SCOTT, 2004; GREEN, 2005).

O ácido lactobiônico pode formar sais (lactobionatos) com cátions metálicos como cálcio, potássio, sódio e zinco. Apresenta forte capacidade de complexar minerais, fazendo-o um composto interessante para aplicações na área alimentícia, podendo ser usado em bebidas energéticas (TOSHIKI *et al.*, 1995a). Apresenta resistência à ação das enzimas digestivas e pode ser fermentado pela flora intestinal, provavelmente exercendo efeitos pré-bióticos (TOSHIKI *et al.*, 1995b, SCHAAFSMA, 2008).

Outra aplicação de grande relevância do ácido lactobiônico é na área médica, como componente de soluções usadas na estabilização de órgãos antes de serem transplantados. Já foi mostrado que as propriedades quelantes desta substância induzem a redução dos danos aos tecidos dos órgãos devido à inibição

da produção de radicais livres (CHARLOUX *et al.*, 1995; SUMIMOTO & KAMADA, 1990; SUMIMOTO *et al.*, 1990; SHEPHERD *et al.*, 1993).

Viaspan® (Du Pont Pharmaceuticals, USA), mais conhecida como solução da Universidade de Wisconsin (solução UW), foi a primeira solução desenvolvida para o armazenamento de órgãos. No final dos anos 80, Folkert Belzer e James Southard iniciaram os estudos de preservação a frio de fígado, rins e pâncreas com a solução UW, sendo esta efetiva para a preservação dos três tipos de órgãos pelo período 48 a 72 horas. A UW é substituta da solução EuroCollins (solução EC), desenvolvida nos anos 70, para a estocagem a frio de rins (24 a 30 horas), de fígado e pâncreas (4 a 8 horas). A solução UW tornou-se padrão clínico para todo o mundo, mostrando excelentes resultados, sendo comumente chamada de padrão ouro para preservação de órgãos, apesar do constante desenvolvimento e aprimoramento de outras soluções, que, em alguns aspectos, são até superiores (MÜHLBACHER *et al.*, 1999).

A eficiência da solução UW está relacionada à presença de impermeantes de alto peso molecular (ácido lactobiônico e rafinose) e agentes como o aluprinol e glutathiona, que atenuam os efeitos dos radicais livres, produzidos em grande quantidade na reperfusão. Esta solução contém alta concentração de potássio, cerca de 130 mmol/L (JAMIESON *et al.*, 1988; KARAM *et al.*, 2005).

Outras aplicações do ácido lactobiônico são relacionadas à fabricação de detergentes, com potencial uso em larga escala como substituto do fosfato na formulação (GERLING & WILKE, 1991) e na indústria farmacêutica, usado na forma de sal, com o intuito de aumentar a solubilidade de antibióticos. Neste caso,

a solubilidade do lactobionato de eritromicina é cerca de 50-100 vezes superior à da eritromicina em água (HOFFHINE, 1956 apud NORDKVIST *et al.*, 2007).

## 3 OBJETIVOS

---

### Objetivo geral

O presente trabalho teve o objetivo geral contribuir para a viabilização da produção biotecnológica industrial de sorbitol e ácidos orgânicos a partir de frutose e aldoses, através da definição de uma nova composição de co-produtos formados no processo de bioconversão catalisado pelas enzimas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*.

### Objetivos específicos

- Comparar o crescimento microbiano, a produção de etanol e o desenvolvimento de atividade de GFOR/GL em cultivos com *Z. mobilis* conduzidos em regimes descontínuo e descontínuo alimentado, em meio com custo compatível com o valor dos produtos.

- Avaliar o sistema GFOR/GL, contido em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, na conversão de frutose e diferentes aldoses alternativas à glicose (maltose, galactose, lactose) em sorbitol e respectivos ácidos orgânicos.
- Verificar os efeitos da concentração de substratos (frutose e glicose ou lactose), pH e temperatura sobre a ação de GFOR/GL presente em células permeabilizadas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.
- Estudar as principais variáveis do processo de bioconversão de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico com GFOR/GL presente em células permeabilizadas de *Z. mobilis* livres ou imobilizadas em alginato de cálcio.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 Instalações

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Bioprocessos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (IB/UCS).

### 4.2 Microrganismo

A linhagem bacteriana usada neste estudo foi *Z. mobilis* ATCC 29191. Em estudo comparativo entre várias linhagens (LEMMEL *et al.*, 1992), *Z. mobilis* ATCC 29191 mostrou atividade de GFOR/GL superior à das demais.

As culturas foram mantidas em meio líquido (MALVESSI *et al.*, 2006), repicadas mensalmente e estocadas a 4°C.

### 4.3 Meios de cultivo

O meio líquido utilizado para a ativação e conservação das culturas, preparo de inóculo e na produção de biomassa/enzimas tinha a seguinte composição (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,5; extrato de levedura bruto (Prodex Lac<sup>®</sup>, Prodesa S.A., Brasil), 7,5 (MALVESSI *et al.*, 2006). Variações na composição do meio de cultura, com relação à fonte de nitrogênio orgânico - extrato de levedura bruto - são apresentadas e discutidas posteriormente.

No preparo do meio de ativação e conservação da cultura foram adicionados 20 g/L de glicose e o pH foi ajustado para 5,5. No cultivo de inóculos, a concentração de glicose foi de 100 g/L, adicionando-se ainda ao meio 5 g/L de  $\text{CaCO}_3$  com o fim de manter-se o pH em torno de 5,5.

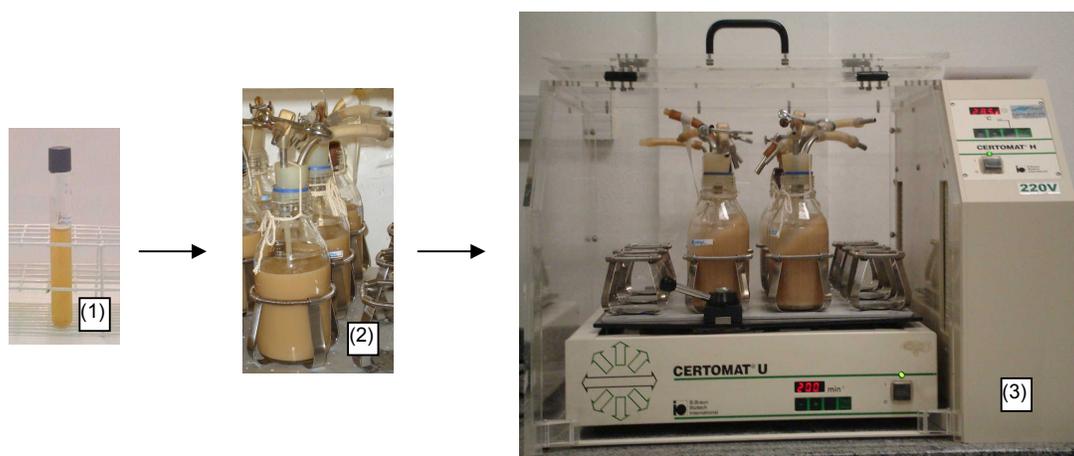
Para os cultivos em biorreator, foi preparada uma solução concentrada de glicose (500 g/L), sendo adicionado ao meio o volume necessário desta solução para atingir-se a concentração desejada em cada condição em estudo (100 a 200 g/L). A esterilização de todos os meios, bem como da solução de glicose, foi feita em autoclave, a 1 atm, por 15 min.

### 4.4 Preparo de inóculo

A ativação de culturas foi feita adicionando-se 2 mL de suspensão bacteriana em estoque a um tubo de tampa rosqueada contendo 18 mL de meio de ativação/conservação. Os tubos foram incubados em estufa a 30°C por 12

horas. Para a produção do inóculo, foram usados frascos anaeróbios de 500 mL, contendo 450 mL de meio total. Os meios foram inoculados com 45 mL da cultura previamente ativada e mantidos sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U/H - B. Braun Biotech, RFA), a 30°C. Nos frascos de incubação, foram instalados filtros esterilizados que permitiam a liberação de CO<sub>2</sub> produzido durante o processo.

Estas etapas estão ilustradas na Figura 6.



**Figura 6.** Obtenção de inóculo de *Zymomonas mobilis* em frascos agitados: (1) cultura de *Zymomonas mobilis* previamente ativada; (2,3) frascos inoculados, mantidos sob condições de crescimento.

Em testes previamente realizados, definiu-se o tempo ideal de incubação de inóculos, 10 horas, que permitia que as células ainda estivessem na fase exponencial de crescimento no momento da inoculação.

#### 4.5 Cultivo de *Zymomonas mobilis* em biorreator de bancada

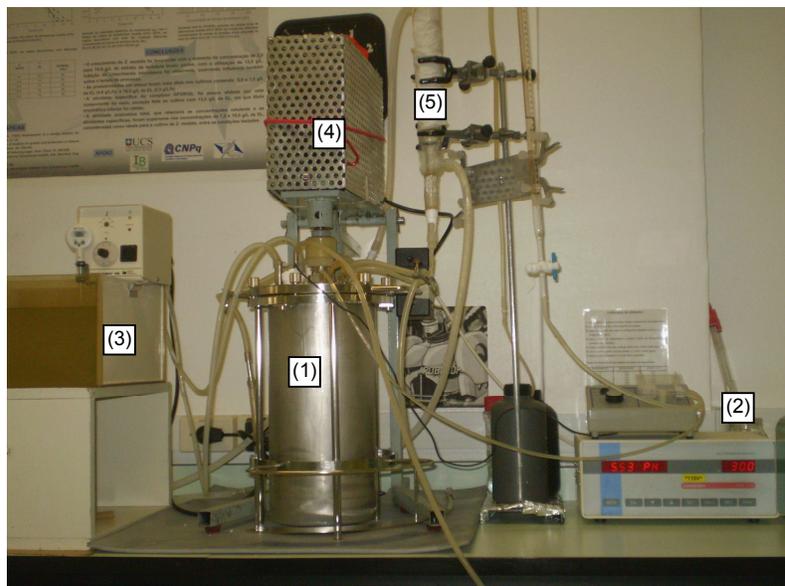
Os cultivos de *Z. mobilis*, tanto para a produção de GFOR/GL a utilizar em ensaios enzimáticos e de bioconversão quanto em estudos fermentativos, foram efetuados em biorreator de 7,0 litros de volume total e volume útil de 5,5 litros construído na oficina mecânica da Universidade de Caxias do Sul. Este equipamento consiste de uma cuba de aço inox em cuja tampa estão acopladas quatro chicanas, um eixo com selo mecânico, no qual são instaladas duas turbinas com seis pás planas, e um dispersor de ar em forma de ferradura perfurada localizado na parte inferior da cuba. Neste sistema, a temperatura é controlada por um fluxo de água, usando-se um banho termostaticado com circulação, conectado a um tubo de aço inoxidável em forma de “U” também instalado na tampa do biorreator. Os gases efluentes passam por um condensador de serpentina, ligado a um banho com água a 4°C, a fim de reduzir perdas por evaporação de água e de etanol. Ao reator estão acoplados um motor com frequência de rotação constante de 450 rpm e um controlador de pH (Consort, modelo R735, Bélgica).

Os meios utilizados foram preparados e esterilizados dentro da própria cuba. O eletrodo de pH foi calibrado e acoplado ao fermentador após o resfriamento do meio. Em todos os ensaios, a temperatura foi mantida em 30°C e o pH foi controlado em 5,5 pela adição automática de NaOH 5M. Durante a primeira hora de fermentação, nitrogênio gasoso foi borbulhado no meio de cultivo, à vazão de 0,5 L/min, com a finalidade de garantir a anaerobiose. Após, a anaerobiose foi proporcionada pelo CO<sub>2</sub> produzido pelo próprio microrganismo.

Amostras foram coletadas periodicamente através de uma mangueira de silicone ligada ao fermentador e acoplada a uma bomba peristáltica.

Ao término dos cultivos, os meios fermentados foram recolhidos e centrifugados (Centrífuga Sigma 4K-15), a 6000 rpm, por 20 minutos. Quando necessário, uma porção do sobrenadante foi estocada visando posterior análise do etanol formado. A biomassa concentrada foi permeabilizada e, eventualmente, imobilizada em alginato de cálcio a fim de ser utilizada em ensaios enzimáticos e de bioconversão. As técnicas de permeabilização e imobilização de células são detalhadas nos itens seguintes.

O sistema utilizado para a produção de biomassa/enzimas e etanol por *Z. mobilis* é ilustrado na Figura 7.



**Figura 7.** Sistema utilizado para a produção de células/enzimas em ensaios fermentativos (1) cuba de fermentação; (2) controlador de pH; (3) banho termostatizado; (4) sistema de agitação; (5) condensador.

Os ensaios foram conduzidos em regime descontínuo e descontínuo alimentado, visando a avaliação dos efeitos das concentrações de glicose, como fonte de carbono, e do extrato de levedura bruto, como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico, sobre o crescimento microbiano, a produção de etanol e a formação de atividade de GFOR/GL. Maiores detalhes sobre estes experimentos serão oportunamente relatados.

#### **4.6 Permeabilização de células de *Zymomonas mobilis***

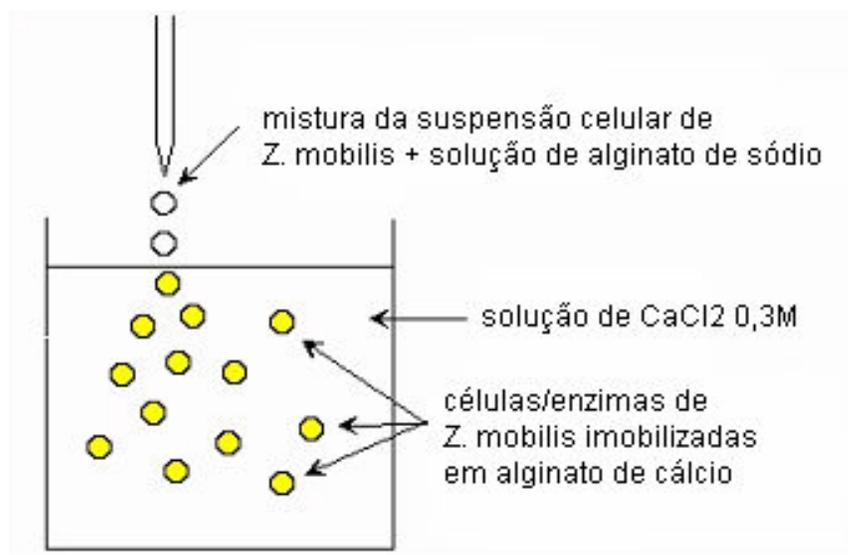
A permeabilização das células foi feita com o intuito de inativar o metabolismo fermentativo da bactéria e evitar que, em ensaios enzimáticos e de bioconversão, ocorresse conversão de substrato em etanol ou crescimento celular. As células foram permeabilizadas a partir da mistura de igual volume de suspensão celular (de concentração aproximada de 25 g/L) e 0,2% (m/v) de brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB). A mistura foi mantida sob agitação magnética, por 10 minutos (REHR *et al.*, 1991). Posteriormente, a suspensão foi centrifugada (Centrífuga Sigma 4K-15), a 6000 rpm, por 20 minutos, sendo o sobrenadante descartado e a biomassa concentrada ressuspensa em água destilada.

#### **4.7 Imobilização de células de *Zymomonas mobilis***

Para a imobilização de células de *Z. mobilis*, seguiu-se a metodologia descrita por ERZINGER (1999). Alginato de sódio Algogel 5540 (Degussa Flavors

& Fruit Systems do Brasil Ltda.) na concentração de 4% (m/v) foi dissolvido em água destilada e colocado para hidratar, sob agitação mecânica de 450 rpm, por 12 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, à esta solução de alginato, foi adicionado igual volume de suspensão celular bacteriana, previamente permeabilizada e tratada com glutaraldeído 0,5% (m/v) (JANG *et al.*, 1992). A mistura foi novamente mantida sob agitação por cerca de 2 horas visando à perfeita homogeneização. Para a formação das esferas de alginato de cálcio e imobilização das células, todo o volume desta suspensão foi lentamente gotejada em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,3M, com o auxílio de uma bomba peristáltica, através de capilares de silicone com as extremidades afuniladas (agulhas hipodérmicas), sendo então formadas esferas com diâmetro médio de 2 mm.

O esquema representativo da imobilização celular de *Z. mobilis* é mostrado na Figura 8.



**Figura 8.** Esquema representativo da etapa de imobilização de células de *Zymomonas mobilis* em alginato de cálcio.

A influência do glutaraldeído sobre a rigidez das esferas e sobre a atividade de GFOR/GL foi avaliada. Para isso, após a formação das esferas, estas foram reticuladas com glutaraldeído 0,5% (m/v) por 15 minutos, sob agitação magnética, à temperatura ambiente. O armazenamento das esferas foi feito em água destilada, a 4°C.

#### 4.8 Ensaio enzimáticos

Os ensaios enzimáticos visaram à avaliação da atividade do complexo enzimático GFOR/GL combinando-se a cetose (frutose) e diferentes aldoses (glicose, maltose, galactose e lactose). Os testes foram realizados empregando-se solução 0,7 mol/L de frutose/aldose (100 mL de solução) e 4,0 g/L de células permeabilizadas livres de *Z. mobilis*.

A temperatura de 39°C e o pH 6,4, condições definidas como básicas, foram mantidos constantes ao longo dos ensaios, sendo a reação monitorada pela medida do volume de NaOH 1M, utilizado para neutralizar o ácido orgânico formado. O sistema utilizado nestas análises é descrito no item 4.9.

Com base nestas condições, foi avaliado o efeito do pH (5,2 a 7,2) e da temperatura (37 a 54°C) sobre a ação enzimática do complexo GFOR/GL frente as diferentes aldoses (glicose, maltose, galactose e lactose). A termoestabilidade do sistema enzimático foi avaliada a 39, 43 e 45°C por até 12 horas. Adicionalmente, foram estimados os parâmetros cinéticos aparentes  $K_M$  e  $V_{max}$  da equação de Michaelis-Menten.

Com células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, particularmente para os pares de substratos glicose/frutose e lactose/frutose, a ação catalítica foi avaliada em diferentes valores de pH (5,2 a 9,7) e temperatura (34 a 59°C).

A termoestabilidade foi estudada em quatro ensaios curtos e sucessivos de bioconversão, com 3 horas de duração, em temperaturas entre 39 e 50°C, resultando em um período total de exposição das esferas de alginato de cálcio de 12 horas.

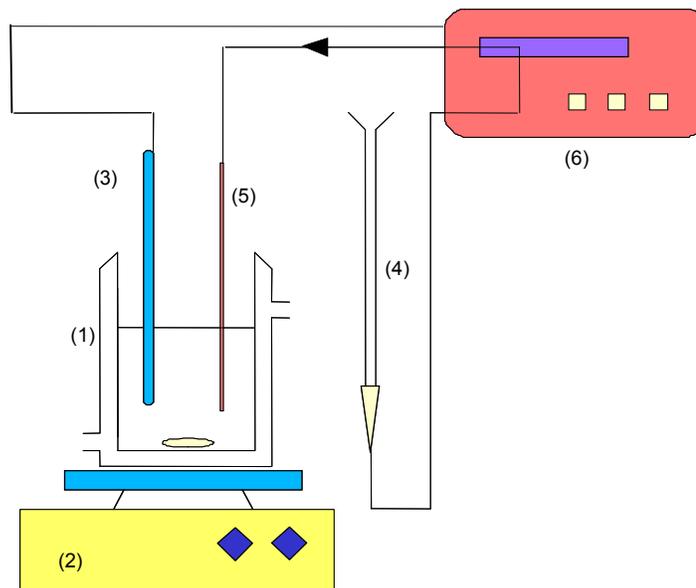
Para a estimativa dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{max}$ , a atividade enzimática foi determinada em soluções equimolares de substratos, nas condições padronizadas ( $X= 10$  g/L, 39°C e pH 6,4). Maiores detalhes de cada condição estudada são apresentados na discussão dos vários ensaios realizados.

#### **4.9 Ensaio de bioconversão**

Os ensaios de bioconversão em biorreator de mistura completa foram realizados utilizando um frasco cilíndrico de 600 mL contendo 240 mL de mistura de substratos (frutose/aldose).

A concentração celular de *Z. mobilis* utilizada nos ensaios foi de 25 g/L para o sistema livre e de 20 g/L para o imobilizado. O biorreator foi mantido sob agitação magnética, na temperatura e no pH desejados. O pH foi controlado pela adição automática de solução de NaOH 7M, contido em uma bureta acoplada a um controlador de pH (Consort, modelo R735, Bélgica).

O sistema utilizado para a determinação da atividade do complexo enzimático GFOR/GL e nos ensaios de bioconversão é ilustrado na Figura 9.



**Figura 9.** Esquema do sistema utilizado na determinação da atividade enzimática de GFOR/GL e em processos de bioconversão. (1) biorreator de mistura completa (BMC) sob temperatura controlada; (2) agitador magnético; (3) eletrodo de pH; (4) bureta contendo NaOH; (5) adição de NaOH; (6) controlador de pH.

## 4.10 Métodos analíticos

### 4.10.1 Coleta e preparo das amostras

Amostras do cultivo em biorreator foram tomadas periodicamente para a dosagem de açúcares redutores e da concentração celular. Ao final dos cultivos, o

meio foi centrifugado, as células concentradas ressuspensas em água destilada e armazenadas sob refrigeração a 4°C.

#### 4.10.2 Concentração celular

A concentração celular foi determinada pela medida da absorbância de suspensões previamente diluídas de meio de fermentação, a 560 nm, e sua conversão em concentração, massa de matéria seca por unidade de volume, através de uma reta de calibração. As medições eram realizadas em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210).

Para a obtenção da reta de calibração, seguiram-se os seguintes passos:

- 10 mL da cultura do tempo final de fermentação foram filtrados através de membranas de porosidade 0,2  $\mu\text{m}$ , sendo a massa retida lavada várias vezes com água destilada;

- a massa úmida foi levada a estufa para secagem a 90-95°C por 24 horas, sendo, posteriormente, transferidas para o vaso dessecador, contendo cristais de sílica, mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos para o resfriamento, seguido de determinação da massa celular em balança analítica;

- conhecendo-se o volume e a massa de células – obtidas pela subtração do peso da membrana sem células pelo peso das membranas contendo células - determinou-se a concentração celular da cultura;

- paralelamente, uma alíquota da suspensão celular original foi diluída com água destilada de forma a obter-se uma suspensão com leitura de absorbância de cerca de 0,500 (a 560 nm);

- a partir desta diluição inicial, foram preparadas diluições de 1:10; 2:10; 3:10...até 9:10, e com as medidas de absorbâncias das diferentes diluições e da concentração celular da cultura, construiu-se a reta de calibração.

Os valores foram convertidos em concentração celular, gramas de matéria seca por litro, através de uma equação de reta relacionando a absorbância da suspensão celular em função da concentração celular. Este procedimento foi repetido em diferentes cultivos, não sendo constatadas diferenças significativas entre os experimentos.

#### 4.10.3 Determinação de açúcares redutores

Uma alíquota de amostra dos diferentes cultivos de *Z. mobilis*, com aproximadamente 2 mL, foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para a dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-di-nitro-salicílico – DNS (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de glicose.

#### 4.10.4 Determinação de etanol

O teor de etanol de meios de cultivo foi determinado em equipamentos acoplados Densimat e Alcomat (Gibertini, Italy), em que a concentração do álcool é obtida com base na densidade da solução.

#### 4.10.5 Determinação da atividade enzimática do complexo GFOR/GL

O método utilizado se baseia na capacidade de conversão de frutose/aldose, por células de *Z. mobilis*, em sorbitol e respectivo ácido orgânico, em reações catalisadas pelas enzimas glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL). O procedimento para a determinação da atividade de GFOR/GL, baseado em MALVESSI *et al.* (2006), é apresentado a seguir:

- determinado volume de suspensão de células permeabilizadas, correspondente à concentração de 4 g/L (células livres) ou 10 g/L de células imobilizadas, foi adicionado à solução 0,7 mol/L dos carboidratos (100 mL de frutose/aldose), preparada em água destilada;

- os testes foram realizados em reator de 300 mL, com 100 mL de meio reacional, em banho termostaticado, mantido sob agitação magnética, por 40 minutos;

- o pH foi controlado pela adição de solução de NaOH 1M contida em pipeta de 10 mL, utilizando o controlador de pH (Consort, modelo R735, Bélgica), sendo as condições básicas de reação pH 6,4 e 39°C;

- a partir da variação do volume de álcali gasto no controle do pH com o tempo, determinou-se a velocidade de formação de determinado ácido orgânico;

Uma unidade de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol de ácido orgânico por hora, nas condições de teste, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas (U/g).

A atividade de GFOR/GL, em unidades enzimáticas por volume de meio (U/L), determinada ao final do processo, foi obtida pela multiplicação da atividade específica de GFOR/GL (U/g) pela concentração celular final (g/L).

#### 4.10.6 Estimativa da concentração de produtos em ensaios de bioconversão

A concentração de ácido orgânico formado em ensaios com concentrações equimolares de substrato, foi calculada de acordo com o volume e concentração de base utilizada durante a reação.

A concentração de sorbitol foi inferida a partir da concentração de ácido orgânico formado, considerando que os produtos são formados em base equimolar.

A equação abaixo foi empregada para este cálculo:

$$C = \frac{V_b \cdot M \cdot MM}{1000 \cdot (V_m + V_b)}$$

Onde:

C = concentração (g/L);

V<sub>b</sub> = volume de base (mL);

M = concentração da solução de base (mol/L);

MM = massa molecular do ácido (g/mol);

V<sub>m</sub> = volume de meio da biotransformação (L).

## 4.11 Parâmetros de avaliação do processo fermentativo e bioconversão

### 4.11.1 Velocidade específica de crescimento

Para o cálculo da máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{x,m}$ ) em cultivos de *Z. mobilis* em fermentador, foram traçadas curvas relacionando os logaritmos neperianos das concentrações ou massas de células, obtidas experimentalmente, e seus respectivos tempos de fermentação. A fase exponencial de crescimento, neste tipo de gráfico, possui um comportamento linear, sendo o coeficiente angular desta reta o próprio valor de  $\mu_{x,m}$ . A velocidade específica foi calculada em  $h^{-1}$ .

### 4.11.2 Fator de conversão de substrato em células

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

Onde:

$Y_{X/S}$  = fator de conversão de substrato em células (g/g);

$S_0$  e  $X_0$  = concentração ou massa inicial de substrato e biomassa (g/L ou g);

$S_f$  e  $X_f$  = concentração ou massa final de substrato e produto (g/L ou g).

### 4.11.3 Fator de conversão de substrato em produto

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f}$$

Onde:

$Y_{P/S}$  = fator de conversão de substrato em produto (g/g);

$S_0$  e  $P_0$  = concentração ou massa inicial de substrato e produto (g/L ou g);

$S_f$  e  $P_f$  = concentração ou massa final de substrato e produto (g/L ou g).

#### 4.11.4 Rendimento em produto

$$\rho = \frac{Y_{P/S}}{f} \cdot 100$$

Onde:

$\rho$  = rendimento (%);

$Y_{P/S}$  = fator de conversão de substrato em produto (g/g);

$f$  = fator estequiométrico máximo.

#### 4.11.5 Produtividade e produtividade específica

Para a determinação da produtividade, utilizou-se a seguinte equação:

$$p = \frac{P_f - P_0}{t}$$

Onde:

$p$  = produtividade (g/L/h ou g/h)

$P_0$  e  $P_f$  = concentração ou massa inicial e final de produto;

$t$  = tempo de processo (h).

Para o cálculo de produtividade específica ( $q$ ), determinada apenas em ensaios de bioconversão, a produtividade, em base volumétrica ou mássica, foi dividida pela respectiva concentração ou massa celular. Os valores de “ $q$ ” foram expressos em mmol de produto por grama de células secas por hora (mmol/g/h).

#### 4.11.6 Máxima velocidade específica de formação de ácido orgânico

A máxima velocidade específica de formação de ácido orgânico ( $v_m$ ), diretamente relacionada à atividade de GFOR/GL, foi determinada nas primeiras horas do processo de bioconversão, quando a variação da concentração de produto com o tempo apresenta um perfil aproximadamente linear. No cálculo, determinou-se graficamente, por regressão linear, a velocidade de formação do ácido orgânico produzido neste período inicial, sendo este valor dividido pela concentração celular utilizada no ensaio. Os valores de “ $v_m$ ” foram expressos em mmol de produto por grama de células secas por hora (mmol/g/h).

## 5 RESULTADOS

---

Os resultados deste trabalho são apresentados e discutidos na forma de capítulos conforme é apresentado a seguir.

### **5.1 RESULTADOS I - Efeito da concentração de extrato de levedura sobre a produção de etanol e do complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) por *Zymomonas mobilis***

A influência de diferentes concentrações de extrato de levedura bruto, como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico, sobre a produção de biomassa de *Z. mobilis* ATCC 29191, de etanol e do complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) é avaliada.

## **5.2 RESULTADOS II - Produção de glicose-frutose oxidorreductase / glucono- $\delta$ -lactonase e etanol por *Zymomonas mobilis* cultivada em regimes descontínuo e descontínuo alimentado**

Neste capítulo, discute-se a condução do cultivo de *Z. mobilis* em regime descontínuo e descontínuo alimentado, visando à formação do complexo enzimático GFOR/GL e de etanol.

## **5.3 RESULTADOS III - Produção biotecnológica de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*.**

A ação enzimática do complexo GFOR/GL sobre diferentes combinações de frutose e aldoses alternativas à glicose (maltose, galactose e lactose) é analisada com respeito aos efeitos do pH, da temperatura e da concentração de substratos.

## **5.4 RESULTADOS IV - Bioconversão de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico por células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*.**

A bioprodução de ácido lactobiônico com o complexo enzimático GFOR/GL presente em células livres de *Z. mobilis* é avaliada com relação aos efeitos da concentração de substratos, da concentração de células/enzimas e da temperatura em reator de mistura completa.

**5.5 RESULTADOS V - Avaliação de glicose-frutose oxidorreductase / glucono- $\delta$ -lactonase presentes em células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio na produção de ácido lactobiônico**

A ação enzimática do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizado em alginato de cálcio, em biorreator de mistura completa, visando à bioprodução de ácido lactobiônico é estudada. São discutidos os resultados obtidos com diferentes concentrações de substratos e valores de pH e de temperatura de reação. A estabilidade de GFOR/GL frente ao pH e à temperatura é abordada.

**5.6 RESULTADOS VI - Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactonase present in calcium alginate – immobilised *Zymomonas mobilis* cells.**

Neste trabalho, avaliam-se os efeitos da concentração de substratos (glicose/frutose), do pH e da temperatura reacional sobre a ação enzimática do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizado em alginato de cálcio, visando à bioprodução de ácido glucônico. A estabilidade do complexo enzimático frente ao pH e à temperatura está incluída na discussão.

## **5.1 RESULTADOS I**

**Efeito da concentração de extrato de levedura sobre a produção de etanol e do complexo enzimático glicose-frutose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) por *Zymomonas mobilis***

**Efeito da concentração de extrato de levedura sobre a produção de etanol e do complexo enzimático glicose-frutose oxidoredutase/glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) por *Zymomonas mobilis***

**RESUMO**

Meios de cultivo de *Zymomonas mobilis* normalmente contêm extrato de levedura como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico. O cultivo desta bactéria foi avaliado em meios com extrato de levedura bruto (ELB) entre 2,5 e 12,5 g/L. A máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{x,m}$ ), a conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) e em etanol ( $Y_{P/S}$ ) e a atividade de glicose-frutose oxidoredutase / glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) em cada condição foram comparadas.  $Y_{X/S}$  de aproximadamente 0,018 g/g foram atingidos com 2,5 e 5,0 g/L de ELB, obtendo-se cerca de 0,030 g/g nas demais condições. Valores de  $\mu_{x,m}$  semelhantes foram alcançados com 5,0, 7,5 e 10,0 g/L de ELB (0,27 h<sup>-1</sup>), com  $\mu_{x,m}$  inferiores (0,21 e 0,17 h<sup>-1</sup>) sendo obtidos com 12,5 e 2,5 g/L de ELB, respectivamente.  $Y_{P/S}$  semelhantes (0,43 g/g) foram calculados em todas as condições. A atividade específica de GFOR/GL foi estimada numa faixa de 22 a 24 U/g de biomassa para meios com ELB entre 2,5 e 10,0 g/L, com valor menor sendo obtido em meio com 12,5 g/L (18 U/g). Devido às maiores concentrações celulares finais nos cultivos com 7,5 e 10,0 g/L de ELB, atingiram-se títulos enzimáticos totais por volta de 100 U/L para estas condições. Os resultados mostram que na faixa entre 7,5 e 10,0 g/L de ELB, além do etanol, obtêm-se títulos elevados de GFOR/GL.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*, cinética do cultivo, etanol, GFOR/GL.

## INTRODUÇÃO

A bactéria anaeróbia, produtora de etanol, *Zymomonas mobilis* tem sido largamente estudada nos últimos anos principalmente devido ao seu sistema enzimático periplasmático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) / glucono- $\delta$ -lactonase (GL) que catalisa a bioconversão de frutose e glicose em quantidades equimolares de sorbitol e ácido glucônico, respectivamente (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

Para o seu crescimento, *Z. mobilis* requer, além da glicose como fonte de carbono e indutor de atividade do complexo GFOR/GL, uma série de nutrientes. Como fontes de nitrogênio, normalmente são utilizados sais de amônio, aminoácidos e peptídeos (ROGERS *et al.*, 1982), sendo conhecida a dependência de *Z. mobilis* de vitaminas, como biotina e ácido pantotênico, necessidade que pode ser suprida com a adição de extrato de levedura ao meio (SWINGS & DE LEY, 1977; FEIN *et al.*, 1983). Neste caso, o uso de extrato de levedura no meio de cultivo é interessante, visto que este componente também funciona como fonte de nitrogênio. Entretanto, devido ao seu preço elevado, a utilização de extrato de levedura em meios de cultivo limita-se à escala laboratorial. Estudos já foram realizados com o emprego de água de maceração de milho (milhocina) em substituição ao extrato de levedura, como fonte de vitaminas e aminoácidos para a obtenção de células, enzimas e etanol por *Z. mobilis* (LAWFORD & ROUSSEAU, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2001). Entretanto, SILVEIRA *et al.* (2001) destacam que a utilização deste subproduto em escala industrial fica limitada a plantas fermentativas próximas a unidades de processamento de milho, visto que

a milhocina é um material facilmente contaminável por microrganismos e, portanto, de difíceis e onerosos transporte e armazenamento.

O uso de um extrato de levedura bruto em comparação com extrato de levedura purificado comercial foi relatado por MALVESSI *et al.* (2006), sendo avaliadas as concentrações de 5,0 e 7,5 g/L de ambas as fontes nutricionais no meio de cultivo de *Z. mobilis* ATCC 29191. Os autores demonstraram que com o extrato de levedura bruto, com valor entre 20 e 25 vezes inferior que o do produto purificado, excelentes resultados em termos de crescimento celular, produção do complexo enzimático GFOR/GL e de etanol em cultivos de *Z. mobilis* são obtidos. Da mesma forma, KAWAGUTI *et al.* (2007) em cultivo de *Erwinia* sp. D12 relatam a eficiência do emprego de Prodex Lac<sup>®</sup> (15 g/L) como fonte de vitaminas e nitrogênio na produção de glicosiltransferase.

Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes concentrações de extrato de levedura bruto como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico sobre a produção de biomassa, de etanol e na formação do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* ATCC 29191.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Microrganismo*

O microrganismo utilizado foi *Z. mobilis* ATCC 29191. As culturas foram repicadas mensalmente em meio líquido, descrito em MALVESSI *et al.* (2006) e incubadas a 30°C e estocadas a 4°C.

### *Meios de cultivo*

O meio de cultivo utilizado para a ativação e conservação das culturas, preparo de inóculo e ensaios fermentativos – tinha a seguinte composição (g/L), excetuando glicose:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,5; extrato de levedura bruto Prodex Lac<sup>®</sup> (Prodesa S.A., Brasil), 7,5 (MALVESSI *et al.*, 2006). O meio de ativação e conservação da cultura continha 20 g/L de glicose e pH ajustado para 5,5. Nos meios usados para a preparação dos inóculos, foram utilizados 100 g/L de glicose e 5 g/L de  $\text{CaCO}_3$  para o controle do pH em torno de 5,5. Para a produção de biomassa, nos ensaios realizados em biorreator, era preparada uma solução concentrada de glicose (500 g/L) e adicionado ao meio o volume necessário, de acordo com a concentração definida para o ensaio (150 g/L). Além da condição padrão, concentrações de extrato de levedura bruto (ELB) entre 2,5 e 12,5 g/L foram testadas. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave a 1 atm, por 15 minutos.

### *Condições experimentais*

O inóculo foi preparado em frascos anaeróbios de 500 mL, dotados de filtro para liberação de  $\text{CO}_2$ , contendo 450 mL de volume de meio total, mantidos sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U–B. Braun Biotech), a 30°C, por aproximadamente 10 horas. Os ensaios fermentativos foram realizados em regime descontínuo, em biorreator de 7,0 litros com volume operacional de 5,5 litros, a 30°C, frequência de agitação de 450 rpm e controle automático de pH em 5,5 com NaOH 5M. Os meios foram preparados e esterilizados dentro da própria cuba do biorreator.

Ao término dos cultivos, o líquido fermentado foi centrifugado a 6000 rpm, por 20 minutos. As células concentradas foram permeabilizadas a partir da mistura de igual volume de suspensão celular concentrada e 0,2% (m/v) de brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB), sob agitação, por 10 minutos (REHR *et al.*, 1991). A permeabilização celular foi realizada com o intuito de inativar o metabolismo fermentativo da bactéria. A biomassa permeabilizada foi utilizada para a determinação da atividade de GFOR/GL enquanto parte do sobrenadante foi utilizado para a determinação de etanol.

#### *Metodologia analítica*

A determinação da concentração celular durante o cultivo foi estimada pela medida da absorbância de suspensões celulares, a 560nm, em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) e ao final do processo, após consumo total de glicose, diretamente por gravimetria, após a secagem das amostras em estufa a 90°C.

Uma alíquota de amostra de cultivo (aproximadamente 2 mL) foi coletada periodicamente, centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para a dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitro-salicílico – DNS (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de glicose.

A atividade conjunta de glicose-frutose oxidorreductase e glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) foi determinada a partir da incubação de determinado volume de suspensão de células permeabilizadas de *Z. mobilis*, correspondente à concentração de 4 g/L, em reator de 300 mL, contendo 100 mL de solução equimolar de glicose/frutose (0,7 mol/L). O sistema foi mantido a 39°C, sob

agitação magnética, e pH automaticamente controlado em 6,4 pela adição de solução de NaOH 1M, acoplado a um controlador automático de pH (Consort modelo R735, Bélgica) (MALVESSI *et al.*, 2006). Uma unidade de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol de ácido glucônico por hora, nas condições de teste, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas (U/g).

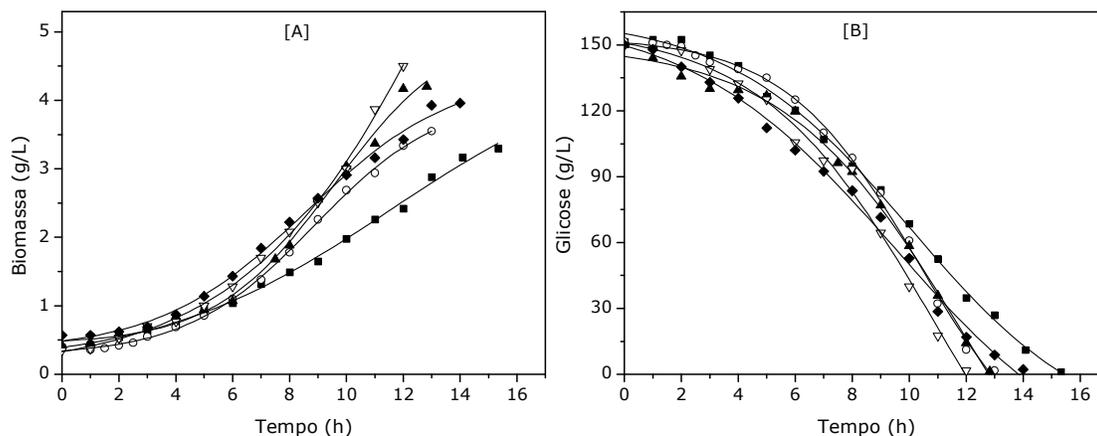
Para a dosagem de etanol, o sobrenadante obtido ao final do cultivo foi previamente destilado, sendo, em seguida, determinada a densidade e o teor de etanol (% v/v) das soluções alcoólicas em equipamentos acoplados Densimat e Alcomat (Gibertini, Itália).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do meio de cultura é fator determinante no crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol por *Z. mobilis*, requerendo para isso, a presença de fonte de carbono, vitaminas e nitrogênio orgânico. Nesse trabalho, foi avaliada a influência de diferentes concentrações de extrato de levedura bruto (ELB) - 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 12,5 g/L - como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico – no cultivo de *Z. mobilis* em regime descontínuo.

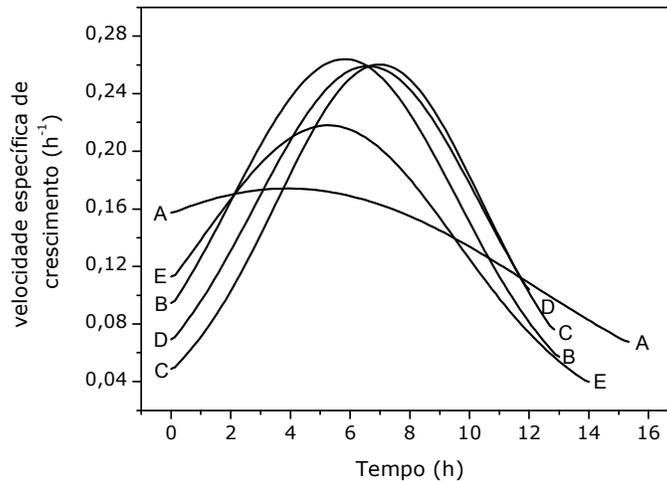
Na Figura 1, são mostrados os perfis cinéticos do crescimento celular e da concentração de açúcares redutores nestes cultivos. Pode-se observar o progressivo incremento da concentração final de biomassa de 3,3 para 4,5 g/L com o aumento da concentração de ELB de 2,5 para 10,0 g/L, respectivamente. Entretanto, com 12,5 g/L de ELB, uma concentração de 4,0 g/L de biomassa celular foi alcançada, sugerindo a possibilidade de inibição do crescimento em

função da concentração de ELB utilizada no processo (Figura 1A). Com relação à concentração de açúcares redutores, independentemente da concentração de ELB testada, valores residuais insignificantes foram observados ao final do processo, cerca de 1,0 g/L, tratando-se, provavelmente, de substâncias redutoras não metabolizáveis por *Z. mobilis* (Figura 1B). O tempo de processo, correspondente ao período de total consumo de substrato, variou de 12 horas, no ensaio com 10,0 g/L de ELB, a 15 horas, com ELB de 2,5 g/L, sendo observado, no último caso, a limitação da fonte de nutrientes, que levou à redução da velocidade global do processo já nas suas horas iniciais, prolongando o tempo de fermentação.



**Figura 1.** Biomassa celular [A] e glicose [B] em função do tempo de cultivo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo, em meio com diferentes concentrações de extrato de levedura bruto (■) 2,5; (○) 5,0; (▲) 7,5; (▽) 10,0; (◆) 12,5 g/L.

A Figura 2 ilustra a variação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) com o tempo de processo nos diferentes ensaios.



**Figura 2.** Velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) em função do tempo de cultivo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo, em meio com diferentes concentrações de extrato de levedura bruto (A) 2,5; (B) 5,0; (C) 7,5; (D) 10,0; (E) 12,5 g/L.

Como observado na Figura 2, entre os resultados de máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{x,m}$ ), o valor mais baixo foi obtido para o cultivo que foi conduzido com 2,5 g/L de ELB ( $\mu_{x,m} = 0,17 \text{ h}^{-1}$ ), por volta de 4 horas de processo, indicando a ocorrência de limitação da fonte de nitrogênio orgânico e vitaminas já na fase exponencial de crescimento. Por outro lado, com as concentrações de 5,0, 7,5 e 10,0 g/L de extrato, valores semelhantes de  $\mu_{x,m}$  (0,25 a  $0,27 \text{ h}^{-1}$ ) foram calculados, porém em tempos de processo ligeiramente diferentes. No cultivo conduzido com 12,5 g/L de ELB, possivelmente devido à inibição provocada pelo excesso de concentração de alguma substância presente no ELB, valor de  $\mu_{x,m}$  de  $0,21 \text{ h}^{-1}$  foi obtido.

SILVEIRA *et al.* (2001) relatam a obtenção de concentração celular de 5,0 g/L e  $\mu_{x,m}$  de  $0,33 \text{ h}^{-1}$ , em cultivo de *Z. mobilis* com milho-cina (25 g/L), sendo

também observados resultados semelhantes com o emprego de extrato de levedura purificado comercial no meio de cultivo (5,0 g/L e 0,35 h<sup>-1</sup>).

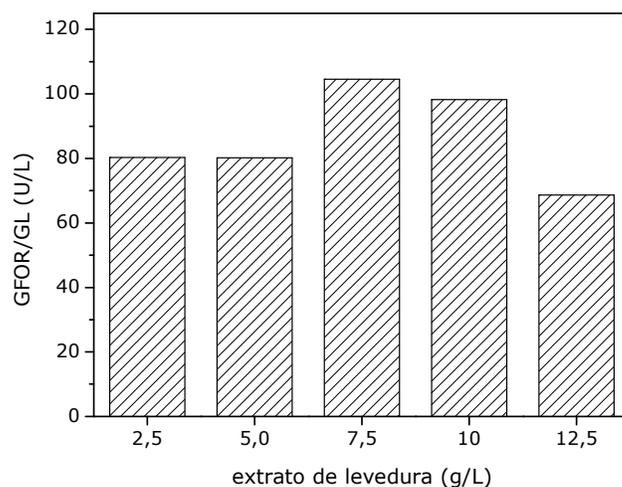
O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado para as diferentes condições experimentais testadas. Nos cultivos contendo 2,5 e 5,0 g/L de ELB, foi obtido 0,018 g de biomassa seca / g de glicose consumida e cerca de 0,030 g/g nos ensaios com de 7,5, 10,0 e 12,5 g/L de ELB. Estes resultados, mais uma vez, podem ser explicados pela carência nutricional nas duas concentrações mais baixas de ELB avaliadas. Estes dados são semelhantes aos obtidos por SILVEIRA *et al.* (2001), porém com o uso de 25 ou 40 g/L de milhocina. Os autores relatam a obtenção de concentração celular de *Z. mobilis* aproximada de 5,0 g/L, conversão de substratos em células de 0,031 g/g e rendimento em etanol de 93%, salientando que estes valores foram comparáveis aos obtidos com a utilização de 5 g/L de extrato de levedura purificado comercial.

Os valores de fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foram semelhantes em todas as condições testadas (0,43 g de etanol / g de glicose consumida). Este resultado já era esperado, visto que *Z. mobilis* utiliza a produção de etanol como, praticamente, a única rota bioquímica de formação de energia. Em decorrência, os rendimentos médios calculados em relação ao máximo teórico, também foram semelhantes (cerca de 85%). A produtividade em etanol foi de aproximadamente 4,4 g/L/h nos cultivos conduzidos com 2,5 e 12,5 g/L de ELB, enquanto resultados superiores foram atingidos para 5,0 e 7,5 g/L de ELB (4,8 g/L/h) e 10,0 g/L de ELB (5,5 g/L/h).

A atividade enzimática específica foi determinada nos diferentes ensaios com extrato de levedura bruto com o intuito de avaliar a influência deste

componente do meio sobre a formação do complexo GFOR/GL. Valores próximos, entre 22 e 24 U/g, foram medidas com ELB entre 2,5 e 10,0 g/L, havendo uma redução para 18 U/g em meio com 12,5 g/L da fonte nutricional. Com relação à formação do complexo enzimático GFOR/GL, atividade específica de 13 U/g foi obtida no cultivo de *Z. mobilis* em meio contendo 5 g/L de extrato de levedura ou ainda com 25 g/L de milhocina (SILVEIRA *et al.*, 2001).

Na Figura 3 estão representados os dados de atividade enzimática obtida com células/enzimas provenientes dos diferentes cultivos com ELB, ressaltando-se que este parâmetro é determinado pelo produto da atividade específica das enzimas GFOR/GL pela concentração celular final.



**Figura 3.** Atividade de GFOR/GL, em unidades enzimáticas por volume de meio (U/L), presente em células livres de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em função das diferentes concentrações de extrato de levedura bruto utilizadas no meio de cultivo (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 12,5 g/L).

Atividades superiores de GFOR/GL, em unidades enzimáticas por volume de meio, aproximadas de 100 U/L, foram atingidas nos cultivos com 7,5 e 10,0 g/L de ELB, enquanto valores mais baixos, cerca de 80 U/L, foram obtidos com 2,5 e 5,0 g/L de ELB, sendo estes títulos enzimáticos decorrentes, fundamentalmente, das concentrações celulares alcançadas em cada condição. Com a utilização de 12,5 g/L de ELB, além de ter sido desfavorecido o crescimento microbiano, também foi observado um efeito negativo sobre a atividade enzimática, sendo obtida cerca de 70 U/L.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados do presente trabalho confirmam que o extrato de levedura bruto Prodex Lac<sup>®</sup> pode ser usado como fonte alternativa ao extrato de levedura purificado comercial como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico para a produção de biomassa, etanol e do complexo enzimático GFOR/GL de *Zymomonas mobilis*.

Em 7,5 e 10,0 g/L de extrato de levedura bruto obteve-se produtividades em etanol de 4,8 g/L/h e 5,5 g/L/h, respectivamente, e títulos enzimáticos de GFOR/GL por volta de 100 U/L. Estes dados indicam a viabilidade deste bioprocessamento em escala industrial.

## REFERÊNCIAS

FEIN, J. E., CHARLEY, R. C., HOPKINS, K. A., LAVERS, B. & LAWFORD, H. G. Development of a simple medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 5:16, 1983.

KAWAGUTI, H. Y., BUZZATO, M., SATO, H. H. Isomaltulose production using free cells: optimization of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34:4:261-269, 2007.

LAWFORD, H. G & ROUSSEAU, J. D. Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas mobilis* ethanol fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63/65:287-304, 1997.

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.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428, 1959.

REHR, B., WILHELM, C. & SAHM, H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35:144-148, 1991.

ROGERS, P. L., LEE, K., SKOTNICKI, M. E. & TRIBE, D. E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemistry Engineering*, 23:37-84, 1982.

SILVEIRA, M. M., WISBECK, E., HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:442-445, 2001.

SWINGS, J. & DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, 41, 1-46, 1977.

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.

## 5.2 RESULTADOS II

**Produção de glicose-frutose oxidorreductase / glucono- $\delta$ -lactonase e etanol por *Zymomonas mobilis* cultivada em regimes descontinuo e descontinuo alimentado**

## **Produção de glicose-frutose oxidoredutase / glucono- $\delta$ -lactonase e etanol por *Zymomonas mobilis* cultivada em regimes descontínuo e descontínuo alimentado**

### **RESUMO**

Neste trabalho, a formação simultânea do complexo enzimático glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) / glucono- $\delta$ -lactonase (GL) e de etanol por *Zymomonas mobilis* foi avaliada em regime descontínuo (RD), em meio com concentração inicial de glicose ( $S_0$ ) de 150 e 200 g/L, e em regime descontínuo alimentado (RDA), com concentração de substrato equivalente a  $S_0 = 200$  g/L em descontínuo. Em RD com  $S_0 = 200$  g/L, não foi observado qualquer desenvolvimento do cultivo após 12 horas de incubação devido à inibição provocada pela alta concentração de substrato. Em RD com  $S_0$  de 150 g/L e em RDA, concentrações celulares finais de cerca de 4,1 - 4,2 g/L foram obtidas. A aplicação de um pulso de nutrientes ao meio de produção durante o cultivo em RDA não resultou em aumento da concentração de biomassa, indicando que a limitação do crescimento não decorre da ausência de algum nutriente essencial, mas possivelmente da alta concentração de produto atingida (94 g/L) nesta condição. Rendimentos em etanol próximos a 95% foram calculados para os cultivos conduzidos em ambos os regimes de operação. Nas condições testadas, valores de atividade específica de GFOR/GL entre 25-27 unidades enzimáticas por grama de células secas foram alcançados. Os resultados mostram que, em RDA, é possível obter-se elevadas atividades de GFOR/GL e altas produtividades

em etanol, já que a inibição do crescimento microbiano pelo substrato é significativamente amenizada.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*, glicose-frutose oxidorreductase/glucono- $\delta$ -lactonase, etanol, regime descontínuo, regime descontínuo alimentado.

## INTRODUÇÃO

*Zymomonas mobilis* tem sido objeto de muitos estudos, sendo considerada uma alternativa para a produção de etanol em larga escala, com algumas vantagens em relação ao uso de leveduras, comumente usadas neste processo. Esta bactéria utiliza como fonte de carbono glicose, frutose e sacarose, apresentando tolerância a altas concentrações de açúcares e etanol (VIKARI, 1988, SPRENGER, 1996).

Na fermentação alcoólica com *Z. mobilis*, normalmente é utilizada glicose como substrato. Glicose atua, também, como indutor da formação do complexo enzimático periplasmático composto por glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL), sendo que atividades mais altas são obtidas quando maiores concentrações de substrato estão presentes no meio de cultivo (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

As enzimas GFOR e GL, presentes em células de *Z. mobilis*, apresentam grande potencial de utilização industrial, visto que catalisam a bioconversão de quantidades equimolares de frutose e glicose em sorbitol e ácido glucônico (ZACHARIOU & SCOPES, 1986), produtos que têm várias aplicações nas áreas

de alimentos e farmacêutica, entre outras (HUSTEDE *et al.*, 2003, SILVEIRA & JONAS, 2002; JONAS & SILVEIRA, 2004). O processo de produção de sorbitol e ácido glucônico, utilizando GFOR/GL de *Z. mobilis*, inclui, em sua maioria, as seguintes etapas: i) cultivo de *Z. mobilis* em glicose para obtenção das enzimas, ii) concentração da biomassa celular por centrifugação ou outro método, iii) uso de agentes permeabilizantes da parede celular para evitar o metabolismo fermentativo da bactéria, iv) imobilização da biomassa em diferentes suportes como forma de permitir o reaproveitamento das enzimas em sucessivas bioconversões e v) bioconversão de substratos em produtos (CHUN & ROGERS, 1988, REHR *et al.*, 1992). Alternativamente, SILVEIRA *et al.* (1999) propuseram um processo com células de *Z. mobilis* não permeabilizadas e não imobilizadas em que, segundo os autores, o custo da etapa de produção de GFOR/GL poderia ser compensado pelo etanol produzido simultaneamente durante o cultivo.

ERZINGER (1996) e WISBECK *et al.* (1997) relatam rendimentos em etanol superiores a 90% em trabalhos com diferentes linhagens desta bactéria. Estes autores descrevem, entretanto, que altas concentrações iniciais de glicose, em processo em batelada, levam a significativa redução da produtividade devido à inibição pela concentração de substrato. ERZINGER *et al.* (2003), em estudos visando à produção do complexo enzimático GFOR/GL e de etanol por *Z. mobilis*, em regimes descontínuo e descontínuo alimentado, mostraram que a condução do processo em regime descontínuo alimentado é uma estratégia interessante a ser usada quando altas concentrações de glicose são necessárias no cultivo desta bactéria.

Visto que para a obtenção de altas atividades do complexo GFOR/GL e de também altas concentrações de etanol é necessário o uso de concentrações de glicose em níveis inibidores para a atividade metabólica de *Z. mobilis*, o presente trabalho teve como objetivo estudar a condução do processo em regime descontínuo e descontínuo alimentado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Microrganismo*

O microrganismo utilizado em todos os ensaios foi *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. As culturas foram repicadas mensalmente em meio líquido, incubadas a 30°C e, posteriormente, estocadas a 4°C.

### *Meios de cultivo*

O meio de cultivo usado nos experimentos foi descrito por MALVESSI *et al.* (2006), contendo em g/L:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,5; extrato de levedura Prodex Lac® (Prodesa S.A, Brasil) 7,5. Dependendo da aplicação, diferentes concentrações de glicose foram adicionadas ao meio: conservação, 20 g/L; inóculo, 100 g/L; cultivos em regime descontínuo (RD), 150 ou 200 g/L; cultivos em regime descontínuo alimentado (RDA), massa equivalente a 200 g/L. No preparo dos inóculos, foram adicionados ao meio 5 g/L de  $\text{CaCO}_3$  para o controle do pH próximo de 5,5. As esterilizações dos meios e das soluções de glicose foram feitas separadamente, em autoclave, a 1 atm por 15 minutos.

### *Condições experimentais*

Os ensaios foram realizados em biorreator de 7,0 litros, contendo 5,5 litros de meio de cultivo. O processo fermentativo foi conduzido a 30°C, frequência de agitadores de 450 rpm e controle automático do pH em 5,5 com solução de NaOH 5M. O inóculo foi previamente preparado em frasco anaeróbio de 500 mL, dotado de filtro para liberação de CO<sub>2</sub>, contendo 450 mL de volume de meio total, mantido sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U, B. Braun Biotech), a 30°C, por aproximadamente, 10 horas.

Nos cultivos em regime descontínuo alimentado, foi utilizado um volume inicial de 4,9L do meio de cultivo, contendo 150 g/L de glicose. Quando cerca de 50% da concentração inicial de glicose foi consumida pela população microbiana, foi feita a adição de 0,6 L de solução de glicose 610 g/L (RDA1). Alternativamente, a solução de glicose foi suplementada com nutrientes do meio de cultivo, em concentração proporcional ao substrato adicionado inicialmente ao reator (RDA2).

Ao término dos cultivos, o meio fermentado foi centrifugado a 6000 rpm, por 20 minutos (Centrífuga Sigma 4K-15). As células concentradas foram permeabilizadas a partir da mistura de igual volume de suspensão celular concentrada e 0,2% (m/v) de brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB), sob agitação, por 10 minutos (REHR *et al.*, 1991). A permeabilização das células foi feita com o intuito de inativar o metabolismo fermentativo da bactéria. A biomassa permeabilizada foi utilizada para a determinação da atividade de GFOR/GL enquanto parte do sobrenadante foi utilizado para a determinação de etanol.

### *Métodos analíticos*

A concentração celular foi determinada durante o cultivo pela medida da absorbância de suspensões celulares a 560nm em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) e ao final do processo, diretamente por gravimetria, após a secagem das amostras em estufa a 90°C.

Para a determinação da concentração de açúcares redutores, uma alíquota de amostra de cultivo (aproximadamente 2 mL) foi coletada periodicamente, centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado na dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-di-nitro-salicílico – DNS (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de glicose.

A atividade enzimática do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* foi determinada a partir da incubação de um determinado volume de suspensão de células permeabilizadas de *Z. mobilis*, correspondente à concentração de 4 g/L, em reator de 300 mL contendo 100 mL de solução 0,7 mol/L de frutose/glicose. O sistema foi mantido a 39°C, sob agitação magnética, com o pH sendo automaticamente controlado em 6,4 pela adição de solução de NaOH 1M, utilizando-se um controlador de pH (Consort, modelo R735, Bélgica) (MALVESSI *et al.*, 2006). Uma unidade de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol de ácido glucônico por hora, nas condições do teste, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas (U/g).

A atividade de GFOR/GL, em unidades enzimáticas por volume de meio (U/L), determinada ao final do processo, foi obtida pela multiplicação da atividade específica de GFOR/GL (U/g) pela concentração celular final (g/L).

Para a determinação da concentração final de etanol, o caldo sobrenadante obtido ao final do cultivo foi destilado, sendo, em seguida, determinada a densidade e o teor de etanol (% v/v) das soluções alcoólicas, utilizando os equipamentos acoplados Densimat e Alcomat (Gibertini, Itália).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados gerais dos ensaios realizados em regime descontínuo (RD) e em regime descontínuo alimentado (RDA1 e RDA2) são resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resultados gerais dos cultivos de *Zymomonas mobilis* em regime descontínuo (RD), com concentração inicial de glicose de 150 g/L, e em regime descontínuo alimentado, com concentração de glicose equivalente a 200 g/L (RDA1, alimentação com solução 610 g/L de glicose; RDA2, alimentação com solução 610 g/L de glicose suplementada com nutrientes do meio de cultivo).

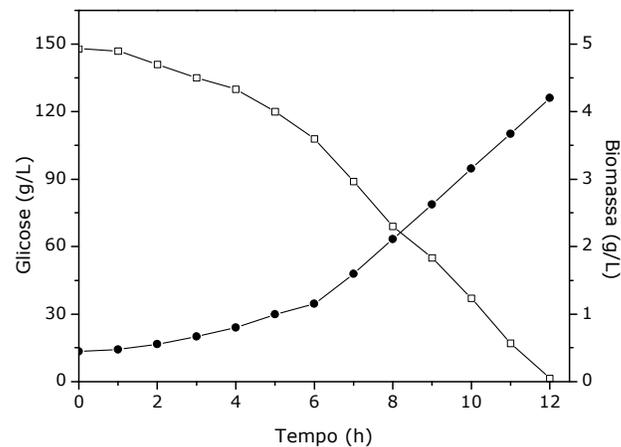
Parâmetros	Regimes de operação		
	RD	RDA1	RDA2
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,030	0,020	0,019
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,42	0,44	0,44
$\mu_{x,m}$ ( $h^{-1}$ )	0,23	0,21	0,22
Etanol final (g/L)	70	94	94
Produtividade em etanol (g/h)	30	32	31
GFOR/GL específica (U/g)	25	26	27
GFOR/GL total (U/L)	105	109	111

$Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em etanol;  $\mu_{x,m}$  - máxima velocidade específica de crescimento

A ausência de dados sobre o cultivo RD com  $S_0 = 200$  g/L se justifica pelo fato de não ter sido observada qualquer atividade microbiana, até 12 horas após a inoculação, evidenciando a ocorrência de forte inibição pelo substrato. O aumento do período de fase *lag* e a diminuição do rendimento em etanol com utilização de concentrações de glicose acima de 200 g/L foi relatado por SIVA-KESAVA *et al.* (1995) e ERZINGER *et al.* (2003).

Na Figura 1, são apresentados os perfis de variação das concentrações de células e glicose com o tempo para o ensaio em RD. No cultivo em RD com  $S_0 = 150$  g/L, concentração de substrato que causa efeito inibidor moderado sobre o crescimento de *Z. mobilis* (ERZINGER, 1996), o tempo de processo foi de cerca de 12 horas (Figura 1).

N  
a  
se  
qü  
ên  
cia



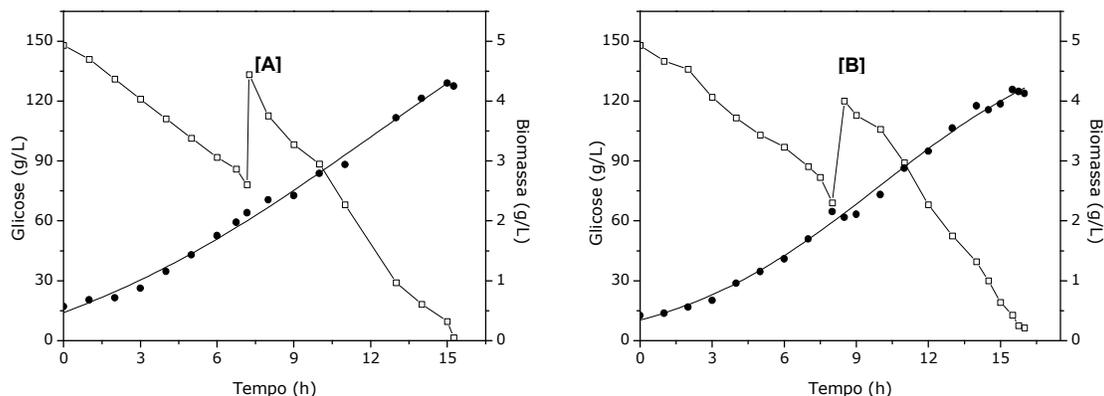
**Figura 1.** Biomassa celular (●) e glicose (□) em função do tempo de cultivo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo,  $S_0 = 150$  g/L glicose, a 30°C, pH 5,5.

nsi

derando o efeito positivo de concentrações mais altas de substrato na indução de

GFOR, de acordo com ZACHARIOU & SCOPES (1986) e, por outro lado, a sensibilidade osmótica de *Z. mobilis*, que prejudica a velocidade do processo, a condução do processo em regime descontínuo alimentado foi avaliada. No Ensaio RDA1, a alimentação de glicose foi feita entre 7 e 7,5 horas de processo, enquanto no Ensaio RDA2, a alimentação de glicose e nutrientes foi feita após 8,5 horas de cultivo. Nestes ensaios, o processo foi concluído entre 15 e 16 horas.

Na Figura 2 são mostrados os perfis cinéticos para as mesmas variáveis nos ensaios em regime descontínuo alimentado (RDA1 e RDA2).



**Figura 2.** Biomassa celular (●) e glicose (□) em função do tempo, em cultivos de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em regime descontínuo alimentado, a 30°C, pH 5,5. [A] RDA; [B] RDA2.

Nos ensaios em regime descontínuo alimentado, a concentração celular final foi semelhante à alcançada em regime descontínuo, cerca de 4,2 g/L (Figuras 1 e 2). Como em RDA2 foi feita a adição de nutrientes ao meio de produção durante o cultivo, com o fim de observar alguma eventual limitação nutricional, estes resultados se explicam pela inibição pelo etanol que, em RDA1

e RDA2 atingiu concentrações superiores (94 g/L) em relação à alcançada em RD (70 g/L) (Tabela 1).

Com relação ao fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ), tendo em vista as concentrações celulares finais e a massa de glicose envolvida, o valor mais alto foi obtido em regime descontínuo e valores inferiores foram encontrados para os ensaios em descontínuo alimentado (Tabela 1),

Como as máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu_{X,m}$ ), são estimadas nas fases exponenciais de cultivo, antes do início da alimentação, não foram observadas, como esperado, diferenças entre os cultivos em RD e RDA para este parâmetro (Tabela 1), já que nos três ensaios a concentração inicial de glicose foi a mesma (150 g/L).

Os dados obtidos para a conversão de glicose em etanol ( $Y_{P/S}$ ) e para o rendimento em etanol, calculado em relação ao fator estequiométrico teórico (0,511 g etanol / g glicose), foram muito próximos nas três fermentações, cerca de 95%, o que se explica pelo fato de *Z. mobilis* ser uma bactéria anaeróbia que tem na formação de etanol sua única via de produção de energia (Tabela 1). Levando-se em conta a concentração final de etanol e o tempo de processo em cada um dos ensaios, obtiveram-se produtividades em etanol semelhantes em RD e em RDA (Tabela 1), demonstrando que as condições operacionais escolhidas permitiram que fossem atingidas altas concentrações do produto em RDA, evitando-se, ao mesmo tempo, o efeito inibidor provocado por uma concentração excessiva de glicose.

A atividade específica do complexo GFOR/GL, medida em células livres de *Z. mobilis*, foi semelhante nos três ensaios (Tabela 1), possivelmente em função

da mesma concentração inicial de substrato utilizada, pois, como descrito por ZACHARIOU & SCOPES (1986), a indução de GFOR é dependente da concentração de glicose à qual *Z. mobilis* é submetida. Com isso, tendo em vista as concentrações celulares muito próximas obtidas em RD e RDA, as atividades totais em GFOR/GL também foram muito próximas.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados deste trabalho confirmam que a inibição do crescimento de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 por glicose pode ser evitada com a condução do processo em regime descontínuo alimentado, permitindo, assim, a obtenção de elevados rendimentos em etanol - próximos a 95% - e atividades do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* superiores a 25 U/g.

Como decorrência dos resultados deste trabalho, pode ser proposto um estudo sobre o processo de bioconversão de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, utilizando células de *Z. mobilis*, previamente cultivadas, e contendo títulos significativos de GFOR/GL, em que a etapa de produção destas enzimas seja viabilizada economicamente pelo etanol simultaneamente produzido.

## **REFERÊNCIAS**

CHUN, U. H. & ROGERS, P. L. The simultaneous production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29: 19-24, 1988.

ERZINGER, G. S. Influência da concentração de glicose e etanol sobre a atividade de glicose-frutose oxidorreductase em *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. *Dissertação de Mestrado*, Escola Politécnica, USP, Brasil, 1996.

ERZINGER, G. S., SILVEIRA, M. M., COSTA, J. P. C. L., VITOLO, M. & JONAS, R. Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:329-333, 2003.

HUSTEDE, H.; HABERSTROH, H.J.; SCHINZIC, E. Gluconic acid. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, 15:211-216, 2003.

JONAS, R. & SILVEIRA, M. M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 118:321-335, 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.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428, 1959.

REHR, B., WILHELM, C. & SAHM, H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 35:144-148, 1991.

SILVEIRA M. M., WISBECK, E., LEMMEL, C., ERZINGER, G. S., LOPES DA COSTA, J. P., BERTASSO, M. & JONAS, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, 75:99-103, 1999.

SILVEIRA, M. M. & JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:40-408, 2002.

SIVA KESAVA, S., RAKSHIT, S. K. & PANDA, T. Production of ethanol by *Zymomonas mobilis*: the effect of batch step-feeding of glucose and relevant growth factors. *Process Biochemistry*, 30:41-47, 1995.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some routes. *FEMS Microbiology Letters*, 145:301-307, 1996.

VIIKARI, L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 7:237-261, 1988.

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.

WISBECK, E., SILVEIRA, M. M., NINOW, J. & JONAS, R. Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. *Journal of Basic Microbiology*, 37:445-449, 1997.

### **5.3 RESULTADOS III**

**Produção biotecnológica de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis***

## **Produção biotecnológica de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis***

### **RESUMO**

Glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL), enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*, além de catalisarem a bioconversão de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, podem ser utilizadas na produção de outros ácidos orgânicos pela oxidação de diferentes aldoses. Neste trabalho, o uso de glicose foi comparado com o de aldoses alternativas – maltose, galactose e lactose – em combinação com frutose. Afinidades decrescentes do complexo enzimático foram observadas com misturas de frutose com glicose, maltose, galactose e lactose. A ação enzimática foi avaliada, particularmente, para os pares glicose/frutose e lactose/frutose, com relação à concentração de substratos (0,1-1,5mol/L), pH (5,2-7,2) e temperatura (37-54°C). Atividades superiores foram alcançadas a 45°C e pH 6,4, com substratos na faixa 0,7-1,0 mol/L, para ambos pares de substratos. Porém, maior estabilidade do complexo enzimático foi verificada a 39°C. Rendimentos de bioconversão de 95 e 85 % foram obtidos para os ácidos glucônico e lactobiônico, respectivamente. A máxima velocidade específica de formação de produto, medida nas primeiras horas de processo, foi de 17 mmol/g/h para o ácido glucônico e de 3,9 mmol/g/h para o ácido lactobiônico, enquanto as produtividades específicas foram determinadas em 1,07 e 0,95 mmol/g/h, respectivamente para os dois produtos, resultados coerentes com a menor

afinidade entre GFOR/GL e lactose. Os resultados indicam que o ácido lactobiônico, produto de alto valor agregado, pode vir a ser produzido por este processo.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*, glicose-frutose oxidorreductase, glucono- $\delta$ -lactonase, carboidratos, bioconversão, ácidos orgânicos.

## INTRODUÇÃO

*Zymomonas mobilis* tem sido estudada nos últimos anos em função da descrição do processo biotecnológico de obtenção de ácido glucônico e sorbitol, a partir de glicose e frutose, respectivamente, pela ação do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR; EC 1.1.1.99) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL; EC 3.1.1.17), enzimas presentes no periplasma da bactéria anaeróbia Gram-negativa *Z. mobilis* (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

A partir deste sistema enzimático, observou-se um grande interesse na obtenção de sorbitol por este processo (CHUN & ROGERS, 1988; REHR *et al.*, 1991) substância que tem muitas aplicações principalmente nas indústrias farmacêutica e de alimentos (VOGEL, 2003; JONAS & SILVEIRA, 2004). Entretanto, tendo em vista que, neste processo, a formação de sorbitol e de ácido glucônico se dá em base equimolar, a transferência desta tecnologia para o setor produtivo é dificultada pela incompatibilidade da demanda comercial do sorbitol e do ácido glucônico, significativamente menor para o segundo produto.

Além de glicose, foi mostrado por SATORY *et al.* (1997) que as enzimas purificadas GFOR e GL de *Z. mobilis* têm a capacidade de converter outros carboidratos, associados à frutose, em seus respectivos ácidos orgânicos. Entre estes produtos, inclui-se o ácido lactobiônico, resultado da oxidação da lactose, que apresenta grande importância na área médica, como componente da solução U.W. (University of Wisconsin) para conservação de órgãos a serem transplantados (SUMIMOTO & KAMADA, 1990, SOUTHARD & BELZER, 1995) e na formulação de cosméticos específicos para o tratamento da pele (GRIMES *et al.*, 2004, YU & VAN SCOTT, 2004). A partir da obtenção de outros ácidos orgânicos e seus sais, além do ácido glucônico, seria possível compor um conjunto de produtos que proporcionariam um balanço de produção compatível com a demanda comercial do sorbitol.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação enzimática do complexo GFOR/GL na presença de frutose e diferentes aldoses alternativas à glicose (maltose, galactose e lactose) com respeito aos efeitos do pH, da temperatura e da concentração de substratos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Microorganismo e condições de cultivo*

O microrganismo utilizado em todos os ensaios foi *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, cultivada em meio líquido, descrito por MALVESSI *et al.* (2006), contendo 150 g/L de glicose como fonte de carbono e 7,5 g/L de extrato de levedura (Prodex Lac® (Prodesa S.A, SP, Brasil), a 30°C. A produção de biomassa de *Z. mobilis* foi realizada em regime descontínuo, em biorreator de 7,0

litros contendo 5,5 litros de meio de cultivo, a 30°C, 450 rpm e pH controlado em 5,5 com NaOH 5M.

#### *Preparação das células permeabilizadas*

As células de *Z. mobilis* previamente cultivadas em glicose foram permeabilizadas com o intuito de evitar o metabolismo fermentativo. Igual volume de solução 0,2% (m/v) de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) foi adicionado à suspensão celular concentrada (REHR *et al.*, 1991). Após 10 minutos sob agitação magnética a 4°C, as células foram separadas por centrifugação e ressuspensas em água destilada. Esta suspensão de células permeabilizadas contendo as enzimas GFOR/GL foi, então, utilizada nos diferentes testes discutidos neste trabalho.

#### *Caracterização do complexo enzimático GFOR/GL em células de Zymomonas mobilis na presença de frutose e diferentes aldoses*

Para a avaliação da ação enzimática conjunta de GFOR/GL em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, foram testados diferentes valores de pH (5,2 a 7,2), temperatura (37 a 54°C) e, adicionalmente, a termoestabilidade do complexo enzimático GFOR/GL, previamente exposto às temperaturas de 39, 43 e 45°C por até 12 horas de reação.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten,  $K_M$  e  $V_{max}$ , a atividade enzimática de GFOR/GL em células de *Z. mobilis* foi determinada utilizando soluções com diferentes concentrações equimolares de

frutose/aldose, a 39°C e pH 6,4, condições descritas na literatura como ideais para a ação catalítica de GFOR purificada (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

#### *Bioconversão de frutose/aldoses em sorbitol e diferentes ácidos orgânicos*

Com o objetivo de avaliar a produção de sorbitol e diferentes ácidos orgânicos pelo complexo GFOR/GL em células de *Z. mobilis*, foram realizados ensaios de bioconversão com os pares frutose/aldose (glicose, maltose, galactose e lactose). Os ensaios foram realizados a 39°C, em reator de mistura completa contendo 240 mL de solução 0,7 mol/L de frutose/aldose e 25 g/L de células permeabilizadas, sendo o sistema mantido sob agitação magnética. O pH foi controlado em 6,4 pela adição automática de solução de NaOH 10M para os testes com glicose e 7M para as demais aldoses.

#### *Métodos analíticos*

A determinação da concentração celular durante o cultivo foi estimada pela medida da absorbância de suspensões celulares, a 560nm, em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) e ao final do processo, após consumo total de glicose, diretamente por gravimetria.

Uma alíquota de amostra de cultivo (aproximadamente 2 mL) foi coletada periodicamente, centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para a dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitro-salicílico – DNS (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de glicose.

A atividade enzimática de GFOR/GL foi determinada em soluções equimolares de frutose/aldose (0,7 mol/L), 4,0 g/L de células permeabilizadas, em

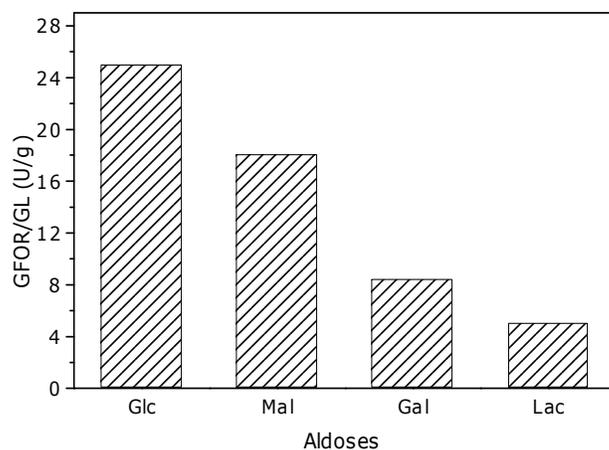
um reator contendo 100 mL de meio reacional. O sistema foi mantido sob agitação magnética, a 39°C e pH controlado em 6,4 pela adição automática de NaOH 1M (MALVESSI *et al.*, 2006). Uma unidade de GFOR/GL foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol de ácido orgânico por hora, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas (U/g).

As concentrações dos ácidos orgânicos foram calculadas de acordo com o volume e a concentração de base utilizada durante a reação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Atividade conjunta de glicose-frutose oxidoredutase/glucono- $\delta$ -lactonase, utilizando diferentes aldoses em substituição a glicose*

Inicialmente, realizaram-se testes com frutose e as diferentes aldoses (glicose, maltose, galactose e lactose), com o intuito de avaliar a atividade catalítica do complexo GFOR/GL frente aos diferentes substratos (Figura 1).



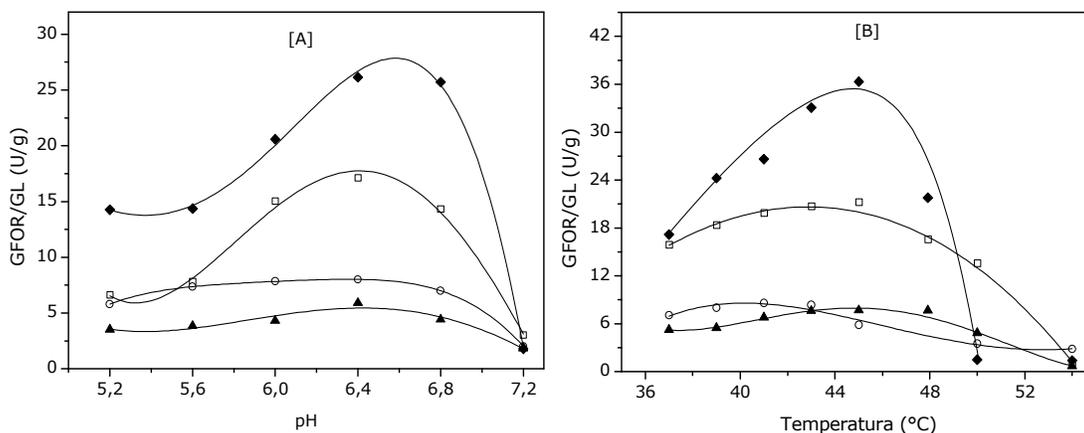
**Figura 1.** Atividade enzimática de GFOR/GL presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em solução equimolar de frutose e diferentes aldoses (0,7 mol/L), a 39°C e pH 6,4. (Glc, glicose; Mal, maltose; Gal, galactose; Lac, lactose).

Como observado na Figura 1, atividade superior foi obtida em mistura de frutose/glicose (25 U/g), comprovando a alta afinidade entre GFOR e este substrato, como descrito em ZACHARIOU & SCOPES (1986), seguida de maltose (18 U/g), galactose (8,5 U/g) e lactose (5,0 U/g).

*Atividade de glicose-frutose oxidoredutase/glucono- $\delta$ -lactonase em células de **Zymomonas mobilis** sob diferentes valores de pH, temperatura e concentração de substratos*

Nesta etapa, procurou-se determinar valores de pH (entre 5,2 a 7,2) e temperatura (entre 37 a 54°C), que proporcionassem a obtenção de maior atividade enzimática de GFOR/GL, em soluções contendo 0,7 mol/L de frutose/maltose, frutose/galactose ou frutose/lactose, sendo avaliados comparativamente à mistura de frutose/glicose.

A variação da atividade enzimática em função do pH e da temperatura, utilizando os diferentes substratos, é mostrada na Figura 2. Como pode ser observado na Figura 2A, para qualquer dos substratos avaliados, o valor de pH ideal para a atividade catalítica da enzima situou-se em torno de 6,4, tal como relatado por ZACHARIOU & SCOPES (1986) para GFOR purificada, tendo glicose/frutose como substratos. Atividades mais altas foram obtidas com o par glicose/frutose (26 U/g), comprovando a alta afinidade da enzima pelo substrato, seguindo-se misturas de frutose com maltose, galactose e lactose.

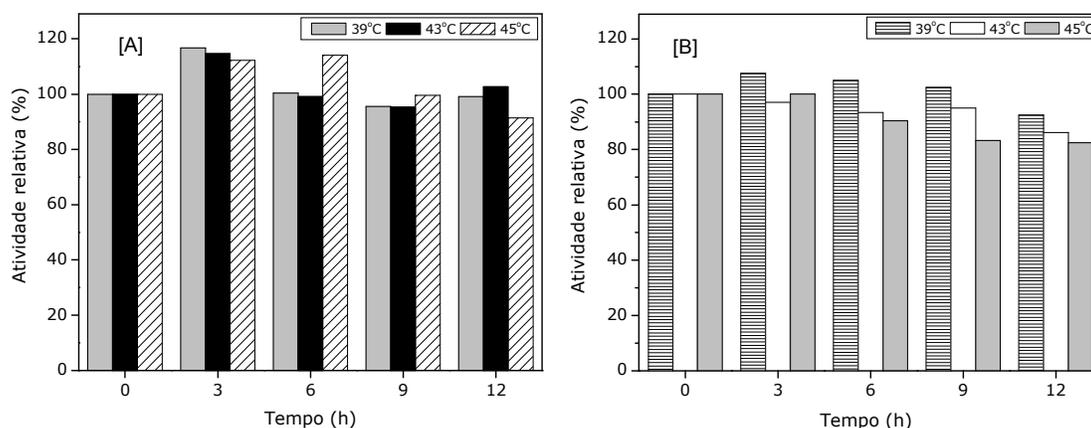


**Figura 2.** Atividade enzimática de GFOR/GL presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, com o pH [A], a 39°C, e com a temperatura [B], em pH 6,4, utilizando soluções equimolares (0,7 mol/L) de frutose/aldoses. (♦) glicose; (□) maltose; (○) galactose; (▲) lactose.

Com relação à temperatura, atividades enzimáticas superiores foram obtidas com glicose e maltose, a 45°C, atingindo 36 e 21 U/g, respectivamente (Figura 2B). Este valor é diferente do obtido por outros autores (ZACHARIOU & SCOPES, 1986; REHR *et al.*, 1991) que descrevem a temperatura de 39°C como ideal para a ação catalítica de GFOR/GL. Para a mistura frutose/galactose, foi observado um patamar nos valores de atividade entre 39-43°C, cerca de 8,0 U/g. Para lactose, a atividade manteve-se constante entre 43 e 47°C, em aproximadamente 7,5 U/g.

Para que se defina a temperatura ideal da ação catalítica do complexo GFOR/GL, a avaliação da resposta da atividade na forma descrita não é suficiente, sendo necessário, também, considerar a estabilidade enzimática frente à temperatura. Foram, então, realizadas avaliações periódicas da atividade do complexo GFOR/GL para os pares de substratos glicose/frutose e lactose/frutose.

Os testes enzimáticos foram realizados com a exposição da suspensão celular contendo as enzimas às temperaturas de 43 e 45°C, faixa que proporcionou a obtenção de títulos enzimáticos superiores (Figura 2B), e ainda a 39°C, como condição padrão. A análise de estabilidade térmica foi realizada por até 12 horas, apesar de o tempo de processo de bioprodução de ácido lactobiônico, particularmente, ser necessariamente mais longo, como será discutido posteriormente. Os resultados dos testes enzimáticos de estabilidade do complexo GFOR/GL frente à temperatura para as misturas glicose/frutose e lactose/frutose são mostrados na Figura 3.

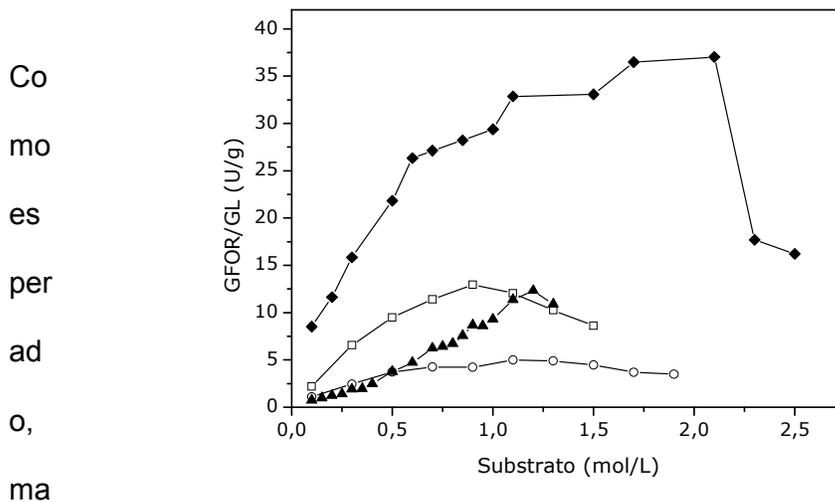


**Figura 3.** Atividade enzimática de GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC29191, medida para glicose/frutose [A] e lactose/frutose [B], em função do tempo de exposição às temperaturas de 39, 43 e 45°C.

Particularmente para a mistura glicose/frutose, pequena variação na atividade do complexo GFOR/GL foi observada em função das temperaturas testadas (Figura 3A). Com lactose, a queda gradual na atividade com o tempo de exposição foi observada a 45°C, entretanto, mostrando atividade residual de 85 %

em 12 horas (Figura 3B). Nas condições testadas, a temperatura de 39°C seria a mais recomendável, pois proporcionou maior estabilidade durante o período de exposição das enzimas, sendo também relatada como ideal para a ação catalítica do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* (ZACHARIOU & SCOPES, 1986; REHR *et al.*, 1991). Utilizando as misturas maltose/frutose e galactose/frutose, pequena variação da atividade enzimática do complexo GFOR/GL foi observada durante o período de avaliação (dados não apresentados).

Com os valores de pH e de temperatura estabelecidos, foi avaliado o efeito da concentração dos diferentes pares de aldoses/frutose (de 0,05 a 1,5 mol/L) sobre a ação catalítica do complexo GFOR/GL (Figura 4).



**Figura 4.** Atividade enzimática de GFOR/GL, presente em células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em função da concentração de substratos, a 39°C e pH 6,4. (◆) glicose/frutose; (□) maltose/frutose; (○) galactose/frutose; (▲) lactose/frutose

ade foi alcançada com glicose, em razão da afinidade entre GFOR e este substrato, seguida de maltose, lactose e galactose. A partir dos dados de

atividade enzimática obtidos nas reações com concentrações equimolares de glicose/frutose, maltose/frutose e galactose/frutose, os parâmetros cinéticos aparentes  $K_M$  e  $V_{max}$  da equação de Michaelis-Menten da cinética enzimática foram estimados graficamente pelo método de Lineweaver-Burk.

Na Tabela 1 são demonstrados os parâmetros cinéticos aparentes obtidos para GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* com diferentes pares de substratos. Os resultados confirmam que a glicose é o substrato preferencial para GFOR/GL tendo em vista o mais baixo valor de  $K_M$ . Embora valor semelhante de  $K_M$  tenha sido estimado também para a galactose, o valor de  $V_{max}$ , cerca de sete vezes inferior ao obtido com glicose, confirma a maior afinidade enzimática por este carboidrato.

**Tabela 1.** Valores de parâmetros cinéticos aparentes  $K_M$  e  $V_{max}$  obtidos para o complexo enzimático glicose-frutose oxidoredutase/glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) de *Zymomonas mobilis* com diferentes pares de substratos.

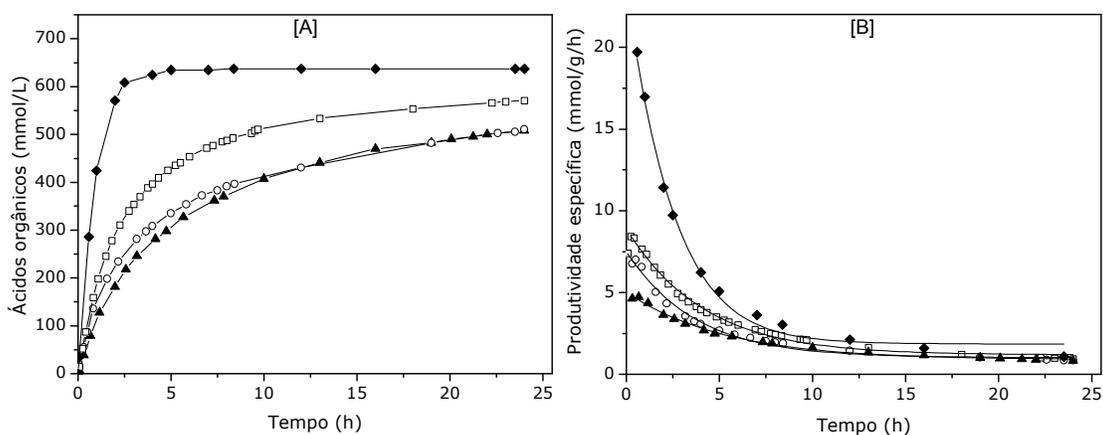
Substratos	$K_M$ (mol/L)	$V_{max}$ (U/g)
Glicose/frutose	0,68	52
Maltose/frutose	2,0	47
Galactose/frutose	0,6	7,6

Cabe salientar que os resultados obtidos no teste enzimático para a mistura de substratos lactose/frutose não se ajustaram ao modelo, não sendo

possível, portanto, nas condições avaliadas, a estimativa dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{max}$ .

### Ensaio de bioconversão com células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*

Estes ensaios tiveram como objetivo a avaliação do comportamento do processo de bioconversão com células permeabilizadas de *Z. mobilis* em soluções com concentrações equimolares (0,7 mol/L) de glicose/frutose em comparação com as misturas de frutose com maltose, galactose ou lactose, a 39°C e pH 6,4 (Figura 5).



**Figura 5.** Formação de ácidos orgânicos [A] e produtividade específica [B] em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em solução 0,7 mol/L de frutose/aldoses (glicose, maltose, galactose e lactose), a 39°C e pH 6,4. (◆) ácido glucônico; (□) ácido maltobiônico; (○) ácido galactônico; (▲) ácido lactobiônico.

Como mostrado na Figura 5A, com o par frutose/glicose foi atingida a mais alta concentração final do respectivo ácido orgânico (640 mmol/L), com menor conversão dos demais substratos em ácido maltobiônico (570 mmol/L),

galactônico (510 mmol/L) e lactobiônico (510 mmol/L). Na Figura 5B observa-se que valores decrescentes de produtividade específica foram obtidos à medida que aldoses com menores afinidades a GFOR foram utilizadas. Como em geral acontece em reações enzimáticas, a velocidade de conversão é significativamente reduzida quando concentrações muito baixas dos substratos encontram-se presentes no meio. Neste sistema enzimático, em razão da baixa afinidade pelos substratos e do alto valor da constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) - por exemplo, usando a mistura lactose/frutose - tem-se que as velocidades máximas práticas são atingidas com concentrações de frutose e lactose da ordem de 0,7 mol/L de cada açúcar. Com isso, ao longo do processo de produção, à medida que as concentrações de substratos decrescem, a velocidade global e, em decorrência, a produtividade, é fortemente afetada.

A concentração molar máxima, a velocidade específica de formação dos produtos, a produtividade específica e a conversão obtida nos diferentes ensaios são resumidos na Tabela 2. Entre as aldoses testadas, resultados superiores de concentração de produto, máxima velocidade específica de formação de ácido glucônico, produtividade específica e conseqüentemente, maior conversão, foram atingidos na bioconversão de glicose/frutose, comprovando a maior afinidade do complexo enzimático por glicose.

Resultados relevantes também foram alcançados nos ensaios de bioprodução de ácido maltobiônico e ácido galactônico, a partir de maltose e galactose, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados gerais da bioconversão com frutose/aldoses (glicose, maltose, galactose e lactose) visando a obtenção dos respectivos ácidos orgânicos, pela ação do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase / glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) de *Zymomonas mobilis*, a 39°C e pH 6,4.

Ácido orgânico	Concentração máxima (mmol/L)	Máxima velocidade específica (mmol/g/h)	Produtividade específica (mmol/g/h)	Conversão (%)
Glucônico	640	17,4	1,07	95
Maltobiônico	570	7,0	0,95	88
Galactônico	510	5,1	0,85	87
Lactobiônico	510	3,9	0,85	85

Para a bioprodução de ácido lactobiônico, os resultados obtidos foram inferiores em quaisquer dos parâmetros considerados (Tabela 2). Entretanto, o ácido lactobiônico, produto de oxidação da lactose pelo complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, apresenta elevado valor agregado e importantes aplicações industriais. Neste trabalho, a conversão de 85 % em ácido lactobiônico, em cerca de 24 horas de processo é considerável em se tratando de um processo biotecnológico e comparável ao relatado por SATORY *et al.* (1997) para o processo com GFOR livre, no qual foi atingido cerca de 90 % de conversão em 60 horas de reação.

## CONCLUSÕES

Foram observadas afinidades decrescentes entre o complexo enzimático GFOR/GL e misturas de frutose com glicose, maltose, galactose e lactose, influenciando nos resultados gerais do processo.

Entre os produtos formados, o ácido glucônico, com aplicações voltadas à indústria de alimentos e farmacêutica, foi o que apresentou melhores conversão e produtividade específica no processo (cerca de 95 % e 1,07 mmol de ácido glucônico por grama de células por hora). Para os ácidos maltobiônico e galactônico, apesar dos relevantes resultados alcançados nos ensaios de produção, não foram, até o momento, relatadas na literatura aplicações industriais específicas. No caso particular do ácido lactobiônico, apesar da baixa afinidade do complexo enzimático por lactose, rendimento de bioconversão de 85 % foi obtido, o que torna evidente o interesse no aprofundamento de estudos sobre a sua obtenção por via biotecnológica a partir de lactose por este sistema enzimático, considerando, ainda, o alto valor agregado do produto e a aplicabilidade na área médica e de cosméticos.

## REFERÊNCIAS

CHUN, U. H. & ROGERS, P. L. The simultaneous production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29: 19-24, 1988.

GRIMES, P. E., GREEN, B. A., WILDNAUER, R. H. & EDISON, B. L. The use of polyhydroxy acid (PHAs) in photoaged skin. *Cutis*, 73:3-13, 2004.

JONAS, R. & SILVEIRA, M. M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 118:321-335, 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.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428, 1959.

REHR, B., WILHELM, C. & SAHM, H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35:144-148, 1991.

SATORY, M., FÜRLINGER, M., HALTRICH, D., KULBE, K.D., PITTNER, F. & NIDETZKY, B. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an membrane reactor. *Biotechnology Letters*, 19:1205-1208, 1997.

SOUTHARD, J. H. & BELZER, F. O. Organ preservation. *Annual Reviews of Medicine*, 46:235-247, 1995.

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

VOGEL, R. Sorbitol. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, 34, 492-498, 2003.

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.

YU, R. J & VAN SCOTT, E. J. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 3:76-87, 2004.

## **5.4 RESULTADOS IV**

**Bioconversão de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico por células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis***

## **Bioconversão de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico por células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis***

### **RESUMO**

Ácido lactobiônico e sorbitol podem ser obtidos por via biotecnológica a partir de lactose e frutose, respectivamente, pela ação do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*. Parâmetros do bioprocesso como temperatura, concentração de células e concentração de substratos foram avaliados visando a produção de ácido lactobiônico com células livres de *Z. mobilis* em biorreator de mistura completa. A variação da concentração inicial de substratos ( $S_0$ ), da concentração de células permeabilizadas livres de *Z. mobilis* ( $X$ ) e da temperatura ( $T$ ) mostraram um ganho pouco significativo na formação de ácido lactobiônico quando comparado ao bioprocesso conduzido sob condições operacionais padrão:  $X = 25$  g/L,  $S_0 = 0,7$ M e  $T = 39^\circ\text{C}$ . Apesar da baixa afinidade de GFOR/GL pelo substrato lactose, este estudo revela a viabilidade da produção biotecnológica de ácido lactobiônico e sorbitol, uma vez que, neste processo, conversões de cerca de 85 % são obtidas.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*, glicose-frutose oxidorreductase/ glucono- $\delta$ -lactonase, bioconversão, ácido lactobiônico.

## INTRODUÇÃO

Glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL), endoenzimas presentes no periplasma da bactéria anaeróbia Gram-negativa *Zymomonas mobilis*, catalisam a bioconversão de frutose e glicose em quantidades equimolares de sorbitol e ácido glucônico (ZACHARIOU & SCOPES 1986). Tendo em vista que a demanda comercial de sorbitol é substancialmente superior à do ácido glucônico e considerando que, no processo biotecnológico, a formação dos produtos se dá em base equimolar, esta desproporção dificulta a economia do processo e, conseqüentemente, a transferência da tecnologia para o setor produtivo.

ZACHARIOU & SCOPES (1986) e SATORY *et al.* (1997) mostraram que GFOR tem a capacidade de catalisar a conversão de outras aldoses em seus respectivos ácidos orgânicos, sendo destacado por SATORY *et al.* (1997) a obtenção de ácido lactobiônico como resultado da oxidação da lactose. Posteriormente, MALVESSI *et al.* (2002) descreveram as bases do processo de obtenção biotecnológica de sorbitol e ácido lactobiônico com células permeabilizadas livres de *Z. mobilis*.

Sorbitol apresenta aplicações voltadas para a indústria de alimentos e farmacêutica (SILVEIRA & JONAS, 2002; VOGEL, 2003; JONAS & SILVEIRA, 2004). Ácido lactobiônico, por suas propriedades quelantes, é usado na formulação de solução de conservação de órgãos a serem transplantados (solução U.W. - solução de Wisconsin) (SUMIMOTO & KAMADA 1990; SUMIMOTO *et al.*, 1990, SOUTHARD & BELZER, 1995) e, mais recentemente,

passou também a ser muito utilizado na formulação de cosméticos por possuir alto poder hidratante, cicatrizante e anti-radicaís livres (GRIMES *et al.* 2004; YU & VAN SCOTT, 2004).

Neste contexto, a bioprodução de ácido lactobiônico pelo complexo enzimático GFOR/GL presente em células livres de *Z. mobilis* foi avaliada com relação aos efeitos da concentração de substratos, de células/enzimas e da temperatura, em reator de mistura completa.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Microorganismo*

*Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi utilizada em todos os ensaios. As culturas foram repicadas mensalmente em meio líquido (MALVESSI *et al.*, 2006), incubadas a 30°C e, posteriormente, estocadas a 4°C.

### *Meios de cultivo*

O meio de cultivo usado para o preparo do inóculo, produção de biomassa e enzimas apresentava a seguinte composição (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5; extrato de levedura bruto Prodex Lac<sup>®</sup> (Prodesa S.A., Brasil), 7,5, glicose, 20 (ativação) 100 (inóculo) 150 (biomassa) (MALVESSI *et al.*, 2006).

Os meios de cultivo e a solução concentrada de glicose (500 g/L), preparada separadamente, foram esterilizados em autoclave (1atm, 121°C e 15 minutos).

### *Condições experimentais*

O inóculo foi preparado em frasco anaeróbio de 500 mL contendo 450 mL de meio de cultivo, mantido sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U, B. Braun Biotech, RFA), a 30°C, por aproximadamente 10 horas.

A produção de biomassa de *Z. mobilis* contendo GFOR/GL foi realizada em regime descontínuo, em reator de 7,0 litros com volume operacional de 5,5 litros, a 30°C, frequência do agitador de 450 rpm e controle automático de pH em 5,5. Ao final do cultivo, as células foram concentradas e posteriormente permeabilizadas a partir da mistura de igual volume de 0,2 % (m/v) de brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB) e da suspensão celular concentrada (REHR *et al.*, 1991). Após 10 minutos sob agitação magnética a 4°C, as células foram separadas por centrifugação e ressuspensas em água destilada.

### *Bioprodução de ácido lactobiônico com células livres de **Zymomonas mobilis***

As condições operacionais básicas usadas no processo de bioconversão foram: temperatura, 39°C, volume reacional, 240 mL, concentração de células permeabilizadas, 25 g/L e concentração de substratos (frutose e lactose), 0,7mol/L. As soluções de frutose e lactose foram preparadas em água fervente em razão da relativamente baixa solubilidade de lactose em água nas temperaturas testadas. O sistema foi mantido sob agitação magnética e o pH foi controlado em 6,4 pela adição automática de solução de NaOH 7M, acoplado a um controlador automático de pH (Consort modelo R735, Bélgica).

Além da concentração padrão de substratos – 0,7 mol/L – a bioprodução de ácido lactobiônico foi estudada em concentrações de frutose / lactose de 1,0 e

1,2 mol/L. Adicionalmente, os efeitos da variação da concentração de células permeabilizadas de *Z. mobilis* (de 12,5 a 37,5 g/L) e da temperatura reacional (de 33 a 45°C) sobre a bioprodução de ácido lactobiônico foram estudados.

#### *Métodos analíticos*

A concentração celular foi determinada durante o cultivo pela medida da absorbância de suspensões celulares a 560nm em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) e ao final do processo, diretamente por gravimetria, após secagem das amostras em estufa a 90°C.

A atividade enzimática foi determinada pela incubação de 4 g/L de células em solução 0,7 mol/L de lactose/frutose (100 mL), em reator de 300 mL, em pH 6,4 e 39°C. O sistema foi mantido em banho termostaticado, sob agitação magnética, com pH automaticamente controlado pela adição de solução de NaOH 1M acoplado a um controlador automático de pH (Consort modelo R735, Bélgica) (MALVESSI *et al.*, 2006).

A velocidade de formação de ácido lactobiônico foi estimada em função do volume de álcali utilizado no controle do pH com o tempo. Uma unidade de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol de ácido lactobiônico por hora, nas condições dos testes, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas (U/g) (MALVESSI *et al.*, 2006).

A concentração de ácido lactobiônico foi determinada de acordo com o volume e concentração de base utilizada durante a reação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Efeito da concentração de substratos sobre a bioprodução de ácido lactobiônico*

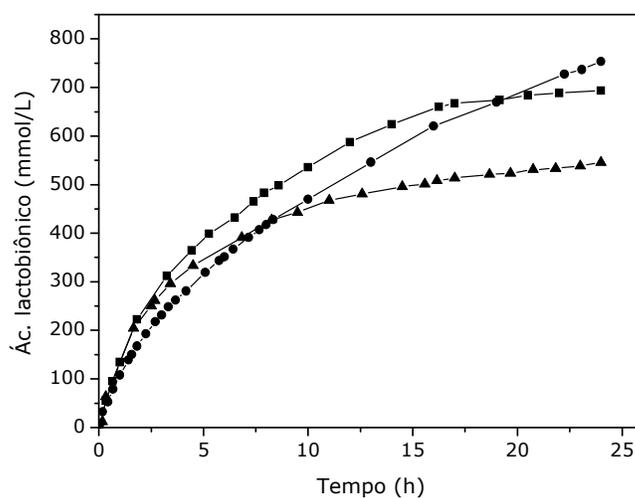
O efeito da concentração de substratos sobre a bioprodução de ácido lactobiônico foi avaliada em soluções equimolares de frutose/lactose de 0,7, 1,0 e 1,2 mol/L, a 39°C e pH 6,4. É importante ressaltar que a solubilidade de lactose a 40°C é de cerca de 0,6 mol/L (MACHADO *et al.*, 2000). Em soluções preparadas em água fervente, como no presente trabalho, a solubilidade se aproxima de 1,1 mol/L (BUDAVARI *et al.*, 1996). Desta forma, considerando, ainda, a presença de frutose no meio reacional, nestes ensaios incluíram-se testes enzimáticos com soluções saturadas de lactose.

Em estudos anteriores (capítulo III), foi avaliada a atividade enzimática do complexo GFOR/GL em relação a mistura de frutose e diferentes aldoses. Nestes estudos, particularmente para lactose/frutose, atividades superiores foram alcançadas com concentração de substratos entre 1,0 e 1,2 mol/L. Entretanto, estes testes são realizados por um período reacional curto, sendo necessária uma avaliação mais completa da ação enzimática frente a concentrações elevadas.

Os resultados gerais dos ensaios com as três concentrações de substratos são mostrados na Tabela 1, sendo os perfis cinéticos ilustrados na Figura 1. A máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico ( $v_m$ ), em mmol do produto por grama de células por hora (mmol/g/h), foi determinada pela divisão da velocidade de formação do ácido orgânico (mmol/L/h), medida graficamente nas duas primeiras horas de processo, pela concentração celular (g/L).

**Tabela 1.** Resultados gerais dos ensaios de bioconversão visando a produção de ácido lactobiônico, utilizando células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 e diferentes concentrações de substratos, a 39°C, pH 6,4 após 24 horas de processo.

Concentração de substratos	Ácido lactobiônico (mmol/L)	Conversão (%)	Máxima velocidade específica (mmol/g/h)	Produtividade específica (mmol/g/h)
0,7 mol/L	546	86	4,4	1,0
1,0 mol/L	694	80	4,5	1,3
1,2 mol/L	754	72	3,5	1,4



**Figura 1.** Concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão utilizando células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em soluções de concentração equimolar de lactose/frutose, a 39°C e pH 6,4. 0,7 mol/L (▲); 1,0 mol/L (■); 1,2 mol/L (●).

Como pode ser observado na Tabela 1, valores crescentes em relação à concentração e produtividade específica de ácido lactobiônico, como esperado, foram alcançados com o aumento da concentração de substratos, em 24 horas de processo. As máximas velocidades específicas de formação de ácido lactobiônico, calculadas nas duas primeiras horas de cada bioprocessos, foram semelhantes para 0,7 mol/L e 1,0 mol/L. Para 1,2 mol/L, a velocidade da reação foi afetada negativamente, provavelmente, pela alta concentração de substrato no meio, sendo, estimada em 3,5 mmol/g/h. Esta queda também foi observada com relação a conversão obtida em ácido lactobiônico. Nos resultados atingidos para as concentrações finais de produto, é importante frisar que estes valores foram afetados pela diluição provocada pelo volume de base adicionada para o controle de pH.

O uso de mais altas concentrações iniciais de substratos, desde que não provoquem inibição da reação, favorece, a princípio, o processo, visto que a constante cinética  $K_M$  de Michaelis-Menten para GFOR é elevada. Conforme trabalho anterior (capítulo III), o valor de  $K_M$  para o par frutose/glicose, substratos preferenciais para esta enzima, foi calculado em 0,68 mol/L. Por outro lado, esta mesma baixa afinidade enzima / substrato faz com que nas horas finais do processo, com menores concentrações de substrato, ocorra uma forte redução da velocidade de reação (Figura 1). Contribui, também, para esta menor velocidade, a perda de atividade decorrente da própria ação enzimática, conforme previamente descrito por diferentes autores (GOLLHOFER *et al.*, 1995; NIDETZKY *et al.*, 1997; SATORY *et al.*, 1997). Assim, na bioconversão de lactose em ácido lactobiônico, tendo em vista a ainda mais baixa afinidade entre GFOR e

este substrato, a conversão é significativamente prejudicada como mostrado na Tabela 1.

Em função dos resultados apresentados, especialmente dos dados de conversão, na seqüência dos estudos foi usada concentração equimolar de lactose e frutose de 0,7 mol/L.

#### *Efeito da concentração celular sobre a bioprodução de ácido lactobiônico*

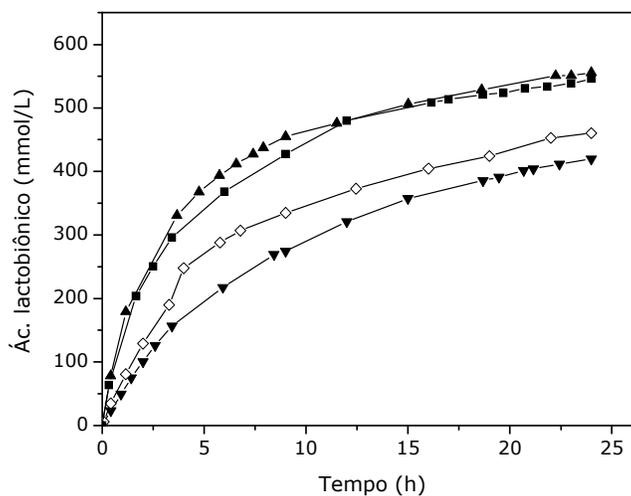
Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de células permeabilizadas de *Z. mobilis* sobre a bioprodução de ácido lactobiônico, foram realizados testes com concentrações inferiores e superiores em relação à condição padrão de 25 g/L. Como a concentração de substratos não foi variada (0,7 mol/L de lactose/frutose), os resultados podem ser avaliados como uma resposta à relação enzima / substrato de cada ensaio.

Na Tabela 2 são resumidos os resultados gerais obtidos nestas condições e na Figura 2 são ilustrados os perfis de produção de ácido lactobiônico em 24 horas de processo.

Maior velocidade específica máxima de formação de ácido lactobiônico foi obtida com 25 g/L de células, observando-se queda de  $v_m$  com o aumento da concentração de células permeabilizadas de *Z. mobilis* acima deste valor. Conversões superiores a 80% foram determinadas com a utilização de 25 a 37,5 g/L de células de *Z. mobilis*.

**Tabela 2.** Resultados gerais dos ensaios de bioconversão visando a obtenção de ácido lactobiônico, utilizando diferentes concentrações de células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*, a 39°C e pH 6,4, após 24 horas de processo.

Concentração de células / enzimas (g/L)	Ácido lactobiônico (mmol/L)	Conversão (%)	Máxima velocidade específica (mmol/g/h)	Produtividade específica (mmol/g/h)
12,5	420	64	3,7	1,48
20	460	70	3,1	1,02
25	546	85	4,2	0,98
37,5	556	86	3,0	0,67



**Figura 2.** Concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em mistura de lactose/frutose 0,7mol/L, utilizando diferentes concentrações celulares, em pH 6,4 e 39°C. (▼) 12,5 g/L; (◇) 20 g/L; (■) 25 g/L; (▲) 37,5 g/L.

Na Figura 2, observa-se, em geral, diminuição da velocidade reacional com o tempo, pelas razões já discutidas, em todos os ensaios. A tendência do perfil cinético da concentração de ácido lactobiônico em formar o característico patamar ao final do processo foi observada em todos os ensaios, especialmente nos dois com concentrações celulares mais baixas, em que concentrações mais altas de substrato ainda estavam presentes no meio, o que pode ser inferido pela conversão em produto. Este resultado sugere a ocorrência de uma significativa perda de atividade enzimática ao longo do tempo de reação, além da questão da baixa afinidade.

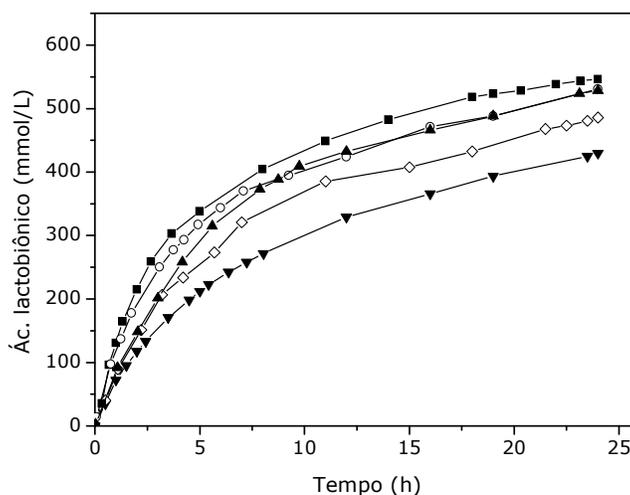
Por outro lado, com as concentrações celulares acima de 25 g/L – significando uma maior concentração enzimática e, portanto, uma maior disponibilidade de sítios ativos para o acoplamento do substrato – não foi observado qualquer ganho para o processo. No caso, deve-se levar em conta que esta conclusão se limita a este grupo de ensaios realizados com concentração inicial de substrato de 0,7 mol/L, uma vez que, como já mencionado, os resultados discutidos decorrem da relação enzima / substrato.

#### *Efeito da temperatura sobre a bioprodução de ácido lactobiônico*

O efeito da temperatura, entre 33 e 45°C, sobre o processo de obtenção de ácido lactobiônico foi avaliado, sendo os resultados gerais mostrados na Tabela 3 e os perfis cinéticos apresentados na Figura 3.

**Tabela 3.** Resultados gerais dos ensaios de bioconversão visando a produção de ácido lactobiônico, utilizando células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, conduzidos em diferentes temperaturas, pH 6,4, após 24 horas de processo.

Temperatura (°C)	Ácido lactobiônico (mmol/L)	Conversão (%)	Máxima velocidade específica (mmol/g/h)	Produtividade específica (mmol/g/h)
33	429	65	2,4	0,76
37	486	74	2,7	0,87
39	546	84	4,4	0,98
42	531	82	4,1	0,96
45	529	82	3,0	0,95



**Figura 3.** Concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em mistura de lactose/frutose 0,7mol/L, em diferentes temperaturas, pH 6,4. (▼) 33°C; (◇) 37°C; (■) 39°C; (○) 42°C; (▲) 45°C.

Com qualquer dos parâmetros considerados na avaliação, os melhores resultados foram encontrados a 39°C, com resultados próximos sendo obtidos a 42°C e, em seguida, a 45°C (Tabela 3). Estes resultados se justificam pela melhor ação catalítica do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* à temperatura de 39°C, de acordo com diferentes autores (ZACHARIOU & SCOPES, 1986; CHUN & ROGERS, 1988; REHR *et al.*, 1991; ERZINGER *et al.*, 2003). Entretanto, em estudos anteriores (capítulo III), temperaturas reacionais mais altas, entre 43 e 47°C, proporcionaram a obtenção de melhores atividades do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* em mistura de lactose e frutose (0,7 mol/L). A aparente incoerência destes resultados com os do presente trabalho pode ter relação com as diferentes condições, em termos de tempo de avaliação e concentração de células de *Z. mobilis*, usadas nos testes de atividade e no processo de bioconversão.

## CONCLUSÕES

Em função do alto valor comercial do ácido lactobiônico, a sua obtenção por via biotecnológica consiste em um estudo de grande relevância. No caso, ressalte-se que esta substância é utilizada, principalmente, na indústria de cosméticos, em que um processo natural de obtenção das matérias-primas permite a agregação de um valor ainda maior aos derivados.

Apesar da evidente baixa afinidade entre o complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* e lactose, os resultados deste trabalho mostram que, a partir da definição adequada de alguns parâmetros operacionais do bioprocessamento, é

possível a obtenção de resultados relevantes em termos de conversão de ácido lactobiônico - cerca de 85% - especialmente em se tratando de uma via biotecnológica de produção.

Estes resultados servem como base para o desenvolvimento de estudos sobre o processo em maior escala, colaborando com a restrita quantidade de informações encontradas na literatura especializada sobre a bioprodução de ácido lactobiônico.

## REFERÊNCIAS

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. 12<sup>th</sup> ed., Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, p.5352, 1996.

CHUN, U. H. & ROGERS, P. L. The simultaneous production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29: 19-24, 1988.

ERZINGER, G. S. Produção biotecnológica de sorbitol e ácido glucônico por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191: Estudo da estabilidade da enzima glicose-frutose oxidoreductase. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1999.

ERZINGER, G. S., SILVEIRA, M. M., LOPES DA COSTA, J. P. C., VITOLO. M. & JONAS, R. Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:329-333, 2003.

GERLING, K. G. & WILKE, D. Washing or detergent composition containing lactobionic acid or lactobionic acid salts. Kali Chemie AG, assignee U.S. Patent 5,069,808, 1991.

GOLLHOFER, D., NIDETZKY, B., FUERLINGER, M. & KULBE, K. D. Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action. *Enzyme and Microbial Technology*, 17:235-240, 1995.

GRIMES, P. E., GREEN, B. A., WILDNAUER, R. H. & EDISON, B. L. The use of polyhydroxy acid (PHAs) in photoaged skin. *Cutis*, 73:3-13, 2004.

JONAS, R. & SILVEIRA, M. M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 118:321-335, 2004.

MACHADO, J.J.B., COUTINHO, J.A. & MACEDO, E.A. Solid-liquid equilibrium of  $\alpha$ -lactose in ethanol/water. *Fluid Phase Equilibria*, 173:121-134, 2000.

MALVESSI, E.; CONCATTO, K & SILVEIRA, M. M. Biotransformação de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico por células de *Zymomonas mobilis*. In: V Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, Brasília, DF. Resumos, p.136-137, 2002.

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.

NIDETZKY, B., FÜRLINGER, M., GOLLHOFER, D., SCOPES, R. K., HALTRICH, D. & KULBE, K. D. Improved operational stability of cell-free glucose-fructose

oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* for the efficient synthesis of sorbitol and gluconic acid in a continuous ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 53, 623-629, 1997.

REHR, B., WILHELM, C. & SAHM, H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35:144-148, 1991.

SATORY, M., FÜRLINGER, M., HALTRICH, D., KULBE, K.D., PITTNER, F. & NIDETZKY, B. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an membrane reactor. *Biotechnology Letters*, 19:1205-1208, 1997.

SILVEIRA, M. M. & JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:40-408, 2002.

SOUTHARD, J. H. & BELZER, F. O. Organ preservation. *Annual Reviews Medicine*, 46:235-247, 1995.

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

SUMIMOTO, R., JAMIESON, N. V. & KAMADA, N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. *Transplantation*, 50:573-576, 1990.

VOGEL, R. Sorbitol. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, 34, 492-498, 2003.

YU, J. R. & VAN SCOTT, E. J. 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.

## **5.5 RESULTADOS V**

**Avaliação de glicose-frutose oxidoreductase / glucono- $\delta$ -lactonase presentes em células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio na produção de ácido lactobiônico**

**Avaliação de glicose-frutose oxidoredutase / glucono- $\delta$ -lactonase presentes em células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio na produção de ácido lactobiônico**

**RESUMO**

Ácido lactobiônico e sorbitol podem ser obtidos por via biotecnológica a partir de lactose e frutose, respectivamente, pela ação do complexo enzimático glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL) contido no periplasma de *Zymomonas mobilis*. A ação do complexo GFOR/GL em células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio foi avaliada com relação ao pH (5,2 a 9,7), concentração de substratos – lactose/frutose (0,1 a 1,3 mol/L) e temperatura (34 a 59°C). A estabilidade enzimática foi estimada em ensaios consecutivos de bioconversão entre 39-50°C e em valores de pH entre 6,4 e 7,9, por 12 horas. Atividades enzimáticas superiores foram alcançadas com pH entre 7,0 e 8,0 e temperatura de 47 a 50°C, mostrando um incremento de 24 e 35 %, respectivamente, quando comparadas às condições ideais descritas na literatura para células livres (pH 6,4 e 39°C). Valores de  $K_M$  de 1,3 mol/L e  $V_{max}$  de 4,6 U/g de células secas foram obtidos. No processo de bioconversão com o sistema imobilizado de *Z. mobilis*, os melhores resultados de produção de ácido lactobiônico foram alcançados em temperaturas de 39 e 47°C e pH 6,4.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*, glicose-frutose oxidoredutase/ glucono- $\delta$ -lactonase, imobilização, pH, temperatura, ácido lactobiônico.

## INTRODUÇÃO

A bioprodução de quantidades equimolares de sorbitol e ácido glucônico a partir de frutose e glicose, respectivamente, pelas enzimas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL) presentes em células de *Zymomonas mobilis* (ZACHARIOU & SCOPES 1986), vem sendo estudada há alguns anos. Nestes estudos, o interesse recai, principalmente, sobre o sorbitol, substância não cariogênica com amplas aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (VOGEL, 2003; JONAS & SILVEIRA, 2004).

SATORY *et al.* (1997), utilizando enzimas purificadas, e MALVESSI *et al.* (2002), trabalhando com células permeabilizadas de *Z. mobilis*, demonstraram que GFOR/GL têm a capacidade de oxidar várias aldoses alternativas à glicose levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos, além de sorbitol, produto da redução da frutose que, obrigatoriamente, deve estar presente no meio para que ocorra a reação. Entre estes produtos, destaca-se o ácido lactobiônico por apresentar elevado valor comercial. O ácido lactobiônico é utilizado na formulação de soluções de conservação de órgãos a serem transplantados (SUMIMOTO & KAMADA 1990; SUMIMOTO *et al.*, 1990, SOUTHARD & BELZER, 1995), na fabricação de detergentes (GERLING & WILKE, 1991) e como recurso multifuncional da cosmetologia (GRIMES *et al.* 2004; YU & VAN SCOTT, 2004).

Com o intuito de permitir a reutilização do complexo enzimático em sucessivas bateladas de bioconversão ou em regime contínuo, a técnica de imobilização celular tem sido objeto de muitos estudos. Como suportes de imobilização, são comumente usados alginato de cálcio (CHUN & ROGERS,

1988), k-carragena (REHR *et al.*, 1991) e ainda alguns tipos de polímeros (KOEHNTOPP *et al.*, 1996; FERRAZ *et al.*, 2000). Visando a utilização de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* neste processo, alguns aspectos devem ser considerados como a capacidade de retenção da atividade enzimática, a estabilidade da enzima frente à temperatura, pH e condições operacionais, a possibilidade de operação do processo em regime contínuo, além de desenhos específicos de reatores (ZANIN & MORAES, 2004; MALVESSI *et al.*, 2006b).

Neste contexto, a ação enzimática do complexo GFOR/GL presente em células permeabilizadas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio foi avaliada com respeito à concentração de substratos (frutose e lactose), pH, temperatura, estabilidade frente ao pH e à temperatura visando a bioprodução de ácido lactobiônico.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Microrganismo*

*Z. mobilis* ATCC 29191 foi utilizada em todos os ensaios. As culturas foram repicadas mensalmente em meio semi-sintético (MALVESSI *et al.*, 2006a), incubadas a 30°C e, posteriormente, estocadas a 4°C.

### *Meios de cultivo*

O meio de cultivo usado para o preparo do inóculo, produção de biomassa e enzimas apresentava a seguinte composição (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5; extrato de levedura bruto

Prodex Lac<sup>®</sup> (Prodesa S.A., Brasil), 7,5 (MALVESSI *et al.*, 2006a). Na preparação do meio de ativação e conservação, 20 g/L de glicose foram adicionados ao meio básico e o pH inicial foi ajustado para 5,5. Para o preparo de inóculo, foram adicionados ao meio 100 g/L de glicose e 5 g/L de CaCO<sub>3</sub>, este último para o controle do pH em valores próximos a 5,5. Em biorreator, nos cultivos para produção de enzimas, a concentração inicial de glicose foi 150 g/L. Os meios foram esterilizados em autoclave (1atm, 121°C e 15 minutos).

#### *Condições experimentais de cultivo*

Os inóculos foram preparados em frasco anaeróbio de 500 mL, dotado de filtro para liberação de CO<sub>2</sub>, contendo 450 mL de meio de cultivo, mantido sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U, B. Braun Biotech, RFA), a 30°C, por aproximadamente 10 horas.

A produção de biomassa de *Z. mobilis* contendo GFOR/GL foi realizada em regime descontínuo, em reator de 7,0 litros com volume operacional de 5,5 litros, a 30°C, com frequência de agitadores de 450 rpm e controle automático de pH em 5,5, utilizando solução de NaOH 5M.

As células de *Z. mobilis* previamente cultivadas em glicose foram permeabilizadas com o intuito de evitar o metabolismo fermentativo. Igual volume de solução 0,2% (m/v) de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) foi adicionado à suspensão celular concentrada (REHR *et al.*, 1991). Após 10 minutos sob agitação magnética a 4°C, as células foram separadas por centrifugação e ressuspensas em água destilada.

### *Imobilização de células de Zymomonas mobilis*

Para a imobilização celular, foi adotada a metodologia descrita por ERZINGER (1999). Alginato de sódio (Algogel 5540 Degussa Flavors & Fruit Systems do Brasil Ltda) foi dissolvido em água destilada a uma concentração de 4% (m/v), mantido sob agitação mecânica (450 rpm) para a hidratação por 12 horas. À solução de alginato de sódio foi adicionado igual volume de suspensão de *Z. mobilis* (50 g/L), sendo a mistura mantida sob agitação por cerca de 2 horas para homogeneização. Para a formação das esferas de alginato de cálcio e imobilização das células, todo o volume desta suspensão foi gotejado em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,3M. A suspensão celular de *Z. mobilis* previamente usada na mistura e as esferas formadas após o gotejamento foram reticuladas com glutaraldeído 0,5% (m/v) por 15 minutos, sob agitação magnética, à temperatura ambiente (JANG *et al.*, 1992). As células imobilizadas foram mantidas a 4°C, em água destilada, sendo posteriormente utilizadas nos ensaios comparativos de atividade enzimática e bioconversão.

### *Efeitos do pH, da temperatura e da concentração de substratos sobre a atividade do complexo glicose-frutose oxidoredutase/ glucono- $\delta$ -lactonase imobilizado em alginato de cálcio*

Nos ensaios enzimáticos, assim como nos de bioconversão, as soluções de frutose e lactose foram preparadas em água fervente em razão da relativamente baixa solubilidade de lactose em água nas temperaturas testadas.

A atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio foi comparada sob diferentes valores

de pH (5,2 a 9,7), de temperatura (34 a 59°C) e de concentração da mistura lactose/frutose (0,1 e 1,3 mol/L), mantendo-se fixas, em cada caso, as demais condições de determinação de atividade.

*Ensaio de bioconversão em reator de mistura completa com células imobilizadas de **Zymomonas mobilis***

Os ensaios de bioconversão foram realizados em reator de 600 mL, contendo 240 mL de solução 0,7M de lactose/frutose e 20 g/L de células previamente permeabilizadas e imobilizadas. O reator foi mantido sob agitação magnética, em banho termostaticado e pH controlado pela adição automática de solução de NaOH 7,0M, através de um controlador de pH (Consort modelo R735, Bélgica).

A máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico, em mmol de produto por grama de células por hora (mmol/g/h), que corresponde à própria atividade de GFOR/GL, foi determinada nas primeiras horas do processo de bioconversão quando a curva de variação da concentração de produto com o tempo apresentava um perfil linear.

Para avaliar a estabilidade do complexo enzimático imobilizado com respeito à temperatura e ao pH, o sistema foi testado em quatro ensaios sucessivos de bioconversão com 3 horas de duração, resultando, ao final, em um tempo de 12 horas na exposição das enzimas às condições testadas. Foram avaliadas as temperaturas de 39, 43, 47 e 50°C e valores de pH de 6,4, 7,0, 7,5 e 7,9. Finalmente, com o objetivo de verificar o comportamento do processo de bioconversão controlado sob diferentes níveis de pH e temperatura, os ensaios

foram realizados nas faixas previamente identificadas como as mais adequadas, em comparação com as condições descritas na literatura para glicose e frutose (pH 6,4 e 39°C), com células livres (ZACHARIOU & SCOPES), ou entre 6,5 e 7,0, a 39°C, para o sistema imobilizado em alginato de cálcio (CHUN & ROGERS, 1988).

#### *Métodos analíticos*

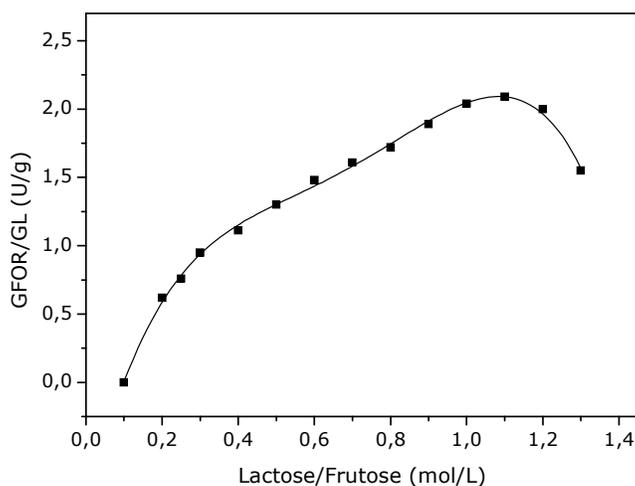
A concentração celular de *Z. mobilis* durante o cultivo foi determinada indiretamente pela medida da absorvância de suspensões celulares, a 560 nm, em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) e, ao final do processo, por gravimetria. A atividade enzimática em células imobilizadas em alginato de cálcio foi determinada pela incubação de 10 g/L de células em solução 0,7 mol/L de lactose/frutose (100 mL), em reator de 300 mL, em pH 6,4 e 39°C. O sistema foi mantido em banho termostaticado, sob agitação magnética, com o pH sendo automaticamente controlado pela adição de solução de NaOH 1M. A velocidade de formação de ácido lactobiônico foi estimada em função do volume de álcali utilizado no controle do pH com o tempo. Uma unidade de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol de ácido lactobiônico por hora, nas condições de teste, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas (U/g) (MALVESSI *et al.*, 2006a).

A concentração de ácido lactobiônico foi determinada de acordo com o volume e a concentração da solução de NaOH utilizada para o controle do pH durante a reação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Efeito da concentração de substratos sobre a atividade de glicose-frutose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactonase em células imobilizadas de **Zymomonas mobilis***

Inicialmente, foi avaliado o efeito da concentração dos substratos sobre a atividade catalítica do complexo GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio. Estes resultados são mostrados na Figura 1.

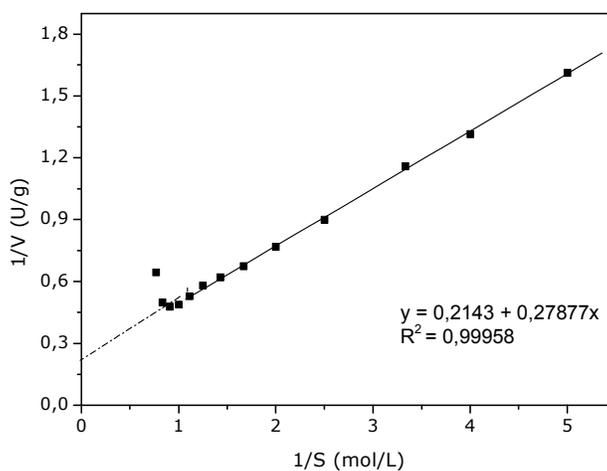


**Figura 1.** Atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, imobilizadas em alginato de cálcio, em função das concentrações relativas de lactose/frutose (39°C, pH 6,4).

Atividades crescentes foram alcançadas com o aumento da concentração de substratos (lactose/frutose). Entre 0,9 e 1,2 mol/L, resultados semelhantes foram obtidos, aproximadamente 2,0 U/g, sendo observado o efeito negativo da concentração de lactose sobre a atividade enzimática quando usado 1,3 mol/L

(Figura 1). É importante ressaltar que a solubilidade de lactose a 40°C é de cerca de 0,6 mol/L (MACHADO *et al.*, 2000). Em soluções preparadas em água fervente, como no presente trabalho, a solubilidade se aproxima de 1,1 mol/L (BUDAVARI *et al.*, 1996). Desta forma, considerando, ainda, a presença de frutose no meio reacional, nestes ensaios incluíram-se testes enzimáticos com soluções saturadas de lactose.

Com base nestes dados (Figura 1), foram calculados os parâmetros cinéticos aparentes  $K_M$  e  $V_{max}$ , através da linearização da expressão de Michaelis-Menten, utilizando o método proposto por Lineweaver-Burk (Figura 2). Na condição testada, os valores aparentes de  $K_M$  e  $V_{max}$  obtidos foram de 1,3 mol/L e 4,6 U/g, respectivamente.



**Figura 2.** Duplo-recíproco da atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, imobilizadas em alginato de cálcio, em função da concentração de lactose/frutose (pH 6,4, 39°C).

De acordo com o modelo proposto por Michaelis-Menten, a velocidade máxima de reação será alcançada quando todos os sítios ativos disponíveis estiverem ocupados pelo substrato. Entretanto, em concentrações elevadas de substrato, observa-se inibição, com conseqüente queda da velocidade de reação, sendo possivelmente esta a razão de a maior atividade experimental (2,0 U/g) obtida com lactose/frutose 1,1 mol/L ser muito inferior à calculada pelo modelo (Figura 1).

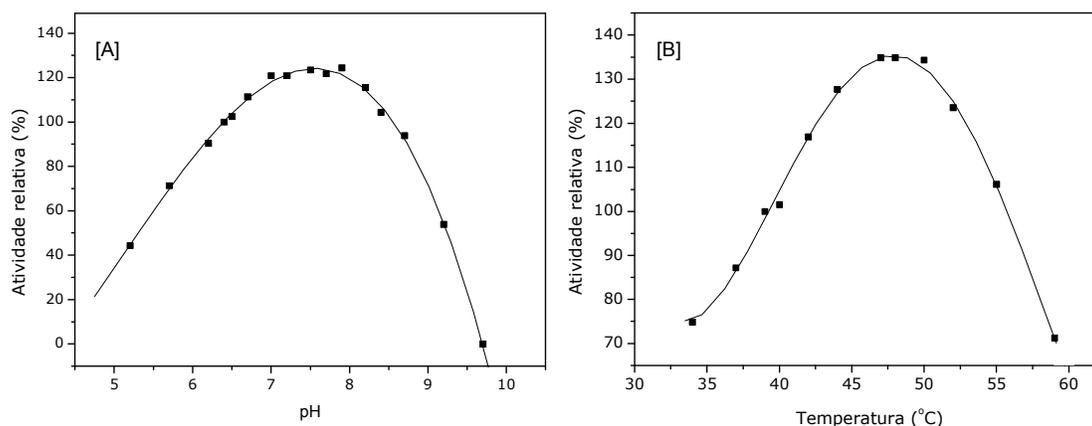
A análise dos resultados de  $K_M$  e  $V_{max}$  obtidos neste trabalho com o sistema imobilizado para os substratos lactose/frutose em comparação com os relatados na literatura para células livres de *Z. mobilis* (SATORY *et al.*, 1997) são de difícil comparação. O emprego de células livres proporciona uma melhor interação entre a enzima e o substrato, ao contrário do sistema imobilizado que, dependendo da técnica, do tipo de suporte e do substrato utilizado, pode dificultar a difusão de substratos e produtos pra dentro e para fora das esferas de alginato, reduzindo, conseqüentemente, a velocidade da reação (ZANIN & MORAES, 2004).

*Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de glicose-frutose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactonase em células imobilizadas de **Zymomonas mobilis***

Uma vez que a temperatura e o pH exercem grande influência sobre a ação catalítica das enzimas, foi avaliado o efeito destas variáveis sobre o complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* imobilizado em alginato de cálcio. O pH de 6,4 e temperatura de 39°C, ideais para enzimas livres, como já relatado em trabalhos

anteriores (ZACHARIOU & SCOPES, 1986; CARRA *et al.*, 2003), foram utilizados como condições padrão, representando 100% de atividade de GFOR/GL.

Nas Figuras 3A e 3B, são representados os dados de atividade enzimática obtidos em diferentes valores de pH, a 39°C e em diferentes temperaturas, em pH 6,4, respectivamente.



**Figura 3.** Influência do pH [A] e da temperatura [B] sobre a atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando solução lactose/frutose 0,7mol/L.

Conforme a Figura 3A, os melhores resultados de atividade enzimática no sistema imobilizado, a 39°C, foram medidos entre pH 7,0-8,0, mostrando um incremento aproximado de 24% quando comparado com o pH 6,4. Nas condições testadas, valores de pH acima de 8,7 e abaixo de 6,2 exerceram efeito negativo sobre a atividade enzimática. A obtenção de títulos enzimáticos superiores em valores de pH mais altos que os normalmente empregados com células não imobilizadas se deve, pelo menos em parte, a problemas difusionais que provocariam uma diminuição do contato entre enzimas e substratos. O emprego

de pH externo mais alto do que o suposto pH interno – inferior, em função do possível acúmulo de ácido lactobiônico no micro-ambiente das esferas de alginato de cálcio – proporcionaria um aumento considerável do pH interno às esferas para níveis mais próximos ao ideal para o sistema não imobilizado, favorecendo a reação.

Com relação à temperatura, foram realizados ensaios de atividade com células imobilizadas de *Z. mobilis* numa faixa de 34 a 59°C, em pH 6,4 (Figura 3B). Um incremento aproximado de 35% na atividade enzimática foi observado entre 47 e 50°C, em comparação com o resultado alcançado a 39°C. Em estudos anteriores, CARRA *et al.* (2003) determinaram, também para lactose/frutose, porém com células não imobilizadas de *Z. mobilis* ATCC 29191, máxima atividade de GFOR/GL entre 43 e 47°C, seguido de acentuado decréscimo a temperaturas ainda mais altas. No presente estudo, o patamar em temperaturas mais elevadas, observado para o sistema imobilizado, se deve, possivelmente, à maior transferência de massa através das esferas de alginato de cálcio que seria proporcionada pelo aumento da temperatura, possibilitando a ação catalítica, ou, ainda, algum tipo de efeito protetor do suporte em relação ao complexo GFOR/GL.

*Estabilidade enzimática glicose-frutose oxidoredutase/glucono- $\delta$ -lactonase em células imobilizadas de **Zymomonas mobilis** frente ao pH e à temperatura reacional*

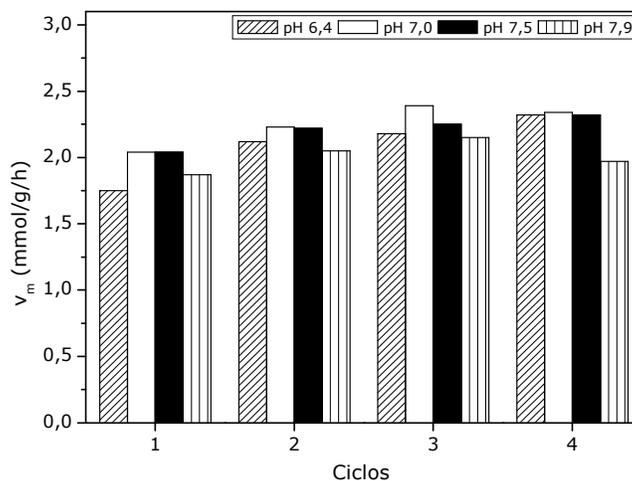
Para que seja obtido um rendimento médio de 70%, o processo de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol com o sistema

imobilizado de *Z. mobilis* deve ser conduzido por um período mínimo de 24 horas, uma vez que entre 12-15 horas já é observada a redução na velocidade reacional (MALVESSI *et al.*, 2006b). Desta forma, torna-se necessária uma melhor avaliação da estabilidade catalítica do complexo GFOR/GL frente ao pH e à temperatura por, no mínimo, 12 horas. Foram então, realizados quatro ensaios em bateladas consecutivas de 3 horas de duração, atingindo, ao final, um período de exposição das enzimas imobilizadas, a cada condição, de 12 horas. É interessante observar que, segundo GOLLHOFER *et al.* (1995), a inativação de GFOR ocorre, especialmente, em decorrência da própria ação enzimática. Deste modo, os testes de estabilidade, na forma realizada neste trabalho, são mais significativos do que a simples exposição prévia das enzimas à condição supostamente inativadora.

Os valores de pH testados foram de 6,4 a 7,9, a 39°C. Os testes de temperatura foram feitos entre 39 e 50°C, em pH 6,4. Em cada batelada, foi estimada a máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico ( $v_m$ ). O meio reacional – solução de lactose/frutose – foi substituído após cada batelada, evitando, assim, a influência da concentração de substratos, reduzida pelo consumo no próprio processo, sobre a velocidade reacional. Portanto, as variações ocorridas foram consideradas como decorrentes apenas do efeito da temperatura ou do pH.

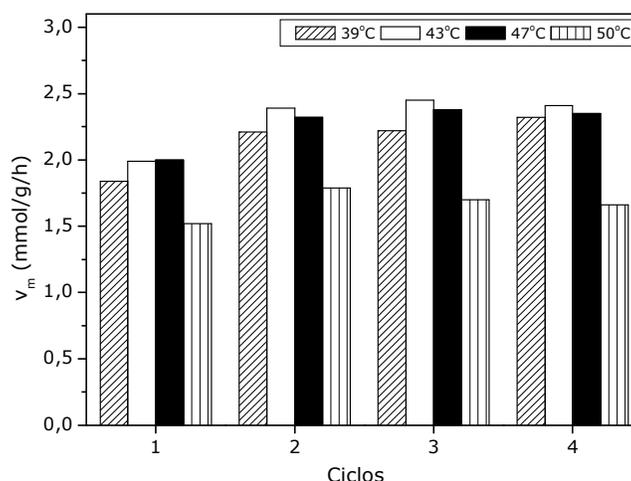
Os dados relativos à estabilidade frente ao pH são mostrados na Figura 4. Como observado no primeiro ciclo de 3 horas, a velocidade ( $v_m$ ) foi mais baixa em todos os valores de pH avaliados. Esta constatação pode ser devido ao fato de o suporte ter sido recém-preparado e ainda apresentar-se excessivamente rígido,

necessitando de um período mais longo para aumentar a difusão através das esferas de alginato (BERTASSO *et al.*, 1996). A partir da segunda batelada, houve pouca variação nos valores de  $v_m$  nas bateladas conduzidas em pH 6,4, 7,0 e 7,5 até o final das 12 horas de exposição das esferas, em média 2,3 mmol/g/h. Entretanto, o sistema imobilizado, quando exposto ao pH de 7,9, ao contrário do discutido anteriormente nos testes de atividade enzimática, nos quais foram atingidos altos títulos enzimáticos em valores entre 7,0-8,0 (Figura 2A), mostrou queda maior de velocidade na quarta batelada (Figura 4). Este fato poderia estar relacionado ao acúmulo de ácido lactobiônico nas esferas de alginato de cálcio e/ou a alterações conformacionais na molécula do biocatalisador, que afetariam a estabilidade enzimática (ZANIN & MORAES, 2004).



**Figura 4.** Máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico ( $v_m$ ) medida para a mistura de lactose/frutose (0,7 mol/L), utilizando células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em ciclos consecutivos de bioconversão de 3 horas de duração, em diferentes valores de pH, a 39°C.

Na Figura 5 são apresentados os resultados dos testes de estabilidade enzimática do complexo GFOR/GL imobilizado frente à temperatura reacional.



**Figura 5.** Máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico ( $v_m$ ) medida para a mistura de lactose/frutose (0,7mol/L), utilizando células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, em ciclos consecutivos de bioconversão de 3 horas de duração, em diferentes temperaturas, pH 6,4.

Independentemente da temperatura avaliada, a velocidade foi mais baixa na primeira batelada, como também observado nos testes de pH. A partir da segunda batelada, pouca variação foi observada nos valores de  $v_m$  até o final das 12 horas de exposição das esferas, com títulos enzimáticos superiores sendo atingidos a 39, 43 e 47°C, em média 2,4 mmol/g/h (Figura 5). Por outro lado, a 50°C, atividades enzimáticas inferiores foram medidas em todos os ciclos, atingindo, aproximadamente, 1,7 mmol/g/h, mostrando que, de fato, o sistema é sensível à pequena variação de temperatura, o que poderia explicar, também, o comportamento cinético do processo nas condições ilustradas na Figura 2B.

Desse modo, levando-se em conta o tempo médio do processo de bioconversão, o uso de temperaturas entre 39 e 47°C permitiria a obtenção de resultados relevantes, com pouca variação de atividade enzimática no período avaliado.

Assim, os resultados discutidos neste trabalho confirmam que a imobilização do complexo enzimático proporciona um aumento da estabilidade operacional do sistema em comparação com o uso de células livres. ZANIN & MORAES (2004) relatam que, devido a restrições difusionais, somente uma fração da enzima imobilizada estaria ativa no início do processo, permanecendo a restante como reserva, que somente começaria a atuar quando a atividade inicial estivesse desnaturada.

*Bioprodução de ácido lactobiônico por células imobilizadas de **Zymomonas mobilis** sob diferentes combinações de valores de pH e temperatura*

Com o objetivo de verificar o comportamento do processo controlado sob diferentes níveis de pH e temperatura, foram realizados ensaios nas condições normalmente descritas na literatura, pH 6,4 e 39°C, em comparação com as que resultaram em maiores atividades nos ensaios de atividade e estabilidade enzimática (pH 7,5 e 47°C). Estes bioprocessos foram conduzidos por 24 horas, salientando-se, novamente, que se trata de período suficiente para ser obtido mínimo de 70% de conversão.

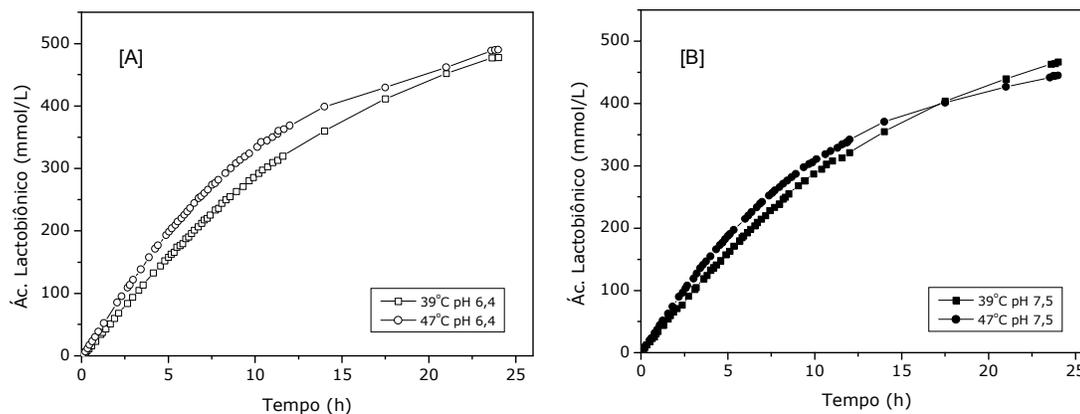
Na Tabela 1 são resumidos os resultados gerais obtidos nestes ensaios de bioconversão.

**Tabela 1.** Resultados dos ensaios de bioconversão visando a produção de ácido lactobiônico, com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, conduzidos em diferentes temperaturas e pH.

Temperatura / pH	Ácido lactobiônico (mmol/L)	Conversão (%)	Máxima velocidade específica (mmol/g/h)	Produtividade específica (mmol/g/h)
39°C / pH 6,4	478	73	1,60	1,0
39°C / pH 7,5	467	72	1,70	0,97
47°C / pH 6,4	490	75	2,07	1,0
47°C / pH 7,5	445	68	2,02	0,92

Como mostrado na Tabela 1, como esperado, as máximas velocidades específicas de formação de produto foram maiores nos ensaios de bioconversão conduzidos a 47°C, sugerindo um possível efeito positivo da temperatura sobre a transferência de massa no sistema, que favoreceria o contato enzima – substrato. Esta velocidade inicial maior, no entanto, não resultou em ganhos significativos em termos de conversão e de produtividade específica de formação de ácido lactobiônico, avaliados em 24 horas de processo, que foram praticamente iguais nos ensaios a 39°C, nos dois valores de pH, e a 47°C, em pH 6,4, com resultados inferiores a 47°C e pH 7,5. Neste último caso, é possível que com a redução da velocidade, devida ao consumo do substrato, possa ter provocado um equilíbrio de pH entre os meios interno e externo às esferas de alginato de cálcio em valores excessivamente elevados para a ação de GFOR/GL.

Nas Figuras 6A e 6B, são mostrados os perfis de variação da concentração de ácido lactobiônico com o tempo em experimentos de bioconversão com diferentes combinações destes parâmetros.



**Figura 6.** Variação da concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 imobilizadas em alginato de cálcio, em mistura de lactose/frutose 0,7 mol/L, a 39°C e 47°C, em pH 6,4 [A] e 7,5 [B].

A continuidade do processo por um período mais longo resultaria em maior produção de ácido lactobiônico, influenciando, entretanto a velocidade reacional e a produtividade global do bioprocesso (Figura 6).

Com o objetivo de estimar os valores de pH no micro-ambiente das esferas de alginato de cálcio, ao final das 24 horas de condução dos processos de bioconversão em discussão, as esferas foram coletadas, drenadas e colocadas em água deionizada em ebulição por 10 minutos. Com este tratamento, pretendeu-se inativar o sistema enzimático e cessar a reação. A relação entre o volume de esferas e o volume de água deionizada foi a mesma usada no biorreator. Após o tratamento, a suspensão foi deixada em repouso por 24 horas

para que o pH atingisse o equilíbrio em todo o sistema. O pH da água foi medido, considerando-se os valores obtidos como uma estimativa do pH interno das esferas de alginato de cálcio (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de pH interno das esferas de alginato de cálcio, após 24 horas de bioconversão de lactose/frutose 0,7 mol/L em diferentes condições de pH e temperatura.

pH reacional	Temperatura (°C)	pH após tratamento das células imobilizadas a 100°C por 10 min
6,4	39	6,1
6,4	47	6,4
7,5	39	6,6
7,5	47	6,8

Como pode ser observado, valores de pH interno e externo mais próximos entre si foram estimados para os ensaios a 47°C. No ensaio a 47°C e pH 7,5, mediu-se o mais alto pH interno, 6,8, que se situa no extremo da faixa considerada ideal para o uso de células livres de *Z. mobilis* neste bioprocessos, apoiando a hipótese apresentada para justificar os resultados deste ensaio. A partir destes resultados, pode-se sugerir que para o sistema imobilizado seria interessante a operação do processo em pH 7,5 durante a fase de máxima velocidade e, na seqüência, com valores decrescentes de pH, acompanhando a redução da velocidade da reação.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo reafirmam o potencial de aplicação da bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol a partir de lactose e frutose, respectivamente, pelo complexo GFOR/GL presente em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. Rendimentos de bioconversão aproximados de 75% foram obtidos em 24 horas de processo com o sistema imobilizado de *Z. mobilis*, com melhores resultados de produção de ácido lactobiônico sendo alcançados em 39 e 47°C e pH 6,4. Relevantes dados são acrescentados ao relativamente pequeno e restrito conjunto de informações a respeito deste bioprocessos. O tema pode, certamente, ser ainda melhor explorado com o emprego de outras técnicas e/ou suportes de imobilização e a definição de biorreatores mais eficientes.

## REFERÊNCIAS

- 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 – Sinaferm, São Carlos. Livro de Resumos, p.476. 1996.
- 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. 12<sup>th</sup> ed., Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, p.5352, 1996.
- CARRA, S., CONCATTO, K., MALVESSI, E., SILVEIRA, M. M. Cinética da ação de glicose-frutose oxidoreductase e glucono- $\delta$ -lactonase de *Zymomonas mobilis* na

presença de diferentes carboidratos. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, SINAFERM. Florianópolis, SC. CD ROM, 2003.

ERZINGER, G. S. Produção biotecnológica de sorbitol e ácido glucônico por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191: Estudo da estabilidade da enzima glicose-frutose oxidoreductase. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1999.

FERRAZ, H. C., BORGES, C. P. & ALVES, T. L. M. Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 89:43-53, 2000.

GERLING, K. G. & WILKE, D. Washing or detergent composition containing lactobionic acid or lactobionic acid salts. Kali Chemie AG, assignee U.S. Patent 5,069,808, 1991.

GOLLHOFER, D., NIDETZKY, B., FUERLINGER, M. & KULBE, K. D. Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action. *Enzyme and Microbial Technology*, 17:235-240, 1995.

GRIMES, P. E., GREEN, B. A., WILDNAUER, R. H. & EDISON, B. L. The use of polyhydroxy acid (PHAs) in photoaged skin. *Cutis*, 73:3-13, 2004.

JONAS, R. & SILVEIRA, M. M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 118:321-335, 2004.

KOEHNTOPP, P. I., PINHEIRO, H. M. V., SILVEIRA, M. M. & JONAS, R. Estudo da imobilização de *Zymomonas mobilis* em poliuretano visando a produção de

sorbitol e ácido glucônico. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações, São Carlos, São Paulo. Resumos, p.470, 1996.

MACHADO, J.J.B., COUTINHO, J.A. & MACEDO, E.A. Solid-liquid equilibrium of  $\alpha$ -lactose in ethanol/water. *Fluid Phase Equilibria*, 173:121-134, 2000.

MALVESSI, E.; CONCATTO, K e SILVEIRA, M. M. Biotransformação de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico por células de *Zymomonas mobilis*. In: V Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, Brasília, DF. Resumos, p.136-137, 2002.

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, 2006a.

MALVESSI, E., PASQUALI, F. C., CARRA, S., POLIDORO, T. A. & SILVEIRA, M. M. Bioconversão de ácido lactobiônico por endoenzimas presentes em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em diferentes configurações de biorreatores. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, ENZITEC, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. Resumos, p.64, 2006b.

MALVESSI, E., CARRA, S., AYUB, M. A. Z. & SILVEIRA, M. M. Efeito da temperatura, do pH e da concentração de substratos sobre a atividade enzimática de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM, Curitiba, Paraná, Brasil. CD-ROM, 2007.

REHR, B., WILHELM, C. & SAHM, H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35:144-148, 1991.

SATORY, M., FÜRLINGER, M., HALTRICH, D., KULBE, K.D., PITTNER, F. & NIDETZKY, B. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an membrane reactor. *Biotechnology Letters*, 19:1205-1208, 1997.

SOUTHARD, J. H. & BELZER, F. O. Organ preservation. *Annual Reviews Medicine*, 46:235-247, 1995.

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

SUMIMOTO, R., JAMIESON, N. V. & KAMADA, N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. *Transplantation*, 50:573-576, 1990.

VOGEL, R. Sorbitol. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, 34, 492-498, 2003.

YU, J. R. & VAN SCOTT, E. J. 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. Enzimas imobilizadas. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Eds. Said, S. e Pietro, R.C.L.R. Legis Summa, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, p.35-85, 2004.

## 5.6 RESULTADOS VI

Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactonase present in calcium alginate – immobilised *Zymomonas mobilis* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, submetido em junho de 2008.

**Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase / glucono- $\delta$ -lactonase present in calcium alginate – immobilised *Zymomonas mobilis* cells**

Eloane Malvessi<sup>1,2\*</sup>, Sabrina Carra<sup>1</sup>, Mauricio Moura da Silveira<sup>1</sup>  
and Marco Antônio Záchia Ayub<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, P.O. Box 1352, ZC 95001-970, Caxias do Sul, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Abstract**

In this work, the action of the enzymes glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- $\delta$ -lactonase (GL), present in calcium alginate - immobilised *Z. mobilis* cells, was characterised in relation to substrate concentration (0.05 to 2.0 M), pH (5.2 to 9.7), and temperature (34 to 59°C). Values obtained for  $K_M$  and  $V_{max}$  were 0.39 M and 8.3 units per gram of dry cells, respectively. Higher enzymatic activities were obtained at pH values of 7.8 and 8.2 and at temperatures of 47 and 50°C, which was 80 % higher than that presented in previously defined conditions for free cells: pH 6.4 and 39°C. Further analysis indicated that the results are related to the diffusional barrier represented by

calcium alginate beads that hinders the transport of gluconic acid from the inner space of the beads to the external medium. Such a behavior was reproduced during the initial moments of bioconversion performed at pH 7.8 and 47°C. Nevertheless, during the last hours of process, the reaction stopped apparently due to the occurrence of inadequate pH levels inside the beads. The results suggest that a variable pH – from 7.8 to 6.4 – and a constant temperature of about 47°C are the best conditions for the achievement of good conversion yields and productivities in this process.

**Keywords:** *Zymomonas mobilis*, glucose-fructose oxidoreductase, glucono- $\delta$ -lactonase, immobilisation, substrate, pH, temperature.

## 1. Introduction

Glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono $\delta$ -lactonase (GL), endoenzymes present in the periplasm of the Gram-negative anaerobic bacterium *Zymomonas mobilis*, catalyse the bioconversion of fructose and glucose to equimolar amounts of sorbitol and gluconic acid, respectively (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

Sorbitol is a polyalcohol with non-cariogenic properties and widely used in the food and pharmaceutical industries (VOGEL, 2003; SILVEIRA & JONAS, 2002). The main applications of gluconic acid and its salts are in the food industry and in electroplating (HUSTEDE *et al.*, 2003).

High yields in the formation of sorbitol and gluconic acid were obtained with the technique of cell immobilization, providing a higher stability of the enzyme complex and facilitating the operation of the process in a continuous mode (REHR *et al.*, 1991).

Usually, calcium alginate (JANG *et al.*, 1996), k-carrageenan (REHR *et al.*, 1991) and other polymers (KOEHNTOPP *et al.*, 1996; FERRAZ *et al.*, 2000) are used as immobilisation support.

The effect of temperature and pH on the activity of GFOR was assessed by different authors for purified GFOR (ZACHARIOU & SCOPES, 1986) and for permeabilised and immobilised *Z. mobilis* cells (CHUN & ROGERS, 1988; REHR *et al.*, 1991). In all these works a pH value in the range 6.2 to 7.0 and a temperature between 39 and 42°C are referred as optimal for the action of the enzyme. However, in a previous work (CARRA *et al.*, 2003) we observed superior results at 43 to 45°C and pH 6.4 for GFOR/GL in cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) - permeabilised *Z. mobilis* cells.

Since pH and temperature are critical parameters for any enzyme and taking in account the different conclusions reported for the GFOR/GL complex of *Z. mobilis*, the effects of these parameters on the activity of the GFOR/GL present in calcium alginate – immobilised cells of this bacterium was evaluated in this work. The best results obtained in these tests were assayed also under bioconversion conditions envisaging the production of sorbitol and gluconic acid from fructose and glucose, respectively. Furthermore, the response of GFOR/GL activity to the concentration of substrates was assessed.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Micro-organism*

The strain ATCC 29191 of *Zymomonas mobilis* was used this research. Cultures were kept at 4°C in semi-synthetic medium. Replicate cultures were made monthly.

## 2.2. Culture media

Semi-synthetic medium (MALVESSI *et al.*, 2006), used for maintenance, inocula growth, and cell biomass and enzyme production, had the following composition (g/L): glucose, 20 (maintenance), 100 (inoculum), 150 (biomass and enzyme production);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0; Prodex Lac® yeast extract (Prodesa S.A., Brazil), 7.5. For inocula preparation, 5 g/L of  $\text{CaCO}_3$  were added to the medium to avoid an excessive pH drop during the experiments. In this case, initial pH was close to 6.2. Concentrated glucose solutions and  $\text{CaCO}_3$  were separately sterilised and added to the medium before inoculation. Sterilization of nutrients and glucose solutions was done by autoclaving at 1 atm for 15 min.

## 2.3 Experimental conditions

Inocula were prepared in 500-mL anaerobic bottles, with  $\text{CO}_2$  release filters, filled with 450 mL of medium and kept under orbital agitation at 200 rpm (Certomat U, B. Braun Biotech, Germany), at 30°C, for approximately 10 h.

Batch cultivation of *Z. mobilis* cells containing GFOR/GL was carried out in a 5.5-liter stainless-steel bioreactor, equipped with two flat-blade impellers, designed and built in our laboratory. The temperature was kept at 30°C, the impeller speed was 450 rpm, and the pH was maintained at 5.5 with 5M NaOH using a Consort model R735 (Belgium) pH controller.

Cell mass was harvested from the medium by centrifugation at 6000 rpm, at 4°C, for 20 min, using a Sigma 4K-15 centrifuge (B. Braun Biotech, Germany) and the cells were re-suspended in distilled water. Concentrated cells were permeabilised with 0.2 %

CTAB (w/v) in order to stop cell metabolism, according to the procedure described by REHR *et al.* (1991) with some modifications.

#### *2.4. Immobilisation of Zymomonas mobilis cells*

In order to immobilise *Z. mobilis* cells in calcium alginate, the methodology described by ERZINGER (1999) was used with some modifications. Equal volumes of *Z. mobilis* cell suspension (50 g/L) were added to 4% (w/v) sodium alginate (Algogel 5540, Degussa Flavours & Fruit Systems do Brasil Ltda) solutions. The mixture was kept under agitation for 2 hours for complete homogenisation and then drop-wise poured through hypodermic needles onto a 0.3M CaCl<sub>2</sub> solution under magnetic stirring in order to form calcium alginate beads with cells. The cell suspension and the beads thus formed were reticulated with 0.5% (w/v) glutaraldehyde for 15 min under magnetic stirring at room temperature. The calcium alginate beads were kept at 4°C in distilled water and were afterwards used in enzymatic activity and bioconversion comparative assays.

#### *2.5. Effects of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of GFOR/GL present in calcium alginate – immobilised Z. mobilis*

To determine the kinetic parameters  $K_M$  and  $V_{max}$  of GFOR/GL present in calcium alginate – immobilised *Z. mobilis*, enzymatic activity was determined on equimolar glucose and fructose solutions (0.05 to 2.0 M), under standardised conditions (cell concentration, 10 g/L; temperature, 39°C; pH, 6.4).

The enzymatic activity of GFOR/GL in *Z. mobilis* cells immobilised in calcium alginate was tested at different pH (5.2 to 9.7) and temperatures (34 to 59°C) and glucose/fructose concentrations.

The thermal stability of the enzymatic complex present in calcium alginate beads was evaluated in tests that consisted of four successive 3-hour bioconversion runs, at pH of 6.4 or 7.8 and temperatures of 39, 43, and 47°C.

### *2.6. Bioconversion experiments*

The bioconversion assays were performed in a 600 mL glass reactor containing 240 mL of 0.7 M glucose/fructose solution and 20 g/L of previously permeabilised and immobilised cells. The temperature of the reactor was maintained at the desired values by placing it into a water bath. The pH was controlled by automatic addition of a 7.0 M NaOH solution through a pH controller (Consort R735, Belgium). A magnetic stirrer provided the agitation of the reaction medium.

The maximum specific rate of gluconic acid formation ( $v_m$ , mmol gluconic acid / g cell / h), which depends on the activity of GFOR/GL, was determined during the first hour of each bioconversion process.

### *2.7. Analytical methods*

Cell concentration was determined by measuring the optical density of cell suspensions at 560 nm. Turbidimetric measurements gave a linear relationship with dry cell mass for each case.

GFOR/GL activity in calcium alginate – immobilised *Z. mobilis* cells was determined by mixing an amount of calcium alginate beads to give 10 g/L of cell biomass and 0.7 M solution of glucose/fructose in a 300 mL reactor. The system was kept in a water bath, at the desired temperature, under magnetic agitation, with pH being automatically controlled at 6.4 or 7.8 by the addition of 1 M NaOH. One unit of GFOR/GL was defined

as the amount of enzymatic complex responsible for the production of 1 mmol of gluconic acid per hour under the assay conditions. GFOR/GL activities in this work are presented in units per gram of dry cells (U/g).

The concentration of gluconic acid was stoichiometrically inferred from the volume of alkali used to control pH.

To estimate the values of pH within the alginate beads, samples of beads were collected from the bioconversion reactor, drained, and added to deionised boiling water to inactivate GFOR/GL complex and, therefore, to stop the reaction.

The relationship between the volumes of alginate beads and boiling water was the same as that used in the bioreactor. After 24 hours, pH of the liquid phase was measured and these values were considered as an estimation of the internal pH of alginate beads.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Michaelis-Menten kinetic parameters of GFOR/GL present in calcium alginate – immobilised *Zymomonas mobilis**

Initially, the effect of substrate concentrations on the catalytic activity of the immobilised GFOR/GL present in calcium alginate immobilised *Zymomonas mobilis* was investigated. The results are depicted in Figure 1. Increasing activities were observed with equimolar concentrations of glucose and fructose up to 0.7 M. Within the range 0.7-1.3 M of substrate, similar activities were achieved, whereas for substrate concentrations higher than 1.3 M the activity decreased. From these data, the kinetic parameters  $K_M$  and  $V_{max}$  of the Michaelis-Menten equation were estimated by using the

Lineweaver-Burk plot: 0.39 M and 8.3 U/g, respectively. These values are lower than those obtained for free cells (0.68 M and 52 U/g) under the same operational conditions (CARRA *et al.*, 2003). Such a difference was probably due to the diffusional barrier of the immobilised system, with lower mass transfer rates than that of the free-cell system.

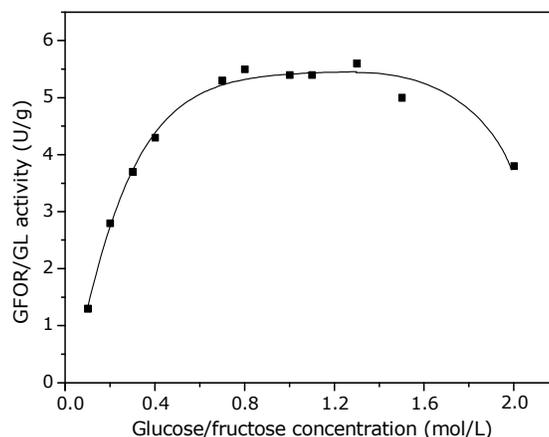


Figure 1 – Variation of the activity of GFOR/GL in calcium alginate-immobilised *Zymomonas mobilis* cells with the concentration of glucose and fructose. The reactions were performed at pH 6.4 and 39°C.

### 3.2. Effects of pH and temperature on the activity of GFOR/GL in calcium alginate immobilised *Zymomonas mobilis* cells

In these tests, pH 6.4 and temperature of 39°C were used as standard conditions, since they were reported as the optimal by several authors. In the further discussion of this work, these conditions represent 100 % of GFOR/GL activity, being the values found in the different tests presented in a relative way.

As shown in Figure 2A, the best results of enzymatic activity with immobilised cells were achieved with pH in between 7.7 and 8.7, significantly higher than the values normally reported, showing an increase of approximately 55%. Under the tested conditions, pH

values above 9.0 and below 5.5 had a negative effect on the enzymatic activity. This was not observed in previous works with immobilised *Z. mobilis* cells (CHUN & ROGERS, 1988; REHR *et al.*, 1991), being this probably due to the different immobilisation conditions used.

With respect to the temperature, activity assays were carried out in the range of 34 to 59°C and results are shown in Figure 2B. An increase of approximately 35% in the enzymatic activity was observed between 44 and 52°C when compared to results obtained at 39°C.

Some of the best results for pH and temperature, as shown in Figure 2, were combined and compared with the standard conditions used to determine the enzymatic activity of immobilised system.

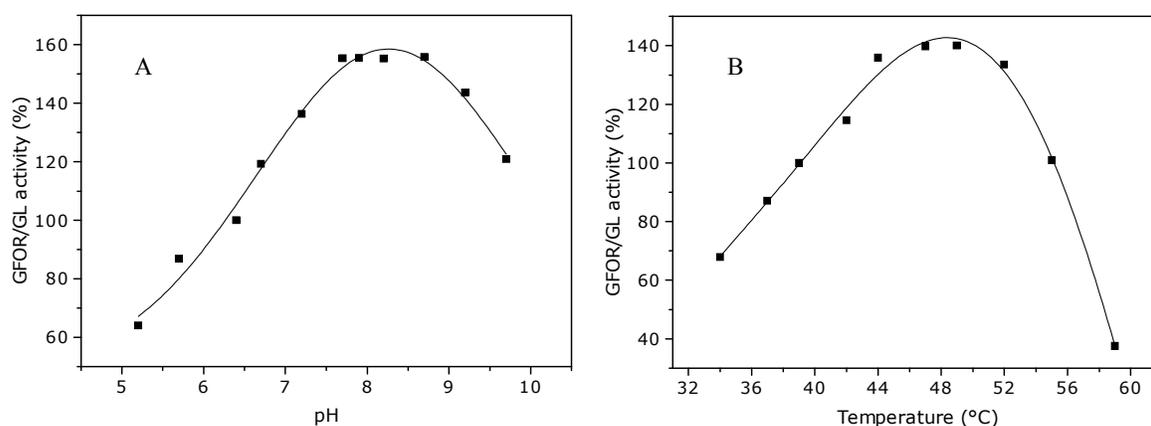


Figure 2 – Influence of pH [A], at 39°C, and temperature [B], at pH 6.4, on the enzymatic activity of the GFOR/GL complex present in calcium alginate - immobilised *Zymomonas mobilis*. Reactions were carried out in 0.7M glucose/fructose solution.

These results are summarised in Table 1 where it can be seen that the combination of temperatures in the range 47-50°C and pH values of 7.8-8.2 led to GFOR/GL activities over 80 % above those measured at the standard conditions (pH 6.4 and 39°C). The

higher enzymatic activity obtained with pH values above those normally used with non-immobilised cells could be related to the diffusional barrier represented by the calcium alginate beads that would difficult the contact between substrates and enzymes. In this case, the accumulation of gluconic acid inside the calcium alginate beads would lead to the reduction of pH in the inner space of beads, affecting, consequently, the behaviour of the enzymatic system. As such, higher external pH values would promote the increase of pH inside the beads to levels near the ideal point for the non-immobilised system, thus favouring the reaction.

Table 1 – Effect of combined values of temperature and pH on the GFOR/GL activity in calcium alginate immobilised *Zymomonas mobilis* cells. The activities are presented in relation to that measured at the standard conditions (pH 6.4 and 39°C).

Temperature (°C)	Relative GFOR/GL activity (%)			
	pH 6.4	pH 7.8	pH 8.2	pH 8.7
39	100	152	nd	nd
43	130	173	167	151
45	127	178	170	nd
47	144	183	181	165
50	154	184	nd	178
52	nd	171	nd	nd

nd – not determined

With respect to the results of reaction temperature tests in which superior activities were found at 47-50°C, one can suggest that the higher temperatures led to the occurrence

of a greater diffusion flux through the alginate beads thus allowing a more adequate environment for the action of GFOR/GL.

To check such a hypothesis, the internal pH of calcium alginate beads was estimated after 5 hours of bioconversion carried out at different temperatures and values of pH. The results are shown in Table 2. In all cases, pH values were significantly lower than 6.4 that is considered as the optimal for free *Z. mobilis* cells, as already mentioned. By comparing the results, however, one can see that higher external pH and temperature resulted in an internal reaction condition closer to the optimal for the enzymatic system.

Table 2 – Internal pH of calcium alginate beads containing CTAB-permeabilised *Zymomonas mobilis* cells after 5 hours of bioconversion at different temperature and pH values. Reactions were carried out in 0.7 M glucose/fructose solution.

Reaction pH	Reaction temperature (°C)	pH after treatment with deionised boiling water
6.4	39	5.1
6.4	47	5.4
7.8	39	5.4
7.8	47	5.6

### 3.3. Bioproduction of gluconic acid and sorbitol with immobilized *Zymomonas mobilis* under different pH and temperature

With the aim of assessing the effect of pH and temperature on the bioconversion process, the standard conditions described in the literature (pH 6.4 and 39°C) were

compared with those determined as optimal in the previous experiments of the present work (pH 7.8 and 47°C) at different combinations of these parameters. The general results of these experiments are shown in Table 3 whereas the time course of each run is depicted in Figures 3A and 3B.

Table 3 – Results of bioconversion runs carried out at different temperatures and pH values with calcium alginate immobilised *Zymomonas mobilis* cells. For all cases, initial glucose/fructose concentration 0.7 M was used.

pH / temperature (°C)	Maximum specific rate of gluconic acid formation (mmol/g/h)	Conversion yield (% of theoretical maximum)
6.4 / 39	5.2	95
6.4 / 47	7.9	93
7.8 / 39	8.3	93
7.8 / 47	8.9	82

As shown in Table 3, the maximum specific rate of gluconic acid formation ( $v_m$ ), calculated during the first hour of process, was favoured when pH was kept at 7.8 for both temperatures or at 47°C for both pH values. Such results corroborate the prior conclusions obtained from the activity tests, but only partially, since the difference in enzyme action between the bioconversion run carried out at pH 7.8 and 47°C and the further conditions tested was not so large as that shown in Table 1.

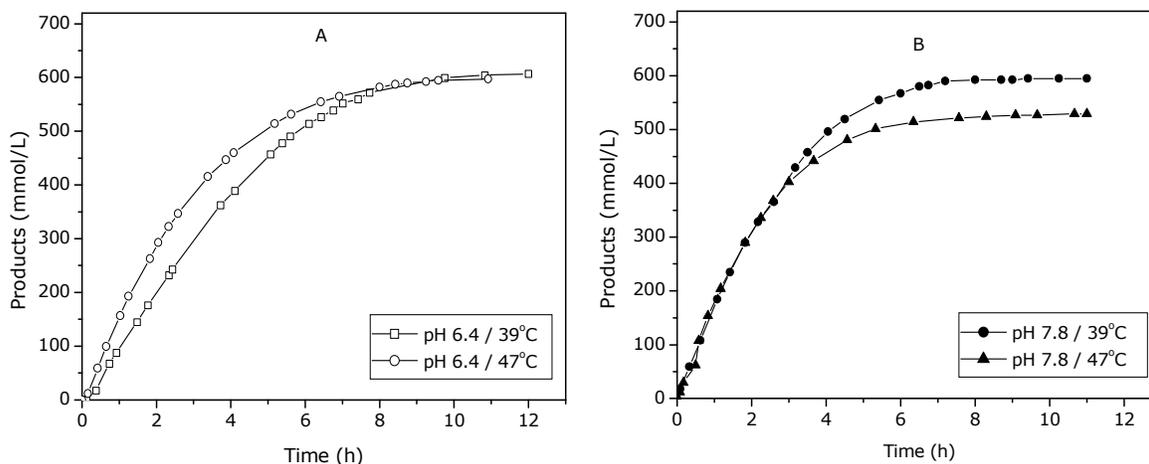


Figure 3 – Time course of gluconic acid production at different pH and temperatures values with calcium alginate - immobilised *Zymomonas mobilis* cells. For all cases, initial glucose/fructose concentration of 0.7 M was used.

As shown in Figures 3A and 3B, process times were longer at pH 6.4 (9 to 10 hours). At this pH, conversion yields over 90 % of the theoretical maximum were obtained (Table 3). At pH 7.8 and 39°C, the reaction was finished after 7-8 hours (Figure 3B) and a conversion yield of 93 % was attained (Table 2). For the experiment performed at pH 7.8 and 47°C, however, the run stopped after ca. of 6 hours (Figure 3B) and only 82 % of the substrate was converted to product despite the highest  $v_m$  calculated for this condition (Table 3).

The thermal de-activation of the enzymatic complex can be taken in account as an immediate hypothesis to explain the behaviour observed in the bioconversion at 47°C and pH 7.8. According to GOLLHOFER *et al.* (1995), the loss of activity of GFOR is linked to its own catalytic action. Thus, one could suppose that the interruption of bioconversion would be a direct consequence of the intense activity at this condition. Such an interpretation, however, fails if considered the similar values of  $v_m$  calculated for the experiments at pH 7.8 and 39°C and pH 6.4 and 47°C in which significantly higher conversion yields were obtained.

Another possibility to explain these results is that a high pH value of the reaction medium favors the action of the GFOR/GL complex present in calcium alginate immobilised *Zymomonas mobilis* cells, since an adequate pH for the enzyme activity – close to 6.4 – would be present in the inner space of the beads. In this case, three aspects must be taken in account: i) pH equilibrium between inner and outer space of calcium alginate beads depends on the mass flux of substrates and products, especially on the gluconic acid flux, ii) mass flux depends on the concentration of substrates and products in both inner and outer space of beads, and iii) concentrations of all of these substances in medium or inside the beads depend on their rates of formation or consumption as well as on the mass flux.

The ideal pH range for the immobilised system was defined from results obtained in the activity tests, which take about 1 hour to be accomplished. As such, in the short time course of these tests, a permanently high mass flux, close to the maximum, would have occurred in the system providing equilibrium at constant pH values inside and outside the calcium alginate beads. In bioconversion conditions, on the other hand, gluconic acid formation rate, which is almost constant ( $v_m$ ) up to 3-4 hours of process (Figure 3A and 3B), shows decreasing values as substrates are consumed and, therefore, enzyme/substrate affinity is reduced. Thus, gluconic acid mass flux would also decrease and the pH inside the beads would increase towards the concentration present in the medium, being that a possible explanation for the bioconversion at pH 7.8 and 47°C. In a previous work of our group (unpublished data), no activity of GFOR/GL was detected in free cells of *Z. mobilis* at pH 7.8 and 39°C.

To support the prior discussion, four successive 3-hour bioconversion experiments using the same calcium alginate beads were performed to evaluate the thermal stability

of the immobilised system at different pH values and temperatures. The results of these tests are represented in Figure 4.

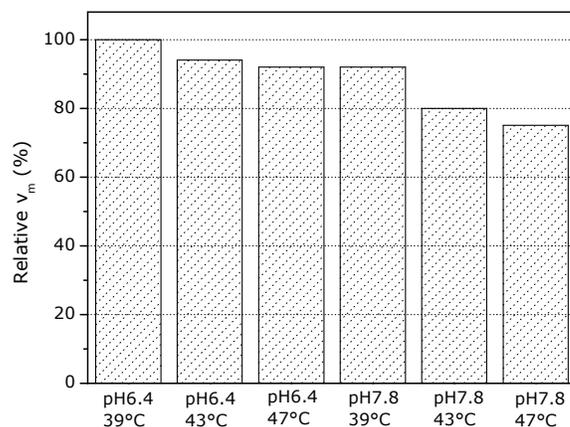


Figure 4 – Remaining specific gluconic acid formation rates measured after four successive 3-hour bioconversion runs with calcium alginate - immobilised *Zymomonas mobilis* cells, at different pH values and temperatures. Initial glucose/fructose concentration of 0.7 M was used in each cycle.

As shown in Figure 4, as pH and temperature got closer to the best conditions for the expression of the enzymatic activity in immobilised system (pH 7.8 and 47°C), larger losses of enzymatic activity from the first to the fourth cycle of bioconversion were noticed, agreeing with the conclusions previously reported by GOLLHOFER *et al.* (1995). At pH 7.8 and 47°C, however, almost 75 % of the specific gluconic acid formation rate, which is dependent on the enzymatic activity, remained in the beads after a total operation time of 12 hours. Then, the early interruption of gluconic acid formation verified in the bioconversion at pH 7.8 and 47°C could not be attributed exclusively to the thermal de-activation of GFOR/GL, reinforcing the hypothesis of an inadequate pH inside the beads after the initial hours of process.

In Figure 5 is depicted the time course of an experiment carried out at 47°C in which pH was initially controlled at 7.8 and afterwards changed to 6.4 when the reaction rate begin to decrease (curve A). The variation of gluconic acid with time in the experiment run completely at pH 7.8 and 47°C (curve B) is also shown to facilitate the comparison between the two conditions.

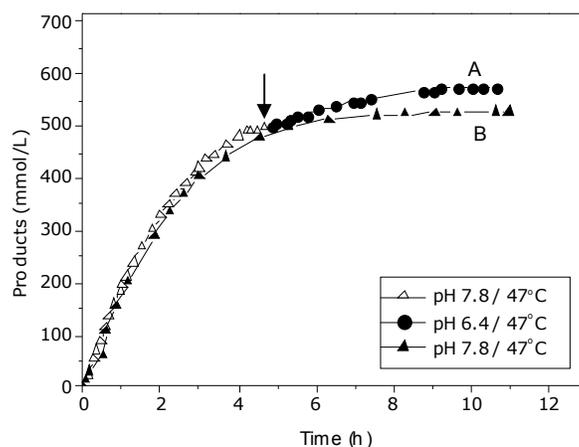


Figure 5 - Time course of gluconic acid production at different pH and temperatures values with calcium alginate - immobilised *Zymomonas mobilis* cells. The initial pH of both bioconversion runs (A and B) was 7.8. In the bioconversion represented by the curve A, the pH value was changed to 6.4 at the time indicated by the arrow. For all cases, initial glucose/fructose concentration of 0.7 M was used.

As can be seen in the Figure 5, curve “A” shows a trend towards stabilisation in a similar way of curve “B”. However, from the moment pH was reduced to 6.4, the reaction rate increased and a conversion yield over 90% was achieved, confirming the interpretation presented in this work and suggesting that a variable pH value should be used along the process in order to obtain both high conversion yield and productivity.

#### **4. Conclusions**

The biotechnological process for sorbitol and gluconic acid production can become economically feasible if an efficient and stable enzymatic system is available. In this work, we improved the knowledge on the sorbitol and gluconic acid production by enzymatic glucose-fructose oxidoreductase / glucono- $\delta$ -lactonase system of *Z. mobilis* immobilised in calcium alginate. Our results have confirmed that the immobilised system is stable and can be used in long-term operation. On the other hand, the diffusional barrier represented by calcium alginate beads hinders the transport of gluconic acid from the inner space of the beads to the external medium, resulting in an inadequate environment for enzyme action. As such, a higher external pH values would promote a pH increase inside the beads to values close to the ideal value for the free enzyme complex, whereas higher temperatures would lead to a greater mass flux for substrates and products thus allowing a more adequate environment for the enzyme action. The results suggest that a variable pH and a constant temperature are the best conditions for the achievement of good conversion yields and productivities in this process.

#### **Acknowledgments**

This work was financed by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Universidade de Caxias do Sul (UCS) and Post-Graduation Programme on Cellular and Molecular Biology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Sabrina Carra received scholarships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

Carra S, Concatto K, Malvessi E, Silveira MM. Cinética da ação de glicose-frutose oxidorreductase e glucono- $\delta$ -lactonase de *Zymomonas mobilis* na presença de diferentes carboidratos. In: Anais do XIV SINAIFERM – Simpósio Nacional de Fermentações, CD-ROM, Florianópolis, SC, Brazil 2003, T281.

Chun UH, Rogers PL. The simultaneous production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol Biotechnol 1988;29:19-24.

Erzinger GS. Produção biotecnológica de sorbitol e ácido glucônico por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191: estudo da estabilidade da enzima glicose-frutose oxidorreductase. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo Brasil 1999.

Ferraz HC, Borges CP, Alves TLM. Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. Appl Biochem Biotechnol 2000;89:43-53.

Gollhofer D, Nidetzky B, Furlinger M, Kulbe, KD. Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action. Enzyme Microbial Technol 1995;17:235-240.

Hustede H, Haberstroh HJ, Schinzic E. Gluconic acid. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim 2003;15:211-216.

Jang K., Jung SJ, Chang HS & Chun U. Improvement of the process for sorbitol production with *Zymomonas mobilis* immobilised in k-carrageenan. Proc Biochem 1996;31:485-492.

- Koenhtopp PI, Pinheiro HMV, Silveira MM, Jonas R. Estudo da Imobilização de *Zymomonas mobilis* em poliuretano visando a produção de sorbitol e ácido glucônico. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações – Sinaferm, São Carlos, SP 1996;p470.
- Malvessi E, Concatto K, Carra S, Silveira MM. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. Braz Arch Biol Technol 2006; 9:139-144.
- Rehr B, Wilhelm C, Sahm H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol Biotechnol 1991;35:144-148
- Silveira, MM, Jonas, R. The biotechnological production of sorbitol. Appl Microbiol Biotechnol 2002;59:400-408.
- Vogel R. Sorbitol. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim Germany 2003;34:492-498.
- Zachariou M, Scopes R K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J Bacteriol 1986;3:863-869.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

---

Como resultado geral mais expressivo, este estudo destaca a potencialidade da bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol a partir de lactose e frutose, respectivamente, pelo complexo glicose-frutose oxidorreductase / glucono- $\delta$ -lactonase (GFOR/GL) presente em células da bactéria anaeróbia *Zymomonas mobilis*. Adicionalmente, obtiveram-se novas informações sobre a produção de GFOR/GL e de etanol por *Z. mobilis* e sobre as características deste complexo enzimático com relação a alguns parâmetros fundamentais.

Na etapa inicial, foi abordada a etapa fermentativa em biorreator de bancada, na qual foi estudada a produção de biomassa/enzimas e etanol, comprovando-se a possibilidade de uso de um extrato de levedura bruto, de baixo custo, como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico no cultivo de *Z. mobilis*. Também foi comparado o efeito da condução do regime descontínuo e descontínuo alimentado de fermentação, comprovando-se a conveniência do emprego do regime descontínuo alimentado para a obtenção de atividade de GFOR/GL semelhante à obtida em batelada e concentração de etanol acima de

90 g/L, com a produtividade, neste caso, sendo favorecida pela não ocorrência de inibição pela concentração de glicose. Ressalte-se que o etanol pode ser incluído como um importante componente do balanço econômico do processo.

Na seqüência, foram conduzidos os estudos enzimáticos e de bioconversão. Em reator de mistura completa, avaliaram-se diferentes aldoses que, associadas a frutose, permitiram a obtenção de sorbitol e dos respectivos ácidos orgânicos, respectivamente, pelo complexo GFOR/GL contido em células *Z. mobilis*. São raras as informações sobre a atividade catalítica de GFOR/GL frente a substratos alternativos a glicose. Maior atenção foi dada à lactose, apesar da menor afinidade entre o complexo enzimático GFOR/GL e este substrato, tendo em vista a importância comercial do produto formado na reação, o ácido lactobiônico, obtendo-se concentração deste produto superior a 500 mmol/L, com conversão de 85%.

Nos testes enzimáticos realizados, obtiveram-se dados importantes em termos de atividade e estabilidade enzimática frente ao pH, temperatura e concentração de substratos, com células livres e imobilizadas em alginato de cálcio. Com o sistema imobilizado de *Z. mobilis*, particularmente, amplas faixas de pH (6,4 a 7,5) e temperatura (39 a 47°C) para a atividade enzimática foram verificadas, constando-se, ainda, a possibilidade de reutilização das células imobilizadas em processos consecutivos. Apesar da menor velocidade de formação de produto obtida neste sistema (50% inferior em relação ao uso de células livres), em função, principalmente, de problemas de transferência de massa, o custo da imobilização pode ser compensado pelo alto valor agregado e pelas aplicações do ácido lactobiônico na área médica e na de cosméticos.

A bioprodução de ácido lactobiônico, nas condições previamente definidas, mostrou elevada conversão (cerca de 85 %), com concentrações finais de produto superiores a 20% (m/v). Estes dados são ainda mais relevantes por tratar-se de um processo biotecnológico, operado em condições brandas de pH e temperatura, para o qual prevê-se um custo de instalação relativamente baixo.

## 7 PERSPECTIVAS

---

Este trabalho demonstrou a viabilidade da bioprodução de sorbitol e ácidos orgânicos por enzimas de *Zymomonas mobilis*, deixando em aberto, no entanto, vários aspectos do processo que necessitam ser aprofundados. A seguir, são mencionados alguns estudos em desenvolvimento nesta linha de pesquisa.

A partir deste estudo, foi concluída uma dissertação de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIO) da UCS, em que avaliou-se o uso do sistema de eletrodialise para a separação de sorbitol e ácido lactobiônico.

Na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, numa tese de doutoramento, vem sendo estudada a separação dos mesmos produtos por cromatografia.

Ainda no ano de 2008, prevê-se a submissão ao PPGBIO da UCS um projeto de dissertação em que será abordada a operação do sistema imobilizado em biorreator de coluna em leito fixo e leito fluidizado em regimes descontínuo e contínuo.

A produção de GFOR/GL e etanol em regime descontínuo alimentado, com diferentes estratégias de alimentação, continua em estudo, uma vez que o etanol pode ser usado na etapa de recuperação dos produtos por precipitação por solventes, além do interesse nas suas muitas aplicações industriais e como combustível.

Considerando a aplicação do ácido lactobiônico na indústria de cosméticos, a substância produzida pelo bioprocessamento com *Z. mobilis* está sendo caracterizada com respeito aos isômeros formados e avaliada com respeito à sua capacidade antioxidante em testes *in vitro* e *in vivo*. Na seqüência, contando com a participação de pesquisadores da área da Farmácia, serão desenvolvidas formulações de cosméticos tendo o ácido lactobiônico produzido por este processo como princípio ativo.

## 8 REFERÊNCIAS

---

BARQUET, A. P., FUNCK, A. P. G. & KOESTER, L. S. Comparação entre alfa-hidroxiácidos e poli-hidroxiácidos na cosmiatria e dermatologia. *Revista Brasileira de Farmácia*, 87:67-73, 2006.

BERGFELD, W., TUNG, R., VIDIMOS, A., VELLANKI, L. REMZI, B. & STANTON-HICKS, U. Improving the cosmetic appearance of photoaged skin with glycolic acid. *Journal of American Academic Dermatology*, 36:1011-1013, 1997.

BERTASSO, M., SILVEIRA, M. M. & MANCILHA, I. M. Preservação da atividade da enzima glicose-frutose oxidoredutase em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações – Sinaferm, São Carlos. Livro de Resumos, p.476. 1996.

BRINGER-MEYER, S & SAHM, H. Process for obtaining sorbitol and gluconic acid by fermentation, and cell material suitable for this purpose. US Patent 448,334 1991.

BUCCHHOLZ, S. E., DOOLEY, M. M. & EVELEIGH, D. E. *Zymomonas* – an alcoholic enigma. *Trends in Biotechnology*, 5:199-204, 1987.

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. 12<sup>th</sup> ed., Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, p.757, 5352, 8871, 1996.

CARRA, S., CONCATTO, K., MALVESSI, E., SILVEIRA, M. M. Cinética da ação de glicose-frutose oxidorreductase e glucono- $\delta$ -lactonase de *Zymomonas mobilis* na presença de diferentes carboidratos. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações – Sinaferm, Florianópolis. T282, CD ROM, 2003.

CHARLOUX, C., ISHII, K., PAUL, M., LOISANCE, D., ASTIER, A. Reduced production of the deleterious hydroxyl free radical during the final reperfusion of isolated rabbit heart with the use of an improved sodium lactobionate-based cardioplegic medium. *Journal of Heart Lung Transplant*, 13: 481-488, 1994.

CHARLOUX, C., PAUL, M., LOISANCE, D., ASTIER, A. Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. *Free Radical Biology and Medicine*, 19: 699-704, 1995.

CHUN, U. H. & ROGERS, P. L. The simultaneous production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29: 19-24, 1988.

DITRE, M.C., GRIFFIN, T., MURPHY, G. F. SUEKI, H., TELEGAN, B., Johnson, W. C., YU, R. J. & VAN SCOTT, E. J. Effects of  $\alpha$ -hydroxy acids on photoaged skin: A pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. *Journal of American Academy of Dermatology*, 34:187-195, 1996.

DOELLE, H. W. Bacterium metabolism. 2ed. *Academic Press*, New York, p.208-260,1975.

DOELLE, W. & GREENFIELD, P. F. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22:40-41,1985.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82:47-95, 2002.

ERZINGER, G. S. Influência da concentração de glicose e etanol sobre a atividade de glicose-frutose oxidorreductase em *Zymomonas mobilis* ATCC29191. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, USP, Brasil, 1996.

ERZINGER, G. S.; SILVEIRA, M. M.; VITOLO, M. & JONAS, R. Determination of glucose-fructose oxidoreductase activity in whole cells of *Zymomonas mobilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12:22-24, 1996.

ERZINGER, G.S. Produção biotecnológica de sorbitol e ácido glucônico por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191: Estudo da estabilidade da enzima glicose-frutose oxidorreductase. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 1999.

ERZINGER, G. S., SILVEIRA, M. M., LOPES DA COSTA, J. P. C., VITOLO. M. & JONAS, R. Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:329-333, 2003.

FEIN, J. E., CHARLEY, R. C., HOPKINS, K. A., LAVERS, B. & LAWFORD, H. G. Development of a simple medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 5:1-6, 1983.

FERRAZ, H. C., BORGES, C. P. & ALVES, T. L. M. Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 89:43-53, 2000.

FERRAZ, H. C., BORGES, C. P. & ALVES, T. L. M. Coupling of electro dialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol

produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized. *Journal of Membrane Science*, 191:43-51, 2001.

FREITAS, V. A. Produção de sorbitol: análise técnico-econômica dos processos eletroquímico e catalítico. Proposta de um projeto básico. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, Brasil, 1990.

FÜRLINGER, M., HALTRICH, D., KULBE, K. D. & NIDETZKY. A multistep process is responsible for product-induced inactivation of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *European Journal of Biochemistry*, 251:955-963, 1998.

GERLING, K. G. & WILKE, D. Washing or detergent composition containing lactobionic acid or lactobionic acid salts. Kali Chemie AG, assignee US Patent 5,069,808, 1991.

GIBBS, M. & DE MOSS, R. D. Anaerobic dissimilation of C<sup>14</sup> labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. *Journal of Biological Chemistry*, 207: 689-694, 1954.

GOLLHOFER, D., NIDETZKY, B., FÜRLINGER, M. & KULBE, K. D. Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action. *Enzyme and Microbial Technology*, 17:235-240, 1995.

GREEN, B. A., WILDNAUER, R. H. & BRENDA, L. E. Lactobionic Acid - A Novel Polyhydroxy Bionic Acid for Skincare, Neostrata Company Inc., Princeton, NJ, USA, 2001. Disponível (*on line*) em 18 de abril de 2005: [http://www.neostrata.com/a\\_cse/cse\\_es\\_04.asp](http://www.neostrata.com/a_cse/cse_es_04.asp).

GREEN, B. After 30 years...the future of hydroxyacids. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 4:44-45, 2005.

GRIMES, P. E., GREEN, B. A., WILDNAUER, R. H. & EDISON, B. L. The use of polyhydroxy acid (PHAs) in photoaged skin. *Cutis*, 73:3-13, 2004.

GROEN, B. W., DE WRIES, S. & DUINE, J. A. Characterization of the hexose oxidase from the red seaweed *Chondrus crispus*, 1997 apud NORDKVIST, M., NIELSEN, P. M. & VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. *Biotechnology and Bioengineering*, 97:694-707, 2007.

GUNASEKARAN, P. & CHANDRA, K. R. Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*. *Current Science*, 77:56-68, 1999.

HARDMAN, M. J. & SCOPES, R. K. The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *European Journal of Biochemistry*, 173:203-209, 1988.

HAIDEGGER, E. The importance of hydrogenation in the processing of carbohydrates, 1977 apud SILVEIRA, M. M. & JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:40-408, 2002.

HOFFHINE, C. E. Aqueous soluble salts of erythromycin. US Patent 2,761,859, 1956 apud NORDKVIST, M., NIELSEN, P. M. & VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. *Biotechnology and Bioengineering*, 97:694-707, 2007.

HUA, L., NORDKVIST, M., NIELSEN, P. M. & VILLADSEN, J. Scale-up of enzymatic production of lactobionic acid using the rotary jet head system. *Biotechnology and Bioengineering*, 97:842-849, 2007.

HUSTEDE, H.; HABERSTROH, H.J.; SCHINZIC, E. Gluconic acid. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, 12:2449-456, 1985.

HUSTEDE, H.; HABERSTROH, H.J.; SCHINZIC, E. Gluconic acid. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, 15:211-216, 2003.

JAMIESON, N. V., LINDELL, S, SUNDBERG, R., SOUTHARD, J. H., BELZER, F. O. An analysis of the components in UW solution using isolated perfused rabbit liver. *Transplantation*, 46: 512, 1998.

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.

JANG, K. H., JUNG, S. J., CHANG, H. S. & CHUN, U. H. Improvement of the process for sorbitol production with *Zymomonas mobilis* immobilised in k-carrageenan. *Process Biochemistry*, 31:485-492, 1996.

JOACHIMSTHAL, E. HAGGETT, K. D., JANG, J. H. & ROGERS, P. L. A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations. *Biotechnology Letters*, 20:137-142, 1998.

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

KARAM, G., COMPAGNON, P., HOURMANT, M., DESPINS, P., DUVEAU, D., NOURY, D. & BOUDJEMA, K. A single solution for multiple organ procurement and preservation. *Transplant International*, 18:657-663, 2005.

KAREL, S.F., LLIBICKI, S.B., ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells-engineering principles, 1985 apud KOURKOUTAS, Y., BEKATOROU, A., BANAT, I. M., MERCHANT, R. & KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21:377–397, 2004.

KAWAGUTI, H. Y., BUZZATO, M., SATO, H. H. Isomaltulose production using free cells: optimization of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34:4:261-269, 2007.

KLUYVER, A. J., DE LEY, J. & RIJVEN, A. The formation and consumption of lactobionic and maltobionic acids by *Pseudomonas* species. *Anton van Leeuwenhoek*, 17:1-14, 1951.

KOEHNTOPP, P. I., PINHEIRO, H. M. V., SILVEIRA, M. M. & JONAS, R. Estudo da Imobilização de *Zymomonas mobilis* em poliuretano visando a produção de sorbitol e ácido glucônico. In: XI Simpósio Nacional de Fermentações – Sinaferm, São Carlos. Livro de Resumos, p.470, 1996.

KOURKOUTAS, Y., BEKATOROU, A., BANAT, I. M., MERCHANT, R. & KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21:377–397, 2004.

LAWFORD, G. R., LAVERS, B. H., GOOD, D., CHARLEY, R. & FEIN, J. E. *Zymomonas* ethanol fermentation: biochemistry and bioengineering. In: International Symposium of Ethanol from Biomass, Royal Society of Canada: Duckworth, H. E. (ed), 482-507, 1982.

LAWFORD, H.G. & ROUSSEAU, J. D. Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas mobilis* ethanol fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63-65: 287-304, 1997.

LEIGH, D., SCOPES, R. K. & ROGERS, P. L. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20: 413-415, 1984.

LEMMEL, C. M., SILVEIRA, M. M., ERZINGER, G. S., KOENHTOPP, P. I. & JONAS, R. Production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*: comparison of strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 35:591-594, 1992.

LIN, Y & TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69:627-642, 2006.

LIMA, O. G., SCHUMACHER, I. E. & ARAÚJO, J. M. New observations about the antagonist effects of *Zymomonas mobilis* var *recifensis*, ecological aspects of some problems in microbiology. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 12:57-68, 1972.

LOOS, H., VÖLLER, M., REHR, B., STIERHOF, Y. D., SAHM, H. & SPRENGER, G. A. Localisation of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 84:211-216, 1991.

LOOS, H. KRÄMER, R., SAHM, H. & SPRENGER, G. A. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence from a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *Journal of Bacteriology*, 176:7688-7693, 1994.

LYNESS, E. & DOELLE, H. W. Fermentation pattern of sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23:1449-1469, 1981.

MALVESSI, E.; CONCATTO, K e SILVEIRA, M. M. Biotransformação de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico por células de *Zymomonas mobilis*. In: V Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, Brasília. Livro de Resumos, p.136-137, 2002.

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., PASQUALI, F. C., CARRA, S., POLIDORO, T. A. & SILVEIRA, M. M. Bioconversão de ácido lactobiônico por endoenzimas presentes em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em diferentes configurações de biorreatores. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, ENZITEC, Caxias do Sul. Livro de Resumos, p.64, 2006b.

MALVESSI, E., CARRA, S., AYUB, M. A. Z. & SILVEIRA, M. M. Efeito da temperatura, do pH e da concentração de substratos sobre a atividade enzimática de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio. In: XIV Simpósio Nacional de Bioprocessos – Sinaferm, Curitiba. PFE0402, CD ROM, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428, 1959.

MIYAMOTO, Y., OOI, T. & KINOSHITA, S. Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas* sp. LS13-1. *Biotechnology Letters*, 22:427-430, 2000.

MOHAGHEGHI, A., DOWE, N., SCHELL, D., CHOU, Y. C., EDDY, C. & ZHANG, M. Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnology Letters*, 26:321-325, 2004.

MÜHLBACHER F, LANGER F, MITTERMAYER C Preservation solutions for transplantation. *Transplant Process*, 31:2069-2070, 1999.

MUKHOPADHYAY, R., CHATTERJEE, S., CHATTERJEE, B. P., BANERJEE, P. C. & GUHA, A. K. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*, 15:299-303, 2005.

MURAKAMI, H., KAWANO, J., YOSHIZUMI, H., NAKANO, H. & KITAHATA, S. Screening of lactobionic acid producing microorganisms. *Journal of Applied Glycoscience*, 49:460-477, 2002.

MURAKAMI, H., SEKO, A., AZUMI, M., UESHIMA, N., YOSHIZUMI, H., NAKANO, H. & KITAHATA, S. Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Glycoscience*, 50:117-120, 2003.

MURAKAMI, H., SEKO, A., AZUMI, M., KISO, T., KIRYU, T., KITAHATA, S., SHIMADA, Y. & NAKANO, H. Microbial conversion of lactose to lactobionic acid by resting cells of *Burkholderia cepacia* No. 24. *Journal of Applied Glycoscience*, 53:7-11, 2006.

NIDETZKY, B., FÜRLINGER, M., GOLLHOFER, D., SCOPES, R. K., HALTRICH, D. & KULBE, K. D. Improved operational stability of cell-free glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* for the efficient synthesis of sorbitol and gluconic acid in a continuous ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 53:623-629, 1997.

NISHIZUKA, Y. & HAYAISHI, O. Enzymic formation of lactobionic acid from lactose. *The Journal of Biological Chemistry*, 237:2721-2728., 1962.

NORDKVIST, M., NIELSEN, P. M. & VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. *Biotechnology and Bioengineering*, 97:694-707, 2007.

RAMAKRIHSNA, S. V. & PRAKASHAM, R. S. Microbial fermentation with immobilized cells. *Current Science*, 77:87-100, 1999.

REHR, B., WILHELM, C. & SAHM, H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35:144-148, 1991.

REHR, B. & SAHM, H. Process for obtaining sorbitol and gluconic acid or gluconate. US Patent 606.821, 1992.

ROGERS, P. L., LEE, K., SKOTNICKI, M. E. & TRIBE, D. E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemistry Engineering*, 23:37-84, 1982.

SAVARY, B. J., HICKS, K. B.; O'CONNOR, J. V. Hexose oxidase from *Chondrus crispus*: improved purification using perfusion chromatography. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:42-51, 1991.

SATORY, M., FÜRLINGER, M., HALTRICH, D., KULBE, K.D., PITTNER, F. & NIDETZKY, B. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an membrane reactor. *Biotechnology Letters*, 19:1205-1208, 1997.

SCOPES, R. K., ROGERS, P. L., LEIGH, D.A. Method for the production of sorbitol and gluconate. US Patent 4,755,467, 1988.

SCHAAFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, doi:10.1016/j.idairyj.2007.11.013, 2008.

SHENE, C. & BRAVO, S. *Zymomonas mobilis* CP4 fed-batch fermentations of glucose-fructose mixtures to ethanol and sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57:323-328, 2001.

SILVEIRA, M. M., LOPES DA COSTA, J. P. & JONAS, R. Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácido glucônico ou gluconato. Patente Industrial PI 9403981-0, INPI, 1994.

SILVEIRA M. M., WISBECK, E., LEMMEL, C., ERZINGER, G. S., LOPES DA COSTA, J. P., BERTASSO, M. & JONAS, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, 75:99-103, 1999.

SILVEIRA, M. M., WISBECK, E., HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:442-445, 2001.

SILVEIRA, M. M. & JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:40-408, 2002.

SIVA KESAVA, S., RAKSHIT, S. K. & PANDA, T. Production of ethanol by *Zymomonas mobilis*: the effect of batch step-feeding of glucose and relevant growth factors. *Process Biochemistry*, 30:41-47, 1995.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10:631-637, 2000.

SOARES, D. G., ANDREAZZA, A. C. & SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2005 doi: 10.1590/S1516-93322005000100011.

SOUTHARD, J. H. & BELZER, F. O. Organ preservation. *Annual Review of Medicine*, 46:235-247, 1995.

SOUTHARD, J. H. Disponível (*on line*) em 18 de outubro de 2007: <http://www.touchbriefings.com/pdf/1322/southard.pdf>, 2005.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some routes. *FEMS Microbiology Letters*, 145:301-307, 1996.

STODOLA, F. H. & LOCKWOOD, L. B. The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *Pseudomonas*, *The Journal of Biological Chemistry*, 171:213-221, 1947.

STOKES, H. W., DALLY, E. L., SPANIEL, D. T., WILLIAMS, R. L., MONTENECOURT, B. S., EVELEIGH, D. E. *Zymomonas*: the phantom ethanol producer. *Biosources Digest*, 3:124-132, 1981.

STRUCH, T., NEUSS, B., BRINGER-MEYER, S., SAHAM, H. Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 201-211, 1991.

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

SUMIMOTO, R., JAMIESON, N. V. & KAMADA, N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. *Transplantation*, 50:573-576, 1990.

SWINGS, J. & DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, 41:1-46, 1977.

TOSHIKI, S. SHUICHI, Y., SEIICHIRO, A., SAKANORI, S. Mineral absorption-stimulating agent. Japanese Patent 07277991, 1995a.

TOSHIAKI, S. SHUICHI, Y., TOMOKO, K. & SAKANORI, S. Bifido-bacteria multiplication-stimulating agent. Japanese Patent 07277990, 1995b.

VAN SCOTT, E. J., DITRE, C. M. & YU, R. J. Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. *Clinics in Dermatology*, 14:217-226, 1996.

VIIKARI, L. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20:118-123, 1984.

VIIKARI, L. & KORHOLA, M. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24: 471-476, 1986.

VIIKARI, L. By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. Technical Research Centre of Finland, 27:3-29, 1986.

VIIKARI, L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 7:237-261, 1988.

VIGNOLI, J. A., CELLIGOI, M.A.P.C. & SILVA, R.S.F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochemistry*, 41:240-243, 2006.

VOGEL, R. Sorbitol. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, 34, 492-498, 2003.

WANICK, M.C., ARAÚJO, J. M., CAVALCANTI DA SILVA, E. & SCHUMACHER, I. E. Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928) Kluyver e Van Niel (1936). *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, 10:47-49, 1970.

WISBECK, E., SILVEIRA, M. M., NINOW, J. & JONAS, R. Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. *Journal of Basic Microbiology*, 37:445-449, 1997.

YU, J. R. & VAN SCOTT, E. J. 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. Enzimas imobilizadas. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Said, S. & Pietro, R.C.L.R. Eds. Ribeirão Preto, Legis Summa, p.35-85, 2004.

## 9 APÊNDICES

---

Alguns trabalhos complementares relacionados a esta tese são apresentados neste item.

**9.1 Artigo: 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.**

Este trabalho contém um conjunto de informações obtidas em pesquisa desenvolvida no Laboratório de Bioprocessos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (IB/UCS), serviu como base para os ensaios de fermentação discutidos nesta tese.

**9.2 Artigo: Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1145:128-132, 2007.**

Este artigo inclui alguns resultados parciais de uma cooperação envolvendo o Laboratório de Bioprocessos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul e o grupo de pesquisa do Laboratório de Separação e Reacção da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal. O treinamento foi realizado no contexto do Programa Alfa 2 / Rede Jean Mermoz, Projeto de Formação de Investigadores, no período de dezembro de 2004 a março de 2005.

Os resultados apresentados neste artigo serviram como base para o estabelecimento da metodologia analítica realizada no Laboratório de Referência Enológica do Rio Grande do Sul (LAREN), da Divisão de Enologia do Departamento de Produção Vegetal da Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SAA/RS), Caxias do Sul, RS.

**9.1 Artigo: 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.**

## Formulation of Medium for Growth and Production of Ethanol and Intracellular Enzymes by *Zymomonas mobilis*

Eloane Malvessi\*, Karina Concatto, Sabrina Carra and Mauricio Moura da Silveira

Universidade de Caxias do Sul; Instituto de Biotecnologia; C. P. 1352; 95001-970; emalvess@ucs.br; Caxias do Sul - RS - Brasil

### ABSTRACT

The aim of the present work was to define a low-cost medium for the growth of *Zymomonas mobilis*, as well as for the production of ethanol and the intracellular enzymes glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono-d-lactonase (GL) by this bacterium. It was observed that the pH of the medium can be efficiently controlled by the addition of 5 g.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, PRODEX (non-purified yeast extract) and dry brewer's yeast can be used as a source of vitamins replacing purified yeast extract. GFOR/GL activity, measured with lactose/fructose as substrates, was preferentially induced by a higher glucose concentration (»150 g.L<sup>-1</sup>). For any glucose concentration, ethanol yields close to 90% of the theoretical maximum were achieved. In bioconversion experiments in 0.7M fructose/lactose solution, over 80% of substrates were converted to sorbitol and lactobionic acid.

**Key words:** *Zymomonas mobilis*, medium composition, glucose-fructose oxidoreductase, ethanol, sorbitol, lactobionic acid

### INTRODUCTION

Besides its ability to form ethanol at high rates, the anaerobic bacterium *Zymomonas mobilis* produces equimolar quantities of glucono-d-lactone and sorbitol from glucose and fructose, respectively, due to the action of glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) (EC 1.1.99), with glucono-d-lactone being hydrolysed by glucono-d-lactonase (GL) (EC 3.1.1.17) in a further reaction to form gluconic acid (Zachariou and Scopes, 1986). The localisation of GFOR in the periplasm of *Z. mobilis* was later observed by Loos et al. (1991) and confirmed by Aldrich et al. (1992).

Sorbitol is widely used in the food industry as a sweetener, humectant, texturizer and softener. Furthermore, this substance is employed for the production of sorbose, propylene glycol, synthetic plasticizers, alkyd resins, and other products (Vogel,

2003). Industrially, gluconic acid and/or its salts is principally used for the removal of zinc coating from metallic objects, the removal of paint and varnish from surfaces, and in the food and pharmaceutical industries as a stabiliser (Husted et al., 2003).

Satory et al. (1997) showed that *Z. mobilis* extracts could oxidise other aldoses instead of glucose leading to the respective organic acid. That finding is particularly interesting due to the fact that gluconic acid and sorbitol are produced by the GFOR/GL system on an equimolar basis and the market for the acid is many times smaller than that for the polyol. As such, by using mixtures of fructose and different sugars, an adequate balance of products could be achieved since applications for the new products could be found. Among these alternative products, lactobionic acid, obtained by oxidation of lactose, seems to hold promise because of its application in the preparation of the UW (University of Wisconsin)

---

\* Author for correspondence

solution, used to preserve human organs for transplant (Sumimoto and Kamada, 1990), and more recently as a component of cosmetics (Nemer, 2002). For its growth, *Z. mobilis* requires glucose, as a carbon source and inducer of GFOR (Zachariou and Scopes, 1986), and a nitrogen source – ammonium salts, amino acids and peptides (Rogers et al., 1982). Additionally, *Z. mobilis* growth is dependent on biotin and pantothenic acid (Swings and De Ley, 1977) and, therefore, culture media for this bacterium normally include yeast extract as a source of those vitamins. Due to its high price, however, yeast extract can be used only at the laboratory scale. Silveira et al. (2001) have shown that corn steep liquor (CSL), a by-product of corn wet milling, can be used as a cost-effective source of vitamins, and also organic nitrogen, for the production of ethanol and GFOR/GL by *Z. mobilis* ATCC 29291. On the other hand, long-term storage of CSL is difficult and its use in industrial processes is limited to plants near to its site of production.

In this context, the aim of the present work was to define a low-cost medium for the growth of *Z. mobilis* and the production of ethanol and GFOR/GL. Furthermore, the bioconversion of fructose and lactose to sorbitol and lactobionic acid, using *Z. mobilis* cells, was tested.

## MATERIAL AND METHODS

### Micro-organism

*Zymomonas mobilis* strain ATCC 29191 was used in all experiments. The strain was maintained in liquid medium at 4°C.

### Medium

SS medium (Silveira et al., 1992), used for maintenance, inocula production, and as a basis for fermentation experiments had the following composition (g.L<sup>-1</sup>): glucose, 20 (maintenance), 100 (inoculum), 100-150 (fermentation runs); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; yeast extract, 5.0. For inocula preparation and shaken flasks experiments, 5 or 10 g.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> was added to the medium to avoid an excessive pH drop during the experiments. In these cases, initial pH was close to 6.2. Concentrated glucose solutions and CaCO<sub>3</sub> were sterilised separately and added to the medium before inoculation. Sterilisation of nutrients and glucose solutions was done at 121°C for 15

minutes. Modifications to SS medium are given within the text.

### Fermentation conditions

Shaken flasks experiments were carried out in 250-mL anaerobic flasks, containing 200 mL of medium, incubated at 30°C in a reciprocal shaker (B. BRAUN BIOTECH, model CERTOMAT U, Germany) at 200 rpm. Bioreactor runs were performed in 5L equipment (B. BRAUN BIOTECH, model BIOSTAT B, Germany). The temperature was kept at 30°C, the pH was maintained at 5.5 with 5M NaOH, and the impeller speed was 450 rpm. Inocula for all runs, corresponding to 10% of the total volume, were grown under reciprocal agitation for 15 hours at 30°C. After growth, the cell mass was centrifuged at 6000 rpm (SIGMA, model 4K15, Germany), at 4°C, for 20 minutes and re-suspended in distilled water at 150-200 g.L<sup>-1</sup>.

### Bioconversion of Lactose and Fructose to Lactobionic Acid and Sorbitol

Bioconversion of lactose and fructose to lactobionic acid and sorbitol was performed in a 500-mL bioreactor, containing 240 mL of a 0.7M solution of substrates and 25 g/L of permeabilised cells of *Z. mobilis*, under magnetic stirring. The pH was automatically maintained at 6.4 with a CONSORT model R735 (Belgium) pH controller by adding 7M NaOH and the temperature was 39°C. Cell permeabilisation was done by treating concentrated *Z. mobilis* suspensions with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Rehr et al., 1991).

### Analytical Methods

Cell concentration was determined by measuring the optical density of cell suspensions at 560nm. Turbidimetric measurements gave a linear relationship with dry cell mass for each case. Glucose was assayed by the DNS method (Miller, 1959). Ethanol was determined in a GIBERTINI (Italy) apparatus after distillation. GFOR/GL activity was estimated by incubating 4.0 g/L permeabilised *Z. mobilis* cells in 100 mL of a solution containing 0.7M each of lactose and fructose, at 39°C, for 40 minutes, with the pH being maintained at 6.4 (CONSORT R735 pH controller, Belgium) by 1M NaOH. One unit of GFOR/GL was defined as the production of one mmol of lactobionic acid per hour, under the assay conditions, and GFOR/GL activities

in this work are presented in units per gram of dry permeabilised cells ( $U \cdot g^{-1}$ ). Lactobionic acid concentrations were calculated from the volume of 7M NaOH used to control pH during bioconversion run. At the end of the bioconversion experiment a sample was taken and analysed by liquid chromatography (GILSON, France) with an RI detector, using an ION-300 column (TRANSGENOMIC, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of glucose concentration and addition of calcium carbonate

*Z. mobilis* growth and production of ethanol were evaluated in shaken flasks in media containing 100 to 150  $g \cdot L^{-1}$  glucose and 5 to 10  $g/L$   $CaCO_3$ . The values of the most important variables, over 24 and 48 hours of the process, are summarised in Table 1. As can be seen in Table 1, with an initial glucose concentration ( $S_0$ ) of 100  $g \cdot L^{-1}$ , substrate was completely depleted after 24 hours of cultivation, with the small values given in the table probably being due to reduction of non-fermentable substances present in the medium. In medium with  $S_0 = 150$   $g \cdot L^{-1}$  glucose, the amount of substrate consumed in 24 h was significantly lower suggesting that cell growth was inhibited by the relatively high initial glucose concentration. After 48 h, however, glucose was totally consumed.

The final cell concentrations with  $S_0 = 150$   $g \cdot L^{-1}$  were slightly lower than those measured for  $S_0 = 100$   $g \cdot L^{-1}$ . By calculating the cell yields for both glucose concentrations, average values of 0.035 and 0.021  $g$  cell per  $g$  consumed substrate were found for  $S_0 = 100$  and 150  $g \cdot L^{-1}$ , respectively. The results in terms of cell growth achieved with 150  $g \cdot L^{-1}$  of glucose were probably due to the inhibition by substrate and/or the exhaustion of some growth factor in the medium.

With respect to the formation of ethanol, final concentrations close to 50 and 70  $g \cdot L^{-1}$  were achieved for  $S_0$  of 100 and 150  $g \cdot L^{-1}$  respectively, with yields between 85 and 88% in relation to the theoretical maximum. As an expected conclusion, one can see that the initial glucose concentration had no evident effect on product formation since energy production in *Z. mobilis* is almost totally dependent on the conversion of glucose to ethanol.

*Z. mobilis* grows preferentially at pH values of ca.

5.5 (Swings and De Ley, 1977). As such, when *Z. mobilis* was cultivated in unbuffered medium, cell growth was interrupted by pH values below 5.0 and a residual glucose concentration of over 50  $g \cdot L^{-1}$  remained in the medium (data not shown). In the shaken flasks experiments described in the present work, we achieved good results in all respects by controlling pH with  $CaCO_3$ . This is particularly interesting for research in shaken flasks, in which several variables could be analysed, or for fermentation runs in a bioreactor, which could have a cheaper configuration with no need for pumps and instrumentation for pH control.

### Evaluation of sources of vitamins

As already mentioned, *Z. mobilis* growth is dependent on biotin and pantothenic acid (Swings and DeLey, 1977) and most cultivation media for this bacterium contain yeast extract. Since this component is too expensive for large-scale application, we evaluated two alternatives: PRODEX (PRODESA, Brazil), a non-purified type of yeast extract, and dry brewer's yeast.

In Table 2, the results obtained in shaken flasks experiments with SS medium containing 100  $g \cdot L^{-1}$  glucose and yeast extract (SIGMA) are compared to those achieved with the alternative sources of vitamins.

With media containing yeast extract, similar final cell concentrations (ca. 3.5-4.0  $g \cdot L^{-1}$ ) were found after 24 hours of the process. With dry brewer's yeast, the quantification of cell dry mass was not possible due to the presence of insoluble material in the medium. However, in all cases, complete consumption of glucose was observed and final ethanol concentrations close to 50  $g \cdot L^{-1}$  were measured, with yields in the normal range previously described in this work (85 to 88%). These results indicate that purified yeast extract can be replaced by the less expensive sources of vitamins PRODEX and dry brewer's yeast.

### Experiments in bioreactor

Two batch experiments in bioreactor were performed with SS medium containing 5.0  $g \cdot L^{-1}$  PRODEX and initial glucose concentrations of 100 and 150  $g \cdot L^{-1}$  to observe the effect of  $S_0$  on the general results of the process as well as to obtain cell mass to be used in the bioconversion test. The general results of these runs are presented in Table 3. It can be seen that final cell concentrations of 4.5 and 5.0  $g \cdot L^{-1}$  were

**Table 1** - Results obtained during the shaken flask cultivation of *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in media containing different glucose and calcium carbonate concentrations.

Initial glucose / CaCO <sub>3</sub> (g/L)	Glucose (g.L <sup>-1</sup> )		Cell (g.L <sup>-1</sup> )		Ethanol (g.L <sup>-1</sup> )	pH	
	24h	48h	24h	48h	48h	24h	48h
100 / 5	1.8	1.1	3.4	3.8	49	5.6	5.7
100 / 10	1.5	1.3	3.5	3.6	49	5.3	5.4
150 / 5	94	1.2	2.0	3.2	68	5.4	5.4
150 / 10	81	1.3	2.0	3.5	65	5.4	5.5

achieved with  $S_0$  of 100 and 150 g.L<sup>-1</sup>, with cell yields of 0.043 and 0.032 g.g<sup>-1</sup>, respectively, suggesting a lack of some growth factor in the experiment with higher initial glucose concentration. Furthermore, the maximum specific growth rate for the run with  $S_0 = 150$  g.L<sup>-1</sup> was 25% lower than that for  $S_0 = 100$  g.L<sup>-1</sup> due to inhibition by the substrate.

With respect to ethanol production, yields identical to the theoretical maximum (86%) were calculated for both runs. All of these conclusions are coherent with those presented in the discussion of shaken flasks experiments.

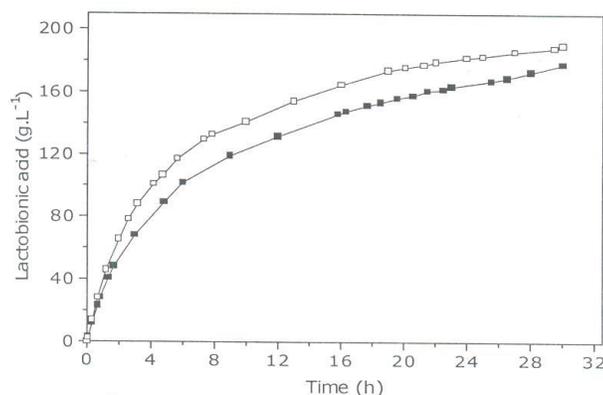
In the comparison of these experiments, the most remarkable difference was the higher GFOR/GL activity, measured with fructose and lactose as substrates for the enzymatic system, in the batch run with  $S_0 = 150$  g.L<sup>-1</sup>. Such a result agrees with those reported in the literature with different methods and substrates (Zachariou and Scopes, 1986; Erzinger et al., 2003), and can be explained by the role of GFOR as an osmoprotective factor for *Z. mobilis* when the bacterium is exposed to a high concentration of substrate (Loos et al., 1994).

### Bioconversion experiments

These preliminary experiments were carried out to evaluate the bioconversion of fructose and lactose to sorbitol and lactobionic acid, respectively, by the intracellular enzymes GFOR/GL of *Z. mobilis* grown in media containing 100 and 150 g.L<sup>-1</sup> glucose. The time course of bioconversion runs, with respect to the formation of lactobionic acid, is depicted in Figure 1. As can be seen, by using *Z. mobilis* grown in 150 g.L<sup>-1</sup> glucose, the lactobionic acid formation rate was significantly higher due to the larger GFOR/GL activity in these cells. In this case, 82% of the initial lactose was converted to ca. 190 g.L<sup>-1</sup> lactobionic acid whereas with 100 g glucose.L<sup>-1</sup>-grown cells the final product concentration and substrate consumption were 180 g.L<sup>-1</sup> and 78%, respectively. These results are inferior to those reported in the literature for the bioconversion using glucose/fructose as substrates due to the low affinity of GFOR for lactose (Malvessi et al., 2002).

**Table 2** - Results obtained in 24-hours shaken flask cultivation of *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in media containing 100 g.L<sup>-1</sup> glucose and different vitamins sources.

Vitamins source / concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Glucose (g.L <sup>-1</sup> )	Cell (g.L <sup>-1</sup> )	Ethanol (g.L <sup>-1</sup> )	pH
Yeast extract SIGMA / 5.0	1.5	3.8	48	5.2
Yeast extract SIGMA / 7.5	2.0	4.2	46	5.2
Yeast extract PRODEX / 5.0	1.3	3.5	48	5.2
Yeast extract PRODEX / 7.5	1.4	3.6	50	5.6
Dry brewer's yeast / 6.0	1.5	-	46	5.0



**Figure 1** - Variation in lactobionic acid concentration with time during bioconversion experiments with 0.7M lactose / fructose and permeabilised *Zymomonas mobilis* cells cultivated in SS medium with initial glucose concentration of 100 g.L<sup>-1</sup> (■) and 150 g.L<sup>-1</sup> (□).

**Table 3** - Results obtained in the cultivation of *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in bioreactor in SS medium containing 5 g.L<sup>-1</sup> PRODEX and 100 or 150 g.L<sup>-1</sup> glucose.

Initial glucose (g.L <sup>-1</sup> )	100	150
Cell (g.L <sup>-1</sup> )	4.5	5.0
Ethanol (g.L <sup>-1</sup> )	49	71
Maximum specific growth rate (h <sup>-1</sup> )	0.45	0.32
Cell yield (g.g <sup>-1</sup> )	0.043	0.032
Ethanol yield (%)	86	86
GFOR/GL activity (U.g <sup>-1</sup> )	4.8	5.9

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). K. Concatto and S. Carra received scholarships from the Universidade de Caxias do Sul and the Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), respectively.

#### RESUMO

Este trabalho objetivou definir uma composição de meio de baixo custo para o cultivo de *Zymomonas mobilis*, visando à produção de etanol e das enzimas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e gluconolactonase (GL). Observou-se que o pH do meio pode ser eficientemente controlado, de forma simples, com a adição de 5 g.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>. PRODEX (extrato de levedura bruto) e levedura seca de cervejaria

podem ser utilizados como fontes de vitaminas em substituição ao extrato de levedura purificado. A atividade GFOR/GL, medida com frutose/lactose como substratos, foi preferencialmente induzida por concentração mais elevada de glicose (>150 g.L<sup>-1</sup>). Para qualquer concentração de glicose, rendimentos em etanol próximos a 90% em relação ao máximo teórico foram alcançados. Em ensaio de bioconversão com células de *Z. mobilis*, em solução frutose/lactose (0,7M), acima de 80% da lactose foi convertida em ácido lactobiônico.

#### REFERENCES

- Aldrich, H. C.; McDowell, L.; Barbosa, M. F. S.; Yomano, L. P.; Scopes, R. K. and Ingram, L. O. (1992), Immunocytochemical localisation of glucolytic and fermentative enzymes in *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.*, **174**, 4504-4508.

- Erzinger, G. S.; Silveira, M. M.; Costa, J. P. C. L.; Vitolo, M. and Jonas, R. (2003), Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. *Braz. J. Microbiol.*, **34**, 329-333.
- Hustede, H.; Haberstroh, H. J. and Schinzig, E. (2003), Gluconic acid. In: *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, **15**, 645-653.
- Loos, H.; Völler, M.; Rehr, B.; Stierhof, Y. D.; Sahm, H. and Sprenger, G. A. (1991), Localisation of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **84**, 211-216.
- Loos, H.; Krämer, R.; Sahm, H. and Sprenger, G. A. (1994), Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *J. Bacteriol.*, **176**, 7688-7693.
- Malvessi, E.; Concatto, K. and Silveira, M. M. (2002), Avaliação de diferentes aldoses como co-substratos para a produção de ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. *Anais do 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática*, Brasília, v. 1. pp. 136.
- Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
- Nemer, M. L. (2002), Ácido lactobiônico vida nova para a pele. *Les Nouvelles Esthétiques*. v. 69.
- Rehr, B.; Wilhelm, C. and Sahm, H. (1991), Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **35**, 144-148.
- Rogers, P. L.; Lee, K.; Skotnicki, M. E. and Tribe, D. E. (1982), Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **23**, 37-84.
- Satory, M.; Furlinger, M.; Haltrich, D.; Kulbe, K. D.; Pittner, F. and Nidetzky, B. (1997), Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in a membrane reactor. *Biotechnol. Lett.*, **19** (12), 1205-1208.
- Silveira, M. M.; Lemmel, C.; Erzinger, G. S.; Koehntopp, P. I. and Jonas, R. (1992), Production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*: comparison of strains. *Arq. Biol. Tecnol.*, **35** (3), 591-594.
- Silveira, M.M.; Wisbeck E.; Hoch, I. and Jonas, R. (2001), Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 442-445.
- Sumimoto, R. and Kamada, N. (1990), Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. *Transplant Proc.*, **22** (5), 2198-2199.
- Swings, J. and De Ley, J. (1977), The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol Rev.*, **41**, 1-46.
- Vogel, R. (2003), Sorbitol. In: *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6<sup>th</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, **34**, 492-498.
- Zachariou, M. and Scopes, R. K. (1986), Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.*, **3** (167), 863-869.

Received: July 18, 2003;  
 Revised: February 09, 2004;  
 Accepted: October 15, 2004.

**9.2 Artigo: Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1145:128-132, 2007.**



## Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography

Israel Pedruzzi<sup>a</sup>, Eloane Malvessi<sup>b</sup>, Vera G. Mata<sup>a</sup>,  
Eduardo A.B. Silva<sup>a</sup>, Mauricio M. Silveira<sup>b</sup>, A.E. Rodrigues<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Separation and Reaction Engineering, Associate Laboratory, Faculty of Engineering University of Porto, Rua Dr Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal*

<sup>b</sup> *Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, Brazil*

Received 23 October 2006; received in revised form 12 January 2007; accepted 15 January 2007

Available online 18 January 2007

### Abstract

Experimental conditions for complete separation and quantification of mixtures containing lactobionic acid, sorbitol, lactose and fructose are discussed for the first time. These mixtures appear in the enzymatic bioconversion of fructose and lactose catalyzed by glucose–fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- $\delta$ -lactonase (GL) enzymes of *Zymomonas mobilis* cells. The high-performance liquid chromatography (HPLC) separation was carried out in a strong cation ion exchange resin (hydrogen form) based on a copolymer of styrene divinylbenzene (PS–DVB). A stationary phase of  $\beta$ -cyclodextrin was also evaluated. An efficient separation was obtained with PS–DVB column eluted with sulfuric acid 0.450 mM solutions (pH 3.0–3.2) at 75 °C. The formation of lactones was observed, which is associated with the dissolution of lactobionic acid crystals; however, by dissolving the lactobionic acid crystals on alkaline calcium hydroxyde solution in equimolar ratio a single lactobionic acid chromatographic peak without lactobionolactone is obtained.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

**Keywords:** HPLC separation; Lactobionic acid/sorbitol/lactose/fructose mixture; Cation ion exchange resin

### 1. Introduction

The bioproduction of bionic acid, especially lactobionic acid, was originally observed in a culture of *Pseudomonas* cells (*P. graveolens* 14 and *P. fragi* 25) bacteria with process yield of 77% [1,2]. Similarly, the biotechnology process for production of sorbitol by *Zymomonas mobilis* started with research of alternative carbohydrate sources for ethanol production by fermentation from sucrose or fructose/glucose mixtures [3–5]. In this process a equimolar production of sorbitol and gluconic acid was observed. The underlying mechanism of the biotransformation with *Z. mobilis* was completely elucidated by Zachariou and Scopes [6]; a single glucose–fructose oxidoreductase (GFOR; EC 1.1.1.99) enzyme with a tightly bound NADP<sup>+</sup> cofactor transfers hydrogens equivalents from glucose to fructose producing glucono- $\delta$ -lactone and sorbitol. In addition,

the action of glucono- $\delta$ -lactonase (GL; EC 3.1.1.17) to convert lactone in gluconic acid was observed. Several works report conditions for sorbitol and gluconic acid production [7–14].

Satory et al. [15] showed that the GFOR/GL enzymes are able to oxidize not only glucose but also seven other aldoses sugars to produce the corresponding organic acids; in particular, lactose is oxidized to lactobionic acid. Additionally, Malvessi et al. [16] obtained the reaction rate for the biotransformation of fructose and other carbohydrates in presence of permeabilized cells of *Z. mobilis* to produce sorbitol and the corresponding organic acid; for the reaction between fructose and lactose, the yield in lactobionic acid was 85%.

Simms et al. [17] suggested an analytical method for the quantification of lactobionic acid in a solution containing both lactose and lactobionate, using  $\beta$ -cyclodextrin resins column and also calcium ion exchange resin. Later, Satory et al. [15] used a calcium ion exchange resin based on copolymer of styrene and divinylbenzene (PS–DVB) to analyze the substrates lactose, fructose and the products lactobionic acid, sorbitol.

\* Corresponding author. Tel.: +351 225081671; fax: +351 225081674.  
E-mail address: arodrig@fe.up (A.E. Rodrigues).

This mixture was produced from enzymatic reaction with GFOR in an ultrafiltration membrane reactor. However, sorbitol and lactobionic acid were eluted as a single peak. Miyamoto et al. [18] measured lactobionic acid produced by *Pseudomonas* sp. LS13-1 with PS–DVB resin column and water as eluent.

The copolymer of styrene–divinylbenzene (PS–DVB) has many advantages as matrix for ion-exchange resins. It has excellent physical and chemical resistance to the degradation by oxidation, hydrolysis or high temperatures. The aromatic ring can react by electrophilic aromatic reaction, for example, by the incorporation of sulphonic groups to produce PS–DVB resins. Ionic groups such as  $\text{SO}_3^-$  modify the retention properties of the hydrophobic resins, varying the retention time of neutral carbohydrates [19]. PS–DVB column has applicability on the separation of different biologic compounds such as proteins, nucleic acids and carbohydrates [20–25], and also polyols and aliphatic carboxylic acids [26]. Additionally, the hydrophilic nature of PS–DVB resins is an important characteristic [26] which is strongly affected by  $\text{SO}_3^-$  groups [19,20] and influenced by pH during analyses [27].

$\beta$ -Cyclodextrin is produced from starch syrups by enzymatic hydrolysis with cyclodextrin glycosyl transferase (CGT) forming a cyclic heptamer with seven glucose units joined by  $\alpha$ -1,4 links. There are three common structures,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  cyclodextrin, formed by 6, 7 and 8 glucose units, respectively. Methyl and 1,4-glucoside oxygen links form the hydrophobic cavity that interact with aromatic structures in aqueous mobile phase in this cavity while amines and carbonyl groups interact with the hydroxyl groups at the mouth of the cavity to form the diastereomeric complex [28]. Columns packed with cyclodextrin/silica gel have been applied for the separation of carbohydrates [29,30] and organic acids [17,31]. Simms et al. [17] showed that the separation of lactose and lactobionic acid can be possible using cyclodextrin column eluted with a 70:30 acetonitrile–sodium phosphate buffer solution ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM, pH 5.0).

The objective of this work is to find experimental conditions for complete separation and quantification of mixtures containing lactobionic acid, sorbitol, lactose and fructose from a reference solution simulating the enzymatic bioconversion solution catalyzed by glucose–fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- $\delta$ -lactonase (GL) of *Z. mobilis* cells. The HPLC technique is considered having in mind that simple eluent and ion exchange resin based PS–DVB should be selected for further work on preparative chromatography.

## 2. Materials

### 2.1. Chemicals

Sorbitol, D-fructose and lactobionic acid analytical standards were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA) and lactose from Panreac (Barcelona, Spain). The eluent was prepared from sulfuric acid obtained from Merck (Darmstadt, Germany), acetonitrile and sodium dihydrogenphosphate from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

### 2.2. Chromatographic equipment

The HPLC system used was from Gilson (France) equipped with an isocratic pump system 305 model and manometric module 805 model and refractive index detector 131 model. The column was maintained inside a tube with water circulation to control the temperature using a pump Haake D1 (Germany).

Chromatographic columns used were:  $\beta$ -cyclodextrin-bonded-phase column (Cyclobond I 2000 column, 250 mm  $\times$  4.6 mm, particle diameter 5  $\mu\text{m}$ ) from Advanced Separation Technology (Whippany, NJ, USA), strong hydrogen cation ion exchange resins column (HPX-87H column, 300 mm  $\times$  7.8 mm, particle diameter 9  $\mu\text{m}$ ) from Bio-Rad Labs. (Richmond, CA, USA) and strong hydrogen cation ion exchange resins column (ICSep ICE-ION-300 column, 300 mm  $\times$  7.8 mm, particle diameter 7  $\mu\text{m}$ ) from Transgenomic (San Jose, CA, USA). The volume of injection was 20  $\mu\text{L}$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Separation test on $\beta$ -cyclodextrin resin

Preliminary tests with the cyclodextrin column did not show good separation for solution when sorbitol is present, as shown in Fig. 1. The test conditions were based on those of Simms et al [17], which showed a good separation of lactobionic acid, lactobionolactone and lactose in absence of sorbitol and fructose. In this work the concentration of the eluent acetonitrile/phosphate buffer (70/30) and pH were carefully adjusted to 10 mM and pH 3.0; after the incorporation of acetonitrile the pH was corrected with phosphoric acid. The analysis was made at room temperature at 1  $\text{mL min}^{-1}$ . There was no solubility problems at concentration of 1  $\text{g L}^{-1}$  for each species.

The results presented in Fig. 1 show an excellent separation of sorbitol and lactose with symmetrical peaks at 6.5 and 8.0 min. However, it was observed that lactobionolactone and sorbitol have the same retention time (6.5 min). Unsymmetrical peaks

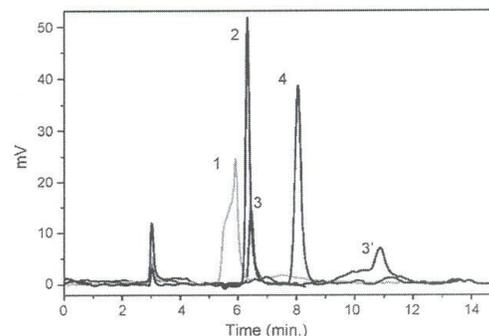


Fig. 1. Chromatogram of individual lactose, fructose, lactobionic acid and sorbitol (1  $\text{g L}^{-1}$ ) on  $\beta$ -cyclodextrin column (Cyclobond I 2000, 250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) using acetonitrile– $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer 10 mM (70:30) as eluent, pH 3.0 at 1.0  $\text{mL min}^{-1}$  at room temperature (20  $^\circ\text{C}$ ) (1—fructose, 2—sorbitol, 3—lactona, 3'—lactobionic acid, and 4—lactose).

of fructose and lactobionic acid were observed at 5.5 min and between 9.0 and 12 min, respectively.

The lactone peak, showed on Fig. 1, can be present in the lactobionic acid salt or can appear during the dissolution of the crystals, and it is a problem for the quantification method proposed. The condition for the appearance of the lactone peak has been associated with pH (acid values) of the reaction media [32,33]. The lactobionolactone species is an intermediate structure probably formed during the oxidation process of lactose to produce lactobionic acid Simms et al. [17]. The chromatographic peaks in the separation observed by Simms et al. [17] are more symmetric and the retention times are lower than in our experiment. It shows that pH adjustment is necessary to obtain better quantitative analysis, in the range of concentration under consideration. The solution to reduce the lactobionolactone peak is an alkaline hydrolysis of the reference solution [32]. However, the economic importance of this intermediary in cosmetics manufacturing should be considered. However, in view of the separation in preparative column in simulated moving bed system (SMB) it is convenient to use simple eluent as water and sulfuric acid at very low concentration.

### 3.2. Separation tests on strongly acidic cation-exchange resins

Results obtained with both PS–DVB columns are evaluated here. The eluent was sulfuric acid solution. The pH was 1–3 with Bio-Rad column by manufacturer recommendation and 95 bar of maximum pressure. However, for the ICSEP-ICE-ION-300 column, the range of pH investigated was 0–7, with 70 bar of maximum pressure. The maximum temperature was 75 °C.

The temperature effect in the resolution of the peaks can be observed on Fig. 2. At higher temperatures fructose and sorbitol peaks are more symmetric and the eluent viscosity is lower, which allows the use of higher flowrate of eluent in the column and a reduction of the time for analysis. Also, the diffusivity

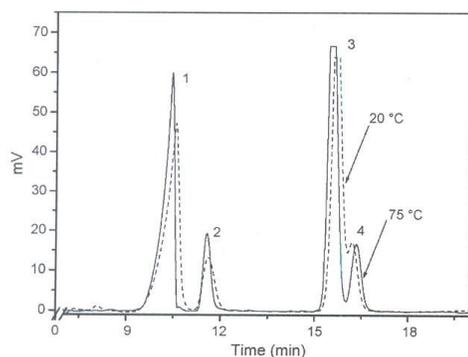


Fig. 2. Effect of temperature on the chromatogram of the reference solution (lactobionic acid, lactose, fructose and sorbitol) in sulfuric acid eluent (0.450 mM, pH 3.1). ICSEP ICE-ION-300, 300 mm × 7.8 mm, 7 μm column at 20 and 75 °C and 0.5 mL min<sup>-1</sup> (1—lactobionic acid, 2—lactose, 3—fructose and 4—sorbitol).

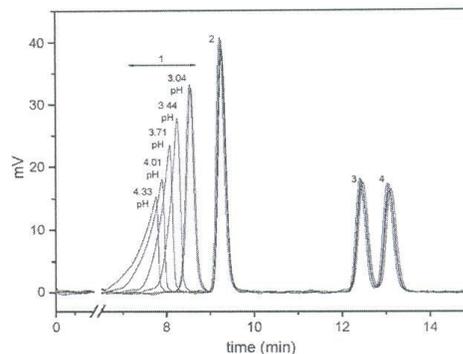


Fig. 3. Effect of the pH of eluent (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) on the separation of lactobionic acid, lactose, fructose and sorbitol mixture (individual concentration 2 g L<sup>-1</sup>). The reference case is sulfuric acid eluent (0.450 mM, pH 3.1). ICSEP ICE-ION-300 column, 300 mm × 7.8 mm particle diameter, 7 μm at 75 °C and 0.5 mL min<sup>-1</sup> (1—lactobionic acid, 2—lactose, 3—fructose and 4—sorbitol).

of species increase with increasing temperature and reducing eluent viscosity [34].

Fig. 3 show the influence of the pH of eluent on the separation of the aqueous solution of lactobionic acid, lactose, fructose, sorbitol. Looking at the lactobionic acid peaks it can be observed that a symmetric peak appears when the eluent is more acidified (pH ≈ 3.1). For pH < 3.1 there is an overlap of lactobionic acid and lactose peaks, while for pH > 3.1 the symmetry of the peak is deformed with further appearance of the lactobionolactone structure.

The lactobionolactone species was present in the reference solution after dissolving the lactobionic acid crystals in the eluent, as shown in Fig. 4. In this case, the formation of this compound is associated with the acid pH of solvent used, water

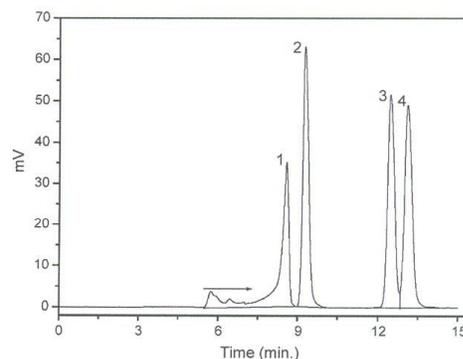


Fig. 4. Chromatogram of the reference solution prepared in sulfuric acid eluent (0.450 mM, pH 3.1) showing the lactobionolactone structure at 6 min retention time and the asymmetrical peak of lactobionic acid. ICSEP ICE-ION-300 column, 300 mm × 7.8 mm particle diameter, 7 μm at 75 °C and 0.5 mL min<sup>-1</sup> (1—lactobionic acid, 2—lactose, 3—fructose and 4—sorbitol).

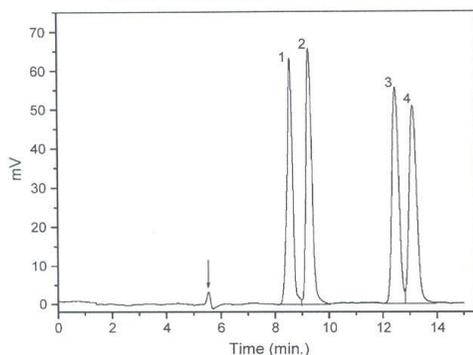


Fig. 5. Chromatogram of the reference solution prepared in  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solution in equimolar ratio and a presence of pulse injection under arrow at 5.5 min retention time and symmetrical peak of lactobionic acid in sulfuric acid eluent (0.450 mM, pH 3.1). ICsep ICE-ION-300 column, 300 mm  $\times$  7.8 mm particle diameter, 7  $\mu\text{m}$  at 75  $^\circ\text{C}$  and 0.5 mL  $\text{min}^{-1}$  (1—lactobionic acid, 2—lactose, 3—fructose and 4—sorbitol).

or sulfuric acid eluent. The recommendation to prevent the formation of lactobionolactone is to dissolve the acid crystals in alkaline solution [32]. However, the lactone structure can be hydrolyzed by increasing the pH of the solution to 11–12 with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  for 30 min and then can be completed to a known volume. In this essay the dissolved lactobionic acid crystals in  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , in an equimolar ratio, were able to reduce the lactone formation, as shown in Fig. 5. The calcium lactobionate has approximately pH 5.5 and the final volume was completed with sulfuric acid solution eluent at pH 3.1.

Fig. 6 showed the chromatogram obtained with the Bio-Rad column. The main difference when comparing with Fig. 3 is the lower separation of peaks. In fact, Fig. 3 showed the important influence of eluent pH on the separation performance; it is clear

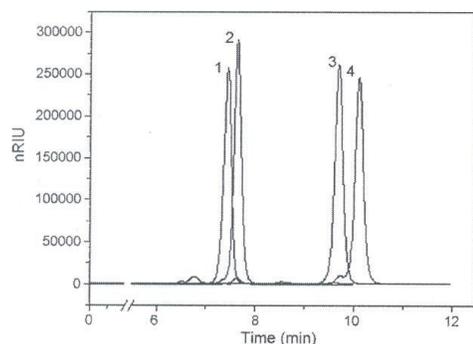


Fig. 6. Chromatogram of individual lactose, fructose, lactobionic acid and sorbitol ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) prepared in sulfuric acid eluent (0.5 mM, pH 2.8). HPX-87H column, 300 mm  $\times$  7.8 mm particle diameter, 9  $\mu\text{m}$  at 60  $^\circ\text{C}$  and 0.6 mL  $\text{min}^{-1}$  (1—lactobionic acid, 2—lactose, 3—fructose and 4—sorbitol). This chromatogram was obtained in HPLC Agilent Technology 9100 model.

that decreasing pH the peak of lactobionic acid will be closer to the peak of lactose. The Bio-Rad column is also a hydrogen strong cation ion exchange resin with particle diameter of 9  $\mu\text{m}$  and crosslink of 8%. However, the Tansgenomic column contains a resin with 6% of crosslink. Resin crosslinking is an important parameter in any chromatographic separation. Styrene divinylbenzene resin is a relatively rigid gel-type media. The lower the crosslink, the more open the structure is, and the more permeable it is to higher molecular weight substances [34].

#### 4. Conclusion

The experimental conditions to analyze a mixture of lactobionic acid, lactose, fructose and sorbitol in PS-DVB column were determined for the first time. The mixture is present in the bioconversion of lactose and fructose by enzymes GFOR/GL of *Z. mobilis*. The main parameters studied were the pH of eluent and the temperature of column which have strong influence on the separation and peak symmetry. The suggested analytical method uses a hydrogen strong ion-exchange resin based on PS-DVB (ICSep ICE-ION-300, 300 mm  $\times$  7.8 mm, particle diameter 7  $\mu\text{m}$ ) and a eluent  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.450 mM (pH 3.1) at 75  $^\circ\text{C}$ . The lactobionic acid crystals have to be dissolved in an alkaline solvent with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , (or in sodium or potassium hydroxide) in equimolar ratio, to prevent the lactone formation. This is a fast and simple analytical method for quantification of lactobionic acid and sorbitol production from enzymatic reaction with GFOR and it is an important method for determination of concentration at different stages of the separation at preparative scale.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge "Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)" for supporting this work through the grants SFRH/BD/24709/2005 and SFRH/BPD/19701/2004.

#### References

- [1] F.H. Stodola, L.B. Lockwood, J. Biol. Chem. 171 (1947) 213.
- [2] L.B. Lockwood, F.H. Stodola, US 2,496,297 (1950) p. 1.
- [3] L. Viikari, Appl. Microbiol. Biotechnol. 19 (1984) 252.
- [4] L. Viikari, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20 (1984) 118.
- [5] D. Leigh, R.K. Scopes, P.L. Rogers, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20 (1984) 413.
- [6] M. Zachariou, R.K. Scopes, J. Bacteriol. 167 (1986) 863.
- [7] K.-H. Jan, S.-J. Jung, H.-S. Chang, U.-H. Chun, Process Biochem. 5 (1996) 485.
- [8] G.A. Sprenger, FEMS Microbiol. Lett. 145 (1996) 301.
- [9] B. Nidetzky, M. Furlinger, D. Gollhofer, R.K. Scopes, D. Haltrich, K.D. Kulbe, Biotechnol. Bioeng. 53 (1997) 623.
- [10] B. Nidetzky, M. Furlinger, D. Gollhofer, M. Satory, D. Haltrich, K.D. Kulbe, Enzyme Eng. XIV Ann. NY Acad. Sci. 864 (1998) 446.
- [11] M. Furlinger, D. Haltrich, K.D. Kulbe, B. Nidetzky, Eur. J. Biochem. 251 (1998) 955.
- [12] M.M. Silveira, E. Wisbeck, C. Lemmel, G. Erzinger, J.P.L. Costa, M. Bertasso, R. Jonas, J. Biotechnol. 75 (1999) 99.
- [13] M.M. Silveira, R. Jonas, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59 (2002) 400.
- [14] R. Jonas, M.M. Silveira, App. Biochem. Biotechnol. 118 (2004) 321.

- [15] M. Satory, M. Fuerlinger, D. Haltrich, K.D. Kulbe, F. Pittner, B. Nidetzky, *Biotechnol. Lett.* 19 (1997) 1205.
- [16] E. Malvessi, K. Concatto, M.M. Silveira Anais do 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática—Enzitec, Brasília, DF, de 07/a 10/04/2002.
- [17] P.J. Simms, K.B. Hicks, R.M. Haines, A.T. Hotchkiss Jr., S.F. Osman, *J. Chromatogr. A* 667 (1994) 67.
- [18] Y. Miyamoto, T. Ooi, S. Kinoshita, *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 427.
- [19] C.W. Huck, G.K. Bonn, *Chem. Eng. Technol.* 12 (2005) 1457.
- [20] T.K. Chambers, J.S. Fritz, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 139.
- [21] C.W. Huck, R. Bakry, G.K. Bonn, *Eng. Life Sci.* 5 (2005) 431.
- [22] Y.-B. Yang, K. Harrison, J. Kindsvater, *J. Chromatogr. A* 723 (1996) 1.
- [23] T. Masuda, K.-I. Kitahara, Y. Aikawa, S. Arai, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 89.
- [24] K. Tanaka, K. Ohta, J.S. Fritz, *J. Chromatogr. A* 739 (1996) 317.
- [25] K.B. Hicks, S.M. Sondey, L.W. Doner, *Carbohydr. Res.* 168 (1987) 33.
- [26] K. Tanaka, K. Ohta, J.S. Fritz, Y.-S. Lee, S.-B. Shim, *J. Chromatogr. A* 706 (1995) 385.
- [27] J.-D. Fourneron, Y. Nait-Si, *Phytochem. Anal.* 17 (2006) 71.
- [28] Astec, *Cyclobond Handbook*, seventh ed., 2005, p. 59.
- [29] D.W. Armstrong, H.L.J. Jin, *J. Chromatogr.* 462 (1988) 219.
- [30] P.J. Simms, R.M. Haines, K.B. Hicks, *J. Chromatogr. A* 648 (1993) 131.
- [31] P.J. Simms, A.T. Hotchkiss Jr., P.L. Irwin, K.B. Hicks, *Carbohydr. Res.* 278 (1995) 1.
- [32] D.S.C. Black, G.M. Blackburn, G.A.R. Johnston, *Aliphatic monohydroxy-monocarboxylic acids and related compounds, Aliphatic Compounds—Part D*, in: *Rodd's chemistry of carbon compounds*, vol. 1, second ed., Elsevier, Netherlands, 1965, p. 418.
- [33] K.B. Hicks, P.C. Lim, M.J. Haas, *J. Chromatogr.* 319 (1985) 159.
- [34] *Bio-Rad. Guide to Aminex HPLC Columns for Food and Beverage Biotechnology, and Bio-organic Analysis*. p. 74.

## CURRICULUM VITAE resumido

**MALVESSI, E.**

### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Eloane Malvessi

**Local e data de nascimento:** Caxias do Sul, RS, Brasil. 20 de abril de 1967.

**Endereço profissional:** Laboratório de Bioprocessos, Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – Bairro Petrópolis. CEP 95070-560 - Caxias do Sul, RS - Brasil - Caixa-Postal 1352.

**Telefone profissional:** (54) 3218-2100 ramal 2578. Fax: (54) 3218-2670

**E-mail:** emalvess@ucs.br

### 2. FORMAÇÃO

#### 2.1 Formação acadêmica/Titulação

Graduação em Ciências Biológicas. Universidade de Caxias do Sul, UCS (1994); Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS (2000).

#### 2.2 Formação complementar

Estatística e Planejamento Experimental. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS, RS (2005); Programa Alfa 2, Rede Jean Mermoz. Projeto

de Formação de Investigadores. Laboratório de Processos de Separação e Reacção (LSRE), Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, FEUP, Universidade do Porto, Porto, Portugal (2004/2005); Extensão Universitária em Cromatografia Básica e Avançada. Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias do Sul, RS, (2002); Fermentation Technology Módulo IV - Projeto Alfa - Bioenge, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, SC (2004); Extensão Universitária em Capacitação de Recursos Humanos em Biossegurança, Universidade de Caxias do Sul, UCS, RS (2001); Fermentation Technology Módulo II - Projeto Alfa – Bioenge, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, SC (2000); Extensão Universitária em Melhoramento Genético e Biologia Molecular em Fungos, Universidade de Caxias do Sul, UCS, RS (1997).

### 3. ESTÁGIOS

Projeto Produção de Sorbitol e Ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. Bolsista DTI (Desenvolvimento Técnico Industrial) – FAPERGS, Universidade de Caxias do Sul, RS (2000); Desenvolvimento de processo de obtenção de óleos essenciais de frutas cítricas utilizando enzimas hidrolíticas, Bolsista CAPES (1998); Projeto Apoio à Reestruturação Tecnológica e Produtiva da Região da Serra do Rio Grande do Sul, Sub-Projeto: Produção de Celulases em Mutantes de *Trichoderma* sp e *Penicillium* sp, Bolsista CNPq - DTI (Desenvolvimento Técnico Industrial), Universidade de Caxias do Sul, RS, Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (Eldorado do Sul/RS) e IRFA Química e Biotecnologia Industrial (POA/RS) (1996); Projeto Melhoramento Genético de Linhagens de

*Trichoderma* sp e *Penicillium* sp para a Produção de Celulases. Bolsa CNPq - Aperfeiçoamento de Atividade de Pesquisa, Universidade de Caxias do Sul, RS (1995).

#### **4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR**

##### **4.1 Atuação profissional**

Universidade de Caxias do Sul, UCS, Brasil (2001 – atual). Enquadramento Funcional: Pesquisador, Carga horária: 40 horas. Regime: Dedicção exclusiva.

##### **4.2 Experiência didática**

Ensino, Curso de Engenharia Química, Nível: Graduação. Disciplina: Introdução à Bioengenharia (08/2006 – atual).

Ensino, Curso de Engenharia Ambiental, Nível: Graduação. Disciplina: Cinética de Processos Microbiológicos (03/2007 – atual).

Ensino, Curso de Farmácia, Nível: Graduação. Disciplina: Biotecnologia Aplicada à Farmácia, em cooperação com Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray (09 a 10/2004, 11 a 12/2003, 02/2003).

#### **5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS**

##### **5.1 Artigos completos publicados em periódicos**

1. PEDRUZZI I, MALVESSI E, MATA, VG, SILVA EAB, SILVEIRA MM, RODRIGUES AE, Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic

reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1145:128-132, 2007.

2. MALVESSI E, CONCATTO K, CARRA S, SILVEIRA MM. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, 49:139-144, 2006.

3. MALVESSI E, SILVEIRA MM. Medium and pH for the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47:693-702,2004.

## **6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

### **6.1 Trabalhos completos publicados em anais de congressos**

1. MALVESSI E, CARRA S, AYUB, MAZ, SILVEIRA MM. Efeito da temperatura, do pH e da concentração de substratos sobre a atividade enzimática de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2007, Curitiba.

2. PANAROTTO C, PIEROZAN C, VEDOVELLI R, KERN DB, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Influência da temperatura e do pH sobre o crescimento celular, produção de endotoxinas e esporulação de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* cultivado em biorreator de bancada. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2007, Curitiba.

3. HENDGES DH, MONTANARI Q, POLIDORO TA, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Produção de endo-PG por *Aspergillus niger* em meio sólido em biorreator de

dupla superfície. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2007, Curitiba.

4. CARRA S, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Cinética do cultivo de *Zymomonas mobilis* em meios com diferentes concentrações de extrato de levedura. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2007, Curitiba.

5. CARRA S, PASQUALI FC, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Bioconversão de carboidratos em sorbitol e ácidos orgânicos por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2005, Recife - Pernambuco.

6. MATOS JO, PANAROTTO C, PIEROZAN C, VEDOVELLI R, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Crescimento e esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meios com diferentes fontes de nitrogênio orgânico. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2005, Recife - Pernambuco.

7. FONTANA RC, SALVADOR S, SILVEIRA MM, MALVESSI E. Quantificação indireta de biomassa de *Aspergillus niger* visando à análise cinética da produção de poligalacturonases em meio sólido. In: XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, COBEQ, 2004, Curitiba.

8. FONTANA RC, SALVADOR S, SILVEIRA MM, MALVESSI E. Produção de pectinases por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido na presença de diferentes concentrações de glicose e pectina. In: XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, COBEQ, 2004, Curitiba.

9. PANAROTTO C, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Avaliação de cascas de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus*

*niger* em estado sólido. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, 2003, Florianópolis.

10. PANAROTTO C, VALIM RTO, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido com diferentes espessuras. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, 2003, Florianópolis.

11. CONCATTO K, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Formulação de meio de crescimento e produção de glicose-frutose oxidoreductase e etanol por *Zymomonas mobilis*. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, 2003, Florianópolis.

12. CARRA S, CONCATTO K, SILVEIRA MM, MALVESSI E. Cinética da ação de glicose-frutose oxidoreductase e glucono-lactonase de *Zymomonas mobilis* na presença de diferentes carboidratos. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, 2003, Florianópolis.

13. CARRA S, CONCATTO K, SILVEIRA MM, MALVESSI E. Produção de glicose-frutose oxidoreductase e etanol por *Zymomonas mobilis* em regimes descontínuo e descontínuo alimentado. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, 2003, Florianópolis.

14. MALVESSI E, SILVEIRA MM. Influência do pH do meio sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. In: I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, 2001, São Paulo.

15. SILVEIRA MM, MALVESSI E, DILLON AJP. Formulação de meio de produção de endo-poligalacturonase por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. In: XIII Simpósio Nacional de Fermentações, 2000, Teresópolis.

16. DILLON AJP, MALVESSI E, TURELLY NS, SILVEIRA MM. Produção de celulases por *Penicillium echinulatum*. In: IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 1999, Rio de Janeiro.

## **6.2 Resumos expandidos publicados em anais de congressos**

1. MALVESSI E, CARRA S, KERN DB, BASTIANI S, AYUB MAZ, SILVEIRA MM. Obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol com o complexo enzimático glicose-frutose oxidoredutase/glucono- $\delta$ -lactonase presente em células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Trabalho submetido em junho de 2008 para participação no VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2008, Rio de Janeiro.

2. BETTIN F, ROSA, LO, MONTANARI, Q, CALLONI R, MALVESSI E, SILVEIRA MM, DILLON AJP. Efeito da fonte de carbono e do pH sobre o crescimento e a produção de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS 2001 em processo submerso. Trabalho submetido em junho de 2008 para participação no VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2008, Rio de Janeiro.

3. HENDGES DH, MONTANARI Q, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Influência da temperatura sobre poligalacturonases produzidas em meio sólido por *Aspergillus niger*. Trabalho submetido em junho de 2008 para participação no VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2008, Rio de Janeiro.

4. MONTANARI Q, HENDGES DH, POLIDORO TA, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Influência da aeração superficial sobre a produção de endo-poligalacturonase em estado sólido por *Aspergillus niger* em reator de dupla superfície. In: 59ª Reunião Anual do SBPC, 2007, Belém.

5. MALVESSI E, CARRA S, PASQUALI FC, SILVEIRA MM, AYUB, MAZ. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase/gluconolactonase de *Zymomonas mobilis*. In: 58ª Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis.
6. HENDGES DH, ONZI RV, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Produção de Exopoligalacturonase por *Aspergillus niger* em estado sólido com diferentes espessuras de meio. In: 58ª Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis, 2006.
7. VEDOVELLI R, PIEROZAN C, PANAROTTO C, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Estudo cinético do crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando método indireto de quantificação de biomassa. In: 58ª Reunião Anual da SBPC- 13ª Jornada Nacional de Iniciação Científica, 2006, Florianópolis.
8. PIEROZAN C, VEDOVELLI R, PANAROTTO C, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meios com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. In: 58ª Reunião Anual da SBPC- 13ª Jornada Nacional de Iniciação Científica, 2006, Florianópolis.
9. CARRA S, PASQUALI FC, POLIDORO TA, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Avaliação de enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis* para a produção de sorbitol, ácido glucônico e ácido lactobiônico. In: 58ª Reunião Anual da SBPC- 13ª Jornada Nacional de Iniciação Científica, 2006, Florianópolis.

### **7.3 Resumos publicados em anais de congressos**

1. MALVESSI E, PASQUALI FC, CARRA S, POLIDORO TA, SILVEIRA MM, AYUB MAZ. Bioconversão de lactose em ácido lactobiônico por endoenzimas presentes em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em diferentes

configurações de biorreatores. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2006, Caxias do Sul.

2. BETTIN F, MALVESSI E, CALLONI R, GAIO TA, SILVEIRA MM, DILLON AJP. Produção de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator de bancada em regime descontínuo. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2006, Caxias do Sul.

3. HENDGES DH, ONZI RV, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Recuperação e caracterização frente à temperatura de exo-poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia

4. MALVESSI E, CARRA S, PASQUALI FC, SILVEIRA MM. Influência da reticulação com glutaraldeído sobre a estabilidade de endoenzimas de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.

5. PANAROTTO C, PIEROZAN C, MATTOS JO, VEDOVELLI R, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meios contendo fontes alternativas de nitrogênio orgânico. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.

6. PIEROZAN C, MATTOS, JO, VEDOVELLI R, PANAROTTO C, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Avaliação do crescimento e esporulação de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* utilizada no controle de dípteros importantes para saúde pública. In: Farmápolis, 13ª edição, 2005, Joinville.

7. PASQUALI FC, CARRA S, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Incremento da atividade de glicose-frutose oxidorreductase/gluconolactonase de *Zymomonas mobilis* por influência de cátions metálicos. In: Farmápolis, 13ª edição, 2005,

8. SILVEIRA MM, MALVESSI E. Produção enzimática de sorbitol e ácidos orgânicos. In: VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2004, Rio de Janeiro.
9. CARRA S, PASQUALI FC, CONCATTO K, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Bioconversão de lactose em ácido lactobiônico por enzimas de *Zymomonas mobilis*. In: VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2004, Rio de Janeiro.
10. FONTANA RC, SALVADOR S, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Análise cinética da produção de poliglacturonases por *Aspergillus niger* em diferentes espessuras de leito de meio. In: VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2004, Rio de Janeiro.
11. SALVADOR S, FONTANA RC, SILVEIRA MM, MALVESSI E. Produção de poligalacturonases e quantificação de biomassa de *Aspergillus niger* visando à análise cinética em meio sólido. In: Farmápolis, 12ª edição, 2004, Florianópolis.
12. SALVADOR S, FONTANA RC, SILVEIRA MM, MALVESSI E. Avaliação de diferentes concentrações de glicose para a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido. In: Farmápolis, 12ª edição, 2004, Florianópolis.
13. CARRA S, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Caracterização enzimática de Glicose-frutose oxidoredutase e glucono-lactonase de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácido lactobiônico. In: Farmápolis, 12ª edição, 2004, Florianópolis.
14. PANAROTTO C, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Avaliação de indutores e nutrientes na produção de poligalacturonases em estado sólido por *Aspergillus niger*. In: V Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2004, Caxias do Sul.

15. CARRA S, CONCATTO K, PASQUALI FC, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. In: Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2004, Caxias do Sul.
16. FONTANA RC, SALVADOR S, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Aplicação de métodos indiretos de quantificação de biomassa de *Aspergillus niger* no estudo cinético da produção de poligalacturonases em estado sólido. In: V Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2004, Caxias do Sul.
17. MATOS JO, PANAROTTO C, VEDOVELLI R, MALVESSI E, SILVEIRA MM. Avaliação de componentes para a formulação de meios de produção de delta-endotoxinas por *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. In: XX Congresso Brasileiro
18. MALVESSI E, SILVEIRA MM, CONCATTO K. Avaliação de diferentes aldoses como co-substratos para a produção de ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. In: V Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2002, Brasília.
19. MALVESSI E, SILVEIRA MM, CONCATTO K. Biotransformação de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico por células de *Zymomonas mobilis*. In: V Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2002, Brasília.
20. MALVESSI E, SILVEIRA MM. Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. In: IV Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2001, Caxias do Sul.
21. SILVEIRA MM, MALVESSI E. Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. In: IV Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2001, Caxias do Sul.

22. DILLON AJP, SILVEIRA MM, SHIRMER M, VELHO TAF, AZEVEDO MO, MALVESSI E. Celulases de *Penicillium echinulatum*, uma alternativa para a indústria têxtil. In: IV Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2001, Caxias do Sul.
23. MALVESSI E, DILLON AJP, SHIRMER M, MENEGUETTI LR, SILVEIRA MM, TURELLY NS, MELO MC. Escalonamento e formulações de meios para a produção de celulases em mutantes de *Penicillium echinulatum*. In: III Simpósio de Ciência e Tecnologia, 1999, Caxias do Sul.
24. MALVESSI E, DILLON AJP, ZORGI C, ROCHA RCS. Mutagênese e seleção para produtores de celulases. In: Simpósio de Saúde e Meio Ambiente - I Encontro Científico do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), 1997, Caxias do Sul.
25. MALVESSI E, DILLON AJP, MELO MC, MENEGHETTI LR. Escalonamento de fermentações para a produção de celulases. In: II Simpósio de Ciência e Tecnologia, 1997, Caxias do Sul.
26. DILLON AJP, MALVESSI E, FALCÃO AR, THIELE R. Indução de fusão de protoplastos entre linhagens de *Trichoderma harzianum* e *Penicillium* sp. In: 42º Congresso Nacional de Genética, 1996, Caxambu.
27. MALVESSI E, DILLON AJP, FALCÃO AR, THIELE R. Obtenção de regenerantes de protoplastos a partir de linhagens produtoras de celulases. In: 42º Congresso Nacional de Genética, 1996, Caxambu.
28. MALVESSI E, DILLON AJP. Enriquecimento do bagaço de uva com proteína fúngica. In: I Simpósio de Ciência e Tecnologia, 1995, Caxias do Sul.

#### **7.4 Produção técnica**

1. SILVEIRA MM, MALVESSI E, CARRA S, PASQUALI FC, POLIDORO TA.

Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácidos orgânicos ou seus sais, preparação de elevada pureza isomérica de ácidos orgânicos ou seus sais.

Depósito de pedido de patente de invenção, 2007.