

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
TAMMY PROENÇA ZAGONEL

OBTENÇÃO DE ÁCIDO LACTOBÍONICO POR PROCESSO DE  
TRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO *Zymomonas mobilis* ATCC 29191



CURITIBA  
2013

TAMMY PROENÇA ZAGONEL

OBTENÇÃO DE ÁCIDO LACTOBÍÔNICO POR PROCESSO DE  
TRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO *Zymomonas mobilis* ATCC 29191

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Profa. Dra. Debora Brand  
Profa. Dra. Tania Maria Bordin  
Bonfim.

CURITIBA  
2013

## TERMO DE APROVAÇÃO


**TAMMY PROENÇA ZAGONEL**

**Título: "OBTENÇÃO DE ÁCIDO LACTOBÍÔNICO POR PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO ZYMOMONAS MOBILIS ATCC 29191"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



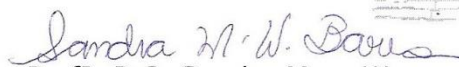
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Debora Brand  
Orientadora



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tania Maria Bordin Bonfim  
Co-orientadora



Prof. Dr. Luiz Gustavo Lacerda  
Universidade Positivo



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Mara Woranoyicz Barreira  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 29 de agosto de 2013.

Aos meus pais, que abriram mão de tudo que foi necessário pela nossa educação. Um pequeno retorno aos seus esforços, mostrando que aprendi que o conhecimento é uma das poucas coisas que nunca se perde, e vale a pena buscá-lo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me concede.

À minha família, especialmente minha mãe Gessy do Pilar Proença Zagonel e meu pai Paulo Zagonel pelo amor, pelo carinho, pela enorme dedicação, pela educação que me proporcionaram.

Ao meu irmão Gustavo Zagonel pela companhia, pelo amor e carinho.

Ao meu querido marido Caio Ruan Nichele, pelo amor, pela paciência nos momentos difíceis e pelo constante incentivo e apoio.

Às minhas orientadoras, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Brand e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tania Maria Bordin Bonfim por todo o conhecimento que me proporcionaram, pela amizade e carinho, pelos conselhos preciosos, pelo incentivo, por ter permitido a finalização deste trabalho

Ao Prof. Dr. Luiz Ramos e Dr. Arion Zandoná Filho, pela orientação e ajuda nas análises cromatográficas e por ter permitido o uso dos equipamentos do laboratório.

Ao Dr. Maurício Passos, pela orientação e ajuda nas análises cromatográficas.

À Flavia Deffert pela ajuda e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, pela ajuda, pelas brincadeiras e palavras de conforto nos momentos difíceis.

A todos os amigos, pela presença, pelo carinho, pelas conversas e pela demonstração de interesse em saber um pouco mais sobre o meu trabalho.

Agradeço ao apoio financeiro do Grupo Boticário.

A presente dissertação é resultado do contrato número 23075.092983/2011-95, de dezembro de 2011, que entre si celebraram o Grupo Boticário (Laboratório de Pesquisas e Desenvolvimento de Cosméticos LTDA – LADECOM), e a Universidade Federal do Paraná – UFPR, com a interveniência da Fundação da Universidade Federal do Paraná para o Desenvolvimento da Ciência, da Tecnologia e da Cultura – FUNPAR.

A Universidade Federal do Paraná por meio do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas agradece o apoio financeiro do Grupo Boticário – Laboratório de Pesquisas e Desenvolvimento de Cosméticos LTDA.

## RESUMO

O ácido lactobiônico é um poli hidroxí ácido composto por uma molécula de galactose e outra de ácido glucônico, unidas por uma ligação éter, considerado uma substância biocompatível, biodegradável, quelante, anfifílica e antioxidante. Possui múltiplas aplicações nos setores cosméticos, alimentícios e farmacêuticos e é reconhecido por agregar valor aos produtos que o contém. Dentre os micro-organismos que são capazes de realizar a oxidação da lactose em ácido lactobiônico, está a bactéria *Zymomonas mobilis*, que possui a enzima glucose frutose oxidoreductase. Dessa forma, a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi cultivada e as células totais sem tratamento prévio foram utilizadas nos processos de transformação. Foi avaliado o efeito do pH, da concentração inicial de células e da agitação no meio reacional para a transformação de lactose em frascos na temperatura de 30° C. Em biorreator, temperatura de 39 ° C, agitação de 400 rpm e pH controlado em 6,4, foram verificados o efeito da adição de frutose em diferentes concentrações em meios reacionais com 220 g.L<sup>-1</sup> de lactose. Também foi testado o efeito da concentração de células inoculadas no início de cada processo. Nos processos realizados em frascos foi formado 0,69 ± 0,02 g.L<sup>-1</sup> e 2,30 ± 0,04 g.L<sup>-1</sup> de ácido lactobiônico, em 70 horas de processo, quando foi utilizado um grama de células secas e três gramas de células secas por litro no início dos processos e agitação de 150 rpm e 200 rpm, respectivamente. Quando foi empregada a concentração de 220 g.L<sup>-1</sup> de lactose e 11,4 g.L<sup>-1</sup> ± 1,7 g.L<sup>-1</sup> de células secas no início dos processos em biorreator, as concentrações de ácido lactobiônico obtidas foram de 20,13 ± 2,53 g.L<sup>-1</sup> e 31,95 ± 0,08 g.L<sup>-1</sup>, quando foram utilizados 40 g.L<sup>-1</sup> e 75 g.L<sup>-1</sup> de frutose no meio reacional em três e seis horas de processo, respectivamente. Nas mesmas condições com concentração inicial de células de 16,6 ± 1,2 g.L<sup>-1</sup> verificou-se a formação de. 36,23 ± 1,17 g.L<sup>-1</sup> de ácido lactobiônico, em 6 horas de processo.

Palavras-chave: ácido lactobiônico, *Zymomonas mobilis*, processo de transformação, lactose.

## ABSTRACT

Lactobionic acid is a polyhydroxy acid constituted of one molecule of galactose and of gluconic acid united by an ether bond, it is considered a biocompatible, biodegradable, chelating, *amphiphilic* and antioxidant substance. Presents multiple applications in the cosmetic, food and pharmaceutical sectors and is recognized to add value to the products that contain it. Among the microorganisms that are capable to accomplish the oxidation of lactose to lactobionic acid is the bacteria *Zymomonas mobilis* which presents the enzyme glucose-fructose oxidoreductase. In this way the bacteria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 was cultivated and the total whole cells without any pre-treatment were used in transformation processes. The effect of the pH, initial cell concentration and agitation were evaluated in the reaction media to transform lactose in flasks at 30° C. In bioreactor, temperature of 39° C, agitation of 400 rpm and pH controlled at 6,4, the effect of the addition of different concentrations of fructose in reaction media containing lactose 220 g.L<sup>-1</sup> was tested. The cell concentration inoculated at the beginning of each process was also experienced. In processes accomplished in flasks it was formed 0,69 ± 0,02 g.L<sup>-1</sup> e 2,30 ± 0,04 g.L<sup>-1</sup> of lactobionic acid in 70 hours when it was used a concentration of one and three grams of dry cell per liter and agitation of 150 rpm and 200 rpm, respectively. When the concentration of 220 g.L<sup>-1</sup> lactose and 11,4 g.L<sup>-1</sup> ± 1,7 g.L<sup>-1</sup> of dry cells were used at the processes in bioreactor, the concentration of lactobionic acid were 20,13 ± 2,53 g.L<sup>-1</sup> and 31,95 ± 0,08 g.L<sup>-1</sup>, when 40 g.L<sup>-1</sup> and 75 g.L<sup>-1</sup> of fructose were added to the reaction media in three and six hours of process, respectively. With the same conditions and an initial cell concentration of 16,6 ± 1,2 g.L<sup>-1</sup> it was verified a formation of 36,23 ± 1,17 g.L<sup>-1</sup> of lactobionic acid in six hours.

Key-words: lactobionic acid, *Zymomonas mobilis*, transformation process, lactose.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1- FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO.....18
- FIGURA 2 - DIAGRAMA DE FITA DA GLUCOSE FRUTOSE OXIDOREDUTASE TETRÂMERA, COM REPRESENTAÇÃO DE NADP EM BRANCO. CADA SUBUNIDADE ESTÁ REPRESENTADA DE UMA COR DIFERENTE.....26
- FIGURA 3A - METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM *Zymomonas mobilis*.....28
- FIGURA 3B – REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO, E SORBITOL, COM CICLOS DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO DE NADP, NA ENZIMA GLUCOSE FRUTOSE OXIDOREDUTASE, E HIDRÓLISE DA LACTONA POR GLUCONO LACTONASE, A PARTIR DE LACTOSE E FRUTOSE, UTILIZANDO A BACTÉRIA *Zymomonas mobilis*.....30
- FIGURA 4 - VARIAÇÃO DE VALOR DE pH E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 NO MEIO CONTENDO O SUBSTRATO LIMITANTE GLUCOSE 20 g.L<sup>-1</sup>, NA TEMPERATURA DE 30°C E AGITAÇÃO DE 150 rpm.....41
- FIGURA 5 - VARIAÇÃO DO VALOR DE pH, CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E DE CÉLULAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 NO MEIO CONTENDO O SUBSTRATO LIMITANTE GLUCOSE 80 g.L<sup>-1</sup> NA TEMPERATURA DE 30°C E AGITAÇÃO DE 150 rpm..... 42
- FIGURA 6 - CURVA DE CALIBRAÇÃO E EQUAÇÃO DA RETA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO.....45
- FIGURA 7 - VARIAÇÃO DO VALOR DE pH E FORMAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO, POR *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, EM MEIO LACTOSE 140 g.L<sup>-1</sup>, EMPREGANDO CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 1,0 g.L<sup>-1</sup>, 150 rpm (rosa); CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 3,0 g.L<sup>-1</sup>, 200 rpm (azul), COM AJUSTE DE pH EM 6,50 ± 0,2, E TEMPERATURA DE 30°C.....46
- FIGURA 8 - VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE, DE CÉLULAS SECAS, LACTOSE E FORMAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO EM FUNÇÃO DO TEMPO, EMPREGANDO A BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, NA TEMPERATURA DE 30°C, AGITAÇÃO DE 400 rpm E pH CONTROLADO EM 6,5 .....47

- FIGURA 9 - CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE RESIDUAL, DE CÉLULAS SECAS NO FINAL DA PRIMEIRA, SEGUNDA E TERCEIRA ETAPA DO DESENVOLVIMENTO DO INÓCULO DE *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, UTILIZANDO O MEIO ADICIONADO DE 50 g.L<sup>-1</sup> (Etapa 1), 100 g.L<sup>-1</sup> (Etapa 2) E 150 g.L<sup>-1</sup> (Etapa 3) DE GLUCOSE, pH 5,50 ± 0,2, TEMPERATURA DE 30°C E AGITAÇÃO DE 150 rpm.....50
- FIGURA 10 - VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, FRUTOSE, ÁCIDO LACTOBIÔNICO, SORBITOL E ETANOL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO, PELA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, EM MEIO REACIONAL COM LACTOSE 220 g.L<sup>-1</sup> E FRUTOSE 40 g.L<sup>-1</sup>, NAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA DE 39°C E AGITAÇÃO DE 400 rpm E CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 11,4 ± 1,7 g.L<sup>-1</sup> .....52
- FIGURA 11 - VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, FRUTOSE, ÁCIDO LACTOBIÔNICO, SORBITOL E ETANOL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO, PELA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, EM MEIO REACIONAL COM LACTOSE 220 g.L<sup>-1</sup> E FRUTOSE 75 g.L<sup>-1</sup>, NAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA DE 39°C E AGITAÇÃO DE 400 rpm E CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 11,4 ± 1,7 g.L<sup>-1</sup> .....52
- FIGURA 12 - VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, FRUTOSE, ÁCIDO LACTOBIÔNICO, ETANOL E SORBITOL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO, PELA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, EM MEIO COM LACTOSE 190 g.L<sup>-1</sup> E FRUTOSE 75 g.L<sup>-1</sup>, NAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA DE 39°C, AGITAÇÃO DE 400 rpm E CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 16,6 ± 1,2 g.L<sup>-1</sup> .....54
- QUADRO 1 - CONVERSÃO DE CARBOIDRATOS EM SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS ALDÔNICOS PELA ENZIMA GLUCOSE FRUTOSE OXIDOREDUTASE PURIFICADA, NAS CONDIÇÕES DE 1 M DE MONOSSACARÍDEOS E 1 M DE D-FRUTOSE OU 0,5 M DE DISSACARÍDEOS E 1 M DE D-FRUTOSE NA TEMPERATURA DE 30° C, pH 6,2, ENZIMA 1 U.mL<sup>-1</sup>, POR 50 HORAS.....31

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
3.1 RELEVÂNCIA DOS ACIDOS ALFA-HIDROXI E POLI-HIDROXI.....	15
3.2 PROPRIEDADES DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO E DA LACTOSE .....	18
3.3 OBTENÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO .....	19
3.3.1 Processos químicos, eletroquímicos e hidrogenação catalítica .....	19
3.3.2 Processos biocatalíticos .....	21
3.4. MICRO-ORGANISMO <i>Zymomonas mobilis</i> .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 MICRO-ORGANISMO .....	33
4.1.1 Ativação e conservação .....	33
4.1.2 Cinética do crescimento do micro-organismo <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191 .....	34
4.2 PROCESSOS DE TRANSFORMAÇÃO .....	35
4.2.1 Desenvolvimento do inóculo.....	35
4.2.2 Processos de transformação em frascos .....	37
4.2.3 Processos de transformação em Biorreator .....	37
4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	38
4.3.1 Determinação da concentração celular .....	38
4.3.2 Taxa específica de crescimento .....	39
4.3.3 Identificação e quantificação do ácido lactobiônico, da lactose, da frutose, da glucose, de sorbitol e de etanol.....	39
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	40

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse industrial pelo desenvolvimento de processos mais eficientes e com menor impacto ambiental coloca em destaque processos biotecnológicos como uma excelente alternativa à manufatura tradicional.

A descoberta de vias metabólicas no metabolismo de micro-organismos para produzir substâncias de interesse comercial criou oportunidades para o desenvolvimento de processos com vantagens mercadológicas. O conhecimento das vias metabólicas dos micro-organismos para a síntese de bioprodutos possibilita o delineamento de condições específicas para a obtenção destes; além disso, oferece uma alternativa para geração de novos produtos de interesse.

O ácido lactobiônico tem sido reportado na literatura como constituinte de um conjunto de produtos provenientes do aproveitamento da lactose, com agregação de valor, e tem despertado o interesse para a produção industrial.

O ácido lactobiônico é um poli hidroxí ácido composto de uma molécula de galactose e outra de ácido glucônico unidas por uma ligação éter. Possui múltiplas aplicações nos setores alimentícios (KRAFT FOODS, 2002; KRAFT FOODS, 2010; NOVOZYMES A/S, 2012.), cosméticos (JOHNSON & JOHNSON CONSUMER FRANCE, 2010; GREEN *et al.*, 2008, p. 76-82; TASIC-KOSTOV *et al.*, 2010, p. 3–10) e farmacêuticos (SOOFT ITALIA SPA, 2012; SOUTHARD, 2004, p. 79-84; CAVALLARI *et al.*, 2003, p. 814-821) e é reconhecido por agregar valor aos produtos que o contém. É uma substância biocompatível, biodegradável, quelante, anfífila e antioxidante, e está ganhando relevância no setor de engenharia de tecidos (GUO, X. L., 2003, p. 551-565; KEKKONEN, V. *et al.*, 2009, p. 1393–1396) e nanomedicina (ZHAO *et al.*, p. 346–352, 2011; VALLE, T. A. *et al.*, 2013, p. 1-5).

Atualmente, a obtenção do ácido lactobiônico ocorre por hidrogenação catalítica a partir da lactose, porém este processo possui inconvenientes que a produção por via microbiana pode superar, como a utilização de catalisadores poluentes (GUTIÉRREZ, HAMOUDI; BELKACEMI, 2012a, p. 103-111).

Dentre os micro-organismos que são capazes de realizar a oxidação da lactose em ácido lactobiônico, está a bactéria *Zymomonas mobilis*, que possui a enzima glucose frutose oxidoreductase, a qual realiza a conversão da lactose em ácido lactobiônico. Esta enzima é ligada fortemente com nicotinamida adenina

dinucleótido fosfato (NADP), e, por isso, proporciona catálise de natureza cíclica que é bastante vantajosa, pois o cofator, um reagente geralmente dispendioso, não é consumido (HARDMAN; SCOPES, 1986, p. 863-869).

Na literatura, a formação do ácido lactobiônico normalmente é descrita como processos envolvendo células permeabilizadas, ou células imobilizadas, ou células permeabilizadas e imobilizadas de diferentes micro-organismos e enzimas isoladas de micro-organismos e purificadas que realizam a bioconversão a partir de lactose (SATORY *et al.*, 1997, p. 1205-1208; MALVESSI *et al.*, 2013, p. 1-10). Os estudos encontrados relacionados à obtenção deste produto e a diversidade de aplicações do ácido lactobiônico, ainda emergentes, demonstra o interesse no desenvolvimento de processos alternativos para a produção de ácido lactobiônico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de ácido lactobiônico utilizando o micro-organismo *Zymomonas mobilis* ATCC 29191.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a cinética do crescimento do micro-organismo em diferentes meios de cultivo;

Verificar o efeito do pH e da velocidade de agitação na formação de ácido lactobiônico em processos de transformação microbiana realizados em frascos;

Cultivar o micro-organismo em biorreator e avaliar a formação de ácido lactobiônico pela adição do precursor lactose no meio do processo;

Analisar a concentração dos substratos lactose e frutose e de células inicial nos processos de transformação da lactose em ácido lactobiônico em biorreator.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 RELEVÂNCIA DOS ACIDOS ALFA-HIDROXI E POLI-HIDROXI

Os ácidos alfa-hidroxi são ácidos orgânicos com propriedade antioxidante, os mais utilizados são o ácido glicólico e o ácido láctico, provenientes da cana-de-açúcar e derivado do leite, respectivamente. Foram introduzidos no mercado farmacêutico e cosmético, em meados da década de 80, com a utilização do ácido glicólico. Nos anos 90, o ácido láctico foi descrito como fator de hidratação natural da pele e para tratamento de ictiose e distúrbios de queratinização (SCOTT; YU, 1984, p. 867-879).

A combinação de retinóides tópicos com o ácido glicólico tem sido utilizada com finalidade de *peeling* para suavizar sinais de envelhecimento. Os ácidos alfa-hidroxi têm a capacidade de reduzir a coesão de células mortas da pele, deixando-a mais lisa, menos enrugada e com aspecto menos manchado (DITRE *et al.*, 1996, p. 187-195; GHERSETICH *et al.*, 1997, p. 1-11; TRISTRATA TECHNOLOGY, 1996). A desvantagem na utilização destes ativos mencionados, está nos problemas de irritação, queimação e ardência, associados ao baixo pH da formulação (GRIMES *et al.*, 2004, p. 3-13; GRAF, 2005, p. 17-28).

Os ácidos poli-hidroxi são a nova geração de ácidos alfa-hidroxi. Eles atuam em mecanismos descritos no processo de envelhecimento, proporcionando uma pele com um aspecto mais saudável e jovem. Este grupo inclui as glucono-lactonas e o ácido lactobiônico, que são moléculas estruturalmente maiores do que ácidos alfa-hidroxi, o que gera uma penetração mais lenta na epiderme e, portanto, menos efeitos colaterais descritos do que para os ácidos alfa-hidroxi (BRIDEN; GREEN, 2005, p. 44-45; GRIMES *et al.*, 2004, p. 3-13).

Além dos benefícios esfoliantes dos ácidos alfa-hidroxi, os ácidos poli-hidroxi fornecem benefícios adicionais de reforço da função de barreira do estrato córneo. Isso faz com que a compatibilidade da epiderme seja reforçada e permite a utilização para a maioria dos tipos de pele, incluindo peles sensíveis. Os ácidos poli-hidroxi, como ácido lactobiônico, são antioxidantes, e agem como agentes de proteção são capazes de quelar íons de ferro e sequestrar radicais hidroxila, diminuindo assim os



danos causados pelos radicais livres, gerados por estresse oxidativo, em condições fisiopatológicas, como o envelhecimento, processos infecciosos, inflamatórios, câncer entre outros (GRAF, 2005, p. 17-28).

Green, Edison e Sigler, (2008, p. 76-82), em estudo com mulheres com idade entre 39 e 60 anos, avaliaram um tratamento empregando creme com ácido lactobiônico 8%, por 6 e 12 semanas. Pela avaliação clínica, foram observadas melhoras na textura, nas manchas e na rugosidade da pele, além do aumento da firmeza, da elasticidade e da espessura da pele. Pela auto-avaliação, foram verificadas melhorias significativas na textura da pele, elasticidade, linhas finas e rugas, e nenhuma irritação foi relatada. Foi realizado um estudo histológico a partir de uma biópsia da região tratada e da região não tratada das voluntárias participantes do estudo. As análises histológicas mostraram um aumento na espessura da epiderme viável, com um estrato córneo compacto e um aumento do conteúdo cutâneo de glicosaminoglicanos. O estudo histológico também mostrou uma redução na marcação para metaloproteinase 9 em queratinócitos. Metaloproteinase 9 é uma enzima gelatinase que degrada componentes da matriz extracelular, como elastina e colágeno tipo IV, V e X. Concluiu-se que o tratamento proporcionou melhorias significativas nos sinais de fotoenvelhecimento.

Hatano *et al.*, (2009, p. 1824–1835), em estudo em modelo murino, concluíram que a manutenção de um pH baixo por aplicações tópicas de ácido lactobiônico a 10% bloqueou o desenvolvimento de dermatite atópica induzida.

Giedrojcl (1998, p. 132-136) investigou o potencial aditivo do composto LW 10082 (ácido lactobiônico sulfatado), na atuação com antitrombóticos, como Molsidomine, Ticlopidina e Daltrobane e possíveis interações. O estudo foi conduzido num modelo de vênulas mesentéricas de camundongo, nas quais foi realizado um determinado número de lesões, por um laser de argônio, para indução da formação de trombos. O número de lesões necessárias para induzir o trombo foi quantificado. A combinação de LW 10082 com Molsidomine e LW 10082 com Daltrobane apresentou um efeito antitrombótico aditivo significativo.

As principais aplicações comerciais propostas do ácido lactobiônico derivam das suas propriedades antioxidantes, quelantes e emulsificantes.

Na indústria farmacêutica, o ácido lactobiônico tem sido utilizado na solução de Wisconsin, na forma de sal de potássio, conhecida comercialmente como solução Belzer ou Viaspan e na solução Celsior (SOUTHARD; BELZER, 1995, p. 235-247;

CAVALLARI *et al.*, 2003, p. 814-821), para estabilizar órgãos em transplantes. Nestas soluções, o ácido lactobiônico inibe a produção de radicais livres pelo tecido, por complexação com ferro oxidado, reduzindo assim o dano no tecido (CHARLOUX *et al.*, 1995, p. 699-704; SHEPHERD *et al.*, 1993, p. 23-48).

A solução de Wisconsin tornou-se padrão de ouro para a preservação de órgãos como fígado e coração. A solução Celsior mostrou-se equivalente à solução de Wisconsin em estudos clínicos, pois aproveita os agentes primários da solução de Wisconsin, porém com concentração mais elevada de ácido lactobiônico. Além disso, o ácido lactobiônico foi apontado como supressor da indução hipotérmica do edema tecidual (SOUTHARD, 2004, p. 79-84; SOUTHARD; BELZER, 1995, p. 235-247; GREEN, 2005, p. 44-45; CAVALLARI *et al.*, 2003, p. 814-821).

Outra aplicação do ácido lactobiônico na indústria farmacêutica é para a estabilidade e na solubilidade de antibióticos macrolídeos, como eritromicina e claritromicina (FOSHAN, 2011). Além disso, o ácido lactobiônico tem sido utilizado para vetorização de drogas, pelo desenho de alguns vetores a partir de nanomateriais e nanopartículas funcionais. Foi usado na construção de partículas *virus-like*, uma nanopartícula biológica com biocompatibilidade e biodegradabilidade, para direcionamento específico para hepatócitos ou células de hepatoma (ZHAO *et al.*, 2011, p. 346–352). Uma aplicação emergente do ácido lactobiônico deriva de grupo galactose, que pode atuar como um ligante específico. Com esta finalidade, o ácido lactobiônico foi modificado e utilizado para transportar drogas para o tratamento de câncer de fígado e mama (LU *et al.*, 2010, p. 2529–2538; STANNARD *et al.*, 2010, p. 95–110; ZHANG *et al.*, 2011, p. 1665–1673).

A indústria alimentícia utiliza o ácido lactobiônico em bebidas energéticas, pela capacidade de complexação com minerais. Ele é fermentado pela flora intestinal e utilizado como um prebiótico (TOSHIKI *et al.*, 1995, p. 199-208). É empregado também, como agente de viscosidade e como acidulante. De acordo com o FDA (*Food and Drug Administration*, 2012), o ácido lactobiônico é um alimento seguro como aditivo na forma de sal de cálcio.

O ácido lactobiônico tem destaque na indústria de cosmético não somente em função do seu alto poder antioxidante, mas também do seu poder hidratante e cicatrizante. Ele tem propriedade de se ligar à água e formar uma película geleificante, que retém até 14% de água, o que fornece a maciez para a pele. Não é

um composto fotossensível, podendo ser utilizado em cosméticos que sejam aplicados durante o dia (GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012a, p. 103-111).

O mercado do ácido lactobiônico não possui, ainda, uma avaliação bem definida, porém especulações mostram que esta substância e seus sais são comercialmente produzidos em pequenas quantidades, por hidrogenação catalítica, para aplicações médicas e industriais, bem como para fins de pesquisa. Os principais produtores são: a indústria alemã, *Solvay* e a holandesa *Friesl and Campina Domo*. De acordo com Affertsholt-Allen (2007), a comercialização de ácido lactobiônico é entre 15.000 e 17.000 toneladas por ano, com uma esperada taxa de crescimento anual de 5% (GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012a, p. 103-111).

### 3.2 PROPRIEDADES DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO E DA LACTOSE

O ácido lactobiônico (ácido 4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucônico) é um ácido poli-hidroxi, composto de um carboidrato (galactose) e um ácido aldônico (ácido glucônico) unidos por uma ligação éter (FIGURA 1) (GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012a, p. 103-111).

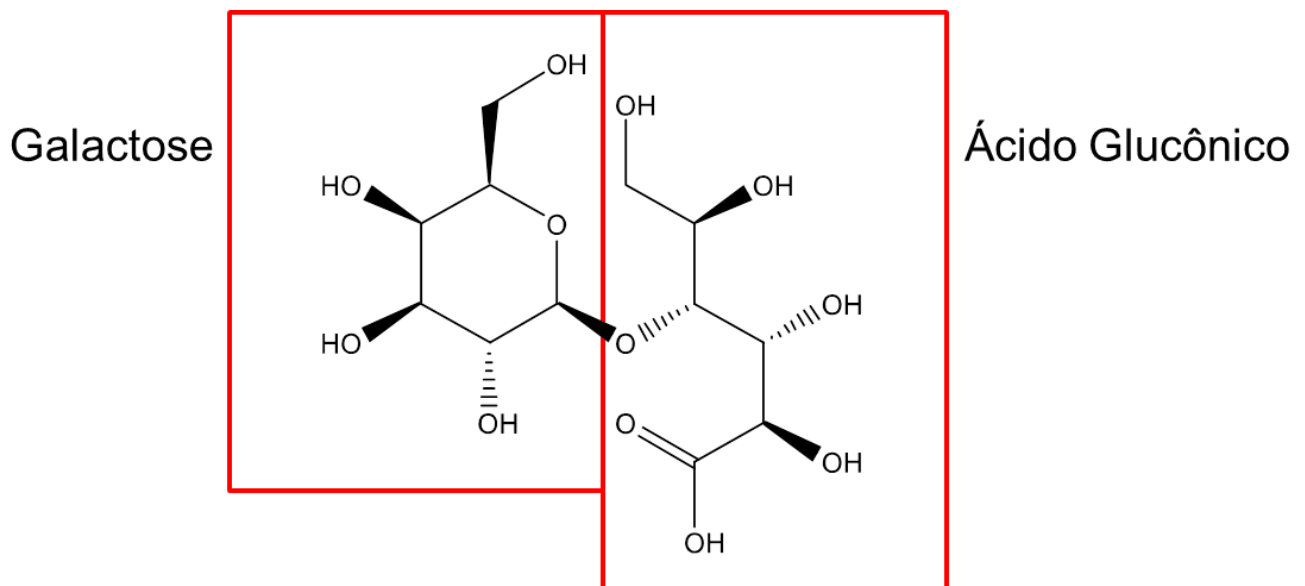


FIGURA 1- FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO  
FONTE: O autor (2013).

Segundo a Real Farmacopea Española (2006), há uma alternância em proporções variáveis entre o ácido 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucônico e o 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucônio-1,5-lactona, portanto é uma mistura entre o composto com a cadeia aberta (forma ácida) e o composto com a cadeia fechada (lactona). O ácido lactobiônico apresenta fórmula molecular  $C_{12}H_{22}O_{12}$ , peso molecular de  $358,3 \text{ g.mol}^{-1}$ , ponto de fusão entre  $113^\circ - 118^\circ \text{ C}$ , solúvel em água e levemente solúvel em metanol, etanol e ácido acético glacial (BUDAVARI *et al.*, 1989, p. 5224).

### 3.3 OBTENÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO

A conversão seletiva de lactose em ácido lactobiônico consiste na oxidação do grupo aldeído livre da glucose no grupo carboxílico. A síntese do ácido lactobiônico foi realizada, primeiramente, por Fischer e Meyer (1889, p. 361–364), por oxidação da lactose com bromo. Desde então, processos químicos, eletroquímicos, biocatalíticos e hidrogenação catalítica têm sido investigados (GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012a, p. 103-111).

#### 3.3.1 Processos químicos, eletroquímicos e hidrogenação catalítica

Os métodos eletroquímicos para a oxidação da lactose em ácido lactobiônico já foi objetivo de diversos estudos encontrados na literatura. Dentre eles está o modelo de Sengupta, Bhattacharya e Basu (1967, p. 152-154) que utilizou o bromo na presença de carbonato de cálcio para a realização desta oxidação.

A oxidação eletrocatalítica, apresentada no trabalho de Druliolle, Kokoh e Beden, (1995, p. 77-83), foi realizada com eletrodos de platina em meio tamponante, composto de carbonato e bicarbonato de sódio e lactose 0,01 M. Neste meio eletrolítico, foi adicionado sal de perclorato de chumbo. A eletrólise durou quatro horas, com uma taxa de conversão de 78%, foram obtidos 0,00 78 M de ácido lactobiônico.

Outro método eletroquímico é a oxidação eletrocatalítica de lactose, utilizando uma concentração de 10,1 mM deste carboidrato, em uma escala nanométrica com colóide de ouro incorporados em feltro de carbono como eletrodo (Au-NMC) apresentado por Kokoh e Alonso, em 2005 (p. 147-151). A produção de ácido lactobiônico atingiu uma conversão de 91%. Murzina *et al.* (2008, p. 385–392) estudaram diferentes suportes para a produção de ácido lactobiônico a partir de lactose em catalisadores a base de ouro, nas condições de pH 8,0, temperatura 60° C. Os catalisadores suportados por óxido de alumínio III apresentaram maior atividade.

É possível, também, realizar a síntese do ácido lactobiônico por hidrogenação catalítica. Glattfeld e Schimpff (1935, p. 2204–2208) desenvolveram o método de hidrogenação catalítica para a síntese de ácidos aldônicos em meio aquoso, e obtiveram 79% de conversão, em 20 minutos.

Outros processos de hidrogenação catalítica são descritos na literatura, como o trabalho de Hendriks, Kuster e Marin (1990, p. 121-129) que obtiveram ácido lactobiônico por oxidação catalítica da lactose sobre a platina promovida pelos catalisadores paládio e bismuto. Abbadì *et al.*, (1997, p. 105-115), realizaram a conversão de lactose para 1-carboxilactulose (ácido 2-ceto-lactobiônico) pela oxidação com ar e dois catalisadores, o bismuto e a platina, ligados à rede de carbono. Em duas horas, a lactose foi completamente oxidada a ácido lactobiônico e em quatro horas e meia, 83% foi convertida a 1-carboxilactulose, em pH 7,0.

Karski (2006, p. 147-154), realizou a reação de catálise utilizando catalisadores bimetálicos, paládio e bismuto, com uma pequena quantidade de bismuto, de 1% a 3%, e os resultados demonstraram que esta última reação é mais seletiva na oxidação da lactose.

Tokarev *et al.* (2006, p. 199-208) descreveram o mecanismo de oxidação da lactose em meio alcalino. Eles afirmaram que a oxidação ocorre quando a lactose está na forma de um semi-acetal, então ela é desidrogenada, a carbonila formada reage com um metal e forma o lactobionato.

Em 2011, estudos de Gutiérrez, Hamoudi, e Belkacemi (2011, p. 94–103; 2012b, p. 213–223) apresentaram a síntese de ácido lactobiônico empregando catalisadores de ouro suportados em materiais mesoporosos de sílica. O processo obteve 100% de seletividade para o ácido lactobiônico em 100 minutos de reação.

### 3.3.2 Processos biocatalíticos

A síntese de ácido lactobiônico, por via microbiana, foi inicialmente reportada em estudos de atividade bioquímica que visavam a oxidação da lactose e da maltose a ácidos biônicos por espécies de *Pseudomonas*. Em 1947, Stodola e Lockwood (p. 213-221) cultivaram a espécie *Pseudomonas graveolens* 14 em três litros de meio com 9,3% de lactose e inoculado com 100 mL de cultivo. Após 165 horas de cultivo, obtiveram 75% do produto na forma de lactobionato de cálcio.

Nishizuka e Hayaishi (1962, p. 2721-2728) testaram a enzima lactose desidrogenase, isolada e purificada da bactéria *Pseudomonas graveolens*, em meio contendo 100  $\mu\text{mol}$  de tampão fosfato de potássio (pH 5,6), 10  $\mu\text{mol}$  de lactose, em um volume total de 3,0 mL, em pH entre 6,5 e 6,7, temperatura de 22°C, por 22 minutos. O ácido lactobiônico formado na reação, 9,1  $\mu\text{mol}$ , foi identificado por cromatografia em papel e quantificado por titulometria. A enzima lactose desidrogenase catalisa a reação de desidrogenação para a formação da lactona, que é hidrolisada em ácido lactobiônico.

Outros estudos avaliaram a atuação de diferentes enzimas, por exemplo, a enzima hexose oxidase, extraída da alga marinha vermelha *Chondrus crispus*, encontrada na costa da Inglaterra, onde é comercializada como uma fonte alimentícia, a carragenana. Após purificação, foi determinada, por colorimetria, a atividade desta enzima frente aos carboidratos glucose, galactose, celobiose, maltose e lactose. O maior valor para a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foi observado para lactose como substrato, 97 mM (SAVARY; HICKS; O'CONNOR, 2001, p. 42-51). Nordkvist, Nielsen e Villadsen (2006, p. 694-707) estudaram a oxidação da lactose em ácido lactobiônico empregando a enzima carboidrato oxidase, que foi clonada a partir de *Microdochium nivale* e expressa em *Fusarium venenatum*, com a enzima catalase para evitar a inibição da oxidase. A reação ocorreu no meio com 50  $\text{g.L}^{-1}$  de lactose, 50 mM de tampão fosfato, 0,25  $\text{g.L}^{-1}$  de catalase e 60 mg de enzima carboidrato oxidase, temperatura de 38°C, pH 6,4 e agitação 1000 rpm, por 8 horas. O valor da constante de Michaelis ( $K_m$ ) para lactose foi de 0,066 mM e ao empregar, nas mesmas condições, um bar de saturação de oxigênio, o  $K_m$  elevou-se para 0,97 mM.

Miyamoto, Ooi e Kinoshita (2000, p. 427-430) isolaram do solo o micro-organismo *Pseudomonas* sp. LS13-1, capaz de converter o soro de leite em ácido

lactobiônico. O mesmo foi cultivado em frasco de fermentação com volume inicial de um litro de meio contendo soro de leite, 207 g (equivalente a 150 g de lactose) e peptona, 15 g; temperatura de 30°C, com pH controlado em 5,5, com a adição de meio de alimentação, constituído de 69 g.L<sup>-1</sup> de soro de leite e 0,8 g.L<sup>-1</sup> de peptona. A adição do meio de alimentação foi realizada quando a concentração de lactose no meio atingia 50 g.L<sup>-1</sup>, foram realizadas três adições intermitentes do meio de alimentação durante o cultivo. Após 180 horas, obtiveram 80 g.L<sup>-1</sup> de ácido lactobiônico. Entretanto, depois de 100 horas de cultivo, o meio tornou-se muito viscoso, o que indica que a produção com uma elevada concentração de soro de leite pode ter um limite. Os autores também cultivaram em frasco de fermentação este micro-organismo nas mesmas condições descritas substituindo o soro de leite por lactose e após 155 horas de cultivo obtiveram 125 g.L<sup>-1</sup> de ácido lactobiônico.

Murakami *et al.*, (2002, p. 469-477), isolaram a bactéria *Burkholderia cepacia* (N 216) do solo e investigaram a sua capacidade em oxidar a glucose, maltose, sacarose e a lactose. No meio contendo 1% de lactose, 0.1% de polipeptona, 0,05% de extrato de levedura, 0,2% de nitrato de amônio, 0,1% de fosfato dibásico de potássio, 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado, pH 7,0, inocularam um pré-cultivo de *Burkholderia cepacia* e cultivaram a temperatura de 28° C, por 72 horas. Nestas condições, verificaram a formação de 10 mg.mL<sup>-1</sup> de ácido lactobiônico medido em 48 horas.

Hecke *et al.*, (2009, p. 1475-1482), desenvolveram um modelo para descrever a interação entre duas enzimas e um mediador intermediário de redox. Neste processo bi-enzimático, de 200 mL de volume de trabalho, a enzima celobiose desidrogenase do basidiomiceto *Sclerotium rolfsii* CBS 191.62 oxida a lactose na posição C-1 do açúcar redutor a lactobionolactona que hidrolisa espontaneamente a ácido lactobiônico. O sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi utilizado como aceptor de elétrons e regenerado continuamente pela lacase. O oxigênio adicionado ao sistema por meio de uma oxigenação livre de bolhas atuou como aceptor final de elétrons e foi completamente reduzido a água pela enzima lacase do fungo *Trametes pubescens* MB89.

Alonso, Rendueles e Diaz (2011, p. 9730-9736; 2012, p. 140-147) reportaram a produção de ácido lactobiônico pela bactéria *Pseudomonas taetrolens* em processos descontínuos empregando biorreator com um litro de soro de queijo, em condições de pH não controlado na fase de crescimento e pH controlado em 6,5

durante a formação cumulativa do ácido lactobiônico. Quando utilizaram uma taxa de inoculação de 30% (v/v) (0,55 g.L<sup>-1</sup> de células) verificaram a formação de 1,12 g.L<sup>-1</sup>.h de ácido lactobiônico em 30 horas.

Na literatura estão descritos outros micro-organismos como, por exemplo, o fungo *Penicillium chrysogenum* (CORT *et al.*, 1956, p. 477-478) e as bactérias *Halobacterium saccharovororum* e *Zymomonas mobilis* capazes de oxidar a lactose em ácido lactobiônico (TOMLINSON; STROHM; HOCHSTEIN, 1978, p. 898-903).

Pesquisadores investigaram a cinética da produção biotecnológica de ácido lactobiônico e sorbitol pela ação catalítica das enzimas glucose frutose oxidoreductase e glucono- $\delta$ -lactonase em duas formas diferentes: um sistema de células mobilizadas e de células imobilizadas, da bactéria *Zymomonas mobilis*, a partir dos substratos lactose e frutose (PEDRUZZI; SILVA; RODRIGUES, 2011, p. 183–191). Em 2013, Malvessi *et al.*, também avaliaram o mesmo sistema enzimático do micro-organismo *Zymomonas mobilis* utilizando células permeabilizadas e células imobilizadas na conversão de glucose, maltose, galactose e lactose em seus respectivos ácidos aldônicos. As reações de bioconversão foram realizadas em banho maria, em frasco de vidro com 240 mL de meio e sob agitação magnética. Nas reações realizadas com 0,7 mol .L<sup>-1</sup> de frutose e com 0,7 mol .L<sup>-1</sup> de cada uma das aldoses, separadamente, e utilizando células livres permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*, obtiveram as concentrações de 0,64, 0,57, 0,51 e 0,51 mol.L<sup>-1</sup>.dos respectivos ácidos aldônicos, em 24 horas. Os autores concluíram que o sistema enzimático glucose frutose oxidoreductase e glucono- $\delta$ -lactonase apresentou menor afinidade para a lactose, e as maiores atividades foram observadas em pH 6,4, temperatura de 47° C para células permeabilizadas e imobilizadas com alginato de cálcio, o qual age como uma barreira de substratos e produtos. As taxas de conversão e produtividades específicas foram similares àquelas obtidas com células livres permeabilizadas (MALVESSI *et al.*, 2013, p. 1-10).

#### 3.4. MICRO-ORGANISMO *Zymomonas mobilis*

No meio ambiente, bactérias do gênero *Zymomonas* são encontradas em regiões tropicais da América, África e Ásia. As bactérias do gênero *Zymomonas*



constituem uma espécie, *Zymomonas mobilis*, com duas subespécies, *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* e *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae*. Segundo a classificação taxonômica o gênero *Zymomonas* pertence ao reino *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Proteobacteria*, ordem *Sphingomonadales* e família *Shingomonadaceae* (SWINGS; KERSTERS; DE LEY, 1977, p. 271-273, 19; SWINGS; DE LEY, 1977, p. 1-46).

O micro-organismo *Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica com aero tolerância. Possui forma de bacilo, com cerca de 2 a 6 µm de comprimento e de 1 a 1,5 µm de largura, ocorrendo isoladamente ou aos pares, não é uma bactéria esporulável e as colônias possuem coloração de branca a creme. Apresenta de 1 a 4 flagelos polares, porém apenas 30% das bactérias são móveis, e algumas linhagens perderam a mobilidade. O crescimento bacteriano é descrito na faixa de pH 3,5 a 7,5, com faixa ótima de pH entre 5,0 a 7,0 e temperatura de 30°C, e apresenta relativa insensibilidade ao oxigênio (SWING; DE LEY, 1977, p. 1-46; VIIKARI, 1988, p. 237-261; VIIKARI; GISLER, 1986, p. 240-244).

Na década de 30, duas características das bactérias do gênero *Zymomonas* chamaram atenção de microbiologistas alemães, a capacidade de crescimento em pH baixo e a capacidade de crescimento em altas concentrações de glucose, e o rápido consumo deste substrato. No início de 1951, o gênero *Zymomonas* adquiriu notoriedade entre os bioquímicos pela descoberta de Gibbs e DeMoss (1951, p. 478-479). Eles comprovaram que o catabolismo anaeróbico da glucose no gênero *Zymomonas* segue o mecanismo Entner-Doudoroff, pois apresenta apenas alguns componentes do ciclo do ácido cítrico. Esta via apresenta tal importância para as bactérias do gênero *Zymomonas*, que 50% da massa proteica da bactéria é constituída de enzimas desta via, quase todas constitutivas (GIBBS; DEMOSS, 1951, p. 478-479; SWINGS; DE LEY, 1977, p. 1-46; SPRENGER, 1996, p. 301-307).

Nos anos 80, foram relatados na literatura diversos processos empregando a bactéria *Zymomonas mobilis* com a finalidade de produzir etanol (VIIKARI, 1986, p. 118-123, REHR; WILHELM; SAHM, 1991, p. 144-148). Viikari (1984, p. 252-255), divulgou a capacidade da bactéria *Zymomonas mobilis* em produzir sorbitol a partir de sacarose, glucose e frutose. O processo foi descrito como uma desidrogenação da glucose para formar a respectiva lactona (LEIGH; SCOPES; ROGERS, 1984, p. 413-415). Iniciou-se uma busca pela comprovação do mecanismo envolvido neste sistema reacional, até que Zachariou e Scopes, (1986, p. 863-869), propuseram que

a glucose era oxidada a gluco lactona, e a glucose oxidada entrava na via Entner-Doudoroff pelas enzimas glucose desidrogenase e gluconato quinase. O equívoco desta teoria está no fato de que a formação de sorbitol é independente de glucose desidrogenase, esta enzima não reduz a frutose a sorbitol. Foi proposta a presença de outra enzima ligada a cofator NADP(H) responsável pela oxidação da glucose em glucono- $\delta$ -lactona, denominada glucose frutose oxidoreductase, e foi identificada também a enzima glucono- $\delta$ -lactonase participando na hidrólise da lactona para formação do ácido glucônico (SPRENGER, 1996, p. 301-307; ZACHARIOU; SCOPES, 1986, p. 863-869).

A glucose frutose oxidoreductase é uma enzima tetrâmera, representada na FIGURA 2, com quatro subunidades similares, formada por dois domínios de uma ligação clássica dinucleotídica, com um braço N-terminal que envolve o NADP e estabiliza a estrutura tetramérica. Possui massa molecular de 40 kDaltons, localiza-se no periplasma da bactéria *Zymomonas mobilis*, ligada fortemente ao co-fator NADP como transportador de hidrogênio e não requer nenhum outro cofator para atividade. A pré-proteína transporta uma sequência de sinal longa N-terminal de 52 resíduos de aminoácidos. Associada a osmoproteção celular, pois linhagens com glucose frutose oxidoreductase mutadas, que perderam a função, não crescem na presença de elevadas concentrações de açúcar (KINGSTON; SCOPES; BAKER, 1996, p. 1413-1428; ZACHARIOU; SCOPES, 1986, p. 863-869; WIEGERT; SAHM; SPRENGER, 1996, p. 32-41; SPRENGER, 1996, p. 301-307).

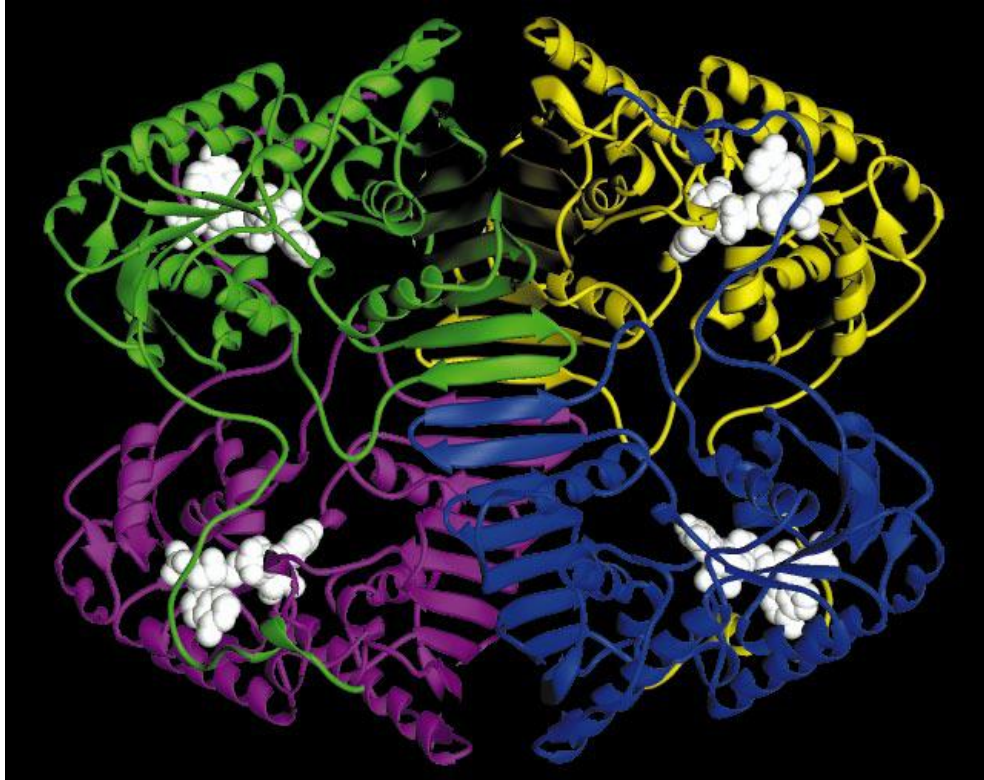


FIGURA 2 - DIAGRAMA DE FITA DA GLUCOSE FRUTOSE OXIDOREDUCTASE TETRÂMERA, COM REPRESENTAÇÃO DE NADP EM BRANCO. CADA SUBUNIDADE ESTÁ REPRESENTADA DE UMA COR DIFERENTE  
 FONTE: KINGSTON; SCOPES; BAKER, 1996, p. 1413-1428.

O micro-organismo *Zymomonas mobilis* cataboliza apenas D-glucose, D-frutose e sacarose como fontes de carbono e energia e o metabolismo destes carboidratos está demonstrado na figura 3A. A sacarose é quebrada, extracelularmente, pelas enzimas invertase B e Levana sacarose, em glucose e frutose. As duas hexoses podem entrar na célula por sistema de difusão facilitada (uniporte) comum, sem gasto de energia metabólica, ou são convertidas, no periplasma, pela glucose frutose oxidoreductase, em sorbitol e gluconolactona. O sorbitol é transportado para dentro da célula por um sistema acumulativo, por um transportador de sorbitol (LOOS *et al.*, 1994, p. 7688-7693, SPRENGER, 1996, p. 301-307), e a gluconolactona é convertida pela gluconolactonase a ácido glucônico. O ácido glucônico é absorvido pelas células e pode ser completamente degradado (como um co-substrato) a etanol e ácido acético (LOOS *et al.*, 1994, p. 7688-7693; SWINGS; DE LEY, 1977, p. 1-46, SPRENGER, 1996, p. 301-307).

A glucose, após entrar na célula, é fosforilada formando a glucose-6-fosfato, ATP é doador de fosfato, a reação é catalisada pela enzima glucoquinase na

presença de magnésio. A glucose-6-fosfato é atacada pela glucose-6-fosfato desidrogenase para formar 6-fosfogluconolactona. Nesta etapa de formação da lactona, pode ser utilizado NAD, e outra com NADP como cofator. A especificidade da enzima pelos cofatores, depende da faixa de pH, da força iônica, do substrato e concentração. A ausência de atividade trans hidrogenase e falta do gene correspondente no genoma faz com que a especificidade para os dois cofatores (NADH e NADPH) seja uma importante chave para o balanço do fluxo redutor. Em seguida, uma lactonase (6-fosfogluconolactonase) com atividade catalítica elevada hidrolisa rapidamente a lactona formada na etapa anterior, utilizando  $\text{NADP}^+$  como agente redutor, formando 6-fosfogluconato. O 6-fosfogluconato é, então, convertido em 2-ceto-3-desoxi 6-fosfo-gluconato pela enzima desidratase (6-fosfogluconato desidratase) ao remover uma molécula de água, em seguida é quebrado em gliceraldeído-3-fosfato e piruvato (FLAMHOLZ *et al.*, 2013, p. 10039–10044; KINOSHITA *et al.*, 1985, p.249-254; NEALE *et al.*, 1986, p.119-124; CONWAY, 1992, p. 1-28.; KESHAV *et al.*, 1990, p.2491-2497; GLAZER; NAKAIDO, 2007, p. 470-486; PENTJUSS *et al.*, 2013, p. 1-10, KALNENIEKS, 2006, p. 73–117).

O gliceraldeído-3-fosfato é metabolizado em piruvato pela via da glicólise. O piruvato é então convertido em dióxido de carbono e acetaldeído por uma piruvato descarboxilase incomum que, ao contrário da enzima de levedura, não exige que o pirofosfato de tiamina como cofator para a sua atividade catalítica. Finalmente, duas enzimas álcool desidrogenases (ADH I e ADH II), reduzem o acetaldeído em etanol, com a oxidação de NADH. A álcool desidrogenase I é uma enzima tetramérica com zinco no sítio ativo, como a maioria das álcool desidrogenases, mas a álcool desidrogenase II é incomum, pois contém ferro no seu sítio ativo. Em baixas concentrações de etanol, a velocidade máxima da enzima álcool desidrogenase I é cerca de duas vezes mais elevada para a redução de acetaldeído e oxidação do etanol, enquanto que o álcool desidrogenase II apresenta uma taxa de oxidação de etanol maior. Na ausência de etanol, ambas contribuem igualmente para a catálise enzimática na redução de acetaldeído. Em concentrações elevadas de etanol, a enzima álcool desidrogenase I é fortemente inibida, mas a produção de etanol continua, porque a taxa de redução pela enzima álcool desidrogenase II para acetaldeído é aumentada significativamente. (FLAMHOLZ *et al.*, 2013, p. 10039–10044; KINOSHITA *et al.*, 1985, p.249-254; NEALE *et al.*, 1986, p.119-124;

CONWAY, 1992, p. 1-28; KESHAV *et al.*, 1990, p.2491-2497; GLAZER; NAKAIDO, 2007, p. 470-479; PENTJUSS *et al.*, 2013, p. 1-10, KALNENIEKS, 2006, p. 73–117).

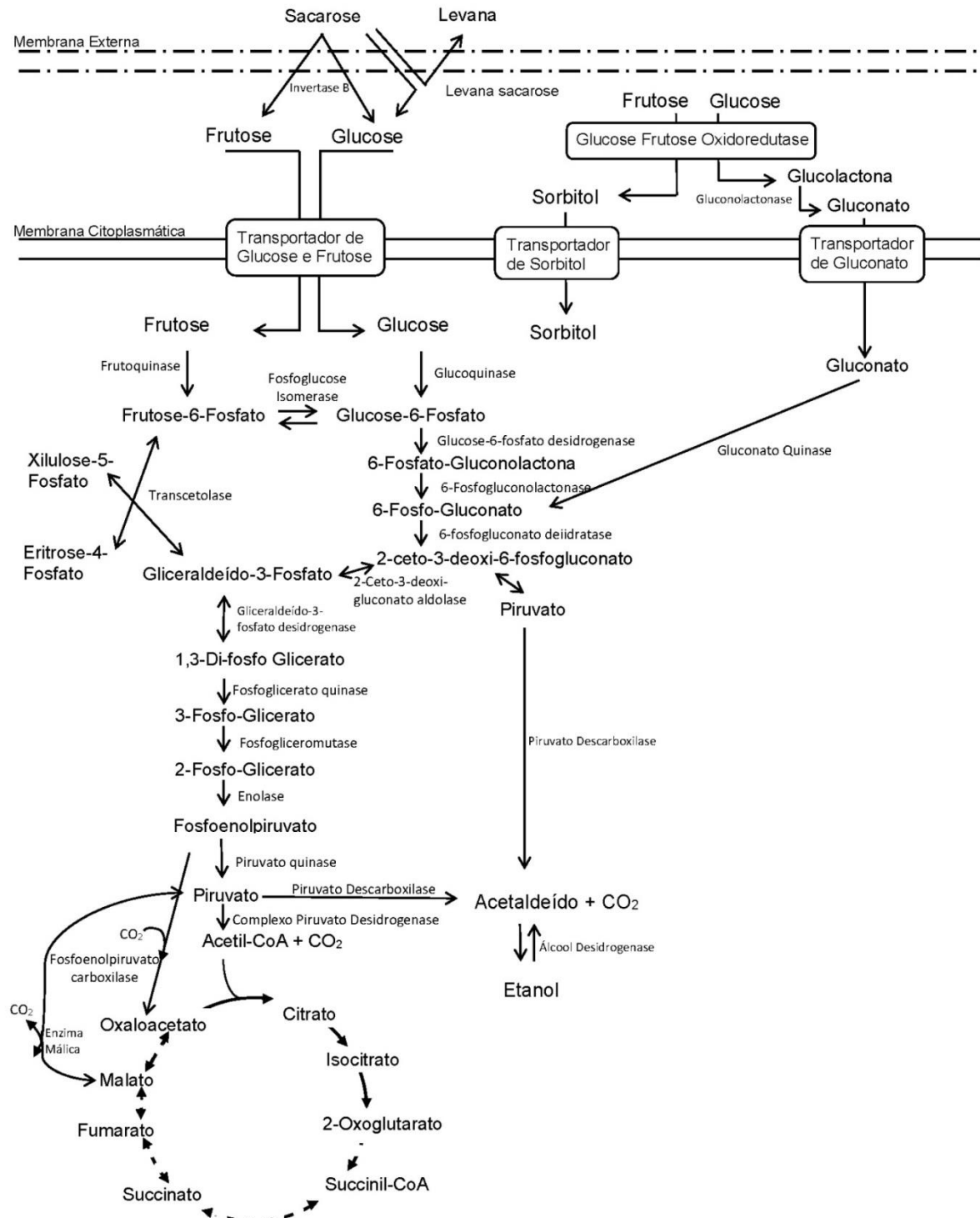


FIGURA 3A - METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM *Zymomonas mobilis*  
 FONTE: SPRENGER, modificado, (1996, p. 301-307).

A frutose do meio, inicialmente, atravessa a membrana de *Zymomonas mobilis*, assim como a glicose, por um sistema de transporte de difusão facilitada. Então, a frutose é fosforilada a frutose-6-fosfato por uma quinase constitutiva (frutoquinase), que possui alta especificidade para a frutose, a glucose-fosfato-isomerase converte a frutose-6-fosfato em glucose-6-fosfato, a glucose-6-fosfato entra na via Entner Doudoroff, e continua sendo metabolizada assim como descrito para a glucose. É descrito que o rendimento teórico em etanol diminui em 5% quando a fonte de carbono utilizada como substrato é a frutose em relação à glucose (GLAZER A. N.; NIKAIDO H., 2007, p. 470-486).

A via das pentoses é incompleta, não é observada atividade transaldolase, no entanto, a célula consegue fornecer as unidades fundamentais para formar ácidos nucleicos, vitaminas, aminoácidos e a biossíntese da parede celular pela combinação de transcetolases, ribose-5-fosfo isomerase e ribulose-5-fosfo epimerase atuando nos passos seguintes a frutose 6-fosfato e gliceraldeído 6-fosfato (FELDMANN, SAHM; SPRENGER, 1992, p. 354-361, SPRENGER, 1996, p. 301-307). O complexo piruvato desidrogenase foi detectado como único com essa função sob condições anaeróbicas e tem que competir com a piruvato descarboxilase, sendo que apresentam afinidade similar para o piruvato. Não há um ciclo do ácido tricarbóxico completo, a célula usa várias enzimas para converter citrato a oxoglutarato, reações anapleiróticas são realizadas pela fosfoenolpiruvato carboxilase e enzima málica (BRINGER-MEYER; SAHM, 1989, p. 529-536, SPRENGER, 1996, p. 301-307).

A formação do ácido lactobiônico e sorbitol, pela ação catalítica das enzimas glucose-frutose oxidoreductase e glucono- $\delta$ -lactonase, ocorre com ciclos de oxidação e redução de NADP, na enzima glucose frutose oxidoreductase e hidrólise da lactona por glucono- $\delta$ -lactonase, a partir dos substratos lactose e frutose (FIGURA 3B). O processo catalítico global consiste em duas meias reações, no qual o cofator NADP é reduzido a NADPH e posteriormente oxidado a NADP novamente, formando um ciclo. O passo determinante da velocidade para a reação geral é a dissociação da lactobiono lactona da enzima e a transferência do hidrogênio do NADPH para o sorbitol (HARDMAN; SCOPES, 1986, p. 863-869; ZACHARIOU; SCOPES, 1986, p. 863-869, 1986).

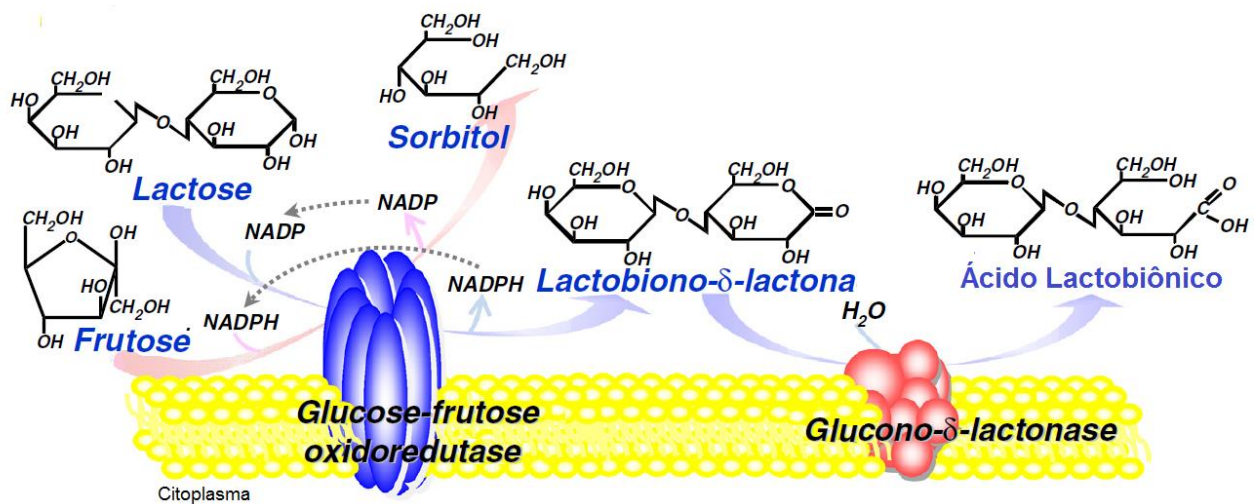


FIGURA 3B – REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIONIÇO, E SORBITOL, COM CICLOS DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO DE NADP, NA ENZIMA GLUCOSE FRUTOSE OXIDOREDUCTASE, E HIDRÓLISE DA LACTONA POR GLUCONO LACTONASE, A PARTIR DE LACTOSE E FRUTOSE, UTILIZANDO A BACTÉRIA *Zymomonas mobilis*.

FONTE: ALONSO; RENDUELES; DIAZ (2013, p. 1-17).

Zachariou e Scopes (1986, p. 863-869) investigaram as enzimas responsáveis pela formação de sorbitol da bactéria *Zymomonas mobilis*. A enzima glucose frutose oxidoreductase catalisa a oxidação-redução intermolecular de glucose e frutose para formar a gluconolactona e o sorbitol. A gluconolactonase também foi isolada e, juntas, essas duas enzimas foram capazes de converter 54% peso/volume de uma mistura equimolar de glucose e frutose para sorbitol e gluconato de sódio em pH 6,2. A enzima oxidoreductase apresentou baixas afinidades para os seus substratos glucose e frutose, mas condições ambientais naturais expõe a enzima a altas concentrações de açúcares. A quantidade de enzima nas células de *Zymomonas mobilis* foi suficiente para explicar a taxa de formação de sorbitol em vivo. Entretanto, esta enzima estava presente em grandes quantidades quando as células da bactéria *Zymomonas mobilis* foram crescidas em apenas glucose, e foi reprimida pela presença de frutose, por outro lado a atividade da gluconolactonase praticamente não variou.

Sartory *et. al.* (1997, p. 1205-1208) apresentaram um estudo de conversão de vários carboidratos em seus respectivos ácidos aldônicos pela glucose frutose oxidoreductase purificada, sob condições de 1 M de monossacarídeo ou 0,5 M de dissacarídeo, 1 M de D-frutose, temperatura de 30° C, em um volume total de reação

de 20 mL, pH 6,2, empregando  $1 \text{ U.mL}^{-1}$  de glucose frutose oxidoreductase por 50 horas. A porcentagem de conversão de cada carboidrato em seu respectivo ácido aldônico está descrita no Quadro 1.

<b>Carboidrato</b>	<b>Produto</b>	<b>Conversão (%)</b>
<b>D-Glucose</b>	Ácido Glucônico	84
<b>D-Xilose</b>	Ácido Xilônico	42
<b>D-Galactose</b>	Ácido Galactônico	35
<b>L-Arabinose</b>	Ácido Arabinônico	18
<b>D-Manose</b>	Ácido Manônico	18
<b>D-Maltose</b>	Ácido Maltônico	30
<b>D-Celobiose</b>	Ácido Celobiônico	15
<b>D-Lactose</b>	Ácido Lactobiônico	9

QUADRO 1 - CONVERSÃO DE CARBOIDRATOS EM SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS ALDÔNICOS PELA ENZIMA GLUCOSE FRUTOSE OXIDOREDUCTASE PURIFICADA, NAS CONDIÇÕES DE 1 M DE MONOSSACARÍDEOS E 1 M DE D-FRUTOSE OU 0,5 M DE DISSACARÍDEOS E 1 M DE D-FRUTOSE NA TEMPERATURA DE 30°C, pH 6,2, ENZIMA  $1 \text{ U.mL}^{-1}$ , POR 50 HORAS.

FONTE: SATORY et al., 1997, p. 1205–1208.

No mesmo estudo, foi determinado a Constante de Michaelis ( $K_m$ ) da glucose frutose oxidoreductase para lactose. A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) é equivalente à concentração de substrato quando a velocidade inicial da reação for igual à metade da velocidade máxima de reação, para enzimas que seguem o comportamento cinético de Michaelis-Menten (LEHNINGER, 2011, p.183-233). A Constante de Michaelis ( $K_m$ ) da enzima glucose frutose oxidoreductase para lactose, determinado por Sartory *et al.*, em 1997, foi de  $1,2 \pm 0,1 \text{ M}$ , o que correspondeu a uma redução de 80 vezes da afinidade de ligação do substrato a lactose, em relação à glucose (SATORY *et al.*, 1997, p. 1205–1208).

Diferentes micro-organismos possuem as enzimas com capacidade de realizar a oxidação de lactose em ácido lactobiônico. Vale ressaltar que o rendimento da produção desta substância é variável e depende de diversos fatores como, por exemplo, os substratos utilizados. Milhões de toneladas de lactose são produzidos anualmente como um subproduto da indústria de laticínios. O mercado global da lactose, lactose farmacêutica, permeato e derivados da lactose tiveram um valor de €1,62 bilhões em 2011, e está previsto para 2015 um valor de €1,94 bilhões. O soro de leite apresentou um crescimento de 20% em 2011. Segundo a 3A



Consulting terá um valor de €6,88 bilhões em 2015, um crescimento anual constante de 4%. As principais empresas desse setor são Lactalis, Friesland Campina, Fonterra, Arla Foods, Saputo, Glanbia, Murray Goulburn, DMK / Wheyco, Leprino, Agropur, Sachsenmilch, Armor Proteines and Hilmar, Meggle, Euroserum, Milei, Volac, Carbery, Dairygold, Milk Specialties Global e Davigo (ASTLEY, 2012). A valorização dos derivados da lactose, como o ácido lactobiótico e ingredientes alimentícios funcionais têm motivado pesquisas para produzi-los e também para expandir suas aplicações nos setores de alimentação, farmacêutico e químico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* (Lindner) Kluyver and van Niel (ATCC® 29191™) empregado nos processos de transformação foi adquirido da coleção American Type Culture Collection, Estados Unidos da América.

#### 4.1.1 Ativação e conservação

O micro-organismo *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* (Lindner) Kluyver and van Niel (ATCC® 29191™) obtido liofilizado, foi ativado utilizando o meio líquido contendo glucose 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup> com pH 6,00 ± 0,2 medido em aparelho de pH marca WTW, modelo pH 330i, em agitador e incubador marca TECNAL, modelo TE-421, a temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm, esterilizado em autoclave vertical marca Phoenix por calor úmido, a temperatura de 121°C e sob pressão de 1 atm, o tempo de esterilização foi empregado de acordo com a capacidade total do frasco e volume do meio utilizado.

Uma ampola com células liofilizadas da bactéria *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* (Lindner) Kluyver and van Niel (ATCC® 29191™) foi aberta, em câmara de fluxo laminar Labconco Purifier Class II, e estas foram hidratadas com meio líquido contendo glucose 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,00 ± 0,2. Em seguida, o volume contendo as células hidratadas foi transferido para um frasco de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, contendo 5 mL do mesmo meio. Posteriormente, foram inoculados 0,5 mL deste cultivo de 24 horas, em frasco de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, com 10 mL do meio líquido contendo glucose 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>. Após 24 horas, as células recém-crescidas contidas em 5 mL de cultivo foram transferidas para frasco de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade com 50 mL do mesmo meio líquido. Todos os frascos inoculados foram mantidos em agitador e incubador, a temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm. Após o crescimento das células, o cultivo foi transferido para tubos de polipropileno e centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga marca Sigma, modelo

1 14, e, em seguida, descartado o sobrenadante. A cada tubo de polipropileno com células foi adicionado 850  $\mu\text{L}$  de meio líquido com glucose 20  $\text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura 5  $\text{g.L}^{-1}$ , pH  $6,00\pm 0,2$ , e 150  $\mu\text{L}$  de glicerol, como agente crioprotetor. Em seguida, os tubos contendo as células foram conservados por congelamento em freezer, marca Consul, a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Estas células foram utilizadas nos processos de transformação microbiana após ativação e crescimento da bactéria. Foi verificada a ausência de micro-organismos contaminantes, por técnica a fresco, utilizando microscopia óptica, em aumento de 400X (microscópio marca Student Lab) e coloração de Gram (BIER, 1980, p. 828), antes de cada inoculação.

#### 4.1.2 Cinética do crescimento do micro-organismo *Zymomonas mobilis* ATCC 29191

Para verificar a variação de crescimento em função do tempo, a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi crescida em meio líquido, contendo como substrato limitante, a glucose, na concentração de 20  $\text{g.L}^{-1}$  e em meio líquido, contendo como substrato limitante, a glucose, na concentração 80  $\text{g.L}^{-1}$ . Os meios líquidos empregados para o cultivo da bactéria foram esterilizados em autoclave, por calor úmido, a temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  e sob pressão de 1 atm. O tempo de esterilização foi utilizado de acordo com o volume do meio e a capacidade total do frasco.

Visando a reativação do micro-organismo o conteúdo de células de um tubo de polipropileno congelado, na etapa de conservação, foi vertido para um frasco Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, com 10 mL de meio líquido contendo glucose 20  $\text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura 5  $\text{g.L}^{-1}$ , pH  $6,00\pm 0,2$ . Posteriormente, para a obtenção de um maior número de células, 10 mL do cultivo de ativação, contendo células recém crescidas, foram adicionados em um frasco de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, com 100 mL do meio líquido. Após o crescimento das células, 5 mL deste cultivo foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, com 50 mL do mesmo meio. Todos os cultivos foram mantidos em agitador e incubador, a temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  e agitação de 150 rpm.

Em diferentes períodos de tempo, foram retiradas amostras dos cultivos para a medida do valor de pH e a determinação da concentração celular por gravimetria.

A bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi novamente reativada e as células crescidas utilizando o meio líquido contendo glucose 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,00 ± 0,2. Após o crescimento das células, 5 mL do cultivo foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, com 50 mL de meio líquido contendo glucose 80 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de magnésio heptahidratado 0,5 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de amônio 1 g.L<sup>-1</sup> e fosfato diácido de potássio 1 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,00 ± 0,2. Os frascos inoculados foram colocados em agitador e incubador, a temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm. Foram retiradas amostras no início (tempo zero hora), e após quatro, oito, 12, 16, 20 e 24 horas de cultivo para medida do valor de pH e determinação da concentração de células e de glucose.

## 4.2 PROCESSOS DE TRANSFORMAÇÃO

Os processos de transformação utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foram realizados em frascos e em biorreator.

### 4.2.1 Desenvolvimento do inóculo

Para o desenvolvimento do inóculo, a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi reativada como descrito no item 4.1.2 e o inóculo foi preparado em três etapas.

Para a primeira etapa do desenvolvimento do inóculo, 1 mL do cultivo de reativação foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, contendo 9 mL de meio líquido, com os constituintes calculados para 10 mL. Posteriormente, 10 mL do cultivo da primeira etapa foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, com 90 mL de meio líquido da segunda etapa, com os constituintes calculados para 100 mL. Após o crescimento das células, 100 mL de cultivo da segunda etapa foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 2000 mL de capacidade, contendo 300 mL de meio líquido da terceira etapa, com os constituintes calculados para 400 mL. Todas as

transferências entre as etapas foram realizadas após 12 horas de crescimento, a temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm.

Este procedimento foi repetido até obtenção do número de células adequado para o preparo da suspensão que foi empregada nos processos de transformação.

Para os processos de transformação microbiana realizados em frascos denominados A e B e para os processos de transformação realizados em biorreator denominado C foi empregado o meio líquido contendo glucose 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, pH 5,5 ± 0,2, nas três etapas do desenvolvimento do inóculo.

Nos processos de transformação D, realizados em biorreator modelo Biostat B, marca B. Braun, nas três etapas do desenvolvimento do inóculo foi utilizado o meio contendo extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de magnésio heptahidratado 0,5 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de amônio 1 g.L<sup>-1</sup> e fosfato diácido de potássio 1 g.L<sup>-1</sup>, adicionado de 50 g.L<sup>-1</sup>, 100 g.L<sup>-1</sup> e 150 g.L<sup>-1</sup> de glucose, na primeira, na segunda e na terceira etapa do inóculo, respectivamente, pH 5,50 ± 0,2.

No desenvolvimento do inóculo para os processos de transformação E, F e G, na primeira e na segunda etapa foi empregado o meio líquido contendo glucose 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, pH 5,50 ± 0,2 e na terceira etapa foi utilizado o meio líquido contendo extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de magnésio heptahidratado 0,5 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de amônio 1 g.L<sup>-1</sup>, fosfato diácido de potássio 1 g.L<sup>-1</sup> e glucose 50 g.L<sup>-1</sup>, pH 5,50 ± 0,2.

Os meios líquidos empregados no desenvolvimento do inóculo foram esterilizados em autoclave, por calor úmido, a temperatura de 121°C e sob pressão de 1 atm. O tempo de esterilização foi utilizado de acordo com o volume do meio e a capacidade total do frasco.

No final do desenvolvimento do inóculo, as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação, em centrífuga marca Sigma, modelo 3-16P, por 10 minutos a 4200 rpm. As células presentes no precipitado foram lavadas com solução aquosa de lactose 50 g.L<sup>-1</sup> esterilizadas por filtração. As células lavadas foram ressuspensas em solução aquosa de lactose estéril 50 g.L<sup>-1</sup> e a suspensão de células foi empregada como inóculo nos processos de transformação microbiana realizados em frascos e em biorreator.

#### 4.2.2 Processos de transformação em frascos

Os processos de transformação foram realizados em agitador e incubador empregando frascos de 250 mL de capacidade, com 50 mL de meio reacional, esterilizado por filtração, contendo  $140 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose. Os frascos utilizados nos processos foram previamente esterilizados em autoclave, por calor úmido, a temperatura de  $121^\circ\text{C}$  e sob pressão de 1 atm, durante 15 minutos. Foram realizados diferentes processos de transformação denominados A e B. Nos processos de transformação A e B foram inoculadas suspensões de células, preparadas de acordo com o item 4.2.1, com diferentes concentrações no tempo zero dos processos, e as condições empregadas foram: temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , pH inicial de  $7,0 \pm 0,2$  e agitação de 150 rpm nos processos A, e 200 rpm nos processos B. Após 5 horas, 20 horas e 45 horas o pH do meio reacional de todos os frascos foi ajustado para  $6,5 \pm 0,2$ , utilizando solução aquosa de hidróxido de sódio estéril  $0,1 \text{ Eq.g.L}^{-1}$ . Em diferentes períodos de tempo, foram retiradas amostras dos processos, medidos os valores de pH e determinada a concentração celular inicial (tempo zero hora) e a concentração de ácido lactobiônico.

#### 4.2.3 Processos de transformação em Biorreator

Os processos de transformação foram realizados em biorreator utilizando dorna de 2,5 L de capacidade total, previamente esterilizada por calor úmido, por processo descontínuo, utilizando vapor direto. No início dos processos de transformação microbiana denominados C foram colocados no biorreator 1220 mL de volume total de meio, esterilizados por filtração, contendo extrato de levedura  $5 \text{ g.L}^{-1}$ , sulfato de magnésio heptahidratado  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , sulfato de amônio  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , fosfato diácido de potássio  $1 \text{ g.L}^{-1}$  e glucose  $80 \text{ g.L}^{-1}$  e, após 8 horas, foram adicionados 280 mL de solução aquosa de lactose estéril  $35 \text{ g.L}^{-1}$ . Nos processos de transformação denominados C foram empregadas as condições de  $30^\circ\text{C}$  de temperatura, 400 rpm de agitação e pH controlado em 6,5, utilizando solução aquosa de hidróxido de sódio estéril  $1 \text{ Eq.g.L}^{-1}$ , para correção automática do pH. A cada intervalo estabelecido

pela diminuição do volume da solução aquosa de hidróxido de sódio estéril 1 Eq.g.L<sup>-1</sup> foram retiradas amostras para o acompanhamento da formação de ácido lactobiônico, concentração celular, concentração de lactose e de glucose.

Nos processos de transformação D, E, F e G foram utilizados 1500 mL de volume total de meios reacionais, esterilizados por filtração, constituídos de: 40 g.L<sup>-1</sup> de lactose, nos processos D; 220 g.L<sup>-1</sup> de lactose com 40 g.L<sup>-1</sup> de frutose, nos processos E; 220 g.L<sup>-1</sup> de lactose adicionados de 75 g.L<sup>-1</sup> de frutose, nos processos F; e 190 g.L<sup>-1</sup> de lactose e 75 g.L<sup>-1</sup> de frutose, nos processos G. Foram empregadas as condições de 39°C de temperatura, 400 rpm de agitação e pH controlado em 6,5. A solução aquosa de hidróxido de potássio estéril 1 Eq.g.L<sup>-1</sup> foi utilizada para a correção automática do pH.

A cada intervalo estabelecido pela diminuição do volume da solução aquosa de hidróxido de potássio estéril 1 Eq.g.L<sup>-1</sup> foram retiradas amostras para o acompanhamento da formação de ácido lactobiônico, concentração de lactose, de frutose, de sorbitol e de etanol. No início de cada processo de transformação microbiana foi determinada a concentração celular.

As condições ambientais descritas foram mantidas durante todo o período dos processos de transformação microbiana.

### 4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 4.3.1 Determinação da concentração celular

Para a determinação da concentração celular pelo método gravimétrico, foram centrifugados 4 mL de amostra a 10.000 rpm durante 10 minutos. As células precipitadas foram lavadas até a remoção completa do meio e secas em liofilizador, marca Operon, até peso constante. As células secas foram pesadas em balança analítica Bioprecisa modelo FA2104N. A determinação da concentração celular foi calculada segundo a equação de Hiss (2001) e cada amostra foi analisada em quintuplicada.

$$X_t = X \cdot V^{-1}$$

Onde  $X_t$  = concentração de células secas ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo  $t$ ,  
 $X$  = células secas (g) e  $V$  = volume de amostra (L).

#### 4.3.2 Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento microbiano descreve a fase exponencial do crescimento microbiano (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995, p. 13-33).

$$\mu_x = \frac{(X_t - X_0)}{(t_0 - t)}$$

$X_t$  = concentração de células secas ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo

$X_0$  = concentração de células secas ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no início do cultivo

$t_0$  = tempo zero do cultivo

$t$  = tempo  $t$  de cultivo

$\mu_x$  = taxa específica do crescimento

#### 4.3.3 Identificação e quantificação do ácido lactobiônico, da lactose, da frutose, da glucose, de sorbitol e de etanol

Um volume de 50 mL de amostra foi centrifugado, a 4200 rpm, por 20 minutos. Os sobrenadantes foram congelados para posterior identificação e quantificação por cromatografia em fase líquida de alta eficiência. Foram utilizados padrões de ácido lactobiônico, de lactose, de frutose, de glucose, de sorbitol e de etanol, todos da marca Sigma.

O sistema cromatográfico utilizado para identificação e quantificação do ácido lactobiônico, da lactose, da frutose, da glucose, de sorbitol e de etanol foi constituído de um cromatógrafo a líquido LC-10A, Shimadzu, com duas colunas trocadoras de íons acopladas, uma HPX87H, 300 x 7.8 mm, na forma de hidrogênio ligado, tamanho de partícula 9  $\mu\text{m}$ , com 8% cross linkage, Biorad e outra coluna Metacarb 87H (Varian). A temperatura mantida nas colunas foi de 65° C, o fluxo foi de



0,6 mL.min<sup>-1</sup> e foi empregado um sistema isocrático. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 0,25 mM e o volume de injeção para os padrões foi de 100 µL e para as amostras foi de 20 µL. O detector utilizado foi o de índice de refração RID-10A, Shimadzu, a temperatura da cela foi 50° C (adaptado de PEDRUZZI, 2007).

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados em triplicada e de modo independente. A análise da concentração de células foi realizada em quintuplicada e as determinações das concentrações de glucose, frutose, lactose, ácido lactobiônico, sorbitol e etanol foram realizadas em triplicada. As médias e desvios padrão das análises foram calculados utilizando o programa ORIGINPRO (data analysis software system), versão 9.0.0. Para as análises foi considerado o limite de precisão de 15% para o coeficiente de variação, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada número 27, de 17 de maio de 2012, fixado pela Agência de Vigilância Sanitária.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar o desempenho dos cultivos do micro-organismo *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 no crescimento celular em função do tempo de cultivo, foram realizados experimentos em frascos, segundo item 4.1.2 de “Materiais e Métodos”, utilizando diferentes meios, contendo como substrato limitante a glucose nas concentrações de 20 g.L<sup>-1</sup> e 80 g.L<sup>-1</sup>. Foram determinados os parâmetros de pH, concentração de glucose e concentração celular.

Os resultados obtidos em relação ao crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, estão demonstrados nas figuras 4 e 5.

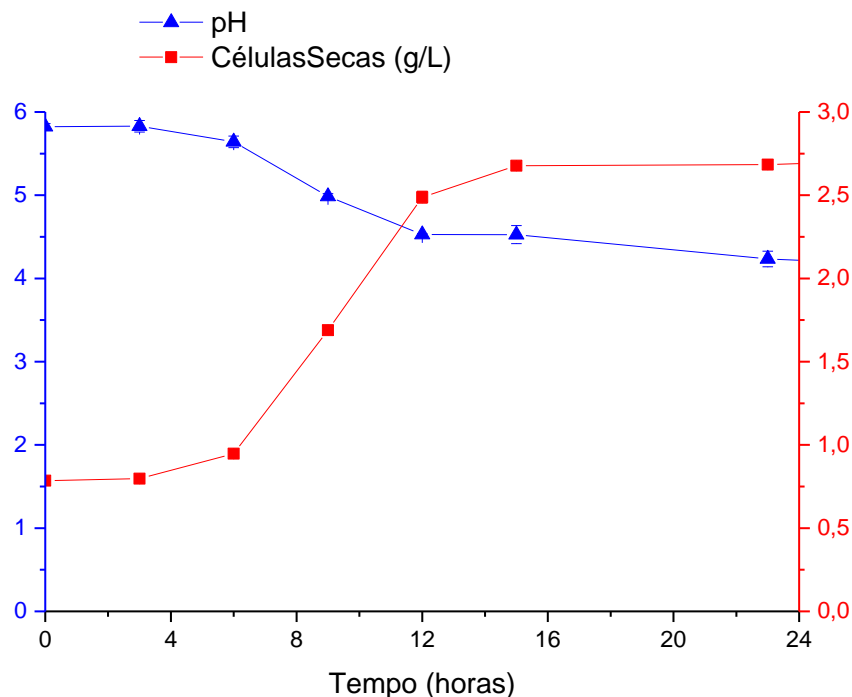


FIGURA 4 - VARIÇÃO DE VALOR DE pH E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 NO MEIO CONTENDO O SUBSTRATO LIMITANTE GLUCOSE 20 g.L<sup>-1</sup>, NA TEMPERATURA DE 30°C E AGITAÇÃO DE 150 rpm.

FONTE: O Autor (2012).

NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão.

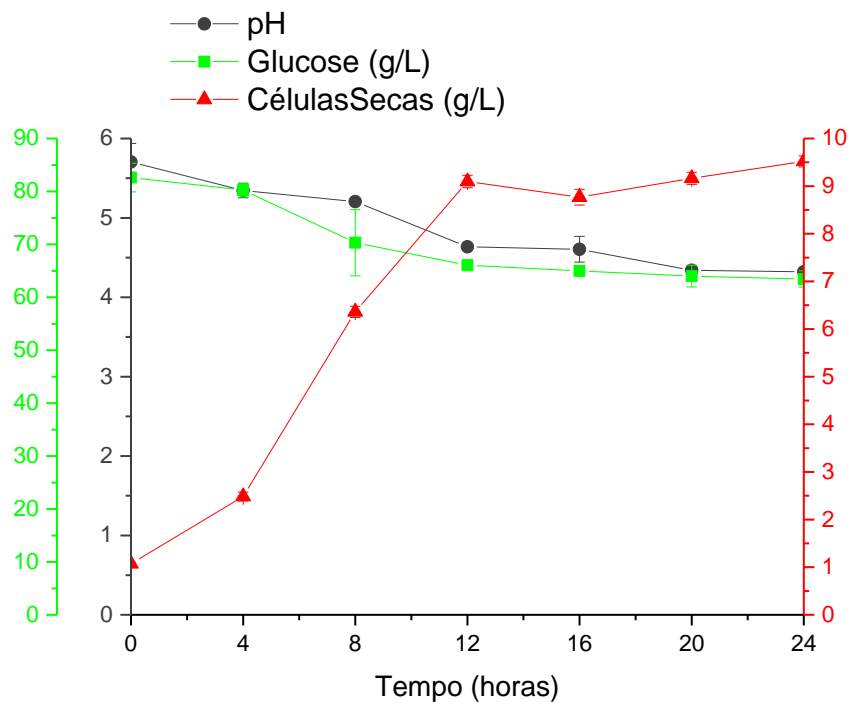


FIGURA 5 - VARIAÇÃO DO VALOR DE pH, CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E DE CÉLULAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 NO MEIO CONTENDO O SUBSTRATO LIMITANTE GLUCOSE 80 g.L<sup>-1</sup>, NA TEMPERATURA DE 30°C E AGITAÇÃO DE 150 rpm.  
 FONTE: O Autor (2012).  
 NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

Nos meios de cultivo utilizados para o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, a concentração do substrato limitante foi de 20 g.L<sup>-1</sup> (FIGURA 4) e 80 g.L<sup>-1</sup> (FIGURA 5), no tempo zero. Em relação ao consumo do substrato limitante pela bactéria (FIGURA 5), observa-se que a glucose é consumida até o tempo de 12 horas de cultivo, verifica-se no meio uma concentração de substrato residual de 63,5 ± 1,5 g.L<sup>-1</sup> e percebe-se que, entre 12 e 24 horas de cultivo do micro-organismo, praticamente não houve variação nas concentrações de glucose no meio.

Para uma descrição quantitativa dos cultivos da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, foram determinadas a concentração celular ( $X_t$ ), taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e foram medidos os valores de pH. Os resultados estão representados nas figuras 4 e 5.

Em todos os cultivos, o valor de pH inicial foi de, aproximadamente, 6,0, e este parâmetro não foi corrigido, o qual variou ao longo dos cultivos. Nos cultivos contendo o substrato limitante glucose, nas concentrações de aproximadamente 20

$\text{g.L}^{-1}$  e  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , o pH diminuiu de 6,0 para 4,5, durante o crescimento exponencial, mantendo este valor constante até o tempo final dos cultivos, conforme figuras 4 e 5.

De acordo com o metabolismo microbiano, durante o consumo do carboidrato e obtenção de células, o pH do meio diminui em decorrência do mecanismo de geração de potencial eletroquímico, que direciona o processo de transporte para a entrada de glucose na célula e opera via excreção de prótons por ação da enzima próton-translocante ATPase localizada na membrana celular (STANBURY; WHITAKE; HALL, 1995, p. 13-33; ISHIZAKI *et al.*, 1994, p. 541-547).

Em relação ao crescimento celular da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, verifica-se nas figuras 4 e 5, o início da fase estacionária em 12 horas, com valores de concentração celular de  $2,49 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$  e  $9,10 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$ , e concentrações celulares máximas ( $X_{\text{max}}$ ) de  $2,71 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$  e  $9,52 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$ , em 24 horas de cultivo, quando foram empregados os meios contendo glucose aproximadamente  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Esses resultados de pequenas alterações nas concentrações celulares, a partir do início da fase estacionária até 24 horas de cultivo, podem ser atribuídos à concentração residual de substrato e aos produtos do metabolismo presentes no meio.

A taxa específica de crescimento ( $\mu_x$ ) foi calculada de acordo com item 4.4.2 de “Material e Métodos”. Para os cultivos empregando os meios com glucose cerca de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e  $80 \text{ g.L}^{-1}$  os valores obtidos foram de  $0,25 \text{ h}^{-1}$ , em 9 horas e  $0,97 \text{ h}^{-1}$ , em 8 horas de tempo de cultivo, respectivamente.

Com base nos resultados de concentração celular máxima ( $X_{\text{max}}$ ) e nos valores de pH, sugere-se que a variação do pH de 6,0 a 4,5 influenciou no desempenho em relação ao crescimento celular da bactéria. O valor de pH de 5,5 parece favorecer o crescimento celular, pois é neste valor que se verifica a taxa específica de crescimento máximo nos meios de cultivo empregados.

O crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* é descrito na faixa de pH 3,5 a 7,5, com faixa ótima de pH entre 5,0 a 7,0 e temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , e apresenta relativa insensibilidade ao oxigênio (SWING; DE LEY, 1977, p. 1-46; VIIKARI, 1988, p. 237-261; VIIKARI; GISLER, 1986, p. 240-244).

Como fontes nutricionais essenciais para o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* são necessárias fontes de nitrogênio, fósforo e enxofre. Os sais de amônio e aminoácidos são preferíveis como fonte de nitrogênio por não acumularem nitratos e nitritos, conduzindo assim a um crescimento mais favorável. É

necessária uma fonte de fósforo, preferencialmente sais de potássio, que são mais bem absorvidos, para constituição de ATP (adenosina trifosfato) e reações de fosforilação. Como fonte de enxofre, pode-se utilizar metionina, cisteína e sulfatos, sendo o sulfato de magnésio uma forma de adicionar também magnésio ao meio de cultivo. O magnésio é necessário para a estabilidade de enzimas. Outros componentes, que devem ser adicionados ao meio como riboflavina, biotina e ácido pantotênico são encontrados no extrato de levedura, uma fonte rica de nutrientes (SWINGS; DE LEY, 1977, p. 1-46). Os cultivos da bactéria *Zymomonas mobilis*, que contêm extrato de levedura, apresentam a máxima velocidade específica reportada na literatura ( $0,35 \text{ h}^{-1}$ ), com início da fase estacionária em 12 horas (SILVEIRA, *et al.*, 2001, p. 442-445), corroborando com os resultados obtidos e apresentados nas figuras 4 e 5.

Considerando as composições dos meios e o tempo de cultivo de 12 horas, o maior valor de concentração celular para a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi obtido no meio contendo o substrato limitante glucose em torno de  $80 \text{ g.L}^{-1}$ .

A bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 foi cultivada por 12 horas e empregada para a obtenção de ácido lactobiônico, por processos de transformação microbiana, realizados em frascos e em biorreator.

A concentração de ácido lactobiônico foi determinada por cromatografia em fase líquida de alta eficiência, pelo método adaptado de Pedruzzi *et al.*, (2007, p. 128–132), com construção de curvas padrão para a quantificação das amostras por padronização externa. A figura 6 apresenta a curva de calibração, realizada a partir de sete pontos de concentração dos padrões ( $R^2 = 0,9988$ ) obtidos a partir de diferentes concentrações.

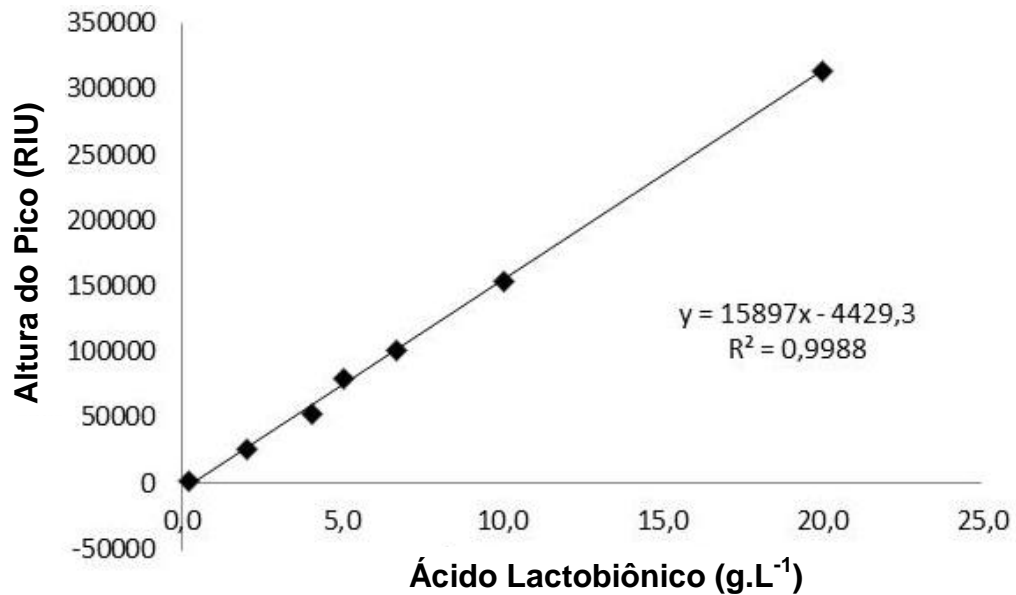


FIGURA 6 - CURVA DE CALIBRAÇÃO E EQUAÇÃO DA RETA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIONIÓICO.  
 FONTE: O autor (2012).

Para avaliar o efeito do pH, da concentração inicial de células e da agitação no meio reacional para a transformação de 140 g.L<sup>-1</sup> de lactose em ácido lactobiônico pela bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, foram ensaiadas diferentes concentrações de células inicial e empregadas as condições de agitação de 150 rpm e 200 rpm de acordo com o item 4.2.2 de “Material e Métodos”. Os resultados representados na figura 7 mostram o efeito da concentração inicial de células e da agitação e do ajuste do valor de pH para  $6,5 \pm 0,2$  na formação do ácido lactobiônico.

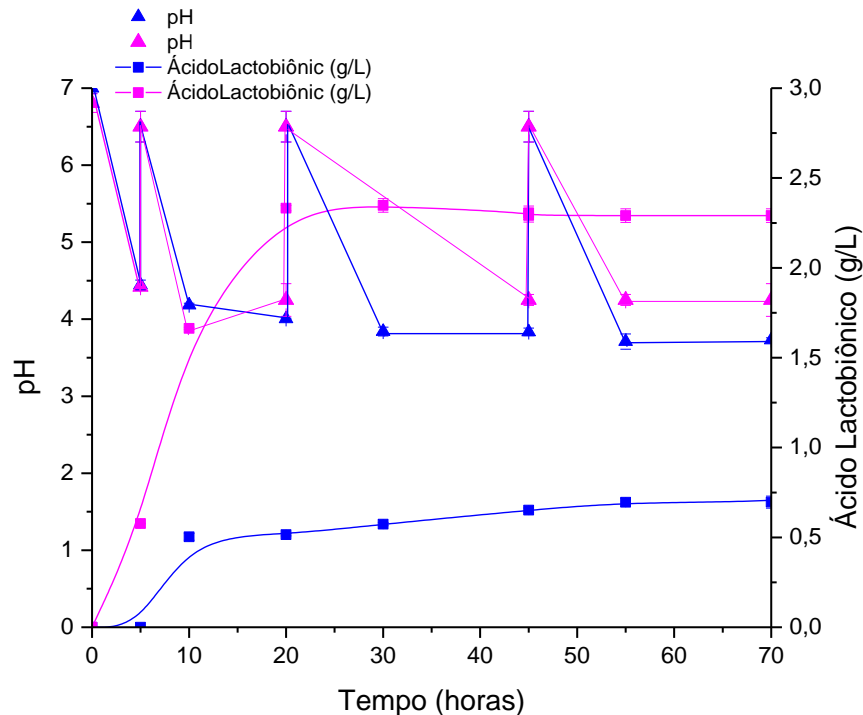


FIGURA 7 - VARIÇÃO DO VALOR DE pH E FORMAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO, POR *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, EM MEIO LACTOSE 140 g.L<sup>-1</sup>, EMPREGANDO CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 1,0 g.L<sup>-1</sup>, 150 rpm (azul); CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 3,0 g.L<sup>-1</sup>, 200 rpm (rosa), COM AJUSTE DE pH EM 6,50 ± 0,2, E TEMPERATURA DE 30°C. FONTE: O autor (2011)

NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

De acordo com a figura 7, ao empregar um grama de células secas por litro (processo A) e três gramas de células secas por litro (processo B) de concentração de células no início dos processos (tempo zero hora) e agitação de 150 rpm e 200 rpm, foi formado 0,69 ± 0,02 g.L<sup>-1</sup> e 2,30 ± 0,04 g.L<sup>-1</sup> de ácido lactobiônico, em 70 horas de processo, respectivamente. Estes resultados sugerem que o ajuste de valor de pH do meio reacional para 6,5, e o aumento da concentração celular inicial e da agitação podem favorecer a oxidação da lactose em ácido lactobiônico. A variação de pH similar em todas os intervalos de ajustes de pH, de 4,5 para aproximadamente 6,5 é significativa, considerando que para a enzima glucose frutose oxidoreductase o pH ótimo é próximo ao pH intracelular de 6,4 a 6,8 (ZACHARIOU; SCOPES, 1986, p. 863-869).

Como a enzima glucose frutose oxidoreductase exerce um papel importante na transformação da lactose em ácido lactobiônico pela bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, o desempenho de sua atividade foi investigado.

Para verificar este efeito foi realizado um processo de transformação denominado C conforme descrito em “Material e Métodos” no item 4.2.3. Inicialmente, uma suspensão da bactéria, preparada de acordo com o item 4.2.1, foi inoculada no meio contendo como substrato limitante glucose e após oito horas de crescimento exponencial do micro-organismo, foi adicionado ao processo o precursor lactose. O processo foi conduzido a temperatura 30°C e pH 6,5 controlados automaticamente, utilizando uma solução aquosa de hidróxido de sódio, durante 24 horas. Os resultados em relação à concentração de glucose, lactose, células e ácido lactobiônico estão representados na figura 8.

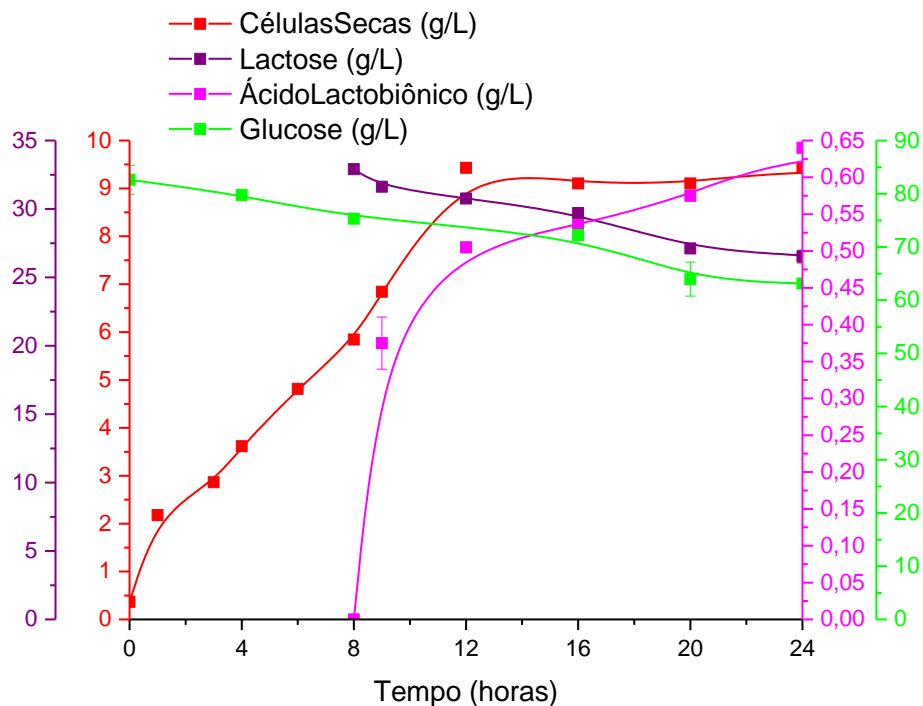


FIGURA 8 - VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE, DE CÉLULAS SECAS, LACTOSE E FORMAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO EM FUNÇÃO DO TEMPO, EMPREGANDO A BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, TEMPERATURA 30°C, AGITAÇÃO DE 400 rpm E pH CONTROLADO EM 6,5.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

Durante as primeiras 12 horas do processo C, observa-se uma concentração de  $9,43 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$  de célula seca, final da fase exponencial do crescimento do micro-organismo, e não houve alteração na concentração de células até o término do processo. Na figura 8, percebe-se em 12 horas de processo uma concentração



residual de glucose, cerca de  $72,21, \pm 0,6 \text{ g.L}^{-1}$  e em 24 horas, de  $63,11 \pm 0,49 \text{ g.L}^{-1}$ , e a adição de lactose não ocasionou um incremento na concentração de células, uma vez que a bactéria *Zymomonas mobilis* não utiliza o substrato lactose para o crescimento (SWINGS; DE LEY, 1977, p. 1-46). A adição do precursor lactose foi realizada no tempo de oito horas após o início do cultivo, quando as células apresentavam taxa específica de crescimento máxima, de acordo com os resultados obtidos para a cinética do crescimento microbiano, demonstrados na figura 5. Erzinger *et al.*, (2003, p.329-333) mostraram que, em até oito horas, foram verificadas as maiores atividades específicas para o par enzimático glucose frutose oxidoreductase e glucono lactonase.

Os resultados deste experimento mostram uma diminuição de lactose de, aproximadamente,  $35 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$  para  $26,51 \pm 0,46 \text{ g.L}^{-1}$ , em 24 horas de processo e formação de ácido lactobiônico de  $0,51 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$  nas primeiras horas após a adição de lactose. Os resultados obtidos após 24 horas mostram uma baixa concentração de ácido lactobiônico, provavelmente devido à presença de glucose no meio, quando as células entraram em contato com a lactose, considerando que a afinidade da glucose frutose oxidoreductase é de 80 vezes maior para a glucose do que para a lactose (SARTORY, *et al.*, 1997, p. 1205-1208).

O micro-organismo *Zymomonas mobilis*, possui um gene putativo facilitador para glucose, estritamente relacionado a uma grande família de transportadores de glucose, e está localizado em um conjunto de genes que codificam as enzimas do metabolismo deste carboidrato. O mecanismo descrito para transportar glucose para dentro de células de *Zymomonas mobilis* é por um processo de difusão facilitada, o qual necessita de um facilitador. Este facilitador limita a velocidade de difusão da substância transportada, pois a glucose para ser transportada deve ligar-se a um sítio específico do facilitador. Dessa forma, quando todos esses sítios estiverem ocupados, a velocidade de difusão tende a manter-se constante, mesmo com o aumento da concentração deste carboidrato. Em *Zymomonas mobilis*, o facilitador possui afinidade específica para glucose (PARKER, *et al.*, 2006, p. 795-802; GLAZER; NIKAIDO H., 2007, p. 470-486).

Sprenger (1996, p. 301-307) descreveu um sistema de difusão facilitada para transportar glucose e frutose sem gasto de energia metabólica. Este sistema é único para a bactéria *Zymomonas mobilis* (FIGURA 3 A). O sistema de difusão facilitada

descrito apresentou maior afinidade para a glucose com um valor de  $K_m$  de 2 a 4 mM.

Sugere-se que a elevada concentração residual de lactose no meio, em 24 horas do processo de transformação C, pode ser atribuída tanto ao facilitador de glucose, quanto a utilização de uma solução de hidróxido de sódio no controle do pH do meio reacional. Quando Ferraz, Alves e Borges, (2001, p.43-51) utilizaram o hidróxido de sódio para neutralizar o ácido glucônico produzido, a redução de 80% na taxa de reação foi observado. A presença do ácido glucônico causa uma inibição na hidrólise da lactona e o acúmulo no meio reacional. Os autores enfatizam a hipótese de que a estabilidade da enzima é associada à concentração da lactona no meio de reação. De acordo com Furlinger *et al.*, (1998, p. 955-963), a interação com a lactona produzida é responsável pela inativação da enzima glucose frutose oxidoreductase.

Gollhofer *et al.*, (1995, p. 235-240) descreveram que a quantidade de hidróxido de potássio 2 M, utilizada para neutralizar o ácido glucônico, não afetou a estabilidade da enzima glucose frutose oxidoreductase.

Considerando os trabalhos de Ferraz, Alves e Borges, (2001, p.43-51) e Gollhofer *et al.*, (1995, p. 235-240), nos processos de transformação microbiana D, E, F e G foi empregada a solução aquosa de hidróxido de potássio, para ajuste automático do pH.

Para investigar a possível influência da presença da glucose na ocorrência da reação de transformação da lactose em ácido lactobiônico no processo de transformação C, foi realizado outro processo empregando como meio reacional apenas lactose, na concentração de  $40 \text{ g.L}^{-1}$ , denominado D, de acordo com o item 4.2.3. Para a realização dos processos de transformação D, foi inoculada uma suspensão preparada a partir do inóculo, desenvolvido em três etapas, com meio adicionado de  $50 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $100 \text{ g.L}^{-1}$  e  $150 \text{ g.L}^{-1}$  de glucose, na primeira, na segunda e na terceira etapa, respectivamente, conforme o item 4.2.1 de “Material e Métodos”, visando a obtenção de um aumento na concentração de células.

Na primeira etapa do inóculo foi produzido  $4,5 \pm 1,40 \text{ g.L}^{-1}$  de células secas, na segunda etapa,  $10,26 \text{ g.L}^{-1} \pm 2,70$  de células secas e na terceira etapa  $26,58 \pm 5,89 \text{ g.L}^{-1}$  de células secas e obtido as concentrações de glucose residual de  $7,45 \pm 0,91 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $55,3 \pm 2,80 \text{ g.L}^{-1}$  e  $110,37 \pm 0,77 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, como pode ser observado na figura 9.

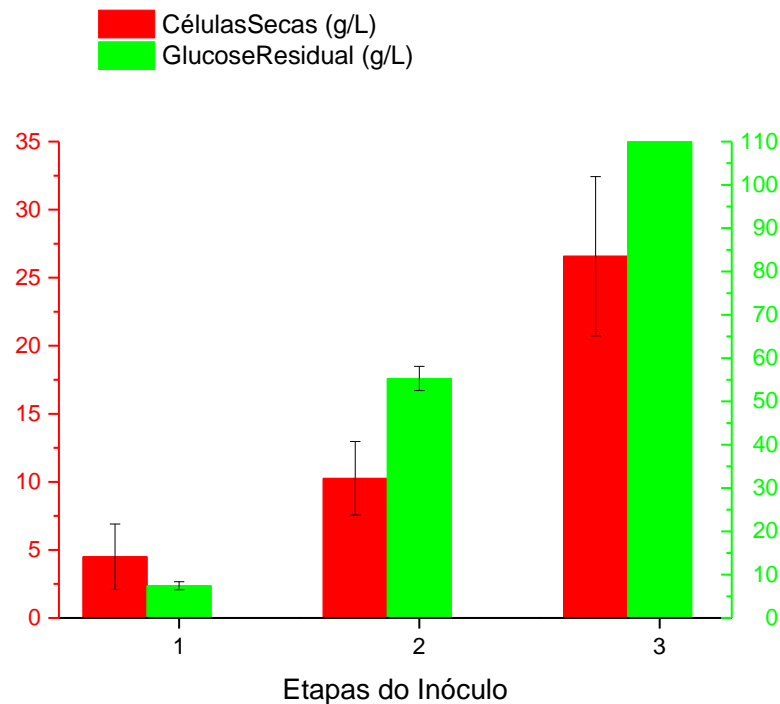


FIGURA 9 - CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE RESIDUAL, DE CÉLULAS SECAS NO FINAL DA PRIMEIRA, SEGUNDA E TERCEIRA ETAPA DO DESENVOLVIMENTO DO INÓCULO DE *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, UTILIZANDO O MEIO ADICIONADO DE 50 g.L<sup>-1</sup> (Etapa 1), 100 g.L<sup>-1</sup> (Etapa 2) E 150 g.L<sup>-1</sup> (Etapa 3) DE GLUCOSE, pH 5,50 ± 0,2, TEMPERATURA DE 30°C E AGITAÇÃO DE 150 rpm.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

Os dados apresentados na figura 9 fornecem subsídios para a utilização da concentração de 50 g.L<sup>-1</sup> de glucose, no meio da terceira etapa de cada desenvolvimento do inóculo, nos processos de transformação microbiana denominados E, F e G, como o meio que apresentou a menor concentração residual de glucose.

O processo de transformação D iniciou com uma concentração de 5,6 ± 0,48 g.L<sup>-1</sup> de células secas e após 21 horas de tempo de processo, não foi observada a formação de ácido lactobiônico. Isso se deve ao fato da enzima glucose frutose oxidoreductase precisar de um aceptor de elétrons, por exemplo, a frutose, para realizar o processo de transformação de lactose em ácido lactobiônico. No processo descrito por Zachariou e Scopes (1986), na presença de glucose e frutose, a glucose funciona como um doador de elétrons, sendo oxidada a glucolactona. O sorbitol é

produzido a partir da frutose, enquanto isso, a glucose é oxidada por NADP, ligada à enzima glucose frutose oxidoreductase, forma NADPH, e ao regenerar o NADP, a frutose é reduzida a sorbitol (FIGURAS 3A e 3B). Além disso, pode-se considerar o processo de inativação da enzima glucose frutose oxidoreductase pela falta da frutose na reação (FURLINGER, *et al.*, 1998, p. 955-963 ; ZACHARIOU; SCOPES 1986, p. 863 - 869).

A fim de verificar o efeito da frutose no processo de obtenção de ácido lactobiônico, foram realizados processos de transformação denominados E e F para avaliar o desempenho da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 utilizando diferentes meios reacionais. Nos processos E, o meio reacional com 220 g.L<sup>-1</sup> de lactose e 40 g.L<sup>-1</sup> de frutose e nos processos F, o meio reacional com 220 g.L<sup>-1</sup> de lactose e 75 g.L<sup>-1</sup> de frutose, realizados conforme descrito em “Material e Métodos” item 4.2.3.

Antes de iniciar os processos de transformação microbiana E e F, foram desenvolvidos os inóculos utilizando 50 g.L<sup>-1</sup> de glucose, no meio da terceira etapa de cada inóculo, de acordo com os resultados demonstrados na figura 9, para obtenção das células e preparo da suspensão a ser inoculada nos processos de transformação, conforme descrito em “Material e Métodos” item 4.2.1. As concentrações de células secas determinadas no início (tempo zero hora) de cada processo de transformação E e F foi de 11,4 ± 1,7 g.L<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos em relação à utilização dos substratos lactose e frutose e formação de ácido lactobiônico, sorbitol e etanol estão apresentados nas figuras 10 e 11.

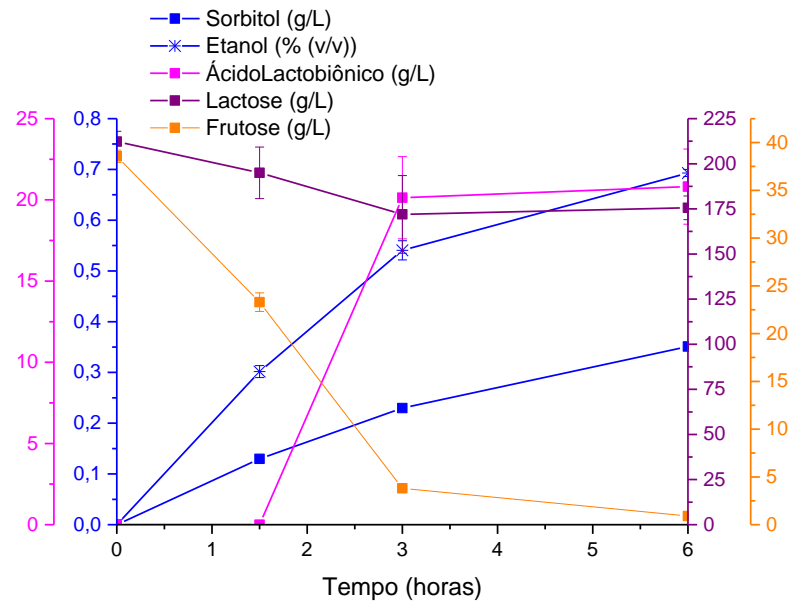


FIGURA 10 - VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, FRUTOSE, ÁCIDO LACTOBIONIÓICO, SORBITOL E ETANOL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO, PELA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, EM MEIO REACIONAL COM LACTOSE 220 g.L<sup>-1</sup> E FRUTOSE 40 g.L<sup>-1</sup>, NAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA DE 39°C, AGITAÇÃO DE 400 rpm E CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 11,4 ± 1,7 g.L<sup>-1</sup>.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

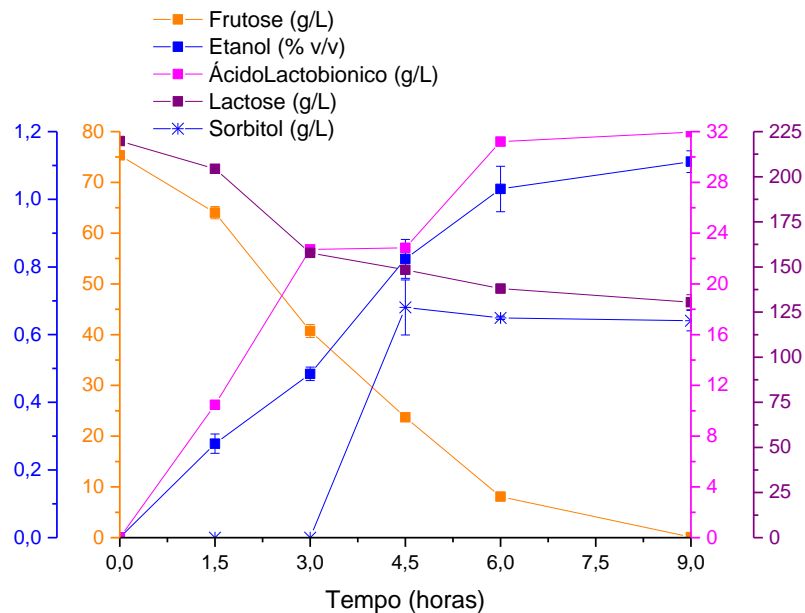


FIGURA 11 - VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, FRUTOSE, ÁCIDO LACTOBIONIÓICO, SORBITOL E ETANOL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO, PELA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, EM MEIO REACIONAL COM LACTOSE 220 g.L<sup>-1</sup> E FRUTOSE 75 g.L<sup>-1</sup>, NAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA DE 39°C, AGITAÇÃO DE 400 rpm E CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE 11,4 ± 1,7 g.L<sup>-1</sup>.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

Conforme os resultados apresentados nas figuras 10 e 11, as concentrações de lactose nos processos de transformação E e F foram em torno de 220 g.L<sup>-1</sup>. Como pode ser observado na figura 11, em seis horas de processo de transformação F a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 transformou uma quantidade maior de lactose, cerca de 81,76 g.L<sup>-1</sup>, em relação ao processo E, figura 10, que foi de aproximadamente 40,37 g.L<sup>-1</sup> de lactose, em três horas. Considerando-se o tempo de três horas no processo de transformação E e de seis horas no processo F, as concentrações de ácido lactobiônico foram de 20,13 ± 2,53 g.L<sup>-1</sup> e 31,95 ± 0,08 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, e praticamente nenhum ácido lactobiônico adicional foi formado após estes tempos.

Em relação à utilização de frutose pela bactéria, ocorreu a diminuição na concentração de frutose em três horas no processo de transformação E, figura 10, de aproximadamente 40 g.L<sup>-1</sup> para 3,80 ± 0,21 g.L<sup>-1</sup> e em seis horas, no processo de transformação F, de 75 g.L<sup>-1</sup> para 8,08 ± 0,46 g.L<sup>-1</sup>, conforme os resultados na figura 11. O aumento de 34 % na quantidade de ácido lactobiônico formado no processo de transformação F, em comparação a quantidade de ácido formado no processo E, pode ser atribuído a maior disponibilidade de frutose no meio reacional. O substrato frutose não foi utilizado apenas para a transformação da lactose em ácido lactobiônico, houve a formação de 0,22 ± 0,01 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol e 0,54 ± 0,02 % (v/v) de etanol, em três horas, no processo E e 0,65 ± 0,03 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol e 1,03 ± 0,07 % (v/v) de etanol, em seis horas, no processo F. O sorbitol é produzido pelo micro-organismo *Zymomonas mobilis* a partir da frutose, para neutralizar o efeito prejudicial de estresse osmótico decorrente das altas concentrações de carboidrato (SPRENGER, 1996, p. 301-307).

A frutose do meio, inicialmente, atravessa a membrana do micro-organismo *Zymomonas mobilis*, assim como a glucose, por um sistema de transporte de difusão facilitada. Então, a frutose é fosforilada a frutose-6-fosfato, por uma quinase constitutiva, que possui alta especificidade para a frutose. A glucose-fosfato-isomerase converte a frutose-6-fosfato em glucose-6-fosfato, nesta etapa este metabólito entra na via Entner Doudoroff, e continua sendo metabolizado, assim como descrito para a glucose (FIGURA 3A). É descrito que o rendimento teórico em etanol diminui em 5% quando a fonte de carbono utilizada como substrato é a frutose, em relação à glucose. A fermentação da frutose pela bactéria *Zymomonas*

*mobilis* produz, ainda, outros subprodutos como diidroxiacetona, manitol e glicerol. (GLAZER; NIKAIDO, 2007, p. 470-486).

A reprodutibilidade da suplementação de frutose na concentração de  $75 \text{ g.L}^{-1}$  na transformação da lactose em ácido lactobiônico foi verificada utilizando meio reacional contendo  $190 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose e com o objetivo de determinar qual o efeito da concentração de células inoculadas no início de cada processo foram realizados processos de transformação microbiana denominados G (itens 4.2.1 e 4.2.3 de “Material e Métodos”). Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 12.

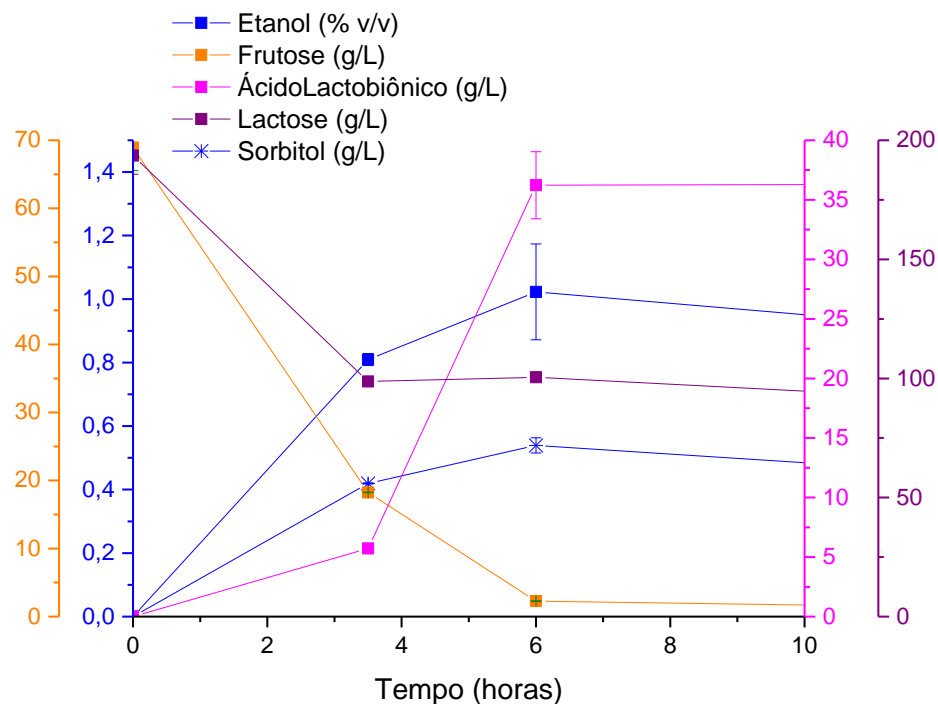


FIGURA 12: VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, FRUTOSE, ÁCIDO LACTOBIÔNICO, ETANOL E SORBITOL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO, PELA BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, EM MEIO COM LACTOSE  $190 \text{ g.L}^{-1}$  E FRUTOSE  $75 \text{ g.L}^{-1}$ , NAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA DE  $39^\circ\text{C}$ , AGITAÇÃO DE 400 rpm, CONCENTRAÇÃO CELULAR INICIAL DE  $16,6 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ . FONTE: O autor (2013)

NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

Os resultados apresentados na figura 12 mostram que existe variação na obtenção de ácido lactobiônico no processo G, quando foi inoculado  $16,6 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$  de células secas, uma concentração 28 % maior de células que a empregada no processo F, utilizando o mesmo meio reacional. A formação de ácido lactobiônico foi de  $36,23 \pm 1,17 \text{ g.L}^{-1}$  em 6 horas de processo, 13% maior do que o obtido no mesmo tempo no processo F, em que foi utilizada a mesma concentração de frutose.

Percebe-se no processo G uma concentração residual de frutose de 3,5 vezes menor do que a observada no processo F. Também se observa uma formação de etanol de  $1,02 \pm 0,15$  % (v/v) e sorbitol,  $0,53 \pm 0,02$ g.L<sup>-1</sup>, em 6 horas de processo.



## 6 CONCLUSÃO

A bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 demonstrou ser promissora para a obtenção do ácido lactobiônico. Os resultados obtidos nas condições empregadas de: temperatura 39°C, pH 6,5 controlado com solução de hidróxido de potássio, e agitação de 400 rpm nos processos de transformação microbiana, mostram que a formação de ácido lactobiônico e o tempo do processo são influenciados pela relação da concentração dos substratos lactose e frutose e pela concentração de células totais empregadas no início do processo. A utilização em biorreator no meio reacional dos substratos lactose e frutose na relação da concentração de 2,5 lactose:1 frutose e a concentração de células inicial de 16,6 g.L<sup>-1</sup> forneceu a maior formação de ácido lactobiônico, de 36,23 ± 1,17 g.L<sup>-1</sup>, em menos tempo de processo, 6 horas.

Em relação ao fator econômico, os resultados indicam que o emprego de células totais de *Zymomonas mobilis* sem tratamento prévio e a redução no tempo do processo de transformação para conversão da lactose em ácido lactobiônico geram uma redução no custo total do processo de transformação industrial.

## REFERÊNCIAS

ABBADI, A. *et al.* **Selective Chemo- Catalytic Oxidation of Lactose and of Lactobionic Acid towards 1-Carboxylactulose (2-keto-Lactobionic Acid)**. Applied Catalysis A: General, v. 156, p. 105-115, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X96004097>>

AFFERTSHOLT-ALLEN, T. **Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives**. International dairy federation symposium "lactose and its derivatives", Moscow, Russia, 2007. Disponível em: [http://lactose.ru/present/1tage\\_affertsholt-allen.pdf](http://lactose.ru/present/1tage_affertsholt-allen.pdf).

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DIAZ, M. **Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions**. Bioresource Technology, v. 102, p. 9730-9736, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411010406>

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DIAZ, M. **Role of dissolved oxygen availability on lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens***. Bioresource Technology, v. 109, p. 140-147, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241200051X>.

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DIAZ, M. **Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects**. Biotechnology Advances, p. 1-17, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975013000815#>.

ASTLEY, M. **Whey market grows 20% to € 5.83 bn**. Dairy Reporter, agosto, 2012. Disponível em: <http://www.dairyreporter.com/markets/whey-market-grows-20-to-5.83bn>.

BRIDEN, M. E.; GREEN, B. A. **Topical exfoliation - clinical effects and formulating considerations** Z.D. Draelos, L.A. Thaman (Eds.), Cosmetic formulation of skin care products, Taylor and Francis Group, New York (2006), pp. 237–250

BRINGER-MEYER, S.; SAHM, H. **Junctions of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme**. Appl. Microbial. Biotechnol. v.31, p. 529-536, 1989. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00270789.pdf>

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1980. p. 828

BUDAVARI, S. *et al.* **The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals** 12 ed. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, p. 1175, 1989.

CAVALLARI, A. *et al.* **A Multicenter Pilot Prospective Study Comparing Celsior and University of Wisconsin Preserving Solutions for Use in Liver Transplantation**. Liver Transplantation, v. 9, n. 8, p. 814-821, 2003. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1053/jlts.2003.50161/pdf>.

CHARLOUX, C. *et al.* **Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol**. Free Radical Biology & Medicine, v. 19, n. 5, p. 699-704, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158499500079D>.

CORT, W. M. *et al.* **Evidence for the formation and utilization of lactobionic acid by *Penicillium chrysogenum*.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 63, n. 2, p. 477-478, 1956. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986156900649>.

CONWAY, T. **The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology.** FEMS Microbiol. Rev. v.103, p. 1-28, 1992.

DITRE, C. M. *et al.* **Effects of  $\alpha$ -hydroxy acids on photoaged skin: A pilot clinical, histologic, and ultrastructural study.** Journal of the American Academy of Dermatology, v.34, n. 2, pt. 1, p. 187-195, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962296801101>.

DRULIOLLE, H.; KOKOH, K. B.; BEDEN, B. **Selective oxidation of lactose to lactobionic acid on lead-adsorbent modified platinum electrodes in  $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$  buffered medium.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 385, n. 1, p. 77-83, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002207289503773A>.

ERZINGER, G. S. *et al.* **Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations.** Braz. J. Microbiol., v. 34, p. 329-333, 2003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822003000400008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822003000400008&script=sci_arttext)

FDA. **Calcium lactobionate. Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption:** Part 172, Code of Federal Regulations, Title 21, Vol. 3, 2012. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cber.18890220182/abstract;jsessionid=A9F5A4CAA90D95A3631ECAC41D1F1CA0.d04t01>

FISCHER E., MEYER J. **Oxydation des milchzuckers** Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft, v. 22, p. 361–364, 1889. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cber.18890220182/abstract>

FERRAZ, H. C.; ALVES, T. L. M.; BORGES, C. P. **Coupling of an electrodialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells.** Journal of Membrane Science, v. 191, p. 43–51, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738801004471>

FOSHAN, L. L. **Hydrates of Erythromycin salts, preparation and use thereof.** United States Patent, 13/003, 397, 2011. Disponível em: <http://www.google.com.br/patents?hl=en&lr=&vid=USPATAPP13003397&id=adfoAQAAEBAJ&oi=fnd&dq=Hydrates+of+Erythromycin+salts,+preparation+and+use+thereof&printsec=abstract#v=onepage&q=Hydrates%20of%20Erythromycin%20salts%2C%20preparation%20and%20use%20thereof&f=false>.

FLAMHOLZ A. *et al.* **Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost.** PNAS, v. 110, p. 10039–10044, 2013. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/110/24/10039.short>

FÜRLINGER, M. *et al.* **A multistep process is responsible for product-induced inactivation of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*.** v. 251, p. 955-963, 1998. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1327.1998.2510955.x/pdf>

GIBBS M.; DeMOSS R.D. **Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*.** Arch Biochem Biophys, v. 34, p. 478–479, 1951.

GLATTFELD, W. E.; SCHIMPF D G.W. **The Catalytic Hydrogenation of Aldonic Acid Delta and Gamma Lactones and of the Aldoses.** J. Am. Chem. Soc., v. 57, p. 2204-2208, 1935. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01314a050>.

GLAZER A. N.; NIKAIDO H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology** 2<sup>o</sup>. ed, p. 470-486, 2007, Cambridge, New York.

GHERSETICH, P. *et al.* **Chemical peeling: How, when, why?** Florença, Italia: Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 8, p. 1-11, 1997. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-3083.1997.tb00449.x/pdf>.

GRAF J. **Anti-Aging Skin Care Ingredient Technologies**, Cosmetic Dermatology, .Springer Berlin Heidelberg, p. 17-28, 2005. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=kJNOY2sLxIoC&oi=fnd&pg=PA17&dq=Anti-Aging+Skin+Care+Ingredient+Technologies&ots=bcXkhjvm49&sig=pCAWxaX5EobMKxpRvps7hJHs2p8>.

GREEN B. A.; EDISON B. L.; SIGLER M. L. **Antiaging Effects of Topical Lactobionic Acid: Results of a Controlled Usage Study.** Cosmetic Dermatology, v. 21, n. 2, p. 76-82, 2008. Disponível em: <http://www.cosderm.com/Article.aspx?ArticleId=8p2zlxBDvrY>.

GREEN B. A. **After 30 years ... the future of hydroxyacids.** Journal of Cosmetic Dermatology, v. 4, p. 44-45, 2005. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1473-2165.2005.00159.x/pdf>

GRIMES, P.E. *et al.* **The use of poly hydroxy acids in photoaged skin.** Cutis, v. 73, p. 3-13, 2004. Disponível em: <http://www.dermage.com.br/dermage/paginas/artigo-acido-lactobionico.pdf>.

GIEDROJC, J. **Experimental Studies on the Interaction of LW 10082 (Aprosulphate) with Other Antithrombotic Agents in Laser-Induced Thrombosis.** Lasers Med Sci, v. 13, p. 132-136, 1998. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs101030050066.pdf>.

GOLLHOFER, D. *et al.* **Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action.** Enzyme and Microbial Technology, v. 17, p. 235-240, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014102299400025M#>

GUO, X. L. *et al.* **Morphology and metabolism of Ba-alginate-encapsulated hepatocytes with galactosylated chitosan and poly(vinyl alcohol) as extracellular matrices.** Journal of Biomaterials Science, v. 14, p. 551-565, 2003. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/15685620360674245#.UhtZy5KsiSo>.

GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. **Selective production of lactobionic acid by aerobic oxidation of lactose over gold crystallites supported on mesoporous sílica.** Applied Catalysis A: General, v. 402, p. 94-103, 2011. Disponível em: <http://www.docentes.unal.edu.co/lfgutierrez/docs/Selective%20production%20of%20lactobionic%20acid%20by%20aerobic%20oxidation%20of%20lactose%20over%20gold%20crystallites%20supported%20on%20mesoporous%20silica.pdf>.

GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. **Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications.** International Dairy Journal, v. 26, p. 103-111, 2012a. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612001173>

GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. **Effective gold catalyst supported on mesoporous silica decorated by ceria for the synthesis of high value lactobionic acid** Applied Catalysis A: General, v. 425-426, p. 213-223, 2012b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X12001585>

HARDMAN, M.; SCOPES R. K. **The kinetics of glucose - fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*.** Eur. J. Biochem., v. 173, p. 863-869, 1986. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13985.x/pdf>.

HATANO, Y. *et al.* **Maintenance of an Acidic Stratum Corneum Prevents Emergence of Murine Atopic Dermatitis.** J Invest Dermatol. V. 129(7), p. 1824-1835. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695850/?report=reader>.

HECKE W. V. *et al.* **Kinetic modeling of a bi-enzymatic system for efficient conversion of lactose to lactobionic acid.** Biotechnology and Bioengineering, v. 102, n. 5, p. 1475-1482, 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22165/pdf>.

HENDRIKS H. E. J.; KUSTER B. F. M.; MARIN, G. B. **The effect of bismuth on the selective oxidation of lactose on supported palladium catalysts.** Carbohydrate Research, v. 204, p. 121-129, 1990. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000862159084027R>.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

ISHIZAKI, A.; TRIPETCHKUL, S.; TONOKAWA, M.; SHI, Z.; SHIMIZU, K. **pH-mediated control methods for continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*.** Journal of Fermentation and Bioengineering, Japan, v. 77, p. 541-547, 1994. Disponível em: [http://ac.els-cdn.com/0922338X94901252/1-s2.0-0922338X94901252-main.pdf?\\_tid=62f34704-fc8c-11e2-b8e0-0000aacb361&acdnat=1375569246\\_4caf5b9e31b704115d8bed068de3e06e](http://ac.els-cdn.com/0922338X94901252/1-s2.0-0922338X94901252-main.pdf?_tid=62f34704-fc8c-11e2-b8e0-0000aacb361&acdnat=1375569246_4caf5b9e31b704115d8bed068de3e06e).

JOHNSON & JOHNSON CONSUMER FRANCE SAS Oddos, T. *et al.* **Cosmetic and pharmaceutical compositions.** Cosmetic and pharmaceutical compositions, EP 2072494 B1, 2010. Disponível em: [https://www.google.com/patents/EP2072494B1?cl=en&dq=lactobionic+acid+cosmetics&hl=pt-BR&sa=X&ei=WcEWUtWICea8jALJ\\_YH4AQ&ved=0CHYQ6AEwBw](https://www.google.com/patents/EP2072494B1?cl=en&dq=lactobionic+acid+cosmetics&hl=pt-BR&sa=X&ei=WcEWUtWICea8jALJ_YH4AQ&ved=0CHYQ6AEwBw)

KARSKI, S. **Activity and selectivity of Pd-Bi/SiO<sub>2</sub> catalysts in the light of mutual interaction between Pd and Bi.** Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v. 253, p. 147-154, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381116906006200>.

KALNENIEKS, U., 2006. **Physiology of *Zymomonas mobilis*: some unanswered questions.** Advances in Microbial Physiology v. 51, p. 73-117, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065291106510021>

KESHAV, K. F. *et al.* **Cloning of the *Zymomonas mobilis* structural gene encoding alcohol dehydrogenase I (adhA): sequence comparison and expression in *Escherichia coli*.** J. Bacteriol. May 1990 vol. 172 no. 5 2491-2497. Disponível em: <http://jb.asm.org/content/172/5/2491.short>

KEKKONEN, V. *et al.* **Synthesis and characterization of biocompatible magnetic glyconanoparticles.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 321, p. 1393–1396, 2009. Disponível em: < [http://ac.els-cdn.com/S0304885309001164/1-s2.0-S0304885309001164-main.pdf?\\_tid=6f5e0d76-0a9c-11e3-93880000aab0f26&acdnat=1377115455\\_04d682ffa71cbb58fc1d4943b2c60528](http://ac.els-cdn.com/S0304885309001164/1-s2.0-S0304885309001164-main.pdf?_tid=6f5e0d76-0a9c-11e3-93880000aab0f26&acdnat=1377115455_04d682ffa71cbb58fc1d4943b2c60528)

KINGSTON, R. L.; SCOPES, R. K.; BAKER, E. N. **The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP.** *Structure*, v. 4, n. 12, p. 1413-1428, 1996. Disponível em: [http://www.cell.com/structure/abstract/S0969-2126\(96\)00149-9](http://www.cell.com/structure/abstract/S0969-2126(96)00149-9).

KINOSHITA, S. *et al.* **Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 22, p. 249-254, 1985. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00252025.pdf>

KOKOH, K.B.; ALONSO-VANTE, N. **Electrocatalytic oxidation of lactose on gold nanoparticle modified carbon in carbonate buffer.** *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 36, p. 147-151, 2006. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10800-005-9042-6.pdf> .

KRAFT FOODS, Mehran, R. **Processo para fabricar um produto de queijo contendo ácido lactobiônico, produto de queijo, processo para fabricar um produto laticínio contendo ácido lactobiônico, queijo do processo, e, processo para preparar o queijo do processo** WO 02/089592, 2002. Disponível em: <http://www.patentesonline.com.br/processo-para-fabricar-um-produto-de-queijo-contendo-cido-lactobi-nico-produto-de-129166.html#adsense1>.

KRAFT FOODS, Baldwin C. **Mineral complexes of lactobionic acid and method of using for mineral fortification of food products** US 7781002 B2, 2010. Disponível em: <https://www.google.com/patents/US7781002?pg=PA8&dq=Mineral+absorption+promoters+containing+lactobionic+acid&hl=pt-BR&sa=X&ei=kL8WUqGkLO72iQKXhoDwDw&ved=0CH0Q6AEwCA>

LEHNINGER, A. L. **Principles of Biochemistry.** 5 ed., New York, NY, 2011.

LEIGH, D., SCOPES; R. K., ROGERS P. L. **A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 20, p. 413-415, 1984. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00261944.pdf>.

LOOS, H. *et al.* **Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in high sugar-content environments: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection.** *J. Bacterial.* V. 176, pg. 7688-7693, 1994. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00252025.pdf>

LU, B. *et al.* **Galactosyl conjugated N-succinyl-chitosan-graft-polyethylenimine for targeting gene transfer.** *Mol. BioSyst.*, v. 6, p. 2529–2538, 2010. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2010/MB/c0mb00096e>.

MALVESSI, E. *et al.* **Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*.** *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 40, p. 1-10, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10295-012-1198-6>.

MIYAMOTO, Y.; OOI, T.; KINOSHITA, S. **Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas sp.* LS13-1.** *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 427-430, 2000. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1005617903152.pdf>.

MURAKAMI, H. *et al.* **Screening of lactobionic acid producing microorganisms.** *J. Appl. Glycosci*, v. 49, n. 4, p. 469-477, 2002. Disponível em: <http://sciencelinks.jp/j-east/article/200222/000020022202A0878046.php>.

MURZINA, E. V. *et al.* **D-Lactose oxidation over gold catalysts.** *Catalysis Today*, v. 131, p. 385–392, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586107006475>.

NEALE, A. D. **Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*.** *Journal of bacteriology*, v. 169, p. 1024-1028, 1987. Disponível em: <http://jb.asm.org/content/169/3/1024.long>

NISHIZUKA, Y.; HAYAISHI, O. **Enzymic formation of Lactobionic Acid from Lactose.** *The journal of Biological Chemistry*, v. 237, p. 2721-2728, 1962. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/237/9/2721.full.pdf+html>.

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*, v. 97, p. 694-707, 2006. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.21273/pdf>.

NOVOZYMES A/S Nielsen, P. M. **Meat based food product comprising lactobionic acid.** EP 1718169 B1, 2012. Disponível em: <https://www.google.com/patents/EP1718169B1?cl=en&dq=lactobionic+acid+2013&hl=pt-BR&sa=X&ei=DcQWUsXJMIHqiwKV2oCIDg&ved=0CDUQ6AEwAA>.

PARKER, C. *et al.* **Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (glf) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport.** *Mol Microbiol*, v. 15, p. 795-802, 2006. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02350.x/abstract>

PEDRUZZI, I. *et al.* **Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography.** v. 1145, p. 128–132, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307000982>

PEDRUZZI, I.; SILVA, E. A. B.; RODRIGUES, A. E. **Production of lactobionic acid and sorbitol from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomonas mobilis* cells: A kinetic study.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 49, p. 183–191, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022911000755>.

PENTJUSS A. *et al.* **Biotechnological potential of respiring *Zymomonas mobilis*: A stoichiometric analysis of its central metabolism.** *Journal of Biotechnology*, v. 165, p. 1–10, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816561300120X>

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA, **Acido Lactobionico.** Ed. 3, Espanha, 2006.

REHR, B.; WILHELM, C.; SAHM H. **Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis***. Applied microbiology and biotechnology, v. 35, p. 144-148, 1991. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00184677>.

SATORY, M. *et al.* **Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxireductase in a ultrafiltration membrane reactor**. Biotechnology Letters, v. 19, n. 12, p. 1205-1208, 1997. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1018485804167.pdf>.

SAVARY, B.J.; HICKS, K.B.; O'CONNOR, J.V. **Hexose oxidase from *Chondrus crispus*: improved purification using perfusion chromatography**. Enzyme and Microbial Technology, v. 29, p. 42-51, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022901003519>.

SENGUPTA, S. M. L., BHATTACHARYA, N.; BASU, U. P. **Preparation of calcium lactobionate by electrolytic oxidation of lactose: Part I Oxidation in electrolytic cell using stationary electrodes**, Indian J. Technol. v. 5, p. 152–154, 1967.

SCOTT E. J. V.; YU R. J. **Hyperkeratinization, corneocyte cohesion, and alpha hydroxy acids**. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 11, n. 5, pt. 1, p. 867-879, 1984. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962284804661>.

SOUTHARD J. H. **The Right Solution for Organ Preservation**. Business Briefing: Global Surgery, p. 79-84, 2004. Disponível em: <http://www.touchbriefings.com/pdf/952/Southard.pdf>.

SOUTHARD, J. H.; BELZER, F. O. **Organ preservation**, Annual Review of Medicine, v. 46, p. 235-247, 1995. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.med.46.1.235>.

SHEPHERD R. E. *et al.*, **Lactobionic and Gluconic Acid Complexes of Fen and Fern; Control of Oxidation Pathways by an Organ Transplantation Preservant**. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 49, p. 23-48, 1993. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ie901724j>.

SPRENGER G. A.; **Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes**. Microbiology Letters, v. 145, n. 3, p. 301-307, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378109796003965>.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL S. J. **Principles of Fermentation Technology** 2<sup>a</sup>. ed, Pergamon Press, Oxford, p. 13-33, 1995.

STANNARD, K. A. *et al.* **Galectin inhibitory disaccharides promote tumour immunity in a breast cancer model**. Cancer Letters, v. 299, p. 95–110, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383510003861>.

SILVEIRA M. M. *et al.* **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, v. 55, p. 442–445, 2001. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002530000569.pdf>.



SOOFT ITALIA SPA Cavallo, G. *et al.* **Ophthalmic composition based on lactobionic acid useful for reducing corneal edema and inflammation**, EP 2494954 A2, 2012. Disponível em: [https://www.google.com/patents/EP2494954A2?cl=en&dq=lactobionic+acid+cosmetics&hl=pt-BR&sa=X&ei=WcEWUtWICea8jALJ\\_YH4AQ&ved=0CFIQ6AEwAw](https://www.google.com/patents/EP2494954A2?cl=en&dq=lactobionic+acid+cosmetics&hl=pt-BR&sa=X&ei=WcEWUtWICea8jALJ_YH4AQ&ved=0CFIQ6AEwAw)

STODOLA, F. H.; LOCKWOOD, L. B. **The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *Pseudomonas***. The Journal of Biological Chemistry, v. 171, p. 213-221, 1947. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/171/1/213.short>.

SWINGS, J; DE LEY, J. **The biology of *Zymomonas mobilis***. Bacteriological Reviews, v. 41, n.1, p. 1-46, 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413995/pdf/bactrev00055-0015.pdf>.

SWINGS, J; KERSTERS, K.; DE LEY, J. **Taxonomic Position of Additional *Zymomonas mobilis* Strains**. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 27, n. 3, p. 271-273, 1977. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/content/27/3/271.full.pdf>. .

TASIC-KOSTOV, M. **Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid**. Journal of Cosmetic Dermatology, v. 9, p. 3–10, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1473-2165.2010.00474.x/full>

TOKAREV, A. V. *et al.* **Kinetic behaviour of electrochemical potential in three-phase heterogeneous catalytic oxidation reactions**. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v. 255, p. 199-208, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138111690600745X>.

TOMLINSON, G. A.; STROHM, M. P.; HOCHSTEIN, L. I. **The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: The identification of lactobionic acid as a product of lactose metabolism by *Halobacterium saccharovorum***. Canadian Journal of Microbiology, v. 24, p. 898-903, 1978. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m78-150>.

TOSHIKI S.; SHUICHI Y.; SEIICHIRO A.; SAKANORI S. **Mineral absorption promoters containing lactobionic acid**. 1995. Japanese Patent 07277991.

TRISTRATA TECHNOLOGY, INC. Scott, E. J. V.; Yu R. J. **Alleviating signs of dermatological aging with glycolic acid, lactic acid or citric acid**. United States Patent, 5547988, 1996. Disponível em: <http://www.google.com.br/patents?id=vpweAAAAEBAJ&zoom=4&dq=alpha%20hydroxy%20acids%20aging%20retinoids%20glycolic%20acid%20peeling%20skin&pg=PA1#v=onepage&q&f=false>.

VALLE, T. A. *et al.* **Lactobionic Acid Produced by *Zymomonas mobilis*: Alternative to Prepare Targeted Nanoparticles**. Pharmaceut Anal Acta, v. 4, p. 1-5, 2013. Disponível em: [http://www.omicsonline.org/2153-2435/2153-2435-abstract.php?abstract\\_id=12187](http://www.omicsonline.org/2153-2435/2153-2435-abstract.php?abstract_id=12187).

VIIKARI, L. **Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis***. Biotechnical Laboratory, Appl Microbiol Biotechnol, v.19, p. 252-255, 1984.

VIIKARI, L. **Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis***. Appl Microbiol Biotechnol, v. 20, p. 118-123, 1986. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00252588#page-1>.

VIIKARI, L.; GISLER, R. **By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas*-strains.** Appl Microbiol Biotechnol, v. 23, p. 240-244, 1986. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00261922>.

VIIKARI, L. **Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*.** CRC Critical Reviews of Biotechnology, v. 7, p. 237–261, 1988.

WIEGERT, T.; SAHM H.; SPRENGER G. A. **Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*.** Archives of Microbiology, v. 166, p. 32-41, 1996. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002030050352.pdf>.

ZACHARIOU, M.; SCOPES R. K. **Glucose-Fructose Oxidoreductase, a New Enzyme Isolated from *Zymomonas mobilis* That Is Responsible for Sorbitol Production** Journal of Bacteriology, v. 167, n. 3, p. 863-869, 1986. Disponível em: <http://jb.asm.org/content/167/3/863.short>.

ZHANG, J. *et al.* **Fabrication of lactobionic-loaded chitosan microcapsules as potential drug carriers targeting the liver.** Acta Biomaterialia, v. 7, p. 1665–1673, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706110005490>.

ZHAO, Q. *et al.* **Self-Assembled Virus-Like Particles from Rotavirus Structural Protein VP6 for Targeted Drug Delivery.** Bioconjugate Chem., v. 22, p. 346-352, 2011. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc1002532>.