



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**SÍNTESE E RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO E
SORBITOL OBTIDOS VIA AÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO
DE *Zymomonas mobilis***

Caroline Ribeiro Corrêa

CAXIAS DO SUL

2025

Caroline Ribeiro Corrêa

SÍNTESE E RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO E
SORBITOL OBTIDOS VIA AÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO
DE *Zymomonas mobilis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eloane Malvessi

CAXIAS DO SUL

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

C824s Corrêa, Caroline Ribeiro

Síntese e recuperação de ácido xilônico e sorbitol obtidos via ação do sistema enzimático de *Zymomonas mobilis* [recurso eletrônico] / Caroline Ribeiro Corrêa. – 2025.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

Orientação: Eloane Malvessi.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. *Zymomonas mobilis*. 2. Sorbitol. 3. Xilose. 4. Ácidos orgânicos. I. Malvessi, Eloane, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 579.84

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

Caroline Ribeiro Corrêa

**SÍNTESE E RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO E SORBITOL OBTIDOS VIA
AÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE *Zymomonas mobilis***

Dissertação apresentada à Universidade de Caxias do Sul – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia aplicada à Agroindústria.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Eloane Malvessi.

Aprovado em 16/05/2025.

Banca Examinadora

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Eloane Malvessi (UCS)

Avaliadora:

Prof.^a Dr.^a Eunice Valduga (URI)

Avaliador:

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger (UNIVILLE)

Avaliador:

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva (UCS)

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento que financiaram a execução deste trabalho – CNPq, FAPERGS e, em especial, a CAPES pela concessão da bolsa taxa.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Laboratório de Bioprocessos, por disponibilizar a estrutura física e recursos para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, prof^a. Dr^a. Eloane Malvessi por todos os incentivos, ensinamentos e toda a confiança depositada.

À Dra. Sabrina Carra pelos ensinamentos, dedicação, paciência, auxílio e por todo apoio, que foi essencial, durante a execução deste trabalho.

Às colegas de laboratório Msc. Larissa Finazzi e Júlia Dick por toda amizade, apoio, auxílio e companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica Camila Klein, Vanderson de Lima, João Vítor Barbosa, Marina Webber, Larissa Machado, Ricardo Baccin, Virginia Tamiosso e Stefanie Barbosa que com muito esforço e dedicação, ajudaram na construção deste trabalho.

À minha família e amigos por sempre me apoiarem, pela paciência, incentivo, amizade e amor.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ASPECTOS GERAIS DE <i>Zymomonas mobilis</i>	3
2.2 COMPLEXO ENZIMÁTICO GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE (GFOR)/GLICONO- δ -LACTONASE (GL) DE <i>Zymomonas mobilis</i>	5
2.3 IMOBILIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES E BIOCONVERSÃO	8
2.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO E SORBITOL	10
2.5 CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DE ÁCIDO XILÔNICO E SORBITOL	14
2.6 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIOCONVERSÃO	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 MICRORGANISMO	19
3.2 MEIO DE CULTIVO	19
3.3 PRODUÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS	20
3.4 IMOBILIZAÇÃO CELULAR.....	21
3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE E GLICONO- δ - LACTONASE.....	21
3.6 ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO	22
3.7 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIOCONVERSÃO	24
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS	24
3.8.1 Determinação da concentração celular	24
3.8.2 Determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidorredutase e glicono-δ-lactonase	25
3.8.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten	26
3.8.4 Estimativa da concentração de substratos e produtos da bioconversão	26
3.9 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIOCONVERSÃO	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

4.1	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS EM CULTIVO DE <i>Zymomonas mobilis</i>	30
4.2	CINÉTICA DE GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE (GFOR) E GLICONO- δ -LACTONASE (GL).....	30
4.3	CINÉTICA DO COMPLEXO ENZIMÁTICO GFOR/GL FRENTE A pH E TEMPERATURA.....	34
4.4	ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO COM CÉLULAS/ENZIMAS LIVRES E IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO.....	37
4.4.1	Ensaio de bioconversão com células/enzimas livres	37
4.4.2	Ensaio de bioconversão com células/enzimas immobilizadas em alginato de cálcio	42
4.5	REUTILIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR IMOBILIZADO EM ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO	51
4.6	RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIOCONVERSÃO	53
5	CONCLUSÕES	57
6	PERSPECTIVAS	59
7	REFERÊNCIAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido D-xilônico.	14
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do D-sorbitol.....	16
Tabela 3 - Composição do meio de cultivo líquido utilizado nas etapas de ativação, inóculo e produção de enzimas.	20
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos aparentes $K_M(\text{Xilose})$, $K_M(\text{Frutose})$ e V_{Max} obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i> com xilose e frutose como substratos.	33
Tabela 5 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes temperaturas (xilose/frutose inicial, 700 mol/L; pH 6,4)..	38
Tabela 6 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39 °C).	41
Tabela 7 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em diferentes valores de temperatura (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; pH 6,4).....	43
Tabela 8 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em alginato de cálcio, em diferentes valores de pH (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39 °C).....	46
Tabela 9 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando hidróxido de cálcio (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39 °C, pH 6,4).....	48
Tabela 10 - Resultados comparativos de concentração, rendimento e produtividade em ácido xilônico obtido por diferentes microrganismos.	50
Tabela 11 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células de <i>Zymomonas mobilis</i> em sucessivos ciclos de bioconversão de 24 horas (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39 °C, pH 6,4).....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos morfológicos de <i>Zymomonas mobilis</i>	3
Figura 2 - Conversão de glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, via ação catalítica de glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de <i>Zymomonas mobilis</i>	6
Figura 3 - Esquema das reações de obtenção de ácidos orgânicos via complexo enzimático glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de <i>Zymomonas mobilis</i> . ..	7
Figura 4 - Estrutura molecular do ácido D-xilônico.	14
Figura 5 - Estrutura molecular do D-sorbitol.	15
Figura 6 - Esquema representativo do processo de bioprodução de ácido xilônico e sorbitol.	19
Figura 7 – Aparato experimental de bioconversão com controle de pH via hidróxido de sódio.	22
Figura 8 - Aparato experimental de bioconversão com controle de pH via hidróxido de cálcio.	23
Figura 9 - Atividade enzimática do complexo GFOR/GL utilizando-se diferentes concentrações de células de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191. Solução equimolar de xilose/frutose 700 mmol/L, a 39°C e pH 6,4.	30
Figura 10 - Variação na atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células de <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191, com diferentes concentrações de substratos, a 39°C e pH 6,4. [A] 0,70 mol/L frutose + xilose (0,05 a 0,70 mol/L); [B] xilose 0,70 mol/L + frutose (0,03 a 0,70 mol/L).	32
Figura 11 - Influência do pH na atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> , em solução equimolar de xilose/frutose 700 mmol/L, a 39 °C.	35
Figura 12 - Influência da temperatura na atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> , em solução equimolar de xilose/frutose 700 mmol/L, e pH 6,4.	36
Figura 13 – Cinética da formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes temperaturas, com células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, pH 6,4). (■) 39 °C; (●) 43 °C; (▲) 47 °C.	38
Figura 14 – Cinética da formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes valores de pH, com células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, 39 °C). (■) pH 6,4; (●) pH 6,8; (▲) pH 7,2.	39

Figura 15 – Cinética da formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes temperaturas, com células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em alginato de cálcio (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, pH 6,4). (■) 39 °C; (●) 43 °C; (▲) 47 °C.	42
Figura 16 – Cinética de formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes valores de pH com células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, 39 °C). (■) pH 6,4; (●) pH 6,8; (▲) pH 7,2.	45
Figura 17 – Cinética de formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão visando a formação do sal de cálcio, com células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, 39 °C, pH 6,4).....	47
Figura 18 – Cinética de formação de ácido xilônico em função do tempo, em sucessivas bateladas de ensaios de bioconversão com células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i> (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, 39 °C, pH 6,4).	51
Figura 19 – Aspecto visual do ensaio de precipitação de amostra resultante do processo de bioprodução de xilonato de sódio com o uso de acetona.	54
Figura 20 – Aspecto visual da precipitação utilizando etanol 70% (v/v) em amostras resultantes do processo de bioprodução de xilonato de cálcio (A) e xilonato de sódio (B).....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diagrama qualitativo da precipitação dos produtos de bioconversão empregando-se células/enzimas de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, em solução contendo 700 mmol de xilose/frutose, a 39°C e pH 6,4, utilizando hidróxido de sódio, frente a diferentes compostos orgânicos. Identificação como (+) para presença de precipitação e (-) para ausência de precipitação..... 54

Quadro 2 – Diagrama qualitativo da precipitação dos produtos de bioconversão empregando-se células/enzimas de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, em solução contendo 700 mmol de xilose/frutose, a 39 °C e pH 6,4, utilizando hidróxido de cálcio, frente a diferentes compostos orgânicos. Identificação como (+) para presença de precipitação e (-) para ausência de precipitação. 55

RESUMO

O ácido xilônico caracteriza-se por ser um ácido polihidroxiado derivado da xilose, proveniente da hemicelulose. O ácido xilônico e seus sais (xilonatos) tem se destacado pelas distintas aplicações, envolvendo a área de alimentos, farmacêutica, e química em geral. Este ácido orgânico é obtido em associação com sorbitol via ação do complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL), de células de *Zymomonas mobilis*. Neste estudo foi avaliado o perfil de produção e posterior recuperação de ácido xilônico e seus sais – xilonato de sódio e xilonato de cálcio, a partir de xilose purificada, frente à concentração de células/enzimas (0,05 a 0,5 g/L), concentração de substratos (0,03 a 0,7 mol/L), pH (5,8 a 7,6) e temperatura (34 a 53 °C), utilizando biocatalisador livre ou imobilizado em alginato de cálcio. Considerando a atividade enzimática frente ao pH e temperatura com células livres e com o uso de xilose e frutose, os melhores resultados foram obtidos entre pH 6,4 a 7,2 e 39 a 47 °C, respectivamente. Na bioconversão com células livres, o melhor resultado em relação ao rendimento, de 90,13% foi atingido a 39 °C e pH 6,4, com a produção de 578,81 mmol/L de ácido xilônico. Na bioconversão com células imobilizadas, 566,99 mmol/L foi obtido em processo conduzido em pH 6,4 e 39 °C, com rendimento em produto de 87%. No entanto, superior produção com o sistema imobilizado a 43 °C e pH 6,4 foi alcançado produção de 572,90 mmol/L do ácido xilônico. Tratando-se de bioprodução de xilonato de cálcio, a concentração de 678,82 mmol/L foi atingida, com rendimento de 96,97%. No processo de recuperação, os melhores resultados foram obtidos com a utilização de etanol (70% v/v) a 22 ± 2 °C, embora seja necessário o aprimoramento do processo de separação e purificação. Esses resultados indicam que, considerando a versatilidade de ação do sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* frente aos substratos xilose e frutose e dentro de condições específicas de processo, obteve-se a maximização da produção de ácido xilônico e sais de xilonato.

ABSTRACT

Xylonic acid is characterized by being a polyhydroxylated acid derived from xylose, which comes from hemicellulose. Xylonic acid and its salts (xylonates) have stood out for their distinct applications in the food, pharmaceutical and chemical fields in general. This organic acid is obtained in association with sorbitol via the action of the enzyme complex glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glycono- δ -lactonase (GL), from *Zymomonas mobilis* cells. This study evaluated the production profile and subsequent recovery of xylonic acid and its salts - sodium xylonate and calcium xylonate - from purified xylose, in relation to cell/enzyme concentration (0.05 to 0.5 g/L), substrate concentration (0.03 to 0.7 mol/L), pH (5.8 to 7.6) and temperature (34 to 53 °C), using a free biocatalyst or one immobilized in calcium alginate. Considering the enzymatic activity in relation to pH and temperature with free cells and with the use of xylose and fructose, the best results were obtained between pH 6.4 and 7.2 and 39 and 47 °C, respectively. In the bioconversion with free cells, the best result in terms of yield, 90.13%, was achieved at 39 °C and pH 6.4, with the production of 578.81 mmol/L of xylonic acid. In the bioconversion with immobilized cells, 566.99 mmol/L of xylonic acid was obtained in a process carried out at pH 6.4 and 39 °C, with a product yield of 87%. However, superior production with the system immobilized at 43 °C and pH 6.4 was achieved with a yield of 572.90 mmol/L of xylonic acid. In the case of calcium xylonate bioproduction, 678.82 mmol/L was achieved and with a yield of 96.97%. For the recovery process, the best results were obtained using ethanol (70% v/v) at 22 ± 2 °C, although the separation and purification process needs to be improved. These results indicate that, considering the versatility of action of the GFOR/GL enzyme system of *Z. mobilis* against the substrates xylose and fructose and within specific process conditions, the production of xylonic acid and xylonate salts was maximized.

1 INTRODUÇÃO

A produção de uma gama de compostos, como o ácido xilônico, por processos biotecnológicos tem despertado um crescente interesse nas últimas décadas, pois muitos avanços têm sido alcançados nesta área. Este interesse pode ser justificado pelas condições de operação mais brandas empregadas na biossíntese, caracterizado pelo reduzido consumo de energia e aumento da segurança do processo, pela alta especificidade das enzimas, que, em particular, minimiza a formação de subprodutos e, finalmente, pelo menor impacto ambiental.

O ácido xilônico é um ácido orgânico polihidroxilado, contendo diversos grupos hidroxila em sua estrutura, sendo derivado da xilose, um monossacarídeo proveniente da hemicelulose. Este composto tem atraído interesse devido à potencialidade de aplicações, abrangendo áreas como a indústria alimentícia, farmacêutica, construção civil e química, destacando-se por suas propriedades funcionais e potencial de inovação em diferentes contextos tecnológicos e industriais.

Este composto pode ser obtido por síntese química, entretanto, na bioprodução por rota biotecnológica, é relatado o uso de processos fermentativos baseados em cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas* sp, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* e *Acetobacter* sp. Porém, em se tratando de maior rendimento em produto, em função da metabolização de xilose, praticamente todos os microrganismos citados são modificados geneticamente. Além dos processos fermentativos, rotas enzimáticas podem ser empregadas com o mesmo intuito. Em particular, *Zymomonas mobilis*, bactéria anaeróbia, não patogênica, tem despertado interesse tecnológico em função da capacidade de obtenção de etanol e gás carbônico a partir do catabolismo de açúcares como glicose, sacarose e frutose. Além dos metabólitos primários, também são obtidas as enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL). Este complexo enzimático GFOR/GL atua na oxidação de diferentes aldoses em seus respectivos ácidos orgânicos e na redução de frutose a sorbitol. Ressalta-se como mais uma vantagem do uso de GFOR/GL, diferentemente de processos fermentativos, a formação de dois produtos de forma concomitante em função da reação enzimática de oxidorredução.

Desde 2007, a UCS é detentora de uma patente no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) Carta Patente nº PI 0700421-4, para o processo de produção biotecnológica de ácidos orgânicos por *Z. mobilis*. O tema da proposta está relacionado à avaliação do processo de bioprodução de ácidos orgânicos, seus sais e sorbitol. Em estudos

anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprocessos, foram abordadas a produção dos ácidos lactobiônico e maltobiônico e seus sais de lactobionato e maltobionato, respectivamente, assim como informações importantes em termos de recuperação, purificação e caracterização físico-química destes compostos, os quais têm aplicações voltadas para as áreas química, farmacêutica, cosmética e de alimentos.

Tendo em vista a constante busca por produtos inovadores no mercado, este estudo tem o foco de ampliar a gama de compostos que podem ser obtidos a partir da ação do complexo GFOR/GL de *Z. mobilis* frente aos diferentes substratos. Aliado à escassez de estudos de bioprodução de ácido xilônico, buscou-se a definição das condições de obtenção de ácido xilônico e/ou xilonato de sódio e de cálcio – formas salinas – concomitante à síntese de sorbitol com a utilização de células/enzimas livres e imobilizadas, e sua posterior recuperação com a utilização de solventes orgânicos.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ação catalítica do complexo enzimático GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* para a obtenção de ácido xilônico e sais (xilonatos) a partir de xilose e frutose e posterior recuperação destes produtos.

Como objetivos específicos propostos citam-se:

- a) avaliar os parâmetros cinéticos K_M e $V_{Máx}$ da equação de Michaelis-Menten do complexo enzimático GFOR/GL, presente em células livres de *Z. mobilis*;
- b) identificar os efeitos de variáveis como pH e temperatura sobre a formação de produtos de bioconversão com células livres e imobilizadas em alginato de cálcio;
- c) determinar a estabilidade da ação do complexo enzimático GFOR/GL presente em células imobilizadas em alginato de cálcio, em bateladas repetidas de ensaios de bioconversão;
- d) investigar o efeito do uso de solventes orgânicos e da temperatura na recuperação dos sais do ácido xilônico.

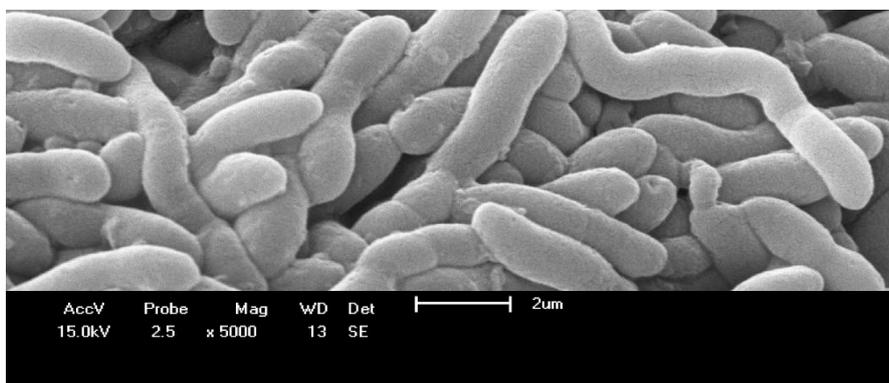
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente referencial bibliográfico aborda os principais fundamentos científicos e tecnológicos relacionados ao uso da bactéria *Zymomonas mobilis* como plataforma biotecnológica para a produção de compostos de interesse industrial. Inicialmente, são explorados os aspectos gerais de *Z. mobilis*, com ênfase em suas características fisiológicas e metabólicas que a tornam promissora para processos fermentativos. Em seguida, destaca-se o complexo enzimático glicose-frutose oxidoredutase (GFOR)/glicono- δ -lactonase (GL), presente nessa espécie, responsável por bioconversões específicas que resultam na produção de compostos como o ácido xilônico e o sorbitol. No texto também são discutidas as estratégias de imobilização de biocatalisadores visando à estabilidade e reutilização das enzimas, e sua aplicação na bioconversão de substratos diversos. Na sequência, são abordadas as rotas bioquímicas envolvidas na síntese de ácido xilônico e sorbitol, bem como as propriedades físico-químicas, aplicações industriais e potencial de mercado desses produtos. Por fim, são apresentadas as metodologias empregadas para a recuperação e purificação dos produtos da bioconversão, etapa essencial para viabilizar sua aplicação em escala comercial.

2.1 ASPECTOS GERAIS DE *Zymomonas mobilis*

Z. mobilis é uma bactéria anaeróbia, gram-negativa, não patogênica para seres humanos e não esporulada, apresentando-se em forma de bastonete com a cauda redonda ou oval, de forma isolada, em pares ou em cadeia (Figura 1). Originalmente este microrganismo foi denominado como *Thermobacterium mobile*, sendo renomeado para *Zymomonas mobilis* devido a sua forte motilidade (WANG *et al.*, 2018).

Figura 1 - Aspectos morfológicos de *Zymomonas mobilis*.



Fonte: Autora (2025).

A faixa de temperatura de crescimento de *Z. mobilis* é de 30 a 37 °C, sendo que se for exposta a 60 °C por mais de 5 minutos ocorrerá sua inativação. Esta bactéria é caracterizada pela tolerância a meios ácidos, de modo que o pH ideal para seu metabolismo varia de 3,5 a 7,5 e apresenta alta tolerância ao etanol, em torno de 16% (v/v) (SWINGS & DE LEY, 1977; DOELLE *et al.*, 1993).

Z. mobilis reproduz-se por divisão binária simples, ou seja, sua célula divide-se ao meio após atingir tamanho específico. Possui dimensões que variam de 1,0 a 1,4 µm de diâmetro e 1,0 a 6,0 µm de largura. Bactérias do gênero *Zymomonas* podem ser encontradas no meio ambiente, em áreas tropicais da Ásia, América e África, em associação com plantas que possuem alto teor de açúcares nas seivas (SWINGS & DE LEY, 1977; LIMA *et al.*, 1972; VIIKARI, 1986).

Z. mobilis foi isolada pela primeira vez em 1911, por Parker e Hiller, de cidra deteriorada. Após, foi possível sua obtenção de bebidas alcoólicas como o pulque mexicano e o vinho de palma africano, tal bactéria, também foi identificada como um contaminante de cerveja na Europa (VIIKARI, 1986; SWINGS & DE LEY, 1977). A bactéria desenvolve-se preferencialmente em anaerobiose, porém é capaz de tolerar presença de oxigênio. Tem despertado interesse tecnológico, pela sua capacidade de produzir etanol, utilizando-se como fontes de carbono, glicose, frutose e sacarose, substratos metabolizados pela via de Entner-Doudoroff (DOELLE *et al.*, 1993). Possui elevada taxa metabólica de glicose e notável capacidade de produção de etanol durante a fermentação, podendo-se chegar a 98% em rendimento teórico, isso devido à expressiva atividade da enzima álcool desidrogenase e da piruvato descarboxilase em sua via metabólica (ZHANG *et al.*, 2009).

No processo de fermentação, *Z. mobilis* é capaz de converter glicose, frutose e sacarose em produtos, como sorbitol e oligossacarídeos, sendo capaz de tolerar presença de açúcar e etanol (VIIKARI, 1986; SPRENGER, 1996). Como resultado da indução por glicose, é formado, também, o complexo enzimático periplasmático glicose-frutose oxidorreductase/glicono-δ-lactonase (GFOR/GL) (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

Z. mobilis é uma bactéria diferenciada no mundo microbiano, com produção de energia (ATP), crescimento e resposta às condições de cultura peculiares, despertando um elevado interesse tecnológico, científico e industrial. Segundo Doelle *et al.* (1993), a habilidade desse microrganismo em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder à manipulação física e química do ambiente, assim como sua limitada formação de produtos, demonstram a importância deste microrganismo no desenvolvimento de processos biotecnológicos.

Segundo Bourdichon *et al.* (2012a) e Bourdichon *et al.* (2012b), *Z. mobilis* é reconhecida pelo Food and Drug Administration (FDA) como um aditivo seguro (GRAS), sendo também certificada pelo International Dairy Federation, em 2012, como um microrganismo seguro para ser utilizado em aditivos alimentares. Estas características, aliadas à formação do complexo GFOR/GL durante o crescimento celular, refletem, também, o grande interesse na utilização desse microrganismo em reações de bioconversão para a obtenção de compostos com alto valor agregado e de uma forma sustentável (HE *et al.*, 2014).

2.2 COMPLEXO ENZIMÁTICO GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE (GFOR)/GLICONO- δ -LACTONASE (GL) DE *Zymomonas mobilis*

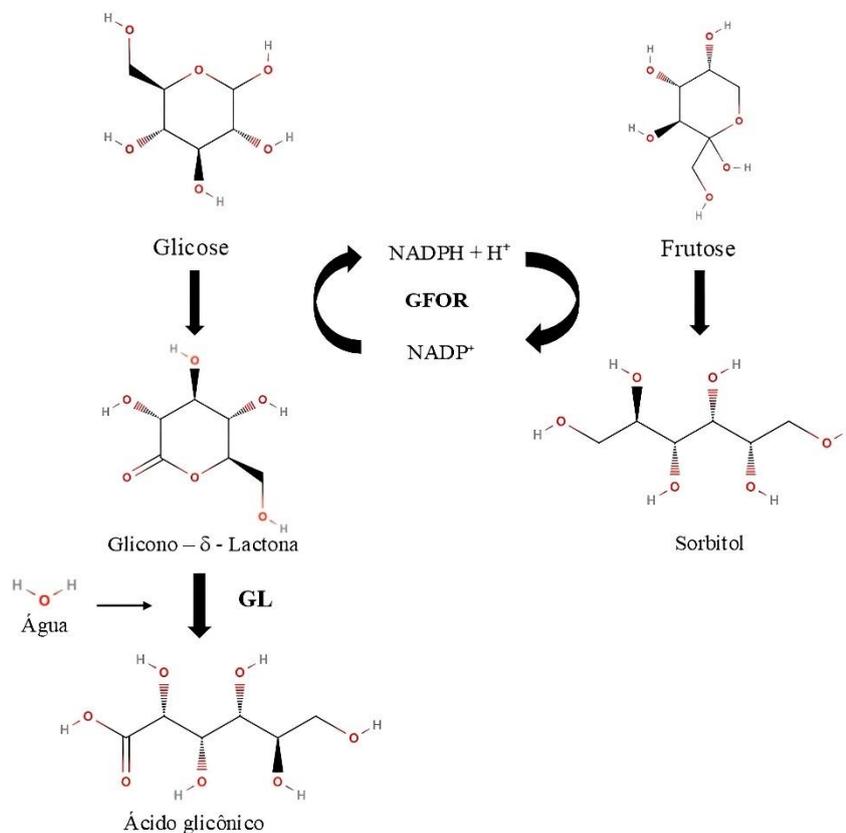
Viikari (1984) foi o primeiro pesquisador a verificar a presença de ácido glicônico e sorbitol quando sacarose ou uma mistura de glicose e frutose eram utilizadas como substratos no processo fermentativo de *Z. mobilis*. Porém, a descrição do mecanismo bioquímico para a obtenção destes compostos foi descrita posteriormente por Zachariou e Scopes (1986).

Zachariou e Scopes (1986) descreveram inicialmente o mecanismo de oxidorredução do sistema enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, destacando o par glicose/frutose como substratos preferenciais na reação. Por meio da enzima GFOR, ocorre a oxidação da glicose em glicono- δ -lactona, com a redução da coenzima NADP. De forma simultânea, ocorre a redução da frutose em sorbitol, com a reoxidação da coenzima. Posteriormente, a GL hidrolisa a glicono- δ -lactona ao seu sal correspondente. A estrutura de GFOR comporta o cofator NADP ligado fortemente à estrutura proteica da enzima, de forma a torná-la ativa independente da condição vital da célula e da improvável dissociação. Desta forma, para a ação de GFOR/GL frente ao substrato não é necessário que as células de *Z. mobilis* estejam viáveis (HARDMAN e SCOPES, 1988; FERNANDES *et al.*, 2010; PEDRUZZI *et al.*, 2011).

As reações da coenzima NADP ocorrem pelo mecanismo de oxidorredução, em que é necessário que um substrato se oxide para que outro possa se reduzir, de forma a manter o ciclo da coenzima ativo, formando quantidades equimolares dos produtos formados na reação (ZACHARIOU e SCOPES, 1986; HARDMAN e SCOPES, 1988; SATORY *et al.*, 1997).

Diversos autores concluíram que o mecanismo “ping-pong”, assim denominado por Zachariou e Scopes (1986), é adequado para descrever o processo de oxidação e redução do par glicose/frutose pelo complexo enzimático GFOR/GL purificado. Este mecanismo de ação pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Conversão de glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, via ação catalítica de glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*.



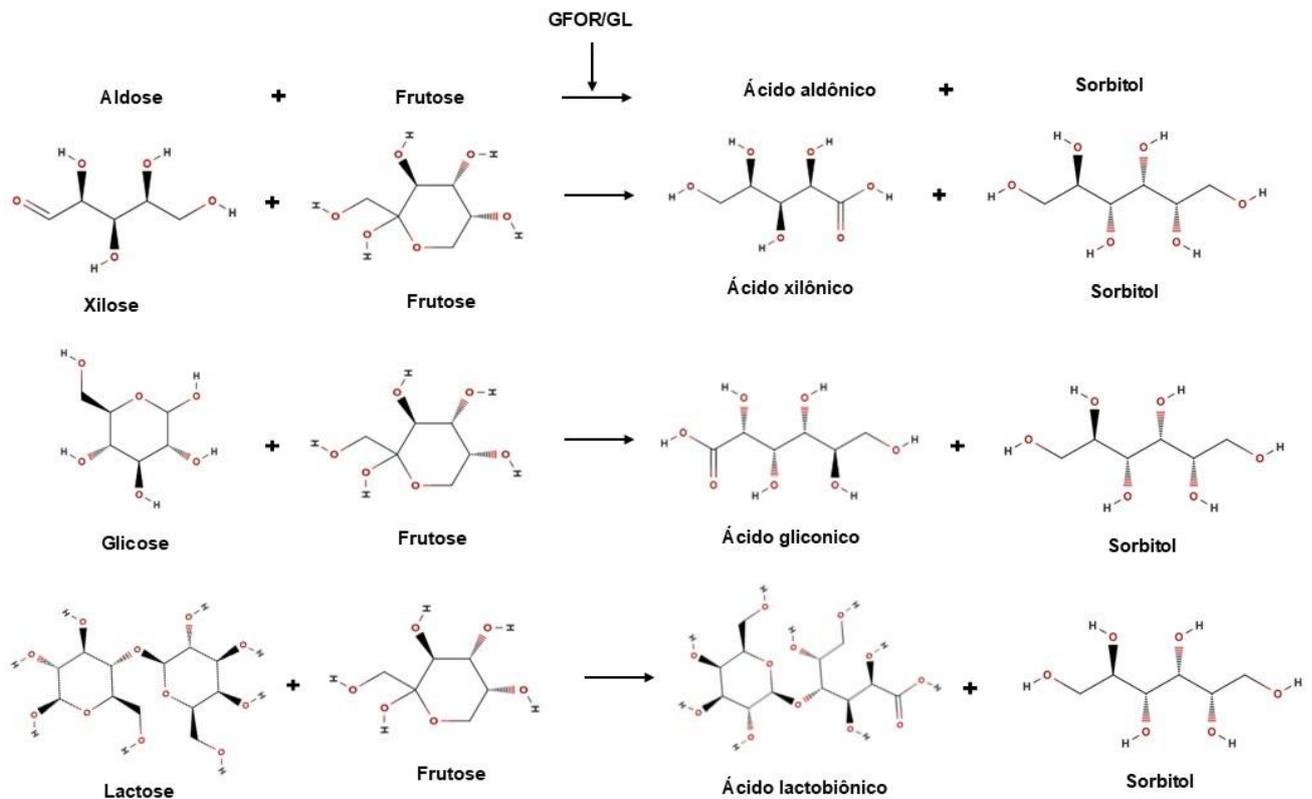
Fonte: Adaptado de Zachariou e Scopes (1986).

Zachariou e Scopes (1986) e Satory *et al.* (1997) mostraram que o complexo enzimático GFOR/GL tem a capacidade de oxidar, além da glicose, outras aldoses (xilose, galactose, arabinose, manose, maltose, celobiose e lactose), na presença de frutose, levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos. Além da formação do ácido aldônico, ocorre a formação, equimolar, de sorbitol, resultante da redução da frutose (MALVESSI, 2008; CARRA 2012; MALVESSI *et al.*, 2013; GARIN, 2016; DELAGUSTIN *et al.*, 2017, FLORES, 2019; CARRA *et al.*, 2020).

A ação do complexo enzimático GFOR/GL frente aos diferentes tipos de aldoses tem sido mais direcionada objetivando a síntese de compostos de maior interesse industrial, como os ácidos orgânicos glicônico, lactobiônico, galactônico, maltobiônico e sorbitol. Cita-se como vantagem de sua produção as inúmeras aplicações podendo ser utilizados em produtos

antienvhecimento, devido as suas propriedades antioxidantes (ácidos glicônico, lactobiônico e maltobiônico), na preservação de órgãos para transplante (ácido lactobiônico), como adoçante (sorbitol), e em produtos para melhoramento da pele (ácido maltobiônico) (MALVESSI, 2008; CARRA, 2012; MALVESSI *et al.*, 2013; GARIN, 2016; DELAGUSTIN *et al.*, 2017; FLORES, 2019). A reação de produção de distintos ácidos biônicos e sorbitol via complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema das reações de obtenção de ácidos orgânicos via complexo enzimático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de *Zymomonas mobilis*.



Fonte: Adaptado de He *et al.* (2014).

Hardman e Scopes (1988) investigaram a cinética de ação da GFOR e observaram que o processo catalítico se divide em duas meias reações, nas quais a glicose reduz o NADP⁺ e o NADPH é oxidado pela frutose de forma alternada, seguido pela hidrólise da glicono- δ -lactona, catalisada pela glicono- δ -lactonase. Essas reações possuem a velocidade da formação do produto cerca de 250 vezes maior do que na reação reversa.

O modelo matemático de Michaelis-Menten (Equação 1) é considerado adequado para representar graficamente a velocidade reacional em função da concentração de substrato, em

avaliações nas quais a concentração de um dos substratos é mantida constante, variando-se a concentração do outro substrato (ZACHARIOU & SCOPES, 1986; HARDMAN & SCOPES, 1988; SATORY *et al.*, 1997).

$$V = \frac{V_{\text{Max}}}{1 + \frac{K_{M(A)}}{[A]} + \frac{K_{M(B)}}{[B]}} \quad (1)$$

Na equação 1, V é a velocidade inicial; V_{Max} é a velocidade máxima, $K_{M(A)}$ é a constante de Michaelis-Menten para o substrato A, $K_{M(B)}$ é a constante de Michaelis-Menten para o substrato B. Além da concentração de substratos, a formação dos produtos na reação de bioconversão depende diretamente dos títulos em GFOR/GL presente nas células de *Z. mobilis* e dos parâmetros operacionais, como pH, concentração de enzimas e temperatura, proporcionando um maior aproveitamento do biocatalisador (MALVESSI *et al.*, 2013).

Em suma, os ácidos biônicos vêm conquistando relevância na indústria em virtude de suas propriedades específicas e de suas múltiplas aplicações. Esses compostos apresentam uma ampla gama de benefícios e estão inseridos em diversos segmentos industriais, tais como os setores cosmético, farmacêutico, alimentício e químico. Diante desse cenário, ressalta-se a importância da bioprodução desses ácidos, especialmente por meio da ação do complexo enzimático GFOR/GL, que se mostra promissor para processos sustentáveis e eficientes.

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES E BIOCONVERSÃO

A produção de ácidos aldônicos por meio do complexo enzimático GFOR/GL pode ser realizada por processos de bioconversão que empregam células/enzimas livres, bem como por enzimas imobilizadas, utilizando estratégias de confinamento enzimático.

Kourkoutas *et al.* (2004) citam que a imobilização de biocatalisadores está relacionada com o confinamento de enzimas e células ligadas a uma matriz, de forma que a sua atividade catalítica esteja preservada e que possam ser utilizadas contínua e repetidamente. O uso de enzimas imobilizadas em bioprocessos é uma abordagem cada vez mais utilizada, no qual as vantagens possuem relação com a eliminação de ciclos externos, a possibilidade de utilização de altas concentrações celulares no reator, maior facilidade no controle do processo, maiores

fatores de conversão de substrato em produto e maior uniformidade do produto (ZANIN & MORAES, 2004; VUJCIC *et al.*, 2011).

Por outro lado, a ligação da enzima a um suporte acarreta a diminuição da mobilidade, resultando na diminuição da acessibilidade ao substrato, ou seja, resulta em uma redução da atividade da enzima através da limitação do acesso do substrato ao sítio ativo enzimático. Estas limitações citadas afetam a cinética da reação, ocasionando na redução da velocidade, podendo também, provocar alterações no pH (ZANIN & MORAES, 2004).

Conforme citado por Cowan & Fernandez-Lafuente (2011), o processo de imobilização aumenta a estabilidade catalítica das enzimas, favorecendo a sua reutilização em múltiplos ciclos reacionais e proporcionando maior eficiência em processos industriais, além de permitir o controle mais eficaz das condições de reação.

Sassolas *et al.* (2012) descrevem que a imobilização por encapsulamento em gel se baseia na retenção da enzima em uma matriz polimérica, onde o único meio de ocorrer a transferência de massa é por difusão. Porém, dependendo do tamanho dos poros, o substrato não chega ao interior da esfera, fazendo com que apenas as enzimas presentes na superfície exerçam a sua atividade catalítica. Os autores citam que essas características indesejáveis do sistema, podem ser minimizadas aumentando os poros ou diminuindo o diâmetro das esferas.

Em relação à cultura de *Z. mobilis*, para a imobilização do complexo enzimático GFOR/GL por encapsulamento, é relatado o emprego de suportes como alginato de cálcio, k-carragena, esferas magnéticas de quitosana ou, ainda, de diferentes polímeros, como poliuretano (MALVESSI *et al.*, 2013; FERRAZ *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2022).

Rehr *et al.* (1991) compararam o uso de células de *Z. mobilis* imobilizadas em k-carragena e células não imobilizadas, no qual os resultados obtidos para as velocidades máximas específicas para a produção de sorbitol e ácido glicônico foram de 1,8 e 2,1 g/g/h para as células livres e de 1,4 e 1,8 g/g/h para as células imobilizadas. Os autores concluíram que os valores inferiores de velocidade para as células imobilizadas se deram em função de problemas difusionais e pela inativação das enzimas durante a sua imobilização.

Malvessi *et al.* (2013) realizaram um estudo para a produção de ácido lactobiônico e sorbitol a partir de lactose e frutose, neste contexto, realizaram ensaios de atividade enzimática comparando células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio. Os resultados indicaram uma redução da atividade enzimática para o sistema imobilizado, o qual foi em média seis vezes inferior ao obtido para células livres com a mesma concentração de substrato.

Souza *et al.* (2022) realizaram estudos de bioprodução de ácido maltobiônico com a utilização de células livres e células imobilizadas de *Z. mobilis* em poliuretano. Os autores

relataram uma concentração máxima de produção de maltobionato de sódio de 647,63 mmol/L para as células livres e 648,61 mmol/L para as células imobilizadas em poliuretano. Apesar dos resultados de produção máxima não possuírem diferença significativa entre as células utilizadas, o mesmo não ocorreu em relação à atividade enzimática, com a obtenção de 13,49 U/g quando usadas células livres e 8,70 U/g para células imobilizadas.

Malvessi *et al.* (2010) relatam a estabilidade do sistema enzimático ao ser utilizado em operações a longo prazo, com a utilização de células imobilizadas em alginato de cálcio. Porém, os autores salientam a influência da barreira difusional associada ao suporte, acarretando a formação de ambiente inadequado para a ação das enzimas. Pedruzzi *et al.* (2011) conduziram um estudo visando avaliar a resistência difusional resultante do uso de suporte em células de *Z. mobilis*, concluindo que a utilização de alginato de cálcio (4% m/v) não gerou efeitos significativos de resistência difusional.

O sucesso da utilização de técnicas de imobilização mostra que as vantagens desse processo superam as suas limitações. Porém, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a perda de atividade durante o processo de imobilização, a instabilidade do biocatalisador, e a difusão de substratos. Esses efeitos podem ser minimizados e até mesmo evitados pela escolha do suporte, pelas condições de operação do biorreator e pelo método de imobilização. (ZANIN & MORAIS, 2004; MAGHRABY *et al.*, 2023).

2.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO E SORBITOL

Vários ácidos orgânicos são obtidos de reações e/ou derivados de açúcares, como é o caso de ácidos aldônicos. Os ácidos aldônicos são obtidos como resultado da oxidação do grupamento aldeído terminal de uma aldose a ácido carboxílico, como é o caso de ácido xilônico (METHIÖ *et al.*, 2016).

Hustede *et al.* (1985) elucidam que diversos mecanismos podem ser utilizados para a produção de ácidos orgânicos, entre os quais podem-se citar os processos químicos, catalíticos, eletrolíticos ou biológicos. Tratando-se de mecanismos químicos, catalíticos e eletrolíticos, algumas desvantagens podem ser citadas, entre elas, a formação de outros produtos, muitas vezes indesejáveis, onerosas etapas de purificação e, normalmente, estes processos acarretam em problemas ambientais (HANDOJO *et al.*, 2019).

É inerente as dificuldades relacionadas às condições mais drásticas de processo, geralmente, temperatura e pressões extremas de reação, em torno de 80 °C e 80 bar,

respectivamente, o que acaba impactando no custo de produção e no tratamento dos produtos, além de problemas ambientais devido ao descarte dos agentes catalisadores químicos, no qual pode-se citar a utilização de Níquel dopado com Molibdênio (JOKIC *et al.*, 1991; LI *et al.*, 2007).

Em contrapartida, a utilização de processos biotecnológicos apresenta vantagens em relação a outras rotas de produção, principalmente, no que diz respeito a preservação ambiental, uma vez que, os bioprocessos são conduzidos em regimes operacionais amenos e com reduzida formação de subprodutos, o que facilita a separação dos mesmos, bem como, minimiza os impactos ambientais relacionados ao processo (BORZANI *et al.*, 2019).

Conforme Toivari *et al.* (2012b) o departamento de energia dos Estados Unidos (DOE) considera o ácido xilônico como um dos 30 produtos químicos de alto valor agregado mais promissores a serem obtidos a partir de biomassa renovável.

De modo geral, microrganismos são capazes de metabolizar a xilose por três principais rotas: via da xilose isomerase, via oxidativa da xilose e via oxidorreductora (FRANÇOIS *et al.*, 2020). Além destas principais vias, existem estudos que viabilizam a produção de ácido xilônico com a utilização de cepas recombinantes capazes de metabolizar a xilose (BAÑARES *et al.*, 2021).

A maior parte dos relatos na literatura sobre produção de ácido xilônico fazem uso da fração hemicelulósica da biomassa vegetal como substrato. Hemicelulose, que constitui a biomassa lignocelulósica junto com celulose e lignina, é um heteropolímero de estrutura amorfa, composta por pentoses como: D-xilose, L-ramnose e L-arabinose; hexoses: D-glucose, D-manose, D-galactose; e ácidos: ácido 4-O-metil-D-glucurônico e galacturônico (DRABER, 2013).

Zhang *et al.* (2017) estudaram a produção de ácido xilônico a partir do fermentado celulósico de etanol. Para isso, inicialmente foi obtido o caldo fermentado por *S. cerevisiae*, utilizando palha seca de milho (celulose, hemicelulose e lignina) como substrato, obtendo-se concentração de 59,80 g/L de etanol. Posteriormente, o fermentado foi destilado para a separação do etanol e de xilose, de modo a xilose ficar contida na vinhaça de destilação. O ácido xilônico foi, então, obtido pela oxidação da xilose pela ação do microrganismo *Gluconobacter oxydans*, sendo obtida concentração na ordem de 66,4 g/L, com total conversão da xilose a ácido xilônico.

Nas reações em que são empregados agentes biológicos, como culturas microbianas, ocorre a oxidação da xilose em xilonolactona pela ação da enzima glicose oxidase ou da enzima

xilose desidrogenase (XDH). A xilonolactona é hidrolisada pela ação da lactonase ao ácido xilônico (JUSTEN, 2017).

Além dos microrganismos descritos por sua habilidade na produção de ácido xilônico, há referências de linhagens microbianas modificadas geneticamente para esse propósito. Para isso, genes codificantes de xilose desidrogenase (XDH) de diferentes microrganismos como espécies de *Pseudomonas*, *Gluconobacter oxydans*, *Aspergillus niger*, *Caulobacter crescentus*, *Trichoderma reesei*, *Enterobacter cloacea* são utilizados (NYGARD *et al.*, 2014).

Rodzri *et al.* (2019) relatam que a produção do ácido D-xilônico por rota microbiológica pode ser realizada utilizando diversas espécies de *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Escherichia coli*. No estudo realizado pelos autores, foi empregada a cultura de *E. coli* recombinante BL21 em meio contendo D-xilose, sendo avaliado o efeito do pH, temperatura e taxa de agitação do meio. Nestas condições, em cultivos em frascos sob agitação, usando 10 g/L de xilose, a 37 °C, pH 7,0 e agitação de 200 rpm, foi atingido 9,95 g/L de ácido D-xilônico com rendimento de 0,91 g/g.

Toivari *et al.* (2010) realizaram um estudo sobre a produção de D-xilonato a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada, com a introdução do gene que codifica a xilose desidrogenase de *T. reesei*. Cerca de 3,8 g/L de D-xilonato foi obtido, com a formação de xilitol (4,8 g/L) como produto primário. O rendimento obtido foi de 0,4 g de D-xilonato por g de D-xilose consumida. Segundo os autores, apesar de ser uma opção biotecnológica aos processos químicos, a modificação genética estabelecida não proporcionou a obtenção de resultados favoráveis em termos de produção de D-xilonato.

Segundo Toivari *et al.* (2012a), *Gluconobacter oxydans* e *Pseudomonas putida* são consideradas as bactérias mais comumente empregadas para a produção de ácido xilônico. Entretanto, os altos rendimentos de D-xilonato a partir de D-xilose fazem com que *G. oxydans* seja uma atrativa escolha para a produção biotecnológica. *G. oxydans* é capaz de produzir xilonato diretamente de hidrolisados provenientes de biomassa lignocelulósica, porém a concentração e o rendimento são reduzidos em função da sensibilidade da cultura frente a alguns inibidores presentes no hidrolisado.

Toivari *et al.* (2012b) relatam a elevada taxa de conversão de xilose em ácido xilônico pelo microrganismo *Gluconobacter oxydans*, cerca de 43 g/L de D-xilonato a partir de 49 g/L de D-xilose, em pH 3,0. Entretanto, foi observado que a produção é limitada, uma vez que necessita de meios complexos e condições extremas de pH, o que acaba dificultando a produção de ácido xilônico por essa rota.

Herrera (2021), na avaliação genes codificadores da enzima XDH (xilose desidrogenase), relatam que, com a seleção do gene de *Paraburkholderia xenovorans* expresso em *Z. mobilis* ZM4, produtividade volumétrica de $1,85 \pm 0,06$ g/l/h foi atingida, cerca de 93% superior ao resultado obtido quando *Z. mobilis* expressou o gene de *Caulobacter crescentus*, que seria a cultura mais reportada quando se trata de modificação de linhagens produtoras de ácido xilônico. Por outro lado, em cultivo em biorreator, com a deleção do gene da xilose redutase de *Z. mobilis*, obteve-se $56,44 \pm 1,93$ g/L de ácido xilônico partindo-se de $54,27 \pm 0,26$ g/L de xilose, o que representa 97,3% do máximo teórico para este processo. Segundo o autor, com esta mesma cultura, na fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a completa conversão de xilose em ácido xilônico foi obtida.

Tratando-se de sorbitol é relatada sua produção por processos químicos, eletroquímicos e biotecnológicos. Em escala industrial, o sorbitol pode ser obtido por hidrogenação catalítica de xarope de glicose em uma concentração de 70% (m/v) com a utilização de níquel (Ni^{2+}) como catalisador, em temperatura e pressão controladas de, aproximadamente, 130 °C e 50 atm, respectivamente. Ao término da síntese, o catalisador é eliminado por precipitação e, posterior, filtração, enquanto o sorbitol é recuperado por cromatografia de troca iônica e carvão ativado (HAIDEGGER, 1977 apud SILVEIRA & JONAS, 2002).

Garcia *et al.* (2020) citam a obtenção de sorbitol por meio da hidrogenação de transferência catalítica com o uso de diferentes catalisadores químicos, entre estes, Níquel de Raney dopado com Molibdênio. Para essa produção, utilizou-se glicose como matéria-prima e avaliaram-se diferentes álcoois de cadeia curta como doadores de hidrogênio. O rendimento máximo de consumo de glicose foi de 78,4% e produção de sorbitol de aproximadamente 38,4% com o uso de etanol como doador de hidrogênio.

Van Heerden *et al.* (2024) realizaram um estudo para a produção de sorbitol e outros produtos a partir de melão de cana-de-açúcar, com base na reprodução de metodologias utilizadas em biorrefinarias. No primeiro cenário que objetivava a produção de sorbitol e frutose, glicose e frutose foram obtidas pelo processo de inversão da sacarose presente no melão de cana-de-açúcar, obtendo-se o sorbitol a partir da hidrogenação da glicose. Para este cenário, obteve-se rendimento de 99,50% e pureza de 99,57% em termos de produção de sorbitol. O segundo cenário objetivava a produção de sorbitol e manitol a partir do melão de cana-de-açúcar de primeira geração (1G), os mesmos foram produzidos pela inversão da sacarose presente no melão em glicose e frutose, seguido pela hidrogenação da glicose e frutose em reator. Este processo indicou rendimento de 98,29% e pureza de 96,42% em termos de sorbitol (VAN HEERDEN *et al.*, 2024).

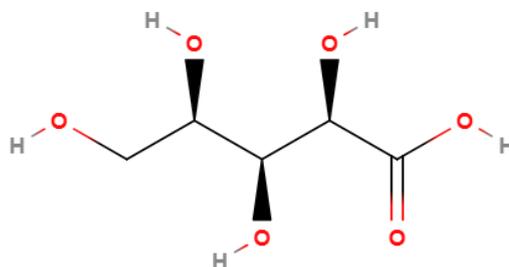
No âmbito dos processos biotecnológicos, a obtenção de sorbitol é relatada por meio da utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, cultivada em meio de cultura contendo uma mistura de frutose e glicose. A produção de etanol é identificada na etapa inicial do processo e a síntese de sorbitol após o consumo do substrato (DUVNJAK *et al.*, 1991 apud CARRA, 2012).

Considerando a produção industrial, não há na literatura relatos sobre a produção de ácido xilônico em maior escala, independente da rota de obtenção.

2.5 CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DE ÁCIDO XILÔNICO E SORBITOL

O ácido xilônico (Figura 4) é um ácido polihidroxilado derivado de xilose; possui cinco carbonos com uma hidroxila ligada a cada átomo de carbono. Pertence ao grupo dos ácidos aldônicos.

Figura 4 - Estrutura molecular do ácido D-xilônico.



Na Tabela 1, são apresentadas as propriedades do ácido xilônico, reportadas na literatura e/ou em banco de dados especializados.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido D-xilônico.

Nome IUPAC	(2R,3S,4R)-2,3,4,5-ácido tetrahidroxipentanoico
Fórmula Química	C ₅ H ₁₀ O ₆
Massa Molar	166,13 g/mol
Ponto de fusão	148 °C a 760 mmHg
Ponto de ebulição	Não relatado na literatura
Densidade	1,715 g/cm ³

Fonte: Adaptado de He *et al.* (2014), Chemenu (2021).

O ácido xilônico, obtido a partir da oxidação química ou microbiana da xilose, apresenta aplicações distintas, sendo citadas a sua ação como agente de complexação ou quelante, na produção de poliamidas, de hidrogéis, poliésteres, como dispersante de cimento, precursor da biossíntese de 1,2,4-butanotriol e de etileno glicol. Pode ser utilizado como uma alternativa ao ácido glicônico, o qual é amplamente utilizado (cerca de 80 kton/ano) em produtos alimentícios, farmacêuticos, tintas, solventes, corantes, adesivos e polímeros (TOIVARI *et al.*, 2012a).

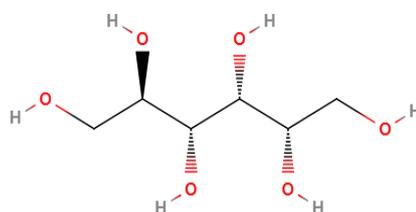
O ácido xilônico também pode ser empregado na área farmacêutica e cosmética, sendo utilizado como um aditivo em produtos antienvhecimento, para renovação da pele e para melhorar penetração na pele, como agente antimicrobiano e na adsorção e retenção de vitamina C (GUPTA *et al.*, 2009; PUJOS & JIKALI, 2014; MARKHAM, 1992).

Luo *et al.* (2020) comprovaram a eficácia do ácido xilônico como agente antimicrobiano, utilizando ácido xilônico produzido por processo fermentativo a partir de *Gluconobacter oxydans*, através da realização da caracterização de filmes de nanocelulose contendo lignina e diferentes quantidades de ácido xilônico, verificando a atividade antimicrobiana dos filmes frente a bactéria *E. coli*. Os autores relatam resultado máximo de 57,4% de atividade antimicrobiana em filmes contendo 40% de ácido xilônico.

As aplicações do ácido xilônico são consideradas relevantes e, quando se trata de substratos, a bioprodução e aplicações do ácido xilônico são importantes para a valorização do uso da xilose produzida na indústria de lignocelulósicos, visto que a xilose é um dos principais açúcares encontrados em biomassas lignocelulósicas, e que até o momento não possui aplicação definida (LV *et al.*, 2024).

O sorbitol (Figura 5) é um poli álcool, também conhecido como D-sorbitol ou D-glicitol, encontrado na natureza, em várias espécies vegetais, principalmente em frutas como maçã, peras, pêssegos e ameixas. Entre as suas aplicações na indústria de alimentos pode-se citar a utilização como inibidor de cristalização de açúcares e como condicionador de umidade. É empregado na indústria cosmética como emoliente, na indústria farmacêutica como matéria-prima para o ácido ascórbico, e em produtos de limpeza como biossurfactante (SILVEIRA & JONAS, 2002; RICE *et al.*, 2019).

Figura 5 - Estrutura molecular do D-sorbitol.



Considerando o sistema GFOR/GL de *Z. mobilis*, o sorbitol é um dos produtos formados em associação com ácidos orgânicos na etapa de bioconversão com o par frutose/aldose a partir da ação do complexo enzimático GFOR/GL. Pertence ao grupo poliol, sendo solúvel em água, higroscópico, cristalino e de sabor adocicado; apresenta elevada estabilidade química, bacteriológica, térmica, não sendo volátil (PERUZZO & CANTO, 2010; FREITAS, 1990). Outras propriedades do referido composto são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do D-sorbitol

Nome IUPAC	(2S,3R,4R,5R)-Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol
Fórmula Química	C ₆ H ₁₄ O ₆
Massa Molar	182,14 g/mol
Ponto de fusão	95 °C a 760 mmHg
Ponto de ebulição	296 °C
Densidade	1,489 g/cm ³

Fonte: PubChem (2025).

O sorbitol possui a capacidade de fixar aromas e cores, o que o faz ser amplamente utilizado na indústria alimentícia como diluente de corantes e aromatizantes, objetivando conferir textura aos alimentos. É um importante edulcorante em alimentos dietéticos, pois apresenta baixa absorção pelo organismo, sendo capaz de substituir o açúcar em diversos alimentos (PERUZZO & CANTO, 2010).

Tratando-se da área alimentícia, em estudo publicado por Zhang *et al.* (2021) o sorbitol foi utilizado para inibição da deterioração de glúten em macarrão durante o seu armazenamento. O estudo foi realizado com a adição de 1, 2 e 3% de sorbitol, obtendo melhores resultados para a concentração de 3%, demonstrando a atividade do sorbitol no que diz respeito a dureza, elasticidade e estabilidade textural.

Na área da saúde, é relatada a utilização do sorbitol como medicação para tratar doenças crônicas. Em estudo desenvolvido por Alisherovna *et. al.* (2022) utilizou-se de concentração de 50 a 100 g de sorbitol em 200 mL de água, juntamente, com as medicações usuais, em tratamento de pessoas diagnosticadas com insuficiência renal crônica. O resultado do estudo

indicou a diminuição dos sintomas de intoxicação urêmica e melhora na condição dos pacientes após 7 a 10 dias do início do uso da medicação.

Além das aplicações citadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil, o sorbitol pode ser utilizado como plataforma química para a produção de outros produtos com alto valor agregado como o medicamento isossorbida, glicóis, alcanos, sorbitano e L-sorbose. Apresenta uma demanda industrial de aproximadamente 2 milhões de toneladas por ano (MURILLO LEO *et al.*, 2016; OCHOA-GÓMEZ e RONCAL, 2017).

Do ponto de vista comercial, a elevada demanda se reflete no emprego em diversos processos industriais. Neste sentido, este aspecto é relevante em termos de processo de produção associado ao ácido xilônico.

2.6 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIOCONVERSÃO

Para a recuperação de produtos, técnicas eficientes devem ser realizadas para minimizar o custo de produção. Se tratando de processos biotecnológicos, estas técnicas devem estar relacionadas a processos com alta eficiência, elevada especificidade e com a ausência de agentes poluentes (PESSOA JR e KILIKAN, 2005).

Malvessi *et al.* (2010) citam que em processos de bioconversão utilizando enzimas de *Z. mobilis* para a produção de ácidos orgânicos, elevadas concentrações de ácido e sorbitol são obtidas após 24 horas de reação. Havendo a necessidade de controle de pH durante a bioconversão, através da adição de hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio, ocorre a formação do ácido e sua conversão em seu respectivo sal de sódio ou de cálcio.

Silveira *et al.* (2007) descrevem a separação dos produtos finais da bioconversão, ácidos orgânicos e sorbitol, utilizando-se de sucessivas precipitações com solventes orgânicos, dentre os quais, álcool etílico, álcool metílico e ácido acético glacial. No caso específico de produtos obtidos pela ação de células de *Z. mobilis*, os autores destacam a utilização de etanol, por ser um dos principais produtos da fermentação de glicose pelo referido microrganismo. Deste modo, a separação e a precipitação por solventes podem ser empregadas tendo em vista a diferença de solubilidade dos compostos. A precipitação de ácidos aldônicos com o uso de etanol, inclusive, tem sido amplamente utilizada devido ao seu baixo custo e à simplicidade da sua realização. No entanto, para o ácido xilônico, são poucos os relatos de estudos na literatura, o que indica a necessidade de mais investigações para compreender melhor suas propriedades e potencial de aplicação.

Pezzotti e Therisod (2006), estudaram a síntese enzimática de ácidos aldônicos, em especial o ácido xilônico, a partir de xilose e ação das enzimas glicose oxidase e catalase de *Aspergillus niger*. Para a separação da mistura reacional, foi empregada a técnica de filtração utilizando coluna de troca iônica com eluição dos ácidos em solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L. Os ácidos aldônicos recuperados foram então submetidos ao processo de evaporação a vácuo seguida de espectroscopia a fim de confirmar a pureza. Os autores relatam a obtenção de teores na ordem de 70 a 90% em ácido xilônico.

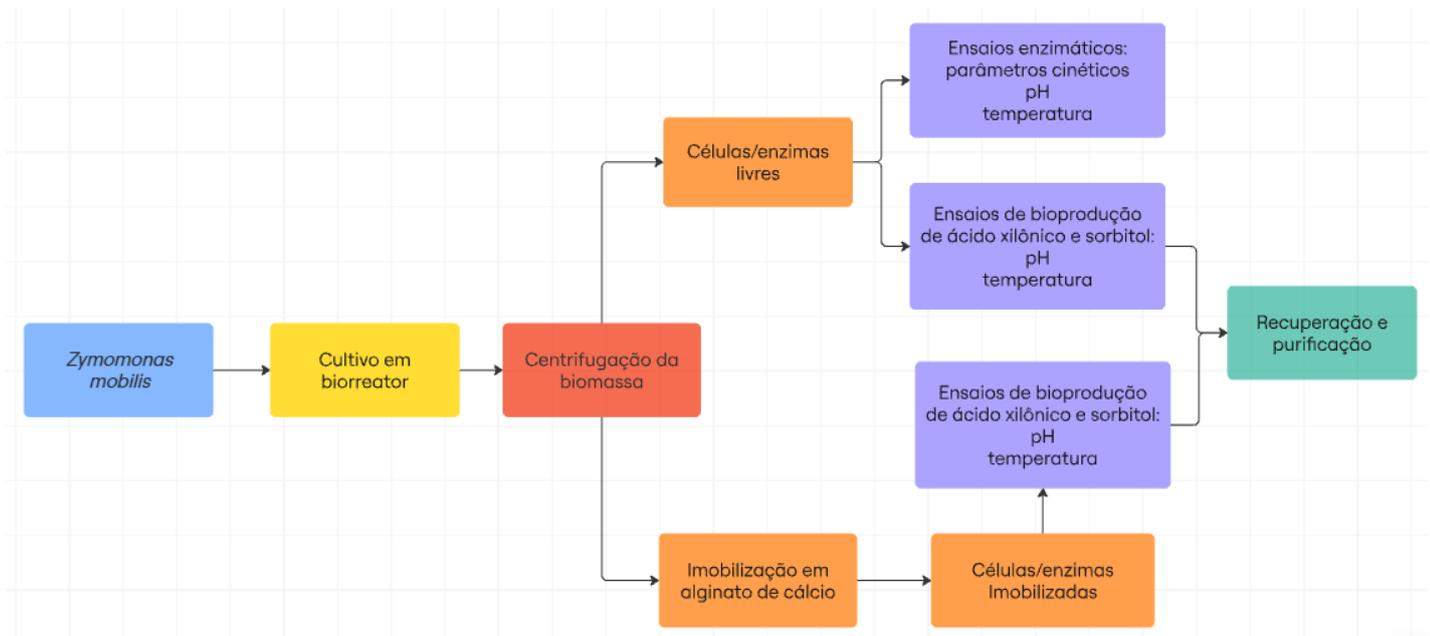
Ly *et al.* (2024) desenvolveram um método de cristalização do ácido xilônico a partir do caldo de fermentação. No estudo, a partir do xilonato de potássio, foi realizada a acidificação utilizando ácido sulfúrico em meio metanólico, promovendo a difusão e agregação do ácido xilônico. Os autores relataram a obtenção de cristais com pureza superior a 99% e rendimento de 67,2%, com base no xilonato de potássio utilizado.

Diante do exposto, e considerando a produção de diferentes ácidos aldônicos por meio da ação do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, a obtenção de ácido xilônico se destaca como uma oportunidade promissora para investigações mais aprofundadas, especialmente em face da escassez de estudos na literatura sobre a obtenção desse composto por rota enzimática. Além disso, cabe destacar que a utilização de GFOR/GL viabiliza a produção simultânea de sorbitol, um composto de ampla aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas relacionadas à condução experimental dos estudos de bioprodução de ácido xilônico e sorbitol pelo sistema enzimático GFOR/GL são apresentadas na Figura 6.

Figura 6 - Esquema representativo do processo de bioprodução de ácido xilônico e sorbitol.



Fonte: Autora (2025).

3.1 MICRORGANISMO

Neste estudo utilizou-se da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580), adquirida do *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Braunschweig, Alemanha). As culturas foram mantidas em meio líquido e estocadas a 4°C (MALVESSI *et al.*, 2006).

3.2 MEIO DE CULTIVO

Para as etapas de ativação das culturas, preparo de inóculo e produção de biomassa/enzimas utilizou-se o meio baseado em Malvessi *et al.* (2006), cuja composição é listada na Tabela 3. Ressalta-se que antes da sua utilização, o meio foi esterilizado em autoclave (Primatec, CS-30) a 1 atm, por 15 minutos.

Tabela 3 - Composição do meio de cultivo líquido utilizado nas etapas de ativação, inóculo e produção de enzimas.

Composição	Concentração em g/L
Glicose	20 (manutenção) 100 (inóculo) 150 (cultivo)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
Extrato de levedura (BioSpringer, Brasil)	7,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01

Fonte: Autora (2025).

3.3 PRODUÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS

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

Para a produção do inóculo, foram utilizados frascos de 500 mL contendo 450 mL de meio, inoculados com 45 mL da cultura previamente ativada e mantidos sob agitação orbital de 200 rpm, em agitador de bancada (Certomat U/H – B. Braun Biotech, Sartorius), sob anaerobiose, a 30 °C, por 10 horas. O pH do meio foi controlado com a adição inicial de 5 g/L de carbonato de cálcio (CaCO₃). Os frascos foram dotados de filtros esterilizados, que permitiam, inicialmente, a injeção de nitrogênio (N₂) gasoso, permitindo submeter o meio a anaerobiose e, posteriormente, auxiliando na liberação de dióxido de carbono (CO₂), decorrente do metabolismo fermentativo (MALVESSI *et al.*, 2006).

O cultivo microbiano para produção de biomassa e enzimas foi realizado em regime descontínuo, em biorreator de bancada (BioFlo/CelliGen 115, New Brunswick, USA) de 7 litros de volume total, contendo 5,5 litros de meio de cultivo. O inóculo correspondeu ao volume necessário para obter-se uma concentração celular correspondente a 20 unidades de D.O. (densidade ótica) no meio de cultivo. O cultivo foi conduzido sob anaerobiose, a uma agitação constante de 450 rpm, com a temperatura mantida em 30 °C e pH 5,5, controlado pela adição automática de NaOH 5 mol/L (MALVESSI *et al.*, 2006). Durante os primeiros 30 minutos de

fermentação, nitrogênio gasoso foi adicionado ao meio, à uma vazão de 0,5 L/min, a fim de garantir a anaerobiose do processo. Ao final do cultivo, o caldo fermentado foi recolhido e concentrado em centrífuga (Sigma, modelo 4-15) a 5836g, por 10 minutos.

3.4 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

As células/enzimas foram imobilizadas por encapsulamento em alginato de cálcio, conforme metodologia descrita por Carra (2012). Primeiramente, o alginato de sódio foi dissolvido em água até obter-se a concentração de 4% (m/v), e mantido sob agitação por 12 h à temperatura de 22 ± 2 °C. Após esse período, à solução de alginato de sódio, foi adicionado igual volume de suspensão de células de *Z. mobilis* (20 g/L). A mistura foi novamente mantida sob agitação por cerca de 2 horas para perfeita homogeneização. Para a formação das esferas de alginato de cálcio e imobilização das células, todo o volume da suspensão foi lentamente gotejado em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,30 mol/L, através de agulhas hipodérmicas, com auxílio de uma bomba peristáltica (Master Flex, L/S). Após essa etapa, as esferas foram tratadas com glutaraldeído 0,5% (m/v), sob agitação magnética, à temperatura ambiente (FOLLE *et al.*, 2016; FOLLE *et al.*, 2018). As esferas foram armazenadas em água destilada a 4°C.

3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE E GLICONO- δ -LACTONASE

Os experimentos foram realizados em reator de 200 mL, contendo 100 mL de solução de xilose/frutose. O reator foi mantido a 39 °C, com auxílio de banho termostaticado, sob agitação magnética e pH controlado em 6,4, pela adição automática de solução de hidróxido de sódio (NaOH) contida em uma bureta, acoplada a um sistema de bomba peristáltica controlada pelo sistema Arduino®. A concentração de NaOH utilizada foi dependente da velocidade reacional, utilizando-se valores de 0,25 a 1,00 mol/L.

Para avaliar os parâmetros cinéticos aparentes K_M e V_{Max} da equação de Michaelis-Menten (Equação 1), foram utilizadas soluções de xilose/frutose, com o emprego de células livres de *Z. mobilis*. Primeiramente, foram avaliados os efeitos da concentração de células/enzimas (0,05 a 0,50 g/L) sobre a atividade enzimática, utilizando-se solução padrão de

xilose/frutose 0,70 mol/L. A partir da concentração de biocatalisador que proporcionou maior atividade enzimática, realizou-se ensaios com a concentração de um dos substratos constante (0,70 mol/L) e variando-se a concentração do outro substrato (0,03 a 0,70 mol/L).

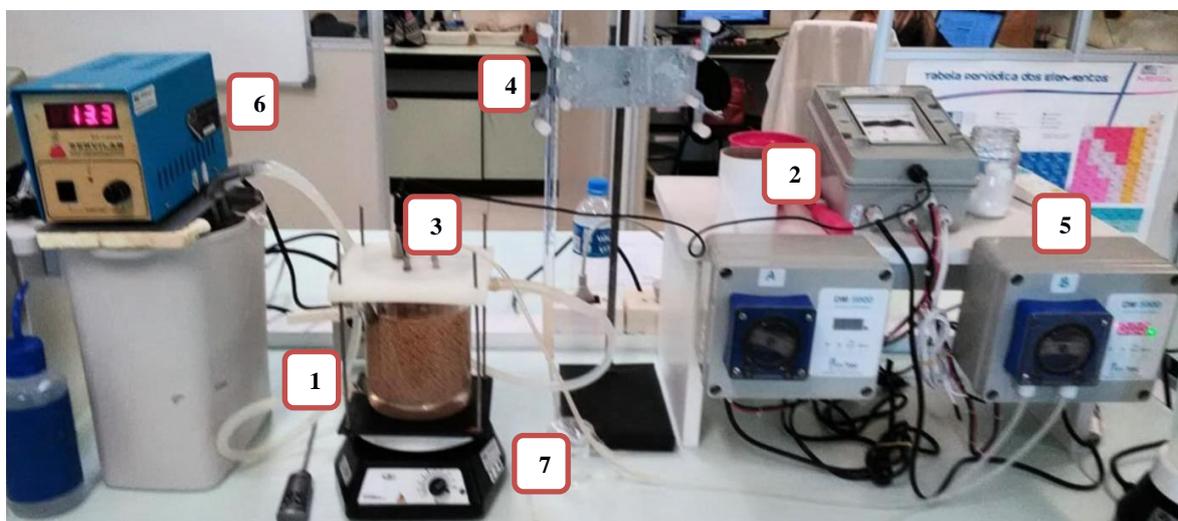
O efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática, foram avaliados, separadamente, o pH na faixa de 5,8 a 7,6, e a temperatura, na faixa de 34 a 53°C, utilizando-se concentração de células/enzimas e substratos constantes. Com base nestas condições, foi quantificada a atividade enzimática frente ao substrato xilose, nas condições do ensaio (CARRA, 2012; CARRA *et al.*, 2020).

3.6 ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO

Os ensaios de bioconversão, utilizando células livres de *Z. mobilis* ou imobilizadas em alginato de cálcio foram realizados seguindo a metodologia adotada por Carra *et al.* (2020). Foi utilizada, como condição padrão, volume reacional de 200 mL de solução de substratos (0,70 mol/L de frutose e 0,70 mol/L de xilose), 20 g/L de biocatalisador imobilizado ou células/enzimas livres, temperatura e pH de 39 °C e 6,4, respectivamente.

A temperatura foi controlada através de banho termostático, pela camisa externa do reator (Figura 7). O pH reacional foi controlado pela adição automática de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 7 mol/L, a fim de proporcionar a formação de xilonato de sódio.

Figura 7 – Aparato experimental de bioconversão com controle de pH via hidróxido de sódio.



(1) reator enzimático; (2) controlador de pH; (3) sonda de pH; (4) bureta com NaOH 7 mol/L; (5) bomba peristáltica; (6) controlador de temperatura; (7) agitador magnético.

Foi empregado um controlador de pH acoplado ao sistema Arduino®, com o objetivo de proporcionar a adição de base de forma mais precisa durante o processo.

O processo de bioconversão do par frutose/xilose foi conduzido em regime descontínuo, em 24 horas de processo. Partindo da condição de processo padrão citada acima, a qual foi definida para a obtenção de outros ácidos orgânicos (glicônico, lactobiônico e maltobiônico), foi avaliado o efeito do pH - na faixa entre 6,4 e 7,2, da temperatura - entre 39 e 47 °C, sobre a velocidade da reação catalisada por GFOR/GL. A concentração dos substratos xilose/frutose foi mantida em 0,70 mol/L.

Para a obtenção do xilonato de cálcio, o pH reacional foi controlado pela adição de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) em pó, em função da baixa solubilidade (Figura 8). O consumo da base foi avaliado pela alteração da massa, determinada em balança semi-analítica, conforme metodologia de Delagustin *et al.* (2017).

Figura 8 - Aparato experimental de bioconversão com controle de pH via hidróxido de cálcio.



(1) reator enzimático; (2) controlador de pH; (3) sonda de pH; (4) motor de passo com $\text{Ca}(\text{OH})_2$; (5) balança semi-analítica; (6) controlador de temperatura; (7) agitador magnético; (8) sistema de controle Arduino.

Em relação à bioconversão com controle de pH utilizando hidróxido de cálcio, esta foi realizada exclusivamente em pH 6,4 e a 39 °C, com o objetivo de facilitar a recuperação dos produtos gerados durante o processo.

3.7 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIOCONVERSÃO

O procedimento para a recuperação do xilonato de sódio e xilonato de cálcio do meio reacional seguiu o método descrito por Silveira *et al.* (2007) e Carra (2012). Foram avaliados, preliminarmente, os solventes orgânicos aplicáveis para a etapa de precipitação de um dos compostos envolvidos na mistura resultante do processo de bioconversão, considerando a solubilidade destes nos solventes metanol (Merck, 99,9%), etanol (Serraquímica, 96%), isopropanol (Dinâmica, 99,5%), butanol (Dinâmica, 99,4%), acetona (Química moderna, 99,5%), éter etílico (Química moderna, 99,5%), clorofórmio (Dinâmica, 99,5%) e ácido acético glacial (Química moderna, 99,7%).

Primeiramente, cerca de 2 mL do caldo resultante dos processos de bioconversão, foram adicionados, gota a gota, a 50 mL de cada solvente orgânico. Avaliou-se qual solvente proporcionou a separação dos sais de ácido xilônico dos demais compostos envolvidos na bioconversão através da identificação visual das fases distintas da mistura.

Após a definição do melhor solvente para a precipitação, os testes foram realizados com a avaliação das concentrações variadas, entre 60 e 90% (v/v) e, posteriormente, temperaturas entre 25 e 45 °C.

A separação dos produtos foi realizada procedendo-se com sucessivas precipitações dos sais nas condições definidas. Para a obtenção de elevado grau de pureza, os procedimentos de precipitação e ressolubilização foram repetidos 3 vezes.

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

Durante o cultivo de *Z. mobilis* em biorreator foram coletadas amostras do meio fermentado a fim de determinar a concentração de biomassa, substrato e produto. As amostras coletadas em tempos de processo pré-determinados foram submetidas à centrifugação a 5836 x g por 10 min.

3.8.1 Determinação da concentração celular

Nos frascos de produção de inóculo, a concentração celular foi estimada por densidade óptica. A 1 mL da amostra de meio foi adicionado 0,2 mL de HCl 2 mol/L para a solubilização

do carbonato de cálcio presente no meio. Após, a amostra foi diluída e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210) a 560 nm.

Nos cultivos em biorreator, a quantificação celular foi realizada por gravimetria. Alíquotas de 3 mL do meio de fermentação foram centrifugadas a 5836 x g por 10 min (Sigma, modelo 4-15), descartando-se o sobrenadante e a massa celular obtida lavada duas vezes com água destilada. A massa celular centrifugada, foi ressuspensa em água destilada e transferida para cadinhos de porcelana, com a massa previamente determinada. Os cadinhos, contendo a suspensão de células, foram mantidos em estufa a 90 ± 5 °C por 24 h. Após este período, os cadinhos foram mantidos em dessecador, a temperatura ambiente por, aproximadamente, 30 min, para seu resfriamento. A massa celular foi determinada em função da diferença da massa do cadinho vazio e da massa do cadinho contendo a biomassa celular. A concentração celular foi determinada pela divisão da massa seca de células pelo volume da amostra (CARRA, 2012).

3.8.2 Determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidorreductase e glicono- δ -lactonase

Para determinar a atividade enzimática do complexo GFOR/GL, foi utilizada a técnica que estima a atividade conjunta, em células livres de *Z. mobilis*, quando expostas à solução de xilose e frutose como substratos. A velocidade de formação de ácido orgânico foi determinada a partir da variação do volume de solução de hidróxido de sódio (0,25 a 1,00 mol/L) gasto no controle do pH em função do tempo (MALVESSI, 2008).

Uma unidade enzimática de GFOR/GL (U) é definida como quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol de ácido orgânico por hora, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células em base seca (U/g) (MALVESSI *et al.*, 2006).

3.8.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten

Um modelo para se determinar a cinética de reações enzimáticas é a equação de Michaelis-Menten. Este modelo cinético, demonstrado por um segmento hiperbólico retangular, representa a velocidade reacional em função da concentração do substrato. Os parâmetros de constante cinética (K_M) e velocidade máxima (V_{Max}) da equação de Michaelis-Menten foram estimados para os substratos em excesso, com o uso da equação do duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk (Equação 2) em que V é a velocidade inicial, K_M é a constante de Michaelis-Menten, V_{Max} é a velocidade máxima, e $[S]$, a concentração de substrato. Os parâmetros cinéticos aparentes foram calculados utilizando o programa Graph Pad Prism 10.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{Max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Max}} \quad (2)$$

Os ensaios enzimáticos foram conduzidos utilizando-se concentração de frutose constante em 0,70 mol/L e variando a concentração de xilose (entre 0,05 e 0,70 mol/L) e, mantendo a concentração de xilose constante em 0,70 mol/L e diferentes concentrações de frutose (entre 0,03 e 0,70 mol/L). Os ensaios foram realizados em biorreator com agitação magnética, contendo 100 mL de solução de substratos e 0,05 g/L de células/enzimas. Os resultados são apresentados como valores médios de duas repetições.

3.8.4 Estimativa da concentração de substratos e produtos da bioconversão

Durante a bioconversão, substratos e produtos foram quantificados pelo método indireto, que se baseia na determinação pelo volume e concentração da solução de hidróxido de sódio ou cálcio adicionada para controlar o pH reacional (MALVESSI, 2008; PEDRUZZI *et al.*, 2011).

O ácido xilônico e o sorbitol são formados em base equimolar, sendo os únicos produtos da reação, desta forma, os substratos xilose e frutose são consumidos na mesma proporção. Deste modo, as concentrações de sorbitol e dos substratos foram determinados indiretamente em função do volume e da concentração da solução de hidróxido de sódio ou cálcio utilizada para titular o ácido formado na reação. A Equação 3 foi utilizada para determinar a concentração de produtos na reação.

$$P = \frac{Vb \times M \times MM}{(Vt+Vb)} \quad (3)$$

Onde:

P , concentração de produto formado (g/L);

Vb , volume de base adicionada (L);

M , concentração da base (mol/L);

MM , massa molar do produto (182,17 e 166,13 g/mol para sorbitol e ácido xilônico, respectivamente);

Vt , volume total da bioconversão (0,20 L).

Para determinar a quantidade de substratos consumidos durante o processo de bioconversão, foi utilizada a Equação 4.

$$C = C_0 - \left[\frac{(Vb \times M \times MMs)}{(Vt+Vb)} \right] \quad (4)$$

Onde:

C , concentração de substrato consumido (g/L);

C_0 , concentração de substratos inicial (g/L);

Vb , volume de base adicionada (L);

M , concentração da base (mol/L);

MMs , massa molar do substrato (180 g/mol para frutose, 150,13 g/mol para xilose);

Vt , volume total da bioconversão (0,20 L).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), também foi empregada como método de quantificação dos produtos e de substratos residuais, baseada no descrito em Carra (2012). Na análise, foi utilizado cromatógrafo (Agilent Technology, 9100) com coluna Aminex HPX-87H (BioRad), com dimensões de 300 mm x 31 7,8 mm, 9 μ m, acondicionada a 60 °C, fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L e fluxo de 0,60 mL/min. Foi usado detector de índice de refração (RID) para as análises de sorbitol e xilose/frutose e detector UV (210 nm) para ácido xilônico (TOIVARI *et al.*, 2012a). A quantificação dos produtos e substratos foi realizada por meio da comparação das concentrações obtidas nas amostras com curvas padrão construídas a partir de soluções de referência, nas faixas de 0,50 a 10,00 g/L para sorbitol (Dinâmica, 99,5%) e ácido xilônico (Biosynth, 97%), e de 1,00 a 20,00 g/L para xilose (Sigma Aldrich, 99%) e frutose (Inlab, 99%). As amostras foram preparadas em água destilada e submetidas à filtração utilizando membranas de 0,22 μ m. Quando necessário, as amostras foram devidamente diluídas

para garantir que os valores obtidos permanecessem dentro dos limites lineares das respectivas curvas padrão, assegurando, assim, a acurácia da quantificação.

3.9 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIOCONVERSÃO

O rendimento em termos de formação de ácido xilônico nos ensaios foi determinado de acordo com a Equação 5.

$$\rho = \frac{Mf}{Me} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde:

ρ , rendimento (%);

Mf , massa molar de ácido xilônico formado (mmol);

Me , massa molar de ácido xilônico esperado (mmol).

A produtividade volumétrica foi determinada, para os ensaios de bioconversão de acordo com a Equação 6.

$$P = \frac{Pf - Po}{t} \quad (6)$$

Onde:

P , produtividade volumétrica (mmol/L/h);

Po , concentração inicial de produto (mmol/L);

Pf , concentração final de produto (mmol/L);

t , tempo de processo (h).

Para determinar a produtividade molar nos ensaios de bioconversão, foi empregada a Equação 7.

$$pm = \frac{Mf - Mo}{t} \quad (7)$$

Onde:

pm , produtividade molar (mmol/h);

Mo , massa molar de ácido xilônico inicial (mmol);

Mf , massa molar de ácido final (mmol);

t , tempo de processo (h).

Para o cálculo de produtividade específica (q), determinada em ensaio de bioconversão, a produtividade mássica foi dividida pela respectiva massa celular em gramas e expressa em mmol de produto por grama de células secas por hora (mmol/g/h).

A velocidade específica de formação de produto (μ_p) foi determinada conforme a Equação 8.

$$\mu_p = \frac{1}{Mx} x \frac{dMP}{dt} \quad (8)$$

Onde:

μ_p , velocidade específica de formação de produto (mmol/mmol/h);

Mx , massa de células (mmol);

$\frac{dMP}{dt}$, derivada do produto em função do tempo (mmol/h).

Para o cálculo do fator de conversão de substratos em produto ($Y_{P/S0}$) foi realizada a divisão do número de mols do produto formado pelo número de mols do substrato inicial, expresso por mmol do produto/mmol do substrato inicial (mmol/mmol).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

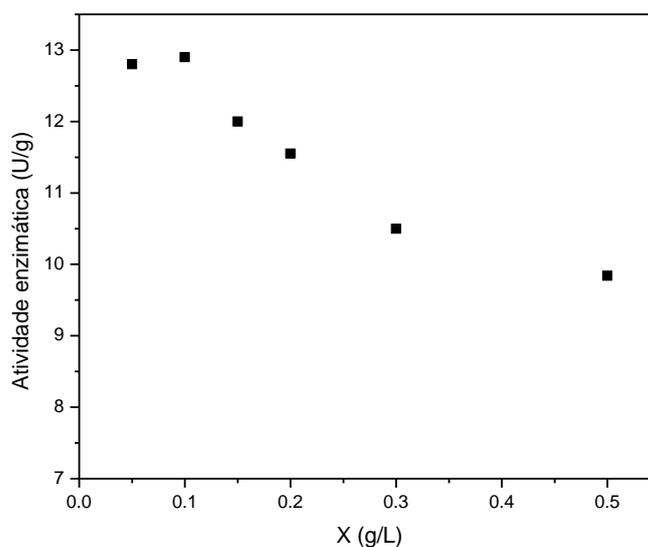
4.1 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CÉLULAS/ENZIMAS EM CULTIVO DE *Zymomonas mobilis*

Para os ensaios descritos neste trabalho, o cultivo de *Z. mobilis* para a obtenção de biomassa (células/enzimas) foi realizado em regime descontínuo, em biorreator de mistura completa, em meio contendo glicose e nutrientes, sem alteração nos parâmetros operacionais, seguindo a metodologia descrita conforme item 3.3. Ao término do cultivo, a biomassa foi centrifugada, permeabilizada e/ou imobilizada, conforme a proposta de uso da enzima, para ensaios enzimáticos e de bioconversão.

4.2 CINÉTICA DE GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE (GFOR) E GLICONO- δ -LACTONASE (GL)

Para alcançar o estado estacionário, em uma condição em que a quantidade de substrato esteja em excesso e a enzima saturada, foi avaliado o efeito da concentração de células/enzimas de *Z. mobilis* (entre 0,05 e 0,50 g/L) sobre a atividade enzimática, utilizando-se solução padrão de xilose e frutose (700 mmol/L) e células livres (Figura 9).

Figura 9 - Atividade enzimática do complexo GFOR/GL utilizando-se diferentes concentrações de células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. Solução equimolar de xilose/frutose 700 mmol/L, a 39 °C e pH 6,4.



Valores de atividade enzimática de 12,80 e 12,90 U/g foram obtidos utilizando entre 0,05 e 0,10 g/L, respectivamente, de células livres de *Z. mobilis*, sendo que nesta faixa de concentração os substratos encontram-se em excesso em relação à concentração do biocatalisador (Figura 9). Como observado, o aumento da concentração celular de 0,15 g/L para 0,50 g/L resultou em uma queda proporcional na atividade específica do complexo enzimático, indicando a ocorrência de limitações difusionais entre o substrato e a enzima, possivelmente devido ao aumento da densidade celular, o que dificultaria o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

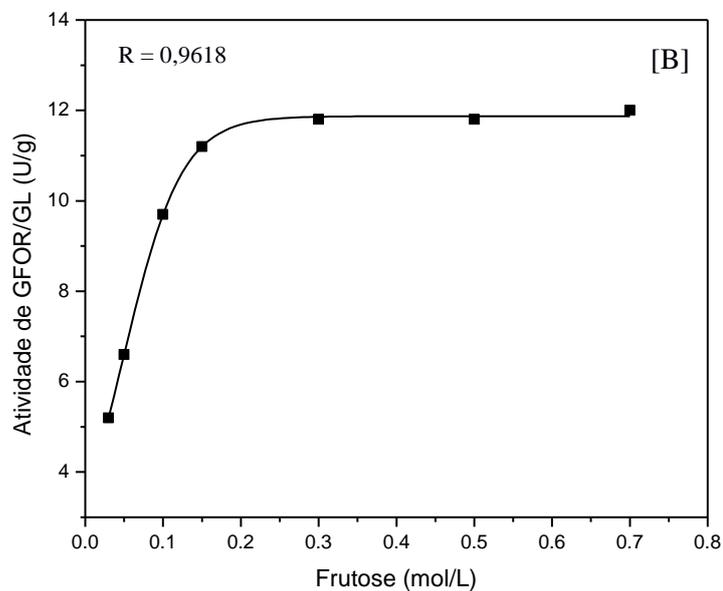
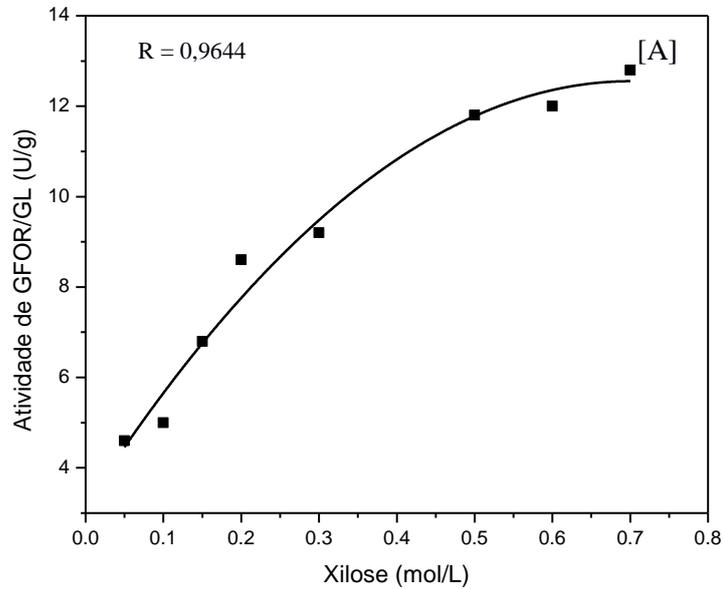
A partir dos resultados obtidos, nos ensaios de atividade enzimática para a determinação dos parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten, K_M e $V_{Máx}$ foi utilizada a concentração de células/enzimas de 0,05 g/L.

Na Figura 10, são apresentados os dados experimentais obtidos nos ensaios e os ajustes para o modelo cinético de Michaelis-Menten. Nos ensaios realizados com frutose 0,70 mol/L, pode-se observar um incremento da atividade enzimática com o aumento da concentração de xilose (Figura 10A), chegando a um valor de 12,80 U/g na concentração de 0,70 mol/L. Quando utilizada concentração constante para xilose (0,70 mol/L), observou-se um aumento da atividade de GFOR/GL até a concentração de 0,30 mol/L de frutose. Entre 0,03 e 0,70 mol/L, resultados de atividade enzimática semelhantes foram identificados, de cerca de 12,00 U/g (Figura 10B).

Valores de coeficiente de correlação da ordem de 0,96 foram calculados para o ajuste dos pontos experimentais da equação de Michaelis-Menten.

Na Tabela 4, são apresentados os valores aparentes de $V_{Máx}$, $K_{M(frutose)}$ e $K_{M(xilose)}$, obtidos a partir dos dados dos ensaios enzimáticos de xilose e frutose.

Figura 10 - Variação na atividade enzimática do complexo GFOR/GL, presente em células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, com diferentes concentrações de substratos, a 39 °C e pH 6,4. [A] 0,70 mol/L frutose + xilose (0,05 a 0,70 mol/L); [B] xilose 0,70 mol/L + frutose (0,03 a 0,70 mol/L).



(■) valores experimentais; (—) valores previstos pela equação de Michaelis-Menten.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos aparentes $K_{M(Xilose)}$, $K_{M(Frutose)}$ e V_{Max} obtidos em ensaios enzimáticos de GFOR/GL de *Zymomonas mobilis* com xilose e frutose como substratos.

Parâmetros cinéticos	Valores estimados
V_{Max} (U/g)	18,00
$K_{M(Frutose)}$ (mol/L)	0,09
$K_{M(Xilose)}$ (mol/L)	0,24
$V_{Máx}/K_{M(Frutose)}$ (U/g/mol/L)	200,00
$V_{Máx}/K_{M(xilose)}$ (U/g/mol/L)	75,00

$V_{Máx}$, velocidade máxima; K_M , constante de Michaelis-Menten

Considerando os resultados de $K_{M(Xilose)}$ e $K_{M(Frutose)}$ aparentes de 0,24 mol/L e 0,09 mol/L, respectivamente, pode-se inferir que a xilose é o substrato limitante da reação. Foi estimado um valor de $V_{Máx}$ de 18,00 U/g, aproximadamente 3,3 vezes inferior aos obtidos em estudos anteriores com o par de substratos glicose/frutose considerados substratos preferenciais do complexo enzimático GFOR/GL (CARRA, 2012). Esta queda nos valores destes parâmetros operacionais pode ter sido devido à menor afinidade da enzima GFOR para a xilose e/ou alterações conformacionais no sítio ativo da enzima. O complexo enzimático GFOR/GL, que opera em um mecanismo de oxidorredução, possui um único sítio de ligação para os substratos. Desta forma, possíveis mudanças conformacionais no sítio ativo da enzima acarretariam mudança no acoplamento de ambos os substratos reacionais (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

Os valores de K_M estão relacionados à afinidade da enzima em relação aos substratos, onde valores mais baixos indicam maior afinidade da enzima com o substrato (BON *et al.*, 2008). É importante ressaltar que a constante de Michaelis (K_M) é única para cada par enzima/substrato. Deste modo, para cada substrato que interage com a enzima resultará em valor específico de K_M (RAIMUNDO, 2003).

Além de xilose, considerando o complexo enzimático GFOR/GL, são relatados os valores de K_M para os substratos glicose, lactose, maltose e galactose, quando combinados com frutose, sendo de 0,019, 0,39, 0,19 e 0,60 mol/L, respectivamente (MALVESSI, 2008; CARRA, 2012; MALVESSI *et al.*, 2013; GARIN, 2016). Assim, em ordem crescente de afinidade do GFOR pelo substrato tem-se galactose, lactose, xilose, maltose e glicose. Embora a glicose seja o substrato preferencial, estudos para a produção de outros ácidos, como o ácido xilônico, são promissores devido às importantes aplicações desse ácido aldônico nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Os resultados obtidos no presente estudo em comparação com os dados relatados na literatura indicam a versatilidade de ação catalítica do complexo enzimático GFOR/GL frente aos diferentes substratos.

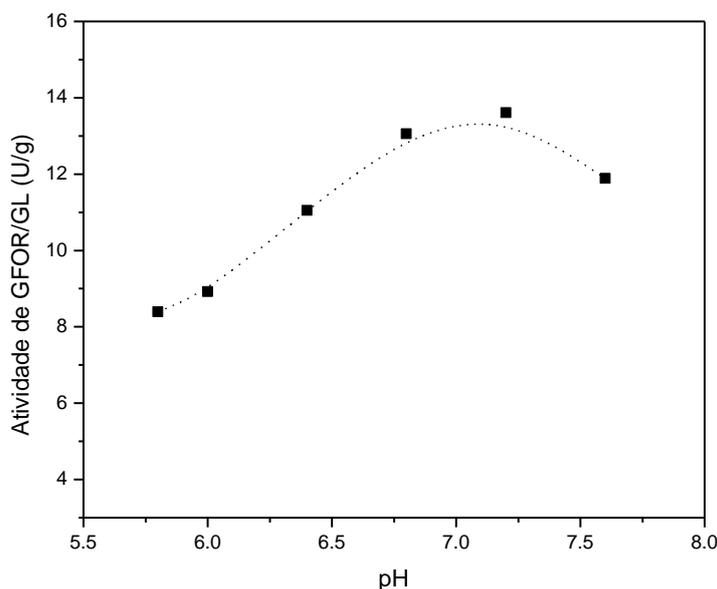
4.3 CINÉTICA DO COMPLEXO ENZIMÁTICO GFOR/GL FRENTE A pH E TEMPERATURA

Além da concentração de substratos, outros parâmetros exercem grande influência sobre a ação catalítica das enzimas, como pH e temperatura. Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprocessos (LBIO/UCS), são relatadas as condições mais favoráveis em termos de ação catalítica de GFOR/GL frente aos outros açúcares, como glicose, maltose, galactose e lactose, sendo descritos como pH 6,4 e temperatura de 39°C (MALVESSI, 2008; CARRA, 2012; GARIN, 2016; FLORES, 2019). Desta forma, foram adotadas como condições padrão/controle para a avaliação dos efeitos do pH e da temperatura durante a catálise usando a combinação de substratos xilose/frutose, com a utilização de células livres. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados por tempo de processo de 0,5 a 2,0 h.

Na primeira etapa, avaliou-se o efeito do pH na atividade de GFOR/GL compreendendo a faixa entre 5,8 e 7,6 (Figura 11).

Como observado na Figura 11, incremento na ação catalítica foi identificado com o aumento do pH entre 5,8 e 7,2. A maior atividade enzimática, de 13,60 U/g, foi alcançada em pH 7,2, valor este superior aos valores descritos para outras aldoses (MALVESSI, *et al.*, 2013; CARRA, 2012; FLORES, 2019; DELAGUSTIN, 2017). Em valores de pH superiores a 7,2 foi observado declínio na atividade enzimática de GFOR/GL. Esse perfil de aumento e posterior queda da atividade sob determinada faixa de pH também foi relatado em avaliações anteriores de pH utilizando glicose, maltose, galactose e lactose (MALVESSI *et al.*, 2013).

Figura 11 - Influência do pH na atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células livres de *Zymomonas mobilis*, em solução equimolar de xilose/frutose 700 mmol/L, a 39 °C.

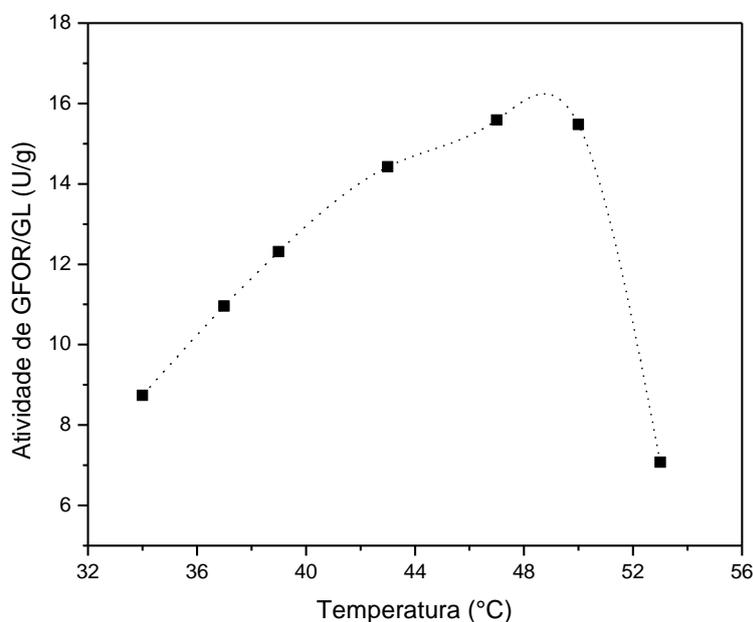


Após a determinação do efeito do pH na atividade do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis*, foi avaliado o impacto da variação de temperatura. Para essa avaliação, as reações foram conduzidas em temperaturas que variaram de 34 a 53 °C, com o pH padronizado em 6,4. Atividades enzimáticas superiores foram observadas em função do aumento da temperatura de reação (Figura 12).

Atividades médias de 15,50 U/g foram atingidas entre 47 e 50 °C. No entanto, como observado na Figura 12, altas temperaturas de reação não podem ser imediatamente assumidas como ideais para a bioconversão visando a produção de ácido xilônico e sorbitol, pois as enzimas tendem a ser inativadas em operações de longo prazo. No caso de avaliação de atividade, salienta-se o emprego de tempo de reação de 0,5 a 2,0 h e, no caso do processo de bioconversão, com a finalidade de obtenção de determinado ácido aldônico, o período médio é de 24 horas.

Por isso, destaca-se a necessidade de avaliação, além da temperatura e do pH mais favorável no ensaio de atividade, as condições de estabilidade em função do tempo de bioconversão

Figura 12 - Influência da temperatura na atividade enzimática do complexo GFOR/GL presente em células livres de *Zymomonas mobilis*, em solução equimolar de xilose/frutose 700 mmol/L, e pH 6,4.



Malvessi *et al.* (2010), em um estudo destinado a avaliar a atividade enzimática em função de diferentes valores de pH e temperatura utilizando glicose e frutose como substratos, observaram que a maior atividade enzimática foi registrada em temperaturas variando de 47 a 50 °C. Notou-se um incremento na atividade enzimática com o aumento da temperatura até 50 °C; no entanto, acima desse ponto, houve uma diminuição na atividade do complexo enzimático. Os resultados deste estudo corroboram com os obtidos no presente trabalho, o que indica que a temperatura recomendada de 39 °C não é a condição que maximiza a atividade enzimática.

Considerando estes resultados preliminares, as melhores condições para ação catalítica do GFOR/GL utilizando xilose foram alcançadas em pH de 6,8 a 7,2 e temperaturas entre 47 e 50 °C (Figura 11 e Figura 12). Adicionalmente, ensaios referentes à avaliação da estabilidade catalítica são imprescindíveis para a bioprodução de ácidos orgânicos. Para a avaliação da influência do pH e da temperatura no processo, as condições descritas na literatura para outros ácidos orgânicos como ácido glicônico, lactobiônico e maltobiônico foram usadas para a comparação com os resultados obtidos no presente estudo.

4.4 ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO COM CÉLULAS/ENZIMAS LIVRES E IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO

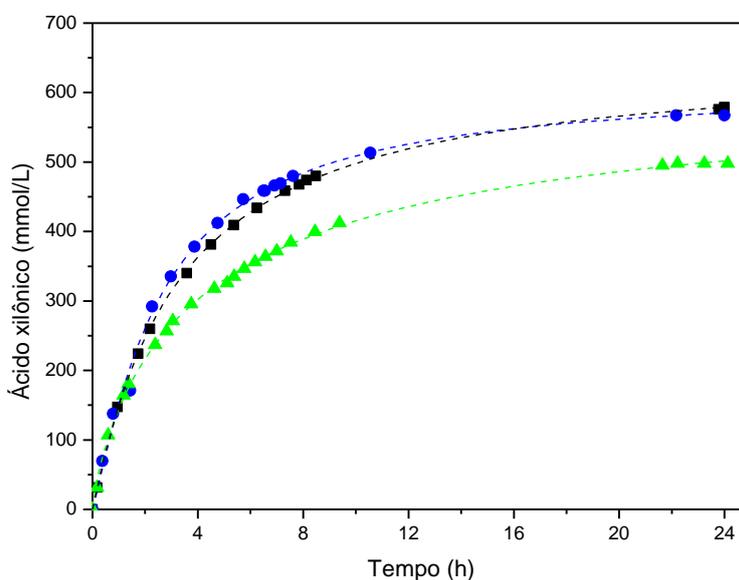
Com base nos resultados dos ensaios de atividade enzimática que avaliaram os perfis de pH e de temperatura, foram definidos os parâmetros que proporcionaram a obtenção de maior atividade de GFOR/GL para, então, conduzir os ensaios de bioconversão. Desta forma, foram avaliados os parâmetros cinéticos em relação aos valores de pH 6,4, 6,8 e 7,2, com temperatura mantida em 39 °C, e em temperaturas de 39 °C, 43 °C e 47 °C, com o pH mantido em 6,4. Salienta-se que as células/enzimas de *Z. mobilis* utilizadas em cada etapa de bioconversão foram provenientes de cultivos diferentes, o que pode, em algum nível, interferir nos resultados aqui relatados.

4.4.1 Ensaios de bioconversão com células/enzimas livres

Uma vez identificada a relação de afinidade do complexo enzimático GFOR/GL com a associação de substratos xilose/frutose, foi avaliado o perfil de bioprodução do respectivo ácido orgânico nas condições estabelecidas nos ensaios prévios de atividade enzimática, empregando células/enzimas de *Z. mobilis* livres. Primeiramente, avaliou-se o efeito da temperatura na bioconversão de xilose ao ácido xilônico, compreendendo as temperaturas de 39 °C, 43 °C e 47 °C. Os ensaios foram conduzidos em pH 6,4, com o uso de 20 g/L de células/enzimas livres e 24 h de processo.

Na Figura 13, pode ser observado o perfil da bioprodução de ácido xilônico a 39 °C, 43 °C e 47 °C, em pH 6,4 e 700 mmol/L de substratos iniciais. Ressalta-se que o perfil inicial de produção de ácido xilônico foi similar para as três temperaturas avaliadas por até aproximadamente 2,5 h de reação. Após esse período, observou-se um aumento na produção nas condições de 39 °C e 43 °C, alcançando 578 mmol/L e 567 mmol/L, respectivamente. Em contraste, na reação realizada a 47 °C foi identificado um perfil distinto, com velocidade reacional inferior, resultando na produção de aproximadamente 498 mmol/L de ácido xilônico em 24 horas de processo

Figura 13 – Cinética da formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes temperaturas, com células livres de *Zymomonas mobilis* (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, pH 6,4). (■) 39 °C; (●) 43 °C; (▲) 47 °C.



Os melhores resultados de rendimento foram identificados nas temperaturas de 39 e 43 °C, de 90,13% e 88,16%, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células livres de *Zymomonas mobilis* em diferentes temperaturas (xilose/frutose inicial, 700 mol/L; pH 6,4; 24 h de bioprodução).

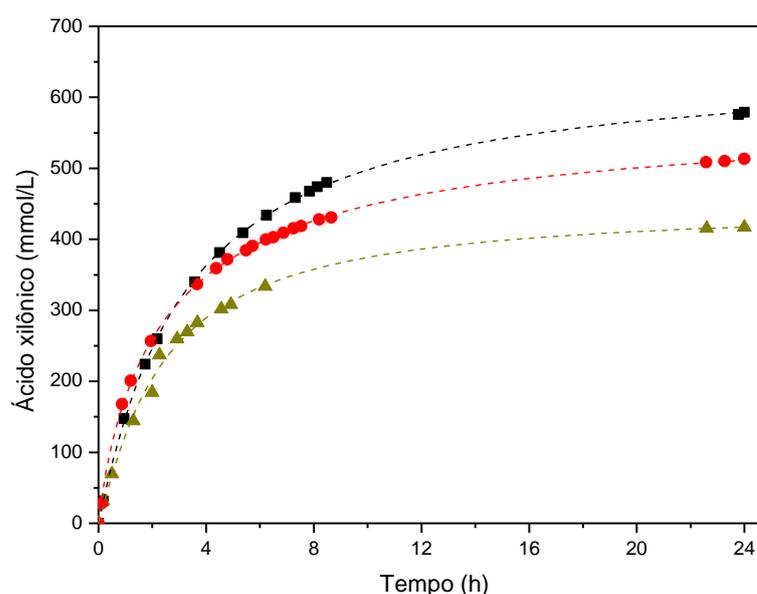
Parâmetros cinéticos	Temperatura		
	39°C	43°C	47°C
P_{Max} (mmol/L)	578,81	566,98	498,16
ρ (%)	90,13	88,16	76,61
p (mmol/L/h)	24,12	23,62	20,76
q (mmol/g/h)	1,31	1,29	1,12
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	0,90	0,88	0,77
$\mu P_{,Max}$ (mmol/g/h)	6,46	7,56	4,66
S_f (mmol/L)	63,17	76,17	151,86

P_{Max} , concentração máxima de ácido xilônico; ρ , rendimento do processo; p , produtividade; q , produtividade específica; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; $\mu P_{,Max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , xilose residual.

Como observado na Tabela 5, para o processo conduzido à temperatura de 47 °C, observou-se um decréscimo no rendimento, sendo atingido 76,61% em produto. Relacionando os valores de produtividade específica (q), pode-se considerar que a diferença identificada entre as condições de temperatura avaliadas não seria determinante para o processo, uma vez que a diferença entre o maior valor, atingido a 39°C e o menor valor, a 47 °C, é de 0,19 mmol/g/h. Observa-se que o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S0}$) entre as duas temperaturas inferiores são semelhantes, mostrando novamente que o perfil de bioconversão nessa faixa de temperatura ocorreu de forma similar. Em relação à formação de produto, em 47 °C foi relativamente inferior às temperaturas mais baixas, indicando que o complexo enzimático GFOR/GL não tem sua atividade intensificada em temperaturas mais elevadas (ZACHARIOU & SCOPES, 1986). Isso pode estar relacionado à instabilidade da proteína frente à alta temperatura reacional ao longo do processo. Carra *et al.* (2015), relatam a desnaturação da enzima em temperaturas superiores a 47 °C, influenciando negativamente a produção de ácidos orgânicos por GFOR/GL.

Na Figura 14, são apresentados os resultados da conversão de xilose em ácido xilônico em diferentes valores de pH (6,4, 6,8 e 7,2).

Figura 14 – Cinética da formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes valores de pH, com células livres de *Zymomonas mobilis* (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, 39 °C). (■) pH 6,4; (●) pH 6,8; (▲) pH 7,2.



Conforme evidenciado na Figura 14, o perfil de bioprodução de ácido xilônico até aproximadamente 3 horas de processo foi semelhante considerando os diferentes valores de pH avaliados. No entanto, após esse período, foi observado um decréscimo na velocidade de reação para o processo realizado em pH 7,2. Por sua vez, em pH 6,4 e 6,8, a taxa de produção manteve-se constante até cerca de 4 horas de reação, após o que foi notado um aumento na velocidade de reação para o pH 6,4. Conseqüentemente, as concentrações máximas de ácido xilônico obtidas foram de 578 mmol/L e 513 mmol/L em pH 6,4 e pH 6,8, respectivamente. Em contraste, a reação conduzida a pH 7,2 apresentou um perfil distinto, com uma redução de aproximadamente 28% na produção de ácido xilônico em comparação ao pH 6,8.

Flores (2019), em sua investigação sobre a produção de ácido maltobiônico a partir de xarope de maltose, reportou que a maior produção foi alcançada a pH 6,4, de concentração aproximada de 615 mmol/L. O autor destaca que no processo realizado em pH 7,0 e em valores ainda superiores, houve redução tanto na concentração final do ácido quanto na velocidade específica de formação do produto, resultado este que corrobora com o perfil identificado no presente estudo.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados gerais de bioprodução de ácido xilônico com diferentes valores de pH e utilizando-se células/enzimas livres. Conforme observado, os melhores resultados em termos de rendimento foram obtidos em valores de pH 6,4 e 6,8, sendo atingido valor máximo de 90,13% em pH 6,4. Tratando-se de produtividade, foram alcançados 24,12 mmol/L/h para o processo conduzido em pH 6,4, e 21,38 mmol/L/h considerando a bioconversão realizada em pH 6,8. De forma geral, a diferença observada na produção de ácido xilônico nas condições de pH avaliados pode estar relacionada com a faixa definida para a condução dos testes, não extrema. No processo de bioprodução conduzido em pH 7,2 foi identificado o decréscimo em termos de produtividade e rendimento de cerca de 30%, indicando que valores de pH superiores a 6,8 acarretam a diminuição da atividade da enzima, não sendo indicados, nas condições avaliadas, como melhores parâmetros para a bioprodução de ácido xilônico,

Em síntese, os resultados obtidos na avaliação de pH com células/enzimas livres indicam que a maior produção de ácido xilônico foi obtida na condição de pH padrão (6,4), assim como observado para outros ácidos adônicos produzidos utilizando-se do mesmo complexo enzimático. Tratando-se de temperatura, resultados semelhantes foram obtidos com a temperatura padrão 39 °C e 43 °C.

Tabela 6 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células livres de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39 °C, 24 h de bioprodução).

Parâmetros cinéticos	pH		
	6,4	6,8	7,2
P_{Max} (mmol/L)	578,81	513,24	417,01
ρ (%)	90,13	79,11	63,34
p (mmol/L/h)	24,12	21,38	10,04
q (mmol/g/h)	1,31	1,15	0,92
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	0,90	0,79	0,64
$\mu P_{,Max}$ (mmol/g/h)	6,46	6,12	6,07
Sf (mmol/L)	63,17	135,27	241,11

P_{Max} , concentração máxima de ácido xilônico; ρ , rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; $\mu P_{,Max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; Sf, xilose residual.

Rodzri *et al.* (2019) avaliaram alguns parâmetros físicos e operacionais para a produção de ácido xilônico a partir de D-xilose utilizando *E. coli* recombinante BL21, incluindo pH, temperatura e taxa de agitação. Os autores relataram uma produção de 9,95 g/L de ácido xilônico a partir de 10 g/L de D-xilose, sob as condições de pH 7,0, temperatura de 37 °C e taxa de agitação de 200 rpm, após 24 horas de processo.

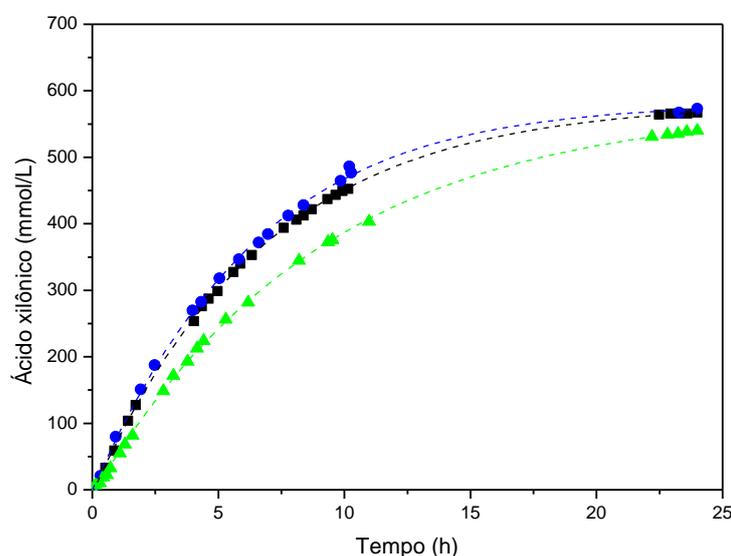
Toivari *et al.* (2012b) investigaram a produção microbiana de D-xilonato e D-gluconato por meio de um processo fermentativo utilizando *Aspergillus niger*. No estudo, os autores avaliaram a produção em uma faixa de pH entre 4,0 e 7,0, observando que a maior produção de D-xilonato foi alcançada com pH 6,5 e 7,0, após 79 horas de processo.

Embora no presente estudo seja empregado um processo distinto de bioconversão, a análise das condições operacionais revela semelhanças com os estudos mencionados, especialmente em relação à temperatura e pH empregados.

4.4.2 Ensaios de bioconversão com células/enzimas imobilizadas em alginato de cálcio

A imobilização do complexo enzimático GFOR/GL está relacionado ao confinamento das células/enzimas em alginato de cálcio, de forma que a atividade da enzima seja preservada total ou parcialmente. O perfil cinético da biossíntese de ácido xilônico com o uso de sistema imobilizado e em temperaturas de 39 °C, 43 °C e 47 °C é apresentado na Figura 15.

Figura 15 – Cinética da formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes temperaturas, com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, pH 6,4). (■) 39 °C; (●) 43 °C; (▲) 47 °C.



O comparativo da cinética de bioprodução (Figura 15) indica velocidades de formação de ácido xilônico semelhantes nas temperaturas reacionais de 39 e 43 °C durante 24 h de processo, sendo atingidas concentrações médias de produto de 567 e 573 mmol/L, respectivamente. Esses resultados são consistentes com os obtidos para a bioprodução utilizando enzimas livres, de 579 e 567 mmol/L, conforme apresentado anteriormente na Tabela 5.

No caso da bioconversão conduzida à temperatura de 47 °C, observou-se um perfil semelhante aos demais ensaios, embora com taxa de formação de produto inferior. Concentração de 540 mmol/L foi obtida, cerca de 8% superior à quantificada neste estudo com a utilização de células/enzimas livres na mesma temperatura. Com base na Figura 15, observa-se que a atividade catalítica do complexo enzimático GFOR/GL é preservada ao utilizar células/enzimas imobilizadas em alginato de cálcio em temperaturas inferiores a 47 °C.

Garin (2016), em estudos de produção de ácido maltobiônico frente à temperatura, relata a produção máxima de 590 mmol/L a 39 °C, utilizando células imobilizadas de *Z. mobilis*. Em temperaturas superiores, de 43 e 47°C, o autor relata queda na concentração média de produto formado, obtendo-se 565 mmol/L e 415 mmol/L, respectivamente. O mesmo comportamento foi relatado por Flores (2019) que, em estudo para a produção de ácido maltobiônico a partir de xarope de maltose, destaca a produção máxima de 615 mmol/L a 39 °C. Ainda, o autor aponta a queda na concentração de produto formado em temperaturas inferiores a 36°C e acima de 45°C, obtendo a menor produção em 32°C, de 466 mmol/L e produção máxima de 565 mmol/L a 50°C. Cabe ressaltar que nas condições testadas, a utilização da temperatura de 39 °C para a bioconversão seria a mais recomendável por proporcionar maior estabilidade durante o período de exposição das células/enzimas, não comprometendo a integridade do biocatalisador imobilizado. Como mencionada anteriormente, 39°C é relatada como ideal para a ação catalítica do complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* (ZACHARIOU & SCOPES, 1986; CARRA *et al.*, 2020; FOLLE *et al.*, 2018; DELLAGUSTIN *et al.*, 2017).

Na Tabela 7 estão relatados os resultados gerais de bioprodução de ácido xilônico considerando as diferentes temperaturas de reação avaliadas.

Tabela 7 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em diferentes valores de temperatura (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; pH 6,4; 24 h de bioprodução).

Parâmetros cinéticos	Temperatura		
	39 °C	43 °C	47 °C
P_{Max} (mmol/L)	566,99	572,90	539,87
ρ (%)	87,46	89,13	83,66
p (mmol/L/h)	23,43	23,87	22,49
q (mmol/g/h)	1,27	1,30	1,22
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	0,87	0,89	0,84
μP_{Max} (mmol/g/h)	3,35	4,22	3,20
S_f (mmol/L)	80,40	69,66	105,21

P_{Max} , concentração máxima de ácido xilônico; ρ , rendimento do processo; p , produtividade; q , produtividade específica; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; μP_{Max} , máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , xilose residual.

Conforme observado na Tabela 7, rendimentos e produtividades superiores foram atingidos em processo realizado à temperatura de 43 °C, de 89,13% e 23,87 mmol/L/h, respectivamente, valores estes pouco superiores ao identificado para a temperatura de 39 °C. Em se tratando de produtividade específica, observa-se uma diferença de 0,03 mmol/g/h entre as temperaturas de 39 °C e 44 °C, indicando, assim, a estabilidade na bioprodução de ácido xilônico nesta faixa de temperatura.

Nos ensaios de bioconversão realizados a 47°C, não foi identificada diferença significativa nos resultados em comparação com as outras temperaturas avaliadas. Uma redução média de 5,5% na produção máxima foi observada quando comparado ao maior rendimento atingido a 43 °C. Estes resultados demonstram a versatilidade da ação do biocatalisador imobilizado quando exposto às temperaturas reacionais de 39 a 43 °C.

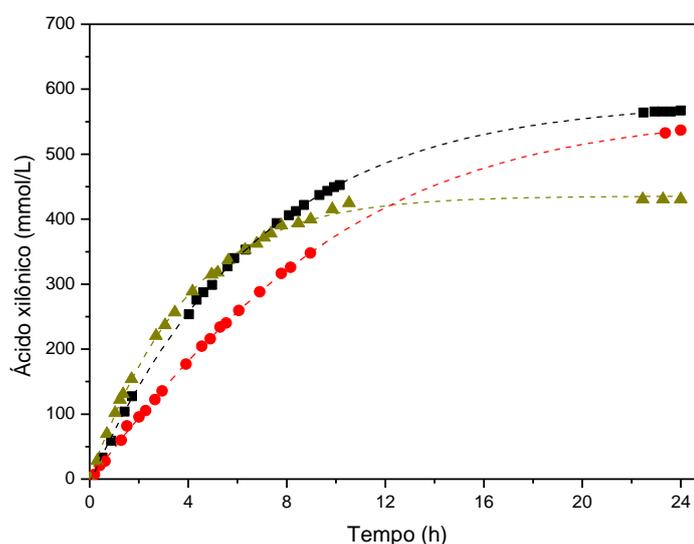
Ao comparar os resultados obtidos com células/enzimas livres no presente estudo, verifica-se uma diferença de apenas 1% entre o maior rendimento alcançado com células/enzimas livres (a 39 °C, de 578,81 mmol/L) e o observado com biocatalisadores imobilizados (a 43 °C, de 572,90 mmol/L). Essa similaridade de resultados sugere uma produção de ácido xilônico de magnitude semelhante entre os diferentes tipos de biocatalisadores usados na bioconversão.

De forma análoga ao estudo realizado com células/enzimas livres, foram avaliados os valores de pH 6,4, 6,8 e 7,2, empregando 20 g/L de células imobilizadas, a 39 °C e com concentração inicial de substratos xilose/frutose de 700 mmol/L. O perfil cinético da bioprodução de ácido xilônico em função do tempo, em processos realizados sob diferentes condições de pH, a 39 °C, é apresentado na Figura 16.

Corroborando com o resultado identificado na avaliação de pH com células livres, o perfil cinético variando o pH com o uso de biocatalisador imobilizado indica maior conversão de xilose em ácido xilônico na reação de bioconversão conduzida em pH 6,4, obtendo-se concentração final de 567 mmol/L. Para a bioconversão em pH 6,8, observa-se velocidade de produção inferior, porém constante, sendo atingido 539 mmol/L ao final de 24 h de conversão. Com relação ao perfil de produção em pH 7,2 a velocidade inicial de processo conversão por até 5 h de processo foi superior às demais. Após este período, observou-se decréscimo na velocidade reacional, finalizando a produção de ácido xilônico em 11 h de processo (Figura 16). Neste período foi quantificada concentração final de 430 mmol/L, valor este que corrobora com o identificado neste estudo para o mesmo valor pH em processo realizado com células livres, de 417 mmol/L (Tabela 6).

De forma geral, a pequena diferença observada na produção do ácido xilônico nas condições de pH e temperatura avaliados pode estar relacionada com a faixa definida para a condução dos testes. Nestas condições, processo realizado na faixa entre pH 6,4 e 6,8 e de temperatura de 39 °C e 43 °C dispensaria a necessidade de um controle mais acurado do pH e temperatura durante a bioprodução.

Figura 16 – Cinética de formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão, utilizando diferentes valores de pH com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, 39 °C). (■) pH 6,4; (●) pH 6,8; (▲) pH 7,2.



Conforme os dados apresentados na Tabela 8, no que se refere ao rendimento do processo, o melhor resultado foi alcançado com pH 6,4, de 87,46%, sendo levemente superior ao obtido no processo de bioconversão realizado em pH 6,8, de 83,17%. No ensaio realizado com pH controlado em 7,2, foi quantificado rendimento inferior, de 65,59%. Observou-se uma diferença de 0,06 mmol/g/h na produtividade específica entre os valores reacionais de pH 6,4 e 6,8, indicando uma baixa influência na produtividade dentro dessa faixa de pH.

Os valores obtidos para os parâmetros avaliados indicam uma diminuição na conversão de xilose em ácido xilônico ao se utilizar pH 7,2, resultando em uma concentração máxima de 430,93 mmol/L de ácido aldônico ao final do processo de bioprodução. Este valor é aproximadamente 24% inferior ao rendimento alcançado com pH 6,4, reação que, nas condições testadas levou à obtenção de melhor desempenho na formação de ácido xilônico (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, em diferentes valores de pH (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39 °C; 24 h de bioprodução).

Parâmetros cinéticos	pH		
	6,4	6,8	7,2
P_{Max} (mmol/L)	566,99	539,93	430,93
ρ (%)	87,46	83,17	65,59
p (mmol/L/h)	23,43	22,37	17,54
q (mmol/g/h)	1,27	1,21	0,96
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	0,87	0,83	0,66
$\mu P_{,Max}$ (mmol/g/h)	3,35	2,47	5,08
Sf (mmol/L)	80,40	108,44	225,79

P_{Max} , concentração máxima de ácido xilônico; ρ , rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; $\mu P_{,Max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; Sf, xilose residual.

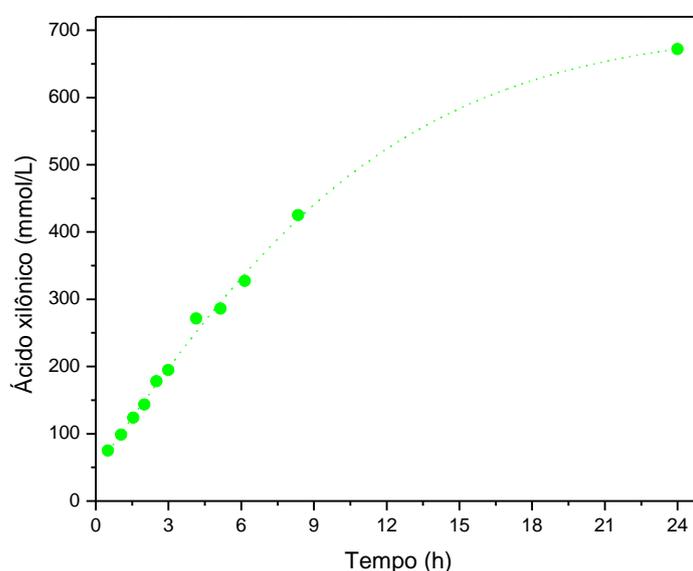
Na comparação dos resultados com células/enzimas livres e imobilizadas em alginato de cálcio, sugere-se a maior vantagem, em termos de produção de ácido xilônico, com a utilização do sistema imobilizado, o que pode ser explicado pelo efeito protetor do suporte, o que levaria à maior preservação da atividade e, portanto, estabilidade catalítica do sistema imobilizado de *Z. mobilis* (MALVESSI *et al.*, 2010; MALVESSI *et al.*, 2013; CARRA *et al.*, 2014; CARRA *et al.*, 2015; GARIN, 2016). As vantagens deste procedimento se refletem, ainda, na possibilidade de uso contínuo e repetido e, principalmente, na facilidade de separação dos produtos de bioconversão no meio (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; ZANIN & MORAES, 2004).

No estudo conduzido por Souza *et al.* (2022), foi investigada a viabilidade da produção de maltobionato de sódio utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em matriz de poliuretano, com o objetivo de comparar o desempenho biocatalítico em relação às células livres. Os resultados evidenciaram que a concentração máxima de maltobionato de sódio alcançada com células livres foi de 647,63 mmol/L, após 40,84 horas de processo. Em contrapartida, o uso de células imobilizadas permitiu atingir uma concentração ligeiramente superior, de 648,61 mmol/L, em um tempo significativamente reduzido de 34,34 horas. Esses dados indicam uma melhora na eficiência do processo quando se emprega a imobilização

celular, especialmente no que tange à redução do tempo necessário para atingir a conversão máxima.

Na sequência, avaliou-se a bioconversão de xilose ao ácido xilônico utilizando-se hidróxido de cálcio como solução alcalina, visando a formação do xilonato de cálcio como uma alternativa ao sal de sódio (xilonato de sódio) avaliado anteriormente. O perfil cinético da produção do sal de cálcio do ácido xilônico é ilustrado na Figura 17 e os resultados gerais dos parâmetros cinéticos são resumidos na Tabela 9.

Figura 17 – Cinética de formação de ácido xilônico em função do tempo, em ensaios de bioconversão visando a formação do sal de cálcio, com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, 39 °C, pH 6,4)



Como ilustrado na Figura 17, o perfil de bioprodução do xilonato de cálcio pelo sistema imobilizado GFOR/GL apresenta semelhanças com os perfis observados para o xilonato de sódio. No entanto, é possível notar um aumento na concentração de ácido formado, alcançando concentração máxima de 678,82 mmol/L, o que representa um incremento de aproximadamente 14% em relação ao valor obtido neste estudo para as mesmas condições, utilizando células livres, que foi de 578,81 mmol/L (Tabela 5). Além disso, esse dado é cerca de 15% superior ao observado na melhor condição de produção de xilonato de sódio com o uso de células imobilizadas (43 °C, pH 6,4), de 572,90 mmol/L (Tabela 7).

Conforme observado na Tabela 9, rendimento de 96,97% foi obtido em processo de bioprodução visando a formação do xilonato de cálcio, rendimento este, cerca de 10% superior ao obtido nas mesmas condições para a formação de xilonato de sódio de 87,46% (Tabela 6).

A diferença observada entre a bioconversão voltada para a formação do sal de cálcio e o sal de sódio corrobora com os resultados reportados por Flores (2019), que, em estudo sobre a produção de ácido maltobiônico, obteve rendimentos de 92% para o maltobionato de cálcio e 83% para o maltobionato de sódio, em condições experimentais semelhantes às adotadas no presente trabalho.

Tabela 9 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando hidróxido de cálcio (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39 °C, pH 6,4; 24 h de bioprodução).

Parâmetros cinéticos	Valores
P_{Max} (mmol/L)	678,82
ρ (%)	96,97
p (mmol/L/h)	23,77
q (mmol/g/h)	1,62
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	0,98
$\mu P_{,Max}$ (mmol/g/h)	8,76
S_f (mmol/L)	4,23

P_{Max} , concentração máxima de ácido xilônico; ρ , rendimento do processo; p , produtividade; q , produtividade específica; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; $\mu P_{,Max}$, máxima velocidade específica de formação de produto; S_f , xilose residual.

Tratando-se de produção de ácido xilônico por via biotecnológica, na Tabela 10 é apresentada a comparação entre os resultados obtidos neste estudo com a utilização de células livres, pH 6,4 e temperatura 39 °C, e os estudos relatados na literatura. Salienta-se as diferentes formas de obtenção de ácido xilônico, como a via de produção por processo fermentativo, em regime descontínuo ou descontínuo alimentado, a utilização de xilose purificada ou proveniente de hidrolisados, e a utilização de microrganismos geneticamente modificados.

Observa-se que o melhor resultado em termos de produtividade foi alcançado neste estudo, utilizando o complexo enzimático GFOR/GL, com produtividade de 4,01 g/L/h (Tabela 10). Em comparação, Zhang *et al.* (2019) conduziram um estudo sobre a produção de D-xilonato utilizando a cepa *Escherichia coli* W3110 em processo fermentativo que empregava D-xilose derivada de hidrolisado de sabugo de milho. Os resultados obtidos indicaram uma produtividade aproximadamente duas vezes inferior em relação à registrada no presente estudo. Da mesma forma, Herrera *et al.* (2021) realizaram um estudo voltado à produção de ácido

xilônico em processo fermentativo utilizando a cepa de *Zymomonas mobilis* modificada geneticamente. O resultado em termos de produtividade relatado pela autora é quatro vezes inferior à alcançada neste estudo, com uma produção de 56,40 g/L de ácido xilônico.

No contexto da produção de ácido xilônico, a maior concentração registrada foi alcançada por Zhang *et al.* (2019), que utilizaram *Escherichia coli* W3110, obtendo 108,2 g/L em processo fermentativo e em regime descontínuo alimentado.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 10 em comparação com os dados obtidos neste estudo revela vantagens substanciais na utilização do complexo enzimático GFOR/GL para a produção de ácido xilônico quando empregada xilose purificada como substrato. Essa abordagem se destaca, pois não requer modificações genéticas no microrganismo, permitindo alcançar produtividades elevadas que superam os valores reportados na literatura. Além disso, por ser um processo enzimático representado por oxidorredução, proporciona a obtenção de dois produtos de forma conjunta, ácido xilônico e sorbitol, os quais podem ser recuperados com o uso de solventes orgânicos, de maior facilidade e, conseqüentemente, vantagem quando comparado com o produto obtido por processo fermentativo.

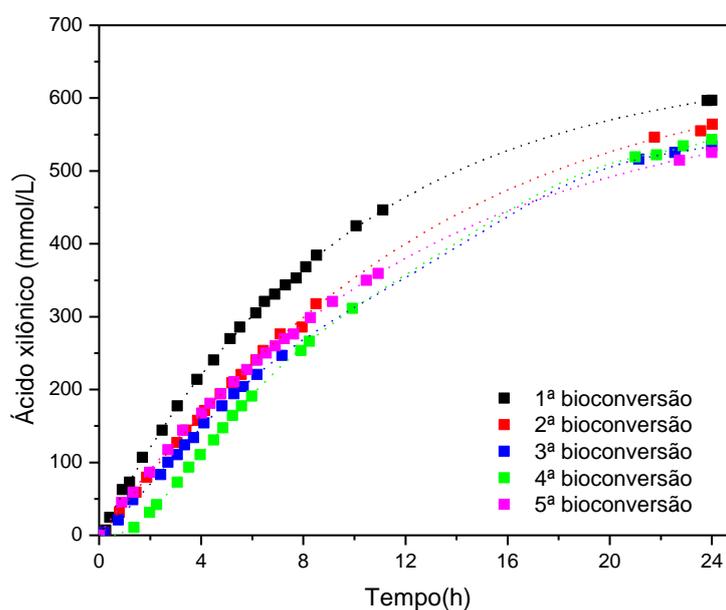
Tabela 10 - Resultados comparativos de concentração, rendimento e produtividade em ácido xilônico obtido por diferentes microrganismos.

Microrganismo	Fonte de substrato	Forma de produção	Regime de produção	pH	Concentração (g/L)	Rendimento (g/g)	Produtividade (g/L/h)	Referências
<i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 29191	Xilose purificada	Enzimática	Descontínuo	6,4	96,6	1,00	4,01	Este trabalho, (2025)
<i>Zymomonas mobilis</i> ZMa	Hidrolisado lignocelulósico	Fermentação	Descontínuo alimentado	6,0	56,4	1,08	0,99	Herrera <i>et al.</i> , (2021)
<i>Komagataella phaffii</i> kXDH-HL	Hidrolisado lignocelulósico	Fermentação	Descontínuo	5,5	37,1	0,96	0,41	Ramos <i>et al.</i> , (2021)
<i>Candida gllicerinogenes</i> CgTT-Y4.2A.SYXB	Hidrolisado lignocelulósico	Fermentação	Descontínuo	2,5	42,0	0,84	0,72	Qiao <i>et al.</i> , (2021)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H3722	Hidrolisado lignocelulósico	Fermentação	Descontínuo	5,5	16,7	0,80	0,23	Toivari <i>et al.</i> , (2012a)
<i>Escherichia coli</i> W3110	Hidrolisado de sabugo de milho	Fermentação	Descontínuo alimentado	7,0	108,2	1,09	1,80	Zhang <i>et al.</i> , (2019)

4.5 REUTILIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR IMOBILIZADO EM ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO

A utilização de células imobilizadas tem se mostrado superior à de células livres em virtude de suas vantagens inerentes, sendo a possibilidade de reutilização em ciclos sucessivos de bioconversão uma das mais relevantes. Com o intuito de avaliar a viabilidade da reutilização de células/enzimas imobilizadas em processos de bioconversão para a formação de ácido xilônico, foram conduzidos múltiplos ciclos de bioconversão com duração de 24 horas, mantidas as condições experimentais dos ensaios prévios. Na Figura 18, pode ser observado os perfis de bioprodução das bateladas realizadas e na Tabela 11, são apresentados os resultados gerais obtidos em cada batelada de bioconversão.

Figura 18 – Cinética de formação de ácido xilônico em função do tempo, em sucessivas bateladas de ensaios de bioconversão com células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* (Substrato inicial: xilose/frutose 700 mmol/L, 39 °C, pH 6,4).



Conforme observado nos perfis de formação de ácido xilônico em função do tempo (Figura 18) nota-se a maior velocidade reacional e, conseqüentemente, formação de produto no primeiro ciclo de bioconversão, de 597 mmol/L de ácido xilônico. Os perfis de velocidade entre a segunda e a quinta batelada sucessiva de produção foram, em geral similares, embora com pequena variação na concentração final de ácido xilônico, quantificadas em 24 h de processo.

A máxima velocidade específica de formação de produto (μP_{Max}) no primeiro ciclo de bioconversão foi de 3,41 mmol/L/h (Tabela 11). Nos ciclos subsequentes, observou-se uma redução na velocidade, sendo estimados valores médios entre 1,90 e 2,38 mmol/L/h considerando os ciclos 2 e 5. Essa redução na velocidade pode estar associada ao tratamento com cloreto de cálcio realizado entre as etapas de bioconversão, o que resulta em aumento da rigidez das esferas e consequente influência na transferência de massa pelo suporte. O resultado encontrado de maior rendimento para o primeiro ciclo e pequeno decaimento para os demais, está de acordo com o encontrado por Delagustin (2017), que em avaliação de bateladas sucessivas para a produção de lactobionato de potássio observou queda na bioprodução nas bateladas 2, 3 e 4, em comparação com a primeira, devido ao tratamento das células com cloreto de cálcio.

Tabela 11 - Resultados gerais sobre a bioprodução de ácido xilônico com células de *Zymomonas mobilis* em sucessivos ciclos de bioconversão de 24 horas (xilose/frutose inicial, 700 mmol/L; 39 °C, pH 6,4; 24 h de bioprodução)

	Ciclos de bioconversão				
	1°	2°	3°	4°	5°
P_{Max} (mmol/L)	597,04	564,02	534,25	543,21	525,26
ρ (%)	93,27	87,65	82,65	84,15	81,15
p (mmol/L/h)	24,88	23,50	21,84	22,65	21,88
q (mmol/g/h)	1,36	1,28	1,20	1,23	1,18
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	0,93	0,88	0,83	0,84	0,81
μP_{Max} (mmol/g/h)	3,41	2,30	1,93	1,90	2,38
Sf (mmol/L)	43,36	79,66	112,39	102,55	122,27

P_{Max} , concentração máxima de ácido xilônico; ρ , rendimento do processo; p, produtividade; q, produtividade específica; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; μP_{Max} , máxima velocidade específica de formação de produto; Sf, xilose residual.

Com base nos dados apresentados nos resultados gerais dos processos de bioprodução (Tabela 11), observa-se redução no rendimento ao longo do tempo do processo. Especificamente, o rendimento alcançado após 24 h, correspondendo ao primeiro ciclo de bioconversão, foi de 93,27%. Ao final do quinto ciclo de 24 h de produção, o rendimento em

produto foi de 81,15%. Porém, destaca-se que ao final do processo, aproximadamente 87% da atividade enzimática foi preservada. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com os relatos de Carra *et al.* (2020) que, em estudo relacionados à reutilização do biocatalisador em ensaios de bioconversão utilizando lactose e frutose como substratos, reportam a preservação de cerca de 85% da atividade enzimática inicial ao final de 193 horas de processo, correspondente a oito bateladas sucessivas de bioconversão com o uso de GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio.

4.6 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DA BIOCONVERSÃO

A etapa de precipitação dos produtos finais do processo de bioconversão foi avaliada com o intuito de obter compostos com elevado grau de pureza, tendo em vista as potencialidades de aplicação. Inicialmente, foram avaliados os solventes metanol, etanol, isopropanol, butanol, acetona, éter etílico, clorofórmio e ácido acético glacial para a realização de testes de precipitação de amostras finais de bioconversão realizada com o uso de biocatalisador imobilizados, tanto na forma de xilonato de sódio como de xilonato de cálcio.

No Quadro 1 são apresentados os resultados da análise qualitativa da precipitação dos sais de ácido xilônico frente ao uso de diferentes solventes. A precipitação parcial dos sais de ácido xilônico foi identificada com a utilização de etanol, metanol e acetona. Com base na avaliação inicial, os solventes que promoveram a precipitação do material foram selecionados para a etapa subsequente de re-solubilização em água destilada. Esse processo foi repetido por três ciclos sucessivos de precipitação e re-solubilização, empregando-se uma concentração de 70% (v/v) do solvente em cada etapa.

No caso do xilonato de sódio, como identificado na Figura 19, foi observada a formação de um precipitado de aspecto esbranquiçado e gelatinoso quando realizada a precipitação com os solventes etanol, metanol e acetona.

Quadro 1 – Diagrama qualitativo da precipitação dos produtos de bioconversão empregando-se células/enzimas de *Zymomonas mobilis* immobilizadas em alginato de cálcio, em solução contendo 700 mmol de xilose/frutose, a 39°C e pH 6,4, utilizando hidróxido de sódio, frente a diferentes compostos orgânicos. Identificação como (+) para presença de precipitação e (-) para ausência de precipitação.

Composto orgânico	Ocorrência de precipitação
Acetona	+
Ácido acético glacial	-
Butanol	-
Clorofórmio	-
Etanol	+
Éter etílico	-
Isopropanol	-
Metanol	+

Figura 19 – Aspecto visual do ensaio de precipitação de amostra resultante do processo de bioprodução de xilonato de sódio com o uso de acetona.



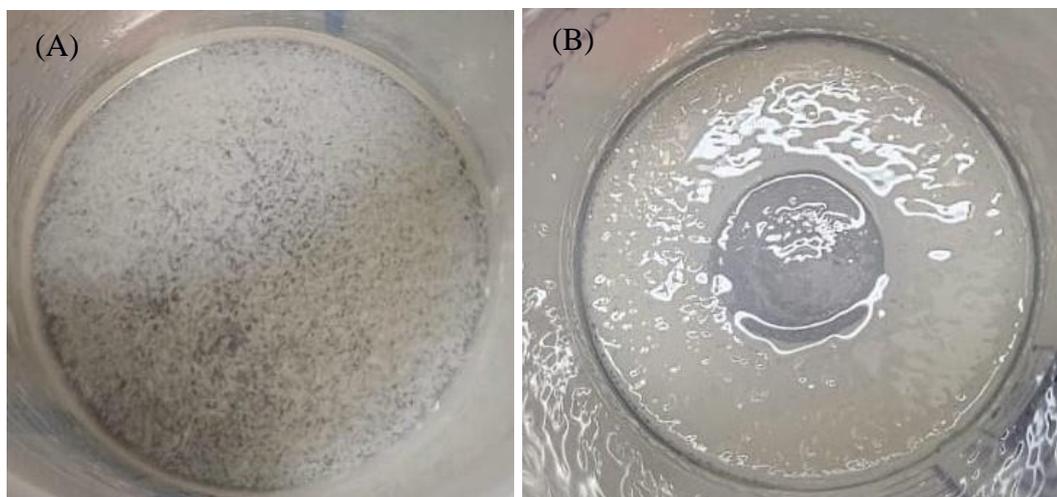
O mesmo perfil de precipitação, com formação de precipitado branco e viscoso, foi identificado com o emprego de xilonato de cálcio quando usados os solventes metanol e acetona (Quadro 2). Desta forma, os testes de precipitação foram continuados com a utilização de xilonato de cálcio e álcool etílico.

Quadro 2 – Diagrama qualitativo da precipitação dos produtos de bioconversão empregando-se células/enzimas de *Zymomonas mobilis* immobilizadas em alginato de cálcio, em solução contendo 700 mmol de xilose/frutose, a 39 °C e pH 6,4, utilizando hidróxido de cálcio, frente a diferentes compostos orgânicos. Identificação como (+) para presença de precipitação e (-) para ausência de precipitação.

Composto orgânico	Ocorrência de precipitação
Acetona	+
Ácido acético glacial	-
Butanol	-
Clorofórmio	-
Etanol	+
Éter etílico	-
Isopropanol	-
Metanol	+

Em segunda etapa, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de etanol, variando entre 60% e 90% (v/v), sobre a eficiência da precipitação. Verificou-se que a concentração de 70% (v/v) foi a que apresentou desempenho superior, promovendo a maior formação de material precipitado, concomitantemente à obtenção de um sobrenadante de maior limpidez (Figura 20). Essa condição favoreceu a separação das fases, aumentando a eficiência do processo, resultado não reproduzido nas demais concentrações avaliadas.

Figura 20 – Aspecto visual da precipitação utilizando etanol 70% (v/v) em amostras resultantes do processo de bioprodução de xilonato de cálcio (A) e xilonato de sódio (B)



Na etapa seguinte, investigou-se a influência da variação de temperatura sobre o processo de precipitação, utilizando-se temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 45 °C, mantidas por meio de banho-maria e sob agitação mecânica constante. Para os ensaios, empregou-se etanol a 70% (v/v) e amostras obtidas a partir da bioprodução de xilonato de cálcio e xilonato de sódio. No entanto, não foram observadas diferenças visuais significativas na formação dos precipitados entre as diferentes temperaturas testadas.

Mesmo sendo observado, ao término das etapas de precipitação, a parcial recuperação dos compostos, os sais de ácido xilônico e sorbitol foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), assim como as amostras finais das bioconversões. Como resultados, foram quantificados 124,50 g/L de xilonato de cálcio e 102,34 g/L de sorbitol da mistura final da bioconversão (sem tratamento com solvente) e 49,08 g/L de xilonato de cálcio e 10,93 g/L de sorbitol, após o processo de precipitação e separação. No entanto, 202,10 g/L de xilonato de sódio e 157 g/L de sorbitol da mistura final da bioconversão (sem tratamento com solvente) e 92,51 g/L de xilonato de sódio e 25,72 g/L de sorbitol, após o processo de precipitação. Esses dados refletem rendimento de 45,80% para o processo de bioprodução de xilonato de sódio e de 39,40% para o processo com xilonato de cálcio.

Considerando os resultados apresentados, é evidente que a metodologia avaliada até o momento não se mostrou eficaz para o propósito de recuperação dos produtos de bioconversão. Torna-se necessária a otimização do método empregado ou implementação de novos procedimentos para melhorar a eficiência da recuperação.

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram a potencialidade do emprego do complexo enzimático GFOR/GL, presente em células de *Z. mobilis*, na bioconversão de xilose e frutose em ácido xilônico em sorbitol, respectivamente.

Na etapa inicial avaliou-se a cinética enzimática da associação de substratos xilose/frutose, obtendo-se $K_M(\text{Xilose})$ de 0,24 mol/L e $K_M(\text{Frutose})$ de 0,09 mol/L. Os resultados obtidos a partir da ação do complexo enzimático GFOR/GL presente em células livres de *Z. mobilis*, para esses substratos, ajustam-se à cinética de Michaelis-Menten. Com base nesses resultados foi possível identificar a xilose como substrato limitante da reação enzimática.

Por meio dos ensaios de atividade enzimática realizados com variação de temperatura e pH, a maior atividade do complexo GFOR/GL foi determinada na faixa de temperatura entre 39 e 43 °C. Considerando o efeito do pH sobre a ação catalítica de GFOR/GL, melhores resultados foram atingidos na faixa de pH entre 6,4 e 7,2.

Com base nos dados obtidos nos ensaios de atividade enzimática, foram realizados experimentos de bioprodução para a produção de ácido xilônico e sorbitol, os quais levaram em consideração os parâmetros previamente definidos e com o uso de células/enzimas de *Z. mobilis* tanto em sua forma livre quanto imobilizadas em alginato de cálcio. Nos ensaios de bioprodução com células/enzimas livres, os rendimentos superiores de 90% e 88% foram associados a temperatura de 39°C e pH 6,4, e de 43°C também com pH 6,4, respectivamente. Em relação aos ensaios de bioprodução com o biocatalisador imobilizado em alginato de cálcio, dados superiores em termos de rendimento em produtos foram identificados nos processos de bioprodução conduzidos a 43°C e pH 6,4, e a 39°C e pH 6,4, com rendimentos de 89% e 87%, respectivamente.

Relacionado ao ensaio de bioprodução visando a formação do xilonato de cálcio, rendimento de 96% foi obtido.

Nos testes de reutilização do biocatalisador imobilizado, foram obtidos resultados médios de 87% em termos de preservação da atividade enzimática inicial após cinco ciclos sucessivos de 24 h de bioprodução, indicando a aplicabilidade do uso do sistema GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio para a produção de ácido xilônico e sorbitol.

No que se refere à precipitação e purificação dos xilonatos de sódio e cálcio e sorbitol, os ensaios preliminares indicaram um desempenho superior na precipitação com a utilização de etanol 70% (v/v); em relação aos ensaios de temperatura, não foram observadas alterações visuais significativas durante a etapa de precipitação dos produtos. Considerando os dados atingidos com o emprego do referido método para a separação dos produtos, indica-se a necessidade de otimização do processo para melhorar a eficiência da recuperação.

6 PERSPECTIVAS

Como continuidade deste estudo, propõem-se as seguintes direções para pesquisas futuras:

- Aprofundamento de estudos de precipitação e purificação dos produtos das bioconversões, visando otimizar o rendimento da recuperação dos xilonatos e do sorbitol;
- avaliação de estudos de bioprodução de ácido xilônico e seus sais utilizando xilose derivada da fração hemicelulósica de biomassas lignocelulósicas, visando à valorização de resíduos agroindustriais;
- investigação sobre a aplicabilidade tecnológica dos xilonatos de modo a agregar valor aos bioprodutos obtidos.

7 REFERÊNCIAS

Alisherovna, K. M., Erkinovna, K. Z., Davranovna, M. K., & Pulotovna, Z. D. 2022. Positive Effect of Sorbitol in Patients with Chronic Renal Insufficiency. *Miasto Przyszłości*, 30, 214–217.

Bañares, A. B., Nisola, G. M., Valdehuesa, K. N. G., Lee, W. K., Chung, W. J. 2021. Understanding D-xylonic acid accumulation: a cornerstone for better metabolic engineering approaches. *Applied and Microbiol Biotechnology*. 105, 5309–5324.

Bon, E., Corvo, M. L., Vermelho, A. L., Paiva, C. L. A. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. 2008, 1^{ed}. Rio de Janeiro: Interciência. 506p.

Bourdichon, F., *et al.* 2012a. A safety assessment of microbial food cultures with history of use in fermented dairy products. *Bulletin of IDF*. 455, 2–12.

Bourdichon, F., *et al.* 2012b. Building an inventory of microbial food cultures with a technological role in fermented food products. *Bulletin of IDF*. 455, 13–21.

Borzani, W.; Schimidell, W; Lima, U. A., Aquarone, E. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 2019, 2^{ed}. São Paulo: Edgard Blucher Ltda.

Carra, S. Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. *Dissertação de Mestrado*. 2012, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.

Carra, S.; Rodrigues, D. C.; Beraldo, N. M. C.; Silveira, M. M.; Bassani, V. L.; Malvessi, E. Reuso de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácido lactobiônico. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. *Anais*. Fortaleza, 2015.

Carra, S., Rodrigues, D. C., Beraldo, N. M. C., Folle, A. B., Delagustin, M. G., Souza, B. C., Reginatto, C., Polidoro, T. A., Silveira, M. M., Bassani, V. L., Malvessi, E. 2020. High lactobionic acid production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells: a great step for large-scale process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 1265–1276.

Chemenu. Ácido D-xilônico. *Disponível (online)* 2021, <https://www.chemenu.com/products/CM229937> (acessado 29 de julho de 2021).

Cowan, D. A.; Fernandez-Lafuente, R. 2011. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 49, 4, 326-346.

Delagustin, M.G. Caracterização do ácido lactobiônico e de diferentes lactobionatos produzidos por *Zymomonas mobilis* visando à utilização na área farmacêutica. *Dissertação de Mestrado*. 2016, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

Delagustin, M.G.; Gonçalves, E.; Carra, S.; Barcellos, T.; Bassani, V.L.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. 2017. Bioproduction and characterization of sodium, potassium, and calcium lactobionates. *Química Nova*. 40, 9, 1003-1008.

Doelle, H. W.; Gumbira-Sa'Id, E.; Greenfield, P. F.; Mitchell, D. A. 1993. Operational parameters for packed beds in solid-state cultivation. *Biotechnology Advances*. 11, 599-610.

Duvnjak, Z.; Turcotte, G.; Duan, Z. 1991. Production of sorbitol and ethanol from jerusalem-artichokes by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC-36859. *Applied Microbiology Biotechnology*. 35, 711-715.

Draber K. M. M. Etanol de segunda geração já é realidade. *Monografia*. 2013, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Ferraz, H. C., Borges, P. C., Alves, M. L. T. 2000. Sorbitol and Gluconic Acid Production Using Permeabilized *Zymomonas mobilis* Cells Confined by Hollow-Fiber Membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 89, 1, 43-54.

Fernandes, K; Lima, C. S.; Lopes, F. M. 2010. Técnicas de imobilização de enzimas. *Revista Processos Químicos*. 4(7):53-58.

Flores, M. L. Síntese biocatalítica, recuperação e caracterização físico-química do ácido maltobiônico. *Dissertação de Mestrado*. 2019, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

Folle, A. B.; Carra, S.; Malvessi, E.; Silveira, M. M. Inviabilização do metabolismo de *Zymomonas mobilis* por glutaraldeído para a obtenção de sorbitol e ácido glucônico. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. *Anais*. Fortaleza, 2016.

Folle, A. B., Bachera, V. M., Vivan, L. T., Carra, S., Polidoro, T. A., Malvessi, E., Silveira, M. M. 2018. Assessment of different systems for the production of aldonic acids and sorbitol by calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 41, 2, 185-194. doi: 10.1007/s00449-017-1856-1.

Francois, J. M., Alkim, C., Morin, N. 2020. Engineering microbial pathways for production of bio-based chemicals from lignocellulosic sugars: current status and perspectives. *Biotechnology for Biofuels*. 13, 118-131.

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

Garin, D. Uso do sistema enzimático de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácidos maltobiônico e lactobiônico. *Dissertação de Mestrado*. 2016. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

García, B., Moreno, J., Morales, G., Melero, J. A., Iglesias, J. 2020. Production of Sorbitol via Catalytic Transfer Hydrogenation of Glucose. *Applied Sciences*. 10, 1843-1855.

Gupta, S.K. Hydroxy Acid Complexes for Antiaging and Skin Renovation. United States Patent 2009, 7,547,454.

Handojo, L., Wardani, A. K., Regina, D., Bella, C., Kresnowati, M. T. A. P., Wenten, I. G. 2019. Electro-membrane processes for organic acid recovery. *RSC Advances*, 9, 7854-7869.

Hardman, M. J.; Scopes, R.K. 1988. The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *European Journal of Biochemistry*, 173, 203-209.

He, M., Wu, B., Qin, H., Ruan, Z., Tan, F., Wang, J., Hu, Q. 2014. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*. 7, 101.

Herrera, C. R. J., Vieira, V. R., Benoliel, T., Carneiro, C. V. G. C., Marco, J. L., Moraes, L. M. P., Almeida, J. R. M., Torres, F. A. G. 2021. Engineering *Zymomonas mobilis* for the Production of Xylonic Acid from Sugarcane Bagasse Hydrolysate. *Microorganisms*, 9, 1372-1386.

Herrera, C. R. J. Engenharia metabólica de *Zymomonas mobilis* para a produção de ácidos orgânicos a partir de xilose. *Tese de Doutorado*. 2021, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Hustede, H; Haberstroh, H. J.; Schinzig, E. 1985. Gluconic acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 12, 2449-2456.

Jokic, A., Ristic, N., Jaksic, M. M., Spasojevic, M., & Krstajic, N. 1991. Simultaneous electrolytic production of xylitol and xylonic acid from xylose. *Journal of Applied Electrochemistry*. 21, 321-326.

Justen, F. Produção de Ácido Xilônico por *Komagataella phaffii*. *Dissertação de Mestrado*. 2017, Curso de Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I., Marchant, R., Koutinas, A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 21, 4, 377-397.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangoan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V. 2007. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 142, 2, 105–124.
- Lima, O. G., Schumacher, I. E. e Araújo, J. M. 1972. New observations about the antagonist effects of *Zymomonas mobilis* var *recifensis*, ecological aspects of some problems in microbiology. *Revista do Instituto de Antibióticos*. 12, 57- 68.
- Luo, J., Huang, K., Zhou, X., & Xu, Y. 2020. Preparation of highly flexible and sustainable lignin-rich nanocellulose film containing xylonic acid (XA), and its application as an antibacterial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1565-1571.
- Lv, Y., Yu, Q., Han, J., Ding, Z., Zhang, X., Xu, Y. 2024. An effective method for the direct crystallization of xylonic acid from fermentation broth of agricultural residue hydrolysate. *Industrial Crops & Products*, 207, 117704-117711.
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R.M., Ibrahim, A. H., Azzazy, H. M. E. S. 2023. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, 8, 5184-5196.
- Malvessi, E.; Concatto, K.; Carra, S.; Silveira, M.M. 2006. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49, 139-144.
- Malvessi, E. Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. *Tese de Doutorado*. 2008, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Malvessi, E., Carra, S., da Silveira, M. M., Ayub, M. A. Z. 2010. Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose–fructose oxidoreductase/glucono- δ -lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. *Biochemical Engineering Journal*, 51(1-2), 1–6.
- Malvessi, E.; Carra, S.; Pasquali, F. C.; Kern, D. B.; Silveira, M. M.; Ayub, M. A. Z. 2013. Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 40, 1–10.
- Markham, R.G. Compositions and Methods for Administering Therapeutically Active Compounds. Australian Patent. 1992, AU-B-43288/89.

- Mehtiö, T., Toivari, M., Wiebe, M. G., Harlin, A., Penttilä, M., Koivula, A. 2016. Production and applications of carbohydrate-derived sugar acids as generic biobased chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. 36, 5, 904–916.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
- Murillo Leo, I., López Granados, M., Fierro, J. L. G., Mariscal, R. 2016. Selective conversion of sorbitol to glycols and stability of nickel–ruthenium supported on calcium hydroxide catalysts. *Applied Catalysis. B Environmental*. 185, 141-149.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 82170, L-Glucitol. *Disponível (online) 2025*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Glucitol> (accessado 22 de janeiro).
- Nygård, Y., Maaheimo, H., Mojzita, D., Toivari, M., Wiebe, M., Resnekov, O., Penttilä, M. 2014. Single cell and in vivo analyses elucidate the effect of xylC lactonase during production of D-xylonate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. 25, 238 -247.
- Ochoa-Gómez, J. R., Roncal, T. 2017. Production of sorbitol from biomass. *Biofuels and Biorefineries*. 265-309.
- Pedruzzi, I.; Silva, E. A. B.; Rodrigues, A. E. 2011. 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*. 49, 183-191
- Peruzzo, F. M.; Canto, E. L. *Química na Abordagem do Cotidiano: Manual do Professor*. 2010, 4ª edição. São Paulo: Moderna.
- Pessoa Junior, A.; Kilikian, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. 2005. Barueri: Manole.
- Pezzotti, F.; Therisod, M. 2006. Enzymatic synthesis of aldonic acids. *Carbohydrate Research*, 13, 2290-2292.
- Pujos, P.; Jijakli, M.H. Compositions for use against One or More Pathogens. United States Patent 2014, 8,828,450,9.
- Qiao, Y., Li, C., Lu, X., Zong, H., & Zhuge, B. 2021. Transporter engineering promotes the co-utilization of glucose and xylose by *Candida glycerinogenes* for d-xylonate production. *Biochemical Engineering Journal*. 175, 108150.
- Ramos T. G. S., Justen, F., Carneiro, C. V. G. C., Honorato, V. M., Franco, P. F., Vieira, F. S., Trichez, D., Rodrigues, C. M., Almeida, J. R. M. 2021. Xylonic acid production by

recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases. *Bioresource Technology Reports*. 16, 100825.

Raimundo, G. M. Desenvolvimento do processo contínuo de produção de xaropes concentrados de açúcar invertido. *Dissertação de Mestrado*. 2003. Centro de Tecnologia e Geociências. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brasil.

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

Rice, T., Zannini, E., K. Arendt, E., Coffey, A. 2019. A review of polyols – biotechnological production, food applications, regulation, labeling and health effects. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2034-2051.

Rodzri, N.A.M., Zain, W. S. W. M., Hanapiah, R. M. A., Samah, R. A., Illias, R. M. 2019. Effect of Physical Parameters on Production of D-Xylonic Acid using Recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Materials Today: Proceedings*. 19, 1247-1254.

Sakukuma, M. C. K. Síntese total de ácidos 4-nitrofenilglucônicos empregando organocatálise. Síntese de fragmentos funcionalizados. *Tese de Doutorado*. 2017, Curso de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

Sassolas, A., Blum, L. J., Leca-Bouvier, B. D. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30, 3, 489-511.

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

Severo Júnior, J. B. Síntese biocatalítica do sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea por eletrodiálise. *Dissertação de Mestrado*. 2008. Ciências em Engenharia Química. Universidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

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

Silveira, M.M.; Malvessi, E.; Carra, S.; Pasquali, F.C.; Polidoro, T.A. Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácidos orgânicos ou seus sais, preparação de elevada pureza isomérica de ácidos orgânicos ou seus sais. Patente de invenção 2007, INPI, PI 0700421-4.

Souza, R. C., Silva, L. M., Carra, S., Flores, M., Puton, B. M., Malvessi, E., Valduga, E., Zeni, J. 2022. High-sodium maltobionate production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells in polyurethane. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 45, 1465–1476.

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

Swings, J.; De Ley, J. 1997. The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriology Reviews*. 41, 1.

Toivari, M. H., Ruohonen, L., Richard, P., Penttilä, M., Wiebe, M. G. 2010. *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88, 3, 751-760.

Toivari, M., Nygård, Y., Kumpula, E.-P., Vehkomäki, M.-L., Benčina, M., Valkonen, M., Wiebe, M. G. 2012a. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate. *Metabolic Engineering*. 14, 427-436.

Toivari, M. H., Ruohonen, L., Richard, P., Penttilä, M., Wiebe, M. G. 2012b. Microbial d-xylonate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96, 1, 1-8.

Van Heerden, C., Bosman, C. E., Farzad, S., Gorgens, J. F. 2024. Techno-economics and environmental assessment of sorbitol and itaconic acid production from sugarcane-based feedstock. *Chemical Engineering Science*. 299, 120431.

Viikari, L. 1986. By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Reviews in Biotechnology*. 7, 237-261.

Vujcic, Z.; Miloradovic, Z.; Milovanovic, A.; Bozic, N. 2011. Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel. *Food Chemistry*. 126, 236-240.

Wang, X., He, Q., Yang, Y., Wang, J., Haning, K., Hu, Y., Yang, S. 2018. Advances and Prospects in Metabolic Engineering of *Zymomonas mobilis*. *Metabolic Engineering*. 50, 57-73.

Werpy T. A. Petersen, G. 2004. Top value added chemicals from biomass: I. results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. *U. S. Dep Energy*. 1, 76.

Wisbeck, E., Nimow, J., Jonas, R., Silveira, M. 1997. Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. *Journal of Basic Microbiology*. 37, 6, 445-449.

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

Zanin, G. M.; Moraes, F. F. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. 2004, 4 ed., Legis Summa: Ribeirão Preto.

- Zhang, H., Han, X., Wei, C., Bao, J. 2017. Oxidative production of xylonic acid using xylose in distillation stillage of cellulosic ethanol fermentation broth by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, 224, 573-580.
- Zhang, M., Zhang, L., Li, M., Sun, Q. 2021. Inhibitory effects of sorbitol on the collapse and deterioration of gluten network in fresh noodles during storage. *Food Chemistry*, 344, 128638
- Zhang, X., Chen, G., Liu, W. 2009. Reduction of xylose to xylitol catalyzed by glucose–fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 293 (2), 214–9.
- Zhang, Y., Guo, S., Wang, Y., Liang, X., Xu, P., Gao, C., Ma, C. 2019. Production of d-Xylonate from corn cob hydrolysate by a metabolically engineered *Escherichia coli* Strain. *ACS Sustainable Chemical Engineering*, 7, 2160–2168.