UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS E TECNOLOGIAS

APERFEIÇOAMENTO DA TÉCNICA DE PREPARO DE BIOCATALISADOR IMOBILIZADO PARA A OBTENÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO

ANALIA BORGES FOLLE

Caxias do Sul, 2017

ANALIA BORGES FOLLE

APERFEIÇOAMENTO DA TÉCNICA DE PREPARO DE BIOCATALISADOR IMOBILIZADO PARA A OBTENÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos, orientada pelo Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira e co-orientado pela Profa. Dra. Eloane Malvessi.

F667a Folle, Analia Borges

Aperfeiçoamento da técnica de preparo de biocatalisador imobilizado para a obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol em diferentes sistemas de produção / Analia Borges Folle. – 2017. 87 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2017. Orientação: Mauricio Moura da Silveira. Coorientação: Eloane Malvessi.

 Zymomonas mobilis. 2. glicose-frutose oxidorredutase / gliconoδ-lactonase. 3. imobilização em alginato de cálcio. 4. regime de operação. 5. reatores. I. Silveira, Mauricio Moura da, orient. II. Malvessi, Eloane, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

"Aperfeiçoamento da técnica de preparo de biocatalisador imobilizado para a obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol em diferentes sistemas de produção"

Analia Borges Folle

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 19 de maio de 2017.

Banca Examinadora:

Dr. Mauricio Moura da Silveira – orientador Universidade de Caxias do Sul

Dra. Eloane Malvessi – Co-orientador Universidade de Caxias do Sul

Dr. Gilmar Sidnei Erzinger Universidade da Região de Joinville

Dr. Thiago Barcellos da Silva Universidade de Caxias do Sul

Dr. Aldo José Pinheiro Dillon Universidade de Caxias do Sul

A minha família, meu bem maior.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que eu chegasse até aqui e por todas as pessoas especiais que colocou na minha vida.

À Universidade de Caxias do Sul e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

Aos membros da banca de avaliação, Dr. Gilmar Sidnei Erzinger, Dr. Thiago Barcellos da Silva e Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, pela disponibilidade de avaliação e pelas importantes contribuições. Aos integrantes da banca de acompanhamento, Dr. Lademir Luiz Beal e Dra. Fernanda Bettin, pela dedicação nas correções e sugestões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira, exemplo de professor, orientador e pesquisador; por toda a troca de ideias, por todos os ensinamentos, tenham sido eles na área acadêmica ou para a vida, obrigada por me guiar pelo caminho certo e, acima de tudo, pelo exemplo de conduta e caráter.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Eloane Malvessi, pelos ensinamentos e paciência, pela incessante busca por conhecimento, pela companhia nos meios-dias do laboratório, pelas amostras durante à noite e, acima de tudo, pela sua amizade e por sua alegria.

À técnica MSc. Sabrina Cara, que esteve comigo desde o início do trabalho e em todas as etapas do seu desenvolvimento, pela ajuda na interpretação e na discussão dos resultados, por todo auxílio às bolsistas quando eu não pude estar presente, pelas infinitas amostras no HPLC, por estar sempre disposta a me ajudar, ouvir minhas lamentações e por me incentivar a nunca desistir. Enfim, por estar sempre pronta para me socorrer.

As minhas bolsistas de iniciação científica, Victoria Maria Baschera e Luiza Tessaro Vivan, pelo comprometimento e contribuição na execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, pelo companheirismo, amizade e por toda a troca de conhecimentos.

Aos laboratórios da universidade, em especial, ao Laboratório de Enzimas e Biomassa, Laboratório de Óleos Essenciais e ao Laboratório de Tecnologias Ambientais pela disponibilidade de equipamentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, por todas as contribuições na etapa de construção do conhecimento.

A quem se tornou uma grande amiga, Caroline Hartmann, pela amizade e

companheirismo, por todos os cafés, conversas e por outros tantos momentos de descontração que tornaram esta caminhada mais leve e fácil.

Aos amigos Débora Muniz de Souza e Jhonattas Muniz de Souza, por terem me acolhido na sua casa; por todas as risadas, conselhos e trocas de experiências.

Aos meus pais, Pedro Folle e Ireni Borges Folle, agradeço pelo apoio incondicional, pela paciência e por acreditarem sempre na minha capacidade, me incentivando a lutar por meus objetivos. Vocês são meu bem mais precioso, obrigada pela nossa família e por todo o esforço sempre. Eu amo vocês.

Ao Fernando Matana, meu companheiro, amigo e quem sempre esteve ao meu lado, tolerando minhas oscilações de humor; por tanto carinho e cuidado, especialmente nesta fase da minha vida. Ainda, agradeço, pelas horas como bolsista e por todos os finais de semana me fazendo companhia no laboratório.

Agradeço, por fim, a todas as pessoas que contribuíram das mais diferentes formas para que eu me tornasse quem sou hoje.

LIS	STA DE TABELAS	. I
LIS	STA DE QUADROSI	Π
LIS	STA DE FIGURAS l	[V
LIS	STA DE ABREVIATURAS	VI
RE	SUMOVI	Π
AB	STRACT	X
1	INTRODUÇAO	.1
2	OBJETIVOS	.3
2.1	OBJETIVO GERAL	.3
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	.3
3	REFERENCIAL TEÓRICO	.4
3.1	ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL: CARACTERÍSTICAS, APLICAÇÕES E PRODUÇÃO	.4
3.2	CARACTERÍSTICAS E METABOLISMO DE Zymomonas mobilis	.6
3.3	COMPLEXO ENZIMÁTICO GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE / GLICONO-δ-LACTONASE	.8
3.3.	1 Uso da lactose como substrato para glicose-frutose oxidorredutase	10
3.4	IMOBILIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES	12
3.4.	1 Alginato de cálcio como suporte para imobilização	14
3.4.	2 Glutaraldeído: características e aplicações	17
3.4.	3 Produção de ácido lactobiônico e sorbitol com células de Zymomonas mobi imobilizadas em alginato de cálcio	lis 21
3.5	BIORREATORES PARA BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS: CARACTERISTICAS E CONFIGURAÇÃO	22
3.5.	1 Aplicação de diferentes reatores e regimes de operação em reação co biocatalisadores imobilizados em alginato de cálcio	m 25
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	MICRORGANISMO	28
4.2	PROCESSO CONVENCIONAL PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO I SORBITOL	E 28
4.2.	1 Meios e condições de cultivo microbiano	29
4.2.	2 Permeabilização celular	30
4.2.	3 Reticulação com glutaraldeído	30
4.2.	4 Imobilização celular	30
4.2.	5 Ensaios de bioconversão	31
4.3	EXPERIMENTOS REALIZADOS	32
4.3.	1 Avaliação de condições de imobilização de Zymomonas mobilis em alginato cálcio	de 32

SUMÁRIO

4.3.2	2 Avaliação de métodos de inviabilização do metabolismo fermentativo de Zymomon mobilis	as 35
4.3.3	3 Estabilidade do sistema imobilizado em diferentes condições de estocagem	37
4.4	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA LACTOSE E DO SAL DE LACTOBIONATO EM ÁGUA	38
4.5	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL	38
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	40
4.6.1	1 Determinação da concentração celular	40
4.6.2	2 Determinação da concentração de açúcares redutores	41
4.6.3	3 Estimativa das concentrações de substratos e produtos nos ensaios bioconversão	de 41
4.6.4	4 Determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidorreduta e glicono-δ-lactonase	ise 42
4.7	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	42
4.7. 1	1 Fator de conversão de substrato inicial em produto	42
4.7.2	2 Produtividades volumétrica e específica	43
4.7.3	3 Velocidade específica de formação de produtos	43
4.7.4	4 Análise estatística dos resultados	44
5 5.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45 45
5.1.1	1 Efeito da variação das concentrações de alginato de sódio e da solução de cloreto cálcio	+3 de 45
5.1.2	2 Efeito do tempo de gelificação do alginato com cloreto de cálcio e reutilização biocatalisador imobilizado	do 48
5.2	AVALIAÇÃO DA INVIABILIZAÇÃO DO METABOLISMO FERMENTATIVO DE Zymomonas mobilis	51
5.3	AVALIAÇÃO DA BIOCONVERSÃO COM A BIOMASSA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO E ISENTA DE TRATAMENTO	53
5.3.1	1 Bioconversão com células livres	53
5.3.2	2 Bioconversão com células imobilizadas	62
5.4	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM CÉLULAS DE Zymomonas mobilis IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM	65
5.5	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL	68
6	CONCLUSÃO	78
7	REFERÊNCIAS	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento de experimentos codificados e decodificados para a concentração de alginato de sódio (A1) e cloreto de cálcio (A2) na imobilização das células de Zymomonas Tabela 2. Fatores codificados e decodificados resultantes do uso da ferramenta central composite design (CCD- 3²) para avaliar os efeitos da concentração de alginato de sódio e da concentração da solução CaCl₂ na máxima velocidade específica de formação dos produtos e **Tabela 3.** Percentual de redução na máxima velocidade específica de formação dos produtos entre a primeira bioconversão e a repetição, utilizando o biocatalisador imobilizado em diferentes concentrações de alginato de sódio47 Tabela 4. Resultados gerais para ensaios repetidos de bioconversão com células de Zymomonas mobilis imobilizadas em alginato de cálcio com diferentes tempos de gelificação em solução de Tabela 5. Resultados gerais referentes aos sucessivos ensaios de bioconversão com o biocatalisador imobilizado em alginato de cálcio 2% (m/v).50 **Tabela 6.** Consumo de substrato por células de Zymomonas mobilis não tratadas ou tratadas com brometo de cetil trimetil amônio e glutaraldeído, após 20 h de incubação em condições de **Tabela 7.** Atividade das enzimas glicose-frutose oxidorredutase e glicono- δ -lactonase presente em células de Zymomonas mobilis não tratadas e tratadas com brometo de cetil trimetil amônio Tabela 8. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com células livres de Zymomonas mobilis não tratadas e tratadas com glutaraldeído, em reações com 400 mmol/L de glicose e frutose......54
 Tabela 9. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com
 células livres de Zymomonas mobilis não tratadas e tratadas com glutaraldeído, em reações com Tabela 10. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com células livres de Zymomonas mobilis não tratadas e tratadas com glutaraldeído, em reações com Tabela 11. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com

células livres de Zymomonas mobilis não tratadas e tratadas com glutaraldeído, em reações com Tabela 12. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com células de Zymomonas mobilis, sem tratamento prévio e previamente tratadas com glutaraldeído, imobilizadas em alginato de cálcio sob diferentes concentrações inicias de substratos63 Tabela 13. Resultados gerais dos ensaios de bioconversão com células de Zymomonas mobilis imobilizadas em alginato de cálcio, com diferentes condições de tratamento em 120 dias de armazenagem......67 Tabela 14. Resultados gerais de produção de ácido lactobiônico em diferentes condições de Tabela 15. Resultados gerais para ensaios de bioconversão de Zymomonas mobilis imobilizadas em reator de agitação mecânica com 20 g/L e 30 g/L de biocatalisador imobilizado Tabela 16. Resultados gerais para ensaios de bioconversão de Zymomonas mobilis imobilizadas em reator de agitação mecânica com 20 g/L e 30 g/L de biocatalisador imobilizado em regime descontínuo alimentado......71 Tabela 17. Resultados gerais para ensaios de bioconversão de Zymomonas mobilis imobilizadas em reator tubular com agitação pneumática em regime descontínuo e descontínuo alimentado74

LISTA DE QUADROS

Quadro	1.	Utilização	de	diferentes	configurações	de	reatores	para	biocatalisadores
imobiliza	dos	em alginato	de c	álcio		•••••		•••••	
Quadro 2. Condições testadas para tratamento nas células em diferentes concentrações iniciais									
de substratos nos ensaios de bioconversão36									
Quadro 3. Condições avaliadas nos ensaios de bioconversão com diferentes reatores e regimes									
de operaç	ão.								40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido lactobiônico
Figura 2. Metabolismo de carboidratos de Zymomonas mobilis (CARRA, 2012)7
Figura 3. Mecanismo de ação das enzimas glicose-frutose oxidorredutase (GFOR) e glicono-
δ-lactonase (GL) de Zymomonas mobilis (ZACHARIOU; SCOPES, 1986)9
Figura 4. Métodos de imobilização (KOURKOUTAS et al., 2004)
Figura 5. Estrutura química do alginato de sódio (LEE e MOONEY, 2012)14
Figura 6. Estrutura de formação do gel de alginato de cálcio (KÜHBECK et al., 2015) 14
Figura 7. Exemplos das formas do glutaraldeído em solução aquosa (MIGNEAULT et al.,
2004)
Figura 8. Reação das diferentes estruturas do glutaraldeído com enzimas/proteínas
(MIGNEAULT et al., 2004)19
Figura 9. Esquema da reticulação de células microbianas com glutaraldeído (MCGINLEY,
2012)
Figura 10. Desenho esquemático de um reator de mistura completa com agitação mecânica
(adaptado de TOWLER; SINNOTT, 2013)
Figura 11. Desenho esquemático de um reator com agitação pneumática (adaptado NEMATI;
WEBB, 2011)
Figura 12. Desenho esquemático de um reator de leito fixo ou empacotado (a) e leito fluidizado
(b) (NEMATI; WEBB, 2011)25
Figura 13. Fluxograma do processo convencional desde a etapa fermentativa de Zymomonas
mobilis até os ensaios de bioconversão em produtos
Figura 14. Biorreator de agitação mecânica Tecnal – modelo TecBio
Figura 15. Sistema utilizado nos ensaios de bioconversão
Figura 16. Fluxograma dos experimentos realizados neste trabalho32
Figura 17. Esquema do reator de agitação mecânica (a) e da turbina tipo âncora (b) utilizados
nos ensaios de bioconversão em regime descontínuo e descontínuo alimentado39
Figura 18. Esquema do reator tubular utilizados nos ensaios de bioconversão em regime
descontínuo e descontínuo alimentado
Figura 19. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de
bioconversão com células livres de Zymomonas mobilis não tratadas (A) e tratadas com
glutaraldeído (B) em meio com glicose e frutose 400 mmol/L55

Figura 20. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de Zymomonas mobilis não tratadas (A) e tratadas com Figura 21. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de Zymomonas mobilis não tratadas (A) e tratadas com glutaraldeído (B) em meio com lactose e frutose 400 mmol/L.....59 Figura 22. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de Zymomonas mobilis não tratadas (A) e tratadas com glutaraldeído (B) em meio com lactose e frutose 700 mmol/L.....61 Figura 23. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células de Zymomonas mobilis imobilizadas em alginato de cálcio em meio contendo glicose/frutose (A e B) e lactose/frutose (C e D)......64 Figura 24. Efeito dos diferentes tratamentos na concentração máxima de produtos [A], máxima velocidade específica de formação dos produtos [B] e na produtividade específica [C], em ensaios de bioconversão após diferentes dias de estocagem do biocatalisador imobilizado....66 Figura 25. Concentração de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol) em função do tempo, em ensaios de bioconversão com 20 g/L (•) e 30 g/L (•) de células de Zymomonas mobilis imobilizada em alginato de cálcio utilizando em reator de agitação mecânica em regime descontínuo [A] e descontínuo alimentado [B].....72 Figura 26. Perfil de consumo de substratos e da velocidade de formação dos produtos em ensaios de bioconversão em reator mecanicamente agitado sob regime de operação descontínuo - RD (preto) e descontínuo alimentado - RDA (azul) com 20 g/L [A e A'] e 30 g/L [B e B'] de biocatalisador imobilizado......73 Figura 27. Perfil de consumo de substratos e da máxima velocidade específica de formação dos produtos em ensaios de bioconversão em reator com agitação pneumática sob regime de operação descontínuo (preto) e descontínuo alimentado (azul) com 20 g/L de biocatalisador imobilizado.....75

LISTA DE ABREVIATURAS

AL – ácido lactobiônico

AG – ácido glicônico

Branco – ensaio com suspensão celular isenta de tratamento para inviabilizar o metabolismo fermentativo

Branco Imb – ensaio com suspensão celular isenta de tratamento para inviabilizar o metabolismo fermentativo e imobilizada em alginato de cálcio, com posterior reticulação das esferas do suporte com glutaraldeído

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CSTR - reator de agitação mecânica

CTAB - brometo de cetil trimetil amônio

CTAB - ensaio com suspensão celular permeabilização com brometo de cetil trimetil amônio

CTAB Imb – ensaio com suspensão celular permeabilizada com CTAB, reticulada com glutaraldeído e imobilizada em alginato de cálcio, com posterior reticulação das esferas do suporte com glutaraldeído

DNS - ácido 3,5-di-nitro-salicílico

 dM_p/dt – velocidade de formação de produtos em mmol por hora

GFOR - glicose-frutose oxidorredutase

 $GL-glicono-\delta$ -lactonase

Glu 10 - ensaio com suspensão celular reticulada com glutaraldeído por 10 minutos

Glu 20 - ensaio com suspensão celular reticulada com glutaraldeído por 20 minutos

Glu Imb - ensaio com suspensão celular tratada com glutaraldeído por 10 minutos e imobilizada

em alginato de cálcio, com posterior reticulação das esferas do suporte com glutaraldeído

K_M – constante de saturação de Michaelis-Menten

Mo - massa inicial das esferas de alginato de cálcio na bioconversão

M_F - massa das esferas de alginato de cálcio ao final da bioconversão

MP - quantidade de produto formado na reação

M_{S0} - quantidade de substrato inicial

M_x - massa de células seca

M_{NaOH} - concentração da base (hidróxido de sódio)

p - produtividade volumétrica

Pmáx - concentração máxima de produtos (ácido aldônico ou sorbitol)

- q-produtividade específica
- RD regime descontínuo
- RDA regime descontínuo alimentado
- SB sorbitol
- S₀ concentração de substrato inicial
- S_F concentração de substratos residual na reação
- t tempo de processo
- V1 volume de líquido para diluir os substratos na primeira bioconversão
- V2 volume de líquido para diluir os substratos na bioconversão repetida
- V_{NaOH} volume de base consumida para controle pH na reação
- V_{total} volume total do meio reacional
- $Y_{P_{S_0}}$ fator de conversão de substrato inicial em produto
- YL_{P/S_0} fator de conversão de lactose em ácido lactobiônico
- YG_{P/S_0} fator de conversão de glicose em ácido glicônico
- $YS_{P_{S_0}}$ fator de conversão de frutose em sorbitol
- μ_p velocidade específica de formação de produtos
- µ_{p,máx} máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido aldônico ou sorbitol)

RESUMO

Ácido lactobiônico e sorbitol têm importantes aplicações na indústria cosmética e farmacêutica. Esses produtos podem ser obtidos de forma equimolar em reações catalisadas por glicosefrutose oxidorredutase (GFOR) e glicono-δ-lactonase (GL), enzimas presentes no periplasma de Zymomonas mobilis. As reações são geralmente conduzidas com células bacterianas imobilizadas, sendo que a técnica de preparo deste biocatalisador demanda tempo, além de ser onerosa. Alternativas para a simplificação do preparo do biocatalisador imobilizado em alginato de cálcio e sua aplicação em diferentes regimes de operação e reatores foram estudadas neste trabalho, com o objetivo de aumentar o potencial de transferência dessa tecnologia para o setor industrial. Modificações na técnica de imobilização de Z. mobilis foram avaliadas quanto às concentrações do polímero e da solução de CaCl₂ e do tempo de gelificação, buscando melhorar as propriedades mecânicas do gel e possibilitar sua utilização em reações repetidas. No caso, não foram observadas alterações significativas na resistência do suporte e nos parâmetros de avaliação da reação em qualquer das condições avaliadas. Assim, a técnica foi mantida na forma previamente definida: alginato de sódio, 2% (m/v); CaCl₂, 0,3 mol/L; tempo de gelificação, 10 a 240 minutos. A reutilização do biocatalisador imobilizado por sete bateladas repetidas, num total de 176 horas, possibilitou a obtenção de cerca de 500 mmol/L de produtos (ácido lactobiônico e sorbitol) por ciclo, com valores médios de rendimento e de produtividade específica de 80% e 1,12 mmol/g/h. A possibilidade de supressão da permeabilização celular com brometo de cetil trimetil amônio (condição CTAB) foi demonstrada, uma vez que se constatou que a reticulação de células de Z. mobilis com glutaraldeído (condição Glu), além de inibir o metabolismo fermentativo de carboidratos como glicose ou frutose, permitiu o acúmulo dos produtos de bioconversão, sem afetar a atividade catalítica das enzimas. A atividade enzimática para a condição Glu (35 U/g de células) foi semelhante à da condição de referência CTAB (31 U/g). Adicionalmente, com o sistema imobilizado, constatou-se que o tratamento das células com glutaraldeído, normalmente feito antes da imobilização (condição Glu Imb), também pode ser suprimido, uma vez que o tratamento único das esferas do suporte (condição Branco Imb) com o agente de reticulação é suficiente para inativar o metabolismo de Z. mobilis. Os rendimentos em ácido lactobiônico e sorbitol, independentemente da condição (Glu Imb ou Branco Imb), foram da ordem de 80%, com concentrações de produto de cerca de 500 mmol/L. A estabilidade das enzimas nas reações de bioconversão manteve-se próxima à inicial após 150 dias de armazenagem. Reações de bioconversão foram conduzidas em regime descontínuo, em reator de agitação mecânica, com 20 e 30 g/L do biocatalisador imobilizado, resultando em 530 mmol/L de produtos em 24 horas. O processo foi testado, ainda, em regime descontínuo alimentado a fim de possibilitar o uso de maior massa de lactose, que não poderia ser empregada em descontínuo devido à baixa solubilidade deste carboidrato em água. Com 20 g/L de biomassa imobilizada, concentrações de produtos de 745 mmol/L foram obtidas em 42 horas, enquanto com 30 g/L foram necessárias 32 horas para atingir-se 776 mmol/L. Os resultados para as reações conduzidas em biorreator tubular com agitação pneumática, com 20 g/L de células, em regimes descontínuo e descontínuo alimentado foram muito próximos aos encontrados no sistema com agitação mecânica, demonstrando a flexibilidade do processo sob esse aspecto.

Palavras chave: *Zymomonas mobilis*, glicose-frutose oxidorredutase / glicono- δ -lactonase, ácido lactobiônico, sorbitol, imobilização em alginato de cálcio, regime de operação, reatores.

ABSTRACT

Lactobionic acid and sorbitol have important applications in cosmetic and pharmaceutical industries. These products can be obtained in equimolar basis in reactions catalysed by glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono-δ-lactonase (GL), enzymes that are present in the periplasm of Zymomonas mobilis. The reactions are usually conducted with immobilized bacterial cells, the preparation technique of this biocatalyst being time demanding and expensive. Some alternatives for the simplification of the preparation of calcium alginate-immobilized biocatalyst and its application in different operation modes and types of bioreactors were studied in this work, with the aim of increasing the potential of this technology to be transferred to the industrial sector. Modifications in the technique of Z. mobilis immobilization were evaluated regarding the concentrations of sodium alginate and CaCl₂ solution and the time of gelification, as an attempt to improve the mechanical properties of the gel and to allow its use in repeated reactions. In this case, no significant changes in both the support resistance and the reaction evaluation parameters were observed for any condition assessed. As such, the technique remained as previously defined: sodium alginate, 2% (w/v); CaCl₂, 0.3 mol/L; gelification time, from 10 to 240 minutes. The reuse of the immobilized biocatalyst for seven consecutive batches, totalling 176 hours of reaction, allowed the attainment of products (lactobionic acid and sorbitol) concentrations of about 500 mmol/L, with approximately 80% of yield and 1.12 mmol/g/h of specific productivity. The possibility of suppression of the cell permeabilization with cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB condition) was demonstrated, since the crosslink of Z. mobilis with glutaraldehyde (Glu condition), besides inhibiting the fermentative metabolism of carbohydrates such as glucose or fructose, allowed the bioconversion products accumulation, without affecting the catalytic activity of the enzymes. The activity of GFOR/GL for the Glu condition (35 U/g of cell) was similar to the reference condition CTAB (31 U/g). Additionally, for the immobilized process, it was found that the cell treatment with glutaraldehyde, that is usually done before immobilization (Glu Imb condition), can also be suppressed because the sole treatment of the support beads with the crosslink agent (White Imb Condition) is enough to inactivate Z. mobilis metabolism. The yields in lactobionic acid and sorbitol, independently of the condition (Glu Imb or White Imb), were about 80%, with products concentrations nearly to 500 mmol/L. The enzymes stability remained stable after 150 days of storage. Bioconversion reactions were carried out in batch mode in a mechanically stirred reactor, with 20 and 30 g/L of the immobilized biocatalyst, resulting in 530 mmol/L of products after 24 h. The process was also tested in fed-batch mode with the purpose of allowing the use of a larger mass of lactose, which could not be employed in batch because of the relatively low solubility of this carbohydrate in water. With 20 g/L of immobilized biomass, product concentrations of 745 mmol/L were obtained in 42 h, whereas with 30 g/L 32 h were needed to reach 776 mmol/L. The results for the reactions conducted in pneumatic-agitated tubular bioreactor with 20 g/L of cells, in batch and fed-batch modes, were very close to those found in the system with mechanical agitation, evidencing the flexibility of the process under this aspect.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, glucose-fructose oxidoreductase / glucono-δ-lactonase, lactobionic acid, sorbitol, calcium-alginate immobilization, operation mode, reactors

1 INTRODUÇÃO

A crescente busca pela inovação tecnológica nos processos industriais, visando minimizar as agressões ao meio ambiente, tem incentivado pesquisas em processos bioquímicos. A tecnologia enzimática tem sido apontada como alternativa promissora nestes processos, pois oferece a vantagem de ser tecnologicamente limpa. A utilização de sistemas imobilizados amplia as possibilidades de aplicação de enzimas na indústria, especialmente no caso das indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos, visto que biocatalisadores imobilizados resultam em produtos com maior grau de pureza.

A bioprodução do ácido lactobiônico e de sorbitol vem ao encontro desta realidade, já que ambos os produtos podem ser obtidos por via bioquímica com o uso do complexo enzimático glicose-frutose oxidorredutase (GFOR) / glicono-δ-lactonase (GL) presente no periplasma da bactéria anaeróbia produtora de etanol *Zymomonas mobilis*. Esse processo tem sido objeto de estudo no Laboratório de Bioprocessos (LBIO) do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul por cerca de duas décadas. Para o processo de produção, é necessária a prévia obtenção da biomassa celular, que, em sequência, são concentradas e permeabilizadas com detergentes orgânicos com o fim de promover inviabilização do metabolismo fermentativo da bactéria, uma vez que a ação catalítica de GFOR/GL independe da viabilidade celular. As etapas subsequentes do processo consistem na imobilização celular – que na pesquisa do LBIO é feita em alginato de cálcio –, na sua posterior utilização no processo de bioconversão e, por fim, nos tratamentos finais para recuperação e purificação dos produtos.

No procedimento de imobilização em alginato de cálcio em uso, a biomassa celular permeabilizada é reticulada com glutaraldeído antes do aprisionamento no gel e, após a imobilização, as esferas do suporte contendo a biomassa/enzimas são novamente reticuladas com glutaraldeído com o fim de aumentar a estabilidade mecânica do sistema. Glutaraldeído é amplamente utilizado como agente de reticulação de proteínas, uma vez que reage com diversos grupamentos, como, amino, tiol, fenol e imidazol. Devido às ligações formadas entre o glutaraldeído e os grupamentos amino na membrana celular dos microrganismos, este composto apresenta efeito biocida contra bactérias Gram-negativas, fungos e vírus.

Para a competitividade dos produtos em questão, no âmbito industrial, fazem-se necessárias modificações no processo convencional desenvolvido, incluindo-se a forma de preparo do biocatalisador. No caso, o tratamento de permeabilização com CTAB, embora

eficiente em escala laboratorial, poderia se constituir num empecilho técnico e econômico no processo em escala de produção industrial, sendo necessária uma análise da sua real necessidade. Outro aspecto fundamental a ser estudado é a imobilização das células de *Z. mobilis* em alginato de cálcio. A definição pelo uso dessa técnica está relacionada, principalmente, à facilidade na formação do gel, quando em contato com soluções de cátions divalentes, e ao seu baixo custo. Como desvantagem, entretanto, pode-se citar a sua relativamente baixa resistência mecânica. Em reatores mecanicamente agitados, por exemplo, o contato físico entre o sistema de agitação e o suporte pode resultar no seu rompimento e extravasamento do biocatalisador para o meio. Na produção de ácido lactobiônico e sorbitol com o sistema descrito, tem-se demonstrado que, com o decorrer da reação, há perda na rigidez da esfera de alginato. Em decorrência, há a necessidade de tratarem-se as esferas com solução de cloreto de cálcio após os repetidos ciclos de bioconversão, resultando em maior enrijecimento do suporte, redução do transporte de massa e perda de produtividade.

A escolha do tipo de reator e do regime de operação para o processo de bioconversão com sistemas imobilizados é tão importante quanto o controle das próprias condições de imobilização. Reatores com agitação mecânica são amplamente utilizados em bioprocessos devido às boas condições de mistura e controle de parâmetros, embora, o sistema de agitação possa resultar em danos ao biocatalisador imobilizado, além de requerer elevada quantidade de energia, podendo vir a constituir-se em mais uma dificulade para a condução do processo. Assim, a utilização de reatores do tipo coluna com agitação por ar poderia provocar um menor efeito de cisalhamento sobre as partículas em suspensão e, devido à sua construção simples, poderia diminuir os custos de instalação e de operação. Por outro lado, é necessário que se avalie se a mistura e a transferência de massa nos reatores tubulares seriam suficientemente eficientes para manter o meio reacional em condições adequadas para as reações enzimáticas.

Na produção de ácido lactobiônico, tem-se como limitação adicional a relativamente baixa solubilidade da lactose em comparação à da frutose. Este fato, aliado à também baixa afinidade entre GFOR e lactose, determina que teores de produtos pouco superiores a 500 mmol/L sejam atingidos ao final da bioconversão, sugerindo que aplicação do regime descontínuo alimentado nesse processo, não descrito na literatura, poderia ser uma forma de obter-se uma concentração mais elevada de produtos.

No contexto das questões apresentadas neste capítulo introdutório, foram formulados os objetivos geral e específicos do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aperfeiçoar a técnica de preparo do biocatalisador, células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, com o fim de simplificar o processo de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, visando à sua condução em diferentes sistemas de produção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atender ao objetivo geral do trabalho, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- determinar o efeito das concentrações de alginato de sódio, da solução de cloreto de cálcio e do tempo de gelificação, na etapa de imobilização de células de *Z. mobilis*, visando à manutenção da integridade das esferas do suporte e a preservação da ação catalítica por longos períodos;

- avaliar o processo de bioconversão em bateladas repetidas com células bacterianas imobilizadas em alginato de cálcio na melhor condição encontrada;

 - avaliar o tratamento com glutaraldeído em comparação com a permeabilização com agentes tensoativos, como formas de impedir o metabolismo fermentativo de Z. mobilis durante a bioconversão;

- comparar os resultados de bioconversão de glicose + frutose e de lactose + frutose nos respectivos ácidos orgânicos e sorbitol, utilizando células de *Z. mobilis*, em seu estado livre e imobilizadas, com e sem tratamento com glutaraldeído;

avaliar a estabilidade do complexo enzimático GFOR/GL contido em células de Z.
mobilis – sob diferentes condições de tratamento para inviabilização celular – imobilizado em alginato de cálcio, após diferentes tempos de estocagem;

- estudar a formação dos produtos em bioconversão em regime descontínuo e descontínuo alimentado em biorreatores com agitação mecânica e tubulares.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL: CARACTERÍSTICAS, APLICAÇÕES E PRODUÇÃO

Ácido lactobiônico (ácido 4-O- β -D-galactonopiranosil-D-glicônico, C₁₂H₂₂O₁₂) é um ácido aldônico obtido pela oxidação da lactose, que se apresenta na forma de pó branco e cristalino. Sua estrutura química compreende a ligação, por um grupamento éter, entre uma molécula de galactose e uma de ácido glicônico (Figura 1) (European Pharmacopoeia, 2014).



Figura 1. Estrutura química do ácido lactobiônico.

O ácido lactobiônico possui aplicações nas áreas cosmética, médica e de alimentos. Na indústria cosmética, tem sido utilizado em produtos anti-idade, devido às suas propriedades antioxidantes, hidratantes e rejuvenescedoras (GRIMES et al., 2004). Na área médica, é componente da solução de Wisconsin, empregada na preservação de órgãos humanos a serem transplantados, com possibilidade de preservação de até 48 h, pois previne os danos causados aos tecidos pelos radicais livres (SUMIMOTO; KAMADA, 1990). É também indicado como agente de vetorização para fármacos antitumorais, devido à possibilidade de liberação do fármaco na velocidade adequada para apenas um órgão específico (KIM; KIM, 2002). Ainda, pode ser utilizado para aumentar a solubilidade de aumento da solubilidade do lactobionato de eritromicina em água, em cerca de 50 até 100 vezes em comparação a eritromicina convencional. Na indústria de alimentos, o ácido é aplicado como acidulante, espessante e preservador de aromas (NORDKVIST et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016).

Quanto a produção de ácido lactobiônico, sua obtenção por via química, descrita por Isbell (1934), ocorre a partir da oxidação eletrolítica da lactose com eletrodos de grafite. Neste caso, uma solução de lactose é enriquecida com brometo e carbonato de cálcio, sendo submetida ao reator para produção do sal de lactobionato de cálcio com eletrodos de grafite. O crescente destaque que o ácido lactobiônico vem apresentando nas mais diversas áreas tem incentivado pesquisas para sua produção biotecnológica, buscando aliar produção sustentável e eficiente (ALONSO et al., 2013). A produção de ácido lactobiônico por *Pseudomonas* foi primeiramente observada por Stodola e Lockwood (1947). Os autores avaliaram diversos gêneros deste microrganismo e obtiveram rendimentos de 75% em produto com *Pseudomonas graveolens 14*. Posteriormente, esta espécie foi investigada para oxidação da lactose por outros autores, a exemplo de Kluyver et al. (1951), Miyamoto et al. (2000) e Alonso et al. (2011; 2012). Ainda, a oxidação da lactose pode ser resultado do emprego de outros microrganismos específicos, como *Acetobacter orientalis* (KIRYU et al., 2012), *Burkholderia cepacia* (MURAKAMI et al., 2006) e *Zymomonas mobilis* (SATORY et al.,

Sorbitol (C₆H₁₄O₆) é um poliol encontrado na natureza, em algumas espécies vegetais, como pera, maçã, pêssego e ameixa. Consiste em uma substância não cariogênica, com elevado poder edulcorante, aproximadamente 50% superior à sacarose, isento de odor e sabor residual. É utilizado nas indústrias de alimentos e farmacêutica (BUDAVARI et al., 1996). A indústria de alimentos concentra a maior aplicação de sorbitol, cerca de 39%, seguida da indústria de dentifrícios e cosmética, com aproximadamente 27%, e produção de vitamina C, com 13% (SHWIDE-SLAVIN et al., 2012). Na indústria de dentifrícios, sua aplicação se deve às suas propriedades edulcorante, umectante e emulsificante, além de não afetar a saúde dos dentes, pois não é metabolizado pelas bactérias presentes na boca (LU, 2001). Esta substância é empregada, ainda, na composição de alimentos e bebidas para diabéticos, já que é lentamente absorvida pelo organismo humano (SHWIDE-SLAVIN et al., 2012). Além disso, sorbitol é aplicado para a produção de sorbose, ácido ascórbico e outros compostos farmacêuticos (LADERO et al., 2007).

1997).

A produção de sorbitol por via química é baseada na hidrogenação, a altas pressões, do xarope de dextrose (glicose), na presença de um catalisador inorgânico – níquel, a 150°C e pressão entre 40 e 50 atm (VAN GORP et al., 1999). Embora, a simples conversão por via química seja de baixo custo, a etapa de purificação é mais onerosa, em virtude do alto grau de pureza exigido para aplicações nas áreas de alimentos e farmacêutica (VAN GORP et al., 1999). Métodos de produção de sorbitol com emprego de microrganismos específicos por processos biotecnológicos podem consistir em uma vantagem econômica, uma vez que a elevada especificidade dos biocatalisadores, além de aumentar o grau de pureza dos produtos, reduz custos associados às etapas de purificação (SILVEIRA; JONAS, 2002). Dentre os microrganismos que possuem a capacidade de sintetizar sorbitol, destacam-se a levedura *Candida boidinii* (TANI; VONGSUVANLERT, 1987) e a bactéria *Z. mobilis* (ZACHARIOU e SCOPES, 1986).

A produção de ácido lactobiônico e sorbitol por *Z. mobilis* será discutida em maiores detalhes na sequência.

3.2 CARACTERÍSTICAS E METABOLISMO DE Zymomonas mobilis

Z. mobilis é uma bactéria anaeróbia, Gram-negativa. Quanto à morfologia celular, são identificados bastonetes individuais, distribuídos em pares ou cadeias, com dimensões médias de 2,0 a 6,0 μ m de comprimento e de 1,0 a 1,5 μ m de largura (SWINGS; DE LEY, 1977).

Esta bactéria tem despertado interesse na área de bioprocessos em função da potencialidade para produção de etanol em grande escala, com superioridade em termos de velocidade de formação de produto em comparação às leveduras (ROGERS et al., 1984). Entretanto, a aplicação industrial de *Z. mobilis* é limitada aos carboidratos, glicose, sacarose e frutose (SPRENGER, 1996; LIN; TANAKA, 2006; PANESER et al., 2006). Contudo, nos últimos 30 anos, estudos vêm sendo desenvolvidos enfocando engenharia genética com o fim de aumentar a gama de fontes de carbono assimiláveis pela bactéria e, assim, garantir sua aplicação em larga escala para produção de etanol (DOELLE et al., 1993; SEO et al., 2005; ROGERS et al., 2007; HE et al., 2014).

Sacarose, glicose e frutose são fontes de carbono metabolizadas pela mesma rota bioquímica, a via de Entner-Doudoroff (Figura 2), característica marcante do gênero *Zymomonas* (SWINGS; DE LEY, 1977). Como resultado do metabolismo de um mol de glicose, um mol de ATP é obtido.

Como pode ser observado na Figura 2, no primeiro passo do catabolismo, a enzima invertase hidrolisa a sacarose à glicose e a frutose. A glicose é, então, fosforilada à glicose-6-fosfato pela ação da enzima glicoquinase. Neste caso, o doador do grupamento fostato é o ATP. Posteriormente, a glicose-6-fosfato desidrogenase, que apresenta NADP⁺ como aceptor de elétrons, catalisa a oxidação de glicose-6-fostato a 6-fosfato-gliconolactona, com a consequente redução a NADPH.

As reações seguintes consistem em hidrólise e desidratação, via ação das enzimas 6-fosfato gliconolactonase e 6-fosfato-glicono desidratase, respectivamente. Na primeira, há formação de 6-fosfogliconato, o qual é convertido, então, a 2-ceto-3-desoxi-6-P-gliconato. O composto 2-ceto-3-desoxi-6-P-gliconato é clivado a piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. O gliceraldeído-

3-fosfato é convertido a piruvato com a produção de duas moléculas de ATP e uma molécula de NADH. Em uma reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, o piruvato é, então, descarboxilado a acetaldeído. Na última reação da via metabólica, o acetaldeído é reduzido a etanol.



Figura 2. Metabolismo de carboidratos de Zymomonas mobilis (CARRA, 2012).

No caso da frutose, primeiramente, é fosforilada à frutose-6-fosfato pela ação da enzima frutoquinase. Posteriormente, a enzima glicose-6-fosfato isomerase catalisa a conversão da frutose-6-fosfato em glicose-6-fostato. A glicose-6-fosfato segue, então, a via catabólica descrita para a glicose (SWINGS; DE LEY, 1977).

Utilizando glicose como fonte de carbono, o rendimento em etanol por *Z. mobilis* é superior a 95% do máximo teórico possível (VIIKARI; BERRY, 1988), com formação de quantidades insignificantes de outros subprodutos (SWINGS; DE LEY, 1977; VIIKARI; BERRY, 1988). Com a utilização de frutose, rendimento inferior é atingido, cerca de 90% do valor máximo teórico, com a geração adicional de pequenas quantidades de manitol, sorbitol, acetoína, glicerol e dihidroxicetona (VIIKARI; BERRY, 1988). A utilização de sacarose como fonte de carbono no meio de cultivo resulta em rendimento em etanol ainda menor, cerca de 75%, caracterizado pela formação de levana e sorbitol a partir da frutose (VIIKARI, 1984).

A formação de sorbitol e de gliconato é resultado da ação das enzimas periplasmáticas glicose-frutose oxidorredutase (GFOR) e glicono-δ-lactonase (GL), respectivamente (ZACHARIOU; SCOPES, 1986).

3.3 COMPLEXO ENZIMÁTICO GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE / GLICONO-δ-LACTONASE

O complexo enzimático GFOR/GL é caracterizado pelas reações de conversão de quantidades equimolares de glicose e frutose a ácido glicônico e sorbitol, respectivamente (ZACHARIOU; SCOPES, 1986). O mecanismo de ação da GFOR, que contém a coenzima NADP⁺ fortemente acoplada, atua pelo clássico sistema *ping-pong*, no qual oxida a glicose a glicono-δ-lactona com consequente redução da frutose a sorbitol (Figura 3). A hidrólise da glicono-δ-lactona a ácido glicônico é resultado da ação da enzima GL. Acredita-se que GFOR tenha função fisiológica, uma vez que a formação de sorbitol está relacionada com a proteção contra o estresse osmótico causado por altas concentrações de açúcares no meio em que se encontra o microrganismo, a fim de manterem-se as atividades biológicas da célula (ZACHARIOU; SCOPES, 1986; LOOS et al., 1994).



Figura 3. Mecanismo de ação das enzimas glicose-frutose oxidorredutase (GFOR) e glicono-δlactonase (GL) de *Zymomonas mobilis* (ZACHARIOU; SCOPES, 1986).

A máxima atividade catalítica de GFOR purificada, utilizando como substratos glicose e frutose, é obtida em pH de 6,2 e temperaturas entre 39 e 42°C (ZACHARIOU; SCOPES, 1986). Nestas condições de operação, estes autores relataram conversões de 99% em sorbitol e gliconato de sódio. Erzinger et al. (1996) confirmaram que os resultados para a máxima atividade de GFOR, contida em células íntegras de *Z. mobilis*, ocorre na temperatura de 39 a 42°C e em pH entre 6,2 a 6,4.

Em estudos realizados com GFOR purificada foi verificada sua instabilidade catalítica quando submetida a longos períodos de reação (GOLLHOFER et al.,1995; FÜRLINGER et al.,1996; NIDETZKY et al., 1997). Nesses trabalhos, os autores descrevem que a perda na atividade é decorrente da própria ação da enzima durante a reação. Este efeito, no entanto, pode ser minimizado com a adição ao meio reacional de substâncias antioxidantes, como ditiotreitol – DTT (GOLLHOFER et al.,1995; FÜRLINGER et al.,1995; SATORY et al., 1997), glutatinona reduzida (GOLLHOFER et al.,1995) e cisteína (GOLLHOFER et al.,1995).

Em reações de bioconversão de glicose e frutose em ácido glicônico e sorbitol utilizando-se células viáveis de *Z. mobilis*, foi observado que tanto o gliconato formado como a glicono-δ-lactona recém-formada eram consumidos e seguiam a rota de Entner-Doudoroff para a formação de piruvato e, em seguida, de etanol, o que resultou na redução do rendimento de formação dos produtos (CHUN; ROGERS, 1988). Para contornar tal situação, foi proposto por Chun e Rogers (1988) o tratamento das células com tolueno, a fim de permeabilizar a parede celular. A permeabilização resulta no extravasamento de cofatores essenciais para a rota de formação de etanol (CHUN; ROGERS, 1988; WILBERG et al., 1997) e facilita o acesso dos substratos às enzimas (WILBERG et al., 1997). Rehr et al. (1991), por sua vez, propuseram a permeabilização das células de *Z. mobilis* com detergentes catiônicos, tendo definido um eficiente tratamento com brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) 0,1 % (m/v), por 10 minutos, que resultou em rendimentos da ordem de 98-99% em gliconato de sódio e sorbitol.

A permeabilização celular é um processo bem estabelecido e amplamente utilizado em

escala laboratorial (CHUN; ROGERS, 1988; REHR et al., 1991; JANG et al., 1996; WILBERG et al., 1997; MALVESSI et al., 2010; 2013; PEDRUZZI et al., 2011). No entanto, no caso de aumento de escala deste processo, essa etapa poderia ter um impacto negativo sobre os custos operacionais (WISBECK et al., 1997; SILVEIRA et al., 1999). Wisbeck et al. (1997) relatam a utilização de elevada concentração inicial de substratos (glicose + frutose) com células floculantes de *Z. mobilis* e isentas de tratamento com agentes permeabilizantes. Os autores destacaram a obtenção de rendimentos de 91% e 92% em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente. Silveira et al. (1999) demonstraram que altas concentrações iniciais de substratos (glicose e frutose) e, posteriormente, altas concentrações de produtos inibem a formação de etanol, tornando, portanto, desnecessária a permeabilização da biomassa celular. Foi relatado que a concentração inicial de 650 g/L de substratos (glicose + frutose) seria suficiente para inibir a conversão de ácido glicônico em etanol, resultando em aproximadamente 300 g/L de produto e rendimento de 91%. A maior produtividade, no entanto, foi atingida na concentração inicial de 500 g/L, fato que pode estar associado a uma possível inibição da enzima quando utilizadas concentrações iniciais de substrato mais elevadas.

Além da glicose, GFOR tem, ainda, a capacidade de oxidar outras aldoses, em combinação com a frutose, como xilose, galactose, arabinose, manose, maltose, celobiose e lactose aos seus respectivos ácidos orgânicos (SATORY et al., 1997). Malvessi et al. (2013) avaliaram a atividade catalítica da GFOR, contida em células de *Z. mobilis*, com maltose, galactose e lactose combinado com frutose. Como resultado, observaram menor afinidade entre GFOR e estes substratos em comparação à glicose, corroborando os valores encontrados por Satory et al. (1997) para GFOR purificada. Apesar da identificação de menor atividade catalítica com lactose, em comparação a outras aldoses (SATORY et al., 1997; MALVESSI et al., 2013), sua utilização se justifica pelo elevado valor comercial e importantes aplicações industriais do ácido lactobiônico

3.3.1 Uso da lactose como substrato para glicose-frutose oxidorredutase

A cinética de oxidação da lactose pode ser descrita por uma equação hiperbólica, conforme o modelo de Michaelis-Menten, quando a concentração do segundo substrato (frutose) é mantida constante (SATORY et al., 1997). De acordo com os autores, o valor aparente de K_M para lactose é de 1,2 mol/L, a 30°C e pH 6,2, valor aproximadamente 80 vezes superior ao determinado para a glicose. Entretanto, este valor não é alcançado experimentalmente, pois a máxima solubilidade da lactose a 30°C é 0,6 mol/L. Valores de K_M

superiores à solubilidade da lactose indicam que a velocidade da reação será sempre de primeira ordem em relação à concentração de substrato real, independentemente do grau de conversão do substrato. (SATORY et al., 1997).

Conforme Malvessi et al. (2013), o uso de elevadas concentrações iniciais de substrato, desde que não iniba a atividade enzimática, favorece a velocidade da reação, uma vez que a constante cinética K_M para GFOR é alta. A solubilidade da lactose em água fervente é próxima de 1,1 mol/L; assim, estes autores conduziram ensaios de bioconversão, com soluções saturadas de lactose (0,7; 1,0 e 1,2 mol/L) preparadas com água em ebulição. Embora valores crescentes tenham sido observados para a concentração final e a produtividade em ácido lactobiônico, com o aumento da concentração inicial de substratos, os autores relatam uma redução significativa na conversão de substratos em produtos. Ainda, as máximas velocidades específicas de formação dos produtos no início da reação foram iguais quando usadas 0,7 mol/L e 1,0 mol/L de soluções de substratos, enquanto que para 1,2 mol/L valores menores foram obtidos. Desta forma, uma vez que a melhor conversão de substratos foi obtida em 0,7 mol/L e considerando que nesta condição a reologia do meio reacional é pouco afetada, já que possui menor viscosidade, essa concentração foi definida para os ensaios de bioconversão.

Como forma de aumentar a produtividade da reação e a conversão de substratos em produtos, Malvessi et al. (2013) avaliaram diferentes concentrações (12,5; 20,0; 25,0 e 37,5 g/L) de células permeabilizadas de *Z. mobilis* livres nos ensaios de bioconversão com lactose e frutose 0,7 mol/L. Como resultado, observou-se redução na máxima velocidade específica e na produtividade específica com concentrações celulares superiores a 25 g/L, indicando a presença de excesso de enzimas em relação à concentração de substratos usada na reação.

Satory et al. (1997) avaliaram a bioprodução de ácido lactobiônico com GFOR purificada em reator de mistura completa sob regime de operação em batelada e batelada alimentada. Na condição em batelada, a conversão de 90% do substrato disponível foi alcançada em 60h de reação. Com a alimentação de substratos foi possível a manutenção da atividade catalítica de GFOR por 200 horas de reação, atingindo o mesmo percentual de conversão (90%). Em reações com alimentação, foram adicionados ao meio ditiotreitol (DTT) e albumina de soro bovino (BSA) para auxiliar na preservação da estabilidade de GFOR. Os autores avaliaram, ainda, a produção contínua em reator de membrana. Como resultado, nesse caso, em um tempo médio de residência de 16,7 h foi possível manter 44% de conversão do substrato inicial (0,5 mol/L), atingido uma produtividade em ácido lactobiônico aproximadamente 12,80 mmol/L/h (110 g/L/d). Contudo, os autores relatam que, devido à baixa afinidade de GFOR por lactose,

conversão elevadas (próximas a 80%) em regime contínuo só poderiam ser obtidas se a atividade catalítica da enzima fosse 20 vezes maior ou, ainda, se o tempo de residência fosse aumentado em 100 horas. Para contornar esse fato, uma solução alternativa, segundo os autores, seria a utilização do sistema imobilizado em reator tipo *plug-flow*.

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES

A imobilização de biocatalisadores – enzimas ou células – pode ser definida como o seu aprisionamento físico ou químico em um determinado suporte, com a preservação da atividade catalítica e que possibilite sua reutilização (KAREL et al., 1985). Nos processos biotecnológicos, a imobilização tem se mostrado uma técnica promissora quando comparada com o processo tradicional com células ou enzimas no seu estado livre, pois proporciona um aumento de produtividade, devido à elevada concentração do biocatalisador no reator (FAJARDO-OCHOA et al., 2011), e promove a proteção do sistema imobilizado contra o cisalhamento, possibilitando sua utilização por períodos prolongados (KOURKOUTAS et al., 2004). Destaca-se, também, a maior facilidade na recuperação dos produtos (D'SOUZA, 1999) e a possibilidade de uso de diferentes configurações de reatores e regimes de operação (KOURKOUTAS et al., 2004).

De fato, a imobilização de biocatalisadores apresenta várias vantagens; no entanto, como desvantagem cita-se a instabilidade mecânica do suporte e as restrições na transferência de massa. Estas desvantagens podem ser evitadas ou diminuídas pela escolha criteriosa do suporte, do método de imobilização e das condições de operação do biorreator (KAREL et al., 1985; HANEFELD et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012).

Os métodos de imobilização são classificados de acordo com a técnica aplicada (PILKINGTON et al., 1998) e pelo tipo de suportes (naturais ou sintéticos) (BUGA et al., 2010):

- ligação ou adsorção a um suporte sólido consiste na adesão das células na superfície do suporte fixo, podendo ocorrer por adsorção natural ou por meio de agentes de ligação cruzada, como o glutaraldeído;
- aprisionamento numa matriz porosa baseia-se na inserção das células em uma matriz porosa, que impede a difusão das células para o meio, como é o caso do alginato de cálcio;
- floculação natural ou artificial envolve a floculação das células de maneira natural ou artificial induzida, formando agregados (CLEA);
- contenção através de barreiras envolve a retenção por barreiras físicas como, por exemplo,

as membranas.

Na Figura 4 estão apresentados os diferentes métodos de imobilização de biocatalisadores.



Figura 4. Métodos de imobilização (KOURKOUTAS et al., 2004).

Há uma grande variedade de suportes disponíveis para a aplicação em imobilização e a sua escolha depende do custo e da disponibilidade do material, do biocatalisador a ser imobilizado, do método de imobilização e da especificidade de cada processo (EŞ et al., 2015). "A natureza física dos suportes pode variar desde materiais geliformes (alginato, álcool polivinílico, carragena) até superfícies solidas (vidro poroso, Eupergit C, alumina)" (CANILHA et al, 2006, p. 51).

Nos casos descritos para a imobilização de *Z. mobilis* destacam-se os suportes, como alginato de cálcio (CHUN; ROGERS, 1988; MALVESSI et al., 2010), k-carragena (REHR et al., 1991; JANG et al., 1996), membranas de fibra oca (FERRAZ et al., 2000), esponja lufa cilíndrica (VIGNOLI et al., 2006) e esferas de álcool polivinílico - PVA (LORENZETTI et al., 2015).

Embora existam diversos tipos de suportes, o aprisionamento em gel de alginato, técnica de imobilização utilizada no presente trabalho, é a mais utilizada devido ao seu baixo custo e à simplicidade na preparação do sistema imobilizado, com a formação do gel com cátions divalentes, como o Ca²⁺ (LEE; MOONEY, 2012). Essa forma de imobilização é discutida em maiores detalhes na sequência.

3.4.1 Alginato de cálcio como suporte para imobilização

Alginato é um polissacarídeo linear presente nas algas marrons (classe *Phaeophyceae*), constituído de unidades de (1,4)- β -D-manuronato (M) e (1,4)- α -L-guluronato (G). A distribuição química do alginato (Figura 5) pode ser apresentada somente em blocos de ácido manurônico (MMMM) ou de ácido gulurônico (GGGG), embora também possam aparecer ambos os ácidos de forma alternada (MGMGMGMGMG) (LEE e MOONEY, 2012).

A distribuição dos blocos do alginato e o comprimento de cada bloco dependem da fonte o qual foi extraído (GACESA, 1988). Essa é uma característica importante, que determina a estabilidade do gel, uma vez que somente os blocos G participam do processo de gelificação com cátions divalentes (Figura 6). Assim, considerando-se que a formação do gel ocorre a partir da interação eletrostática dos grupos carboxílicos do bloco G com os cátions divalentes, quanto maior for a relação G:M, melhores serão as propriedades físicas do gel (GASECA, 1988; LEE e MOONEY, 2012).



Figura 5. Estrutura química do alginato de sódio (LEE e MOONEY, 2012).

Figura 6. Estrutura de formação do gel de alginato de cálcio (KÜHBECK et al., 2015).

A formação dos géis de alginato ocorre quando o seu sal de sódio entra em contato com cátions divalentes. Neste momento, há a troca do cátion Na^+ do alginato pelo cátion presente na solução, sendo que o cátion mais comumente utilizado na imobilização é o Ca^{2+} .

Para a imobilização, a solução ou suspensão de um determinado biocatalisador é misturada a uma solução de alginato de sódio. Essa mistura é gotejada sobre a solução de cloreto de cálcio até a formação dos géis, ficando o biocatalisador retido no interior do gel de alginato de cálcio (GACESA, 1988; KAWAGUTI; SATO, 2008). Enquanto as esferas de alginato contendo o biocatalisador permanecem na solução de CaCl₂, os íons Ca²⁺ são constantemente transportados para o interior do suporte, até que o equilíbrio seja atingido (GACESA, 1988; BLANDINO et al., 1999).

A imobilização em alginato de cálcio apresenta diversas vantagens, como, biocompatibilidade, simplicidade do método e baixo custo (BLANDINO et al., 1999). No entanto, como principal desvantagem cita-se a sua solubilização quando utilizado por longos períodos de reação. Assim, a fim de manter-se a forma e a integridade das esferas de alginato de cálcio, é necessária, em muitos casos, a adição de íons de cálcio durante a reação (WIDERØE; DANIELSEN, 2001). Algumas alternativas vêm sendo desenvolvidas para contornar as dificuldades impostas pela utilização de géis de alginato de cálcio por longos períodos, como a utilização de quitosana e/ou pectina com o alginato, visando tornar os géis mais estáveis e aumentar sua resistência através das diferentes ligações químicas e físicas formadas (WIDERØE; DANIELSEN, 2001; LEE; MOONEY, 2012; BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015).

As propriedades gelificantes do alginato de cálcio dependem da composição monomérica, do tamanho molecular e da distribuição dos blocos que compõe a estrutua do polímero, bem como, da concentração de alginato de sódio e da concentração dos íons de cálcio (BLANDINO et al., 1999; LEE; MOONEY, 2012). Nesse contexto, Blandino et al. (1999) avaliaram o efeito da concentrações de alginato de sódio e de CaCl₂ na cinética de formação de cápsulas de alginato de cálcio. Os autores mostraram que o aumento na concentração do polímero torna a estrutura de gel mais densamente reticulada e menos porosa; com isso, do ponto de vista mecânico, essas amostras eram mais resistentes do que as obtidas a partir de soluções menos concentração de cloreto de cálcio sobre a resistência mecânica do gel.

Potumarthi et al. (2008), em estudo para a otimização do método de imobilização de *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 visando à produção de protease, descreveram que altas concentrações de alginato diminuíram a produção de enzimas, fato atrelado às dificuldades difusionais pelo tamanho reduzido dos poros da rede de reticulação. Já baixas concentrações podem promover o extravasamento do biocatalisador, devido ao grande tamanho de poros. Quanto ao efeito da concentração da solução de CaCl₂, os autores, também, observaram que em concentrações elevadas formam-se géis mais resistentes, dificultando a difusão. Assim, nas condições avaliadas, os resultados mostraram que a variação nas concentrações do biopolímero e do sal de cálcio pode resultar em melhora no desempenho das células imobilizadas por períodos prolongados. Ainda, para a condição de alginato de sódio 2,78% (m/v) e CaCl₂ 2,15% (m/v), foi possível reutilizar o biocatalisador imobilizador por doze ciclos de produção sem haver extravasamento do microrganismo para o meio.

3.4.1.1 Imobilização de *Zymomonas mobilis* em alginato de cálcio para a produção de ácidos orgânicos e sorbitol

Chun e Rogers (1988) compararam a produção de ácido glicônico e sorbitol com células permeabilizadas de *Z. mobilis* no seu estado livre e imobilizadas em alginato de cálcio. Neste estudo, observaram-se resultados semelhantes nas duas condições. Entretanto, a velocidade de formação de produtos foi maior para células livres, fato provavelmente relacionado com as limitações difusionais do sistema imobilizado. As células imobilizadas foram utilizadas em bateladas de bioconversão de 20 horas, repetidas cinco vezes, e observou-se que a atividade catalítica da enzima manteve-se acima de 80%, mesmo após as 120 horas de utilização. Para o mesmo processo, Bertasso et al. (1996) avaliaram a preservação da atividade catalítica de GFOR/GL em células de *Z. mobilis* não permeabilizadas e imobilizadas em alginato de cálcio. Os autores relataram a preservação de cerca de 80% da atividade inicial após aproximadamente 350 horas de processo de bioconversão em batelada.

Pedruzzi et al. (2011) avaliaram o efeito do tamanho da esfera do gel de alginato de cálcio contendo *Z. mobilis* (permeabilizada e reticulada com glutaraldeído) sobre a transferência de massa em ensaios de bioconversão de lactose (700 mmol/L) e frutose (350 mmol/L) em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente. Os autores mostraram não haver interferência considerável na velocidade de formação de produtos quando utilizadas esferas com diâmetro médio de 1,2 mm. Neste caso, o valor para a velocidade de formação de produtos foi de 41,6 mmol/L/h, enquanto que para reação com esferas maiores (1,7 mm), a velocidade diminuiu para 33,6 mmol/L/h. Assim, o tamanho da esfera representa um parâmetro importante para os parâmetros cinéticos da reação. Ainda, os autores descrevem que para a utilização deste sistema imobilizado por longos períodos são necessários novos estudos, uma vez que, ao final da bioconversão observou-se a ruptura do suporte.

No que se refere as características físicas do suporte de imobilização, nesse caso alginato de cálcio, ao final dos ensaios de bioconversão, Carra (2012) relata perda na rigidez do suporte e um aumento no diâmetro das esferas. Fato que está associado ao acúmulo de líquido no interior da esfera; no caso, este líquido compreende produtos e substratos da reação.

3.4.2 Glutaraldeído: características e aplicações

A reticulação é um processo químico em que cadeias independentes se interligam por meio de ligações covalentes, promovendo modificações na solubilidade e em outras propriedades das cadeias independentes (HEMAPRABHA, 2012). Dentre os agentes de reticulação de proteínas disponíveis, glutaraldeído é, sem dúvidas, o mais aplicado, nas mais diversas áreas, como, histoquímica, microscopia, citoquímica, curtimento de peles, tecnologia enzimática, esterilização química e biomédica e em ciências farmacêuticas (MIGNEAULT et al., 2004).

Glutaraldeído ($C_5H_8O_2$) é um dialdeído saturado de cinco carbonos, que se apresenta na forma de um líquido oleoso acentuado, cor de palha, solúvel em água, álcool e em outros solventes orgânicos. É comercializado na forma de solução ácida (pH 3,0-4,0), variando nas concentrações de 25% a 70% (m/v) (MIGNEAULT et al., 2004). Possui em sua estrutura grupamentos carbonila que reagem com ácidos nucléicos e proteínas em pH neutro (MINER et al., 1977), sendo mais eficiente do que outros aldeídos na formação de reticulação térmica e quimicamente estável (OKUDA et al., 1991).

A estrutura química do glutaraldeído é dependente do pH da solução em que se encontra, conforme descrito por Okuda et al. (1991) e por Walt e Agayn (1994) e ilustrado na Figura 7. As soluções comerciais (25% ou 70%), por exemplo, podem consistir de uma mistura multicomponentes: glutaraldeído livre (I), linear mono- (II) e di-hidratado (III), hemiacetal cíclico (IV) e oligômeros (V) (WALT; AGAYN, 1994).



Figura 7. Exemplos das formas do glutaraldeído em solução aquosa (adaptado de MIGNEAULT et al., 2004).

Cada estrutura participa de uma forma diferente nas reações de reticulação e, por consequência, resulta em produtos diferentes; porém, é difícil afirmar qual destes componentes é o mais eficiente para reações de reticulação (WALT; AGAYN, 1994; MIGNEAULT et al., 2004). Geralmente, a reação entre aldeídos e grupamentos amino resulta em uma base de Schiff (OKUDA et al., 1991), mas, sob condições ácidas, este composto formado torna-se instável e regenera-se a aldeído e amina (WALT; AGAYN, 1994). Em virtude da estabilidade das ligações entre glutaraldeído e o grupamento amino sob condições ácidas, sugere-se que este não seja o mecanismo provável para esta reação (OKUDA et al., 1991; WALT; AGAYN, 1994). Alternativas de elucidar o mecanismo de reticulação com glutaraldeído foram propostos por diversos autores (MIGNEAULT et al., 2004), destacando-se a condensação aldólica do glutaraldeído (RICHARDS; KNOWLES, 1968; MONSAN et al., 1975) e adição de Michael (RICHARDS; KNOWLES, 1968; PETERS; RICHARDS, 1977; TASHIMA et al., 1991). Na Figura 8, são mostrados os mecanismos de reação propostos para algumas das diferentes estruturas do glutaraldeído.


Figura 8. Reação das diferentes estruturas do glutaraldeído com enzimas/proteínas (adaptado de MIGNEAULT et al., 2004).

O mecanismo de reação do glutaraldeído com grupos amino das proteínas não é claramente compreendido, como ilustrado pelo número de mecanismos relatados na literatura (Figura 8) (MIGNEAULT et al., 2004). Acredita-se, que nenhum mecanismo único seja responsável pela reticulação do glutaraldeído com proteínas. Todas as formas relatadas de glutaraldeído exibem a capacidade de reagir e reticular as proteínas, conduzindo à formação de uma ampla gama de conjugados. No entanto, apesar das incertezas associadas ao mecanismo de reação, a inclusão de glutaraldeído em técnicas de imobilização de enzimas tem aumentado constantemente, especialmente pela formação de uma rede tridimensional insolúvel como resultado da reticulação intermolecular e a ligação a um suporte fixo (MIGNEAULT et al., 2004; BARBOSA et al., 2014).

A utilização do glutaraldeído na técnica de imobilização por inclusão em gel de alginato tem se destacado, uma vez que, assim, pode-se aumentar a estabilidade química e mecânica do gel (ATEŞ; MEHMETOĞLU, 1997; TANRISEVEN; DOĞAN, 2002; HUANG et al., 2014). Embora a estrutura química do gel de alginato de cálcio não permita ligações com o glutaraldeído (MIGNEAULT et al., 2004), relatos da combinação deste polímero com gelatina têm sido publicados, uma vez que a gelatina é uma proteína compatível com o glutaraldeído para a reticulação (TANRISEVEN; DOĞAN, 2002). Ainda, nos casos da utilização de alginato como único suporte para imobilização, glutaraldeído interage com o

biocatalisador, formando a rede de reticulação com os grupamentos amino nele presentes (Figura 9) (TANRISEVEN; DOĞAN, 2002).



Figura 9. Esquema da reticulação de células microbianas com glutaraldeído (MCGINLEY, 2012).

Ateş e Mehmetoğlu (1997) compararam a atividade específica de β -galactosidase imobilizada em alginato de cobalto, reticuladas e não reticuladas com glutaraldeído, e observaram que para a condição reticulada a atividade manteve-se em 83% por 240 horas, enquanto que para as não reticuladas a atividade foi de apenas 50% no mesmo tempo. Assim, os autores concluem que o tratamento dos géis de alginato com glutaraldeído promove maior estabilidade do gel e previne o extravasamento do biocatalisador (ATEŞ; MEHMETOĞLU, 1997). Para esta mesma condição, Haider e Husain (2007) mantiveram 90% da atividade após 42 horas de reação.

Jung et al. (1990) compararam a eficiência na conversão a sorbitol e ácido glicônico com células permeabilizadas de *Z. mobilis* em seu estado livre e imobilizado em alginato de cálcio, reticuladas e não reticuladas com glutaraldeído, em regime de operação continuo e em batelada. Os resultados para ensaios de bioconversão em batelada para células no seu estado livre e imobilizada em alginato de cálcio foram similares. Após o primeiro ciclo, a produção de sorbitol foi reduzida em aproximadamente 50-70% para a segunda e terceira batelada, fato associado, provavelmente, ao extravasamento das enzimas pela parede permeabilizada em alginato de cálcio, os autores observaram a redução na concentração de sorbitol à medida que as concentrações de substratos aumentaram, resultado que sugere a liberação das enzimas pela parede permeabilizada das células. Os autores contornaram essa situação com a utilização de glutaraldeído para promover a reticulação das enzimas no interior das células da bactéria, prevenindo a perda das enzimas e mantendo a conversão a sorbitol por 210 horas de reação.

A alta reatividade do glutaraldeído na reticulação dos grupamentos amino presente na parede externa e na membrana dos microrganismos é responsável pela eficácia biocida contra bactérias Gram-negativas, fungos e vírus (MINER et al., 1977). No caso de bactérias Gram-

negativas, por exemplo, sua destruição está associada a combinação da reticulação parcial da camada externa (composta de lipoproteína) e na inativação de determinadas enzimas presentes na parede celular ou no periplasma da bactéria, que são necessárias para a viabilidade celular. Assim, o transporte de nutrientes essenciais é inibido (GORMAN; SCOTT, 1980).

3.4.3 Produção de ácido lactobiônico e sorbitol com células de Zymomonas mobilis imobilizadas em alginato de cálcio

A imobilização de *Z. mobilis* em alginato de cálcio, para o uso de GFOR/GL, foi primeiramente relatada por Chun e Rogers (1988), conforme já descrito anteriormente. Para a produção de outros ácidos orgânicos, particularmente ácido lactobiônico, diferentes trabalhos foram descritos (MALVESSI, 2008; PEDRUZZI et al., 2011; CARRA, 2012; MALVESSI et al., 2013; CARRA et al., 2015), que serão discutidos a seguir.

Pedruzzi et al. (2011), avaliaram o efeito da concentração inicial dos substratos (lactose e frutose) em ensaios de bioconversão com o sistema imobilizado. Os autores observaram um incremento da velocidade reacional com o aumento da concentração inicial de lactose. Por outro lado, a presença da frutose não influenciou negativamente a velocidade inicial da reação, sendo essa dependente da concentração de lactose. Malvessi (2008) avaliou o efeito da concentração de lactose/frutose sobre a atividade enzimática do complexo GFOR/GL imobilizado em alginato de cálcio. Como resultado, verificou-se um efeito positivo e crescente na atividade enzimática com o aumento da concentração de substratos (lactose/frutose) até 900 mmol/L. Em concentrações superiores, entre 900 a 1200 mmol/L, resultados semelhantes foram obtidos e para concentrações maiores do que 1300 mmol/L, observou-se a redução da atividade enzimática. Entretanto, conforme já discutido anteriormente, o uso de elevadas concentrações de lactose é limitado pela sua solubilidade. Carra (2012), por sua vez, avaliou o efeito da concentração inicial de lactose (700 mmol/L) combinado a diferentes concentrações de frutose (500, 550, 600 e 700 mmol/L) com células permeabilizadas e reticuladas de Z. mobilis imobilizadas em alginato de cálcio (2% m/v). Como resultado, tem-se que a bioprodução de ácido lactobiônico foi superior quando utilizadas concentrações elevadas de frutose (600 e 700 mmol/L). Ainda, de forma geral, maior eficiência de produção de ácido lactobiônico e sorbitol por Z. mobilis foi atingida com a utilização de 700 mmol/L e 600 mmol/L de lactose e frutose, respectivamente.

Com o intuito de aumentar a velocidade reação e melhorar a produtividade do processo de obtenção ácido lactobiônico e sorbitol com *Z. mobilis* imobilizada em alginato de cálcio,

Carra (2012) avaliou o efeito de diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 g/L) do biocatalisador imobilizado em ensaios de bioconversão com lactose/frutose 0,7 mol/L. Com o aumento da concentração do biocatalisador, menor tempo de reação foi necessário para atingir o mesmo percentual de conversão do substrato; assim, a produtividade foi superior para a condição 30 g/L. Embora Malvessi et al. (2013), em reação com células livres, tenham observado uma diminuição na produtividade específica em concentrações de biocatalisador superiores a 25 g/L, os resultados de Carra (2012) demonstram a possibilidade de utilização de 30 g/L biocatalisador imobilizado sem haver excesso de enzimas em relação ao substrato disponível na reação. No entanto, as dificuldades associadas ao processo nesta condição, com destaque para a diminuição da quantidade de água disponível para solubilização dos substratos e problemas de mistura/controle de processo em reatores com agitação magnética, resultaram na definição por 20 g/L do biocatalisador imobilizado.

A influência do pH e da temperatura no processo de produção de ácido lactobiônico e sorbitol por *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio e posterior reticulação com glutaraldeído foi avaliado por Malvessi et al. (2013). Os autores relatam superioridade na atividade catalítica das enzimas em valores de pH de 7,0 a 8,0 e temperatura de 47 a 50°C, alcançando um incremento de 24% e 35%, respectivamente, quando comprada com as condições padrão descritas na literatura (39°C, pH 6,4). No entanto, em ensaios de bioconversão repetidos, obtenção de rendimento máximo de 75% em ácido lactobiônico foi em pH 6,4 e nas temperaturas de 39 ou 47°C. Esse resultado para temperaturas superiores se deveu, possivelmente, a um efeito protetor do suporte às enzimas (MALVESSI et al., 2013).

A reutilização em repetidas bateladas de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol foi avaliada por Carra et al. (2015), que observaram queda na máxima velocidade específica de formação dos produtos e na produtividade específica ao longo do processo. Os autores sugerem que a redução nos parâmetros da reação se deveu, provavelmente, à redução na transferência de massa ocasionada pelo enrijecimento do suporte posteriormente ao tratamento com CaCl₂.

3.5 BIORREATORES PARA BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS: CARACTERISTICAS E CONFIGURAÇÃO

O sucesso de processos realizados com o uso de biocatalisadores imobilizados depende, adicionalmente, da escolha adequada do tipo de biorreator (PITCHER JR, 1978). Embora exista uma variedade de reatores, bem como de formas de condução da operação, esta

definição dependerá das particularidades do processo, tais como as características de mistura, transferência de massa exigida, distribuição das células, atrito com o biocatalisador, cinética da reação, controles empregados e custo do reator (NEMATI e WEBB, 2011). Os reatores empregados para sistemas imobilizados podem ser de mistura completa com agitação mecânica (STR) ou com agitação pneumática, e de coluna, com leito fixo ou leito fluidizado (NEMATI e WEBB, 2011). O regime de operação para tal aplicação pode ser descontínuo, descontínuo alimentado ou com processo contínuo (PITCHER JR, 1978). Embora o processo mais simples seja em reator de mistura completa em regime descontínuo, a combinação de diferentes tipos de reatores e regimes de operação pode ser empregada (PITCHER JR, 1978; NEMATI e WEBB, 2011).

Os reatores de mistura completa com agitação mecânica (Figura 10) são os mais utilizados para crescimento microbiano e bioconversão com células no seu estado livre, tanto em escala laboratorial como em industrial (PITCHER JR, 1978; SHMIDELL et al., 2001). Isso se deve à eficiência na mistura do meio, o que proporciona melhor transferência de calor e massa e de controles de parâmetros como o pH e a temperatura (PITCHER JR, 1978; SHMIDELL et al., 2001). Para isso, no entanto, este tipo de reator requer elevada quantidade de energia, o que pode consistir num impecilho econômico para o processo (SHMIDELL et al., 2001). Apesar disso, a principal limitação destacada para este tipo de reator, aplicado aos sistemas imobilizados, tem relação com a tensão de cisalhamento provocada pelos impelidores sobre suporte do biocatalisador imobilizado (NEMATI e WEBB, 2011).





Os impelidores são os responsáveis pelos fluxos do fluido no reator e, dependendo de seu formato, provocam diferenças na caracterização da mistura. Logo, para contornar os efeitos adversos do cisalhamento, há a possibilidade de trabalhar com diferentes tipos de impelidores,

que sejam capazes de promover a homogeneidade na mistura com menor cisalhamento (NEMATI e WEBB, 2011).

Como alternativa para contornar os problemas impostos pelos impelidores nos reatores de agitação mecânica, utiliza-se circulação de ar para promover a homogeneização (OBRADOVIC et al., 2004; MARGARITIS; KILONZO, 2005; NEMATI; WEBB, 2011). Esse tipo de reator é representado na Figura 11. A injeção de um gás pode ser avaliada como uma forma conveniente para distribuir o meio de um biorreator. Com isso, tem-se a obtenção de uma eficiente mistura e transferência de massa, em um ambiente com mais suavidade e com forças de cisalhamento distribuídas uniformemente. Este é um reator atrativo em grande escala devido à sua simplicidade, facilidade de operação e consumo mais baixo de energia (NEMATI; WEBB, 2011).



Figura 11. Desenho esquemático de um reator com agitação pneumática (adaptado NEMATI; WEBB, 2011).

Biorreatores de leito fixo (Figura 12a) são frequentemente utilizados em bioprocessos com microrganismos anaeróbios e com biocatalisadores imobilizados, tendo como vantagens a sua construção simples e seu baixo custo de operação (NEMATI e WEBB, 2011). Estes reatores consistem de uma coluna empacotada com o biocatalisador e sob o qual o meio é escoado (PRADELLA, 2001). Estes reatores promovem a fácil separação entre as fases e permitem taxas de fluxo elevadas para substrato com baixa solubilidade. Sua limitação está relacionada à baixa transferência de calor e de massa, formação de caminhos preferenciais e falta de mistura no reator, o que prejudica as velocidades de formação de produto. Há dificuldades, ainda, quanto ao controle dos parâmetros de processo, como pH e temperatura (PRADELLA, 2001; CANILHA et al., 2006; COVIZZI et al., 2007; NEMATI; WEBB, 2011).

Reatores de leito fluidizado (Figura 12b) podem ser compreendidos como sendo uma

variação do sistema de leito fixo; aliando as características de boas condições de misturas às baixas tensões de cisalhamento (CANILHA et al., 2006; COVIZZI et al., 2007). Consistem de uma coluna vertical, na qual o biocatalisador imobilizado é colocado na proporção de até 70% do volume útil do reator, sendo então fluidizado com injeção de ar. A dificuldade de operação deste tipo de reator está nos controles do processo, como pH e temperatura (PRADELLA, 2001; CANILHA et al., 2006; COVIZZI et al., 2007)



Figura 12. Desenho esquemático de um reator de leito fixo ou empacotado (a) e leito fluidizado (b) (NEMATI; WEBB, 2011).

3.5.1 Aplicação de diferentes reatores e regimes de operação em reação com biocatalisadores imobilizados em alginato de cálcio

Na literatura, encontra-se uma ampla variedade de trabalhos empregando diferentes configurações de reatores para condução de processos com biocatalisadores, microrganismos e enzimas, imobilizados em alginato de cálcio. Quanto às reações empregadas, têm-se desde cultivos microbianos, com enfoque a produção de metabólitos, até aplicação nas áreas de remediação e controle de poluição ambiental e para produção de produtos farmacêuticos e bioquímicos (PALLERLA; CHAMBERS, 1997; BECERRA et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 2001; GENARI ET AL., 2003; DOMÍNGUEZ et al., 2005; GABARDO et al., 2012; RAKMAI; CHEIRSILP, 2016; KONTI et al., 2016; MISHRA et al., 2016).

No Quadro 1 estão exemplificados alguns trabalhos para sistemas imobilizados em alginato de cálcio com destaque quanto ao reator empregado e ao biocatalisador utilizado.

Reator	Biocatalisador	Referência
Airlift	Trametes hirsuta	Domínguez et al. (2005)
	Ciclodextina glicosiltransferase	Rakmai e Cheirsilp (2016)
Agitação	Kluyveromyces lactis	Genari et al. (2003)
mecânica	Pseudomonas putida	González et al. (2001)
	I setuomonus puttuu	Konti et al. (2016)
	Ciclodextina glicosiltransferase	Rakmai e Cheirsilp (2016)
Leito	Kluyveromyces marxianus	Gabardo et al. (2012)
empacotado	Saccharomyces cerevisiae	Mishra et al. (2016)
	Pseudomonas putida	Konti et al. (2016)
	Pseudomonas putida	González et al. (2001)
Leito fluidizado	Kluyveromyces marxianus	Gabardo et al. (2012)
	Trametes versicolor	Pallerla e Chambers (1997)
Plug-flow	Kluwveromyces lactis	Becerra et al. (2001)
1 1115-1101	Kiuyveroniyces tacits	Genari et al. (2003)

Quadro 1. Utilização de diferentes configurações de reatores para biocatalisadores imobilizados em alginato de cálcio.

Para o caso específico da condução do processo de obtenção de ácidos orgânicos (ácido glicônico ou lactobiônico) e sorbitol por GFOR/GL, contidas em *Z. mobilis* imobilizada em alginato de cálcio, são convencionalmente descritas para reatores com agitação mecânica ou magnética (CHUN; ROGERS, 1988; JUNG et al., 1990; PEDRUZZI et al., 2011; CARRA, 2012; MALVESSI et al., 2013; CARRA et al., 2015). Nesses casos, na maioria dos trabalhos, utilizou-se o regime descontínuo (CHUN; ROGERS, 1988; PEDRUZZI et al., 2011; CARRA, 2012; MALVESSI et al., 2013; CARRA et al., 2015), embora o trabalho de Jung et al. (1990) seja um exemplo do uso do regime contínuo. Registros da condução destas reações em regime descontínuo alimentado não foram evidenciados, com exceção do trabalho de Satory et al. (1997) que fez uso da GFOR/GL purificada, como descrito no item 3.3.1.

Especialmente para a obtenção de ácido lactobiônico e sorbitol, Malvessi et al. (2006a) avaliaram diferentes configurações de biorreatores (mistura completa, leito fixo e leito fluidizado). Como resultados os autores destacaram que a máxima velocidade específica de formação de ácido lactobiônico foi maior com o emprego de reator de mistura completa; isso,

porque, neste tipo de reator, o contato entre enzima e substrato foi favorecido e os controles de processos, como pH, foram facilitados. As reações em reator de mistura completa com agitação magnética alcançaram rendimentos em produtos próximos a 70% (PEDRUZZI et al., 2011; CARRA, 2012; MALVESSI et al., 2013; CARRA et al., 2015).

Diferentes sistemas de produção de sorbitol e ácido glicônico empregando GFOR/GL contida em *Z. mobilis* imobilizada foram avaliados, também, utilizando-se como suporte k-carragena (REHR et al., 1991; JANG et al., 1996), assim como já mencionando anteriormente. Nesses casos, as reações foram conduzidas em regime continuo de operação em reator de mistura completa – CSTR (JANG et al., 1996) e de leito empacotado (REHR et al., 1991; JANG et al., 1996). Rehr et al. (1991) relataram, ainda, a reação em regime descontínuo em reator de leito empacotado.

Nos casos levantados na literatura, evidencia-se que a imobilização em alginato de cálcio é uma das técnicas mais utilizadas para esse fim. Apesar disso, não são encontrados relatos envolvendo a otimização das condições de imobilização de *Z. mobilis* neste suporte, especificamente aplicadas ao processo de produção de ácidos orgânicos e sorbitol. Ainda, nos procedimentos de imobilização descritos, inclui-se, em geral, uma etapa de inviabilização das células bacterianas por permeabilização, seguida de outra em que o biocatalisador, livre ou imobilizado, é reticulado com glutaraldeído. No entanto, não há registros sobre a utilização do próprio glutaraldeído como agente de inviabilização da bactéria, abrindo-se a possibilidade de supressão da etapa de permeabilização celular, mesmo conhecendo-se a ação biocida dessa substância contra bactérias Gram-negativas. Adicionalmente, a condução desse processo tem sido realizada em reator de mistura completa, em regime descontínuo, com agitação magnética ou mecânica, com poucas referências à aplicação de outros regimes de operação e tipos de reatores. Com isso, fica evidente que, apesar de vir sendo pesquisado há duas décadas, o processo de produção de ácido lactobiônico e sorbitol requer, para o seu aprimoramento, novos estudos, envolvendo diferentes aspectos como os que são abordados no presente trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

A bactéria utilizada nesse estudo foi Zymomonas mobilis ATCC 29191 (NRRL B-4492), adquirida do United States Departament of Agriculture (USDA). As culturas foram mantidas em meio líquido, repicadas mensalmente e estocadas a 4°C.

4.2 PROCESSO CONVENCIONAL PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL

A produção de ácido lactobiônico e sorbitol por GFOR/GL retido em células de Z. *mobilis* imobilizada em alginato de cálcio tem sido objeto de estudo no Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul e para dar início ao processo, inicialmente, é necessário a obtenção da biomassa por meio do cultivo microbiano. Posteriormente, segue-se o procedimento de permeabilização celular e reticulação com glutaraldeído. Entre cada uma dessas etapas (cultivo, permeabilização e reticulação) a biomassa é centrifugada e concentrada. As etapas subsequentes do processo consistem na imobilização celular e utilização em ensaios de bioconversão de substratos em produtos.

Na Figura 13, é apresentado o fluxo deste processo, desde a etapa fermentativa de *Z*. *mobilis* até os ensaios de bioconversão. O detalhamento de cada etapa será descrito nos itens a seguir.



Figura 13. Fluxograma do processo convencional desde a etapa fermentativa de *Zymomonas mobilis* até os ensaios de bioconversão em produtos.

4.2.1 Meios e condições de cultivo microbiano

O meio de cultivo líquido utilizado para conservação e ativação da linhagem microbiana, obtenção do inóculo e ensaios em biorreator foi o descrito por Malvessi et al. (2006b) com a seguinte composição (g/L):

$(NH_4)_2SO_4$	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
KH ₂ PO ₄	3,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Extrato de levedura	7,5

Para o preparo do meio de ativação e conservação da cultura, foram adicionados 20 g/L de glicose e o pH foi ajustado para 5,5. Na obtenção dos inóculos, a concentração de glicose utilizada foi de 100 g/L e o pH do meio ajustado para 5,5 e controlado com a adição de CaCO₃ na concentração de 5 g/L. A concentração de glicose para o cultivo no reator foi de 150 g/L. A esterilização do meio e da solução concentrada de glicose foi realizada em autoclave, a 1 atm de pressão manométrica, por 20 minutos.

A ativação de culturas foi realizada com a adição de 4 mL da suspensão bacteriana em estoque a tubos com 36 mL de meio de ativação, incubados a 30°C por 12 horas. A preparação dos inóculos foi feita em frascos Duran contendo 405 mL do meio de cultura, com massas de substrato e nutrientes necessárias para 450 mL, e 45 mL da cultura previamente ativada. Os frascos de inóculo foram mantidos sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U/H – B. Braun Biotech, Alemanha), em anaerobiose, a 30°C por 10 horas.

O cultivo para produção de biomassa e enzimas foi realizado em batelada, em fermentador de bancada Tecnal modelo Tecbio com cuba com 7,0 L de volume total e 5,5 L de volume útil (Figura 14). A agitação do meio no reator foi proporcionada por três turbinas do tipo *Rushton* equidistantes 67 mm. A frequência dos impelidores foi de 450 rpm. O meio de cultivo foi inoculado com o volume necessário para obter-se uma suspensão celular de 20 unidades de absorbância a 560 nm. A temperatura foi mantida a 30°C por meio de um banho circulante ligado a um tubo em "U" conectado na tampa do reator e localizado no interior da cuba. O controle de pH foi realizado pelo *software* TecBio-Soft versão 2.2.9A, do próprio reator, pela adição de NaOH 5 mol/L com o auxílio de uma bomba peristáltica. Nos 30 minutos iniciais do cultivo, nitrogênio gasoso foi borbulhado no meio a fim de garantir a anaerobiose. Ao término do cultivo, o meio fermentado foi recolhido e centrifugado (Centrífuga Sigma 4K-15), a 6000 rpm (5836 x g), por 10 minutos.



Figura 14. Biorreator de agitação mecânica Tecnal – modelo TecBio.

4.2.2 Permeabilização celular

Para a permeabilização das células de *Z. mobilis* seguiu-se a metodologia convencional proposta por Rehr et al. (1991) com modificações. Após a centrifugação do caldo fermentado, a biomassa celular foi concentrada a 25 g/L e tratada com 0,2% (m/v) de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, a biomassa permeabilizada foi centrifugada (Centrífuga Sigma 4K-15), a 6000 rpm (5836 x *g*), por 10 minutos.

4.2.3 Reticulação com glutaraldeído

O procedimento de reticulação das células com glutaraldeído seguiu a metodologia proposta por Jung et al. (1990) com modificações. A biomassa celular, após permeabilizada, foi concentrada a 50 g/L e tratada com glutaraldeído 0,5% (v/v), sem controle de temperatura, por 10 minutos. Posteriormente, a biomassa foi centrifugada (Centrífuga Sigma 4K-15), a 6000 rpm (5836 x *g*), por 10 minutos.

4.2.4 Imobilização celular

Para o encapsulamento de *Z. mobilis* em alginato de cálcio utilizou-se, como base, a metodologia descrita por Carra (2012). Inicialmente, dissolveu-se alginato de sódio Algogel 5540 (Cargill SA) em água 4% (m/v) e manteve-se a solução sob agitação por 12 horas (*overnight*). Após, a solução de alginato de sódio foi misturada com igual volume da suspensão

celular (70 g/L), previamente permeabilizada e reticulada. Essa mistura permaneceu sob agitação por cerca de 2 horas, até a perfeita homogeneização das fases. Para a formação das esferas de alginato de cálcio, todo o volume da suspensão celular + alginato de sódio foi gotejado em solução de cloreto de cálcio 0,3 mol/L. Posteriormente, as esferas de alginato de cálcio contendo o biocatalisador foram, mais uma vez, tratadas com solução de glutaraldeído 0,5% (v/v). Após a imobilização, as esferas foram estocadas em água pH 7,0 a 4°C para posteriores ensaios de bioconversão.

4.2.5 Ensaios de bioconversão

Os ensaios de bioconversão foram realizados em reatores encamisados com 200 mL de volume útil, em meio reacional contendo solução de lactose 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L, e 20 g/L de biocatalisador imobilizado (CARRA, 2012). O meio reacional foi mantido a 39°C, com o uso de um banho termostatizado, sob agitação magnética. O pH foi controlado em 6,4, com solução NaOH 7 mol/L contida numa bureta, com o uso de equipamento Dosatronic pH 2900 acoplado a uma bomba peristáltica DosaMini 100 (Provitec, Brasil) (Figura 15).



Figura 15. Sistema utilizado nos ensaios de bioconversão.

(1) Reator encamisado; (2) agitador magnético; (3) banho termostatizado; (4) controlador de pH;(5) bomba peristáltica; (6) bureta com NaOH.

Tendo em vista que as esferas contendo as células de *Z. mobilis* imobilizadas são compostas por 91% de água (CARRA, 2012), o volume de líquido para diluir a solução de substratos (lactose + frutose) foi ajustado conforme a Equação 1.

$$V_1 = V_T - (M_0 \times 0.91)$$
 (1)

Onde:

V₁ – volume de líquido para diluir os substratos (mL);

V_T – volume total da bioconversão (200 mL);

M₀ – massa inicial das esferas para a bioconversão (g).

4.3 EXPERIMENTOS REALIZADOS

Neste item, são descritos os ensaios realizados neste trabalho, detalhando-se as condições experimentais utilizadas. Na Figura 16, é apresentado o fluxograma dos experimentos realizados.



Figura 16. Fluxograma dos experimentos realizados neste trabalho.

4.3.1 Avaliação de condições de imobilização de Zymomonas mobilis em alginato de cálcio

4.3.1.1 Influência da concentração do alginato de sódio e da solução de cloreto de cálcio na imobilização celular

A preparação das esferas de alginato de cálcio contendo biomassa de *Z. mobilis* seguiu, como condição padrão, a metodologia descrita por Carra (2012). Entretanto, as concentrações das soluções de alginato de sódio e de cloreto de cálcio foram avaliadas, como variáveis no planejamento de experimentos, com o objetivo de manter-se a resistência do gel em ensaios de bioconversão e melhorar os parâmetros cinéticos da reação.

O desenho experimental foi feito com dois fatores e três níveis: i) A1, concentração de alginato de sódio (% m/v): 1 (-1), 1,75 (0) e 2,5 (+1); ii) A2, concentração da solução de cloreto de cálcio (mol/L): 0,1 (-1); 0,3(0) e 0,5 (+1), conforme apresentado na Tabela 1. A concentração

de alginato de sódio informada na Tabela 1 é aquela atingida após a mistura com a suspensão celular, antes do gotejamento sobre CaCl₂.

Experimente	Alginato de sódio – A1	Cloreto de Cálcio – A2
Experimento	(% m/v)	(mol/L)
1	0 (1,75)	0 (0,3)
2	+1 (2,5)	+1 (0,5)
3	+1 (2,5)	-1 (0,1)
4	0 (1,75)	0 (0,3)
5	-1 (1,0)	+1 (0,5)
6	0 (1,75)	0 (0,3)
7	0 (1,75)	-1 (0,1)
8	0 (1,75)	0 (0,3)
9	-1 (1,0)	-1 (0,1)
10	0 (1,75)	+1 (0,5)
11	0 (1,75)	0 (0,3)
12	+1(2,5)	0 (0,3)
13	-1 (1,0)	0 (0,3)

Tabela 1. Planejamento de experimentos codificados e decodificados para a concentração de alginato de sódio (A1) e cloreto de cálcio (A2) na imobilização das células de *Zymomonas mobilis*.

As esferas preparadas em cada condição foram submetidas a ensaios de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, por 24 horas. As variáveis resposta foram a produtividade específica (p) e a máxima velocidade específica de formação dos produtos ($\mu_{p,máx}$). A otimização dos parâmetros de imobilização foi realizada usando *Central Composite Design* (CCD) e processados com o auxílio do programa estatístico Minitab 16.

Em testes posteriores, nova imobilização foi realizada com concentrações de alginato de sódio de 1,75, 2,5 e 3,25 % (m/v), e mantendo-se a concentração da solução de cloreto de cálcio em 0,3 mol/L. O objetivo foi avaliar o efeito de concentrações elevadas de alginato nos parâmetros cinéticos em bioconversões repetidas. Ao final de 24 horas de bioconversão, as esferas de alginato foram removidas do meio, lavadas com água destilada, tratadas com solução de CaCl₂ 0,3 mol/L por 10 minutos, drenadas para remover o excesso de água e pesadas. Posteriormente, estas mesmas esferas, foram submetidas a novos ensaios de bioconversão com lactose e frutose. Neste caso, o parâmetro de avaliação foi a redução na máxima velocidade específica de formação dos produtos ($\mu_{p,máx}$) entre a primeira bioconversão e a seguinte.

Ao final dos ensaios de bioconversão observa-se o aumento da massa das esferas, uma vez que têm-se a difusão de substratos, produtos e água para dentro das esferas (CARRA, 2012). Assim, para reutilizar o sistema imobilizado em nova batelada de bioconversão, foi necessário subtrair o volume de líquido retido no interior do gel, do volume de líquido da solução de

substratos. A Equação 2 foi utilizada para determinar o volume da solução de substratos na batelada repetida de bioconversão.

$$V_2 = V_1 - (M_F - M_0)$$
 (2)

Onde:

V₂-volume de líquido para diluir os substratos na bioconversão repetida (mL);

V₁ – volume de líquido para diluir os substratos na primeira bioconversão (mL);

M_F – massa das esferas ao final da bioconversão (g);

M₀ – massa inicial das esferas na bioconversão (g).

4.3.1.2 Influência do tempo de contato das esferas imobilizadas com a solução de cloreto de cálcio

Avaliou-se a influência do tempo de gelificação das esferas de alginato, contendo biomassa de *Z. mobilis*, com a solução de cloreto de cálcio. Esse ensaio teve por objetivo verificar o efeito do tempo de contato entre a esfera de alginato recém-formada com a solução de CaCl₂, a fim de promover a manutenção na resistência dos géis em ensaios repetidos de bioconversão. A mistura de solução de alginato de sódio 4% (m/v) e da suspensão celular, em partes iguais, foi gotejada na solução de CaCl₂ 0,3 mol/L por 5 minutos. Após, interrompeu-se o gotejamento e controlou-se o tempo de contato entre as esferas de suporte e a solução de CaCl₂. Os tempos avaliados foram de 10, 60 e 240 minutos.

Posteriormente, as esferas foram reticuladas com glutaraldeído, lavadas com água destilada e utilizadas em ensaios de bioconversão de lactose e frutose em bateladas repetidas com 24 horas de duração. Ao final da primeira batelada, as esferas de alginato de cálcio foram separadas do meio reacional e seguiu-se a metodologia de tratamento com CaCl₂ 0,3 mol/L, como descrito anteriormente. Neste grupo de ensaios, os parâmetros de avaliação foram a concentração máxima de produtos, a produtividade específica e a máxima velocidade específica de formação dos produtos obtida nos ensaios de bioconversão com o biocatalisador imobilizado em cada condição (10, 60 e 240 minutos).

Ao final, para a melhor condição encontrada de imobilização, avaliou-se a utilização do biocatalisador em sete ciclos consecutivos de bioconversão com o objetivo de avaliar a possibilidade de reutilização do biocatalisador imobilizado para produção de ácido lactobiônico e sorbitol. Nesses ensaios, o tempo de cada batelada foi de 24 horas ou até atingir 75% de conversão. Salienta-se que entre cada batelada, as esferas de alginato de cálcio foram tratadas

com CaCl₂ como descrito previamente.

4.3.2 Avaliação de métodos de inviabilização do metabolismo fermentativo de Zymomonas mobilis

No procedimento de imobilização celular, posterior à permeabilização com CTAB, a biomassa é reticulada com glutaraldeído com o fim de aumentar a estabilidade enzimática e para promover a reticulação das células. Assim, avaliou-se a possibilidade da substituição da permeabilização celular por CTAB pela simples exposição das células ao glutaraldeído, uma vez que ambos os tratamentos podem agir no sentido de inviabilizar o consumo dos substratos através da via fermentativa. Os tratamentos avaliados para inibição no metabolismo fermentativo da biomassa estão descritos abaixo:

- CTAB permeabilização com brometo de cetil trimetil amônio 0,2% (m/v), a 4°C por 15 minutos (REHR et al., 1991).
- Glu 10 reticulação com glutaraldeído 0,5% (v/v), sem controle de temperatura, por 10 minutos.
- Glu 20 reticulação com glutaraldeído 0,5% (v/v), sem controle de temperatura, por 20 minutos.

4.3.2.1 Avaliação da inviabilização do metabolismo fermentativo de *Zymomonas mobilis* pelo consumo de substrato e por determinação de atividade enzimática

A verificação da inativação celular foi preliminarmente realizada submetendo-se a biomassa tratada (CTAB, Glu 10 e Glu 20) às condições normais de cultivos em frascos anaeróbios, sob agitação orbital de 200 rpm (Certomat U/H – B. Braun Biotech, Alemanha), por 20 horas de incubação, a 30°C. A concentração de glicose no meio de cultivo padrão foi de 100 g/L. O pH foi ajustado em 5,5 e controlado com a adição de 5 g/L de CaCO₃. Em paralelo, conduziram-se ensaios com biomassa não tratada (Branco), a fim de avaliar a viabilidade das células. Amostras foram coletadas no início do ensaio e após 20 horas de incubação para determinação de açúcares, com o fim de avaliar o consumo de substrato. Posteriormente, avaliou-se a influência destes tratamentos sobre a atividade enzimática por meio da determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidorredutase e glicono- δ -lactonase.

4.3.2.2 Avaliação da bioconversão com a biomassa tratada com glutaraldeído e isenta de tratamento

Ensaios de bioconversão foram realizados para avaliar o efeito do tratamento único com glutaraldeído sobre a atividade catalítica do complexo enzimático em condições de produção, ou seja, por longos períodos de reação, a fim de comprovar o acúmulo dos produtos de interesse no meio reacional. Desta forma, conduziram-se as reações de bioconversão por 24 horas em condições operacional padrão (pH 6,4; 39°C) e com 20 g/L do biocatalisador (livre e imobilizado). Para estes ensaios soluções equimolares dos substratos glicose e frutose e de lactose e frutose foram utilizadas (Quadro 2). A utilização de glicose como substrato deveu-se por este ser o carboidrato preferencial para a via fermentativa. As condições com concentrações reduzidas de substratos objetivaram comprovar que o acúmulo dos produtos da bioconversão realmente decorreu do tratamento com glutaraldeído e não pela inibição do metabolismo fermentativo da bactéria pelos substratos.

Identificação	Substratos	Concentração de substratos equimolar (mmol/L)	Condição do biocatalisador	Concentração do biocatalisador (g/L)
Branco	glicose e frutose	400 e 700	livre	20
	lactose e frutose	400 e 700	livre	20
Glu	glicose e frutose	400 e 700	livre	20
014	lactose e frutose	400 e 700	livre	20
Branco Imb	glicose e frutose	400 e 700	imobilizado	20
	lactose e frutose	400 e 700	imobilizado	20
Glu Imb	glicose e frutose	400 e 700	imobilizado	20
	lactose e frutose	400 e 700	imobilizado	20

Quadro 2. Condições testadas para tratamento nas células em diferentes concentrações iniciais de substratos nos ensaios de bioconversão.

A identificação de cada tratamento apresentado no Quadro 2 está descrita abaixo:

- Branco suspensão celular isenta de tratamento para inviabilizar o metabolismo fermentativo.
- Glu suspensão celular tratada com glutaraldeído 0,5% (v/v), sem controle de temperatura por 10 minutos.
- Branco Imb suspensão celular isenta de tratamento para inviabilizar o metabolismo

fermentativo e imobilizada em alginato de cálcio, com posterior reticulação das esferas do suporte com glutaraldeído 0,5% (v/v), sem controle de temperatura por 15 minutos.

Glu Imb – suspensão celular tratada com glutaraldeído 0,5% (v/v), sem controle de temperatura por 10 minuto, e imobilizada em alginato de cálcio com posterior reticulação das esferas do suporte com glutaraldeído 0,5% (v/v), sem controle de temperatura por 15 minutos.

No decorrer dos ensaios de bioconversão, amostras foram coletadas para a avaliação do consumo dos substratos e acúmulo dos produtos. Para as reações com biocatalisador livre, o volume coletado de amostra de 2 mL foi centrifugado (Centrífuga Sigma 4K-15), a 10.000rpm (11180 x g) por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi diluído e armazenado sob refrigeração para a posterior determinação da concentração dos substratos e produtos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em reações com biocatalisador imobilizado, amostras de 1 mL foram coletadas, imediatamente, diluídas e armazenadas sob refrigeração para posterior análise por CLAE.

4.3.3 Estabilidade do sistema imobilizado em diferentes condições de estocagem

A estabilidade do complexo enzimático de GFOR/GL contido nas células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio foi avaliada em duas condições de estocagem: i) esferas armazenas em água pH 7,0 e ii) esferas armazenadas drenadas (isentas de água livre). O período de estocagem foi de 30, 90 e 150 dias. O objetivo destes ensaios foi propor diferentes condições para estocagem do biocatalisador visando facilitar o processo de armazenamento e utilização deste e manter a atividade das enzimas.

A estabilidade enzimática foi avaliada, ainda, quanto aos diferentes tratamentos ao qual a suspensão celular foi submetida previamente à imobilização. As esferas de alginato + células foram armazenadas a 4°C em água destilada por 15, 30, 60 e 120 dias. Posteriormente, as esferas de alginato de cálcio foram utilizadas em ensaios de bioconversão com lactose e frutose sob as condições operacionais padrão (pH 6,4; 39°C). Os diferentes tratamentos avaliados estão descritos abaixo, sendo que para todas as condições a suspensão celular foi imobilizada em alginato de cálcio 2% (m/v), de acordo com o procedimento convencional descrito por Carra (2012).

- Branco Imb suspensão celular não tratada.
- Glu Imb suspensão celular tratada com glutaraldeído 0,5% (v/v).
- CTAB Imb suspensão celular permeabilizada com CTAB 0,2% (m/v), posterior reticulação

com glutaraldeído 0,5% (v/v).

4.4 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA LACTOSE E DO SAL DE LACTOBIONATO EM ÁGUA

Embora a solubilidade das substâncias seja descrita qualitativamente pela Farmacopeia, nesse trabalho buscou-se estimar, de forma aproximada, a solubilidade da lactose e do lactobionato de sódio nas condições do ensaio de bioconversão (pH 6,4 e 39°C).

Os testes de solubilidade foram realizados em reatores encamisados com 200 mL de volume útil, contendo 100 mL de água destilada. A solução foi mantida a 39°C, com o uso de um banho termostatizado, sob agitação magnética. O pH da água foi corrigido para 6,4 e foi monitorado com o uso de equipamento Dosatronic pH 2900 (Provitec, Brasil). Adicionou-se lactose e lactobionato de sódio parceladamente, anotando a massa adicionada, até que a solução ficasse totalmente saturada. Ao final, a solução foi mantida sob agitação por 4 horas, para confirmar a sua saturação.

Com o valor em massa (g) da substância adicionada até o momento antes da saturação foi determinada a solubilidade dos componentes em função do volume total (mL).

4.5 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL

Convencionalmente, os ensaios de bioconversão em laboratório foram realizados em reator de mistura completa sob agitação magnética, com regime de operação em batelada. Com o fim aumentar a produtividade do processo e, ainda, propor diferentes sistemas de produção para uma possível aplicação em escala industrial, avaliaram-se ensaios de bioconversão em reator de agitação mecânica e agitação pneumática sob regimes de operação descontínuo (RD) e descontínuo alimentado (RDA). Adicionalmente, as reações foram avaliadas com diferentes concentrações celulares.

A agitação do meio nos ensaios de bioconversão conduzidos em reator de mistura completa com agitação mecânica (Figura 17a) foi proporcionada por uma turbina do tipo âncora (Figura 17b) acoplada a um agitador mecânico modelo 713D (Fisatom, Brasil). A frequência de agitação do impelidor foi de aproximadamente 100 rpm. O reator encamisado tinha 800 mL de volume útil, e as dimensões eram 110 mm de diâmetro e 160 mm de altura.



Figura 17. Esquema do reator de agitação mecânica (a) e da turbina tipo âncora (b) utilizados nos ensaios de bioconversão em regime descontínuo e descontínuo alimentado.

Para os ensaios de bioconversão com agitação pneumática, utilizou-se um reator tubular (Figura 18) e a agitação foi proporcionada pela injeção de ar na parte inferior do reator. O ar foi previamente filtrado e aquecido. O fluxo de ar foi mantido em aproximadamente 1,0 L/min. As dimensões do reator foram 54 mm de diâmetro e 300 mm de altura e o volume útil era de 500 mL.



Figura 18. Esquema do reator tubular utilizados nos ensaios de bioconversão em regime descontínuo e descontínuo alimentado.

Em todos os ensaios de bioconversão, o reator foi mantido a 39°C com um banho termostatizado e o pH foi controlado em 6,4, com solução NaOH 7 mol/L contida numa bureta, com o uso de equipamento Dosatronic pH 2900 acoplado a uma bomba peristáltica DosaMini 100 (Provitec, Brasil).

Com o objetivo de verificar o efeito da concentração do biocatalisador na velocidade da reação e na produtividade do processo, foram realizados ensaios com 20 e 30 g/L de biocatalisador imobilizado.

Nos ensaios de bioconversão RDA, a concentração inicial de substratos foi de 700

mmol/L e 600 mmol/L para lactose e frutose, respectivamente. A alimentação de substratos foi realizada à medida que os produtos foram sendo formados. Nesse caso, procurou-se manter a concentração dos substratos iniciais por até 9 horas de processo. Assim, a cada 18 mmol/L de produtos formados (ácido lactobiônico e sorbitol) adicionava-se quantidade equivalente em pó para 18 mmol/L de lactose e 17 mmol/L de frutose. A massa de substratos utilizada nesses ensaios que corresponderia a concentração para a condição em batelada é a equivalente a lactose 1000 mmol/L e de frutose 900 mmol/L. O tempo de reação para esses ensaios foi o necessário para que fosse consumida praticamente toda a frutose em solução.

Reator	Regime de operação	S ₀ (mmol/L)	X ₀ (g/L)
agitação mecânica	descontínuo - RD	lactose 700 frutose 600	20
agitação mecânica	descontínuo - RD	lactose 700 frutose 600	30
agitação pneumática	descontínuo - RD	lactose 700 frutose 600	20
agitação mecânica	descontínuo alimentado - RDA	lactose 1000 frutose 900	20
agitação mecânica	descontínuo alimentado - RDA	lactose 1000 frutose 900	30
agitação pneumática	descontínuo alimentado - RDA	lactose 1000 frutose 900	20

As condições utilizadas em ensaios em RD e RDA, nos dois tipos de reatores, estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3. Condições avaliadas nos ensaios de bioconversão com diferentes reatores e regimes de operação.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular no inóculo foi estimada indiretamente por densidade óptica. Para cada 1 mL da amostra do inóculo adicionou-se 0,2 mL de HCl 2 mol/L, procedimento realizado para a solubilização do carbonato de cálcio presente no meio. Na sequência, a amostra foi diluída e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (PG Instruments, EUA), a 560 nm. As medidas de absorbância foram realizadas em duplicata.

Nos cultivos em biorreator, a quantificação celular foi realizada por gravimetria. Amostras de 3 mL do meio de fermentação foram centrifugadas a 5836g por 10 minutos (Sigma, modelo 4-15), o sobrenadante foi descartado e a biomassa celular foi lavada duas vezes com água destilada. A massa de células centrifugada foi ressuspendida em água e, então, transferida para cadinhos, que foram mantidos em estufa a 100°C por 24 horas. Posteriormente, os cadinhos foram mantidos em dessecador, à temperatura ambiente, por 20 minutos, para resfriamento e a massa celular foi determinada em balança analítica. Estes ensaios foram realizados em triplicata. A concentração celular foi determinada pela divisão da massa seca de células pelo volume de meio utilizado para análise (3 mL).

4.6.2 Determinação da concentração de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-di-nitrosalicílico – DNS (Miller, 1959). Para esta análise, a 0,25 mL de amostra previamente diluída foi adicionado 0,75 mL de DNS. Um branco foi preparado substituindo-se o volume de amostra diluída por água destilada. As amostras foram mantidas em banho a 100°C por 5 minutos, sendo posteriormente colocadas em banho de gelo por 2 minutos. Ao final desta etapa, foram adicionados 4 mL de água destilada e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PG Instruments, EUA), a 545 nm, e convertidas para g/L empregando a curva padrão de glicose entre 0,1 e 1,0 g/L.

4.6.3 Estimativa das concentrações de substratos e produtos nos ensaios de bioconversão

Como os produtos são formados em base equimolar, a concentração dos ácidos aldônicos e sorbitol formados nos ensaios de bioconversão foram estimados indiretamente em função do volume e da concentração de NaOH utilizada para neutralizar o ácido formado e controlar o pH. A Equação 3 foi empregada para quantificar os produtos da reação.

$$P_{máx} = \frac{V_{NaOH} \times M_{NaOH}}{V_{total} + V_{NaOH}} \qquad (3)$$

Onde

P_{máx} - concentração máxima de produtos (ácido aldônico ou sorbitol) (mol/L);

V_{NaOH} - volume de base consumida para controle pH na reação (mL);

M_{NaOH} - concentração da base (mol/L);

V_{total} - volume total da reação (mL).

A concentração de substratos foi determinada indiretamente em função do consumo de NaOH para controle do pH da reação. Como ácido aldônico e sorbitol são os únicos produtos da reação, o consumo dos substratos ocorre na mesma proporção que a formação de produtos em base equimolar. A Equação 4 foi empregada para estimar a concentração dos substratos na reação de bioconversão.

$$S_{F} = \left(\frac{S_{0} \times V_{\text{total}}}{V_{\text{total}} + V_{\text{NaOH}}}\right) - \left(\frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}}}{V_{\text{total}} + V_{\text{NaOH}}}\right) \quad (4)$$

Onde

S_F - concentração de substratos residual na reação (mol/L);

 S_0 - concentração de substrato inicial (mol/L);

V_{NaOH} - volume de base consumida para controle pH na reação (mL);

M_{NaOH} - concentração da base (mol/L);

V_{total} - volume total da reação (mL).

Salienta-se que, embora Pedruzzi et al. (2007) tenha mostrado a equivalência do procedimento de quantificação de substratos e produtos por cromatografia líquida e em função do volume e concentração do NaOH, a confirmação dos resultados, em alguns ensaios, foi realizada por CLAE.

O equipamento utilizado foi Agilent Technology, modelo 9100, acoplado aos detectores de índice de refração (IR) e de ultravioleta visível (UV-vis). Foi utilizada coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, 9 μ m). As condições da análise cromatográfica foram: fase móvel H₂SO₄ 0,05 mmol/L (previamente filtrada em filtro de poliamida, 0,2 μ m); fluxo, 0,4 mL/min; temperatura, 60°C, volume de amostra injetado, 5 μ L.

4.6.4 Determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidorredutase e glicono-δ-lactonase

A determinação da atividade de GFOR/GL seguiu a metodologia descrita por Malvessi et al. (2006b), com solução equimolar de glicose e frutose 700 mmol/L e 4 g/L de células de *Z. mobilis* livres. Os testes foram realizados em reator de 200 mL, com temperatura controlada a 39°C, sob agitação magnética, por 30 minutos. O pH foi automaticamente controlado em 6,4 pela adição de solução de NaOH 1 mol/L. Uma unidade de GFOR/GL (U) foi definida como a quantidade de enzimas capaz de formar 1 mmol de ácido glicônico por hora, nas condições do teste, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas (U/g).

4.7 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

4.7.1 Fator de conversão de substrato inicial em produto

O fator de conversão de substrato inicial em produto nos ensaios de bioconversão foi

determinado conforme a Equação 5:

$$Y_{P/S_0} = \frac{M_P}{M_{S_0}}$$
 (5)

Onde:

 Y_{P/S_0} - fator de conversão de substrato inicial em produto (mmol produto/ mmol substrato

inicial)

MP - quantidade de produto formado na reação (mmol);

M_{S0} – quantidade de substrato inicial (mmol).

4.7.2 Produtividades volumétrica e específica

A produtividade volumétrica foi determinada por meio da Equação 6:

$$p = \frac{P_{máx}}{t} \quad (6)$$

Onde:

p - produtividade volumétrica (mmol/L/h);

P_{máx} - concentração máxima de produtos (ácido aldônico ou sorbitol) (mmol/L);

t - tempo de processo (h).

A produtividade específica foi determinada por meio da Equação 7:

$$q = \frac{\left(\frac{MP}{t}\right)}{M_x} \quad (7)$$

....

Onde:

q - produtividade específica (mmol /g de célula seca /h);

M_P - quantidade de produto formado na reação - ácido aldônico ou sorbitol - (mmol);

t - tempo de processo (h);

M_x - massa de células seca (g).

4.7.3 Velocidade específica de formação de produtos

A velocidade específica de formação de produtos (μ_P) nos ensaios de bioconversão foi determinada conforme Equação 8:

$$\mu_{\rm p} = \frac{1}{M_{\rm X}} \frac{\mathrm{d}M_{\rm p}}{\mathrm{d}t} \ (8)$$

Onde

$$\label{eq:massa} \begin{split} \mu_p \text{-} \text{velocidade específica de formação de produtos (mmol/g de célula seca/h);} \\ M_x \text{-} massa de células seca (g); \\ dM_p/dt - \text{velocidade de formação de produtos (mmol/h).} \end{split}$$

4.7.4 Análise estatística dos resultados

As avaliações estatísticas apresentadas foram realizadas por análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade inferior a 5% (p < 0.05), com o auxílio dos programas OriginPro 8.5 e IBM SPSS Statistics 20.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos no presente trabalho. Inicialmente, avaliou-se a técnica de imobilização celular de *Z. mobilis* quanto ao efeito das concentrações de alginato de sódio e da solução de cloreto de cálcio, bem como do tempo de contato entre as esferas de suporte e a solução de CaCl₂, na manutenção da integridade do suporte e na preservação da ação catalítica das enzimas. Posteriormente, foi avaliada a supressão da etapa de permeabilização celular com CTAB pelo tratamento único com glutaraldeído. Por fim, avaliaram-se diferentes sistemas, regimes de operação e reatores para a produção de ácido lactobiônico e sorbitol.

5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DE Zymomonas mobilis EM ALGINATO DE CÁLCIO

Neste item, são discutidos os resultados obtidos nos ensaios de bioconversão conduzidos com o biocatalisador imobilizado em alginato de cálcio, com diferentes condições de preparo do suporte de imobilização.

5.1.1 Efeito da variação das concentrações de alginato de sódio e da solução de cloreto de cálcio

Potumarthi et al. (2008) relatam que, na imobilização de biocatalisadores, o correto dimensionamento das variáveis como, no caso, as concentrações de alginato de sódio e de cloreto de cálcio, podem influenciar na resistência do gel. Desta forma, a imobilização de *Z. mobilis* foi avaliada em diferentes concentrações de alginato de sódio (1,0, 1,75 e 2,5% m/v) e de cloreto de cálcio (0,1, 0,3 e 0,5 mol/L). Na Tabela 2, é mostrado o planejamento codificado/decodificado e as variáveis resposta. Salienta-se que a concentração de alginato de sódio informada nesta tabela é aquela atingida após a mistura com a suspensão celular, antes do gotejamento sobre CaCl₂.

O biocatalisador imobilizado nas diferentes condições foi utilizado em ensaios de bioconversão com lactose e frutose nas condições padrão (39°C, pH 6,4). O planejamento de experimentos foi avaliado com base nas máximas velocidades específicas de formação de produtos e nas produtividades específicas. Adicionalmente, a fim de avaliar a estabilidade das propriedades mecânicas dos géis, observou-se qualitativamente o aspecto das esferas do suporte ao final dos ensaios de bioconversão. Conforme descrito por Carra (2012), é comum que ocorra

perda na rigidez do gel e aumento das esferas durante o processo, resultado do acúmulo de líquido no interior do suporte. Dessa forma, ao final dos ensaios de bioconversão com o biocatalisador imobilizado, recupera-se cerca de 50-60% do volume total da reação. Com base nessas informações, procurou-se verificar se as alterações propostas para a técnica de imobilização teriam algum efeito positivo na integridade das esferas de alginato de cálcio ao final de 24 horas de reação.

CaCl ₂ na máxima velocidade específica de formação dos produtos e produtividade específica.					
Experimento	Alginato de sódio	Cloreto de cálcio	$\mu_{p,máx}$	q	
Experimento	A1 (% m/v)	A2 (mol/L)	(mmol/g/h)	(mmol/g/h)	
1	0 (1,75)	0 (0,3)	2,50	1,13	
2	+1 (2,5)	+1 (0,5)	2,80	1,22	
3	+1 (2,5)	-1 (0,1)	2,90	1,20	
4	0 (1,75)	0 (0,3)	2,80	1,15	
5	-1 (1,0)	+1 (0,5)	2,88	1,20	
6	0 (1,75)	0 (0,3)	2,90	1,11	
7	0 (1,75)	-1 (0,1)	2,40	1,20	
8	0 (1,75)	0 (0,3)	2,60	1,16	
9	-1 (1,0)	-1 (0,1)	2,60	1,22	
10	0 (1,75)	+1 (0,5)	2,60	1,20	
11	0 (1,75)	0 (0,3)	2,70	1,20	
12	+1 (2,5)	0 (0,3)	2,70	1,22	
13	-1 (1.0)	0(0.3)	2,88	1,20	

Tabela 2. Fatores codificados e decodificados resultantes do uso da ferramenta *central composite design* (CCD- 3²) para avaliar os efeitos da concentração de alginato de sódio e da concentração da solução CaCl₂ na máxima velocidade específica de formação dos produtos e produtividade específica.

 $\mu_{p,máx}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); q, produtividade específica.

O planejamento experimental foi avaliado estatisticamente com o fim de otimizar os resultados em ensaios de bioconversão para as diferentes concentrações de alginato de sódio e da solução de cloreto de cálcio usadas na preparação do sistema imobilizado. A análise de variância em termos lineares foi verificada para os fatores e para a interação entre eles. Os parâmetros como a máxima velocidade específica de formação dos produtos e produtividade específica não foram afetados significativamente pela variação na concentração do alginato de sódio e da solução de cloreto de cálcio (p > 0,05). Da mesma forma, não se verificou interação significativa entre os dois fatores (p > 0,05). Na avaliação qualitativa das esferas ao final dos ensaios de bioconversão, não foram observadas diferenças, independentemente das variações propostas na imobilização.

Os resultados alcançados contrariam os encontrados por Kawaguti et al. (2011), que observaram diferença significativa na conversão de sacarose em isomaltulose por *Erwinia* sp. imobilizada em alginato de cálcio com diferentes concentrações de alginato de sódio e de

cloreto de cálcio. Ainda, embora Blandino et al. (1999) tenham relatado influência das concentrações do polímero e de CaCl₂ na cinética de formação do gel e, por consequência, nas suas propriedades mecânicas, não foi perceptível qualquer diferença na estrutura do suporte nas condições estudadas no presente trabalho. Assim, a discordância entre os resultados obtidos nestes experimentos e aqueles descritos na literatura se devem, possivelmente, às diferenças em termos de reações e processos, ressaltando-se que, na literatura, não há informações disponíveis para o caso específico de reações de bioconversão com *Z. mobilis* imobilizada em alginato de cálcio.

No decorrer dos ensaios de bioconversão, observou-se a solubilização das esferas do suporte formadas com 1,0% (m/v) de alginato de sódio e 0,1 mol/L de cloreto de cálcio (experimento 9), o que impossibilitaria a sua reutilização. Para as demais condições avaliadas, o aspecto das esferas ao final da bioconversão foi similar e, em todos os casos, seria necessário tratarem-se as esferas com solução de CaCl₂ para permitir a sua reutilização. Conforme descrito por Carra (2012), o tratamento com CaCl₂ tem o inconveniente de promover o enrijecimento do suporte, afetando a transferência de massa e resultando na queda na produtividade em ácido lactobiônico.

Na sequência, foram conduzidas novas imobilizações mantendo-se constante a concentração de CaCl₂ em 0,3 mol/L e variando-se a concentração de alginato de sódio (1,75; 2,5 e 3,25% m/v). Ressalte-se que a concentração de alginato de sódio informada é aquela atingida após a mistura com a suspensão celular, antes do gotejamento sobre CaCl₂. As esferas obtidas nessas condições foram utilizadas em ensaio de bioconversão por 24 horas e, após, reutilizadas em novo ensaio de bioconversão por mais 24 horas. Entre os ensaios, o biocatalisador imobilizado foi tratado com CaCl₂ conforme descrito previamente. O objetivo destes ensaios foi avaliar o efeito da concentração de alginato de sódio sobre $\mu_{p,máx}$. Constatouse, de fato, uma significativa redução de $\mu_{p,máx}$ entre a primeira bioconversão e a repetição, conforme é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Percentual de redução na máxima	velocidade específica de formação dos produtos entre a
primeira bioconversão e a repetição, utilizando	o biocatalisador imobilizado em diferentes concentrações
de alginato de sódio (Substrato inicial: lactose	e 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L; pH 6,4; temperatura
39°C; 20 g/L biocatalisador imobilizado).	

Concentração alginato (% m/v)	Redução µ _{p,máx} (%)
1,75	$39,70 \pm 8,0^{a}$
2,50	$37,\!60\pm 6,\!7^{\mathrm{a}}$
3,25	$36,00 \pm 4,6^{a}$

 $\mu_{p,máx}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol). Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% (p>0,05) para ensaios em triplicata.

Os resultados foram avaliados estatisticamente, demonstrando-se não haver alterações significativas (p > 0,05) no decréscimo de $\mu_{p,máx}$, para as diferentes concentrações de alginato avaliadas. De acordo com a literatura, seria esperado que diferentes concentrações do polímero afetassem os parâmetros cinéticos da reação, uma vez que o aumento na concentração do polímero diminui a porosidade do suporte (BLANDINO et al., 1999), o que diminuiria a difusão entre enzima/substrato (TANAKA et al., 1984). Acredita-se que os resultados obtidos neste trabalho, não condizentes com os relatados na literatura, possam estar relacionados com o processo em questão, já que o pH da reação é controlado pela adição de NaOH, que pode afetar negativamente a estrutura do alginato de cálcio.

Desta forma, não sendo observada variação significativa em qualquer das condições avaliadas, no sentido de melhorar as propriedades físicas do gel, a metodologia convencional para a técnica de imobilização de *Z. mobilis* descrita previamente por Chun e Rogers (1988) e, posteriormente, por Malvessi et al. (2010), foi mantida para a sequência dos estudos.

5.1.2 Efeito do tempo de gelificação do alginato com cloreto de cálcio e reutilização do biocatalisador imobilizado

Gacesa (1988) afirma que embora a superfície das gotículas de alginato de cálcio se forme instantaneamente ao entrar em contato com a solução de cloreto de cálcio, é necessário um tempo mais longo para que os cátions divalentes se difundam no interior do gel. Desta forma, o autor sugere que o aumento do tempo de contato entre as esferas formadas e a solução do cloreto de cálcio pode promover melhor estabilidade mecânica do gel. O biocatalisador imobilizado em alginato de cálcio com diferentes tempos de gelificação (10, 60 e 240 minutos) foi utilizado em ensaios de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol. Na Tabela 4, apresentam-se os resultados gerais obtidos em cada condição avaliada.

A formação de produtos nas diferentes condições avaliadas foi similar, com concentração de cerca de 500 mmol/L e aproximadamente 80% de conversão. Em termos de $\mu_{p,máx}$, valores próximos entre si foram obtidos para a primeira bioconversão após a imobilização. Como uma das vantagens da imobilização celular é a reutilização do biocatalisador em sucessivas bateladas, para estes casos, avaliou-se qualitativamente a resistência do gel após a primeira reação, não tendo sido observadas diferenças, independentemente da condição avaliada. Assim, foi necessário, em todos os casos, tratar as esferas com CaCl₂ 0,3 mol/L antes de iniciar novas bateladas de bioconversão, como já descrito previamente.

Tabela 4. Resultados gerais para ensaios repetidos de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio com diferentes tempos de gelificação em solução de cloreto de cálcio (Substrato inicial: lactose 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L; pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador imobilizado).

Tempo de gelificação (min)	10)	60)	24	40
Batelada	1 ^a	2ª	1 ^a	2^{a}	1 ^a	2ª
P _{máx} (mmol/L)	514	499	515	495	518	496
t (h)	24	24	24	24	24	24
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	0,79	0,77	0,80	0,76	0,80	0,76
p (mmol/L/h)	21,4	20,8	21,0	20,6	21,5	20,7
q (mmol/g/h)	1,15	1,12	1,14	1,11	1,16	1,11
$\mu_{p,máx} \ (mmol/g/h)$	2,80	1,75	2,70	1,80	2,90	1,70
$S_f(mmol/L)$	133	149	131	151	128	152

 $P_{m\acute{a}x}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); t, tempo de processo; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato inicial em produto; p, produtividade volumétrica; q, produtividade específica; $\mu_{p,m\acute{a}x}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); S_f , concentração de lactose residual. 1^a, primeiro ensaio de bioconversão com biocatalisador imobilizado; 2^a, ensaio de bioconversão com o biocatalisador reutilizado.

Elevados tempo de gelificação poderiam resultar na diminuição de alguns parâmetros da reação, como produtividade específica e da máxima velocidade específica de formação dos produtos, conforme descrito previamente por Blandino et al. (1999) e Tanaka et al. (1984), devido aos problemas difusionais. No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho foram próximos para as três condições avaliadas. Esses resultados podem estar atrelados às condições específicas da reação, como o controle do pH em 6,4, com o uso de NaOH, e da temperatura em 39°C, durante as 24 horas de reação, associado ao fluxo de substratos e produtos através do suporte, que poderiam estar afetando negativamente a estabilidade do gel.

De uma forma geral, resultados similares foram alcançados em ensaios de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, com o biocatalisador sendo imobilizado em qualquer das condições avaliadas nesse estudo. Adicionalmente, foram realizados ensaios de bioconversão por sete ciclos consecutivos e os resultados gerais estão apresentados na Tabela 5.

Nesses ensaios, as cinco primeiras bateladas de bioconversão tiveram a duração de 24 horas, enquanto na sexta e na sétima bateladas o tempo da reação foi o necessário para a conversão de no mínimo 75% do substrato disponível. Ao final de cada batelada, as esferas de alginato foram removidas do meio, tratadas com solução de cloreto de cálcio 0,3 mol/L por 10 minutos, assim, como descrito anteriormente.

Bateladas de bioconversão 1° 2° 7° 4° 6° 3° 5° 497 ± 8^{a} P_{máx} (mmol/L) 516 ± 3^{a} 498±3^a 493±10^a 488 ± 20^{a} 485±13^a 493 ± 2^{a} t (h) 24 24 24 24 24 28 28 Y_{P/S0} 0,79±0,00^a 0,76±0,00^a 0,76±0,01^a 0,76±0,00^a 0,75±0,02^a 0,75±0,00^a 0,76±0,00^a (mmol/mmol) p (mmol/L/h) 21,4±0,1ª $20,7\pm0,0^{a}$ $20,4\pm0,4^{a}$ $20,5\pm0,2^{a}$ $20,1\pm0,8^{a}$ $17,3\pm0,4^{b}$ $17,4\pm0,0^{b}$ q (mmol/g/h) 1,10±0,02ª 1.16±0,01^a $1,10\pm0,02^{a}$ 1,09±0,03ª $0,94\pm0,01^{b}$ 0,95±0,00^b 1.12±0,00^a $\mu_{p,máx}$ 2,85±0,09ª 1,74±0,01^b 1,70±0,07^b 1,69±0,06^b 1,61±0,18bc 1,30±0,00° 1,30±0,01° (mmol/g/h) $S_f(mmol/L)$ 130±3ª 150±3ª 156±10^a 151±8^a 161±21ª 155±2ª 153±13ª

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); t, tempo de processo; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato inicial em produto; p, produtividade volumétrica; q, produtividade específica; $\mu_{p,máx}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); S_f, concentração de lactose residual. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% (p>0,05) entre as colunas para ensaios em duplicata.

A utilização do biocatalisador imobilizado em sucessivas bateladas de bioconversão se mostrou como um processo viável tecnicamente, uma vez que concentrações de aproximadamente 500 mmol/L de produtos foram alcançadas mesmo após 176 horas de reação. Embora, como já observado, o tratamento com CaCl₂ provoque o enrijecimento do suporte de imobilização e, assim, dificulte a transferência de massa, os resultados apresentados neste trabalho foram semelhantes durante todo o processo. Os parâmetros de avaliação de produtividade foram reduzidos significativamente somente nas duas últimas bateladas. As máximas velocidades específicas de formação de produtos entre a segunda e a sétima bateladas foram significativamente menores que na primeira. Acredita-se que esta redução no $\mu_{p,máx}$ esteja relacionada com a liberação do biocatalisador do suporte, decorrente das alterações na conformação da esfera do suporte de imobilização nas condições de processo, conforme descrito por Garin (2016). Entre a segunda e a quinta bateladas, constatou-se um comportamento estável do sistema enzimático, que fica evidenciado pela observação dos parâmetros de avaliação dependentes do tempo (μ_p , p e q), e, em seguida, valores decrescentes para estes mesmos parâmetros. Tal comportamento nas últimas bateladas teve, provavelmente, relação com a instabilidade de GFOR após longos períodos de reação, primeiramente descrita por Gollhofer et al. (1995) e corroborada por Bertasso et al. (1996) e Malvessi et al. (2013).

Apesar de as modificações avaliadas na técnica de imobilização em alginato de cálcio, discutidas no item 5.1, não terem resultado em incremento no processo, a possibilidade de reutilização do biocatalisador por longos períodos de reação, associada ao elevado valor

Tabela 5. Resultados gerais referentes aos sucessivos ensaios de bioconversão com o biocatalisador imobilizado em alginato de cálcio 2% (m/v) (Substrato inicial: lactose 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L; pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador imobilizado).

comercial do ácido lactobiônico justifica os custos de obtenção e preparo do sistema imobilizado, visando à sua eventual aplicação em escala industrial.

5.2 AVALIAÇÃO DA INVIABILIZAÇÃO DO METABOLISMO FERMENTATIVO DE Zymomonas mobilis

A permeabilização de células de *Z. mobilis* com brometo de cetil trimetil amônio – CTAB (REHR et al., 1991) tem sido empregada como forma de inibir o consumo de substrato pela via fermentativa da bactéria. No processo convencional em uso no LBIO, posteriormente à permeabilização celular, tem-se a etapa de reticulação com glutaraldeído (JUNG et al., 1990). Uma vez que glutaraldeído tem ação biocida contra bactérias Gram-negativas (GORMAN; SCOTT, 1980), é possível que ambos os tratamentos, permeabilização e reticulação, possam atuar na inviabilização da via fermentativa da bactéria.

Assim, para avaliar a possibilidade de supressão da etapa de permeabilização celular com brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), com a inviabilização celular ocorrendo, apenas, pelo tratamento com glutaraldeído, conduziram-se ensaios de crescimento bacteriano posteriores aos diferentes tratamentos (CTAB e glutaraldeído) e com células isentas de tratamento. Como forma de verificar a inviabilização do metabolismo fermentativo, foi determinado o percentual do consumo de substratos após 20 horas de incubação, cujos resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Consumo de substrato por células de Zymomonas mobilis não tratadas ou tratadas com brometo
de cetil trimetil amônio e glutaraldeído, após 20 h de incubação em condições de cultivo (Substrato inicial:
glicose 100 g/L; concentração celular inicial 0,5 g/L; pH 5,5-6,5; temperatura 30°C; frequência de
agitação 200 rpm).

Condição	Substrato consumido (%)
Branco	99 ± 0^{a}
CTAB	9 ± 3^{b}
Glu 10	7 ± 3^{b}
Glu 20	15 ± 4^{b}

Branco, células não tratadas; CTAB, células tratadas com brometo de cetil trimetil amônio por 15 minutos; Glu 10, Glu 20, células tratadas com glutaraldeído por 10 e 20 minutos, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% (p<0,05) para ensaios em triplicata.

Observa-se para as células não tratadas (Branco) o consumo praticamente completo de substrato em 20 horas de cultivo. Entretanto, para as células tratadas com CTAB, no mesmo período de cultivo, observou-se limitação no metabolismo, uma vez que o consumo de substrato foi significativamente reduzido, reafirmando, assim, a eficiência deste método de

permeabilização celular na inviabilização da bactéria, conforme descrito por Rehr et al. (1991). Resultados similares foram obtidos para o tratamento com glutaraldeído, indicando, da mesma forma, a possibilidade deste tratamento na inibição do metabolismo fermentativo da bactéria. Comparando-se os resultados para consumo de substrato por microrganismos sem tratamento com aqueles observados após os três tratamentos de inviabilização, é possível afirmar que há diferença significativa no consumo de substrato, como pode ser observado na Tabela 6. Por outro lado, não foram identificadas diferenças significativas quanto ao consumo de substrato entre os diferentes tratamentos. Desta forma, conclui-se que o tratamento das células com glutaraldeído, por 10 ou 20 minutos, promoveu a inibição do crescimento bacteriano de forma estatisticamente similar ao com CTAB.

Confirmando estes resultados, observou-se, também, o aumento da concentração celular para a condição sem tratamento de 0,5 para 3,3 g/L. Salienta-se que as limitações no consumo de substrato e no crescimento se deveram ao tratamento a que células foram submetidas, uma vez que as condições de cultivo foram totalmente propícias ao pleno desenvolvimento celular.

Embora a atividade catalítica das enzimas GFOR/GL independa da viabilidade celular (CHUN; ROGERS, 1988), é necessário comparar os resultados em termos da atividade enzimática determinada posteriormente aos diferentes tratamentos de inviabilização. Na Tabela 7, estão apresentados os resultados da influência dos tratamentos de inviabilização celular sobre a atividade de GFOR/GL.

Tabela 7. Atividade das enzimas glicose-frutose oxidorredutase e glicono-δ-lactonase presente em células de *Zymomonas mobilis* não tratadas e tratadas com brometo de cetil trimetil amônio ou glutaraldeído.

Condição	Atividade enzimática (U/g)
Branco	34±1 ^a
CTAB	31 ± 2^{a}
Glu 10	35 ± 0^{a}
Glu 20	$35\pm0^{\mathrm{a}}$

Branco, células não tratadas; CTAB, células tratadas com brometo de cetil trimetil amônio por 15 minutos; Glu 10, Glu 20, células tratadas com glutaraldeído por 10 e 20 minutos, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% (p<0,05) para ensaios em duplicata.

Observaram-se resultados similares para atividades enzimáticas em todas as condições avaliadas, não tendo sido observadas diferenças significativas nos resultados atingidos com as células isentas de tratamento e aquelas submetidas aos tratamentos CTAB, Glu 10 e Glu 20. Desta forma, constata-se que quando o metabolismo fermentativo da bactéria foi inviabilizado

pelo tratamento com glutaraldeído, a atividade das enzimas GFOR/GL foi mantida, indicando a possibilidade de utilizar-se este simples tratamento em substituição à permeabilização da parede celular com tolueno ou CTAB, como descrito respectivamente por Chun e Rogers (1988) e Rehr et al. (1991).

5.3 AVALIAÇÃO DA BIOCONVERSÃO COM A BIOMASSA TRATADA COM GLUTARALDEÍDO E ISENTA DE TRATAMENTO

O tratamento de inviabilização celular com glutaraldeído reduziu significativamente o consumo de substrato e não provocou alterações significativas na atividade enzimática. No entanto, na técnica de determinação de atividade a velocidade reacional, são avaliados somente os 30 minutos iniciais da reação em que a elevada concentração inicial dos substratos pode inibir a via fermentativa, impedindo o consumo dos substratos. Nesse contexto, ensaios de bioconversão foram conduzidos para avaliar o efeito do tratamento com glutaraldeído em condições de produção, ou seja, por períodos mais longos de reação.

5.3.1 Bioconversão com células livres

Inicialmente, conduziram-se ensaios de bioconversão com células livres de *Z. mobilis* tratadas com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 10 minutos em comparação com células isentas de tratamento. Para avaliar a influência do tratamento de inviabilização celular sobre o fator de conversão de substratos em produtos nos ensaios de bioconversão, utilizaram-se soluções equimolares de glicose e frutose nas concentrações de 400 mmol/L e 700 mmol/L. O uso de glicose nestes ensaios se deveu ao fato de este carboidrato ser o preferencial para o metabolismo fermentativo de *Z. mobilis*. Já os testes com concentrações reduzidas de glicose e frutose tiveram por objetivo evitar a inibição do metabolismo fermentativo da bactéria pelos substratos, conforme descrito por Silveira et al. (1999), e comprovar se o acúmulo de produtos de bioconversão seria decorrente do tratamento com glutaraldeído.

Os resultados da concentração e do fator de conversão de substratos em produtos nos ensaios de bioconversão para 400 mmol/L estão mostrados na Tabela 8. A quantificação dos substratos e dos produtos na reação de bioconversão, a partir do volume e da concentração de NaOH utilizada no controle do pH foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Embora Pedruzzi et al. (2007), ao utilizarem células de *Z. mobilis* imobilizadas, tenham confirmado a equivalência entre os dois métodos de quantificação, nestes ensaios procurou-se avaliar se os substratos disponíveis foram efetivamente convertidos em produtos e

se o ácido glicônico foi acumulado no meio ou direcionado para a via fermentativa.

Tabela 8. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* não tratadas e tratadas com glutaraldeído, em reações com 400 mmol/L de glicose e frutose (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador livre).

	Glicose e Frutose 400 mmol/L	
	Branco	Glu
P _{máx} (mmol/L)	293 ± 1	371 ± 1
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,\!76\pm0,\!00$	$0{,}98 \pm 0{,}00$
AG _. (mmol/L)	-	356 ± 3
YG _{P/S0} (mmol/mmol)	-	$0,94 \pm 0,00$
SB (mmol/L)	258 ± 2	355 ± 5
YS _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,60 \pm 0,01$	$0,\!94 \pm 0,\!00$

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido glicônico ou sorbitol); $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produtos; AG; SB, concentração máxima em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE; $YG_{P/S0}$; $YS_{P/S0}$, fator de conversão em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE. Branco, células isentas de tratamento; Glu, células tratadas com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 10 minutos.

Em concentrações iniciais de substratos de 400 mmol/L, com células não tratadas, o ácido glicônico formado foi totalmente metabolizado em aproximadamente 4,5 horas de reação. Esses resultados corroboram os de Silveira et al. (1999), que, em ensaios de bioconversão com concentração equimolar inicial de substrato de 280 mmol/L e biomassa não tratada, evidenciaram o total consumo do ácido glicônico formado em 1 hora de reação. Assim, a concentração final de ácido glicônico foi nula, indicando que todo o gliconato produzido foi convertido para 6-P-gliconato e direcionado para a via Entner-Doudoroff (Figura 19A). No decorrer da bioconversão, observou-se, também, a formação de gás, provavelmente CO₂, e espuma, característicos de fermentação.

Para a mesma concentração de substratos (400 mmol/L), porém utilizando-se células tratadas com glutaraldeído, a inviabilização do metabolismo fermentativo das células foi confirmada, promovendo acúmulo dos produtos de interesse no meio reacional. Nesse caso, as concentrações dos produtos de interesse foram similares àquelas estimadas pela adição de NaOH 7 mol/L durante o ensaio de bioconversão. Na Figura 19, são mostrados os perfis cinéticos dos ensaios de bioconversão com células tratadas e não tratadas com concentração inicial de substrato de 400 mmol/L.


(•) Glicose (\blacktriangle) Frutose (\circ) Ácido glicônico (Δ) Sorbitol

Figura 19. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* não tratadas (A) e tratadas com glutaraldeído (B) em meio com glicose e frutose 400 mmol/L (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador livre).

Para a condição com maior concentração inicial de substratos, 700 mmol/L (glicose e

frutose), os resultados dos ensaios de bioconversão estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* não tratadas e tratadas com glutaraldeído, em reações com 700 mmol/L de glicose e frutose (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador livre).

	Glicose e Frutose 700 mmol/L		
	Branco Glu		
P _{máx} (mmol/L)	526 ± 1	611 ± 1	
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,81 \pm 0,00$	$0,96 \pm 0,00$	
AG _. (mmol/L)	186 ± 0	620 ± 9	
YG _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,29 \pm 0,05$	$0,97 \pm 0,02$	
SB (mmol/L)	$281 \ \pm 4$	600 ± 1	
YS _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,44 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,01$	

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido glicônico ou sorbitol); $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produtos; AG; SB, concentração máxima em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE; $YG_{P/S0}$; $YS_{P/S0}$, fator de conversão em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE. Branco, células isentas de tratamento; Glu, células tratadas com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 10 minutos.

Observa-se que para a condição com concentração inicial de substratos de 700 mmol/L, o fator de conversão de glicose em ácido glicônico, com células isentas de tratamento, foi de apenas 0,29 mmol/mmol, enquanto que pelo consumo de NaOH o valor estimado seria 0,81 mmol/mmol. Neste caso, o pequeno acúmulo de ácido glicônico está de acordo com os resultados de Silveira et al. (1999), que relataram a inibição parcial no metabolismo fermentativo de *Z. mobilis* para concentração de substratos de 800 mmol/L, evitando o total consumo deste produto. Na condição com células tratadas, entretanto, percebe-se o acúmulo dos produtos de interesse com o decorrer do tempo, alcançando rendimentos próximos ao teórico estimado pelo consumo de NaOH.

Observa-se ainda, que, neste grupo de ensaios, utilizando-se células não tratadas (400 e 700 mmol/L), tem-se o rendimento final em sorbitol reduzido, em comparação ao valor estimado pelo consumo de NaOH. Esses resultados se devem ao fato de que parte dos substratos disponíveis foi consumido através do metabolismo fermentativo da bactéria. Ainda, percebe-se que a concentração de sorbitol ao longo do tempo manteve-se constante conforme demonstrado por Silveira et al. (1999). Na Figura 20, são mostrados os perfis cinéticos dos ensaios de bioconversão com células tratadas e não tratadas com concentração inicial de substrato de 700 mmol/L.



(●) Glicose (▲) Frutose (○) Ácido glicônico (Δ) Sorbitol

Figura 20. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* não tratadas (A) e tratadas com glutaraldeído (B) em meio com glicose e frutose 700 mmol/L (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador livre).

Ensaios similares foram realizados com substratos lactose e frutose, pois, embora a lactose não seja uma fonte de carbono assimilável pela bactéria (SWINGS; DE LEY, 1977), a frutose pode ser convertida a frutose-6-P e posteriormente, a glicose-6-P pela enzima glicose-6-fosfato isomerase, e ser consumida pela via fermentativa, desta forma reduzindo a concentração dos produtos de interesse no meio reacional.

Na Tabela 10, são mostrados os resultados para o fator de conversão de substratos em produtos e a máxima concentração de produtos encontrados nos ensaios de bioconversão com lactose e frutose nas concentrações de 400 mmol/L com células livres de *Z. mobilis* isentas de tratamento e tratadas com glutaraldeído.

Tabela 10. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* não tratadas e tratadas com glutaraldeído, em reações com 400 mmol/L de lactose e frutose (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador livre).

	Lactose + Frutose 400 mol/L		
	Branco Glu		
P _{máx} (mmol/L)	254 ± 3	311 ± 2	
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,65 \pm 0,00$	$0,81 \pm 0,00$	
AL _. (mmol/L)	127 ± 4	$315\ \pm 7$	
YL _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,33 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,02$	
SB (mmol/L)	128 ± 3	$303\ \pm 7$	
YS _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,33 \pm 0,02$	$0,80 \pm 0,02$	

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produtos; AL; SB, concentração máxima em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE; $YL_{P/S0}$; $YS_{P/S0}$, fator de conversão em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE. Branco, células isentas de tratamento; Glu, células tratadas com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 10 minutos.

O fator de conversão de substratos em produtos para reações com células isentas de tratamento foi de apenas 0,33 mmol/mmol, indicando, assim, que parte da frutose disponível foi consumida pelo metabolismo fermentativo da bactéria. Nesse caso, o fator de conversão de substratos em produtos estimado pelo consumo de NaOH também foi baixo (0,65 mmol/mmol). Acredita-se que esse resultado possa estar atrelado, também, ao metabolismo fermentativo, uma vez que nas reações com a biomassa tratada o valor estimado foi de 0,81 mmol/mmol. Assim como na condição utilizando-se glicose e frutose, o tratamento com glutaraldeído permitiu o acúmulo de elevada concentração final em ácido lactobiônico (315 mmol/L) e sorbitol (303 mmol/L). Os perfis cinéticos dessas reações estão mostrados na Figura 21.



(●) Lactose (▲) Frutose (○) Ácido lactobiônico (Δ) Sorbitol

Figura 21. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* não tratadas (A) e tratadas com glutaraldeído (B) em meio com lactose e frutose 400 mmol/L (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador livre).

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados dos ensaios de bioconversão para a condição 700 mmol/L de lactose e frutose.

Tabela 11. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* não tratadas e tratadas com glutaraldeído, em reações com 700 mmol/L de lactose e frutose (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador livre).

	Lactose e Frutose 700 mol/L		
	Branco Glu		
P _{máx} (mmol/L)	336 ± 1	506 ± 4	
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,50 \pm 0,00$	$0,78 \pm 0,00$	
AL _. (mmol/L)	142 ± 2	$496\ \pm 10$	
YL _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,21 \pm 0,00$	$0,77 \pm 0,03$	
SB (mmol/L)	165 ± 9	471 ± 6	
YS _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,25 \pm 0,00$	$0,74 \pm 0,01$	

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produtos; AL; SB, concentração máxima em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE; $YL_{P/S0}$; $YS_{P/S0}$, fator de conversão em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE. Branco, células isentas de tratamento; Glu, células tratadas com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 10 minutos.

Da mesma forma que nos ensaios anteriores, o baixo valor para conversão de substratos em produtos, 0,21 e 0,25 mmol/mmol em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, para a condição com células não tratadas, indica o consumo de frutose para via fermentativa do microrganismo. Por outro lado, o tratamento com glutaraldeído proporcionou a obtenção de resultados superiores a 0,75 mmol/mmol, valores que corroboram os obtidos por Malvessi et al. (2013) e Carra (2012) utilizando células de *Z. mobilis* livres e permeabilizadas. Os perfis cinéticos de consumo dos substratos e formação dos produtos estão apresentados na Figura 22.

Comparando-se os perfis cinéticos, na ausência de tratamento, é possível observar que embora os substratos tenham sido adicionados de forma equimolar, o consumo se deu de forma distinta. A concentração de produto formado, no entanto, foi igual, corroborando, assim, a hipótese de fermentação da frutose para atividades metabólicas da célula. Por outro lado, nos ensaios com a biomassa tratada com glutaraldeído, comportamentos semelhantes entre consumo e formação de produtos foram observados.



(●) Lactose (▲) Frutose (○) Ácido lactobiônico (Δ) Sorbitol

Figura 22. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células livres de *Zymomonas mobilis* não tratadas (A) e tratadas com glutaraldeído (B) em meio com lactose e frutose 700 mmol/L (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador livre).

Embora o crescimento da bactéria *Z. mobilis* aconteça na faixa de pH 5 a 7 e de temperatura entre 25 e 31°C, e raro crescimento seja observado em temperaturas próximas a 40°C (SWINGS; DE LEY, 1977), observou-se, para todas as condições estudadas com células livres e não inviabilizadas, o consumo do produto formado – caso do ácido glicônico – e/ou do substrato disponível para a via fermentativa – glicose e frutose. Desta forma, enfatiza-se a necessidade de tratamento para inviabilização celular, independentemente dos substratos utilizados, para que os produtos de interesse sejam acumulados ao utilizarem-se células livres no processo.

5.3.2 Bioconversão com células imobilizadas

De uma forma geral, a substituição da permeabilização pelo único tratamento com glutaraldeído se mostrou tecnicamente possível, mantendo-se o rendimento e a produtividade do processo, além de favorecer a sua economia, já que permite suprimir uma etapa onerosa no fluxograma de produção. No entanto, ainda mais interessante seria a utilização da biomassa, que não tivesse recebido qualquer tratamento prévio à imobilização em alginato de cálcio, desde que uma simples reticulação do suporte contendo células íntegras com glutaraldeído fosse suficiente para inibir o metabolismo fermentativo da bactéria. Neste caso, duas etapas do processo previamente desenvolvido poderiam ser omitidas, o que reduziria ainda mais o custo de produção. Assim, neste grupo de ensaios, procurou-se avaliar se o tratamento posterior das esferas do suporte com glutaraldeído seria suficiente para inibir o metabolismo fermentativo de *Z. mobilis* e permitiria o acúmulo dos produtos de interesse em concentrações apreciáveis.

Conduziram-se ensaios de bioconversão com células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, comparando-se o sistema imobilizado contendo células previamente tratadas com glutaraldeído 0,5 % (v/v) por 10 minutos e sem qualquer tratamento prévio.

Assim como nos testes realizados com células livres, nesses ensaios, utilizaram-se soluções equimolares de glicose e frutose, bem como lactose e frutose, nas concentrações de 400 mmol/L e 700 mmol/L. As reações foram conduzidas por 24 horas em condições operacionais padrão (39°C, pH 6,4). Os resultados dos ensaios estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados em termos de formação de produtos nos ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis*, sem tratamento prévio e previamente tratadas com glutaraldeído, imobilizadas em alginato de cálcio sob diferentes concentrações inicias de substratos (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador imobilizado).

	Glicose e Frutose		Glicose e Frutose	
	400 mmol/L		700 mmol/L	
	Branco Imb	Glu Imb	Branco Imb	Glu Imb
P _{máx} (mmol/L)	361 ± 2	360 ± 1	598 ± 2	598 ± 2
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,\!95\pm0,\!00$	$0,\!94\pm0,\!00$	$0,93 \pm 0,00$	$0,93 \pm 0,00$
AG _. (mmol/L)	355 ± 5	355 ± 4	590 ± 4	590 ± 1
YG _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,\!94 \pm 0,\!01$	$0,\!94 \pm 0,\!01$	$0,\!92 \pm 0,\!01$	$0,\!92\pm0,\!00$
SB (mmol/L)	360 ± 4	360 ± 0	589 ± 3	589 ± 3
YS _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,\!95\pm0,\!01$	$0,\!95\pm0,\!00$	$0,\!92 \pm 0,\!01$	$0,92 \pm 0,01$
	Lactose e Frutose		Lactose e Frutose	
	400 mmol/L		700 m	mol/L
	Branco Imb	Glu Imb	Branco Imb	Glu Imb
P _{máx} (mmol/L)	304 ± 1	317 ± 1	497 ± 2	471 ± 2
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,79 \pm 0,00$	$0,\!83\pm0,\!00$	$0,\!76\pm0,\!01$	$0,72 \pm 0,01$
AL. (mmol/L)	315 ± 6	319 ± 7	542 ± 4	559 ± 2
YL _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,\!82\pm0,\!02$	$0,\!83\pm0,\!02$	$0,\!83\pm0,\!01$	$0,\!85\pm0,\!01$
SB (mmol/L)	316 ± 7	317 ± 8	540 ± 4	563 ± 4
YS _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,82 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,02$

Pmax, concentração máxima de produtos (ácido glicônico, lactobiônico ou sorbitol); YP/S0, fator de conversão de substrato em produtos; AG; AL; SB, concentração máxima em ácido glicônico, ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE; YGP/S0 ; YLP/S0 ; YSP/S0, fator de conversão em ácido glicônico, ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, obtida por CLAE. Branco Imb, suspensão celular isenta de tratamento para inviabilizar o metabolismo fermentativo e imobilizada em alginato de cálcio, com posterior reticulação das esferas do suporte com glutaraldeído 0,5% (v/v); Glu Imb, suspensão celular tratada com glutaraldeído 0,5% (v/v) e imobilizada em alginato de cálcio com posterior reticulação das esferas do suporte com glutaraldeído 0,5% (v/v).

Os resultados medidos por CLAE para a concentração inicial de 400 mmol/L de glicose e frutose foram estatisticamente iguais ao estimado pelo consumo de NaOH independentemente do tratamento testado. Nesses casos, rendimentos na ordem de 95% foram obtidos corroborando os resultados de Chun e Rogers (1988) para bioconversão com células permeabilizadas de *Z. mobilis* imobilizada em alginato de cálcio. Igualmente, os ensaios com maior concentração inicial de substratos, 700 mmol/L de glicose e frutose, alcançaram resultados semelhantes aos estimados por NaOH. Os resultados obtidos nesse caso, com 400 mmol/L e 700 mmol/L de substratos, comprovam que o único tratamento das esferas do suporte com glutaraldeído foi suficiente para inviabilizar a via fermentativa da bactéria.

No caso da utilização de lactose e frutose como fonte de substratos, novamente, os resultados do fator de conversão de substratos em produtos e da concentração máxima de produtos foram próximos aos estimado pelo consumo de NaOH. Assim, confirma-se para lactose e frutose a inviabilização do metabolismo fermentativo das células com o único tratamento das esferas do suporte.

Na Figura 23 estão apresentados os perfis cinéticos de consumo de substrato e



formação de produtos para as condições avaliadas.

Figura 23. Concentrações de produtos e substratos em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio em meio contendo glicose/frutose (A e B) e lactose/frutose (C e D).

Isentas de tratamento prévio a inviabilização celular (azul) e tratadas com glutaraldeído (preto) (pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador imobilizado). (\blacksquare) Glicose/Lactose (\bullet) Frutose (\Box) Ácido glicônico/lactobiônico (\circ) Sorbitol.

Observa-se que para as duas condições avaliadas, com e sem tratamento prévio com glutaraldeído, o consumo de substratos e a formação de produtos ocorreu de forma equimolar, comprovando, assim, que o substrato disponível está sendo totalmente convertido em produtos. Desta forma, a análise dos perfis cinéticos permite admitir-se a possibilidade de simplificação do processo convencional utilizado, por meio da substituição dos tratamentos prévios à imobilização e, com isso, a diminuição dos custos operacionais de um eventual processo em escala industrial.

Nos perfis cinéticos apresentados na Figura 23, é possível ainda observar que, para as reações com glicose e frutose, a velocidade reacional é maior na condição das células isentas de tratamento prévio (linha azul) quando comparadas com as tratadas previamente com glutaraldeído (linha preta). Esse resultado pode estar relacionado com o fato de o duplo

tratamento com glutaraldeído provocar inativação de algumas enzimas, como descrito por Gorman e Scott (1980) para a ação biocida com bactérias Gram-negativas. Por outro lado, este comportamento não é observado para reações com lactose e frutose, isso porque, nessa condição, a velocidade da reação é limitada pela baixa afinidade pelo substrato lactose, conforme descrito por Satory et al. (1997) e Malvessi et al. (2013).

5.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM CÉLULAS DE Zymomonas mobilis IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM

Neste item, foi avaliada a estabilidade GFOR/GL, contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, frente ao tempo e à forma de estocagem. Essas informações seriam importantes, especialmente na escala industrial, considerando-se eventuais interrupções e retomadas do processo por razões técnicas ou redução de demanda dos produtos. Inicialmente, compararam-se os diferentes tratamentos na biomassa, prévios a imobilização em estudo nesse trabalho (Glu Imb e Branco Imb) com a condição convencional (CTAB Imb) por até 120 dias de estocagem. O biocatalisador foi estocado em água destilada, pH 7,0, a 4°C, e os ensaios de bioconversão com lactose e frutose, realizados para avaliação, foram conduzidos após 15, 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem.

O rendimento em produtos, para todas as condições, imediatamente antes da armazenagem, foi de aproximadamente 80%, atingindo-se concentrações da ordem de 500 mmol/L em 24 horas de reação (Figura 24A). Por outro lado, a máxima velocidade específica de formação dos produtos (Figura 24B) para a condição Glu Imb (2,3 mmol/g/h) foi superior em 20% ao obtidos para as demais condições (Branco Imb e CTAB Imb). Sugere-se que o elevado valor de µ_{p,máx} para Glu Imb esteja associado às ligações formadas entre o glutaraldeído e as enzimas da bactéria, que, apesar de não serem claramente compreendidas, promovem um aumento na atividade enzimática (MIGNEAULT et al., 2004). A produtividade específica antes da armazenagem, para as três condições, foi semelhante (Figura 24C), com valores próximos a 1,1 mmol/g/h, resultados que corroboram os de Carra (2012) para condição convencional. Percebe-se que ao longo dos dias de armazenamento, nas condições Branco Imb e Glu Imb, os valores para a concentração final de produtos foram próximos aos do tempo inicial. Em termos de produtividade específica (Figura 24C) e máxima velocidade específica de formação dos produtos (Figura 24B), para o Branco Imb, observam-se resultados superiores aos encontrados no tempo inicial. Em reações com Glu Imb nota-se uma constância na produtividade ao longo



do tempo, no entanto, uma leve redução em $\mu_{p,máx}$ pode ser evidenciada.

Figura 24. Efeito dos diferentes tratamentos na concentração máxima de produtos [A], máxima velocidade específica de formação dos produtos [B] e na produtividade específica [C], em ensaios de bioconversão após diferentes dias de estocagem do biocatalisador imobilizado. (**n**) Glu Imb, suspensão celular tratada com glutaraldeído 0,5% (v/v); (**A**) Branco, suspensão celular não tratada; (**•**) CTAB Imb, suspensão celular permeabilizada com CTAB 0,2% (m/v) e com posterior reticulação com glutaraldeído 0,5% (v/v). (Substrato inicial: lactose 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L; pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador imobilizado)

Para a condição CTAB Imb, constatou-se uma queda acentuada nos parâmetros avaliados, resultados que corroboram os obtidos por Carra (2012), que, nessa condição, em 15 dias de estocagem em água destilada percebeu redução de 8% na concentração final de produtos. Embora sem uma base experimental, é possível sugerir-se que o tratamento com

CTAB, ao promover a abertura de poros na parede celular, leve ao extravasamento parcial das enzimas para o meio externo no decorrer da reação. Vignoli et al. (2006) relatam que a combinação entre o processo de permeabilização e de imobilização resulta em acentuada queda na produção de sorbitol.

Na análise estatística dos resultados gerais dos ensaios de bioconversão no tempo zero e no tempo 120 dias (Tabela 13) e para as condições Glu Imb e Branco Imb, observa-se que não há diferença significativa entre os parâmetros avaliados (p > 0,05). Como discutido anteriormente, o único tratamento das esferas do suporte de imobilização com glutaraldeído (Branco) foi capaz de promover o acúmulo dos produtos de interesse no meio reacional e, além disso, nesta condição manteve-se a estabilidade a estocagem por 120 dias de teste.

Tabela 13. Resultados gerais dos ensaios de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, com diferentes condições de tratamento em 120 dias de armazenagem (Substrato inicial: lactose 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L; pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador imobilizado).

Tempo (dias)	Zero		120 dias	
Tratamento	Glu Imb	Branco Imb	Glu Imb	Branco Imb
P _{máx} (mmol/L)	511 ± 1^{a}	514 ± 22^{a}	506 ±4 ^a	521 ± 34^{a}
t (h)	24	24	24	24
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,\!78 \pm 0,\!00^{\mathrm{a}}$	$0,8 \pm 0,03^{a}$	$0,77 \pm 0,00^{a}$	$0,8 \pm 0,06^{a}$
p (mmol/L/h)	$4,6 \pm 0,0^{a}$	$4,6 \pm 0,3^{a}$	$4,6 \pm 0,0^{a}$	$4,7 \pm 0,3^{a}$
q (mmol/g/h)	$1,14 \pm 0,00^{a}$	$1,14 \pm 0,06^{a}$	1,13 ±0,04 ^a	$1,17 \pm 0,28^{a}$
μ _{p,máx} (mmol/g/h)	$2,34\pm0,08^{a}$	$1,61 \pm 0,16^{b}$	1,99 ±0,12 ^a	$1,93 \pm 0,04^{\text{ b}}$
$S_f(mmol/L)$	137 ± 3^{a}	135 ± 25^{a}	143 ± 4^{a}	126 ± 37^{a}

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); t, tempo de processo; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade volumétrica; q, produtividade específica; $\mu_{p,máx}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); S_f, concentração de lactose residual. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% (p>0,05) entre as colunas para ensaios em duplicata.

Ainda, considerando que a imobilização de células de *Z. mobilis* contendo GFOR/GL em alginato de cálcio é um processo trabalhoso e oneroso, especialmente em escala de produção industrial, torna-se interessante verificar a possibilidade de armazenar-se o biocatalisador, a fim de reutilizá-lo conforme a demanda pelos produtos. Desta forma, avaliou-se a estabilidade em duas condições de armazenagem: i) esferas armazenas em água pH 7,0 e ii) esferas armazenadas drenadas (isentas de água livre) por 30, 90 e 150 dias. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Resultados semelhantes foram obtidos nas duas condições de estocagem, em água pH 7,0 e drenadas. A concentração final de produtos foi superior a 500 mmol/L e a conversão de lactose em ácido lactobiônico foi próxima de 0,80 mmol/mmol ao longo dos dias de armazenagem. A máxima velocidade específica de formação dos produtos ($\mu_{p,máx}$) também

manteve-se ao longo dos dias, no entanto, para a condição drenadas percebeu-se uma tendência de redução após 150 dias. A avaliação geral dos resultados obtidos nesses ensaios revela duas possibilidades de armazenamento, em água pH 7,0 ou drenadas, para o sistema imobilizado em alginato de cálcio com manutenção da atividade catalítica das enzimas.

Tabela 14. Resultados gerais de produção de ácido lactobiônico em diferentes condições de armazenamento das esferas de alginato de cálcio contendo *Zymomonas mobilis* (Substrato inicial: lactose 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L; pH 6,4; temperatura 39°C; 20 g/L biocatalisador imobilizado).

Tempo (dias)	0		30		90		150
Condição	-	Água	Drenadas	Água	Drenadas	Água	Drenadas
$P_{máx}(mmol/L)$	510	541	533	511	529	542	512
t (h)	24	24	24	24	24	24	24
$Y_{P/S0}$ (mmol/mmol)	0,78	0,83	0,82	0,78	0,82	0,84	0,79
p (mmol/L/h)	4,6	4,9	4,8	4,6	4,8	4,9	4,6
q (mmol/g/h)	1,14	1,21	1,20	1,15	1,19	1,22	1,15
$\mu_{p,máx}$ (mmol/g/h)	2,29	2,23	2,20	2,17	2,14	2,20	1,63
$S_f(mmol/L)$	139	106	114	139	119	104	136

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); t, tempo de processo; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade volumétrica; q, produtividade específica; $\mu_{p,máx}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); S_f , concentração de lactose residual.

5.5 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO E SORBITOL

Na literatura, embora haja, como visto, um expressivo volume de dados sobre diferentes aspectos do processo em estudo, são escassos os estudos voltados à transferência da tecnologia ao setor industrial. Assim, neste item, são discutidas alternativas para execução do processo de bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol por *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.

Inicialmente, avaliou-se o aumento da concentração celular nas reações de bioconversão em reator de agitação mecânica operando em regime descontínuo (RD). Esses ensaios tiveram por objetivo avaliar a utilização de reatores mecanicamente agitados, visando contornar as limitações do sistema com agitação magnética em termos de mistura. Nesta condição, comparou-se o desempenho do processo com 20 e 30 g/L de células de *Z. mobilis* imobilizadas, o que não seria possível no reator magneticamente agitado. Neste caso, para promover a mistura do meio, a opção pelo uso do impelidor do tipo âncora se justifica pelo fato de este promover a agitação do meio com menor turbulência (BERTRAND et al., 1996; TANGUY et al., 1996), o que poderia resultar em menor cisalhamento do suporte de imobilização. Na Tabela 15, estão apresentados os resultados desses ensaios.

Tabela 15. Resultados gerais para ensaios de bioconversão de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em reator de agitação mecânica com 20 g/L e 30 g/L de biocatalisador imobilizado em regime descontínuo. (Substrato inicial: lactose 700 mmol/L e frutose 600 mmol/L; pH 6,4; temperatura 39°C).

Concentração biocatalisador (g/L)	20	30
P _{máx} (mmol/L)	532 ± 1^{a}	532 ± 2^{a}
t (h)	24	24
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,81 \pm 0,01^{a}$	$0,82 \pm 0,01^{a}$
p (mmol/L/h)	$22,1 \pm 0,1^{a}$	$22,2 \pm 0,0^{a}$
q (mmol/g/h)	$1,19 \pm 0,01^{a}$	$0,81 \pm 0,01^{ m b}$
μ _{p,máx} (mmol/g/h)	$2,47 \pm 0,25^{a}$	$1,73 \pm 0,05^{\rm b}$
S_{f} (mmol/L)	117 ± 2^{a}	116 ± 3^{a}

 $P_{m\acute{a}x}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); t, tempo de processo; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade volumétrica; q, produtividade específica; $\mu_{p,m\acute{a}x}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); S_f, concentração de lactose residual. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% (p>0,05) entre as colunas para ensaios em duplicata.

Concentrações finais de produtos (ácido lactobiônico e sorbitol) semelhantes, cerca de 530 mmol/L, foram alcançadas em RD empregando as concentrações de 20 e 30 g/L do biocatalisador imobilizado. Da mesma forma, valores semelhantes para fator de conversão de substratos em produtos (0,80 mmol/mmol) e a produtividade volumétrica (22 mmol/L/h) em 24 horas foram obtidas. Por outro lado, o aumento da concentração celular representou um decréscimo na produtividade específica e na máxima velocidade específica de formação dos produtos. Isso, porque essas constantes cinéticas são expressas em função da concentração do biocatalisador imobilizado a velocidade da reação foi aumentada em comparação com a condição convencional (20 g/L), uma vez que menos tempo foi necessário para converter 70% dos substratos em produtos. A autora destaca, ainda, dificuldades atreladas ao processo de mistura com agitação magnética. Entretanto, no presente trabalho, ao utilizar-se agitação mecânica, as condições de misturas foram mantidas durante toda a reação para 20 e 30 g/L e, ainda assim, os resultados foram semelhantes ao final de 24 horas de reação.

Uma das alternativas para aumentar a velocidade da reação e, por sua vez, a concentração final de produtos é o aumento da concentração inicial de substratos, uma vez que o K_M de GFOR para lactose, em combinação com frutose, é alto (SATORY et al., 1997; MALVESSI et al., 2013). A solubilidade de frutose em água, a 20°C, é próxima de 4,4 mol/L (MERK, 2015), enquanto o sorbitol é normalmente comercializado em soluções 70% (m/v) (aproximadamente 3,9 mol/L) (SILVEIRA; JONAS, 2002), mostrando que, por este lado da reação, não haveria dificuldades. Entretanto, o uso de elevadas concentrações de lactose é

limitado pela sua solubilidade, cerca de 0,6 mol/L (SATORY et al., 1997). No caso, essa limitação pode ser contornada pela operação em regime descontínuo alimentado (RDA), uma vez que a alimentação de substratos pode ser executada à medida que os produtos são formados. Para isso, é necessário que a solubilidade dos produtos seja maior que a dos substratos, nas condições da reação (pH 6,4; 39°C). Delagustin (2017) relatou ser possível preparar uma solução 1,3 mol/L lactobionato de sódio, tendo caracterizado este composto como facilmente solúvel. No presente trabalho, a solubilidade da lactose e do lactobionato de sódio foi estimada em água 39°C e pH 6,4. Como resultado, confirmou-se a maior solubilidade para lactobionato de sódio (> 1,3 mol/L) em comparação à da lactose (0,94 mol/L), atendendo, assim, à exigência para a condução do processo em RDA.

A alimentação dos substratos nos ensaios foi realizada à medida que os produtos foram sendo formados e, para isso, foi considerado o consumo de NaOH como parâmetro de estimativa. A concentração dos substratos no início da reação foi a convencional (700 mmol/L de lactose e 600 mmol/L de frutose) e, para cada 18 mmol/L de produtos formado, adicionavam-se quantidades equivalentes para 18 mmol/L de lactose e 17 mmol/L de frutose. Os substratos foram adicionados na forma de pó, a fim de minimizar a variação de volume da reação. A concentração final equivalente dos substratos em batelada corresponderia a 1000 mmol/L de lactose e 900 mmol/L de frutose. Essas reações foram realizadas com 20 g/L e 30 g/L do biocatalisador imobilizado, pois, embora em RD resultados semelhantes foram alcançados em 24 horas de reação, desejava-se avaliar se a adição de substratos seria vantajosa para a condição com maior concentração celular. Os resultados dos ensaios em RDA estão apresentados na Tabela 16.

Os ensaios de bioconversão em RDA levaram ao aumento significativo da concentração final de produtos. Embora, concentrações finais em produtos estatisticamente iguais tenham sido obtidas para as duas condições em RD (20 e 30 g/L), os resultados para 30 g/L em RDA foram superiores a 770 mmol/L ao final de 32 horas de reação, enquanto que com 20 g/L a concentração máxima de 745 mmol/L somente foi alcançada após 42 horas de reação. Esses resultados foram superiores aos obtidos em RD neste trabalho e, também, aos descritos na literatura, cuja concentração máxima alcançada foi na ordem de 500 mmol/L (CARRA, 2012; MALVESSI et al., 2013; CARRA et al., 2015). Os resultados obtidos para RDA no presente trabalho levaram à conversão do substrato inicial em produtos de 85%, ligeiramente superior à de RD. Fazendo uso do sistema imobilizado em alginato de cálcio, Pedruzzi et al. (2011), Malvessi et al. (2013) e Carra et al. (2015) relataram conversão da ordem de 75%.

Pedruzzi et al. (2011) relataram concentrações próximas a 600 mmol/L em ácido lactobiônico, em RD; no entanto, foram necessárias 108 horas de reação com o biocatalisador no seu estado livre para que fosse atingia esta concentração. Da mesma forma, Malvessi et al. (2013) alcançaram 750 mmol/L com o biocatalisador livre, mas a elevada concentração inicial de lactose (1,2 mol/L) reduziu a conversão em produtos a 72%. No presente trabalho, os ensaios em RDA mostraram claramente a influência da concentração da lactose sobre a velocidade de formação dos produtos, assim como descrito previamente por Satory et al. (1997), Pedruzzi et al. (2011) e Malvessi et al. (2013).

Tabela 16. Resultados gerais para ensaios de bioconversão de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em reator de agitação mecânica com 20 g/L e 30 g/L de biocatalisador imobilizado em regime descontínuo alimentado. (Substrato inicial equivalente: lactose 1000 mmol/L e frutose 900 mmol/L; pH 6,4; temperatura 39°C).

Concentração biocatalisador (g/L)	20	30
P _{máx} (mmol/L)	745 ± 2^{b}	776 ± 3^{a}
t (h)	42	32
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,\!84 \pm 0,\!01^{a}$	$0,85 \pm 0,01^{a}$
p (mmol/L/h)	$17,4 \pm 0,9^{\text{ b}}$	$23,9\pm0,6^{a}$
q (mmol/g/h)	$0,\!97 \pm 0,\!04^{\mathrm{a}}$	$0,91 \pm 0,02^{a}$
μ _{p,máx} (mmol/g/h)	$1,70 \pm 0,04^{a}$	$1,58 \pm 0,02^{a}$
S_{f} (mmol/L)	139 ± 4^{a}	134 ± 6^{a}

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); t, tempo de processo; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade volumétrica; q, produtividade específica; $\mu_{p,máx}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); S_f , concentração de lactose residual. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% (p>0,05) entre as colunas para ensaios em duplicata.

Em consequência da elevada concentração equivalente de substratos que pôde ser empregada em RDA, a menor relação enzima /substrato com o uso de 30 g/L de biocatalisador imobilizado – 30 g/mol de lactose em RDA e 43 g/mol em RD – permitiu que uma produtividade volumétrica de 23,9 mmol/L/h fosse alcançada. Esse valor foi superior àquele obtido em RDA com 20 g/L de biocatalisador (17,4 mmol/L/h) e em RD (22,1 mmol/L/h) para as duas concentrações (20 e 30 g/L). Comparando-se estes resultados com os da literatura, os valores obtidos são ainda mais interessantes, uma vez que a mais alta produtividade relatada é de cerca de 19 mmol/L/h, para aproximadamente 480 - 500 mmol/L de ácido lactobiônico (PEDRUZZI et al., 2011; MALVESSI et al., 2013; CARRA et al., 2014; CARRA et al., 2015).

Ao final dos ensaios de bioconversão, detectaram-se apenas traços de concentrações de frutose, mas a concentração residual de lactose mínima foi da ordem de 100 - 130 mmol/L. Este fato se deve à baixa afinidade entre GFOR e lactose, fazendo com que haja obrigatoriamente resíduo desta aldose ao final da reação, assim como descrito previamente na

literatura (SATORY et al., 1997; PEDRUZZI et al., 2011; MALVESSI et al., 2013).

Na Figura 25, apresentam-se os perfis de formação de produtos em função do tempo para os ensaios em reator mecanicamente agitados em RD e RDA.



Figura 25. Concentração de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol) em função do tempo, em ensaios de bioconversão com 20 g/L (\bullet) e 30 g/L (\bullet) de células de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio utilizando em reator de agitação mecânica em regime descontínuo [A] e descontínuo alimentado [B].

É possível observar que, embora em RD a concentração final de produtos atingida em 24 horas foi a mesma para as duas condições, a velocidade da reação para a condição com 30 g/L foi superior. Ao comparar-se a concentração de produtos em um intervalo menor de tempo, em 16 horas, por exemplo, verificam-se resultados estatisticamente diferentes (500 mmol/L para 30 g/L e 480 mmol/L para 20 g/L). O mesmo perfil é observado para reações em RDA. Nesse caso, mesmo após 44 horas, a concentração de produtos formado para 20 g/L não atinge aquela obtida em 32 h para 30 g/L, fato que demonstra a possibilidade de operar-se com 30 g/L biocatalisador imobilizado sem haver excesso de enzimas em relação ao substrato disponível na reação, corroborando os resultados de Carra (2012).

Na Figura 26, são confrontados os perfis de concentração equivalente de lactose e de velocidade reacional em função do tempo nos diferentes regimes de operação em ensaios em reator de agitação mecânica. Nesses gráficos, o valor informado para a concentração de lactose foi determinado pela soma das massas adicionada na alimentação e residual na solução dividida pelo volume total da solução no momento de cada adição.



Figura 26. Perfil de consumo de substratos e da velocidade de formação dos produtos em ensaios de bioconversão em reator mecanicamente agitado sob regime de operação descontínuo – RD (preto) e descontínuo alimentado - RDA (azul) com 20 g/L [A e A'] e 30 g/L [B e B'] de biocatalisador imobilizado.

Nas reações com alimentação de substratos, é possível observar que a velocidade reacional se manteve no máximo pelo tempo em que a concentração de lactose ficou próxima a 700 mmol/L. No entanto, para a condição em RD, a velocidade é máxima apenas nos instantes iniciais da reação e percebe-se sua redução comparativamente mais acelerada à medida que se reduz a concentração de lactose, e também de frutose, no meio reacional. A alimentação manteve alta a concentração de substratos, o que favoreceu a velocidade específica de formação dos produtos, assim como descrito previamente por Pedruzzi et al. (2011). Malvessi et al. (2010) relataram que a máxima atividade catalítica de GFOR se dá em concentração de substratos entre 0,7 e 1,3 mol/L, no caso de utilizar-se o par glicose/frutose. No caso da utilização de lactose, a máxima atividade de GFOR ocorre com substratos entre 0,9 e 1,2 mol/L (MALVESSI, 2008), fato atrelado ao elevado valor de K_M da GFOR para a lactose, como já discutido anteriormente.

A velocidade inicial em RD foi superior àquela em RDA; acredita-se que isso se deva a uma provável inibição pelo substrato logo no início da reação, uma vez que a adição dos substratos já acontece nos primeiros 30 - 40 minutos. Como alternativa, sugere-se que a estratégia de alimentação deveria ser otimizada a fim de favorecer a velocidade inicial. As reações com regime de operação com alimentação de substratos mostraram-se uma alternativa viável para o processo, já que resultaram em aumento na concentração final de produtos de cerca de 50% em relação ao processo descrito na literatura. Ainda, nesse caso, o aumento da concentração do biocatalisador imobilizado para 30 g/L levou a resultados superiores, que justificaria sua utilização em substituição à concentração de 20 g/L; no entanto, em termos de processo, o aumento da concentração celular representa maior quantidade de esferas no reator. Como descrito anteriormente, ao final dos ensaios de bioconversão é comum que ocorra o acúmulo de líquido no interior do suporte, reduzindo o volume de caldo recuperável da reação. Assim, o aumento na quantidade do biocatalisador imobilizado (30/L) levou a recuperação de apenas 25% do caldo. Salienta-se, que este não é um fato isolado para a condição 30 g/L; no entanto, com concentração atual (20 g/L) recupera-se cerca de 50-60% de caldo.

Na sequência, ensaios de bioconversão foram conduzidos em reator tubular sob agitação pneumática em RD e RDA com 20g/L do biocatalisador imobilizado. Esse ensaio teve por objetivo propor uma nova configuração de reator visando à simplicidade e à facilidade de operação. Na Tabela 17, estão apresentados os resultados para os ensaios realizados.

Tabela 17. Resultados gerais para ensaios de bioconversão de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em reator tubular com agitação pneumática em regime descontínuo e descontínuo alimentado (pH 6,4; temperatura 39°C; fluxo de ar 1 L/min; 20 g/L de biocatalisador imobilizado)

Regime de operação do reator	Descontínuo	Descontínuo alimentado
		annentado
P _{máx} (mmol/L)	501 ± 12^{b}	753 ± 14^{a}
t (h)	24	47
Y _{P/S0} (mmol/mmol)	$0,77 \pm 0,02^{\rm b}$	$0,89 \pm 0,03^{a}$
p (mmol/L/h)	$21,3 \pm 0,0^{a}$	$16,\!28 \pm 0,\!3^{\mathrm{b}}$
q (mmol/g/h)	$1,15 \pm 0,00^{a}$	$0,90 \pm 0,02^{\rm b}$
$\mu_{p,máx} (mmol/g/h)$	$1,83 \pm 0,00^{\rm b}$	$1,90 \pm 0,03^{a}$
S_{f} (mmol/L)	150 ± 13^{a}	139 ± 14^{a}

 $P_{máx}$, concentração máxima de produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); t, tempo de processo; $Y_{P/S0}$, fator de conversão de substrato em produto; p, produtividade volumétrica; q, produtividade específica; $\mu_{p,máx}$, máxima velocidade específica de formação dos produtos (ácido lactobiônico ou sorbitol); Sf, concentração de lactose residual. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% (p>0,05) entre as colunas para ensaios em duplicata.

Em regime descontínuo concentração de 500 mmol/L em produtos foram obtidas em 24 horas de processo. Entretanto, valores superiores (753 mmol/L) foram alcançados com a alimentação de substratos. O aumento no tempo da reação em RDA levou à queda na produtividade, quando comparado com a reação em RD. Valores superiores, no entanto, foram alcançados para o fator de conversão de substratos em produtos (superior em 16%). Estes

resultados foram semelhantes aos obtidos para as reações conduzidas em reator de agitação mecânica.

Em termos da máxima velocidade específica de formação dos produtos, determinaramse valores maiores para a condição com alimentação. Na Figura 27, é apresentado o comparativo do efeito da concentração de substrato (lactose) sobre a velocidade de formação de produto para as duas condições em reator de agitação pneumática.



Figura 27. Perfil de consumo de substratos e da máxima velocidade específica de formação dos produtos em ensaios de bioconversão em reator com agitação pneumática sob regime de operação descontínuo (preto) e descontínuo alimentado (azul) com 20 g/L de biocatalisador imobilizado.

Observa-se que, embora a velocidade logo no início da reação tenha sido maior para condição em RD, este valor é reduzido à medida que os substratos são consumidos. Por outro lado, a alimentação de substratos promoveu um aumento na velocidade, resultando em valores maiores do que na condição descontínua, de forma semelhante à observada anteriormente em reator de agitação mecânica. Ainda, a máxima velocidade nesse caso manteve-se por 12 horas de reação, enquanto que para RD a máxima foi instantânea no início da reação.

As reações de bioconversão a ácido lactobiônico e sorbitol descritas na literatura foram, em sua maioria, conduzidas em reator de mistura completa, como apresentado no referencial teórico desta dissertação. Exceto pelo trabalho de Malvessi et al. (2006a), nenhuma outra informação foi levantada com respeito ao uso de reatores tubulares com agitação pneumática nesta reação.

Os ensaios conduzidos em reatores mecanicamente agitados em RD levaram a valores estatisticamente superiores (p < 0,05) nos parâmetros $P_{máx}$ e $\mu_{p,máx}$ quando comparado com a reação em reator tubular; corroborando os resultados de Malvessi et al. (2006a), que observaram melhores condições de mistura no reator de agitação mecânica. No entanto, parâmetros importantes, como a produtividade e o rendimento foram similares (p > 0.05) nos dois tipos de reatores. De uma forma geral, essas reações podem ser conduzidas, tanto em reatores de agitação mecânica como nos de agitação pneumática, já que os resultados foram semelhantes aos descritos em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (MALVESSI et al., 2013; CARRA et al., 2015). Em termos de processo, a injeção de ar promove a agitação com mais suavidade, provocando menor cisalhamento no suporte de biocatalisador imobilizado, como descrito por Obradovic et al. (2004), Margaritis e Kilonzo (2005) e Nemati e Webb (2011). No entanto, não foram evidenciadas diferenças na integridade do suporte independentemente do reator em que as reações foram conduzidas. Acredita-se que este fato possa estar relacionado com a vazão de ar (1 L/min) necessária para promover o suporte em suspensão e garantir as condições da reação ou, ainda, ao fato de utilizar-se o impelidor do tipo âncora, no reator de agitação mecânica, que por promover a mistura do meio com menor tensão de cisalhamento, pode ter minimizado as diferenças na integridade do suporte (BERTRAND et al., 1996; TANGUY et al., 1996). Ainda assim, como vantagem para o reator tubular cita-se sua simplicidade e o baixo consumo de energia (NEMATI; WEBB, 2011).

Nos ensaios em RDA, a alimentação de substratos manteve alta a relação substrato/enzima por mais tempo, o que favoreceu a velocidade da reação e resultou em elevada concentração final de produtos para ambos os reatores, mecanicamente agitado e tubular com agitação pneumática. Concentrações em ácido lactobiônico e sorbitol na ordem de 750 mmol/L representa um incremento de 50% em relação aos melhores resultados descritos na literatura (500 mmol/L). Ainda, a conversão dos substratos em produtos foi 85% do máximo estequiométrico possível, enquanto que na melhor condição descrita na literatura o alcançado foi 75%. De fato, nesses casos, em função da alimentação da produtividade volumétrica (17,4 mmol/L/h) e específica (0,97 mmol/g/h) em comparação aos resultados do grupo, 19 mmol/L/h e 1,15 mmol/g/h. No entanto, os resultados em 24 horas de reação, em RDA, também foram superiores aos obtidos em RD, alcançando 630 mmol/L em produtos, com produtividades de 24 mmol/L/h e 1,50 mmol/g/h. Neste tempo de reação, a concentração residual de lactose e frutose eram 280 mmol/L e 188 mmol/L, respectivamente. O maior tempo de reação permitiu

reduzir a concentração residual de lactose para 139 mmol/L, com teores insignificantes de frutose, o que seria vantajoso para a execução da etapa de recuperação e purificação dos produtos do processo.

6 CONCLUSÃO

De um modo geral, os resultados deste trabalho confirmam as condições da imobilização de *Z. mobilis* em alginato de cálcio convencionalmente descritas na literatura. Adicionalmente, a técnica de obtenção do biocatalisador imobilizado foi simplificada, mantendo-se o rendimento da reação de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol. A avaliação dessa reação em diferentes sistemas de condução do processo possibilitou manter a máxima velocidade de formação dos produtos por maior tempo em decorrência do uso do regime de operação descontínuo alimentado.

A partir dos resultados deste trabalho é possível que se formulem as conclusões apresentadas a seguir.

- As alterações propostas na técnica de imobilização celular em alginato de cálcio – concentração do polímero e da solução de cloreto de cálcio e do tempo de gelificação - não levaram a alterações significativas nas propriedades do gel para reutilização em bateladas repetidas de bioconversão. Os resultados podem estar relacionados com o próprio processo, uma vez que o pH da reação é controlado por meio da adição de NaOH, que pode estar afetando negativamente a estabilidade do alginato de cálcio. Assim, a técnica de imobilização celular em alginato de cálcio mantem-se da forma convencional, com concentração de alginato de sódio de 4% (m/v) e da solução de cloreto de cálcio 0,3 mol/L.

- A estabilidade do biocatalisador imobilizado por longos períodos – 176 horas de reação, em sete bateladas de bioconversão consecutivas –, juntamente com elevado valor comercial do ácido lactobiônico, indica que o processo tem potencial de aplicação industrial.

- A permeabilização celular de *Zymomonas mobilis*, convencionalmente feita com detergentes catiônicos como o CTAB, pode ser excluída, uma vez que o tratamento com glutaraldeído 0,5% (v/v) mostrou-se suficiente para inativar o metabolismo microbiano, sem afetar negativamente a atividade catalítica de GFOR/GL.

- O tratamento para inviabilização celular com glutaraldeído é necessário nos ensaios de bioconversão, com glicose ou lactose, utilizando células de *Z. mobilis* em seu estado livre, assim evitando o consumo dos produtos para via fermentativa. Por outro lado, em ensaios de bioconversão com células imobilizadas em alginato de cálcio, o único tratamento com glutaraldeído nas esferas do suporte – posteriormente à imobilização – é suficiente para inibir o metabolismo fermentativo das células.

- Para as condições testadas, a estabilidade enzimática do biocatalisador imobilizado

em alginato de cálcio, armazenado em água destilada a 4°C, manteve-se constante por 120 dias. No que diz respeito à forma de armazenamento, ambas as condições avaliadas, suspensão em água pH 7,0 ou drenado, a atividade catalítica do biocatalisador imobilizado se mantém por 150 dias.

- A condução do processo em regime descontínuo alimentado possibilitam o aumento da concentração final de produtos em cerca de 50% em relação ao regime descontínuo.

 O processo pode ser realizado com sucesso tanto em reator de agitação mecânica quanto em reator tubular com agitação pneumática, sendo está última uma alternativa viável para a redução dos custos do processo pela simplicidade de construção e pelo baixo gasto energético.

Como perspectivas para a continuidade da pesquisa, sugere-se o aprofundamento de novos estudos envolvendo os seguintes aspectos:

 otimização da estratégia de alimentação de substratos no processo em regime descontínuo alimentado;

 - avaliação da condução do processo em outras configurações de reatores, como de coluna com leito fixo e com leito fluidizado;

- estudo em cultivos de *Z. mobilis*, com o fim de obter-se enzimas com maior atividade catalítica;

- aprimoramento das condições de processo visando a melhora nas propriedades mecânicas do gel ao final dos ensaios de bioconversão.

7 REFERÊNCIAS

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9730-9736, 2011.

_____. Role of dissolved oxygen availability on lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 140-147, 2012.

_____. Bio-production of lactobionic acid: current status, applications and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1275-1291, 2013.

ATEŞ, S.; MEHMETOĞLU, Ü. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 433–436, 1997.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in biocatalysts design: a useful crosslinker and a versatile too in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583-1600, 2014.

BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A.M.; MÉNDEZ, J.B.; SISO, M.I.G. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 506–512, 2001.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; KARLOVIĆ, S.; DJAKOVIĆ, S.; ŠPOLJARIĆ, I.; MRŠIĆ, G.; JEŽEK, D. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. **Food Chemistry**, v. 167, p. 378-386, 2015.

BERTASSO, M.; SILVEIRA, M.M.; MANCILHA, I.M. Preservação da atividade da enzima glicose-frutose oxidorredutase em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. **XI Simpósio Nacional de Fermentações**, São Carlos, 1996.

BERTRAND F.; TANGUY, P.A.; BRITO- DE LA FUENTE, E. A new perspective for the mixing of yield stress fluids with anchor impellers. Journal of Chemical Engineering of Japan, v. 29, p. 51-58, 1996.

BLANDINO, A.; MACÍAS, M.; CANTERO, D. Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaC1₂ concentration on gelation kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 686-689, 1999.

BUDAVARI, S.; O`NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E.; KINNEARY, J.F. **The Merck Index:** an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12. ed. Whitehouse Station: Merck & Co, 1996.

BUGA, M.; IBRAHIM, S.; NOK, A. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6). African Journal of Biotechnology, v. 9, p. 8934-8943, 2010.

CARRA, S. Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. Universidade de Caxias do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Dissertação de mestrado). Caxias do Sul. 2012.

CARRA, S.; RODRIGUES, D.C.; BERALDO, N.M.C.; FOREST, P. F.; REGINATTO, C.; BASSANI, V.L.; SILVEIRA, M.M.; MALVESSI, E. Avaliação da temperatura na produção de ácido lactobiônico e sorbitol por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, 2014.

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. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Fortaleza, 2015.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.D.; SILVA, J. B. D.A.E. Biocatalizadores Imobilizados. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n° 36, p. 48-57, 2006.

CHUN, U.H.; ROGERS, P.L. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gliconic acid from glucose using an oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 29, p. 19-24, 1988.

COVIZZI, L.G.; GIESSE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; DA SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, p. 143-160, 2007.

DELAGUSTIN, M.G. Caracterização e avaliação da estabilidade do ácido lactobiônico e de diferentes lactobionatos produzidos por *Zymomonas mobilis* visando à utilização na área farmacêutica. Universidade de Caxias do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Dissertação de mestrado). Caxias do Sul. 2017.

DOELLE, H.; KIRK, L.; CRITTENDEN R.; TOH, H.; DOELLE, M. *Zymomonas mobilis* science and industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 57-98, 1993.

DOMÍNGUEZ, A.; COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Dye decolorization by Trametes hirsuta immobilized into alginate beads. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 405-409, 2005.

D'SOUZA, S. F. Immobilized enzymes in bioprocess. Current Science, v. 77, p. 69-79, 1999.

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

EUROPEAN Pharmacopoeia Commission. European pharmacopoeia. 8º ed., 2014.

EŞ, I.; VIEIRA, J.D.G; AMARAL, A.C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, p. 2065-2082, 2015.

FAJARDO-OCHOA, R.; OSUNA-CASTRO, J. A.; VILLAVELÁZQUEZ-MENDOZA, C.; ESCALANTE-MINAKATA, P; IBARRA-JUNQUERA, V. Inmovilización de células y enzimas. **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 3, p. 42-56, 2011.

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

FÜRLINGER, M.; NIDETZKY, B.; SCOPES, R.K.; HALTRICH, D.; KULBE, K.D. Inactivation of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* during its catalytic action. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 799, p. 752-756, 1996.

GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M.A. Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 1194-1201, 2012.

GACESA, P. Alginates. Carbohydrate Polymers, v. 8, p. 161-182, 1988.

GARIN, D. Uso do sistema enzimático de Zymomonas mobilis para a produção de ácidos

maltobiônico e lactobiônico. Universidade de Caxias do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Dissertação de mestrado). Caxias do Sul. 2016.

GENARI, A.N.; PASSOS, F.V.; PASSOS, F.M. Configuration of a bioreactor for milk lactose hydrolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2783-2789, 2003.

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

GONZÁLEZ, G.; HERRERA, M.G.; GARCÍA, M.T.; PEÑA, M.M. Biodegradation of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fuidized-bed bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 245-251, 2001.

GORMAN, S.P.; SCOTT, E.M. Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde. Jornal of Applied Bacteriology, v. 48, p. 161-190, 1980.

GRIMES, P.E.; GREEN, B.A.; WILDNAUER, R.H.; EDISON, B.L. The use of polyhydroxy acids (PHAs) in photoaged askin. **Cutis**, v. 73, p. 3-13, 2004.

GUTIÉRREZ, L.F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: a high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **International Dairy Journal**, v. 26, p. 103-111, 2012.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Its stability and applications in the hidrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 72-80, 2007.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HE, M.X.; WU,B.; QIN, H.; RUAN, Z.Y.; TAN, F.R.; WANG, J.L.; SHUI, Z.X.; DAI, L.C.; ZHU, Q.L.; PAN, K.; TANG, X.Y.; WANG, W.G.; HU, Q.C. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1-15, 2014.

HEMAPRABHA, E. Chemical crosslinking of proteins: a review. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, v. 1, p. 22-26, 2012.

HOFFHINE, Jr.C.E. Aqueous soluble salts of erythromycin. US 2761859 A, 14 jan. 1953, 4 set. 1956.

HUANG, S.; XIAO, Z.; ZHAI, S.; ZHAI, B.; ZHANG, F.; AN, Q. Fabrication of highly-stable Ag/CA@GTA hydrogel beads and their catalytic application. **RSC Advances**, v. 4, p. 60460-60466, 2014.

ISBELL, H.S. Process of oxidizing aldoses sugars and products resulting therefrom. USA. US1976731A, 21 fev. 1931, 16 out. 1934.

JANG, K.; JUNG, S.; CHANG, H.; CHUN, U. Improvement of the process for Sorbitol production with *Zymomonas mobilis* immobilised in *k*-carrageenan. **Process Biochemistry**, v. 31, p- 485-492, 1996.

JUNG, I.; CHOI, D.; PARK, C.; CHUN, U. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis* immobilized in calcium alginate gels and glutaraldehyde. **Korean Journal of Food Science Technology**, v. 22, p. 812-816, 1990.

KAREL, S.F.; LIBICKI, S.B.; ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells: engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, p. 1321-1354, 1985.

KAWAGUTI, H.Y.; CARVALHO, P.H.; FIGUEIRA, J.A.; SATO, H.H. Immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in alginate-gelatin matrix and conversion of sucrose into isomaltulose using response surface methodology. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, p. 134-143, 2008.

KIM, I.; KIM, S. Development of a polymeric nanoparticulate drug delivery system in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 245, p. 67-73, 2002.

KIRYU, T.; YAMAUCHI, K.; MASUYAMA, A.; OOE, K.; KIMURA, T.; KISO, T.; NAKANO, H; MURAKAMI, H. Optimization of lactobionic acid production by *Acetobacter orientalis* isolated from Caucasian fermented milk, "Caspian Sea Yogurt"76. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, p. 361-363, 2012.

KLUYVER, A J; DE LEY, J; RIJVEN, A. The formation and consumption of lactobionic and maltobionic acids by *Pseudomonas* species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 17, p. 1-14, 1951.

KONTI, A.; MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; KEKOS, D. 3-Chloro-1,2-propanediol biodegradation by Ca-alginate immobilized *Pseudomonas putida* DSM 437 cells applying different processes: mass transfer effects. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 1597-1609, 2016.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINASS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable inalcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377-397, 2004.

LADERO, V.; RAMOS, A.; WIERSMAN, A.; GOFFIN, P.; SCHANCK, A.; KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J.; SMID, E.J.; HOLS, P. High-Level Production of the low-calorie sugar sorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1864-1872, 2007.

LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 106-126, 2012.

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

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

LORENZETTI, M.F.S.; MORO, M.R.; GARCÍA-CRUZ, C.H. Alginate/PVA beads for levan production by *Zymomonas mobilis*. Journal of Food Process Engineering, v. 38, p. 31-36, 2015.

LU, Y. Humectancies of D-tagatose and D-sorbitol. International Journal of Cosmetic Science, v. 23, p. 175-181, 2001.

MALVESSI, E.; PASQUALI, F.C.; CARRA, S.; POLIDORO, T.A.; SILVEIRA, M.M. Bioconversão de ácido lactobiônico por endoenzimas presentes em células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em diferentes configurações de biorreatores. **VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Caxias do Sul, 2006a.

MALVESSI, E.; CONCATTO, K.; CARRA, S; SILVEIRA, M.M. Z. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*.

Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 49, p. 139-144, 2006b.

MALVESSI, E. **Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por** *Zymomonas mobilis*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (Tese de doutorado). Porto Alegre. 2008.

MALVESSI, E.; CARRA, S; SILVEIRA, M.M.; AYUB, M.A.Z. 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**, v. 51, p. 1-6, 2010.

MALVESSI, E.; CARRA, S.; PASQUALI, F.C.; KERN, D.B.; SILVEIRA, M.M.; AYUB, M.A.Z. Production of organic acids by periplasmic enzymes presente in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, v. 40, p. 1-10, 2013.

MARGARITIS, A.; KILONZO, P.M. Production of ethanol using immobilized cell bioreactor systems. **Focus on Biotechnology**, v. 8B: Applications of Cell Immobilisation Biotechnology, p. 375–405, 2005.

MERK. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ**. Data da revisão 03.12.2015, versão 1.5. Disponível em: http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/D(-)Fructose,MDA_CHEM-105323#overview>. Acesso em 01 abril. 2017.

MCGINLEY, H. R. Glutaraldehyde uses and counterfeits. **Water Technology**, v. 35, p. 30-33, 2012.

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

NEMATI, M.; WEBB, C. **Immobilized Cell Bioreactors**. In: _____ Comprehensive Biotechnology. 2°. ed. Elsevier, v. 2, p. 331-346, 2011.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J.; WALDRON, K. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790-802, 2004.

MINER, N.A.; MCDOWELL, J.W.; WILLCOCKSON, G.W.; BRUCKNER, N.I.; STARK, R.L.; WHITMORE, E.J. Antimicrobial and other properties of a new stabilized alkaline glutaraldehyde disinfectant/sterilizer. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 34, p. 376-382, 1977.

MISHRA, A.; SHARMA, A.K.; SHARMA, S.; BAGAI, R.; MATHUR, A.S.; GUPTA, R.P.; TULI, D.K. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. **Renewable Energy**, v. 98, p. 57-63, (ONLINE), 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.010

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

MONSAN, P.; PUZO, G.; MAZARGUIL, H. Étude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldehyde protéines. **Biochimie**, v. 57, p. 1281-1292, 1975.

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

NIDETZKY, B.; FÜRLINGER, M.; GOLLHOFER, D.; SCOPES, R.K.; HALTRICH, D.; KULBE, K.D. Improved operation stability of cell-free glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* for the efficient syntesis of sorbitol and glconic acid in a continuous ultrafiltrarion membrane reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, p. 623-629, 1997.

NORDKVIST, M.; NILESEN, P. M.; VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 694-707, 2006.

OBRADOVIC, B.; NEDOVIĆ, V.A.; BUGARSKI, B.; WILLAERT, R.G.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Immobilised cell bioreactors. **Focus on Biotechnology**, v. 8A: Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology, p. 411-431, 2004.

OKUDA, K.; URABE, I.; YAMADA, Y.; OKADA, H. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 71, p. 100-105, 1991.

PALLERLA, S.; CHAMBERS, R.P. Characterization of a Ca-alginte-immobilized trametes versicolor bioreactor for decolorization and aox reduction of papel mill efluents. **Bioresource Technology**, v. 60, p. 1-8, 1997.

PANASER, P.S.; MARWAHA, S.S.; KENNEDY, J. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 623-635, 2006.

PILKINGTON, P.H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N.A.; RUSSELL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, p. 19–31, 1998.

PEDRUZZI, I.; DA SILVA, E.A.B.; RODRIGUES, A. Production of lactobionic acid and sorbitol from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomona mobilis* cells: a kinetic study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 183-191, 2011.

PETERS, K.; RICHARDS, F.M. Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, p.523-551, 1977.

PITCHER JR, W.H. Design and operation of immobilized enzyme reactors. Advances in Biochemical Engineering, v. 10, p. 75-129, 1978.

POTUMARTHI, R.; SUBHAKAR, C.H.; PAVANI, A.; JETTY, A. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1776-1786, 2008.

PRADELLA, J.G.C. **Reatores com células imobilizadas**. In Biotecnologia industrial. 1° ed. Edgar Blücher, v. 2, p. 355-371, 2001.

RAKMAI, J.; CHEIRSILP, B. Continuous production of cyclodextrin by cyclodextrin glycosyltransferase immobilized in mixed gel beads: comparative study in continuous stirred tank reactor and packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 107–113, 2016.

REHR, B.; WILHEM, C.; SAHM, N. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 144-148, 1991.

RIBEIRO, J. C.; GRANATO, D.; MASSON, ML.; ANDRIOT, I.; MOSCA, AC.; SALLES, C.; GUICHARD, C.; GUICHARD, E. Effect of lactobionic acid on acidification, rheological

properties and aroma release of daury gels. Food Chemestry, v. 207, p. 101-106, 2016.

RICHARDS, F.M.; KNOWLES, J.R. Glutaraldehyde as a protein cross-linkage reagent. **Journal of Molecular Biology**, v.37, p. 231-233, 1968.

RODRIGUES, R.C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemestry Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2012.

ROGERS, P.L.; SKOTNICHI, M.L.; LEE, K.J.; LEE, J.H. Recent developments in the *Zymomonas* process for ethanol production. **Biotechnology**, v. 1, p. 273-288, 1984.

ROGERS, P.L.; JEON, Y.J.; LEE, K.J.; LAWFORD, H.G. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 263-288, 2007.

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

SEO, J.S.; CHONG, H.; PARK, H.S.; YOON, K.O.; JUNG, C.; KIM, J.J.; HONG, J.H.; KIM, H.; KIM, J.H.; KILL, J.I.; PARK, C.H.; OH, H.M.; LEE, J.S.; JIN, S.J.; UM, H.W.; LEE, H.J.; OH, S.J.; JIM, J.Y.; KANG, H.L.; LEE, S.Y.; LEE, K.J.; KANG, H. S. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM 4. **Natire articles**, v. 23, p. 63-68, 2005.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. Vol. 2 – Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. pp. 541, 2001.

SHWIDE-SLAVIN, C.; SWIFT, C.; ROSS, T. Nonnutritive Sweeteners: Where Are We Today? **Diabetes Spectrum**, v. 25, p. 104-110, 2012.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK, E.; LEMMEL, C.; ERZINGER, G.; DA COSTA, J.P.L.; BERTASSO, M.; JONAS, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 25, p. 99-103, 1999.

SILVEIRA, M. M.; JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 400–408, 2002.

SILVEIRA, M.M.; MALVESSI, E.; CARRA, S.; PASQUALI, F.C.; POLIDORO, T.A. Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácido orgânicos ou seus sais, preparação de elevada pureza isomérica de ácidos orgânicos e seus sais. **Patente de invenção**. INPI, PI 0700421-4, Brasil, 2007.

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

STODOLA, F.H.; LOCKWOOD, L.W. The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *Pseudomonas*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1947, p. 213-221, 1947.

SUMIMOTO, R.; KAMADA, N. Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. **Transplantation Proceedings**, v. 22, p. 2198-2199, 1990.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 1-46, 1977.

TASHIMA, T.; MASAHIRO, I.; KURODA, T.; YAGI, S.; TERUMICHI, N. Structure of a new

oligomer of glutaraldehyde produced by aldol condensation reaction. **The Journal of organic Chemistry**, v. 56, p. 694-697, 1991.

TANAKA, H.; MATSUMURA, M; VELIKY, i.a. Diffusion characteristics of substrates in Caalgiante gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 53-58, 1984.

TANGUY, P.A.; THIBAULT, F.; BRITO-DE LA FUENTE, E. A new investigation of the Metzner-Otto concept for anchor mixing impellers. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 74, p. 222-228, 1996.

TANI, Y.; VONGSUVANLERT, V. Sorbitol production by a methanol yeast, *Candida Boidinii* (Kloeckera sp.) No. 2201. Journal of Ferment Technology, v. 65, p. 405–411, 1987.

TANRISEVEN, A.; DOĞAN, S. A novel method for the immobilization of β -galactosidase. **Process Biochemestry**, v. 38, p. 27-30, 2002.

TOWLER, G.; SINNOTT, R.K. Chemical Engineering Design: Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design. 2nd ed. Boston: Elsevier, 2013.

VAN GORP, K.; BOERMAN, E.; CAVENAGHI, C.V.; BERBEN, P.H. Catalytic hydrogenation of fine chemicals: sorbitol production. **Catalysis Today**, v. 52, p. 349-361, 1999.

VIGNOLI, J.A.; CELLIGOI, M.A.P. C.; SILVA, R.S.F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 240-243, 2006.

VIIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 19, p. 252-255, 1984.

VIIKARI, L.; BERRY, D.R. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. Critical Reviews in Biotechnology, v. 7, p. 237-261, 1988.

WALT, D.; AGAYN, V. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, p. 425-430, 1994.

WIDERØE, H.; DANIELSEN, S. Evaluation of the use of Sr2+ in alginate immobilization of cells. **Naturwissenschaften**,v. 88, p. 224-228, 2001.

WILBERG, K.Q.; ALVES, T.L.M.; NOBREGA, R. Enzymatic catalysis by permeabilized cells. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, 1997. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66321997000400008. Acesso em: 10 nov. 2016.

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

ZACHARIOU, M.; SCOPES, R.K. Glucose-Fructose Oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* That Is Responsible for Sorbitol Production. **Journal of Bacteriology**, v. 167, p. 863-869, 1986.