

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE POR
LINHAGEM FLOCULANTE DE *Zymomonas mobilis*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Dr. Jorge Ninow.

Co-Orientador: Dr. Maurício Moura da Silveira.

ELISABETH WISBECK

Florianópolis

1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE POR
LINHAGEM FLOCULANTE DE *Zymomonas mobilis*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Dr. Jorge Ninow.

Co-Orientador: Dr. Maurício Moura da Silveira.

ELISABETH WISBECK

Florianópolis

1995

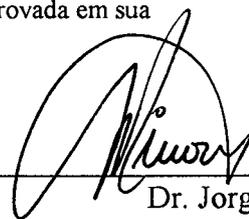
Termo de aprovação

Estudo da produção de glicose-frutose oxidoredutase por
linhagem floculante de *Zymomonas mobilis*

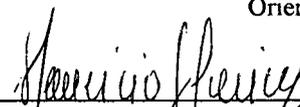
por

Elisabeth Wisbeck

Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Processos Fermentativos** e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação.



Dr. Jorge Ninow
Orientador

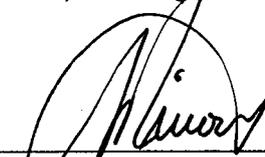


Dr. Mauricio Moura da Silveira
Co-Orientador

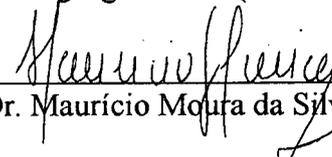


Dr. José Vladimir de Oliveira
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

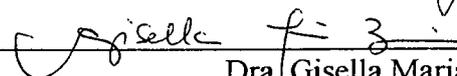
Banca Examinadora:



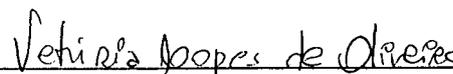
Dr. Jorge Ninow (Presidente)



Dr. Mauricio Moura da Silveira



Dra. Gisella Maria Zanin



Dra. Vetúria Lopes de Oliveira

Florianópolis, 30 de junho de 1995

A parte experimental deste trabalho foi inteiramente realizada nos laboratórios do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico de Joinville, SC.

"Trilhava um caminho de glória, cabeça erguida, peito aberto. Sorriso franco de quem sabia aonde ir. Vento no rosto, passo firme, olhar refletindo a luz da esperança... Então, repentinamente, escureceu. E sobrou um caminho a ser percorrido."

Em memória de Romolo Irineu Sandrini.

AGRADECIMENTOS

Agradeço do Dr. Jorge Ninow pela orientação prestada durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Mauricio Moura da Silveira, apresento meus sinceros agradecimentos pela sua prestimosa colaboração no decorrer da supervisão de meus trabalhos.

À Diretoria do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, em especial Dr. Rainer Jonas, pela oportunidade de desenvolver o trabalho experimental neste local, meus agradecimentos.

Aos colegas do grupo de trabalho, Paulo Ivo, Claudia, Adriane, José Paulo, Gilmar, Daniel, Marcelo, Marília, pela atenciosa colaboração e companheirismo, o meu muito obrigada.

Aos meus familiares, em especial meus pais, pela compreensão oferecida neste período, lhes sou inteiramente grata.

Agradeço aos demais colegas e funcionários do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico e da Universidade Federal de Santa Catarina, que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, agradeço pela cessão da cepa de *Zymomonas mobilis* Z1-81.

Meus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
NOMENCLATURA	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
II.1 MICRORGANISMO	4
II.1.1 Floculação	5
II.1.2 Uso terapêutico	6
II.1.3 Necessidades nutricionais	6
II.2 VIAS METABÓLICAS PRINCIPAIS	7
II.3 GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE	10
II.4 CRESCIMENTO MICROBIANO E PRODUÇÃO DE ETANOL	12
II.5 SORBITOL E ÁCIDO GLUCÔNICO	16
II.5.1 Aplicações	16
II.5.2 Processos convencionais de produção	17
II.5.3 Produção por <i>Zymomonas mobilis</i>	17
III MATERIAL E MÉTODOS	21
III.1 MICRORGANISMO	21
III.2 MEIOS DE CULTURA	21
III.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	23
III.3.1 Amostragem	23
III.3.2 Concentração celular	24
III.3.3 Atividade enzimática	28
III.3.4 Glicose, frutose e sorbitol	28

III.3.5 Etanol	32
III.3.6 Ácido glucônico	34
III.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	38
III.5 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO	39
III.5.1 Preparo dos inóculos	39
III.5.2 Condições de operação	41
III.6 ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO	43
III.7 METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS CÁLCULOS	45
III.7.1 Índice de floculação	45
III.7.2 Atividade enzimática	46
III.7.3 Rendimentos	46
III.7.4 Fatores de conversão	47
III.7.5 Produtividades	49
III.7.6 Velocidades	51
III.7.7 Velocidades específicas	51
III.7.8 Velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) e constante de Michaelis-Menten (K_m) para glicose-frutose oxidoredutase	51
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
IV.1 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	52
IV.1.1 Determinação da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) e da constante de Michaelis-Menten (K_m) para glicose-frutose oxidoredutase	52
IV.1.2 Determinação da temperatura ideal para glicose-frutose oxidoredutase	55
IV.1.3 Determinação do pH ideal para glicose-frutose oxidoredutase	56
IV.2 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO	59
IV.2.1 Influência da concentração inicial de substrato	59
IV.2.2 Influência da agitação	70
IV.3 ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO	83
V CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	88
ANEXO - RESULTADOS EXPERIMENTAIS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE TABELAS

II.1 - Resultados gerais, encontrados na literatura, para a fermentação de açúcares com diferentes linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .	15
II.2 - Resultados gerais, encontrados na literatura, para a produção de sorbitol e ácido glucônico por <i>Zymomonas mobilis</i> .	20
III.1 - Condições testadas nos ensaios de fermentação.	43
IV.1 - Comparação dos parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_m para diferentes linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .	55
IV.2 - Resultados experimentais obtidos ao fim dos ensaios para o estudo da influência da concentração inicial de substrato.	60
IV.3 - Resultados gerais dos ensaios realizados para o estudo da influência da concentração inicial de substrato.	60
IV.4 - Resultados experimentais obtidos ao fim dos ensaios para o estudo da influência da agitação.	70
IV.5 - Resultados gerais dos ensaios realizados para o estudo da influência da agitação.	71
IV.6 - Resultados gerais obtidos no ensaio de biotransformação.	84
A.1.1 - Variação da atividade específica (A) com a concentração inicial de glicose+frutose, a pH=6,4 e 39°C.	91
A.2.1 - Variação da atividade específica (A) com a temperatura, a pH=6,4 e concentração inicial de glicose+frutose de 288g/L.	92
A.3.1 - Variação da atividade específica (A) com o pH, a 39°C e concentração inicial de glicose+frutose de 288g/L.	93
B.1.1 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 05, frequência do agitador 70min ⁻¹).	94

B.1.2 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 18, frequência do agitador de 70min ⁻¹).	96
B.1.3 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 08, frequência do agitador de 70min ⁻¹).	98
B.1.4 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 04, frequência do agitador de 70min ⁻¹).	100
B.1.5 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 12, frequência do agitador de 70min ⁻¹).	102
B.2.1 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 17, frequência do agitador de 25min ⁻¹).	104
B.2.2 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 15, frequência do agitador de 250min ⁻¹).	106
B.2.3 - Variação das concentrações de glicose, etanol e células totais com o tempo e concentração inicial e final das células livres (Ensaio 14, frequência do agitador de 500min ⁻¹).	108
C.1 - Variação das concentrações de glicose, frutose, ácido glucônico e sorbitol com o tempo e volume da NaOH adicionado (Ensaio 23).	110

LISTA DE FIGURAS

II.1- Vias metabólicas principais em <i>Zymomonas mobilis</i> .	8
II.2- Conversão da glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, pelas enzimas glicose-frutose oxidoredutase e gluconolactonase.	10
II.3 - Esquema do mecanismo "ping-pong" para a enzima glicose-frutose oxidoredutase.	11
III.1 - Células livres de <i>Zymomonas mobilis</i> Z1-81 coradas pelo método de Gram (Aumento observado ao microscópio: 1000x).	22
III.2 - Células floculantes de <i>Zymomonas mobilis</i> Z1-81 coradas com fucsina. (Aumento observado ao microscópio: 400x).	22
III.3 - Curva de calibração para fermentações com concentração inicial de substrato até 100g/L, obtida a partir de suspensões celulares de <i>Zymomonas mobilis</i> Z1-81 em diferentes concentrações, definida pela equação: $X = ((a + 9,76 \times 10^{-4}) / 3,524)d$ com $r = 0,999$, onde "X" é concentração celular, "a" absorvância e "d" diluição da amostra.	27
III.4 - Curva de calibração para fermentações com concentração inicial de substrato entre 100 e 200g/L, obtida a partir de suspensões celulares de <i>Zymomonas mobilis</i> Z1-81 em diferentes concentrações, definida pela equação: $X = ((a + 5,53 \times 10^{-3}) / 4,047)d$ com $r = 0,999$, onde "X" é concentração celular, "a" absorvância e "d" diluição da amostra.	27
III.5 - Cromatograma típico das análises de glicose, frutose e sorbitol realizadas por cromatografia em fase líquida.	31
III.6- Cromatograma típico das análises de etanol realizadas por cromatografia em fase gasosa.	33
III.7- Cromatograma típico das análises de ácido glucônico realizadas por cromatografia em fase líquida.	37
III.8- Esquema do preparo do inóculo para os ensaios de fermentação.	40

III.9- Esquema do sistema de fermentação.	42
III.10 - Sistema de fermentação utilizado nos ensaios.	42
III.11 - Esquema do sistema de biotransformação.	44
III.12 - Sistema de biotransformação utilizado nos ensaios.	45
IV.1 - Atividade de GFOR com diferentes concentrações de glicose+frutose a 39°C a pH 6,4.	53
IV.2 - Gráfico duplo recíproco para GFOR. Glicose e frutose em mistura equimolar a 39°C e pH 6,4.	54
IV.3 - Efeito da temperatura sobre a atividade de GFOR em solução 288g/L de glicose+frutose, em pH 6,4.	56
IV.4- Efeito do pH sobre a atividade de GFOR em solução 288g/L de glicose+frutose, a 39°C.	57
IV.5 - Variação da concentração de substrato com o tempo em diferentes concentrações iniciais de glicose (S_0).	61
IV.6 - Fatores de conversão em células totais ($Y_{XT/S}$) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	62
IV.7 - Fatores de conversão em células livres ($Y_{XL/S}$, Δ) e floculantes ($Y_{XF/S}$, \square) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	63
IV.8 - Índices de floculação (i_F) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	64
IV.9 - Fatores de conversão em etanol ($Y_{P/S}$) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	65
IV.10 - Produtividades em etanol (p) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	65
IV.11 - Atividades específicas (A) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	66
IV.12 - Atividades globais de células totais (A_{GT} , \circ) e floculantes (A_{GF} , \square) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	67
IV.13 - Fatores de conversão em atividade global de células totais ($Y_{AGT/S}$, \circ) e floculantes ($Y_{AGF/S}$, \square) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	68

IV.14 - Produtividades em atividade global de células totais (pA_{GT} , ○) e floculantes (pA_{GF} , □) em função da concentração inicial de glicose (S_0).	69
IV.15 - Concentrações de células totais (Δ_{XT} , ▨) e livres (Δ_{XL} , ■) em função da frequência do agitador.	72
IV.16 - Concentrações de células floculantes (Δ_{XF}) em função da frequência do agitador.	73
IV.17 - Índices de floculação (i_F) em função da frequência do agitador.	74
IV.18 - Velocidades específicas de crescimento (μ_X , □), consumo de substrato (μ_S , Δ) e formação de etanol (μ_P , ○) em função do tempo (t).	75
IV.19 - Velocidades específicas de crescimento (μ_X) em função da variação da concentração de etanol (P).	76
IV.20 - Velocidades específicas de formação de etanol (μ_P) em função da variação da concentração de etanol (P).	77
IV.21 - Fatores de conversão em células totais ($Y_{XT/S}$, ▨) e floculantes ($Y_{XF/S}$, ■) em função da frequência do agitador.	78
IV.22 - Fatores de conversão em etanol ($Y_{P/S}$) em função da frequência do agitador.	79
IV.23 - Produtividades em etanol (p) em função da frequência do agitador.	79
IV.24 - Atividades específicas (A) em função da frequência do agitador.	80
IV.25 - Atividades globais de células totais (A_{GT} , ▨) e floculantes (A_{GF} , ■) em função da frequência do agitador.	81
IV.26 - Fatores de conversão em atividade global de células totais ($Y_{AGT/S}$, ▨) e floculantes ($Y_{AGF/S}$, ■) em função da frequência do agitador.	81
IV.27 - Produtividades em atividade global de células totais (p_{AGT} , ▨) e floculantes (p_{AGF} , ■) em função da frequência do agitador.	82
IV.28 - Variação da concentração de glicose (Δ), frutose (□), ácido glucônico (○) e sorbitol (◇) com o tempo (t).	84
IV.29 - Velocidades de formação de ácido glucônico (d_{ag}/dt) em função da variação da concentração de glicose+frutose (g/L)	86
B.1.1 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (◇) com o tempo. Ensaio 05 ($S_0 = 21,8g/L$).	95

B.1.2 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 18 ($S_0 = 61\text{g/L}$).	97
B.1.3 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 08 ($S_0 = 95\text{g/L}$).	99
B.1.4 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 04 ($S_0 = 144\text{g/L}$).	101
B.1.5 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 12 ($S_0 = 210\text{g/L}$).	103
B.2.1 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 17 ($S_0 = 100\text{g/L}$).	105
B.2.2 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 15 ($S_0 = 96\text{g/L}$).	107
B.2.3 - Variação das concentrações de glicose (Δ), etanol (\diamond) e células totais (\square) com o tempo. Ensaio 14 ($S_0 = 98\text{g/L}$).	109

NOMENCLATURA

A - atividade específica de glicose-frutose oxidoredutase (U/g);

A_{GF} - atividade global de células floculantes (U/L);

A_{GT} - atividade global de células totais (U/L);

ag_f - massa final de ácido glucônico (g);

ag_0 - massa inicial de ácido glucônico (g);

dag/dt - velocidade de produção de ácido glucônico (g/h);

dP/dt - velocidade de produção de etanol (g/(L.h));

dS/dt - velocidade de consumo de substrato (g/(L.h));

dX/dt - velocidade de crescimento de células totais (g/(L.h));

F_0 - massa inicial de frutose (g);

F_f - massa final de frutose (g);

G_0 - massa inicial de glicose (g);

G_f - massa final de glicose (g);

i_F - índice de floculação (%);

K_m - constante de Michaelis-Menten para glicose-frutose oxidoredutase (g/L);

p - produtividade em etanol (g/(L.h));

P_0 - concentração inicial de etanol (g/L);

P_f - concentração final de etanol (g/L);

pA_{GF} - produtividade em atividade enzimática global nas células floculantes (U/(L.h));

pA_{GT} - produtividade em atividade enzimática global nas células totais (U/(L.h));

p_{ag} - produtividade específica em ácido glucônico (g/(g.h));

p_{sor} - produtividade específica em sorbitol (g/(g.h));

pX_F - produtividade em células floculantes (g/(L.h));

pX_L - produtividade em células livres (g/(L.h));

pX_T - produtividade em células totais (g/(L.h));

R - rendimento em etanol (%);

R_{ag} - rendimento em ácido glucônico (%);

R_{sor} - rendimento em sorbitol (%);

S_0 - concentração inicial de glicose (g/L);

S_f - concentração final de glicose (g/L);

sor_0 - massa inicial de sorbitol (g);

sor_f - massa final de sorbitol (g);

t - tempo de fermentação (h);

U - unidade de glicose-frutose oxidoreductase (g/h);

$V_{máx}$ - velocidade máxima de reação para glicose-frutose oxidoreductase (U/g);

X_{F0} - concentração inicial de células floculantes (g/L);

X_{Ff} - concentração final de células floculantes (g/L);

X_F - massa de células floculantes (g);

X_{L0} - concentração inicial de células livres (g/L);

X_{Lf} - concentração final de células livres (g/L);

X_{T0} - concentração inicial de células totais (g/L);

X_{Tf} - concentração final de células totais (g/L);

$Y_{AGF/S}$ - conversão de glicose em atividade enzimática global nas células floculantes (U/g);

$Y_{AGT/S}$ - conversão de glicose em atividade enzimática global nas células totais (U/g);

$Y_{ag/G}$ - conversão de glicose em ácido glucônico;

$Y_{P/S}$ - conversão de glicose em etanol;

$Y_{sor/F}$ - conversão de frutose em sorbitol;

$Y_{XF/S}$ - conversão de glicose em células floculantes;

$Y_{XL/S}$ - conversão de glicose em células livres;

$Y_{XT/S}$ - conversão de glicose em células totais;

Δ_{ag} - diferença entre a concentração final e inicial de ácido glucônico (g/L);

Δ_F - diferença entre a concentração inicial e final de frutose (g/L);

Δ_G - diferença entre a concentração inicial e final de glicose (g/L);

Δ_P - diferença entre a concentração final e inicial de etanol (g/L);

Δ_S - diferença entre a concentração inicial e final de substrato (g/L);

Δ_{sor} - diferença entre a concentração final e inicial de sorbitol (g/L);

ΔX_F - diferença entre a concentração final e inicial de células floculantes (g/L);

ΔX_L - diferença entre a concentração final e inicial de células livres (g/L);

ΔX_T - diferença entre a concentração final e inicial de células totais (g/L);

μ_P - velocidade específica de produção de etanol (h^{-1});

μ_S - velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1});

μ_X - velocidade específica de crescimento de células totais (h^{-1});

$\mu_{X_{m\acute{a}x}}$ - máxima velocidade específica de crescimento de células totais (h^{-1});

RESUMO

Zymomonas mobilis produz ácido glucônico e sorbitol a partir de glicose e frutose, em reações catalisadas pelas enzimas glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e gluconolactonase. Neste processo, para a biotransformação de glicose em ácido glucônico e frutose em sorbitol, é necessário concentrar suspensões celulares, previamente cultivadas, contendo as enzimas. Isto é normalmente feito por centrifugação ou outro processo físico. Com a utilização de uma linhagem floculante, a recuperação das células poderia ser realizada pela sedimentação natural dos flocos.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo da produção de células floculantes de *Z. mobilis* Z1-81 com alta atividade em GFOR, visando sua utilização no processo de biotransformação de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente.

Foram realizados estudos sobre a cinética enzimática de GFOR para a linhagem floculante, estudos sobre a influência da concentração inicial de substrato e do estado de agitação do sistema sobre o processo de floculação, a produção de etanol e a atividade de GFOR, e estudos de avaliação da capacidade da linhagem floculante de converter glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol.

A GFOR de *Z. mobilis* Z1-81 apresenta um valor da constante de Michaelis - Menten (K_m) de aproximadamente 324g/L de glicose e frutose e da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) próximo a 10,4U/g para uma concentração de glicose+frutose em torno de 300g/L. Requer temperatura de 39°C e pH de 6,4 para alcançar a máxima atividade.

Concentrações iniciais de substrato entre 95 e 144g/L resultaram em índices de floculação (i_f) mais altos, em torno de 76%, bem como, maiores valores de conversão de substrato em células floculantes, 0,02.

A formação de etanol não é afetada pela concentração inicial de substrato, ficando os rendimentos na faixa de 90 a 92% do máximo teórico, nas condições testadas. Com concentrações de substrato mais elevadas, cerca de 210g/L, são obtidas as maiores concentrações de etanol, próximas a 100g/L.

A atividade específica em GFOR tende a aumentar com o aumento da concentração inicial de substrato, tendo sido encontrados valores entre 7,3 e 14,1U/g.

O aumento do estado de agitação do sistema favorece o crescimento celular, que chega a 3,4g/L de células totais na condição de agitação mais elevada testada. O índice de floculação, porém, é prejudicado, ficando em torno de 40 e 60%. Valores de i_f mais altos, em torno de 76%, foram obtidos sob agitação branda.

Os rendimentos em etanol não são afetados pela agitação, bem como a atividade específica em GFOR. A produtividade em etanol, por outro lado, aumenta com o aumento da agitação do sistema, tendo sido atingidos valores da ordem de 4,9g/(L.h).

Rendimentos de cerca de 95% do máximo teórico, em sorbitol e ácido glucônico, demonstram a capacidade da enzima GFOR, contida em *Z. mobilis* Z1-81, em converter eficientemente glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol. Foram obtidas, no ensaio de biotransformação, concentrações de ácido glucônico e sorbitol de 285 e 287g/L, respectivamente, com um tempo de processo inferior a 12 horas.

ABSTRACT

In the presence of glucose and fructose, *Zymomonas mobilis* produces gluconic acid and sorbitol. These reactions are catalyzed by the enzymes glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and gluconolactonase. In this process, for the biotransformation of glucose to gluconic acid and fructose to sorbitol, the concentration of a previously grown cell suspension, containing the enzymes, is needed. This is normally carried out by centrifugation or other physical methods. By using a flocculent strain, the recovery of cells could be achieved by natural sedimentation of the flocs.

The aim of this work was to study the production of flocculent cells to be used in the biotransformation of glucose and fructose in gluconic acid and sorbitol respectively.

The following studies were done: enzymatic kinetics of GFOR contained in the flocculent strain; effect of initial substrate concentration and agitation on the flocculation process, ethanol production, and GFOR activity; the ability of the flocculent strain to convert glucose and fructose to gluconic acid and sorbitol.

The enzyme glucose-fructose oxidoreductase of *Z. mobilis* Z1-81 has a Michaelis-Menten constant (K_m) of about 324g/L glucose plus fructose and a maximum reaction rate (V_{max}) around 10.4U/g at a substrate concentration of 300g/L, approximately. The maximum activity of this enzyme is reached at 39°C and pH 6.4.

An initial substrate concentration of 144g/L results in a higher flocculation yield of about 76% of total cell mass.

Ethanol production is not dependent on the initial glucose concentration, since, in any condition tested. Yields between 90 to 92% of the theoretical maximum have been obtained. With a higher substrate concentration (about 210g/L), an ethanol concentration of 100g/L, approximately, was obtained.

Specific activity of GFOR seems to increase with increasing initial substrate concentrations. In this case, values between 7.3 and 10.4U/g were found.

Increasing agitation leads to better growth yields. Using the highest agitation rates, for example, a total cell concentration of 3.4g/L was obtained. On the other hand, under these conditions, flocculation is hindered, remaining between 40 and 60% of the total cell mass. Under conditions of mild agitation, a flocculent fraction of about 76% was measured.

Ethanol yield and GFOR specific activity are not affected by agitation. Ethanol productivity, however, is higher as agitation is increased. In the best conditions, values near to 4.9g/(L.h) have been reached.

Sorbitol and gluconic acid yields of 95% of the theoretical maximum show the ability of the enzyme GFOR, contained in *Z. mobilis* Z1-81, to convert glucose and fructose efficiently to gluconic acid and sorbitol. In biotransformations, gluconic acid and sorbitol concentrations of 285 and 287g/L, respectively, were obtained in less than 12 hours of process.

I INTRODUÇÃO

Na década de 80, foram realizados diversos trabalhos considerando a potencialidade da bactéria *Zymomonas mobilis* para a produção de etanol (LYNESS e DOELLE, 1981; KING e HOSSAIN, 1982; ROGERS *et al.*, 1982; LAWFORD *et al.*, 1982; FEIN *et al.*, 1983b; DOELLE e GREENFIELD, 1985, 1989; VIKARI, 1986; MORTATTI e PARK, 1988).

À época, cogitava-se substituir as leveduras, normalmente utilizadas para este processo, por esta bactéria, considerando a capacidade de *Z. mobilis* de produzir etanol cerca de duas vezes mais rapidamente que as leveduras (ROGERS *et al.*, 1982). A utilização deste microrganismo, entretanto, era viável apenas com glicose como fonte de carbono, uma vez que, em presença de frutose ou sacarose, uma série de subprodutos eram formados, diminuindo o rendimento em etanol (VIKARI, 1984).

Em estudos sobre os carboidratos metabolizados por *Z. mobilis*, VIKARI (1984) e BARROW *et al.* (1984) verificaram que, em presença de glicose e frutose, ou sacarose, esta bactéria era capaz de produzir ácido glucônico e sorbitol.

Mais tarde, ZACHARIOU e SCOPES (1986), estudando a formação de ácido glucônico e sorbitol por *Z. mobilis*, identificaram a enzima glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) como a responsável pela conversão da glicose e frutose em gluconolactona e sorbitol, respectivamente. Na seqüência, gluconolactona é hidrolisada a ácido glucônico pela enzima gluconolactonase.

Sorbitol e ácido glucônico são produtos com várias aplicações, especialmente nas indústrias farmacêutica e de alimentos (FREITAS, 1990). Ácido glucônico é produzido por processo fermentativo com *Aspergillus niger* (HUSTEDE *et al.*, 1985). Sorbitol, por sua vez, é obtido industrialmente por via química, através da

hidrogenação catalítica de xarope de glicose, em temperaturas em torno de 150°C, com pressões entre 40 e 50atm (PHILLIPS, 1963).

Assim, a possibilidade de produzir sorbitol por via biológica com *Z. mobilis*, em condições de processo moderadas, tendo ácido glucônico como co-produto, desencadeou a realização de pesquisas visando a definição de um processo tecnicamente viável.

Em condições normais de fermentação, o ácido glucônico produzido por *Z. mobilis* é metabolizado no sentido da formação de etanol através da via de Entner-Doudoroff (VIKARI, 1984; BARROW *et al.*, 1984; SILVEIRA *et al.*, 1992). De modo a evitar o consumo do gluconato formado, CHUN e ROGERS (1988) desenvolveram um processo no qual eram utilizadas culturas concentradas de *Z. mobilis* permeabilizadas com tolueno. Com a permeabilização, as células perdiam para o meio externo cofatores essenciais para a produção de energia e, em consequência, o consumo do ácido glucônico era impedido.

Visando evitar a necessidade de permeabilização das células, SILVEIRA *et al.* (1994) desenvolveram e patentearam um processo utilizando células livres e não permeabilizadas de *Z. mobilis*, em que o consumo do gluconato não ocorria quando a concentração de substrato (glicose+frutose) era superior a 600g/L. Neste caso, o processo deve ser realizado em quatro etapas: (i) produção de células com alta atividade em GFOR, (ii) concentração das células, (iii) biotransformação dos substratos em sorbitol e ácido glucônico e (iv) recuperação dos produtos por extração com solventes.

Neste processo, o meio utilizado na etapa de produção de células é semi-sintético, com glicose como substrato. Assim, nestas condições, um etanol de alta qualidade pode ser produzido. Estudos de viabilidade econômica demonstraram que o álcool produzido tem uma participação fundamental na economia deste processo.

Um dos pontos que poderiam ser melhorados no processo biológico, é a recuperação e concentração das células contendo GFOR para uso na biotransformação. Nos trabalhos descritos na literatura, a concentração das células foi feita por

centrifugação. Numa eventual ampliação de escala, a utilização deste método encareceria o processo.

Uma alternativa, então, seria a utilização de uma linhagem floculante de *Z. mobilis*, já que, normalmente, estas linhagens apresentam alta velocidade de sedimentação (LOPES *et al.*, 1991). Neste caso, a etapa de recuperação das células seria realizada simplesmente pela sedimentação natural dos flocos.

Assim sendo, este trabalho teve por objetivo principal, estudar a produção de células floculantes de *Z. mobilis* com alta atividade em GFOR, visando sua utilização no processo de biotransformação de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente.

Neste contexto, os seguintes pontos foram abordados:

- . estudos sobre a cinética enzimática da glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) para a linhagem floculante;
- . estudos da influência da concentração inicial de substrato e do estado de agitação do sistema sobre o processo de floculação, sobre a produção de etanol e a atividade da GFOR;
- . estudos de avaliação da capacidade da linhagem floculante de converter glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, no processo de biotransformação.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 MICRORGANISMO

Zymomonas mobilis (KLUYVER e van NIEL) são bactérias gram-negativas, pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, habitantes comuns do solo e da água, normalmente encontradas em sucos de plantas tropicais, principalmente cana-de-açúcar. Possuem, de 1 a 6 µm de comprimento e 1 a 1,5 µm de largura, podendo ocorrer isoladas ou em pares, com mobilidade ou não (SWINGS e DE LEY, 1977; VIKARI, 1986). Algumas linhagens apresentam formas agregadas com poder de floculação, células em cadeia, células curvas ou filamentosas (VIKARI, 1986).

Segundo o BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY 9ª ed. (KRIEG e HOLT, 1984), o gênero *Zymomonas* apresenta uma única espécie com duas sub-espécies: *Z. mobilis* sub-espécie *mobilis* e *Z. mobilis* sub-espécie *pomaceae*.

A maioria das linhagens é capaz de crescer em pH entre 3,5 e 7,5, com uma faixa ideal entre 5,0 e 7,0, e temperatura entre 25 e 30°C. Até 38°C, 74% das linhagens conseguem crescer. Acima de 40°C, porém, o crescimento é raro (SWINGS e DE LEY, 1977).

Apesar de possuir um metabolismo fermentativo, *Z. mobilis* é capaz de crescer em condições aeróbias, sendo também classificada como anaeróbia facultativa (VIKARI, 1988). KERSTERS e DE LEY (1968) verificaram que *Zymomonas* é capaz de converter glicose, frutose e sacarose em etanol, utilizando a via metabólica de Entner-Doudoroff, normalmente constatada em microrganismos aeróbios. STOKES *et al.* (1981) sugeriram que embora possua natureza anaeróbia, é possível que o gênero *Zymomonas* descenda de organismos aeróbios que perderam algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico.

II.1.1 Floculação

Em geral, as linhagens de *Zymomonas mobilis* apresentam-se em forma de flocos, com alta velocidade de sedimentação. LOPES *et al.* (1991) pesquisaram o efeito da concentração inicial de açúcar, temperatura e pH sobre o perfil de sedimentação dos flocos. Os resultados mostraram que a influência da concentração inicial de substrato sobre o comportamento da sedimentação é significativamente maior que a da temperatura e do pH.

Em estudo realizado com três linhagens floculantes de *Z. mobilis*, Z1-81, T2 e CP1, cultivadas em diferentes substratos (LOPEZ *et al.*, 1993), demonstraram que o índice de floculação, concentração de células floculantes pela concentração de células totais, da linhagem Z1-81, era de, aproximadamente, 73% quando o meio de crescimento continha glicose. As linhagens T2 e CP1 apresentavam um índice de floculação de 52 e 22%, respectivamente, no mesmo meio.

Segundo FALCÃO DE MORAIS *et al.* (1993), a floculação em *Z. mobilis* parece estar relacionada com propriedades da parede celular. FEIN *et al.* (1983a) isolaram mutantes espontâneas das linhagens ATCC 29191 e CP4 em cultivo contínuo. Com base em observações microscópicas e estudos bioquímicos, estes autores tentaram elucidar o mecanismo de floculação em *Z. mobilis*. Os resultados demonstraram a existência de fibrilas de natureza celulósica em torno das células. Estas fibrilas seriam as responsáveis pela adesão das células e, conseqüentemente, pelo fenômeno da floculação. Verificaram, ainda, que em um mesmo cultivo de *Z. mobilis* WR6, mutante da linhagem ATCC 29191, existiam células com maior tendência a formar flocos enquanto outras se desenvolviam de forma individualizada.

Além destes trabalhos, pouco se sabe sobre o mecanismo de floculação de *Z. mobilis*.

A maior parte dos estudos sobre a floculação de microrganismos foi realizada com leveduras. Neste caso, a floculação tem relação, principalmente, com forças

iônicas. Interações proteína-proteína, proteína-carboidrato e carboidrato-carboidrato também são possíveis. A presença de determinados sais no meio, dependendo das suas concentrações, pode inibir ou provocar a floculação, enquanto que a presença de álcoois e solventes pode promover um aumento da floculação (CALLEJA, 1987).

II.1.2 Uso terapêutico

Zymomonas mobilis não é patogênica para seres humanos, animais ou plantas, possuindo, ao contrário, propriedades terapêuticas. Meios líquidos contendo determinadas linhagens de *Zymomonas* têm sido utilizados para tratamentos de distúrbios e infecções intestinais, problemas renais, cistites crônicas, vaginites, vulvovaginites e diversas infecções ginecológicas (WANICK *et al.*, 1970; WANICK e CAVALCANTI DA SILVA, 1971; SWINGS e DE LEY, 1977; FALCÃO DE MORAIS *et al.*, 1993).

II.1.3 Necessidades nutricionais

Zymomonas mobilis requer para um melhor crescimento uma série de nutrientes. Como fonte de nitrogênio, geralmente são utilizados sais de amônio, aminoácidos e peptídeos (ROGERS *et al.*, 1982). BELAICH e SENEZ (1965) demonstraram que praticamente a metade do carbono celular era derivado do substrato e a outra metade provinha de um ou mais aminoácidos, alguns dos quais, não somente serviam como fonte de nitrogênio, mas também como fonte de carbono.

Sulfatos, sulfitos, metionina, tiamina e cisteína são usualmente empregados como fonte de enxofre no meio sintético. Segundo ANDERSON e HOWARD (1974), 50% do enxofre das células é derivado de sulfato e de metionina, a origem do restante é desconhecida.

Com relação aos íons fosfato, fundamentais para a atividade catabólica das células, SENEZ e BELAICH (1965) relataram que, sob limitação de fosfato e excesso de glicose, a atividade catabólica de *Z. mobilis* era reduzida em torno de 20%. No entanto, o decréscimo da atividade catabólica era completamente e imediatamente restituído pela adição de fosfato inorgânico.

Existem evidências de que íons magnésio são importantes para prevenir a degradação do RNA e prolongar a sobrevivência das linhagens de *Zymomonas*. DAWES e LARGE (1970), verificaram que a degradação do RNA não ocorria na presença de $MgCl_2$ (33mM).

A necessidade de vitaminas parece ser variável. A maioria das linhagens de *Zymomonas* requer pantotenato e biotina como fonte de vitaminas. Existem, porém, linhagens que apresentam bom crescimento celular na presença de apenas uma destas vitaminas ou na ausência delas (VAN PEE *et al.*, 1974). Extrato de levedura, entretanto, fornece as vitaminas necessárias ao crescimento de *Z. mobilis* (FEIN *et al.*, 1983b).

II.2 VIAS METABÓLICAS PRINCIPAIS

Como citado anteriormente, *Zymomonas mobilis* utiliza, no metabolismo de carboidratos, a via de Entner-Doudoroff descrita por GIBBS e DE MOSS em 1954 e, mais tarde, confirmada por diversos autores (SWINGS e DE LEY, 1977; ROGERS *et al.*, 1982; VIIKARI, 1986).

Na Figura II.1 são mostradas as reações bioquímicas ocorridas na via de Entner-Doudoroff, os principais produtos formados a partir do piruvato, além de algumas rotas secundárias.

Glicose é transportada, quando fosforilada, pela glucoquinase constitutiva que não sofre inibição por substrato ou pelo produto final, etanol. Frutose, por sua vez, é fosforilada pela frutoquinase, enzima que é inibida pela glicose e pela glicose-6-P. A fosforilação da frutose é, então, regulada pela concentração de glicose. Na seqüência, glicose-6-P isomerase converte frutose-6-P em glicose-6-P.

A degradação da 6-P-gluconato para 2-ceto-3-deoxi-6-P-gluconato pela 6-P-gluconato desidratase e a clivagem do 2-ceto-3-deoxi-6-P-gluconato pela 2-ceto-3-deoxi-6-P-gluconato-aldolase produz um mol de piruvato e um mol de gliceraldeído-3-P.

Portanto, para cada molécula de glicose ou frutose consumida são produzidos um mol de NADPH ou NADH através da glicose-6-P desidrogenase e um mol de NADH através da gliceraldeído-3-P desidrogenase. A coenzima reduzida é amplamente reoxidada pela redução do acetaldeído a etanol pela álcool desidrogenase, e em menor grau, pela lactato desidrogenase (SWINGS e DE LEY, 1977; VIKARI, 1988).

Como produtos do catabolismo, *Z.mobilis* forma, principalmente, etanol e CO₂ e menores quantidades de lactato, acetoína, acetato, formato e glicerol.

O mecanismo da hidrólise da sacarose em *Zymomonas* não está bem definido. Tanto a invertase quanto a levanassacarase podem ser as enzimas responsáveis pela conversão da sacarose em glicose e frutose, como visto na Figura II.1 (VIKARI, 1988).

De acordo com LYNESS e DOELLE (1981), a levanassacarase é induzida durante a fase "lag" e o período subsequente de crescimento, no qual a concentração de glicose livre é menor, pois a levanassacarase é inibida por glicose e etanol.

Uma vez hidrolisada, a sacarose pode ser metabolizada através da via de Entner-Doudoroff como descrito anteriormente.

A partir de uma mistura de glicose e frutose, quantidades consideráveis de sorbitol são acumuladas no meio. Esta reação é catalisada pela enzima glicose-frutose oxidoreductase e tem como co-produto gluconolactona. Esta última substância é hidrolisada por gluconolactonase para gluconato que, por sua vez, dependendo das condições do meio, retorna à via de Entner-Doudoroff por ação de gluconato quinase (Figura II.1).

Em virtude da importância de glicose-frutose oxidoreductase para o presente trabalho, esta enzima será discutida separadamente no próximo item.

II.3 GLICOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE

Nos primeiros estudos bioquímicos sobre a produção de sorbitol e ácido glucônico por *Zymomonas mobilis*, foi proposto por LEIGH *et al.* (1984) que duas desidrogenases, atuando com um cofator desconhecido, seriam as responsáveis pela desidrogenação da glicose para formar gluconolactona e pela redução da frutose a sorbitol.

Mais tarde, ZACHARIOU e SCOPES (1986) descobriram que, como já visto no item anterior, uma única enzima, glicose-frutose oxidoreductase (GFOR), é responsável pela conversão de glicose e de frutose em gluconolactona e sorbitol, respectivamente. Gluconolactona é, posteriormente, hidrolisada a ácido glucônico pela enzima gluconolactonase (Figura II.2).

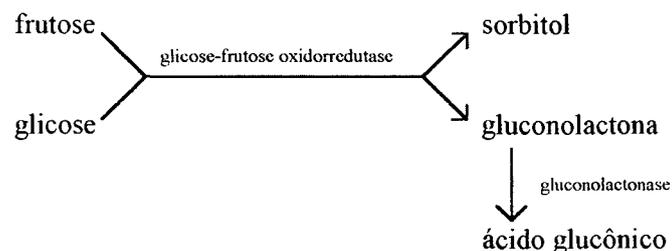
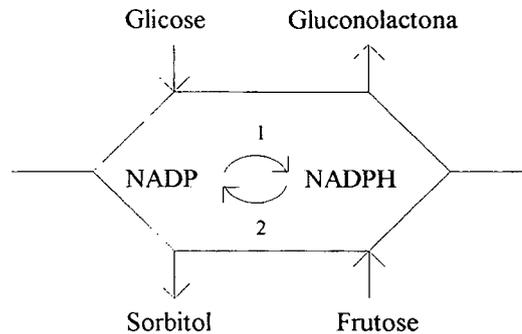


FIGURA II.2 - Conversão de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, pelas enzimas glicose-frutose oxidoreductase e gluconolactonase.

GFOR localiza-se na região periplasmática da célula, característica das bactérias gram-negativas (LOOS *et al.*, 1991). É uma proteína tetrâmica que apresenta em sua estrutura uma molécula de NADP com hidrogênio carregado, não requerendo nenhum outro cofator para sua atividade (ZACHARIOU e SCOPES, 1986). Esta enzima opera com o clássico mecanismo cinético "ping-pong" (Figura II.3) (HARDMAN e SCOPES, 1988).



- (1) - oxidação da glicose à gluconolactona pela redução do NADP à NADPH;
 (2) - reoxidação do NADPH à NADP pela entrada da frutose que é reduzida a sorbitol.

FIGURA II.3 - Esquema do mecanismo "ping-pong" para a enzima glicose-frutose oxidoreductase.

Em células intactas de *Z. mobilis*, linhagem CP1, GFOR apresenta uma velocidade máxima teórica de 17g ácido glucônico/g célula.h e um Km de 192g/L de glicose. A enzima demonstra sofrer inibição pelo substrato (glicose+frutose) a partir de 490g/L e requer energia da ordem de 30 KJ para a conversão de um mol de glicose em um mol de ácido glucônico (ERZINGER *et al.*, 1993).

ZACHARIOU e SCOPES (1986) verificaram que células de *Z. mobilis*, cultivadas em meio contendo glicose, possuíam atividades específicas de GFOR (U/mg proteína) mais altas do que aquelas cultivadas em meio com frutose ou com a mistura dos dois açúcares. Mostraram, ainda, que a atividade da GFOR aumenta com o aumento da concentração inicial de glicose.

A atividade da GFOR em *Z. mobilis* pode ser diferente dependendo da linhagem. *Z. mobilis* ATCC 29191 apresenta uma atividade específica muito mais elevada que as outras linhagens testadas, bem como um superior fator de conversão de glicose em GFOR (SILVEIRA *et al.*, 1995).

II.4 CRESCIMENTO MICROBIANO E PRODUÇÃO DE ETANOL

Em comparação com outras bactérias anaeróbias, a conversão de substrato em células de *Zymomonas mobilis* é menor. Isto se deve ao fato da via de Entner-Doudoroff fornecer somente um mol de ATP por mol de glicose (VIAKARI, 1988; ROGERS *et al.*, 1982).

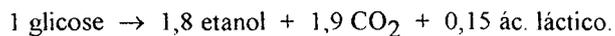
VIAKARI e KORHOLA (1986) verificaram que a conversão em células, obtida na fermentação com frutose, é geralmente a metade da obtida a partir de glicose ou da mistura de ambos os açúcares. Isto se deve, provavelmente, à perda de energia devido à formação de produtos específicos do metabolismo da frutose, à inibição do crescimento pelos metabólitos formados ou pela modificação da rota do metabolismo da frutose.

Concentrações elevadas de glicose, cerca de 200g/L, em culturas em batelada, promovem inibição do crescimento celular, devido à própria concentração de substrato e ao acúmulo do CO₂ no meio (VEERAMALLU e AGRAWAL, 1986).

LEE *et al.* (1980) observaram, para a linhagem ZM4, menores conversões de substrato em células com o aumento da concentração inicial de glicose. Para 100 e 200g/L de glicose, estes autores encontraram valores de 0,032 e 0,018 gramas de células por grama de glicose consumida, respectivamente. Observaram, ainda, que a velocidade específica de crescimento era decrescente com o aumento da concentração inicial de glicose, tendo obtido valores de 0,35 e 0,22h⁻¹, para as concentrações citadas.

A conversão de substrato em células de *Z. mobilis* varia de acordo com a linhagem. SILVEIRA *et al.* (1995) encontraram valores de 0,016g/g glicose para a linhagem Ag11 e 0,035g/g glicose para a linhagem ATCC 29191, nas mesmas condições de operação.

O rendimento em etanol na fermentação de glicose é, em média, de cerca de 95% do valor máximo teórico (VIAKARI, 1986). KLUYVER e HOPPENBROUWERS (1931) calcularam empiricamente a equação molar da fermentação da glicose para a linhagem ATCC 10988:



Equações similares foram descritas por outros autores (GIBBS e DE MOSS, 1954; BELAICH e SENEZ, 1965; DAWES *et al.*, 1966). ROGERS *et al.* (1982), entretanto, relataram a obtenção de 1,9 moles de etanol por mol de glicose, em condições anaeróbias.

O rendimento em etanol a partir de frutose é, geralmente, menor que o obtido com glicose, 88,4% do máximo teórico (Tabela II.1) (VIAKARI, 1988). Em presença de sacarose, além de etanol e CO₂, ocorre a produção de cerca de 8% de levana e 11% de sorbitol. Assim sendo, o uso deste microrganismo na produção de etanol é viável, apenas, quando glicose é utilizada como fonte de carbono (VIAKARI, 1986).

A cinética da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* foi estudada e revisada por ROGERS *et al.* (1982), VIAKARI (1986) e BUCHHOLZ *et al.* (1987), que constataram que *Z. mobilis* produz etanol a uma velocidade cerca de duas vezes maior que a das leveduras.

Segundo ROGERS *et al.* (1982), *Z. mobilis* possui propriedades interessantes para a produção de etanol:

- . a habilidade de algumas linhagens de tolerar altas concentrações de açúcar (até 400g/L);
- . a habilidade de algumas linhagens de tolerar concentrações relativamente altas de etanol (até 100g/L);
- . o potencial para menores rendimentos de biomassa e altos rendimentos de etanol com alguns açúcares.

Concentrações de glicose de 150g/L provocaram uma redução no rendimento de etanol, quando KING e HOSSAIN (1982) utilizaram *Z. mobilis* ATCC 10988 em processo batelada. Estes autores encontraram um máximo valor de rendimento em etanol com concentração de glicose de 100g/L. ROGERS *et al.* (1982) e MORTATTI e PARK (1988), porém, não observaram diferença nos rendimentos em etanol, quando utilizaram 100 e 200g/L de glicose em fermentações em batelada com *Z. mobilis*.

SWINGS e DE LEY (1977) mostraram que entre as várias linhagens de *Z. mobilis* testadas, todas cresciam na presença de 55g/L de etanol, 73% das linhagens podiam crescer em 77g/L de etanol e que 47% eram capazes de crescer em 100g/L de etanol. Acima desta concentração, porém, o etanol tornava-se um forte inibidor. Segundo BARATTI e BU'LOCK (1986), o primeiro efeito do etanol é aumentar a permeabilidade da membrana plasmática. Conseqüentemente, ocorre a perda de cofatores essenciais, coenzimas e, possivelmente, de metabólitos intermediários das células, reduzindo assim a conversão de açúcar em etanol.

A temperatura também interfere na produção de etanol. O rendimento diminui quando o processo é realizado a temperaturas em torno de 40°C. Nesta temperatura um sensível aumento na inibição pelo produto é verificado (ROGERS *et al*, 1982). MORTATTI e PARK (1988) observaram a influência da temperatura no rendimento de etanol em fermentação em batelada com *Z. mobilis* NRLL B-14022. Um rendimento de 94% do máximo teórico foi encontrado quando a concentração de glicose era de 200g/L a 30°C. A 35°C, o rendimento foi de 68,5% na mesma concentração de substrato. KING e HOSSAIN (1982), no entanto, realizaram fermentações em batelada com a linhagem ATCC 10988 a 37°C com 100 e 150g/L de glicose e obtiveram 99,2 e 85,5% de rendimento máximo teórico em etanol, respectivamente, sugerindo que a influência da temperatura varia de acordo com a linhagem.

O rendimento de etanol é constante em pH entre 5,0 e 7,5, mas decresce sensivelmente entre 7,5 e 8,0 (KING e HOSSAIN, 1982). Na maioria dos trabalhos em que bons rendimentos foram atingidos, o pH foi controlado entre 5,0 e 6,0 (Tabela II.1).

A Tabela II.1 apresenta alguns resultados dos trabalhos, desenvolvidos pelos autores citados, utilizando diferentes substratos e linhagens de *Z. mobilis*. De um modo geral, as fermentações com glicose como substrato apresentam rendimentos em etanol na ordem de 90% do máximo teórico e produtividades inferiores a 6g/(L.h). As fermentações conduzidas em regime contínuo com reciclo de células, destacam-se pelas altas produtividades em etanol, superiores a 90g/(L.h) (LAWFORD *et al.*, 1982).

TABELA II.1 - Resultados gerais, encontrados na literatura, para a fermentação de açúcares com diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis*.

Linhagem	Regime de operação	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	Conversão em células (g/g)	Rendimento ¹ (%)	Produtividade (g/(L.h))	Temperatura (°C)	pH	Referência
VTT-E-78082	batelada	glicose (148,0)	72,0	2,5	0,017	95,5	-	-	-	VIKARI, 1988
VTT-E-78082	batelada	frutose (148,0)	66,7	1,3	0,009	88,4	-	-	-	VIKARI, 1988
ATCC 10988	batelada	glicose (100,0)	50,6	-	0,012	99,2	-	37	6,3	KING e HOSSAIN, 1982
ATCC 10988	batelada	glicose (150,0)	65,4	-	0,009	85,5	-	37	6,3	KING e HOSSAIN, 1982
ZM4	batelada	glicose (100,0)	52,0	3,5	0,032	94,0	5,2	30	5,0	ROGERS <i>et al.</i> , 1982
ZM4	batelada	glicose (200,0)	94,3	3,5	0,018	96,0	5,1	30	5,0	ROGERS <i>et al.</i> , 1982
NRRL B-14022	batelada	glicose (100,0)	46,7	-	-	93,0	1,87	30	6,0	MORTATTI e PARK, 1988
NRRL B-14022	batelada	glicose (200,0)	93,6	-	-	94,0	1,87	30	6,0	MORTATTI e PARK, 1988
ZM4	batelada	glicose (200,0)	80,0	-	0,013	78,0	5,3	40,0	-	ROGERS <i>et al.</i> , 1982
NRLL B-14022	batelada	glicose (200,0)	52,8	-	-	68,5	0,88	35,0	6,0	MORTATTI e PARK, 1988
ATCC 10988	batelada	glicose (100,0)	32,7	-	0,007	64,1	-	37,0	8,0	KING e HOSSAIN, 1982
ATCC 10988	contínuo com reciclo	glicose (100,0 ³)	44,5	38,0	-	-	120,0	-	-	LAWFORD <i>et al.</i> , 1982
WR6 ²	contínuo com reciclo	glicose (130,0 ³)	60,0	35,0	-	94,0	90,0	-	-	LAWFORD <i>et al.</i> , 1982

1 - Rendimento em relação ao máximo teórico

2 - Linhagem flocculantes

3 - Concentração de alimentação

II.5 SORBITOL E ÁCIDO GLUCÔNICO

II.5.1 Aplicações

Uma das mais importantes aplicações do sorbitol é sua utilização como matéria-prima básica para a produção do ácido ascórbico. Na indústria de alimentos, o sorbitol é indicado para inibir a cristalização de açúcares, controlar a textura e aperfeiçoar o sabor do alimento. Também atua como edulcorante de corpo em produtos dietéticos, destacando-se pela sua não cariogenicidade (FREITAS, 1990).

Nos cosméticos, o sorbitol age como umectante e emoliente na produção de cremes, emulsões e loções. Sua utilização em cremes dentais proporciona plasticidade e aperfeiçoa o sabor (FREITAS, 1990):

É utilizado ainda na produção de resinas e adesivos, em galvanoplastia, e nas indústrias farmacêutica, têxtil, de papel e tabaco (MERCK INDEX, 10^a ed.).

O ácido glucônico, ou sua forma ionizada gluconato, tem sua principal aplicação na indústria de alimentos como acidulante em sorvetes, balas, xaropes, refrescos e outros. Atua, também, como aditivo em produtos derivados da carne (HUSTEDE *et al.*, 1985).

Tendo a capacidade de formar complexo com vários cátions, como por exemplo Ca^{+2} e Fe^{+2} , que possuem aplicação terapêutica no tratamento por deficiência de cálcio e ferro, o gluconato pode ser utilizado ainda na indústria farmacêutica (MILSON e MEERS, 1985; RÖHR e KUBICEK, 1981).

Ácido glucônico e seus sais são ainda utilizados para remoção de incrustações provocadas por oxidação em ferro galvanizado, ligas de magnésio ou aço inoxidável. Em concretagem, gluconato de sódio é um efetivo agente para o retardamento de cura, o que produz um concreto mais homogêneo e com maior resistência a água, gelo e rachaduras. Soluções alcalinas de gluconato de sódio, a 95-100°C, são efetivas para a rápida remoção de pintura e verniz, sem danificar a superfície (HUSTEDE *et al.*, 1985).

II.5.2 Processos convencionais de produção

A produção industrial de sorbitol é realizada, normalmente, pelo processo químico de hidrogenação catalítica de uma solução de glicose 70%, catalisada por níquel (Ni^{+2}), a uma temperatura de cerca de 150°C e pressão entre 40 e 50atm. Este processo envolve a geração e o armazenamento do H_2 produzido pela eletrólise da água. O xarope de sorbitol resultante passa por várias colunas de troca-iônica para reduzir a concentração de Ni^{+2} a níveis inferiores a 5ppm, aceitáveis na indústria de alimentos. O produto resultante apresenta contaminantes como, por exemplo, o manitol (PHILLIPS, 1963).

O ácido glucônico pode ser obtido industrialmente por processo fermentativo utilizando, principalmente, *Aspergillus niger*. Neste caso, o ácido glucônico é produzido pela desidrogenação da glicose em reação catalisada pela enzima glicose oxidase. Este processo requer altas taxas de aeração para alcançar um suprimento de oxigênio satisfatório e apresenta rendimento em ácido glucônico da ordem de 80% do valor máximo teórico (HUSTEDE, 1985; MILSON e MEERS, 1985; CHUN e ROGERS, 1988).

A primeira patente de um processo de produção de ácido glucônico em grande escala com *Aspergillus niger* data de 1932 e foi solicitada por BERNHAUER e SCHULHOF (RÖHR e KUBICEK, 1981).

II.5.3 Produção por *Zymomonas mobilis*

A possibilidade de produzir sorbitol e ácido glucônico por via biológica com *Zymomonas mobilis* desencadeou a realização de diversos estudos (LEIGH *et al.*, 1984; BARROW *et al.*, 1984; VIIKARI, 1984; CHUN e ROGERS, 1988; REHR *et al.*, 1991; SILVEIRA *et al.*, 1992).

VIIKARI (1984) verificou que em uma mistura de 75g/L de glicose e 75g/L de frutose a concentração final de sorbitol era de 17g/L, equivalente a 11% do substrato inicial.

BARROW *et al.* (1984), não observaram produção significativa de gluconato na fermentação de glicose e frutose, pois o gluconato produzido era fosforilado pela gluconato quinase e posteriormente metabolizado a etanol, como já explicado no item II.2.

SILVEIRA *et al.* (1992) estudaram a produção de sorbitol e ácido glucônico por diferentes linhagens de *Z. mobilis* em uma mistura de 60g/L de glicose e 60g/L de frutose. Verificaram que as linhagens CP1, CP4 e T2 apresentavam maior produção de sorbitol que as linhagens ATCC 10988 e Ag11. Entretanto, praticamente todo o ácido glucônico produzido era convertido em etanol durante a fermentação.

Nos trabalhos citados acima, foi utilizado o processo convencional de fermentação em batelada.

Trabalhos utilizando o processo de biotransformação, onde somente ocorre a conversão de substratos em produtos com culturas concentradas de células, também foram realizados. De modo a evitar o consumo do gluconato formado, CHUN e ROGERS (1988) desenvolveram um processo no qual culturas concentradas de *Z. mobilis* eram tratadas com tolueno a fim de permeabilizar a parede celular das células. Neste caso, as bactérias perdiam a capacidade de formar etanol e outros produtos do catabolismo devido à liberação, para o meio externo, de substâncias essenciais. Nessa pesquisa, foram testadas células livres e imobilizadas em alginato de cálcio. Verificou-se que, a partir de uma mistura de 300g/L de glicose e 300g/L de frutose, as células livres apresentaram uma conversão de substrato em sorbitol de 95,4% e em ácido glucônico de 93,6%, enquanto que as células imobilizadas apresentaram uma conversão em sorbitol de 94,3% e em ácido glucônico de 92,7%.

Em 1991, foi patenteado um processo para obtenção de sorbitol e ácido glucônico por *Z. mobilis* (BRINGER-MEYER e SAHM, 1991). No processo era utilizada uma solução de glicose e frutose como substrato e as células eram permeabilizadas pela técnica de congelamento e descongelamento.

REHR e SAHM (1992) aplicaram o mesmo conceito mas utilizando células de *Z. mobilis* permeabilizadas com detergentes, como por exemplo, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Este processo foi patenteado em 1992.

Estudos com células livres e não permeabilizadas de *Z. mobilis*, para a produção de sorbitol e ácido glucônico, foram também desenvolvidos. SILVEIRA *et al.* (1994) patentearam o processo de produção e recuperação de sorbitol e ácido glucônico ou gluconato, utilizando células livres e não permeabilizadas de *Z. mobilis*. Segundo os autores, o consumo do gluconato formado é impedido em concentrações altas de açúcares ou produtos. Esse último processo envolve quatro etapas principais:

- . produção de células com alta atividade em glicose-frutose oxidoreductase;
- . concentração da biomassa;
- . biotransformação de glicose e frutose, em concentrações somadas superiores a 600g/L, em sorbitol e ácido glucônico;
- . recuperação dos produtos por extração com solventes.

Na Tabela II.2 são resumidos alguns resultados dos trabalhos citados.

TABELA II.2 - Resultados gerais, encontrados na literatura, para produção de sorbitol e ácido glucônico por *Zymomonas mobilis*.

Treatamento das células e linhagem	Células (g/L)	Glicose e frutose (inicial) (g/L)	Etanol (g/L)	Sorbitol (g/L)	Ácido glucônico (g/L)	Rendimento em sorbitol ¹ (%)	Rendimento em ácido glucônico ¹ (%)	Referência
Permeabilização com CTAB (ATCC 29191)	14,4	105,0 + 105,0	0,8	103,0	110,0	97,0	99,0	REHR e SAHM, (1992)
Permeabilização com CTAB (ATCC 29191)	39,6	281,0 + 292,0	0,8	285,0	295,0	97,0	96,5	REHR e SAHM, (1992)
Permeabilização por congelamento e descongelamento	43,0	234,0 + 234,0	-	233,0	247,0	99,1	99,9	BRINGER-MEYER e SAHM, (1991)
Nenhum (CPI)	26,0	185,0 + 171,0	9,0	163,0	136,0	99,8 ²	68,9 ²	CDB, (1994)
Nenhum (CPI)	26,0	360,0 + 325,0	0	303,0	325,0	100,0 ²	99,5 ²	CDB, (1994)
Permeabilização com tolueno e imobilização em alginato de cálcio (ATCC 31821)	37,3	200,0 + 200,0	0	-	-	90,9	87,5	CHUN e ROGERS, (1988)
Permeabilização com tolueno (ATCC 31821)	34,9	200,0 + 200,0	2,5	-	-	93,7	90,3	CHUN e ROGERS, (1988)

1 - Rendimento em relação ao máximo teórico.

2 - Os resultados foram corrigidos em função da diluição que o meio sofre, durante o processo, pela adição de base para o controle de pH.

III MATERIAL E MÉTODOS

III.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado em todos os ensaios foi *Zymomonas mobilis* (Z1-81), linhagem floculante cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Esta linhagem foi isolada de mosto de caldo de cana-de-açúcar (FALCÃO DE MORAIS *et al.*, 1983).

A cultura era conservada em meio líquido SDL (SWINGS e DE LEY, 1977), a 4°C. Os repiques para manutenção eram feitos mensalmente. As Figuras III.1 e III.2 mostram células livres e floculantes, respectivamente, de *Z. mobilis* Z1-81.

III.2 MEIOS DE CULTURA

O meio para manutenção das culturas, SDL (SWINGS e DE LEY), tinha a seguinte composição (g/L):

glicose	20,0
extrato de levedura	5,0

O pH deste meio ficava entre 6,5 e 7,0.

Para o preparo dos inóculos e nos ensaios de fermentação, era utilizado o meio semi-sintético para *Z. mobilis* floculantes (SSF). Este meio continha (g/L):

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
Extrato de levedura	5,0

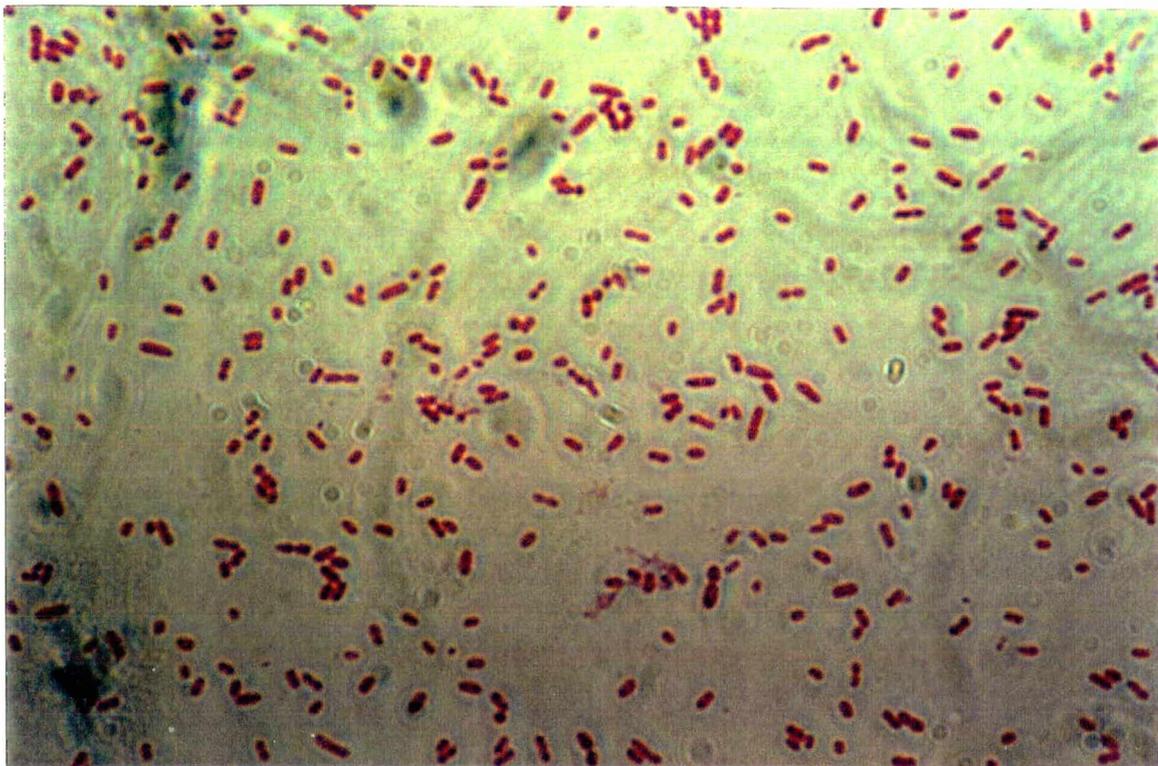


FIGURA III.1 - Células livres de *Zymomonas mobilis* Z1-81 coradas pelo método de Gram. (Aumento observado ao microscópio: 1000x)

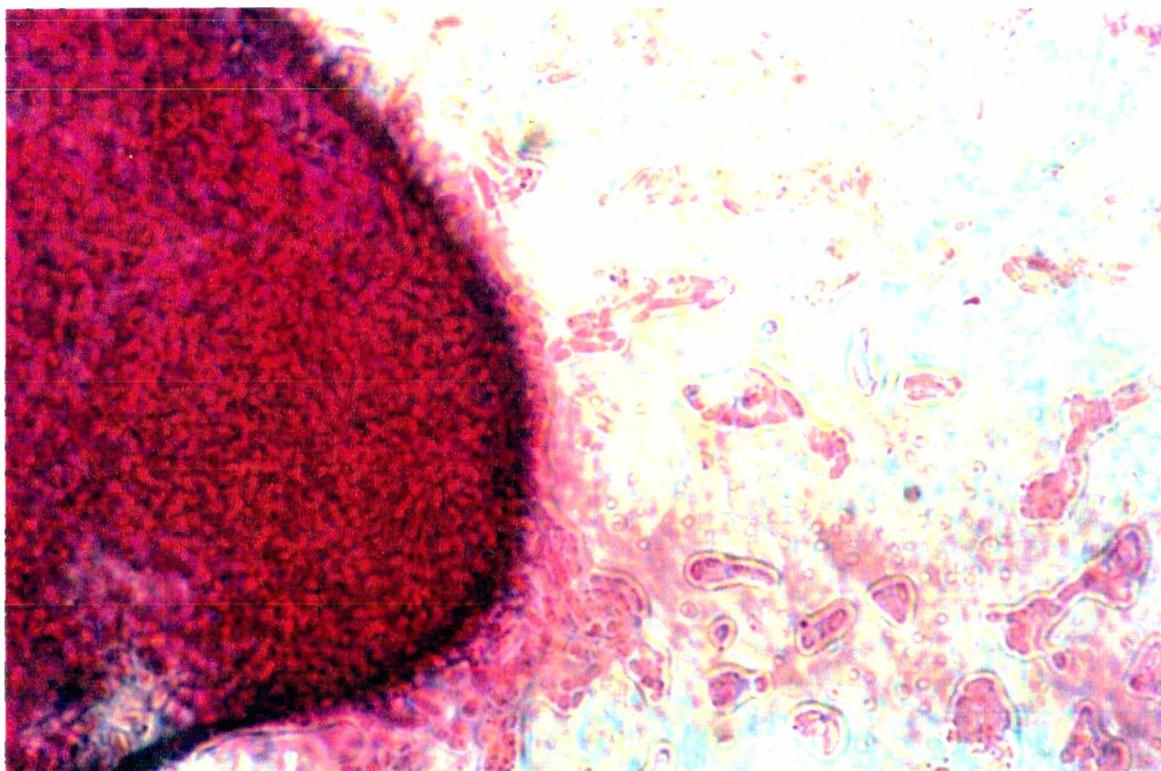


FIGURA III.2 - Células floculantes de *Zymomonas mobilis* Z1-81 coradas com fucsina. (Aumento observado ao microscópio: 400x)

Diferentes volumes de uma solução concentrada de glicose (500g/L), esterilizada separadamente, eram adicionados ao meio de forma a ter-se as concentrações desejadas. No meio utilizado para o preparo dos inóculos, a concentração de glicose era de 100g/L. Quanto aos meios de fermentação, na Tabela III.1 do item III.5.2 são mostradas as concentrações de glicose utilizadas.

No caso do preparo dos inóculos, o meio era tamponado em pH 5,5 com MES (ácido 2-[N-morfolino]etano-sulfônico)/MES-K (sal potássico), 0,2M. Nos ensaios de fermentação, o pH era mantido constante em 5,5 pela adição de NaOH 3M durante o processo.

A esterilização dos meios e da solução concentrada de glicose era feita a 121°C por 15 minutos.

III.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

III.3.1 Amostragem

Nos ensaios de fermentação, as amostras eram retiradas com o auxílio de uma bomba peristáltica, situando-se o ponto de amostragem logo acima da turbina inferior (Figura III.10). Após a inoculação, duas amostras eram retiradas. A primeira, com um volume de cerca de 10mL, destinava-se à medida da concentração de células totais e a segunda, de 5mL, era usada para a medida de células livres.

Imediatamente após a coleta, cada amostra era convenientemente preparada e diluída para a medição da absorbância de suspensões celulares. O restante do volume era centrifugado (centrífuga modelo SIGMA 3K12, B.BRAUN) a 12000min⁻¹ (12879xg) por 10 minutos, sendo o sobrenadante separado e congelado para análises posteriores de glicose e etanol.

No decorrer das fermentações apenas um volume de 5mL por amostra era retirado para análise de glicose e etanol. Uma explicação para este procedimento é apresentada no item seguinte.

Após a retirada de cada amostra, revertia-se o sentido da bomba para que o meio contido na mangueira retornasse à cuba.

Ao fim do processo fermentativo, eram retiradas amostras para medida de concentração celular, via absorvância de suspensões celulares e via peso de matéria seca, e para determinação da atividade enzimática de GFOR. Maiores detalhes sobre a coleta de amostra ao fim da fermentação são apresentados no ítem III.3.2.

Nos ensaios de biotransformação, amostras de 0,5mL foram retiradas com auxílio de uma pipeta automática e imediatamente diluídas 10 vezes para facilitar a centrifugação. Os sobrenadantes foram separados e congelados para análises posteriores de glicose, frutose, sorbitol e ácido glucônico. Não foram realizadas medidas de concentração celular.

III.3.2 Concentração celular

A concentração celular nos ensaios de fermentação era determinada de duas formas: indiretamente pela medida da absorvância de suspensões celulares e diretamente por peso de matéria seca. O procedimento completo é descrito a seguir.

No início da fermentação, como já visto, duas amostras eram retiradas do fermentador. A primeira amostra, utilizada para medir a concentração inicial de células totais, era tratada pela passagem sucessiva por uma seringa com agulha (0,9x40mm). Esse procedimento tinha por objetivo a desintegração dos flocos e a obtenção de uma suspensão homogênea para a estimativa da absorvância da suspensão celular. A segunda amostra era deixada em repouso até a sedimentação total dos flocos, medindo-se a seguir a absorvância do sobrenadante a fim de se obter a concentração inicial de células livres. A concentração inicial de células floculantes era estimada, então, pela diferença das concentrações de células totais e de células livres.

Nos ensaios com baixa agitação (inferiores a 250min^{-1}), as medidas de concentração de células, durante a fermentação, tinham um valor limitado devido à falta de homogeneidade da suspensão celular no fermentador. No entanto, o ensaio com frequência do agitador de 500min^{-1} , uma das condições testadas, por apresentar homogeneidade do meio, permitiu a realização de medidas de concentração de células totais durante a fermentação.

No final da fermentação, após a retirada de uma amostra para a medida da concentração final de células livres, a agitação era fixada em 500min^{-1} , permanecendo nesta condição por cerca de 15 minutos para garantir a homogeneidade do meio. Era coletada, então, uma amostra para medir a concentração final de células totais pelos dois métodos utilizados.

A medida da concentração final de células totais via peso de matéria seca era realizada para comprovar os resultados obtidos pelas medidas da absorbância de suspensões celulares. A concentração final de células floculantes era estimada pela diferença das concentrações de células totais e de células livres.

As medidas de absorbância eram feitas a 560nm em espectrofotômetro (modelo UV-160A, SHIMADZU) e convertidas em concentração, massa de matéria seca por unidade de volume, através de uma curva de calibração.

Para a construção das curvas de calibração, o primeiro passo era calcular a concentração da suspensão celular, da seguinte maneira:

- . 200mL da cultura de *Z. mobilis* eram coletados em quatro tubos de centrífuga de 50mL, após a homogeneização do meio pela agitação a 500min^{-1} , e centrifugados (centrífuga modelo SIGMA 3K12, B.BRAUN) a 5500min^{-1} ($5039\times g$) por 20 minutos;
- . o sobrenadante era desprezado e as células lavadas e centrifugadas duas vezes com água deionizada;

- . as células de cada tubo eram ressuspensas em 40mL de água deionizada e colocadas em quatro cadinhos de porcelana, previamente secos em estufa a 90°C e pesados em balança analítica até peso constante;
- . os cadinhos contendo a massa celular eram postos a secar por 24 horas a 90°C;
- . após este período, os cadinhos eram transferidos para vaso dessecador contendo cristais de sílica, por 30 minutos, para resfriamento;
- . os cadinhos eram pesados em balança analítica e recolocados na estufa, sendo a operação repetida até que fosse confirmada a constância das medições.

Uma vez conhecidos o volume e a massa de células, esta última obtida pela subtração do peso dos cadinhos vazios do peso dos cadinhos com células, determinava-se a concentração celular na suspensão original.

Em paralelo era executada a medida da absorvância de suspensões celulares em diferentes diluições, a fim de encontrar uma relação entre estes valores e as respectivas concentrações celulares. O procedimento era o seguinte:

- . após a ruptura dos flocos, media-se o valor da absorvância da suspensão original;
- . diluía-se a suspensão com água deionizada de forma a obter-se uma suspensão com absorvância aproximadamente igual a 0,5 a 560nm;
- . a partir desta diluição eram preparadas diluições de 1:10, 2:10, 3:10, ... até 9:10;
- . a absorvância de cada diluição era medida.

Com base nas absorvâncias das diluições e na concentração já conhecida da suspensão original, era construída uma curva de calibração, relacionando a absorvância com a concentração celular, e definida uma equação matemática que a descrevesse.

Foram construídas várias curvas de calibração tendo sido obtidos dois tipos de equação: uma para ensaios com concentrações iniciais de substrato até 100g/L (Figura III.3) e outra para concentrações entre 100 e 200g/L (Figura III.4).

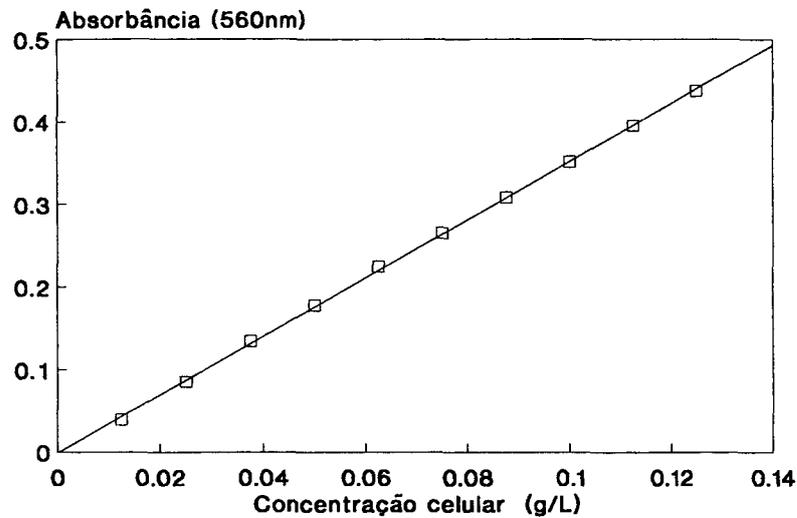


FIGURA III.3 - Curva de calibração para fermentações com concentração inicial de substrato até 100g/L, obtida a partir de suspensões celulares de *Zymomonas mobilis* Z1-81 em diferentes concentrações, definida pela equação: $X = ((a + 9,76 \times 10^{-4}) / 3,524)d$ com $r = 0,999$ e onde "X" é concentração celular, "a" absorbância e "d" diluição da amostra.

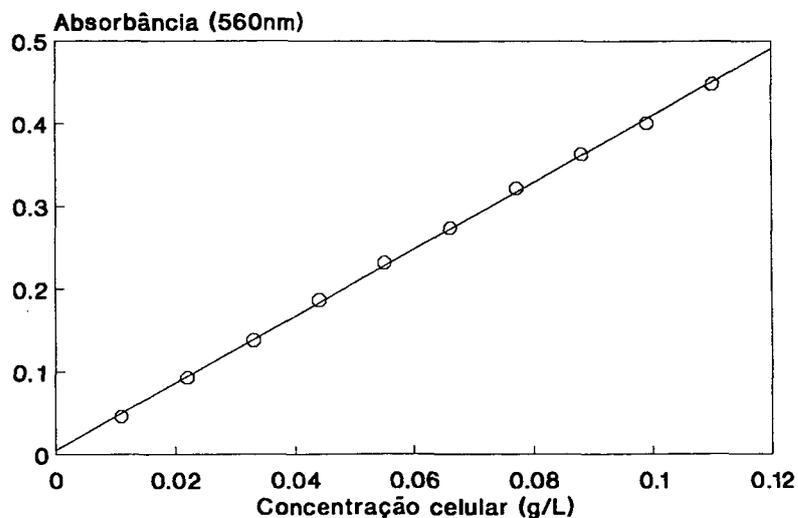


FIGURA III.4 - Curva de calibração para fermentações com concentração inicial de substrato entre 100 e 200g/L, obtida a partir de suspensões celulares de *Zymomonas mobilis* Z1-81, definida pela equação: $X = ((a + 5,53 \times 10^{-3}) / 4,047)d$ com $r = 0,999$ e onde "X" é concentração celular, "a" absorbância e "d" diluição da amostra.

III.3.3 Atividade Enzimática

A determinação da atividade da enzima glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) seguia a metodologia descrita por ERZINGER *et al.* (1993):

- . a amostra era centrifugada a 5500min^{-1} ($5039 \times g$) por 20 minutos e ressuspensa a uma concentração de 10g/L com solução tampão de MCLLVAINÉ (fosfato dissódico e ácido cítrico) (MORITA e ASSUMPÇÃO, 1983), 1,0M e pH 6,4;
- . 0,4mL desta suspensão era adicionado a 1,6mL de uma solução de glicose (180g/L) e frutose (180g/L) preparada no mesmo tampão;
- . o teste era realizado em banho termostatizado, sob agitação, a 39°C por 20 minutos;
- . transcorrido o tempo de reação, a amostra era levada a banho fervente, por um minuto, para interromper a reação;
- . o material era, então, centrifugado a 12000min^{-1} ($12879 \times g$) por 10 minutos e o sobrenadante conservado a -4°C para posterior análise de ácido glucônico produzido.

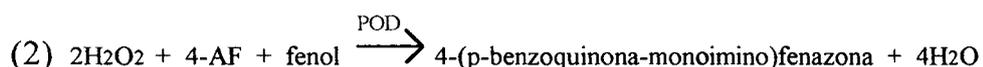
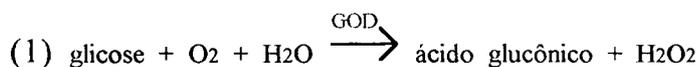
Uma unidade (U) de GFOR foi definida como a massa de ácido glucônico produzido por hora, nas condições do teste.

III.3.4 Glicose, frutose e sorbitol

A concentração de glicose, dos ensaios de fermentação, era medida pelo método Glicose-E (CELM, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos).

Neste método a glicose é oxidada pela enzima glicose-oxidase (GOD) a ácido glucônico e água oxigenada (1). Em presença de peroxidase (POD), H_2O_2 produz a copulação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF) dando lugar à formação de

um cromógeno vermelho cereja (2), cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose presente na solução em análise (TRINDER, 1969). A seqüência reacional é apresentada a seguir:



As leituras de absorvância eram feitas em espectrofotômetro (modelo UV-160A, SHIMADZU) a 505nm. O procedimento completo é descrito em seguida:

- . as amostras eram diluídas em água deionizada de modo a que fosse obtida uma solução de glicose com concentração entre 4 e 50mg/L;
- . a 1,0mL desta diluição era adicionado 1,0mL de reativo GOD-POD;
- . a mistura era incubada em estufa a 37°C por 20 minutos;
- . as medições de absorvância eram realizadas, tendo o branco uma preparação idêntica, na qual a amostra era substituída por água;
- . em paralelo com as amostras, quatro soluções padrão, contendo 4,0 , 16,0 , 32,0 e 50,0mg/L de glicose, sofriam o mesmo tratamento.

Com base nas leituras obtidas com os padrões, era definida uma equação, por regressão linear, através da qual eram calculadas as concentrações de glicose nas amostras. Todas as análises eram realizadas em duplicata para cada amostra.

As concentrações de glicose, frutose e sorbitol, nos ensaios de biotransformação, eram quantificadas por cromatografia em fase líquida (HPLC, MERCK-HITACHI) em sistema com a seguinte configuração:

- . detetor de índice de refração RID-6A (SHIMADZU);
- . bomba inteligente L-6210 (MERCK-HITACHI);
- . software modelo D-6000 (MERCK-HITACHI);
- . interface D-6000 (MERCK-HITACHI);
- . injetor automático AS-2000 (MERCK-HITACHI);
- . termostato para coluna T-6300 (MERCK-HITACHI);
- . microcomputador PC 45III (COMMODORE);

O equipamento era operado nas seguintes condições:

- . coluna - Eurokat-Pb (KNAUER);
- . diâmetro da coluna - 8,0mm;
- . comprimento da coluna - 300mm;
- . temperatura da coluna - 60°C;
- . fluxo de eluente - 0,8mL/min;
- . eluente - água destilada;
- . volume de injeção - 20 μ L;
- . padrão interno - rhamnose (3g/L).

As amostras eram convenientemente diluídas de modo que as concentrações de glicose, frutose e sorbitol estivessem entre 0,5 e 3g/L. Estas diluições eram filtradas e misturadas em proporção 1:1 (v/v) com a solução de padrão interno.

Para a análise dos picos obtidos, através do módulo do cromatógrafo, determinação das alturas e cálculo das concentrações correspondentes em g/L, era construída uma curva de calibração com seis soluções padrão contendo 0,5 , 1,0 , 1,5 , 2,0 , 2,5 e 3,0g/L de glicose, frutose e sorbitol, preparadas da mesma forma que as amostras.

Na Figura III.5 é apresentado um cromatograma típico das análises de glicose, frutose e sorbitol.

D-6000 HPLC Manager Report

Analyzed: May 2, 1995 11:06

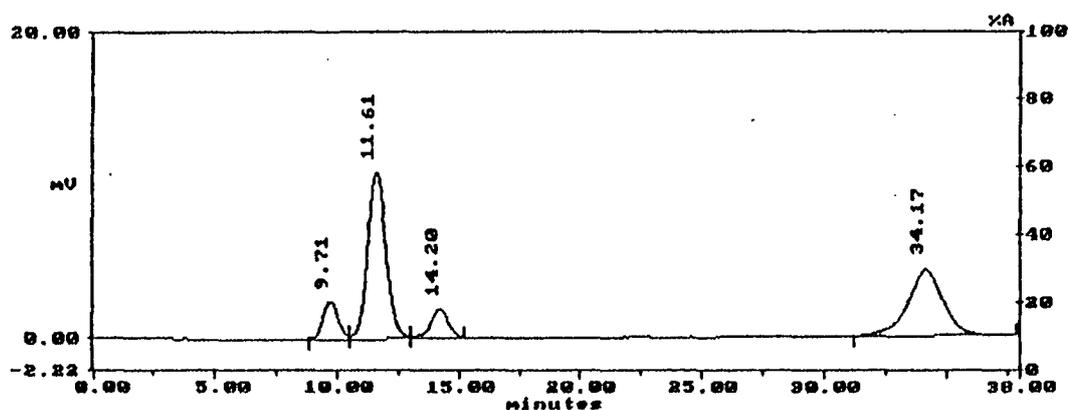
Reported: Jun 9, 1995 11:12

Method Title : Zymomonas mobilis

Method : EKPBI Data File : EKPBI003.RW Channel : 1

Sample : Z1 81 17 UMK - Inj 1 Vial No. = 8 Vol = 20 ul

Channel 1



Method Title : Zymomonas mobilis

Column Type : Eurokat Pb

Operator Name : D-6000 HPLC Manager

Solvent A :

Solvent B : H2O 60°C 0,8ml

Solvent C :

Comments : Curva de calibracao para Glicose, Frutose e Sorbitol

Detector RI SHIMADZU Coluna EUROKAT Pb - 0.5 a 3.0 g/L

Padrao Interno: Rhamnose 3g/L 27/04/95

Channel 1

Peak Quantitation : HEIGHT

Calculation Method : INT-STD

Sample Amount : 1.000

INT-STD Amount : 1.000

Scale Factor1 : 1.000

NO	RT	NAME	HEIGHT	g/L	R-FACTOR	BC	AREA
1	9.71	Glicose	2428	0.516	2.191E+00	88	93573
2	11.61	Rhamnose I	10761	1.000	1.000E+00	88	522289
3	14.20	Frutose	1833	0.528	2.868E+00	88	88416
4	34.17	Sorbitol	4358	2.273	5.413E+00	88	432643

TOTAL			19380	4.317			1136921
-------	--	--	-------	-------	--	--	---------

FIGURA III.5 - Cromatograma típico das análises de glicose, frutose e sorbitol realizadas por cromatografia em fase líquida.

III.3.5 Etanol

Etanol era quantificado por cromatografia em fase gasosa (HEWLETT PACKARD modelo 5890 series II), equipado com detetor de ionização de chama, nas seguintes condições de operação:

- . coluna - FFAP Cross-Linked (HEWLETT PACKARD);
- . diâmetro da coluna - 500 μ m;
- . comprimento da coluna - 30m;
- . temperatura da coluna - 75 a 130°C;
- . temperatura do detetor - 230°C;
- . vazão de gás de arraste (hélio) - 15mL/minuto;
- . vazão de gás de arraste (nitrogênio) - 20mL/minuto;
- . vazão de hidrogênio - 35mL/minuto;
- . vazão de oxigênio - 300mL/minuto;
- . volume de injeção - 1,0 μ L;
- . padrão interno - isobutanol (1,0 g/L).

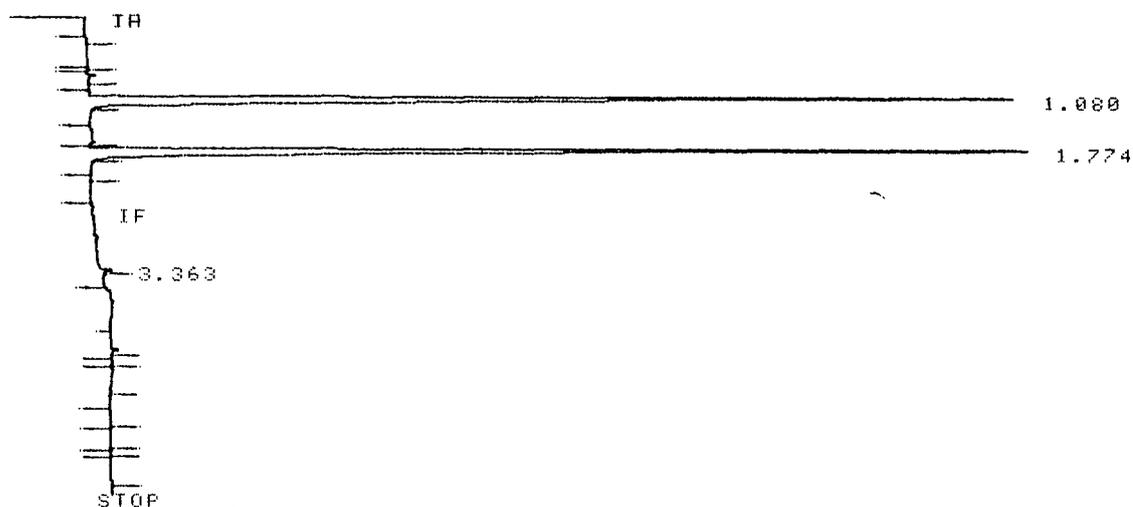
As amostras eram convenientemente diluídas de modo que as concentrações de etanol estivessem entre 0,3 e 2,0g/L. Estas diluições eram misturadas em proporção 1:1 (v/v), com a solução de padrão interno.

Para que o integrador pudesse analisar os picos obtidos através do módulo do cromatógrafo, determinar suas áreas e calcular as concentrações correspondentes em g/L, era construída uma curva de calibração com cinco soluções padrão, contendo 0,39 , 0,78 , 1,55 e 1,94 g/L de etanol, preparadas da mesma forma que as amostras.

Na figura III.6 é apresentado um cromatograma típico desta análise.

As análises apresentavam, também, resultados de acetoína e ácido acético em baixas concentrações. Estas substâncias, entretanto, não foram consideradas neste trabalho.

RUN # 21 SEP 8, 1994 13:33:51
START



RUN# 21 SEP 8, 1994 13:33:51

SAMPLE# 12

METHOD NAME: A*FERMT01.MET

ETANOL

ISTD-AREA

RT	TYPE	AREA	WIDTH	HEIGHT	CAL#	G/L	NAME
1.080	HH	95786	.061	25978	1R	1.691	ETANOL
1.774	HH	85748	.054	26254	2S		ISO-BUTANOL
3.363	HB	.3941	.222	296	3R	.016	ACETOINA

TOTAL AREA= 185475

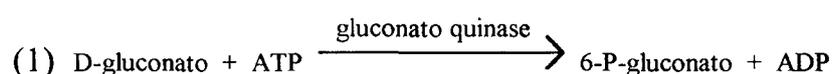
MUL FACTOR=1.0000E+00

ISTD ANT=1.0000E+00

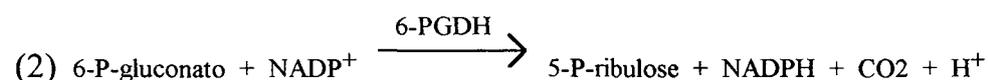
FIGURA III.6 - Cromatograma típico das análises de etanol realizadas por cromatografia em fase gasosa.

III.3.6 Ácido Glucônico

Determinou-se as concentrações de ácido glucônico, para a determinação da atividade enzimática, pelo teste enzimático BOEHRINGER-MANNHEIM. Neste teste, segundo MOELLERING e BERGMAYER (1984), o ácido D-glucônico (D-gluconato) é fosforilado por adenosina-5'-trifosfato (ATP) em presença da enzima gluconato quinase para 6-P-gluconato com formação simultânea de adenosina-5'-difosfato (ADP) (1).

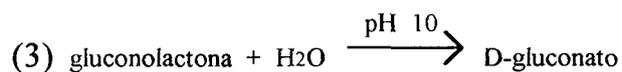


Na seqüência, em reação catalisada por 6-P-gluconato desidrogenase (6-PGDH), 6-P-gluconato é oxidado por nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) para 5-P-ribulose com a formação da nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) (2).



A quantidade de NADPH formada na reação (2) é proporcional à quantidade de D-gluconato, podendo ser determinada pela medida da absorbância a 340nm.

Após hidrólise alcalina, gluconolactona pode ser determinada (3).



Para a quantificação do ácido glucônico as amostras eram preparadas da seguinte maneira:

. 0,1mL de amostra era tratada com 0,1mL de KOH 1,1M por 30 minutos para a hidrólise da gluconolactona, eventualmente presente na amostra, a gluconato;

- . as amostras eram diluídas com água deionizada, de modo a que fossem obtidas concentrações de gluconato entre 0,1 e 0,6g/L;
- . três soluções padrão contendo 0,1 , 0,3 e 0,6g/L de gluconato de potássio eram preparadas.

O teste era realizado em sistema Microtiter Reader (SLT Lab Instruments). Este sistema utilizava uma placa com 96 cubetas de 400 μ L. Cada cubeta era preenchida da seguinte forma:

- .160 μ L de tampão trietanolamina pH 7,8 (NADP, ATP, sulfato de magnésio, estabilizantes);
- . 20 μ L de amostra ou padrão;
- . 20 μ L de enzima 6-PGDH.

A placa era mantida sob agitação por 5 minutos e, em seguida, instalada no sistema Microtiter Reader para a realização da primeira leitura. Em seguida o sistema iniciava uma contagem regressiva de 30 minutos. Neste tempo eram adicionados a cada cubeta 20 μ L da enzima gluconato quinase e a placa era colocada novamente sob agitação. Antes do término da contagem regressiva, a placa era instalada no sistema para a realização da segunda leitura. O sistema fornecia, então, as absorbâncias lidas a 340nm em cada cubeta.

Com base nas leituras obtidas com os padrões, definia-se uma equação, por regressão linear, pela qual eram calculadas as concentrações de gluconato de potássio para cada amostra.

Os resultados eram então, multiplicados por um fator de conversão, 0,838, a fim de se obter a concentração em ácido glucônico.

As concentrações de ácido glucônico, dos ensaios de biotransformação, eram quantificadas por cromatografia em fase líquida (HPLC) em aparelho com os seguintes componentes:

- . detector de índice de refração 7515A (ERC);
- . bomba inteligente L-6200 (MERCK-HITACHI);
- . termostato para coluna T-6300 (MERCK-HITACHI);
- . integrador D-2000 (MERCK-HITACHI);

O equipamento era operado nas seguintes condições:

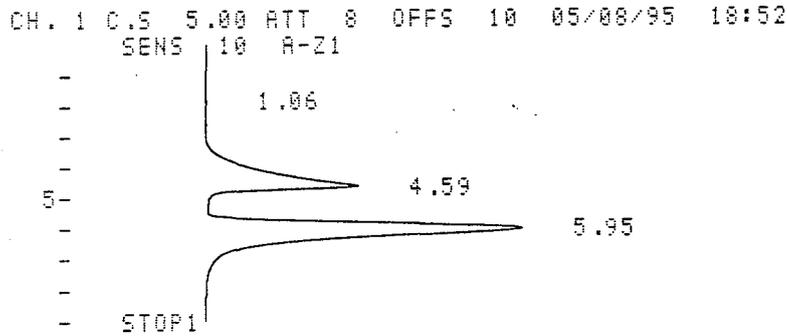
- . coluna - PRP-X300 (HAMILTON);
- . diâmetro da coluna - 4,1mm;
- . comprimento da coluna - 250mm;
- . temperatura da coluna - 50°C;
- . fluxo de eluente - 0,5mL/min;
- . eluente - água destilada;
- . volume de injeção (manual) - 20µL;
- . padrão externo.

As amostras eram convenientemente diluídas de modo que as concentrações de gluconato estivessem entre 0,5 e 1,5g/L.

Para a análise dos picos obtidos, através do módulo do cromatógrafo, determinação das alturas e cálculo das concentrações correspondentes em g/L, era construída uma curva de calibração com duas soluções padrão contendo 0,5 e 1,5g/L de gluconato de sódio, sendo realizadas três repetições para cada padrão. Os resultados eram multiplicados por um fator de conversão, 0,899, a fim de se obter a concentração em ácido glucônico.

A Figura III.7 mostra o cromatograma típico deste tipo de análise.

As concentrações de ácido glucônico, para determinação da atividade enzimática, não foram analisadas por cromatografia devido à interferência que o tampão (fosfato dissódico e ácido cítrico) tem sobre este método.



CURVA DE CALIBRACAO
 ACIDO GLICONICO - GNA
 0.5 A 1.56/L
 05/95

D-2000

05/08/95 18:52

METHOD: AC.GLIC./SOR TAG: 16 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	NAME	HEIGHT	G/L CONC	BC	AREA
2	4.59	GNA	39313	1.012	BU	1385129
3	5.95	G.F.S	81404	0.673	UB	2701473
TOTAL			120717	1.685		4086602
PEAK REJ:	10					
SF:	1.000					
SAMP-AMT:	1.000					

Onde: GNA = gluconato de sódio
 G.F.S = glicose, frutose e sorbitol

FIGURA III.7 - Cromatograma típico das análises de ácido glucônico realizadas por cromatografia em fase líquida.

III.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Foram realizados ensaios para a determinação da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$), da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da temperatura e pH ideais para a enzima glicose-frutose oxidorreductase (GFOR).

Estes ensaios tinham por objetivo conhecer os parâmetros cinéticos de *Zymomonas mobilis* Z1-81, verificar a concentração de substrato (glicose+frutose), temperatura e pH ideais para a glicose-frutose oxidorreductase, desta linhagem, a fim de confirmar as condições pré-estabelecidas por ERZINGER *et al.* (1993), para a medida da atividade enzimática, assim como, estabelecer as condições de operação do processo de biotransformação.

A técnica descrita por ERZINGER *et al.* (1993), para a determinação da atividade da glicose-frutose oxidorreductase em células íntegras de *Zymomonas mobilis*, foi utilizada nos ensaios. Detalhes sobre esta técnica são apresentados no item III.3.3.

Na avaliação da influência de cada parâmetro sobre a atividade enzimática, as demais condições eram mantidas constantes, ou seja:

- . no ensaio para determinação de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , a concentração inicial de substrato (glicose+frutose) variava entre 40 e 634g/L, enquanto o pH e a temperatura (6,4 e 39°C) eram mantidos constantes;
- . para a determinação da temperatura ideal, foram testadas temperaturas entre 25 e 48°C, mantendo-se o pH e a concentração inicial de substrato constantes (6,4 e 288g/L);
- . no ensaio para determinação do pH ideal, os valores variavam entre 4,0 e 8,0, enquanto a temperatura e a concentração inicial de substrato eram mantidas constantes (39°C e 288g/L).

III.5 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

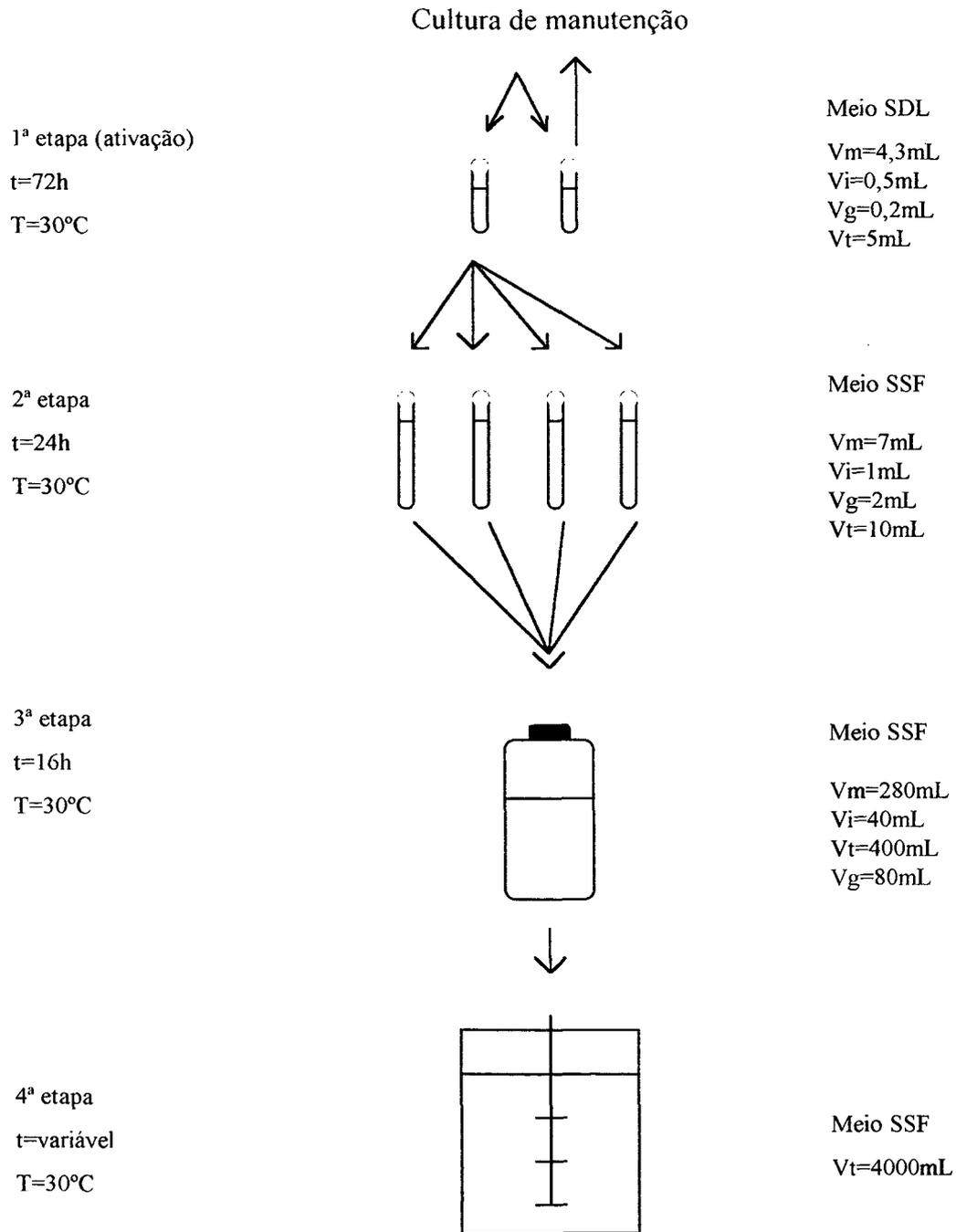
São discutidos neste trabalho, cinco ensaios referentes ao estudo da influência da concentração inicial de substrato e quatro ao estudo da influência do estado de agitação sobre o processo. Um dos ensaios foi comum aos dois grupos de experimentos. Cada ensaio teve, no mínimo, uma repetição para confirmação dos resultados.

III.5.1 Preparo dos inóculos

A partir das culturas estocadas sob refrigeração, era feita a ativação, colocando-se 0,5mL da cultura em tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo 4,5mL de meio SDL com 20g/L de glicose. Estes tubos eram incubados estaticamente a 30°C por 72h.

Tubos contendo 7mL de meio SSF e 2mL de solução 500g/L de glicose eram inoculados com 1mL da cultura ativada e incubados a 30°C por 24h. Estes tubos eram hermeticamente fechados com tampas de borracha, fixadas por um selo de alumínio, onde eram introduzidas agulhas com filtros de ar. Estes filtros tinham a função de permitir a saída do CO₂ formado durante a incubação, uma vez que nesta etapa o meio continha 100g/L de glicose, o suficiente para a produção de uma quantidade considerável de gás. Na etapa anterior esta precaução não era necessária devido à relativamente baixa concentração de glicose.

Um frasco de 500mL, com tampa rosqueada, com duas saídas laterais, uma saída superior para conectar o filtro de ar e uma saída inferior para a passagem do inóculo, contendo 280mL de meio SSF e 80mL de solução de glicose (500g/L), era inoculado com 40mL da cultura da etapa anterior e incubado a 30°C por 16h. O fermentador era, então, inoculado com 400mL desta cultura. As incubações de todas as etapas eram realizadas estaticamente. A Figura III.8 mostra o esquema do preparo do inóculo.



Onde: V_m = Volume de meio
 V_i = Volume de inóculo
 V_g = Volume da solução de glicose a 500g/L

FIGURA III.8 - Esquema do preparo do inóculo para os ensaios de fermentação.

III.5.2 Condições de operação

Todos os ensaios de fermentação em batelada simples foram realizados em fermentador de bancada (modelo BIostat MD, B.BRAUN), tendo acoplados a ele um sensor de pH (modelo 465-35-90-K9, INGOLD ELEKTRODE) e um sensor de temperatura (modelo PT 100, B.BRAUN).

A cuba de fermentação, encamisada, utilizada nos ensaios tinha um volume útil de 5 litros (160 x 250mm), sendo o volume nas fermentações de 4 litros.

Na maioria dos ensaios, o sistema possuía três turbinas, com seis pás planas. A primeira turbina situava-se imediatamente acima do anel dispersor de ar. O diâmetro das turbinas era de 63mm e a distância entre elas de 50mm. No estudo do efeito da agitação sobre o processo, em uma das condições testadas, apenas a turbina superior foi utilizada.

Na preparação do sistema, o fermentador vazio era esterilizado em autoclave a gás a 121°C por 30 minutos. O eletrodo de pH passava por um tratamento com etanol 70% e em seguida era lavado com água deionizada esterilizada e instalado no fermentador.

Após a instalação da cuba de fermentação e do eletrodo de pH no sistema, o meio e o substrato eram transferidos para a cuba com cuidados assépticos. Antes de inocular o fermentador, era introduzido nitrogênio no sistema para saturar o meio com este gás inerte. Logo que a temperatura atingia 30°C, desligava-se o fluxo de N₂ e iniciava-se a fermentação, inoculando-se o fermentador como descrito no item III.5.1.

As Figuras III.9 e III.10, mostram o esquema e uma fotografia do sistema de fermentação utilizado, respectivamente. Na Tabela III.1 são apresentadas as condições testadas nos diferentes ensaios.

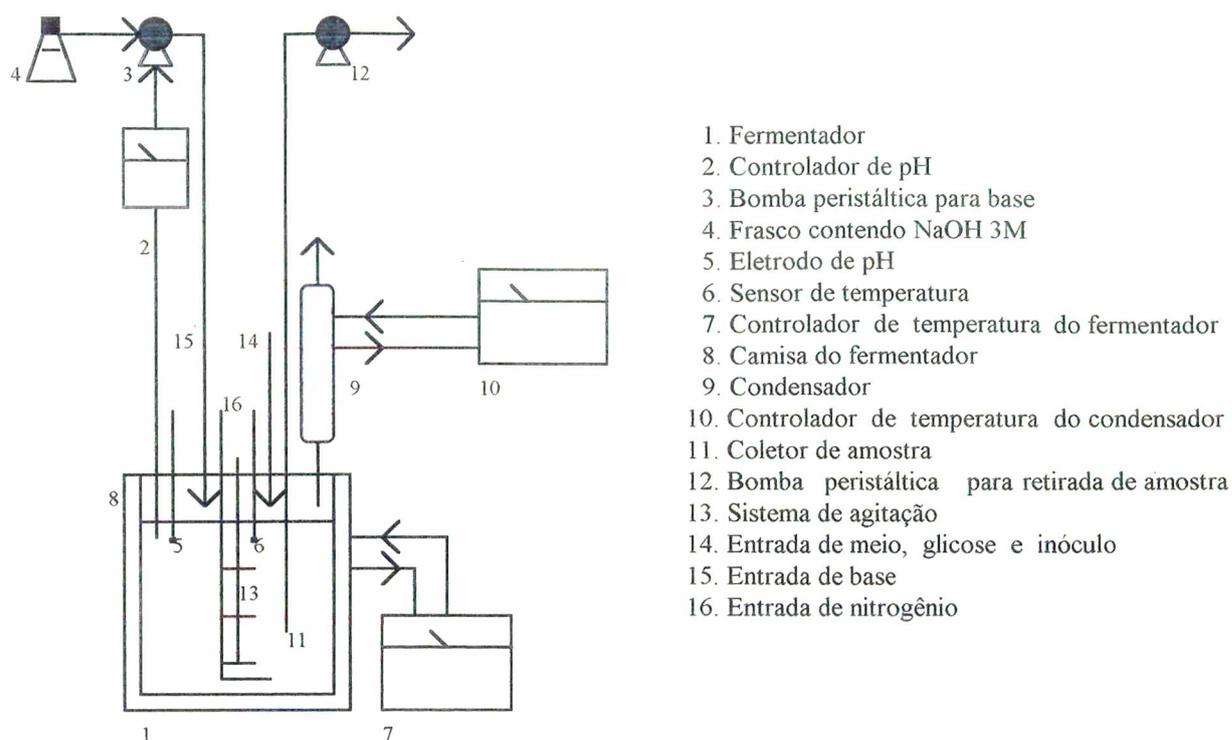


FIGURA III.9 - Esquema do sistema de fermentação.

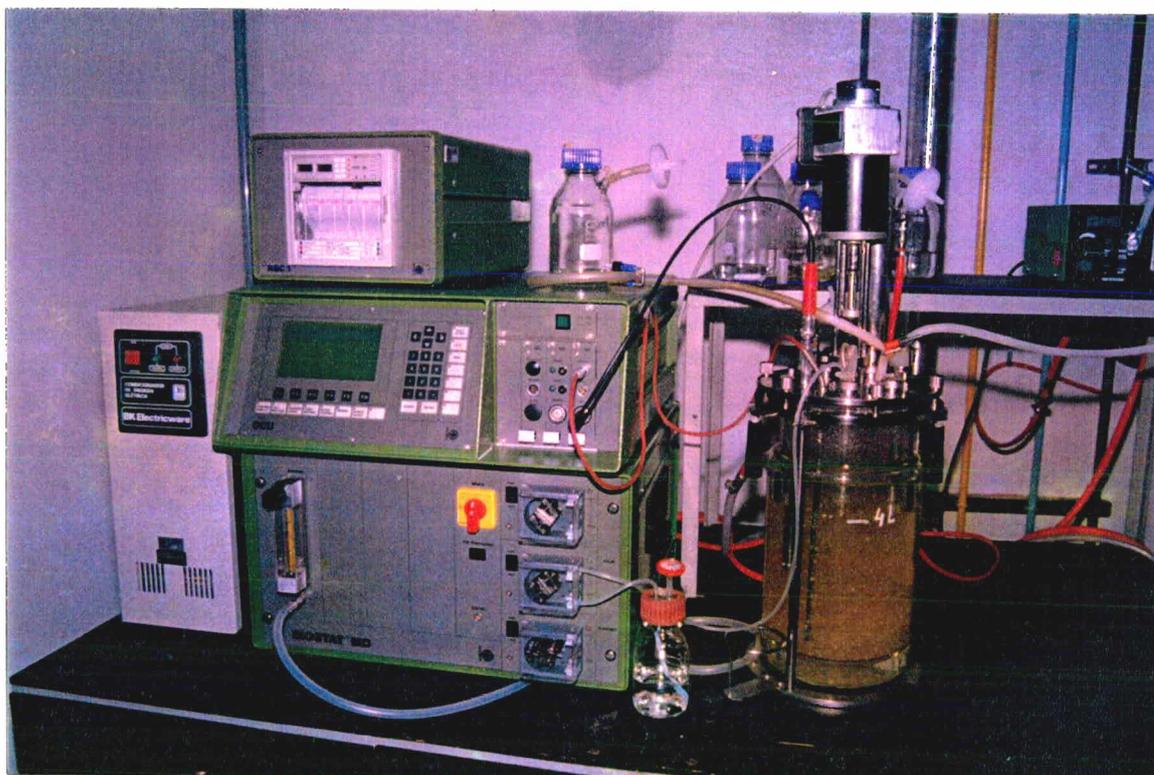


FIGURA III.10 - Sistema de fermentação utilizado nos ensaios.

TABELA III.1 - Condições testadas nos ensaios de fermentação.

Ensaio	Frequência do agitador (min ⁻¹)	Glicose (g/L)	Número de turbinas
19	70	29,8	3
18	70	61,0	3
08	70	95,0	3
04	70	144,0	3
12	70	210,0	3
17	25	100,0	1
15	250	96,0	3
14	500	98,0	3

III.6 ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Os ensaios de biotransformação tiveram por objetivo confirmar a viabilidade de utilização da linhagem floculante de *Zymomonas mobilis* Z1-81 na conversão de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente. Para confirmação dos resultados, o experimento foi realizado em duplicata.

Células floculantes de *Z. mobilis*, produzidas em reator de 4 litros, eram separadas do meio por sedimentação e, após sucessivas lavagens com água deionizada, concentradas em suspensão aquosa num volume de 100mL.

Um volume de 200mL de uma solução contendo glicose (465g/L) e frutose (465g/l) era preparada em um copo de Becher de 500mL e esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

A solução de glicose e frutose era mantida sob agitação com o auxílio de um agitador magnético situado sob o banho termostatizado, dentro do qual era colocado o copo de Becher.

Um eletrodo de pH era tratado com etanol 70% e, em seguida, lavado com água deionizada esterilizada, sendo então, instalado no sistema. O pH era mantido constante em 6,4 pela adição de uma solução de NaOH 14M contida em uma bureta ligada à bomba peristáltica do controlador de pH.

Após o sistema ter sido montado e a temperatura ter atingido 39°C, as células floculantes eram misturadas à solução de glicose e frutose dando início à biotransformação.

As Figuras III.11 e III.12 apresentam o esquema e uma fotografia do sistema de biotransformação utilizado.

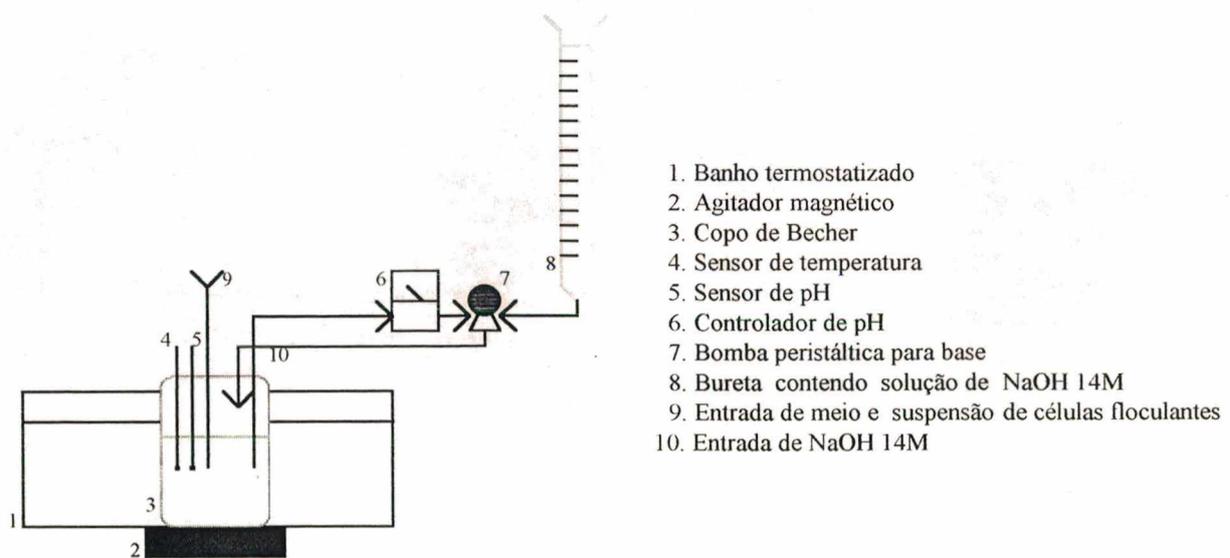


FIGURA III.11- Esquema do sistema de biotransformação.

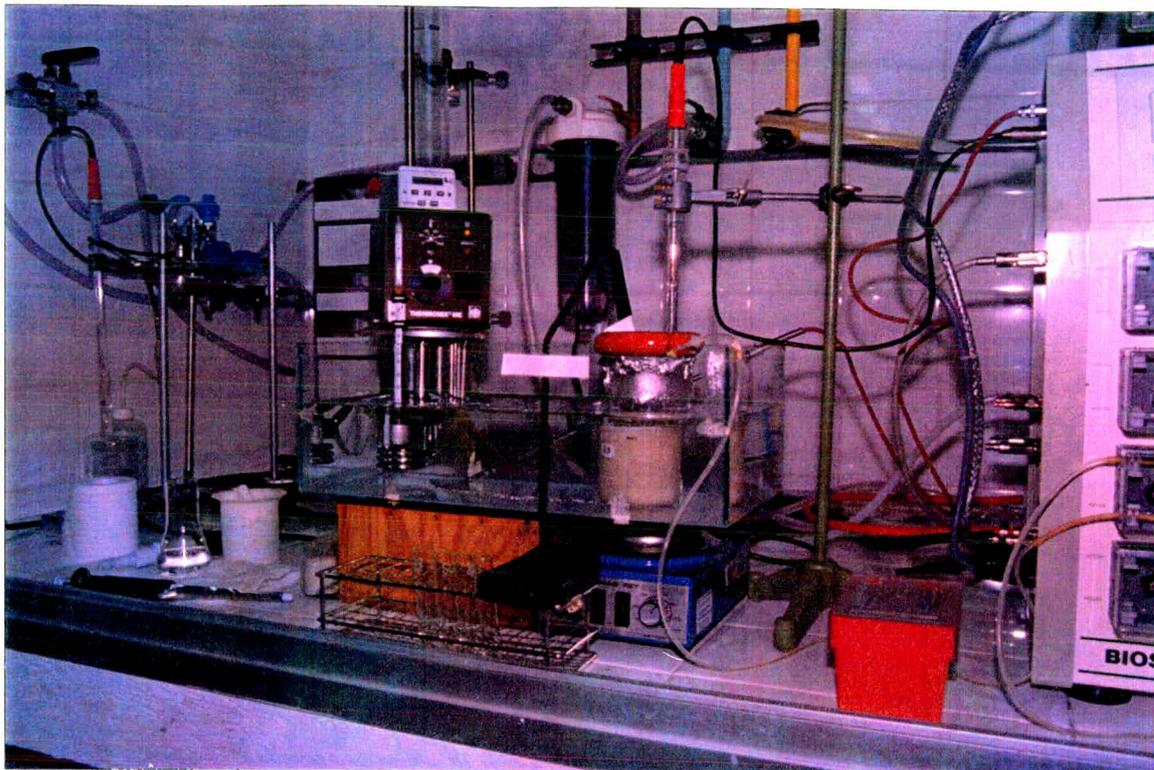


FIGURA III.12 - Sistema de biotransformação utilizado no ensaio.

III.7 METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS CÁLCULOS

III.7.1 Índice de Floculação

O índice de floculação era calculado dividindo-se a concentração final de células floculantes pela concentração final de células totais, como segue:

$$i_F = \frac{X_{Ff}}{X_{Tf}} * 100 \quad (1)$$

Onde: i_F = índice de floculação;

X_{Ff} e X_{Tf} = concentração final de células floculantes e totais (g/L), respectivamente.

III.7.2 Atividade Enzimática

A atividade específica foi definida como unidades de GFOR produzida, por grama de célula, nas condições do teste (item III.3.3).

$$A = \left[\frac{U}{g} \right] \quad (2)$$

As atividades globais de células floculantes (A_{GF}) e totais (A_{GT}), respectivamente, em U/L eram calculadas por:

$$A_{GF} = A X_{Ff} \quad (3)$$

$$A_{GT} = A X_{Tf} \quad (4)$$

III.7.3 Rendimentos

. Etanol

A partir de um mol de glicose são produzidos dois moles de etanol. Assim, para cada grama de glicose consumida forma-se, estequiometricamente, 0,51g de etanol. Assim, para o cálculo de rendimento, era utilizada a seguinte fórmula:

$$R = \frac{P_f - P_0}{(S_0 - S_f) \cdot 0,51} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde: R = rendimento em etanol (%);

P_f e P_0 = concentração final e inicial de etanol (g/L), respectivamente;

S_0 e S_f = concentração inicial e final de glicose (g/L), respectivamente.

. Sorbitol e ácido glucônico

Os cálculos de rendimentos em sorbitol e ácido glucônico eram realizados em base de massa, devido à diluição que o meio sofre pela adição de base para o controle de pH.

A partir de um mol de glicose e frutose são produzidos um mol de ácido glucônico e um mol de sorbitol, respectivamente. Assim, para cada grama de glicose e frutose consumidas formam-se, estequiometricamente, 1,09g de ácido glucônico e 1,01g de sorbitol, respectivamente. Então, para o cálculo dos rendimentos em ácido glucônico e sorbitol, as seguintes fórmulas eram utilizadas:

$$R_{ag} = \frac{ag_f - ag_0}{(G_0 - G_f) \cdot 1,09} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde: R_{ag} = rendimento em ácido glucônico (%);

ag_f e ag_0 = massa final e inicial de ácido glucônico (g), respectivamente;

G_0 e G_f = massa inicial e final de glicose (g), respectivamente.

$$R_{sor} = \frac{sor_f - sor_0}{(F_0 - F_f) \cdot 1,01} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde: R_{sor} = rendimento em sorbitol (%);

sor_f e sor_0 = massa final e inicial de sorbitol (g), respectivamente;

F_0 e F_f = massa de inicial e final de frutose (g), respectivamente.

III.7.4 Fatores de Conversão

Os fatores de conversão, nos ensaios de fermentação, foram definidos da seguinte maneira:

.conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$);

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (8)$$

.conversão de glicose em células floculantes ($Y_{XF/S}$);

$$Y_{XF/S} = \frac{X_{Ff} - X_{F0}}{S_0 - S_f} \quad (9)$$

Onde: X_{F0} = concentração inicial de células floculantes (g/L).

.conversão de glicose em células totais ($Y_{XT/S}$);

$$Y_{XT/S} = \frac{X_{Tf} - X_{T0}}{S_0 - S_f} \quad (10)$$

Onde: X_{T0} = concentração inicial de células totais (g/L).

.conversão de glicose em células livres ($Y_{XL/S}$);

$$Y_{XL/S} = \frac{X_{Lf} - X_{L0}}{S_0 - S_f} \quad (11)$$

Onde: X_{L0} e X_{Lf} = concentração inicial e final de células livres (g/L), respectivamente.

.conversão de glicose em atividade enzimática global nas células floculantes em U/g ($Y_{AGF/S}$);

$$Y_{AGF/S} = \frac{A_{GF}}{S_0 - S_f} \quad (12)$$

.conversão de glicose em atividade enzimática global nas células totais em U/g ($Y_{AGT/S}$);

$$Y_{AGT/S} = \frac{A_{GT}}{S_0 - S_f} \quad (13)$$

Os fatores de conversão no ensaio de biotransformação, foram assim definidos:

.conversão de glicose em ácido glucônico (Y_{ag} / G);

$$Y_{ag} / G = \frac{ag_f - ag_0}{G_0 - G_f} \quad (14)$$

.conversão de frutose em sorbitol (Y_{sor} / F)

$$Y_{sor} / F = \frac{sor_f - sor_0}{F_0 - F_f} \quad (15)$$

III.7.5 Produtividades

As produtividades, nos ensaios de fermentação, foram calculadas da seguinte forma:

. etanol em g/(L.h) (p):

$$p = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (16)$$

Onde: t = tempo de fermentação (h).

. células floculantes (pX_F), totais (pX_T) e livres (pX_L), respectivamente em g/(L.h):

$$pX_F = \frac{X_{Ff} - X_{F0}}{t} \quad (17)$$

$$pX_T = \frac{X_{Tf} - X_{T0}}{t} \quad (18)$$

$$pX_L = \frac{X_{Lf} - X_{L0}}{t} \quad (19)$$

. atividade enzimática global nas células floculantes (pA_{GF}) e totais (pA_{GT}), respectivamente em U/(L.h):

$$pA_{GF} = \frac{A_{GF}}{t} \quad (20)$$

$$pA_{GT} = \frac{A_{GT}}{t} \quad (21)$$

O fim da fermentação era determinado pela curva de consumo de substrato em função do tempo. Próximo ao final da fermentação, esta curva tinha um comportamento linear com o tempo, o que permitia a definição de uma equação de reta para esta porção. Era, então, atribuído o valor zero para a concentração de substrato e o tempo de fermentação era estimado.

As produtividades específicas, no ensaio de biotransformação, eram calculadas por:

. ácido glucônico em g/(g.h) (p_{ag});

$$p_{ag} = \frac{ag_f - ag_0}{X_F * t} \quad (22)$$

Onde: X_F = massa de células floculantes (g).

. sorbitol em g/(g.h) (p_{sor});

$$p_{sor} = \frac{sor_f - sor_0}{X_F * t} \quad (23)$$

III.7.6 Velocidades

As velocidades de crescimento de células totais (dX/dt), consumo de substrato (dS/dt), formação de etanol (dP/dt) e ácido glucônico (dag/dt) eram calculadas pelo método de LE DUY e ZAJIC, (1973).

Eram traçadas curvas de crescimento, variação da concentração de substrato e produto em função do tempo, com os dados experimentais. Destas curvas eram retirados os valores a serem utilizados nos cálculos. A velocidade de formação de ácido glucônico era dada em g/h e as demais velocidades em g/(L.h).

III.7.7 Velocidades Específicas

As velocidades específicas de crescimento de células totais (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e de produção de etanol (μ_P), eram obtidas dividindo-se as velocidades pela concentração de células totais. As velocidades específicas eram dadas em h^{-1} .

Para o cálculo da máxima velocidade específica de crescimento das células totais ($\mu_{Xm\acute{a}x}$), eram traçadas curvas relacionando os logaritmos neperianos das concentrações celulares, obtidas com os dados experimentais, com os seus respectivos tempos de fermentação. Neste gráfico, a fase exponencial tinha um comportamento linear, sendo o coeficiente angular desta reta, o próprio $\mu_{Xm\acute{a}x}$.

III.7.8 Velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) e constante de Michaelis-Menten (K_m) para glicose-frutose oxidoreductase

Os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram estimados através da construção de uma curva de $1/A$ em função de $1/S$, onde, A era a atividade específica em GFOR (U/g) e S a concentração de substrato, glicose+frutose (g/L), segundo LINEWEAVER-BURK (BAILEY e OLLIS, 1986). Este curva tinha um trecho linear, no qual o inverso do coeficiente linear definia o valor de $V_{m\acute{a}x}$ e o coeficiente angular o valor de $K_m/V_{m\acute{a}x}$.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios realizados. As Tabelas e Figuras, com os resultados experimentais, são mostrados no Anexo - Resultados Experimentais.

IV.1 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Neste item são discutidos três ensaios que tiveram como objetivos a determinação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima de reação) e K_m (constante de Michaelis-Menten) e a determinação da temperatura e do pH ideais para a atividade de glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) em *Zymomonas mobilis* Z1-81.

Estes ensaios não visaram aprofundar o estudo enzimático sobre esta enzima, mas sim conhecer melhor a enzima GFOR desta linhagem e, também, definir as condições experimentais a serem utilizadas nas medidas de atividade enzimática e nos ensaios de biotransformação.

IV.1.1 Determinação da velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) e da constante de Michaelis-Menten (K_m) para glicose-frutose oxidoredutase

Os testes foram realizados em diferentes concentrações equimolares de glicose e frutose em tampão McIlvaine (pH 6,4), à temperatura de 39°C. Os valores de temperatura e pH foram escolhidos por terem sido definidos como ideais para a enzima GFOR de células intactas de *Z. mobilis* CP1 (ERZINGER *et al.*, 1993) e ATCC 29191 (SILVEIRA *et al.*, 1995).

De acordo com a definição de "unidade" de GFOR (massa de ácido glucônico produzido por hora; item III.3.3), os conceitos de "atividade específica" e "velocidade" se confundem. Neste item, estas duas expressões são usadas indistintamente.

A Figura IV.1 mostra os valores de atividade específica de GFOR em função das concentrações de substrato (glicose+frutose). Foi observado um valor máximo de atividade específica próximo a 10,4 U/g para uma concentração de glicose+frutose em torno de 300g/L.

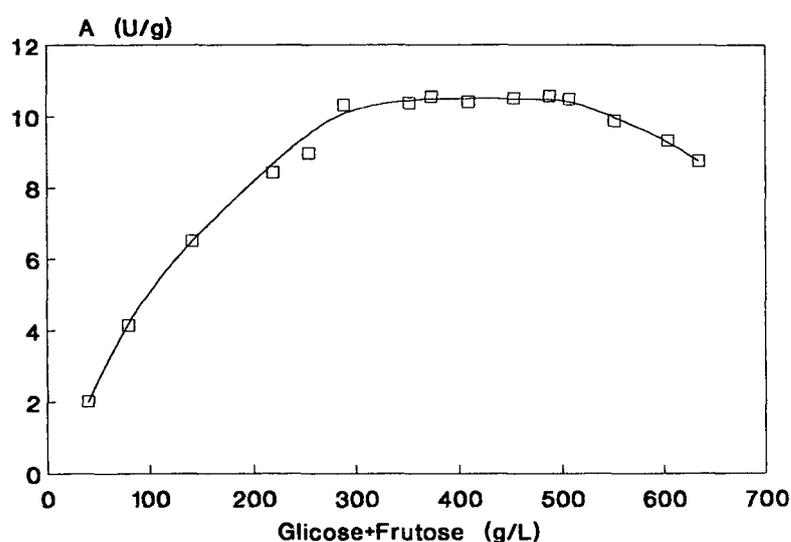


FIGURA IV.1 - Atividade de GFOR com diferentes concentrações de glicose+frutose a 39°C e pH 6,4.

O patamar existente entre 300 e 500g/L é interessante para o processo de biotransformação, uma vez que permite operar o sistema, por um maior tempo, em concentrações de substrato que levam à máxima velocidade. As linhagens CP1 (ERZINGER *et al.*, 1993) e ATCC 29191 (SILVEIRA *et al.*, 1995) não apresentam um patamar tão largo.

Os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_m foram estimados por um gráfico relacionando o inverso da atividade específica com o inverso da concentração de glicose+frutose (Figura IV.2) (BAILEY e OLLIS, 1986). A partir do trecho linear da curva mostrada na Figura IV.2, foi definida uma equação de reta ($1/A = 0,047 + 15,3 1/S$) que permitiu estimar os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m como sendo 21U/g e 324g/L de glicose+frutose, respectivamente.

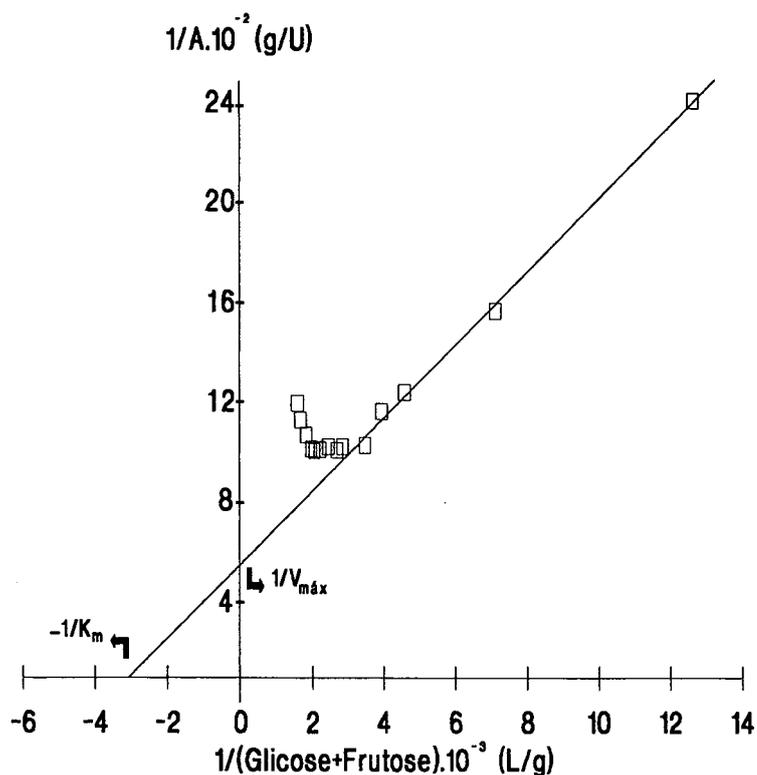


FIGURA IV.2 - Gráfico duplo recíproco para GFOR. Glicose e frutose em mistura equimolar a 39°C e pH 6,4.

A Tabela IV.1 apresenta os valores de $V_{\text{máx}}$, teórica e experimental, e de K_m calculados para Z1-81, assim como aqueles medidos para as linhagens CPI (ERZINGER *et al.*, 1993) e ATCC 29191 (SILVEIRA *et al.*, 1995).

TABELA IV.1 - Comparação dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m para diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis*.

Linhagem	K_m (g/L)	$V_{m\acute{a}x}$ teórica (U/g)	$V_{m\acute{a}x}$ experimental (U/g)
Z1-81 (floculante)	324,0	21,0	10,4
CP1 (não floculante)	384,0	17,0	10,0
ATCC 29191 (não floculante)	408,0	35,0	19,0

Este método incide, em geral, em significativos erros de medida. Apesar disto, os valores expostos na Tabela IV.1 indicam que a linhagem floculante Z1-81 apresenta um menor valor de K_m em comparação com outras linhagens, sugerindo que a GFOR de Z1-81 apresenta maior afinidade por glicose e frutose.

Verifica-se, ainda, que $V_{m\acute{a}x}$ teórica das três linhagens é praticamente o dobro das respectivas $V_{m\acute{a}x}$ experimentais e que a linhagem ATCC 29191 apresenta os maiores valores de $V_{m\acute{a}x}$ teórica e experimental.

A partir destes dados, pode-se afirmar que o patamar observado na Figura IV.1 é provocado pela inibição que o substrato (glicose+frutose) provoca sobre GFOR a partir de uma concentração próxima a 300g/L.

IV.1.2 Determinação da temperatura ideal para glicose-frutose oxidoredutase

Os testes foram realizados com temperaturas entre 25 e 48°C, em pH constante de 6,4, em solução de glicose+frutose com concentração inicial de 288g/L. Foi adotada esta concentração de substrato por ter sido a utilizada no teste enzimático descrito por ERZINGER *et al.* (1993), permitindo, assim, uma comparação com outras linhagens de *Z. mobilis*. Este valor se encontra, para a linhagem Z1-81, no início da faixa de máxima velocidade experimental.

A Figura IV.3 apresenta os valores de atividade relativa em função da temperatura e mostra que a atividade é profundamente dependente da temperatura, tendo os valores mais altos sido observados em temperatura da ordem de 39°C. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por ERZINGER *et al.* (1993) e SILVEIRA *et al.* (1995), quando mediram a atividade da GFOR em células intactas de *Z. mobilis* CP1 e ATCC 29191, respectivamente. ZACHARIOU e SCOPES (1986) também definiram a temperatura de 39°C como a ideal para a GFOR livre de *Z. mobilis* ATCC 29191.

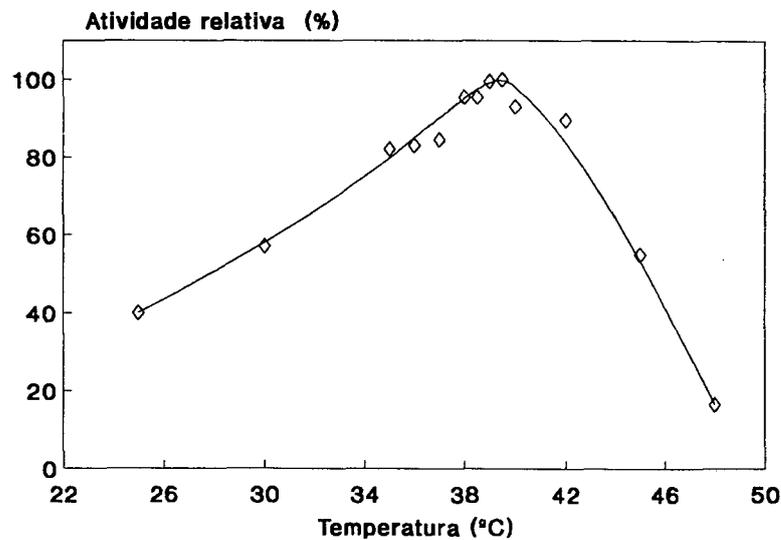


FIGURA IV.3 - Efeito da temperatura sobre a atividade da GFOR em solução 288g/L de glicose+frutose, em pH 6,4.

IV.1.3 Determinação do pH ideal para glicose-frutose oxidoredutase

Os testes foram realizados com valores de pH entre 4,0 e 8,0, em temperatura constante de 39°C, em solução de glicose+frutose com concentração inicial de 288g/L.

Na Tabela A.3.1, do Anexo, onde estão apresentados os valores de atividade específica deste ensaio, pode-se observar que em pH 6,4 o valor de A (U/g) é menor que o encontrado nos ensaios de temperatura e concentração de glicose+frutose. A prática tem mostrado que a atividade de GFOR em células de *Z. mobilis* decresce com o tempo. Assim, a redução observada deveu-se, provavelmente, ao fato de que o ensaio de pH não foi realizado no mesmo dia que os demais. Entretanto, isto não o invalida, uma vez que os resultados estão expressos em atividade relativa.

A Figura IV.4 apresenta o gráfico das atividades relativas em função do pH. De acordo com os resultados apresentados, constatou-se que os valores de pH entre 6,0 e 6,7 resultaram em atividades de GFOR mais elevadas. Fora destes limites, a atividade enzimática cai drasticamente.

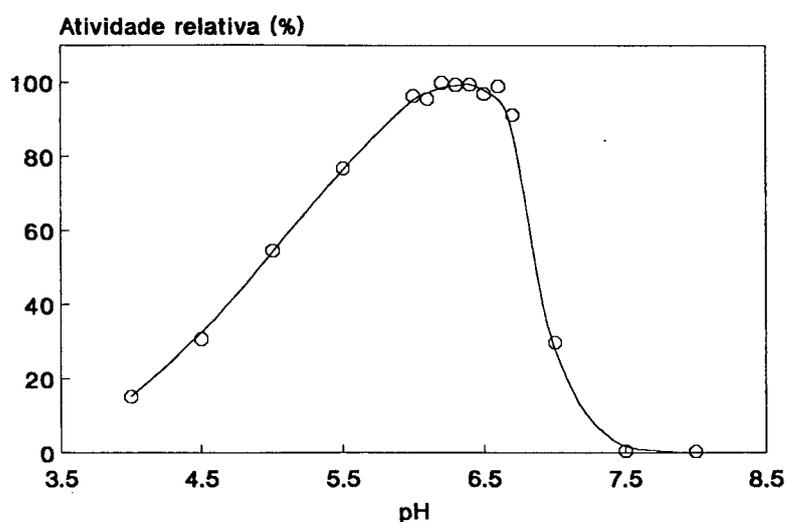


FIGURA IV.4 - Efeito do pH sobre a atividade de GFOR em solução 288g/L de glicose+frutose, a 39°C.

ERZINGER *et al.* (1993) e SILVEIRA *et al.* (1995) definiram o valor de 6,4 para o pH como o ideal para células intactas de *Z. mobilis* CP1 e ATCC 29191, respectivamente. ZACHARIOU e SCOPES (1986) definiram 6,2 como valor de pH ótimo para a GFOR livre da linhagem ATCC 29191. REHR *et al.* (1991), quando utilizaram células permeabilizadas e imobilizadas em K-carragena da linhagem ATCC 29191, verificaram maiores atividades da GFOR em pH entre 6,5 e 7,0.

De acordo com os resultados, foi verificado que os valores ideais de pH e temperatura para GFOR de *Z. mobilis* Z1-81 foram 6,4 e 39°C, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os encontrados por ERZINGER *et al.* (1993), para a linhagem CP1, ao definirem as condições de operação para a medida de atividade enzimática. Portanto, foram adotadas, no presente trabalho, as condições já definidas por estes autores para a realização das medidas da atividade enzimática (item III.3.3). Nos ensaios de biotransformação, estes valores de pH e temperatura foram, também, empregados.

IV.2 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

São discutidos, neste item, um grupo de ensaios de fermentação em batelada, dos quais cinco são referentes ao estudo do efeito da concentração inicial de substrato e quatro ao estudo do efeito da agitação sobre o processo.

Nestes ensaios, na análise dos resultados, levou-se em consideração o índice de floculação, a atividade da enzima glicose-frutose oxidoredutase contidas nas células, principalmente nas floculantes, e a formação de etanol que, no caso, se constitui num importante sub-produto do processo de produção de sorbitol e ácido glucônico.

IV.2.1 Influência da concentração inicial de substrato

Foram realizados ensaios com concentrações iniciais de substrato entre 21,8 e 210g/L, mantendo-se constantes o pH, a temperatura e a frequência do agitador em 5,5, 30°C e 70min⁻¹, respectivamente. Os valores de pH e temperatura foram escolhidos por terem sido definidos como sendo ótimos para o crescimento de *Zymomonas mobilis*, de acordo com SWINGS e DE LEY (1977). A frequência do agitador, 70min⁻¹, foi escolhida por promover uma boa agitação do meio e, simultaneamente, não provocar destruição significativa dos flocos (LOPEZ *et al.*, 1993).

Como os ensaios foram realizados a 70min⁻¹, não foi possível manter a homogeneidade dos flocos de *Z. mobilis*, prejudicando, assim, a coleta de amostras representativas para o acompanhamento da variação da concentração de células com o tempo nos diferentes ensaios. Deste modo, as velocidades específicas, essenciais para o estudo cinético de um processo fermentativo, não foram calculadas.

Na Tabela IV.2 são apresentados resultados experimentais obtidos ao fim das fermentações e na Tabela IV.3 os índices de floculação, fatores de conversão, rendimentos e produtividades calculados para este grupo de ensaios.

TABELA IV.2 - Resultados experimentais obtidos ao fim dos ensaios para o estudo da influência da concentração inicial de substrato.

Ensaio	05	18	08	04	12
ΔS (g/L)	21,8	61,0	95,0	144,0	210,0
ΔP (g/L)	10,0	29,0	45,0	68,5	100,0
ΔX_T (g/L)	0,72	1,76	2,49	2,29	2,25
ΔX_L (g/L)	0,34	0,53	0,61	0,59	1,59
ΔX_F (g/L)	0,38	1,23	1,88	1,71	0,66
A (U/g)	7,3	10,0	9,5	14,2	14,1
A_{GT} (U/L)	6,25	18,3	24,4	34,08	32,15
A_{GF} (U/L)	3,4	12,9	18,5	25,6	9,6
t (h)	8,8	12,5	12,5	21,0	88,0

TABELA IV.3 - Resultados gerais dos ensaios realizados para o estudo da influência da concentração inicial de substrato.

Ensaio	05	18	08	04	12
iF (%)	55,3	70,5	75,9	75,0	29,8
R (%)	90,2	92,1	92,1	92,1	92,1
$Y_{P/S}$	0,46	0,47	0,47	0,47	0,47
$Y_{X_T/S}$	0,033	0,029	0,026	0,016	0,011
$Y_{X_L/S}$	0,0150	0,0087	0,0064	0,0041	0,0076
$Y_{X_F/S}$	0,0170	0,0200	0,0200	0,0120	0,0031
$Y_{AGT/S}$ (U/g)	0,29	0,30	0,26	0,24	0,15
$Y_{AGF/S}$ (U/g)	0,16	0,21	0,20	0,18	0,046
p (g/(L.h))	1,14	2,32	3,60	3,30	1,14
pA_{GT} (U/(L.h))	0,71	1,46	1,95	1,62	0,36
pA_{GF} (U/(L.h))	0,39	1,03	1,48	1,22	0,11

Apesar de não ter sido possível obter os valores das velocidades específicas, tentou-se avaliar o possível efeito inibidor da concentração inicial de substrato pela variação da concentração de glicose com o tempo (Figura IV.5).

Foi observada, no ensaio com 210g/L de concentração inicial de substrato, uma forte inibição, evidenciada por uma fase "lag" de aproximadamente 50h. Por outro lado, é difícil afirmar que nos demais ensaios tenha ocorrido inibição por substrato, uma vez que o patamar existente no início da fermentação parece ser uma tendência natural do processo.

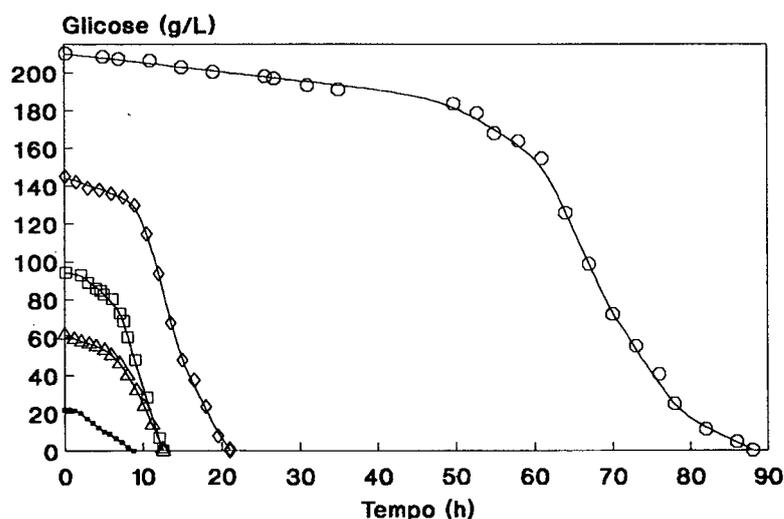


FIGURA IV.5 - Variação da concentração de substrato com o tempo com diferentes concentrações iniciais de substrato (S_0).

Como mostra a Figura IV.6, o fator de conversão em células totais ($Y_{X/T/S}$) diminui com o aumento de S_0 . Esse fato pode ser devido à própria concentração inicial de substrato, inibindo o crescimento, e/ou à inibição pelos produtos finais da fermentação, etanol e CO_2 (SWINGS e DE LEY, 1977; VEERAMALLU e AGRAWAL, 1986).

Em estudos realizados no Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (dados não publicados) com *Z. mobilis* CP1 e 29191, em concentrações de S_0 acima de 180g/L, verificou-se interrupção do crescimento celular, possivelmente devido ou à inibição pelo etanol ou à escassez de algum nutriente do meio. É provável que *Z. mobilis* Z1-81 também apresente este comportamento, podendo-se, assim, explicar os baixos valores de $Y_{X_{T/S}}$ no ensaio com $S_0 = 210\text{g/L}$.

ROGERS *et al.* (1982) observaram fatores de conversão em células livres de *Z. mobilis* ZM4 de 0,032 e 0,018 quando utilizaram 100 e 200g/L de concentração inicial de glicose, respectivamente. Isto mostra que o comportamento de *Z. mobilis*, com relação ao efeito da concentração inicial de glicose sobre o fator de conversão em biomassa, é semelhante para diferentes linhagens.

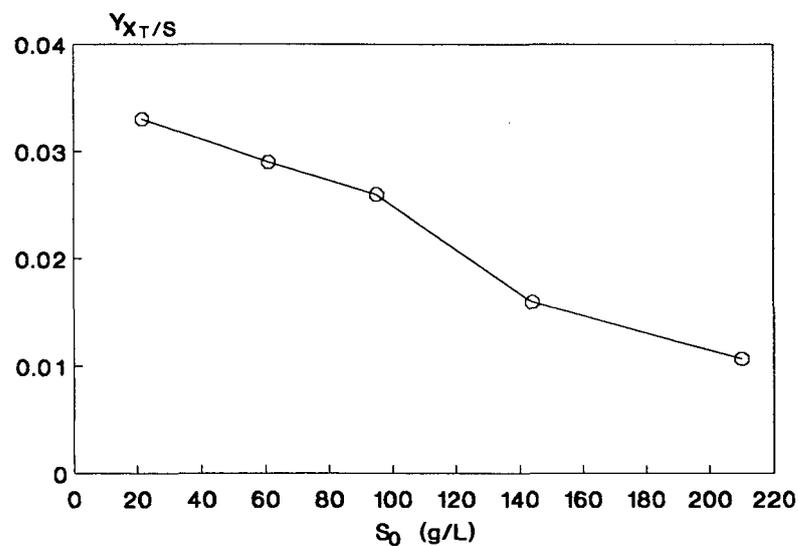


FIGURA IV.6 - Fatores de conversão em células totais ($Y_{X_{T/S}}$) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

Na Figura IV.7 são apresentados os fatores de conversão em células livres ($Y_{XL/S}$) e células floculantes ($Y_{XF/S}$). O fator de conversão em células livres diminui com o aumento de S_0 até concentrações de 144g/L. No ensaio com $S_0=210$ g/L foi observado um aumento de $Y_{XL/S}$. Maiores conversões em células floculantes foram medidas com S_0 entre 61 e 95g/L, 0,02 grama de célula por grama de substrato consumido. A definição desta faixa é importante, uma vez que no processo de biotransformação de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, apenas as células floculantes são utilizadas.

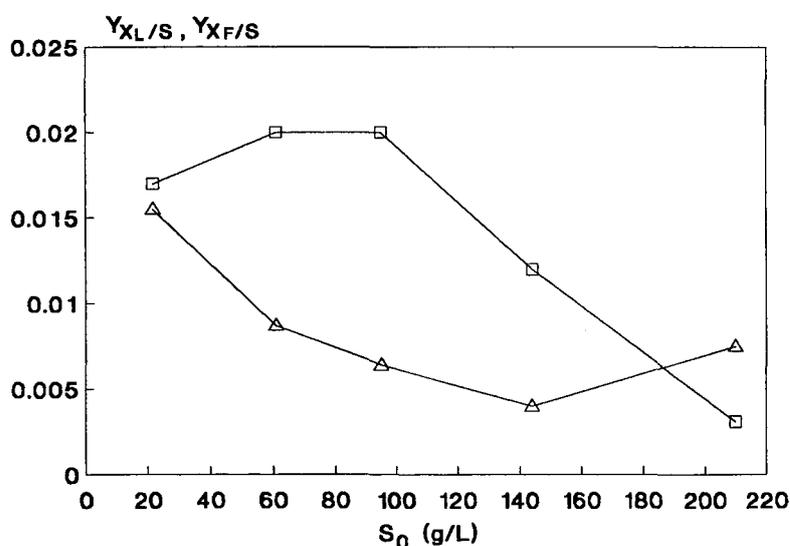


FIGURA IV.7 - Fatores de conversão em células livres ($Y_{XL/S}$, Δ) e floculantes ($Y_{XF/S}$, \square) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

Os maiores índices de floculação (i_F), 75,9 e 75%, foram obtidos nos ensaios com concentrações iniciais de glicose de 95 e 144g/L, respectivamente (Figura IV.8). Resultados semelhantes foram encontrados por LOPEZ *et al.* (1993), quando utilizaram *Z. mobilis* Z1-81 nas mesmas condições de operação. De acordo com a Figura IV.8, observa-se uma sensível queda de i_F no ensaio com $S_0=210$ g/L, devido à alta concentração de células livres no meio.

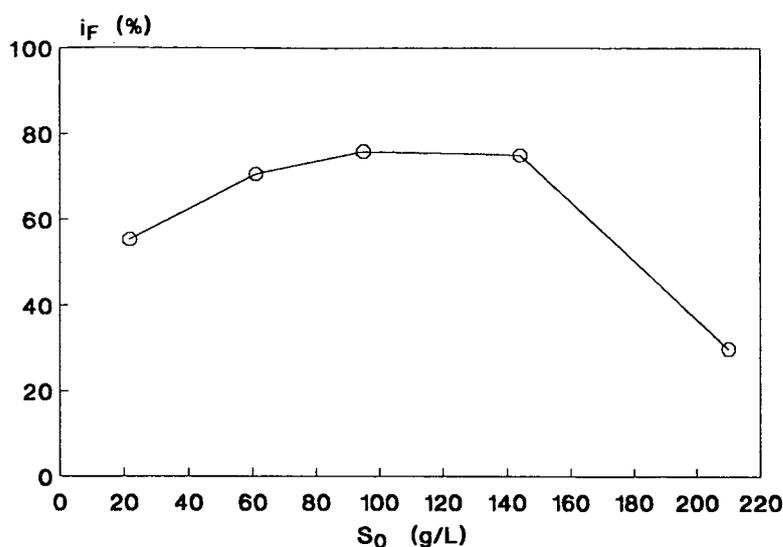


FIGURA IV.8 - Índices de floculação (i_F) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

Não foram observadas diferenças significativas nos fatores de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$), com qualquer dos valores de S_0 testados, como mostra a Figura IV.9. Valores semelhantes de $Y_{P/S}$ foram encontrados por ROGERS *et al.* (1982) e MORTATTI e PARK (1988), com *Z. mobilis* ZM4 e NRLL B-14022, respectivamente, em fermentações em batelada com concentração inicial de glicose de 100 e 200g/L, a 30°C. Esta constância pode ser devida ao fato de que etanol é o produto principal do catabolismo de glicose por *Z. mobilis*, estando sua formação diretamente relacionada com a reoxidação de coenzima (NADPH) a ser utilizada para a produção de ATP na via de Entner-Doudoroff.

A análise conjunta dos resultados mostrados nas Figuras IV.6 e IV.9, $Y_{X/T/S}$ decrescente com o aumento de S_0 e $Y_{P/S}$ constante, deixa dúvidas com relação ao destino de parte do substrato nestes ensaios. Quanto aos demais produtos do catabolismo de glicose, ainda que não seja proposta deste trabalho discutí-los, não foram verificadas, pelas análises cromatográficas das amostras destes ensaios, concentrações importantes de ácido acético e acetoína.

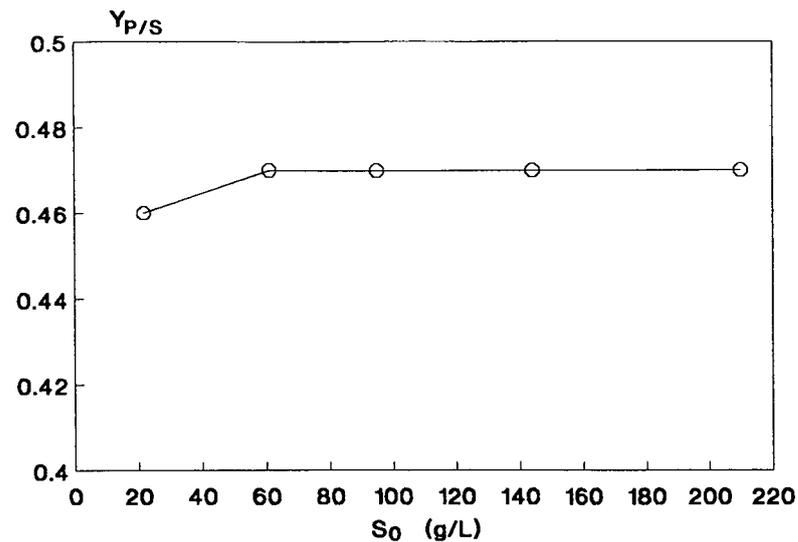


FIGURA IV.9 - Fatores de conversão em etanol ($Y_{P/S}$) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

A Figura IV.10 mostra as produtividades em etanol em função de S_0 . Sendo etanol um produto importante para a economia do processo, uma especial atenção é dada ao ensaio com $S_0=95\text{g/L}$, o qual apresenta a maior produtividade $3,5\text{g/(L.h)}$. ROGERS *et al.* (1982) alcançaram produtividade de $5,2\text{g/(L.h)}$ e MORTATTI e PARK (1988) de $1,87\text{g/(L.h)}$, quando utilizaram *Z. mobilis* ZM4 e NRRL B-14022, respectivamente, nas mesmas condições de operação, sugerindo que a produtividade em etanol está relacionada com a linhagem utilizada.

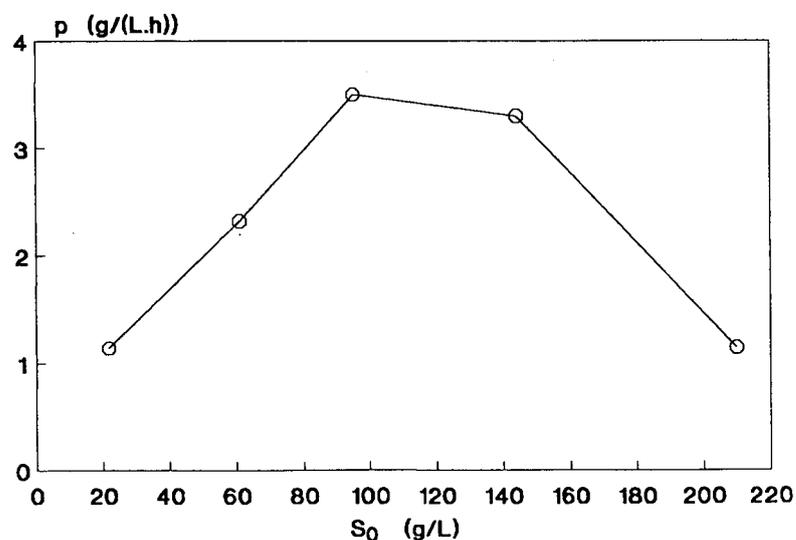


FIGURA IV.10 - Produtividades em etanol (p) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

Apesar da relativamente alta produtividade em etanol do ensaio com $S_0=95\text{g/L}$, a concentração final deste produto, 45g/L (Tabela IV.3), é ainda baixa para a operação de um sistema de destilação de forma econômica. Neste aspecto, destaca-se a concentração de álcool, 100g/L , no ensaio com $S_0=210\text{g/L}$, ainda que a produtividade ($1,14\text{ g/(L.h)}$) tenha sido quase 70% menor.

Como já foi discutido neste capítulo, não se sabe ao certo a utilização dada pelas células à parte do substrato consumido durante as fermentações nestes ensaios. Foi observado, porém, que a atividade específica (A) em glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) tende a aumentar com o aumento de S_0 (Figura IV.11), confirmando os resultados de ZACHARIOU e SCOPES (1986). Este aumento sugere, então, que parte do substrato poderia estar sendo utilizado para a produção de GFOR, embora não seja possível afirmar com certeza, visto que a quantificação da enzima é feita por medida de atividade e não de concentração.

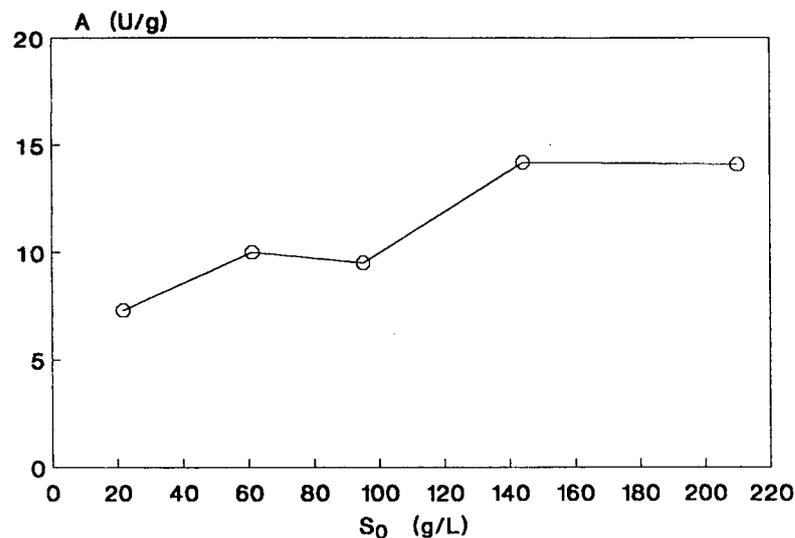


FIGURA IV.11 - Atividades específicas (A) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

Por ser a enzima GFOR considerada como produto, tornou-se interessante saber qual a atividade enzimática global de células totais (A_{GT}) e floculantes (A_{GF}) obtidas ao fim da fermentação. Foram realizados ensaios prévios de atividade enzimática e verificou-se que as atividades específicas de células totais, livres e floculantes não variavam entre si. Assim sendo, foi possível obter os valores de A_{GT} e A_{GF} multiplicando-se A por X_{Tf} e X_{Ff} , respectivamente.

A Figura IV.12 apresenta as atividades globais de células totais (A_{GT}) e floculantes (A_{GF}) em função da concentração inicial de glicose. Observa-se que A_{GT} e A_{GF} aumentam com o aumento de S_0 até 144g/L. Com $S_0=210$ g/L, A_{GT} mantém-se, aproximadamente, no mesmo valor que no ensaio com $S_0=144$ g/L, já que as atividades específicas e concentrações celulares finais foram praticamente idênticas em ambos experimentos. Com relação a A_{GF} , verificou-se, com $S_0=210$ g/L, uma substancial queda em comparação com o valor obtido com $S_0=144$ g/L, devido ao índice de floculação mais baixo.

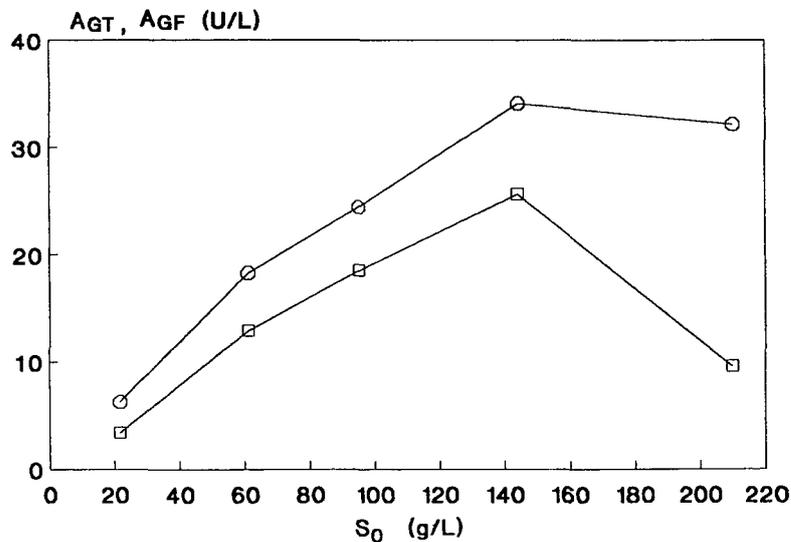


FIGURA IV.12 - Atividades globais de células totais (A_{GT} , \circ) e floculantes (A_{GF} , \square) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

Analisando-se os resultados ilustrados pela Figura IV.13, que mostra os fatores de conversão em atividade global de células totais ($Y_{AGT/S}$) e floculantes ($Y_{AGF/S}$), observa-se que os perfis das duas curvas são semelhantes, com os fatores de conversão diminuindo com o aumento de S_0 , a partir de 61g/L. Com relação aos fatores de conversão em atividade global de células floculantes, destacam-se os ensaios com S_0 entre 61 e 144g/L, nos quais os maiores valores de $Y_{AGF/S}$, em torno de 0,2 unidades de GFOR produzidas por grama de glicose consumida, foram encontrados.

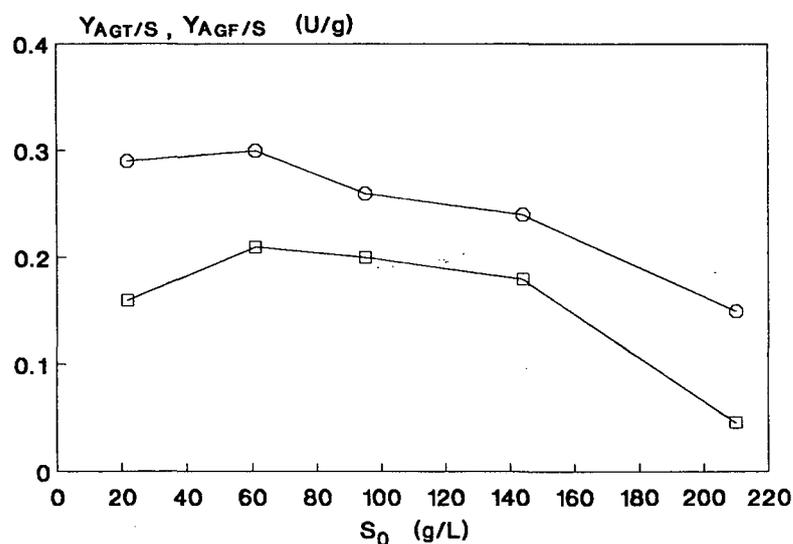


FIGURA IV.13 - Fatores de conversão em atividade global nas células totais ($Y_{AGT/S}$, \circ) e floculantes ($Y_{AGF/S}$, \square) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

A Figura IV.14 mostra as produtividades em atividade global de células totais (pA_{GT}) e floculantes (pA_{GF}), para cada concentração de S_0 testada, constatando-se que o ensaio com $S_0=95$ g/L apresentou os maiores valores, $pA_{GT}=1,95$ U/(g.L) e $pA_{GF}=1,48$ U/(g.L).

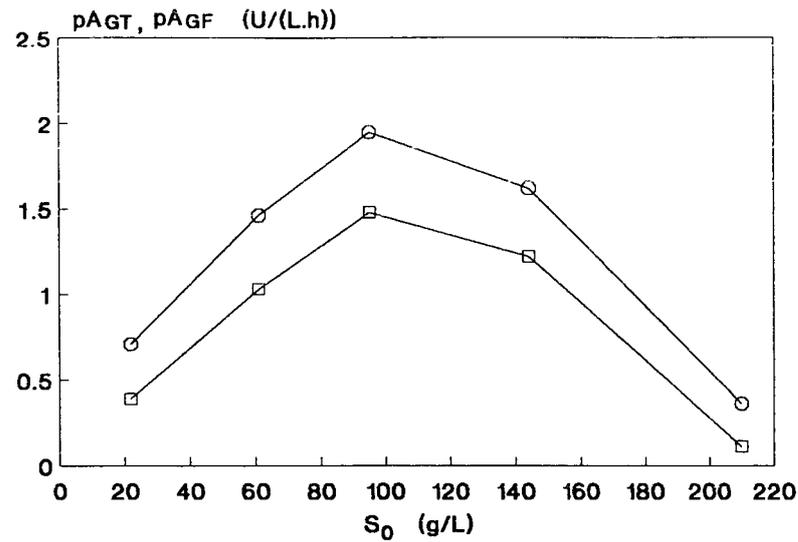


FIGURA IV.14 - Produtividades em atividade global de células totais ($pA_{GT, \circ}$) e floculantes ($pA_{GF, \square}$) em função da concentração inicial de glicose (S_0).

De acordo com os resultados, verificou-se que o ensaio 08, com 95g/L de substrato inicial, apresentou um bom índice de floculação e uma expressiva produtividade em etanol. Nesta condição, foram obtidos ainda valores relativamente altos de atividade específica, concentração de células floculantes, fator de conversão e produtividade em atividade global de células floculantes. Considerando estes aspectos, aliados ao fato de que nesta concentração de substrato não foi evidenciada inibição, as condições deste ensaio foram estabelecidas como básicas para a seqüência dos estudos descritos neste trabalho.

IV.2.2 Influência da agitação

O estudo da influência do estado de agitação do sistema sobre o crescimento celular de *Zymomonas mobilis* Z1-81, a floculação e a produção de glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e etanol foi realizado com concentração inicial de substrato em torno de 100g/L e com a frequência do agitador variando de 25 a 500min⁻¹. Foram mantidos constantes o pH e a temperatura em 5,5 e 30°C, respectivamente. No ensaio a 25min⁻¹, utilizou-se apenas a turbina superior do agitador e nos demais ensaios foram utilizadas três turbinas.

Na Tabela IV.4 são apresentados os resultados experimentais obtidos ao fim das fermentações e na Tabela IV.5 os índices de floculação, os fatores de conversão, rendimentos e produtividades obtidos nos ensaios.

TABELA IV.4 - Resultados experimentais obtidos ao fim dos ensaios para o estudo da influência da agitação.

Ensaio	17	08	15	14
Frequência do agitador (min ⁻¹)	25	70	250	500
ΔS (g/L)	100,0	95,0	96,0	98,0
ΔP (g/L)	49,5	45,0	47,0	47,5
ΔX_T (g/L)	1,92	2,49	3,08	3,38
ΔX_L (g/L)	0,64	0,61	1,31	2,07
ΔX_F (g/L)	1,28	1,88	1,77	1,30
A (U/g)	8,7	9,5	8,8	8,4
A_{GT} (U/L)	17,4	24,4	28,0	29,2
A_{GF} (U/L)	11,7	18,5	16,4	11,6
t (h)	19,5	12,5	11,8	9,8

TABELA IV.5 - Resultados gerais dos ensaios realizados para o estudo da influência da agitação.

Ensaio	17	08	15	14
iF (%)	67,0	75,9	58,5	39,6
R (%)	96,0	92,1	96,0	94,1
$Y_{P/S}$	0,49	0,47	0,49	0,48
$Y_{X_T/S}$	0,019	0,026	0,032	0,034
$Y_{X_L/S}$	0,0064	0,0064	0,014	0,021
$Y_{X_F/S}$	0,013	0,020	0,018	0,013
$Y_{AGT/S}$ (U/g)	0,17	0,26	0,29	0,30
$Y_{AGF/S}$ (U/g)	0,12	0,20	0,17	0,12
p (g/(L.h))	2,54	3,60	4,00	4,90
pA_{GT} (U/(L.h))	0,89	1,95	2,37	3,00
pA_{GF} (U/(L.h))	0,60	1,48	1,39	1,18

A variação da concentração de células totais (ΔX_T) é um dos pontos em que se verifica mais claramente a influência da agitação. De acordo com a Figura IV.15, observa-se um aumento de ΔX_T em função da frequência do agitador. Observa-se, também, que quanto mais agitação se proporciona ao sistema, mais rapidamente a fermentação chega ao fim (Tabela IV.4). Este fato tem, provavelmente, relação com o desprendimento de CO_2 , formado durante a fermentação, pela agitação. Sendo o CO_2 um inibidor do crescimento (VEERAMALLU e AGRAWAL, 1986), quanto maior a agitação mais facilmente o CO_2 é retirado, promovendo maior concentração de células totais e, conseqüentemente, um menor tempo de fermentação. Outra possibilidade a cogitar, é que o aumento da agitação provoca a liberação de células e a redução do tamanho dos flocos, o que melhoraria o transporte de substrato e nutrientes para as células devido ao aumento da área de troca.

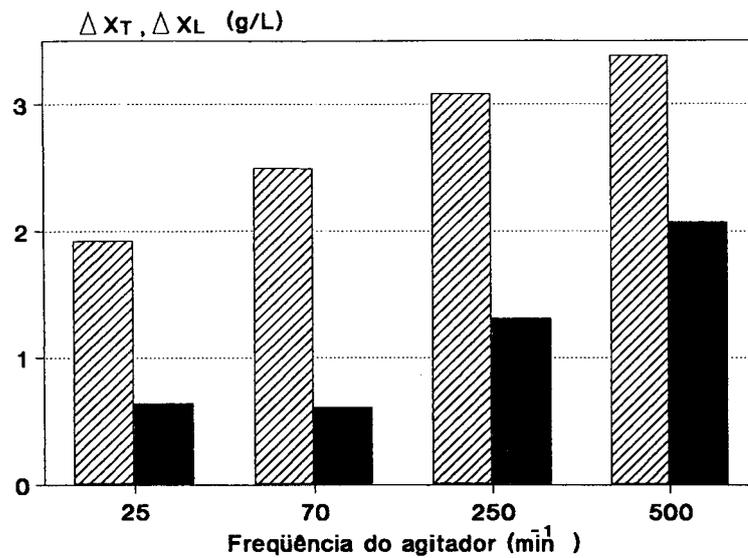


FIGURA IV.15 - Concentrações de células totais (ΔX_T , ▨) e livres (ΔX_L , ■) em função da freqüência do agitador.

A Figura IV.15 apresenta, ainda, a concentração de células livres (ΔX_L) em função da freqüência do agitador. Foi observado um aumento de ΔX_L a partir de 70min^{-1} , tendo o ensaio a 500min^{-1} apresentado uma concentração de células livres de aproximadamente 2g/L . Provavelmente, em agitações mais elevadas, as células desprenderam-se dos focos por cisalhamento, aumentando assim a concentração de células livres no meio.

No ensaio a 25min^{-1} foi utilizada, apenas, a turbina superior do agitador, na tentativa de minimizar o desprendimento de células dos focos em função do cisalhamento. Verificou-se, por meio de um traçador (corante fucsina), que estas condições proporcionavam uma agitação suficiente para manter a homogeneidade do líquido, necessária para o controle do pH e o acompanhamento do consumo de glicose e formação de etanol com o tempo. Era esperado, então, uma concentração menor de células livres, mas o que se observou foi uma concentração semelhante à concentração do ensaio a 70min^{-1} com três turbinas, cerca de $0,6\text{g/L}$.

Por não se conhecer claramente o mecanismo de floculação destas células, torna-se difícil justificar este fato. O que foi observado neste ensaio, porém, é que durante a fermentação, os flocos sedimentaram, devido à baixa agitação, permanecendo em suspensão somente células livres. Supondo que as células livres não possuam a capacidade de se reagruparem para formar um novo floco, então, o fato de estarem em suspensão e, conseqüentemente, em maior contato com o substrato, pode ser usado para justificar o aumento da concentração de células livres. Esta teoria se apóia no trabalho de FEIN *et al.* (1983a) que demonstraram que, em um mesmo cultivo de *Z. mobilis* WR6, existem células com maior tendência a formar flocos enquanto outras se desenvolvem de forma individualizada.

A Figura IV.16 apresenta a concentração de células floculantes (ΔX_F) em função da frequência do agitador. Verifica-se que o ensaio a 70min^{-1} apresentou maior ΔX_F , $1,9\text{g/L}$. Este resultado deve ser, provavelmente, função da ação conjunta de um baixo cisalhamento e uma remoção de CO_2 mais eficiente.

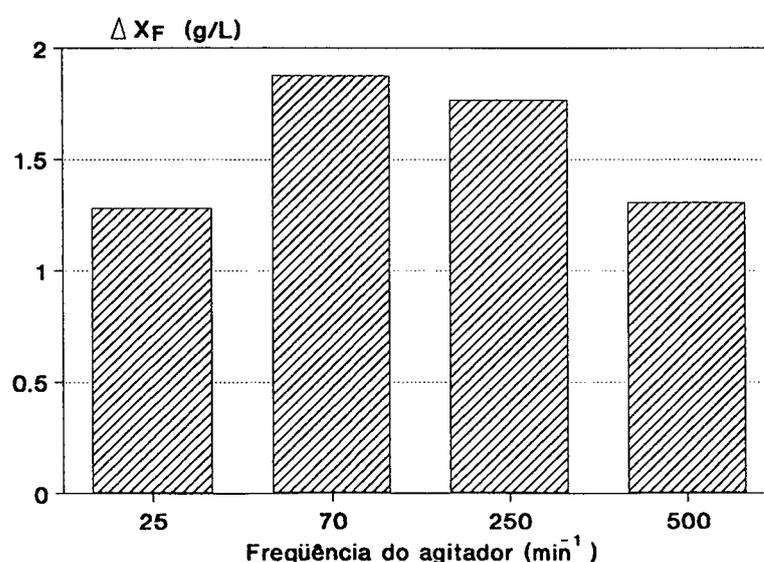


FIGURA IV.16 - Concentrações de células floculantes (ΔX_F) em função da frequência do agitador.

Resultados proporcionais são encontrados na Figura IV.17, que mostra o índice de floculação (i_F) em função da agitação, sendo o ensaio a 70min^{-1} aquele que apresentou maior i_F (76%). Os ensaios com agitação mais alta apresentam menores índices de floculação. Sem dúvida isto se deve ao desprendimento de células livres no meio provocado pelo maior cisalhamento em altas agitações.

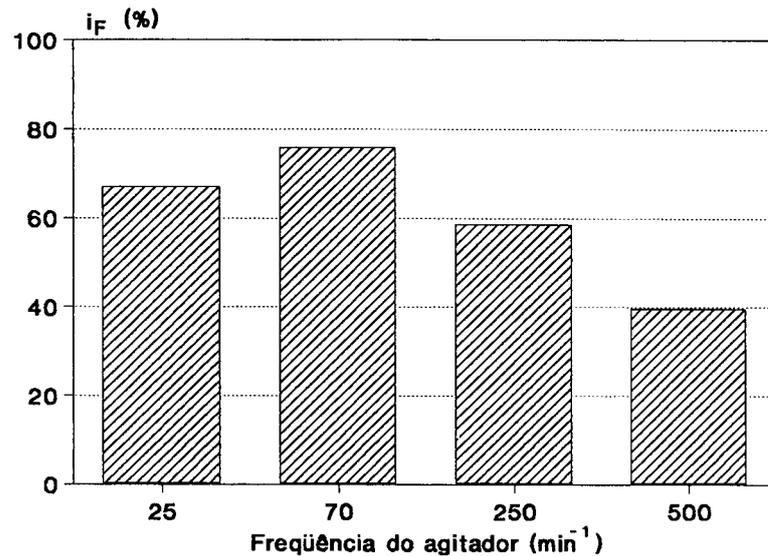


FIGURA IV.17 - Índices de floculação (i_F) em função da frequência do agitador.

Nos ensaios realizados com frequência do agitador de 25, 70 e 250min^{-1} , não foi possível, como já foi mencionado, determinar as velocidades específicas, devido à não homogeneidade dos flocos no meio, prejudicando a coleta de amostras representativas. No ensaio a 500min^{-1} , porém, o meio podia ser considerado homogêneo. Neste ensaio, então, foram estudados alguns parâmetros cinéticos, com o fim de conhecer melhor *Z. mobilis* Z1-81, visto que na literatura, com exceção de alguns trabalhos sobre floculação, não há qualquer referência a esta linhagem.

A máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{X_{\text{máx}}}$), para células totais, foi determinada traçando-se uma curva que relacionava os logaritmos neperianos das concentrações celulares com o tempo. Este gráfico era linear entre 3 e 6 horas, sendo neste intervalo observada a ocorrência de $\mu_{X_{\text{máx}}}$.

Para *Zymomonas mobilis* Z1-81, nas condições deste experimento, o valor encontrado para $\mu_{X_{\text{máx}}}$ foi de $0,47\text{h}^{-1}$. Valor semelhante, $0,42\text{h}^{-1}$, foi encontrado por AIT-ABDELKADER e BARATTI (1993), quando utilizaram *Z. mobilis* ZM4 com 50g/L de glicose e 50g/L de frutose. ROGERS *et al.* (1982), ao estudarem a cinética da linhagem ZM4, com 100g/L de concentração inicial de glicose, encontraram um valor para $\mu_{X_{\text{máx}}}$ de $0,31\text{h}^{-1}$. Os diferentes valores encontrados para $\mu_{X_{\text{máx}}}$ demonstram que este é dependente da linhagem e das condições de operação do processo fermentativo.

A Figura IV.18 apresenta a variação das velocidades específicas de crescimento (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e formação de etanol (μ_P) com o tempo. Observa-se que a partir de 3 horas de processo, μ_X é crescente com o tempo, chegando ao $\mu_{X_{\text{máx}}}$ por volta das 4 horas, verificando-se uma fase de cerca de 2 horas com valores de μ_X muito próximos ao máximo. Em seguida, o valor de μ_X decresce com o tempo até o fim da fermentação. O decréscimo da velocidade específica de crescimento pode ser devido à inibição pelo produto, etanol, que neste tempo é de aproximadamente 15g/L. Os resultados obtidos nos tempos iniciais não são confiáveis, uma vez que a concentração de células é muito baixa e qualquer erro de medida é muito significativo nos cálculos das velocidades.

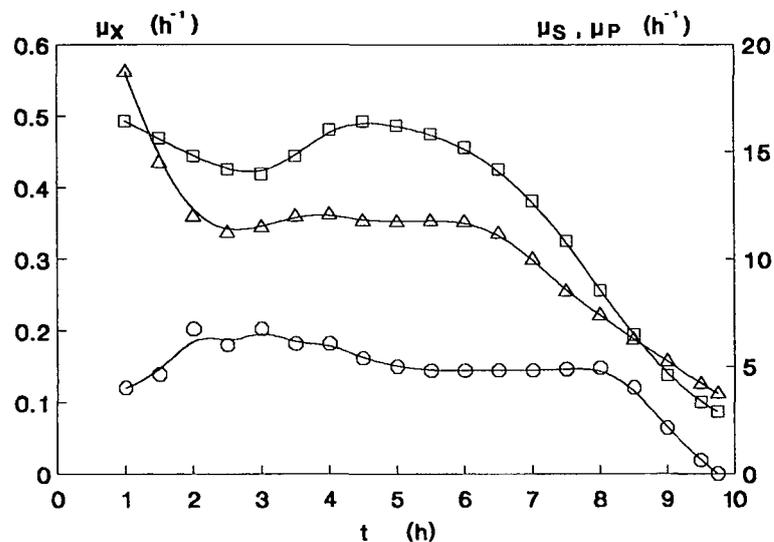


FIGURA IV.18 - Velocidades específicas de crescimento (μ_X , \square), consumo de substrato (μ_S , Δ) e formação de etanol (μ_P , \circ) em função do tempo (t). Freqüência do agitador de 500min^{-1} e $S_0 = 98\text{g/L}$.

Verifica-se, ainda, na Figura IV.18, que entre 4,5 e 6 horas μ_S é praticamente constante (aproximadamente $12h^{-1}$), tornando-se, após este período, decrescente quase que linearmente com o tempo. Comportamento semelhante foi encontrado por AIT-ABDELKADER e BARATTI (1993) para o consumo de glicose.

No que se refere à velocidade específica de formação de etanol (μ_P), observa-se que, entre 4,5 e 8 horas, μ_P é praticamente constante com o tempo ($5h^{-1}$), sendo decrescente após este intervalo. Os perfis obtidos não permitem caracterizar a cinética de formação de produto como associada ou semi-associada ao crescimento celular.

A Figura IV.19 mostra os valores de μ_X em função da variação da concentração de etanol (P). Verifica-se que, entre 10 e 15g/L de etanol, μ_X apresenta um valor quase constante. A partir de 15g/L de etanol, μ_X é linearmente decrescente, sugerindo que esta concentração seja suficiente para inibir o crescimento. LEE *et al.* (1980) verificaram que a partir de 20g/L de etanol o crescimento de *Z. mobilis* ZM4 começava a sofrer inibição pelo produto.

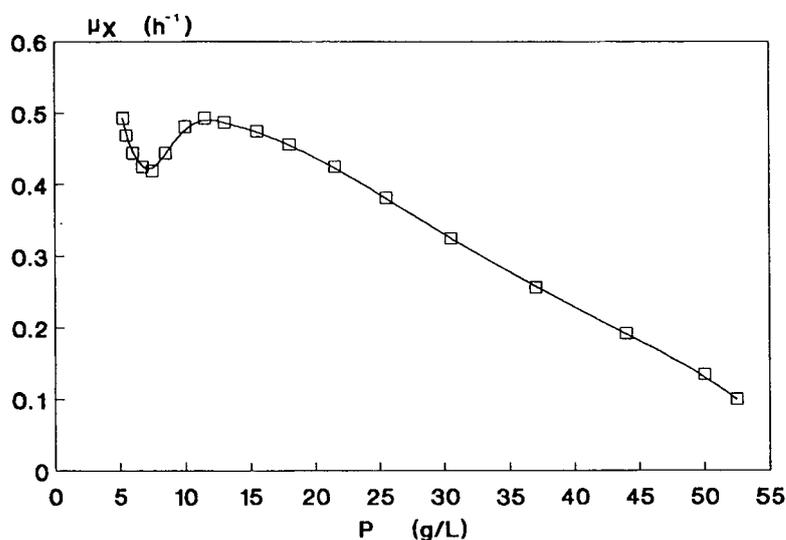


FIGURA IV.19 - Velocidades específicas de crescimento (μ_X) em função da variação da concentração de etanol (P).

Na Figura IV.20 estão apresentados os valores de μ_P em função da variação da concentração de etanol. Verifica-se que entre 15 e 35g/L a velocidade de formação de etanol apresenta um patamar. Com P maior que 35g/L, μ_P torna-se decrescente. Os perfis das Figuras IV.19 e IV.20, então, sugerem que o acúmulo de etanol influi muito mais sobre o crescimento celular do que sobre a formação do próprio produto.

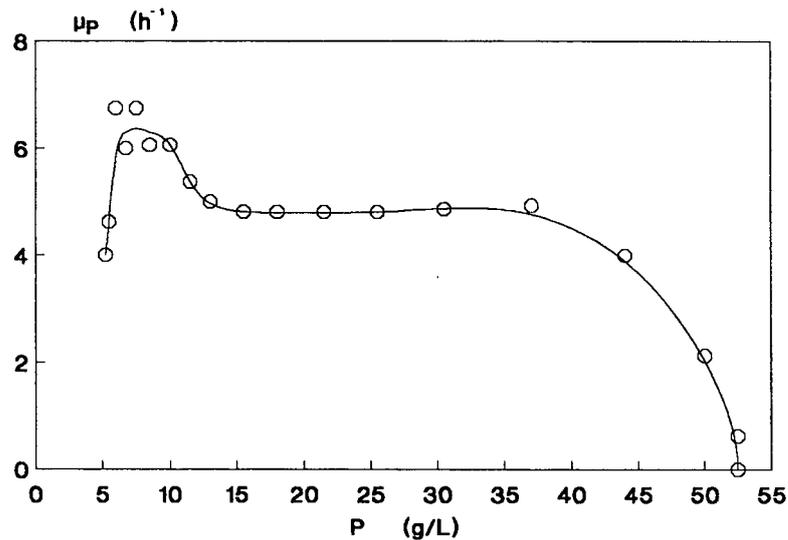


FIGURA IV.20 - Velocidades específicas de formação de etanol (μ_P) em função da variação da concentração de etanol (P).

Na Figura IV.21 são mostrados os fatores de conversão em células totais ($Y_{X/T/S}$) e floculantes ($Y_{X/F/S}$) em função da agitação.

O aumento da agitação, pelas razões já mencionadas, afetou positivamente a conversão em células totais. Observa-se que no ensaio a 500min^{-1} , por exemplo, foi obtido um fator de conversão de 0,034 grama de células totais por grama de substrato consumido. Um valor de $Y_{X/S} = 0,035$ foi encontrado para a linhagem não floculante ATCC 29191 (SILVEIRA *et al.*, 1995). Segundo estes autores, a conversão de substrato em células, com ATCC 29191, foi superior a de cinco outras linhagens testadas. Por outro lado, a 500min^{-1} , $Y_{X/F/S}$ foi de 0,013, mostrando a fragilidade dos flocos em altas agitações.

Observando-se as Figuras IV.16 e IV.21, verifica-se que os perfis de Δ_{X_I} e $Y_{X_F/S}$ em função da frequência do agitador são semelhantes, uma vez que a concentração inicial de substrato nestes ensaios é constante. O ensaio a 70min^{-1} apresentou o maior valor de $Y_{X_F/S}$, 0,02 grama de células produzidas por grama de substrato consumido.

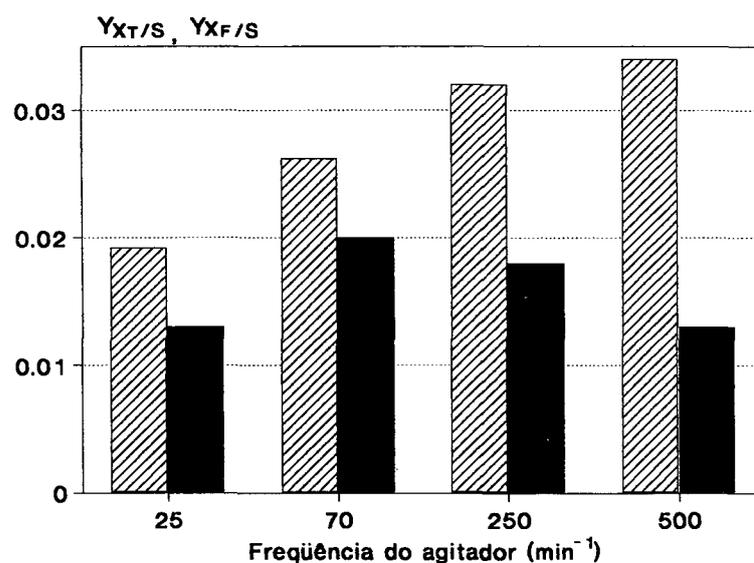


FIGURA IV.21 - Fatores de conversão em células totais ($Y_{X_T/S}$, ▨) e floculantes ($Y_{X_F/S}$, ■) em função da frequência do agitador.

Não foram observadas variações significativas nos fatores de conversão em etanol em função da agitação, indicando que esta não influencia na produção de etanol. Os valores encontrados variam entre 0,47 e 0,49, 92 a 96% do máximo teórico, como mostra a Figura IV.22, e são semelhantes aos encontrados por ROGERS *et al.* (1982) e MORTATTI e PARK (1988) com *Z. mobilis* ZM4 e NRRL B-14022, respectivamente.

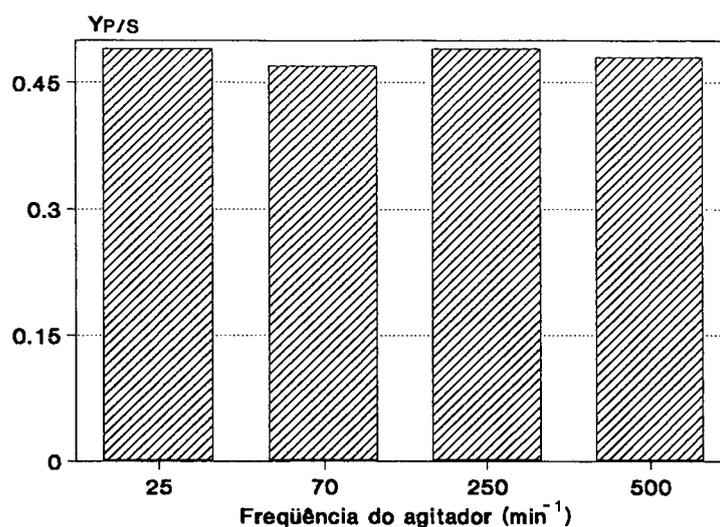


FIGURA IV.22 - Fatores de conversão em etanol ($Y_{p/S}$) em função da frequência do agitador.

Os dados representados na Figura IV.23 mostram um aumento das produtividades em etanol em função da frequência do agitador. Isto é devido ao favorecimento do crescimento celular pelo aumento da agitação, diminuindo, conseqüentemente, o tempo de fermentação. ROGERS *et al.* (1982) verificaram uma produtividade de 5,2g/(L.h) com a linhagem não floculante ZM4, com 100g/L de concentração inicial de glicose. Isto mostra que a linhagem Z1-81, sob agitação mais intensa, pode ser comparada a uma linhagem não floculante.

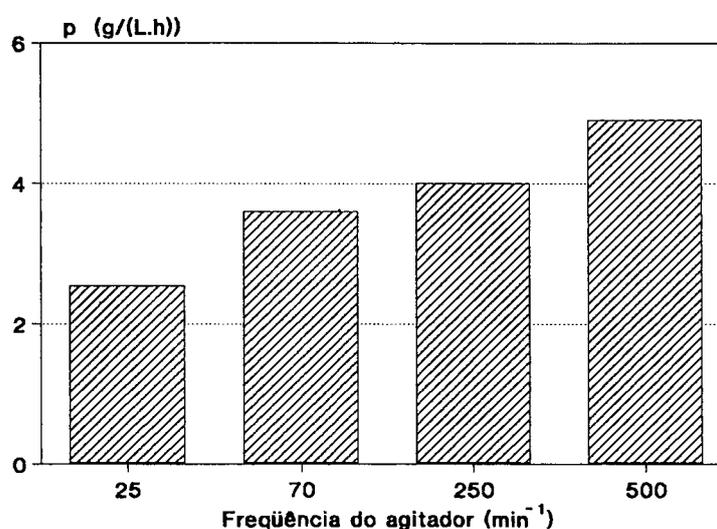


FIGURA IV.23 - Produtividades em etanol (p) em função da frequência do agitador.

Na Figura IV.24 estão apresentadas as atividades específicas em função da agitação. As atividades ficaram entre 8,4 e 9,5U/g , não apresentando uma variação significativa.

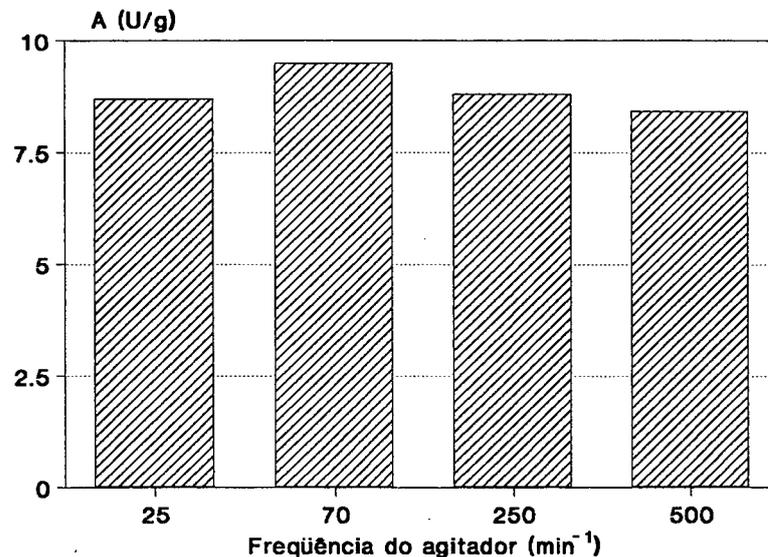


FIGURA IV.24 - Atividades específicas (A) em função da frequência do agitador.

As Figuras IV.25, IV.26 e IV.27 apresentam resultados relacionados às atividades globais de células totais e floculantes. Sendo A praticamente constante em função da frequência do agitador, os perfis das Figuras IV.25, IV.26 e IV.27 são decorrentes das concentrações finais de células totais e células floculantes (Figuras IV.15 e IV.16).

Observa-se na Figura IV.25 que o ensaio a 500min⁻¹ apresentou a maior atividade global de células totais (A_{GT}), tendo, porém, menor atividade global de células floculantes (A_{GF}). O ensaio a 70min⁻¹ apresentou a maior atividade global de células floculantes, 18,5U/L, provavelmente, como já explicado, pela ação conjunta de menor cisalhamento e melhor retirada de CO₂.

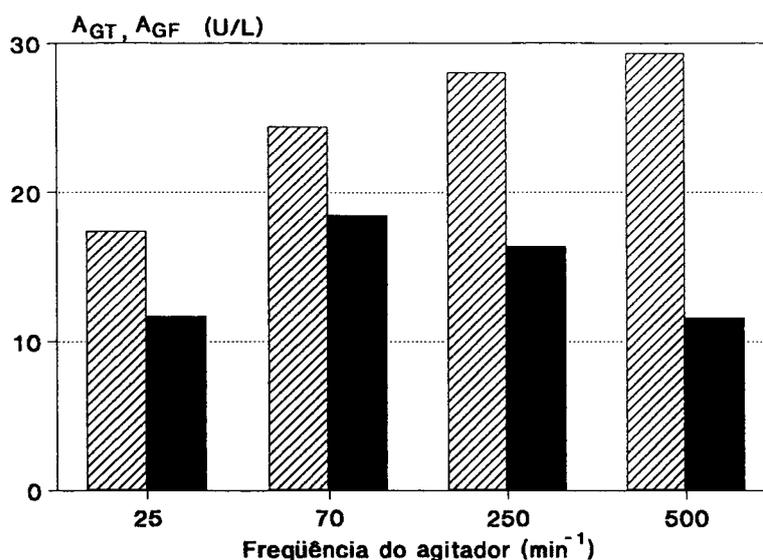


FIGURA IV.25 - Atividades globais de células totais (A_{GT} , ▨) e floculantes (A_{GF} , ■) em função da frequência do agitador.

As conversões de glicose em atividade global de células totais ($Y_{AGT/S}$) e floculantes ($Y_{AGF/S}$) e as produtividades em atividade global de células totais (pA_{GT}) e floculantes (pA_{GF}), em função da agitação, são apresentadas nas Figuras IV.26 e IV.27, respectivamente. Verifica-se que o ensaio a 70min^{-1} apresentou os maiores valores de $Y_{AGF/S}$, $0,2\text{U/g}$ e pA_{GF} , $1,48\text{U}/(\text{L.h})$.

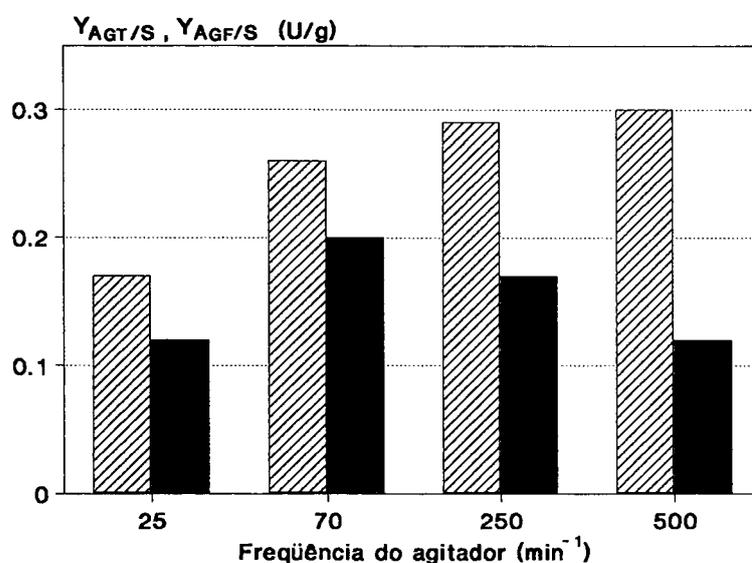


FIGURA IV.26 - Fatores de conversão em atividade global de células totais ($Y_{AGT/S}$, ▨) e floculantes ($Y_{AGF/S}$, ■) em função da frequência do agitador.

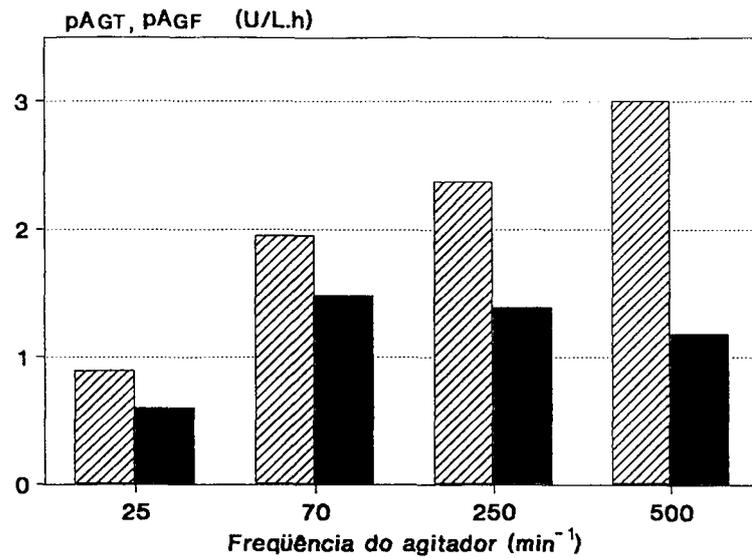


FIGURA IV.27 - Produtividades em atividade global de células totais (pA_{GT} , ▨) e floculantes (pA_{GF} , ■) em função da frequência do agitador.

As condições do ensaio a 70min^{-1} , por apresentarem os melhores resultados com relação às células floculantes, foram escolhidas para a produção de biomassa floculante a ser utilizada no ensaio de biotransformação.

IV.3. ENSAIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

O ensaio de biotransformação, discutido neste item, não teve por objetivo otimizar o processo, mas sim avaliar a capacidade de conversão de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, pela enzima GFOR de *Zymomonas mobilis* Z1-81.

A massa celular foi produzida por fermentação em batelada nas condições de operação definidas no item IV.2: concentração inicial de glicose de 100g/L e frequência do agitador de 70min⁻¹.

O ensaio de biotransformação foi realizado com aproximadamente 20g/L de células floculantes, 600g/L de glicose+frutose (quantidades equimolares), num volume inicial de 300mL. A temperatura foi mantida constante em 39°C e o pH em 6,4 pela adição de NaOH 14M. Os valores de pH e temperatura foram definidos como ideais para a GFOR de *Z. mobilis* CP1 (ERZINGER *et al.*, 1993) e estão de acordo com os resultados encontrados para a linhagem Z1-81 no item IV.1 deste capítulo.

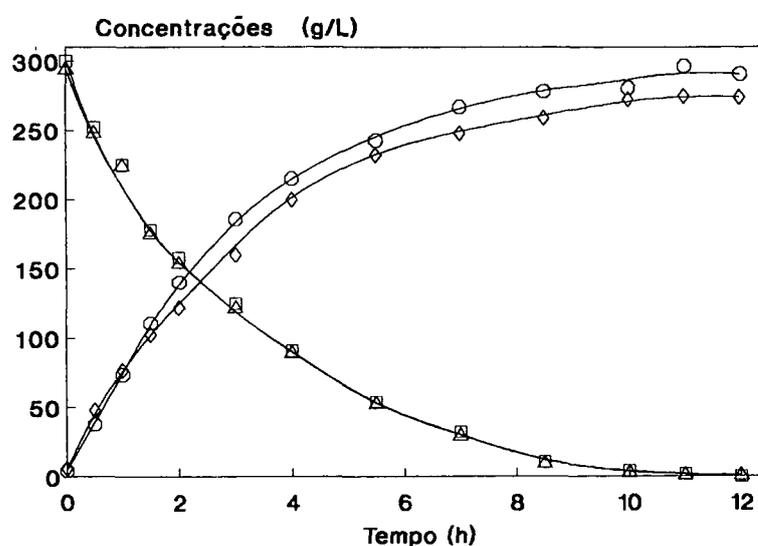
A concentração de 600g/L de glicose+frutose foi estabelecida em função dos resultados obtidos por SILVEIRA *et al.* (1994) que definiram, para a linhagem CP1, que em concentrações de glicose+frutose superiores a 600g/L, a formação de etanol é inibida e o consumo do gluconato formado é impedido.

Na Tabela IV.6 são apresentados os resultados gerais obtidos ao fim do ensaio. A Figura IV.28 apresenta a variação das concentrações de glicose, frutose, ácido glucônico e sorbitol com o tempo.

Os valores de rendimento e produtividade específica em ácido glucônico e sorbitol, como já mencionado, foram calculados em base de massa, pois o meio sofre uma diluição considerável pela adição de base para o controle do pH (Tabela C.1, Anexo). Nas curvas apresentadas na Figura IV.28 esta diluição não é considerada

TABELA IV.6 - Resultados gerais obtidos no ensaio de biotransformação (Ensaio 23).

ΔG (g/L)	295,0
ΔF (g/L)	300,0
Δag (g/L)	285,0
Δsor (g/L)	267,0
Y_{ag} / G	1,04
Y_{sor} / F	0,96
R_{ag} (%)	96,0
R_{sor} (%)	95,0
p_{ag} (g/(g.h))	1,1 - 1,3
p_{sor} (g/(g.h))	1,0 - 1,2
t (h)	12,0

**FIGURA IV.28 - Variação das concentrações de glicose (Δ), frutose (\square), ácido glucônico (\circ) e sorbitol (\diamond) com o tempo (t).**

Os rendimentos em relação ao máximo teórico, encontrados para ácido glucônico e sorbitol, foram 96 e 95%, respectivamente (Tabela IV.6). É possível, neste caso, que o restante dos açúcares tenha sido utilizado para a produção de outros subprodutos e para manutenção celular, embora, nas análises cromatográficas, não tenha sido verificada a presença de etanol ou acetoína, por exemplo. No entanto, os valores são semelhantes aos encontrados por SILVEIRA *et al.* (dados não publicados) com a linhagem CP1 em concentração de substrato de aproximadamente 700g/L.

Na Tabela IV.6 é apresentada uma faixa de produtividade específica por não ter sido possível definir exatamente a concentração de células floculantes utilizada no ensaio. Foram encontrados valores entre 1,1 e 1,3g/(g.h) para ácido glucônico e entre 1,0 e 1,2g/(g.h) para sorbitol. REHR *et al.* (1991), utilizando *Z. mobilis* ATCC 29191, permeabilizadas com CTAB, encontraram valores maiores de produtividade específica, 2,1 e 1,8g/(g.h) para ácido glucônico e sorbitol, respectivamente. Isto pode ter relação com o fato de que a atividade específica da linhagem Z1-81, em condições padronizadas, é cerca de 40% menor que a linhagem ATCC 29191 (SILVEIRA *et al.*, 1995). Assim sendo, os valores de produtividade específica, obtidos para Z1-81, são 40% menores que os obtidos para ATCC 29191.

Nos resultados apresentados na Figura IV.28, verifica-se que os açúcares são consumidos simultaneamente e que a formação de ácido glucônico e sorbitol é proporcional ao consumo de glicose e frutose. Este comportamento é previsível uma vez que para cada mol de glicose e frutose consumidos um mol de ácido glucônico e sorbitol são formados, respectivamente.

A Figura IV.29 mostra as velocidades de formação de ácido glucônico em função da concentração de glicose+frutose. Observa-se uma velocidade praticamente constante entre 350 e 600g/L de glicose+frutose, semelhante aos resultados obtidos no item IV.1.1 (Figura IV.1). Em concentrações menores que 300g/L a velocidade é decrescente. Não é possível precisar se a razão deste decréscimo é devida à menor

concentração de glicose e frutose, à elevada concentração de produtos (ácido glucônico e sorbitol), à uma baixa termoestabilidade da enzima GFOR ou a uma ação conjunta destes fatores.

Com relação ao aspecto termoestabilidade, estudos com a enzima GFOR da linhagem CP1 foram realizados no Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (CDB, 1993) e foi verificado que a 39°C, após 28,5h de incubação de uma suspensão celular, apenas 23% da atividade inicial foi conservada.

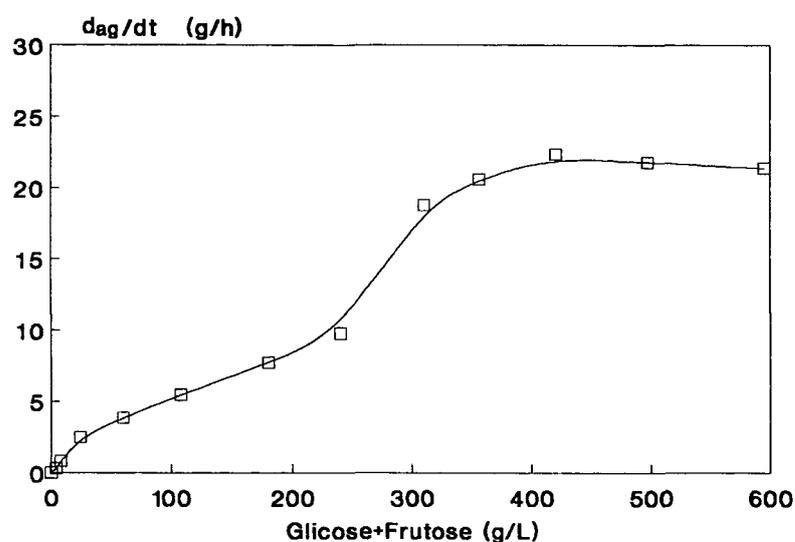


FIGURA IV.29 - Velocidades de formação de ácido glucônico (dag/dt) em função da variação da concentração de glicose+frutose.

Na Figura IV.29 observa-se, ainda, uma máxima velocidade de formação de ácido glucônico de aproximadamente 22g/h. Este valor corresponde a uma máxima velocidade específica de, aproximadamente, 3,5g/(g.h). A máxima velocidade específica experimental de formação de ácido glucônico, encontrada no ensaio para determinação de $V_{máx}$ e K_m (item IV.1.1) foi de 10,4g/(g.h). Esta diferença pode estar relacionada com a utilização de meio tamponado, no ensaio para determinação de $V_{máx}$ e K_m , que poderia provocar certa permeabilização nas células, aumentando o acesso dos substratos à enzima e, em consequência, a velocidade de formação de ácido glucônico.

As velocidades de formação de sorbitol não foram apresentadas devido à semelhança das cinéticas.

De acordo com os resultados, verifica-se que *Z. mobilis* Z1-81 é uma linhagem que pode ser utilizada em processos biológicos de produção de ácido glucônico e sorbitol.

V CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho objetivou desenvolver estudos sobre a cinética da enzima glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) contida em *Zymomonas mobilis*, linhagem floculante Z1-81, estudos da influência da concentração inicial de substrato e do estado de agitação do sistema sobre o processo de floculação, a produção de etanol e a atividade da GFOR e estudos de avaliação da capacidade da GFOR desta linhagem floculante de converter glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, no processo de biotransformação.

Neste capítulo são, então, apresentadas as principais conclusões obtidas de acordo com os objetivos propostos para este trabalho, bem como algumas sugestões para a sua continuação.

. Com relação à enzima glicose-frutose oxidoreductase (GFOR):

- o valor de $K_m=324\text{g/L}$ de glicose e frutose demonstra a baixa afinidade da enzima GFOR por estes substratos;
- em concentrações equimolares de glicose e frutose superiores a 300g/L , a enzima GFOR sofre inibição pelos substratos, apresentando um valor de $V_{m\acute{a}x}$ de $10,4\text{U/g}$;
- temperatura de 39°C e pH de $6,4$ são ideais para a obtenção da máxima atividade da enzima GFOR.

. Com relação à influência da concentração inicial de substrato sobre o processo de floculação, produção de etanol e atividade em GFOR:

- os índices de floculação mais altos, em torno de 76%, são obtidos com concentrações iniciais de substrato entre 95 e 144g/L;
- conversões mais altas de substrato em células floculantes (0,02) são encontradas com concentrações de substrato na faixa de 95 a 144g/L;
- concentrações iniciais de substrato próximas a 210g/L inibem o crescimento celular; neste caso, no entanto, concentrações de etanol de cerca de 100g/L, suficientemente altas para a recuperação econômica do álcool, são alcançadas;
- rendimentos em etanol de 90 a 92% do máximo teórico, obtidos nas condições testadas, demonstram que a concentração inicial de substrato não influencia a formação de etanol; as produtividades em etanol, porém, sofrem influência, sendo seus valores mais altos na faixa de 3,6g/(L.h), obtidos com concentrações de substrato em torno de 95g/L;
- a atividade específica em GFOR tende a aumentar com o aumento da concentração inicial de substrato.

. Com relação à influência da agitação sobre o processo de floculação, produção de etanol e atividade em GFOR:

- o índice de floculação máximo (cerca de 76%) é atingido em condições brandas de agitação (70min^{-1}), embora, nesta condição, o crescimento celular seja prejudicado pela retenção de CO_2 , provavelmente;
- maiores agitações, 250 e 500min^{-1} , favorecem o crescimento de células totais embora prejudiquem o índice de floculação, que fica entre 60 e 40%, respectivamente;
- a agitação não influencia o rendimento em etanol, ficando na faixa de 92 a 96% do máximo teórico, nas condições testadas; o aumento da agitação, entretanto, promove o aumento da produtividade em etanol, em virtude do aumento da biomassa;
- a atividade específica em GFOR não é influenciada pela agitação, permanecendo próxima a 9U/g nas condições testadas;

Com relação à biotransformação, os rendimentos em sorbitol e ácido glucônico da ordem de 95% do máximo teórico, e as produtividades específicas, na faixa de 1,1 - 1,3g/(g.h) para ácido glucônico e de 1,0 - 1,2g/(g.h) para sorbitol, demonstram a capacidade da enzima GFOR, contida na linhagem Z1-81, de converter glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente. Logo, esta linhagem pode ser comparada às melhores linhagens até então utilizadas para este processo.

Os resultados apresentados abrem uma série de possibilidades de avaliação, dependendo do parâmetro ou produto escolhido como referência. Considerando a produção de etanol, em que uma concentração alta do produto é um dado importante, parece evidente que o uso de um sistema em regime descontínuo alimentado é o mais indicado. Quanto à produção de GFOR, a seqüência desta pesquisa deve buscar a obtenção de uma maior biomassa floculante, aspecto que tem relação com a utilização de linhagens de *Z. mobilis* mais eficientes, em termos de floculação, e a otimização das condições de operação.

Entre as possíveis condições de operação a serem pesquisadas, sugere-se a realização do processo de fermentação sob vácuo. Assim, seria possível operar o sistema em baixas agitações, com menor destruição dos flocos e menor interferência do CO₂, que seria em grande parte removido.

No processo de biotransformação, maiores estudos para esta linhagem necessitam ser realizados, a fim de otimizar o processo. Estes estudos poderiam envolver, por exemplo, temperatura, concentração de células e substrato.

Levando em conta a economia do processo como um todo, entretanto, é necessário que sejam considerados com o mesmo grau de importância, tanto a enzima GFOR, visando a produção de sorbitol e ácido glucônico, como o etanol.

ANEXO - RESULTADOS EXPERIMENTAIS

A. ENSAIOS ENZIMÁTICOS

A.1 Determinação da velocidade máxima de reação ($V_{\text{máx}}$) e da constante de Michaelis-Menten (K_m) para glicose-frutose oxidoredutase

TABELA A.1.1 - Variação da atividade específica (A) com a concentração inicial de glicose+frutose, a pH=6,4 e 39°C.

Teste	Glicose+Frutose (g/L)	A (U/g)
01	40,0	2,0
02	79,0	4,1
03	141,0	6,5
04	219,0	8,4
05	254,0	9,0
06	288,0	10,3
07	352,0	10,4
08	373,0	10,5
09	409,0	10,4
10	453,0	10,5
11	488,0	10,6
12	507,0	10,5
13	551,0	9,9
14	604,0	9,3
15	634,0	8,7

A.2 Determinação da temperatura ideal para glicose-frutose oxidoredutase

TABELA A.2.1 - Variação da atividade específica (A) com a temperatura, a pH=6,4 e concentração inicial de glicose+frutose de 288g/L.

Teste	Temperatura (°C)	A (U/g)
01	25,0	4,0
02	30,0	5,7
03	35,0	8,1
04	36,0	8,2
05	37,0	8,4
06	38,0	9,5
07	38,5	9,5
08	39,0	9,9
09	39,5	9,9
10	40,0	9,2
11	42,0	8,9
12	45,0	5,5
13	48,0	1,7

A.3 Determinação do pH ideal para glicose-frutose oxidoredutase

TABELA A.3.1 - Variação da atividade específica (A) com o pH, a 39°C e concentração inicial de glicose+frutose de 288g/L.

Teste	pH	A (U/g)
01	4,0	1,2
02	4,5	2,5
03	5,0	4,5
04	5,5	6,3
05	6,0	7,8
06	6,1	7,8
07	6,2	8,1
08	6,3	8,1
09	6,4	8,1
10	6,5	7,9
11	6,6	8,0
12	6,7	7,4
13	7,0	2,4
14	7,5	0,05
15	8,0	0,03

B. ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

B.1 Influência da concentração inicial de substrato

TABELA B.1.1 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 05, frequência do agitador de 70min⁻¹).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X _T (g/L)	X _L (g/L)
0,0	21,9	4,5	0,13	0,04
0,5	21,7	4,8	-	-
1,2	21,4	5,2	-	-
2,0	19,8	5,4	-	-
2,8	17,0	6,1	-	-
3,5	14,8	6,4	-	-
4,3	12,4	7,5	-	-
5,0	10,1	8,4	-	-
5,8	8,8	9,3	-	-
6,5	6,5	11,2	-	-
7,2	4,3	12,9	-	-
8,0	1,9	13,7	-	-
8,8	0,09	14,5	0,85	0,38

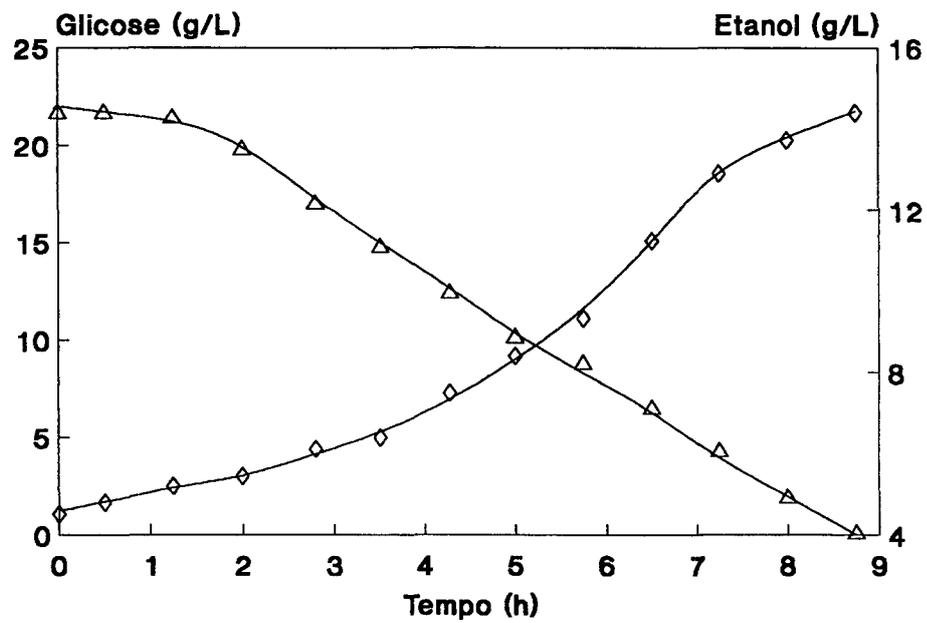


FIGURA B.1.1 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 05 ($S_0 = 21,8\text{g/L}$).

TABELA B.1.2 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 18, frequência do agitador de 70min^{-1}).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X_T (g/L)	X_L (g/L)
0,2	61,0	3,3	0,07	0,02
1,2	59,5	3,7	-	-
2,1	58,0	4,1	-	-
3,1	56,8	5,5	-	-
4,0	55,5	6,0	-	-
5,1	53,6	7,5	-	-
6,0	50,8	9,7	-	-
7,0	46,5	12,3	-	-
8,0	40,2	15,3	-	-
9,2	32,2	19,0	-	-
10,1	23,8	24,5	-	-
11,2	14,1	28,3	-	-
12,4	1,5	32,1	-	-
12,5	0,05	32,3	1,83	0,55

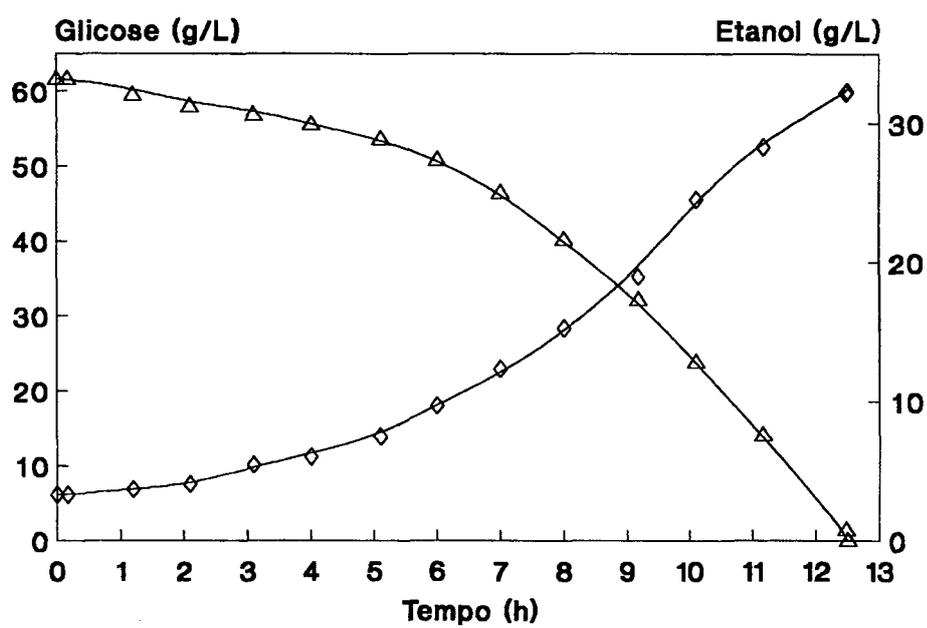


FIGURA B.1.2 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 18 ($S_0 = 61 \text{ g/L}$).

TABELA B.1.3 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 08, frequência do agitador de 70min⁻¹).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X _T (g/L)	X _T (g/L)
0,2	95,0	4,0	0,08	0,02
1,0	93,8	4,3	-	-
2,1	92,7	5,3	-	-
3,0	88,8	6,4	-	-
4,0	85,7	7,7	-	-
4,6	84,7	8,9	-	-
5,0	82,7	10,2	-	-
6,1	80,3	13,0	-	-
7,0	72,8	16,9	-	-
7,5	68,6	18,2	-	-
8,0	60,0	21,0	-	-
9,0	48,0	26,6	-	-
10,5	28,2	38,1	-	-
12,0	6,7	46,2	-	-
12,5	0,0	49,0	2,57	0,63

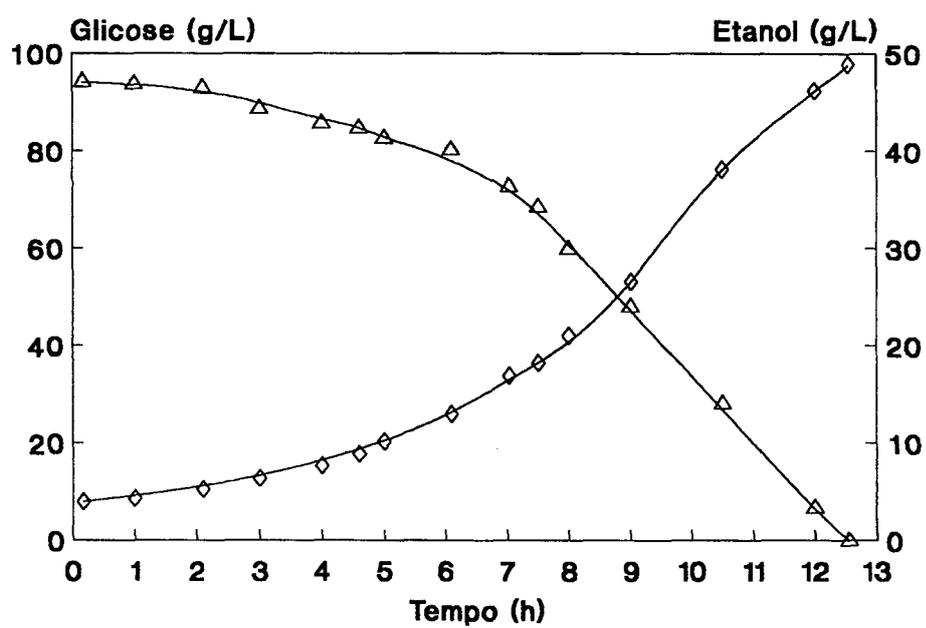


FIGURA B.1.3 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 08 ($S_0 = 95\text{g/L}$).

TABELA B.1.4 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 04, frequência do agitador de 70min⁻¹)

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X _T (g/L)	X _F (g/L)
0,1	145,2	4,5	0,11	0,01
1,5	142,2	5,2	-	-
3,0	139,0	5,9	-	-
4,5	138,0	7,3	-	-
6,0	136,0	10,4	-	-
7,5	134,3	13,9	-	-
9,0	129,8	17,9	-	-
10,5	114,8	23,6	-	-
12,0	93,8	29,2	-	-
13,5	67,6	34,5	-	-
15,0	48,1	46,4	-	-
16,5	37,5	58,1	-	-
18,0	23,3	63,8	-	-
19,5	8,0	69,7	-	-
21,0	1,2	73,0	2,4	0,6

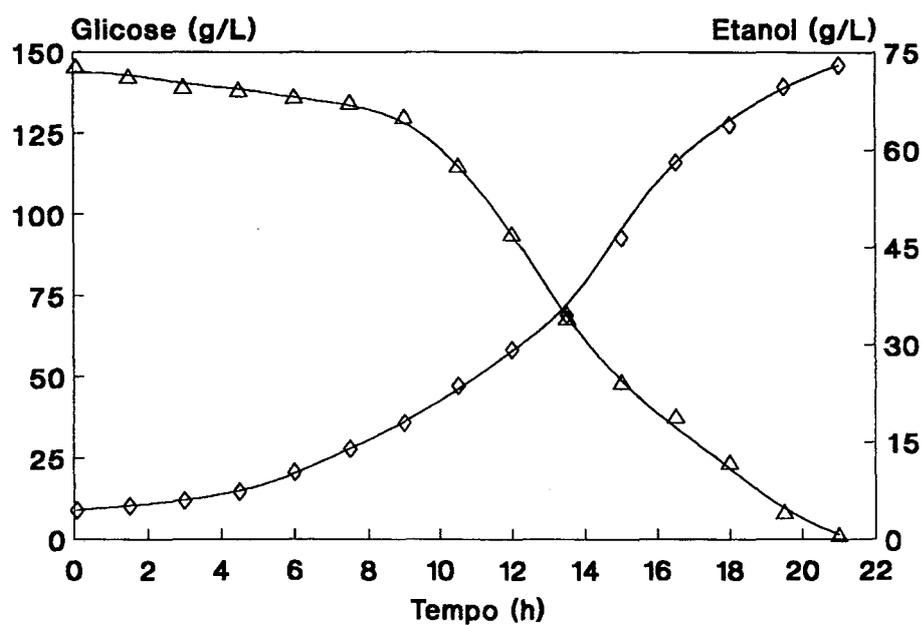


FIGURA B.1.4 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 04 ($S_0 = 144\text{g/L}$).

TABELA B.1.5 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 12, frequência do agitador de 70min^{-1}).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X_T (g/L)	X_L (g/L)
0,2	210,3	1,5	0,03	0,01
5,0	208,4	1,7	-	-
7,0	207,4	1,9	-	-
11,0	206,5	2,7	-	-
15,0	203,0	2,8	-	-
19,0	200,5	3,0	-	-
25,6	198,0	3,2	-	-
26,7	197,0	3,3	-	-
31,0	193,3	3,4	-	-
35,0	191,1	3,9	-	-
49,8	183,6	9,0	-	-
52,8	178,7	9,2	-	-
55,0	168,0	13,2	-	-
58,0	163,9	19,1	-	-
61,0	154,6	23,7	-	-
64,0	125,9	36,7	-	-
67,0	98,7	53,1	-	-
70,0	72,2	69,5	-	-
73,0	55,4	73,2	-	-
76,0	40,6	83,2	-	-
78,0	24,8	85,2	-	-
82,0	11,4	93,2	-	-
86,0	4,8	98,3	-	-
88,0	0,3	101,5	2,28	1,6

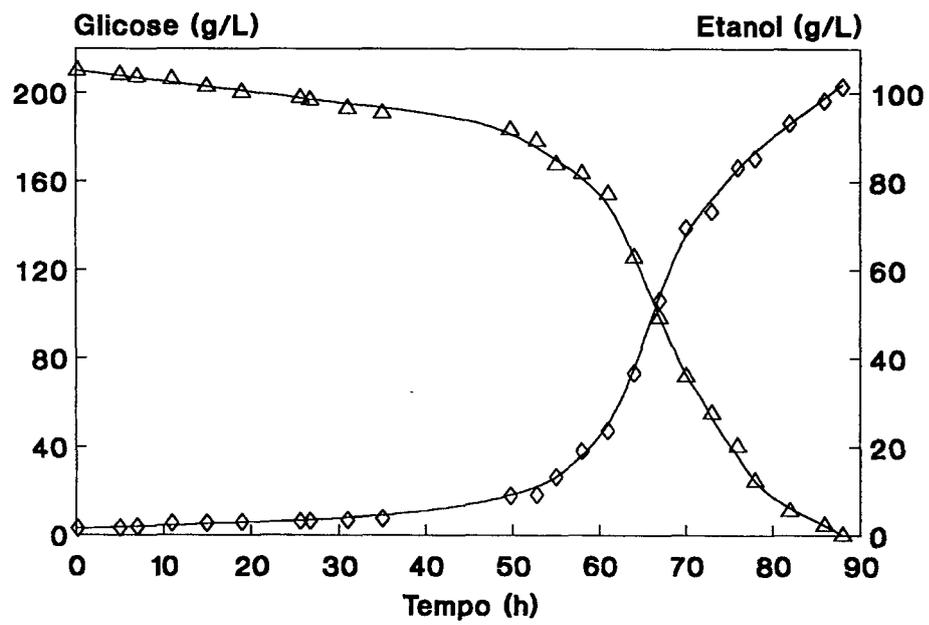


FIGURA B.1.5 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 12 ($S_0 = 210\text{g/L}$).

B.2. Influência da agitação

Os resultados do ensaio 08 estão apresentados no item II.1 (Influência da concentração inicial de substrato).

TABELA B.2.1 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 17, frequência do agitador de 25min⁻¹).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X _T (g/L)	X _L (g/L)
0,2	100,8	2,8	0,08	0,02
1,2	99,3	3,1	-	-
2,2	98,9	3,7	-	-
3,5	97,5	4,8	-	-
4,5	97,4	5,7	-	-
5,5	97,4	6,9	-	-
6,5	96,8	8,4	-	-
7,5	94,1	9,9	-	-
8,5	88,5	12,4	-	-
9,5	81,4	14,1	-	-
10,5	79,3	18,1	-	-
12,0	65,3	24,1	-	-
13,5	51,1	31,9	-	-
15,0	38,4	35,9	-	-
16,6	20,1	43,8	-	-
18,0	9,3	49,8	-	-
19,5	0,8	52,3	2,0	0,66

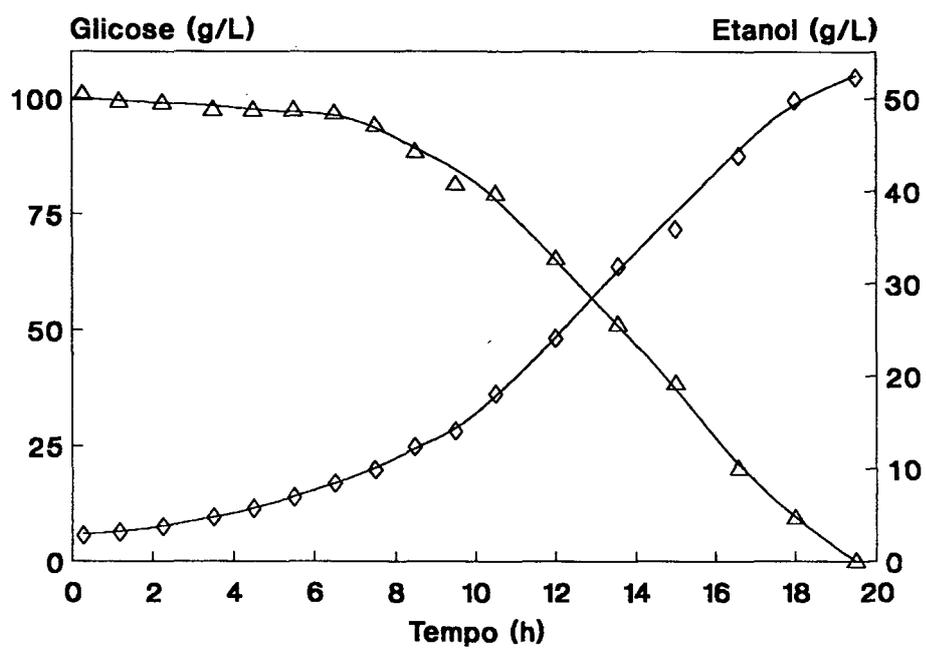


FIGURA B.2.1 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 17 ($S_0 = 100\text{g/L}$).

TABELA B.2.2 - Variação das concentrações de glicose e etanol com o tempo e concentração inicial e final das células totais e livres (Ensaio 15, frequência do agitador de 250min⁻¹).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X _T (g/L)	X _L (g/L)
0,2	96,0	4,0	0,1	0,02
1,0	93,2	5,1	-	-
2,2	91,4	6,5	-	-
3,3	90,9	7,4	-	-
4,2	89,2	10,6	-	-
5,6	84,8	13,6	-	-
6,5	79,2	17,4	-	-
7,5	77,4	24,7	-	-
8,7	60,8	34,6	-	-
9,8	41,2	47,3	-	-
11,2	13,4	50,1	-	-
11,8	0,02	51,0	3,18	1,33

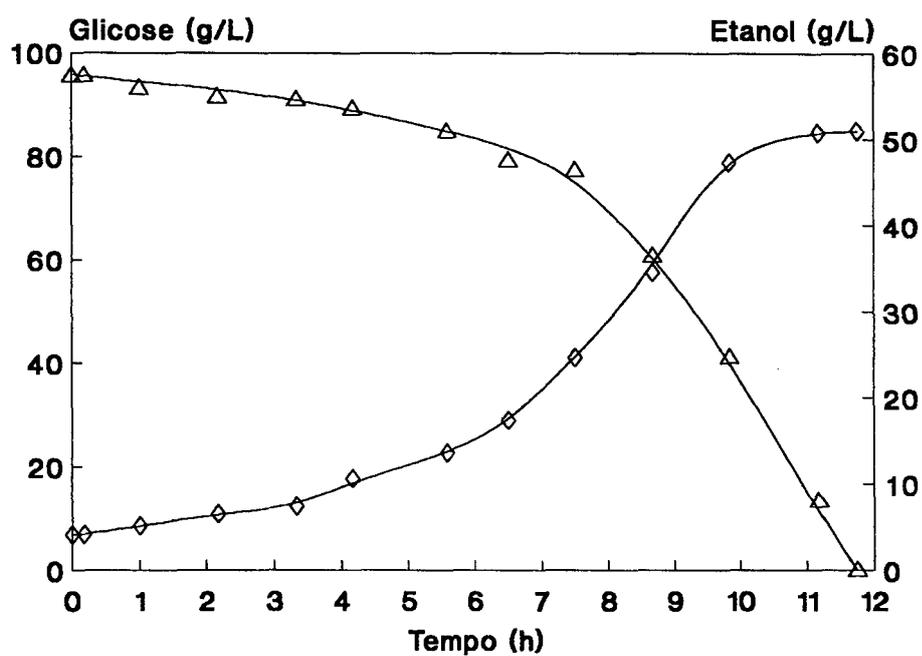


FIGURA B.2.2 - Variação das concentrações de glicose (Δ) e etanol (\diamond) com o tempo. Ensaio 15 ($S_0 = 96\text{g/L}$).

TABELA B.2.3 - Variação das concentrações de glicose, etanol e células totais com o tempo e concentração inicial e final das células livres (Ensaio 14, frequência do agitador de 500min^{-1}).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X_T (g/L)	X_f (g/L)
0,2	98,0	5,0	0,12	0,03
1,2	96,0	5,4	0,21	-
2,2	92,5	6,8	0,32	-
3,2	87,8	7,5	0,52	-
4,2	84,4	10,7	0,79	-
5,2	76,0	13,9	1,5	-
6,3	45,4	19,8	2,1	-
7,2	30,4	25,9	2,8	-
8,2	8,5	39,5	3,3	-
9,2	60,8	51,6	3,5	-
9,8	0,02	52,5	3,5	2,1

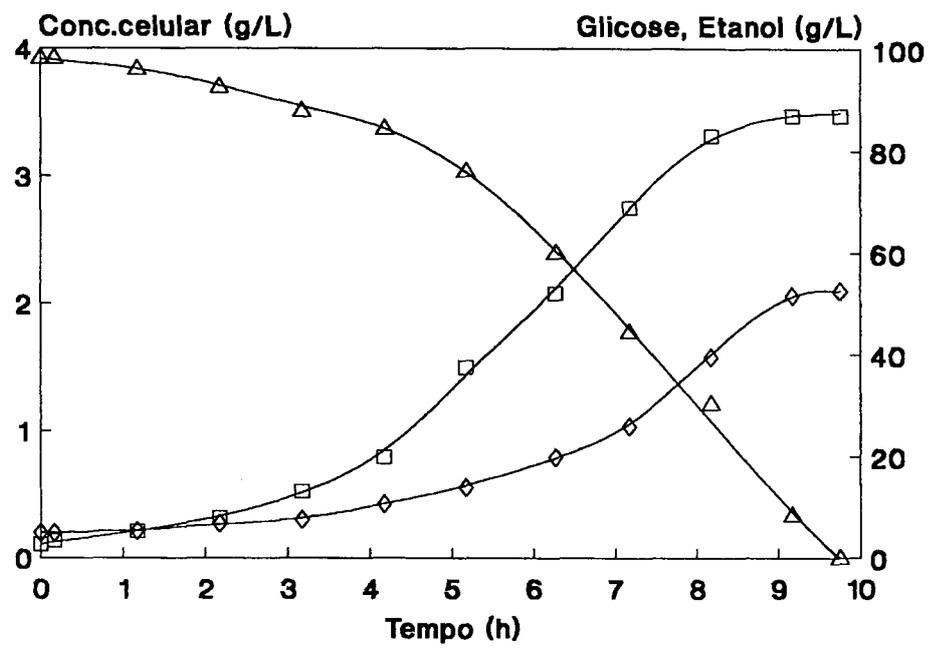


FIGURA B.2.3 - Variação das concentrações de glicose (Δ), etanol (\diamond) e células totais (\square) com o tempo. Ensaio 14 ($S_0 = 98\text{g/L}$).

C. ENSAIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

TABELA C.1 - Variação das concentrações de glicose, frutose, ácido glucônico e sorbitol com o tempo e volume da NaOH adicionado (Ensaio 23).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Ácido glucônico (g/L)	Sorbitol (g/L)	NaOH (ml)
0,0	294,8	300,3	6,2	6,9	0,0
0,5	248,4	252,2	37,7	48,2	3,5
1,0	224,4	224,8	73,7	76,8	7,4
1,5	175,5	177,8	110,6	102,4	11,2
2,0	154,2	157,8	140,1	121,9	14,4
3,0	121,7	124,9	185,8	160,1	19,9
4,0	89,3	90,6	215,0	200,0	24,5
5,5	52,7	53,9	242,7	232,3	29,5
7,0	29,9	32,3	266,8	247,8	32,7
8,5	9,9	10,7	278,1	259,0	34,9
10,0	3,2	4,1	280,5	272,4	36,2
11,0	1,4	1,8	296,3	273,8	36,6
12,0	0,0	0,0	291,1	274,0	36,9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIT-ABDELKADER,N., BARATTI,J.C. Estimation of kinetic and yield parameters: ethanol fermentation of a glucose and fructose mixture using *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Techniques**, v.7, n.5, p.329-334, 1993.

ANDERSON,R.J., HOWARD,G.A. The production of hydrogen sulphide by yeast and by *Zymomonas mobilis*. **Journal of the Institute of Brewing**, n.80, p.245-251, 1974. In: ROGERS,P.L., LEE,K.J., SKOTNICKI,M.E., TRIBE,D.E. **Ethanol production by *Zymomonas mobilis***. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v.23, p.37-84, 1982.

BAYLEY,J.E., OLLIS,D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. The kinetic of enzyme catalyzed reactions. 2^a ed. Mc Graw-Hill Book Co., p.984, 1986.

BARATTI,J.C., BU'LOCK,J.D., *Zymomonas mobilis*: A bacterium for ethanol production. **Biotechnology Advances**, v.4, p.95-115, 1986.

BARROW,K.D., COLLINS,J.G., LEIGH,D.A., ROGERS,P.L., WARR,R.G. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.20, p.225-232, 1984.

BELAICH,J.P., SENEZ,J.C. Influence of aeration and of pantothenate on growth yield of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology**, v.89, n.5, p.1195-1200, 1965.

BRINGER-MEYER,S., SAHM,H. Metabolis shifts in *Zymomonas mobilis* in response to growth conditions. **FEMS Microbiology Reviews**. n.54, p.131-142, 1988.

BRINGER-MEYER,S., SAHM,H. **Process for obtaining sorbitol and gluconic acid by fermentation, and cell material suitable for this purpose.** United States Patent. nº 448.334, Dec. 11, 1989. US. Cl. 5.017.485, May. 21, 1991.

BUCHHOLZ,S.E., DOOLEY,M.M., EVELEIGH,D.E. *Zymomonas* - an alcoholic enigma. **Tibtech.** v.5, p.199-204, 1987.

CALLEJA,G.B. Cell agregation. In: ROSE,A.H., HARRISON,J.S. (ed). **The Yeast.** London: Academic Press, 1987, p.165-238.

CDB - Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, Relatório Anual, 1993.

CDB - Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, Relatório Anual, 1994.

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

DAWES,E.A., LARGE,P.J. **Journal of General Microbiology**, n.60, p.31-42, 1970. In: SWINGS,J., DE LEY,J. **The biology of Zymomonas.** Bacteriological Reviews, v.41, p.1-46, 1977.

DAWES,E.A., RIBBONS,D.W., LARGE,P.J. The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. **Biochemical Journal**, n.98, p.795-803, 1966. In: SWINGS,J; DE LEY,J. **The biology of Zymomonas.** Bacteriological Reviews, v.41, p.1-46, 1977.

DOELLE,H.W., GREENFIELD,P.F. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. **Appliel Microbiology and Biotechnology**, n.22, p.40-41, 1985.

- DOELLE,H.W., GREENFIELD,P.F. Ethanol production from sugar cane syrup using *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, n.11, p.25-36, 1989.
- ERZINGER,G., SILVEIRA,M.M., VITOLO,M., JONAS,R. Medida da atividade de glicose-frutose oxidorreductase em células íntegras de *Zymomonas mobilis*. In: 3^{ER} CONGRESO LATINOAMERICANO Y NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, Santiago-Chile,1993.
- FALCÃO DE MORAIS,J.O., ARAUJO,J.M., RIOS,E.M., MELLO,B.R. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações alcoólicas industriais. **Revista de Microbiologia**, São Paulo. v.1, n.14, p.6-10, 1983.
- FALCÃO DE MORAIS,J.O., RIOS,E.M., CALAZANS,G.M.T., LOPES,C.E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology**, v.31, p.75-91, 1993.
- FEIN,J.E., ZAWADZKI,B.C., LAWFORDE,H.G., LAWFORDE,G.R. Controlling morphological instability of *Zymomonas mobilis* strain in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.6, p.1899-1904, 1983a.
- FEIN,J.E., CHARLEY,R.C., HOPKINS,K.A.,LAVERS,B., LAWFORDE,H.G. Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.5, n.1, p.1-6, 1983b.
- FREITAS,V.A. **Produção de sorbitol: análise técnico-econômica dos processos eletroquímico e catalítico. Proposta de um projeto básico.** São Paulo: USP, 1990, 153p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1990.

- GIBBS,M., DE MOSS,R.D. Anaerobic dissimilation of C¹⁴ - labelled glucose on fructose by *Pseudomonas lindneri*. **Journal of Biological Chemistry**, n.207, p.689-694, 1954. In: VIIKARI,L. **By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis***. Technical Research Centre of Finland, p.3-29 1986.
- HARDMAN,M.J., SCOPES,R.K. The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. **European Journal of Biochemistry**, n.173, p.203-209, 1988.
- HUSTEDE,H., HABERSTROH,H.J., SCHINZIG,E. Gluconic Acid. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim: Verlag Chemie, 1985, v.A12, p.449-456.
- KERSTERS,K., DE LEY,J. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. **Journal of Microbiology**, n.34, p.393-408,1968. In: VIIKARI,L. **By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis***. Technical Research Centre of Finland, p.3-29, 1986.
- KING,F.G., HOSSAIN,M.A. The effect of temperature, pH and initial glucose concentration on the kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. **Biotechnology Letters**, n.4, v.8, p.531-536,1982.
- KLUYVER,A.J., HOPPENBROUWERS,W.J. Ein merkwürdiges Gärungsbakterium: Lindner's *Termobacterium mobile*. **Arch. Mikrobiol.**, n.2, p.245-260, 1931. In: SWINGS, J; DE LEY,J. **The biology of *Zymomonas***. **Bacteriological Reviews**, v.41, p.1-46, 1977.
- KRIEG,N.R., HOLT,J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, 9th ed, p.576-580, 1984.

- LAWFORD,G.R., LAVERS,B.H., GOOD.D., CHARLEY,R., FEIN,J.E. *Zymomonas* ethanol fermentation: biochemistry and bioengineering. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ETHANOL FROM BIOMASS, Royal Society of Canada: Duckworth,H.E. (ed), pp.482-507, 1982.
- LE DUY,A., ZAJIC,J.E. A geometrical approach for differentiation of a experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, n.25, p.805-810, 1973.
- LEE,K.J., SKOTNICKI,M.L., TRIBE,D.E., ROGERS,P.L. Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.2, n.8, p.339-344, 1980.
- LEIGH,D., SCOPES,R.K., ROGERS,P.L. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.20, p.413-415, 1984
- LOOS,H., VÖLLER,M., REHR,B., STIERHOF,Y.D., SAHM,H., SPRENGER,G.A. Localisation of glucose-fructose oxidoreductase in wild type and over producing strains of *Zymomonas mobilis*. **Microbiology Letters**, n.84, p.211-216, 1991.
- LOPES,C.E., CALAZANS,G.M.T., RIOS,E.M., CARLOS,T.F. On the effect of temperature and pH on the settling behaviour of a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.13, n.1, p.43-46, 1991.
- LOPEZ,J.A., CALAZANS,G.M.T., SILVEIRA,M.M., LOPES,C.E., JONAS,R. Flocculação de *Zymomonas mobilis* cultivada em diferentes substratos. In: 3^{ER} CONGRESO LATINOAMERICANO Y NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, Santiago-Chile, 1993

- LYNESS,E., DOELLE,H.W. Fermentation pattern of sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, n.23, p.1449-1460, 1981.
- MERCK INDEX, WINDHOLZ,M. (ed.). 10ª edição, New Jersey, p.638 e 1248.
- MILSON,P.E., MEERS,J.L. Gluconic and itaconic acids. In: MOO-YOUNG,M.(ed). **Comprehensive Biotechnology**, Oxford: Pergamon Press, v.3, p.681-700, 1985.
- MOELLERING,H., BERGMAYER,H.U. In: BERGMAYER,H.U. (ed). **Methods of Enzymatic Analysis**. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Besel, 3th ed., v.VI, p.220-227, 1984.
- MORITA,M.; ASSUMPTÃO,R.M.V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**. Editora Edgard Blücher Ltda. 2ª ed., 1988.
- MORTATTI,M.P.L.; PARK,Y.K. Comparative fermentation of glucose and sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v.3, n.19, p.253-257, 1988.
- PHILLIPS,M.A. Catalytic hydrogenation of glucose to sorbitol using a highly active catalyst. **Br.Chem. Eng.**, v.8, n.11, p.767-769, 1963. In: CHUN,U.H., ROGERS,P.L. **The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis***. Applied Microbiology and Biotechnology, n.29, p.19-24, 1988.
- REHR,B., WILHEM,C., SAHM,N. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.35, p.144-148, 1991.

REHR,B., SAHM,H. **Process for obtaining sorbitol and gluconic acid or gluconate.**

United States Patent, nº 606.821, Otc. 31, 1990. US. Cl. 5.102.795. Apr. 7, 1992.

ROGERS,P.L., LEE,K.J., TRIBE,D.E. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, n.15, p.7-11, 1980.

ROGERS,P.L., LEE,K., SKOTNICKI,M.E., TRIBE,D.E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.23, p.37-84, 1982.

RÖHR, M., KUBICEK,C.P. Gluconic acid. In: REHM,H.J., REDD,G. (ed). **Biotechnology**, VHC, 8 VOL, v.4, p.455-465, 1981.

SENEZ,J.C.; BELAICH,J.P. Etude microcalorimétrique de la croissance bactérienne et du contrôle de l'activité métabolique par le phosphate. **Colloq Int. C.N.R.S.**, n.124, p.237, 1965. In: ROGERS,P.L., LEE,K., SKOTNICKI,M.E., TRIBE,D.E. **Ethanol production by *Zymomonas mobilis***. **Advances in Biochemical Engineering/Biotchenology**, v.23, p.37-84, 1982.

SILVEIRA,M.M., COSTA,J.P., JONAS,R. Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, Joinville-BR. **Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácido glucônico ou gluconato**. P.I. 9403981-0, N/Ref:P. 51912, outubro, 04, 1994.

SILVEIRA,M.M, LEMMEL,C., ERZINGER,G.S., KOEHNTOPP,P.I., JONAS,R. Production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*: comparison of strains. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.3, n.35, p.591-594, 1992.

SILVEIRA,M.M., SALES,R., LEMMEL,C., JONAS,R. Glucose-fructose oxidoreductase activity in six strains of *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.38, n.2, 1995 (em impressão).

- STOKES,H.W., DALLY,E., SPANIEL,D.T., WILLIAMS,R.L., MONTENECOURT,B.S., EVELEIGH,D.E. *Zymomonas*: the phantom ethanol producer. **Biosources Dig.** n.3, p.124-132, 1981. In: VIKKARI,L. **By-product formation in ethanol fermentation.** Technical Research Centre of Finland, Publications 27, p.3-29, 1986.
- SWINGS,J., DE LEY,J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v.41, p.1-46, 1977.
- TRINDER,R. **Ann. Clin. Biochem.**, 1969. In: CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo. Instruções para a determinação enzimática de glicose pelo método Glicose-E.
- VAN PEE,W., VANLAAR,M., SWINGS,J. The nutrition of *Zymomonas*. **Acad. R. Sci Outre Mer (Brussels) Bull Science**, v.2, p.206,1974. In: ROGERS,P.L., LEE,K.J., SKOTNICKI,M.E., TRIBE,D.E. **Ethanol production by *Zymomonas mobilis*.** Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v.23, p.37-84, 1982.
- VEERAMALLU,U.K., AGRAWAL,P. The effect of CO₂ ventilation on kinetics and yields of cell-mass and ethanol in batch cultures of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.8, n.11, p.811-816, 1986.
- VIIKARI,L. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.20 p.118-123, 1984.
- VIIKARI,L. By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Technical Research Centre of Finland**, Publications 27, p.3-29, 1986.
- VIIKARI,L., KORHOLA,M. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.24, p.471-476, 1986.

- VIKARI,L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.7, p.237-261, 1988.
- WANICK,M.C., ARAÚJO,J.M., CAVALCANTI DA SILVA, E., SCHUMACHER,I.E. Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis*. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v.10, n.1/2, p.47-49, 1970.
- WANICK,M.C., CAVALCANTI DA SILVA,E. Novas observações sobre o emprego de *Zymomonas mobilis* var. *Recifencis* em infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*. **Revista do Instituto de Antibióticos**. Recife, v.11, n.2, p.69-71, 1971.
- 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.3, n. 167, p.863-869, 1986.