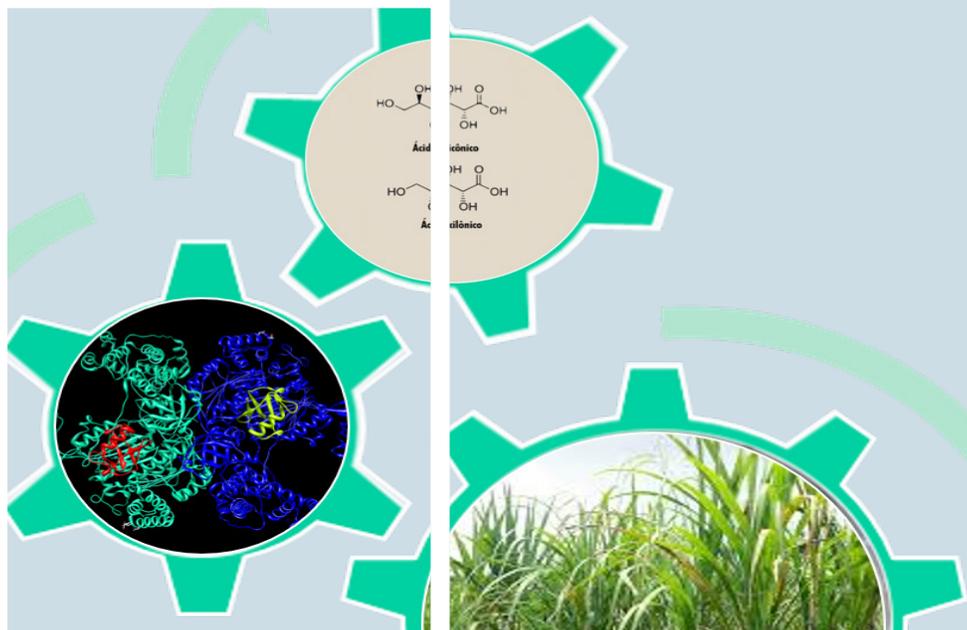


Imobilização de Glicose Oxidase para a Síntese de Ácidos Aldônicos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
21**

**Imobilização de Glicose Oxidase para
a Síntese de Ácidos Aldônicos**

*Silvio Vaz Junior
Dasciana de Sousa Rodrigues
Sílvia Belém Gonçalves
João Ricardo Moreira de Almeida
Wellington Carvalho
Thályta Fraga Pacheco*

**Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2020**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na

Embrapa Agroenergia
Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55 (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroenergia

Presidente
Alexandre Alonso Alves

Secretária-Executiva
Lorena Costa Garcia Calsing

Membros
Adilson Kobayashi, André Leão, Dasciana Rodrigues, Emerson Leo Schultz, Felipe Carvalho, Thais Salum, Wesley Leal

Supervisão editorial e revisão de texto
Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e tratamento das imagens
Maria Goreti Braga dos Santos

Ilustração da capa
Dasciana de Sousa Rodrigues

1ª edição
Publicação digital (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroenergia

Imobilização de glicose oxidase para a síntese de ácidos Aldônicos / Thályta Fraga Pacheco et al ... – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2020.

43 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroenergia, 21.)

ISSN: ISSN 2177-0395

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader

Modo de Acesso: World Wide Web

1. Biocatálise. 2. Imobilização. 3. Química verde I. Pacheco, Thályta Fraga. II. Rodrigues, Dasciana de S. III. Carvalho, Wellington B. IV. Almeida, João R. M. de V. Gonçalves, S. B. VI. Vaz Junior, Sílvio. VII. Embrapa Agroenergia. VIII. Série.

579 – CDD 21

Ana Flávia do N. Dias Côrtes (CRB-1999)

© Embrapa, 2020

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	8
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	20
Conclusões.....	39
Agradecimentos.....	40
Referências	40

Imobilização de Glicose Oxidase para a Síntese de Ácidos Aldônicos

Silvio Vaz Junior¹

Dasciana de Sousa Rodrigues²

Sílvia Belém Gonçalves³

João Ricardo Moreira de Almeida⁴

Wellington Carvalho⁵

Thályta Fraga Pacheco⁶

Resumo – Os ácidos aldônicos — glicônico e xilônico — estão entre as moléculas de alto valor agregado que podem ser obtidas a partir de biomassa lignocelulósica e apresentam elevado potencial de aplicação comercial em diferentes campos. A síntese de ácidos aldônicos é possível por meio de diferentes processos, como: químico, eletroquímico, microbiano e enzimático. Porém, independentemente da opção escolhida, ainda existem vários obstáculos para que a produção em larga escala seja bem estabelecida. Entre esses obstáculos, está o desenvolvimento de um catalisador eficaz e estável para a síntese dos ácidos aldônicos a partir de hidrolisados de biomassa lignocelulósica, cuja composição apresenta, além dos monômeros de interesse (glicose e xilose), um grande número de inibidores. Neste estudo, um biocatalisador estável foi obtido pela imobilização de glicose oxidase (GOX) em esferas de agarose e alginato ativadas com glutaraldeído (GOX-AA). O desempenho desse biocatalisador foi avaliado com o uso de glicose e xilose como substratos, em reatores do tipo tanque agitado e leito fixo. GOX-AA apresentou melhor desempenho em reator de leito fixo, onde foi possível converter xilose/glicose (presente em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar) em ácido xilônico/glicônico a uma taxa de 33% no estado estacionário. Esse sistema passou por trocas sequenciais de solução de substratos, em

¹ Químico, doutor em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

² Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

³ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁴ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁵ Graduação em Energias Renováveis, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

⁶ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

diferentes concentrações, e ainda assim continuou funcionando por 18 dias seguidos, sem perda de atividade catalítica.

Termos para indexação: biocatálise, imobilização, reator de leito fixo, química verde.

Glucose Oxidase Immobilization for Aldonic Acids Synthesis

Abstract – Aldonic acids (gluconic and xylonic) are among the high value-added molecules that can be obtained from lignocellulosic biomass and has a high potential for commercial application in different fields. The synthesis of aldonic acids is possible by chemical, electrochemical, microbial and enzymatic route and each of these processes still face several challenges to have a well-established large-scale production. Among these obstacles is the development of an effective and stable catalyst for aldonic acids synthesis from hydrolyzate of biomass, which contains a large number of inhibitors. In this work, a stable biocatalyst was obtained by the immobilization of glucose oxidase (GOX) in agarose and alginate beads activated with glutaraldehyde (GOX-AA). The performance of this biocatalyst was evaluated in stirred tank and fixed bed type reactors. Glucose and xylose were used as substrate. The GOX-AA showed better performance in the fixed bed reactor, where it was possible to convert xylose/glucose (present in hydrolyzate of sugarcane bagasse) to xylonic/gluconic acid at a steady state rate of 33%. This system underwent sequential substrate solution changes at different concentrations and ran for 18 consecutive days without loss of its catalytic activity.

Index terms: biocatalysis, immobilization, fixed bed reactor, green chemistry.

Introdução

Os ácidos aldônicos, ou seja, o ácido xilônico e o ácido glicônico, estão entre as principais moléculas de alto valor agregado que podem ser obtidas a partir de biomassa lignocelulósica (Werpy; Petersen, 2004). A estrutura química dessas moléculas é apresentada na Figura 1.

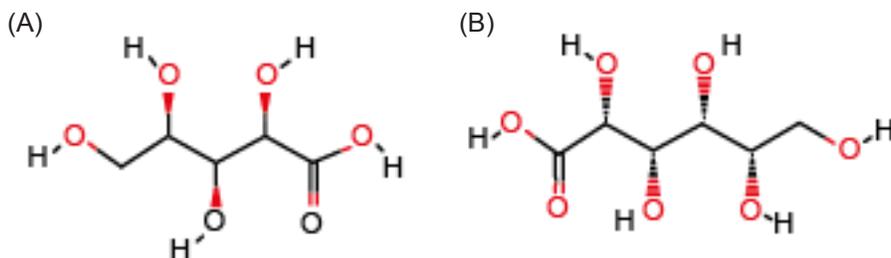


Figura 1. Estruturas moleculares do ácido xilônico (A) e do ácido glicônico (B).

Fonte: PubChem (2019).

Entre as principais possíveis aplicações do ácido xilônico, destaca-se o seu uso como dispersante em cimento (Chun et al., 2006), como substituto do ácido glicônico em produtos não alimentícios (Toivari et al., 2013), como precursor para a síntese de 1,2,4-butanotriol, utilizado para a fabricação de espuma de poliuretano, como aditivo em tintas, como precursor para a síntese de fármacos ou como precursor para a síntese de trinitrato butanotriol, um plastificante (Niu et al., 2003; Cao et al., 2015).

Para o ácido glicônico e seus derivados, as principais aplicações são como aditivo para evitar a formação de pedra do leite, limpar latas de alumínio, acidulante em alimentos, coagulante de proteína de soja para a produção de tofu, coagulante na produção de coalhada, detergente para lavagem de garrafas, aditivo na indústria de papel, têxtil e metalúrgica, aditivo na alimentação humana e animal, entre outras (Ramachandran et al., 2006).

A síntese de ácidos aldônicos pode ser realizada a partir de glicose e xilose obtidas de biomassa lignocelulósica. Dependendo do processo de obtenção desses monômeros, uma elevada quantidade de contaminantes pode

estar presente durante a produção dos ácidos aldônicos e causar a redução da produtividade e rendimento destes por afetar o desempenho dos catalisadores (Zhou et al., 2015). Etapas prévias de purificação dos monômeros podem ser utilizadas para minimizar o efeito dos contaminantes (Lu, 2013), mas isso eleva o custo de produção dos ácidos (Zhu et al., 2015). A complexidade da composição química da biomassa associada ao processo de obtenção de glicose e xilose torna imprescindível o uso de catalisadores específicos e estáveis em meios reacionais contaminados e relativamente ácidos (valores do pH compreendidos entre 2 e 5) para viabilizar economicamente o processo (Toivari et al., 2013).

Os processos catalisados por enzimas estão entre os mais promissores para a síntese de ácidos aldônicos, pois podem ocorrer em condições operacionais brandas, requerem baixo consumo de energia, geram pouco resíduo, apresentam elevada especificidade na obtenção de produto e, quando a enzima é usada na forma imobilizada, há também a possibilidade do uso de reator contínuo (Tomotani; Vitolo, 2007; Liu; Wang, 2007). Ademais, esse tipo de catálise para a conversão de açúcares (hexoses e pentoses) derivados da biomassa lignocelulósica está diretamente relacionado aos princípios 7 e 9 da química verde, respectivamente: uso de matérias-primas renováveis e uso de catalisadores, pois esses se apresentam superiores às reações estequiométricas (Vaz Jr., 2018).

Entre as enzimas que podem ser usadas para a síntese de ácidos aldônicos, são destacadas na literatura: aldose-aldose oxidorreductase, xilose desidrogenase ou oxidase (Lyr, 1962; Wiebe et al., 2015; Richard et al., 2012), glicose desidrogenase (Toivari et al., 2012) e glicose oxidase (Pezzotti; Therisod, 2006).

Devido à disponibilidade comercial e facilidade no uso e regeneração de seu cofator, a glicose oxidase (GOX), β -D-glicose: oxigênio 1-oxidorreductase, EC 1.1.3.4, tem sido uma das enzimas mais aplicadas comercialmente e vem sendo bastante utilizada para estudos na produção de ácidos aldônicos (Bankar et al., 2009; Pezzotti; Therisod, 2006).

As oxidases podem utilizar oxigênio como aceptor externo de elétrons, e no caso da glicose oxidase, isso favorece a regeneração do cofator FAD⁺/FADH (Ferri et al., 2011; Bankar et al., 2009). Por exemplo, quando glicose oxidase é utilizada para catalisar a oxidação de xilose, ocorre a liberação de xilonolactona

e peróxido de hidrogênio, e a presença deste último indica o consumo de oxigênio para a regeneração do cofator (Pezzotti; Therisod, 2006).

Um dos gargalos na utilização de GOX na catálise oxidativa de xilose deve-se ao fato de que, por se tratar de uma enzima específica para a utilização de glicose, em determinadas condições de temperatura e valores de pH, a taxa de conversão de outros açúcares é muito baixa (Mislovičová et al., 2010). Entretanto, a aplicação dessa enzima na forma imobilizada pode viabilizar seu uso tanto na síntese de ácido glicônico quanto na de ácido xilônico, pois, com o aumento da estabilidade e com possibilidade de reuso da enzima imobilizada, o custo global do processo pode ser reduzido, mesmo que seja necessária elevada concentração da enzima no reator.

A aplicação de glicose oxidase na forma imobilizada é desejável porque possibilita a recuperação da enzima ao final do processo, possibilitando seu reciclo, além de promover maior estabilidade operacional, especialmente frente aos valores de pH e temperatura utilizados no processo de produção de ácidos aldônicos, aumentando, em última instância, seu tempo de prateleira. (Mateo et al., 2007; Mislovičová et al., 2010, Yang et al., 2016).

Algumas das estratégias descritas para a imobilização de GOX fazem uso de suportes como membrana de troca iônica (Godjevargova et al., 2004; Tomotani; Vitolo, 2007), membrana de acetado de celulose-polimetilmetacrilato (Rauf et al., 2006), celulose (Mislovičová et al., 2010), sílica (Balistreria et al., 2016), nanotubo de carbono (Wang et al., 2011), nanopartículas magnéticas (Abbasi et al., 2016; Aber et al., 2016; Yang et al., 2016), entre outras.

Neste estudo, sete estratégias de imobilização foram investigadas para a imobilização de GOX. Duas dessas estratégias levaram a biocatalisadores ativos: imobilização por encapsulamento de agregados em alginato (AGR-GOX-ALG) e imobilização covalente em um suporte híbrido de agarose e alginato (GOX-AA). Dois biocatalisadores ativos foram obtidos, mas somente GOX-AA apresentou estabilidade mecânica e química satisfatória para a produção dos ácidos aldônicos.

O objetivo do estudo foi implementar metodologias de imobilização que possam garantir a elevada estabilidade operacional da enzima glicose oxidase para a conversão de glicose e xilose a ácido glicônico e ácido xilônico, respectivamente.

Material e Métodos

Quantificação do ácido xilônico pelo método da hidroxilamina

Para a quantificação de ácido xilônico, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Lien (1959) e descrita em Liu et al. (2012), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em microplaca, reduzindo proporcionalmente o volume de reagente aplicado em cada ensaio, sendo esta uma das modificações. Em cada poço, foram adicionados 25 μL da solução amostra com concentração do analito desconhecida, ou da solução padrão do analito, cuja concentração é conhecida, e 25 μL de ácido clorídrico 0,7 mol L^{-1} . A mistura foi homogeneizada, a microplaca foi tampada com filme adesivo e incubada em termociclador por 15 minutos a 95 °C. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 μL de hidroxilamina a 2 mol L^{-1} (preparada em hidróxido de sódio a 2 mol L^{-1}), 65 μL de ácido clorídrico 3,2 mol L^{-1} e 50 μL de cloreto de ferro 100 g L^{-1} (preparado em ácido clorídrico a 0,1 mol L^{-1}). Após a adição de cada solução, a mistura foi homogeneizada. Após a homogeneização, amostras foram transferidas para uma microplaca adequada para leitura a 550 nm em espectrofotômetro (modelo Spectramax M3, Molecular Devices). A curva de calibração [$\text{Abs}=0,0974 \times (\text{Concentração de ácido xilônico}) + 0,0427$] foi construída com padrões de xilose (Sigma-Aldrich) e ácido xilônico (Carbosynth), ambos de grau analítico, numa mesma solução, e esta foi outra modificação em relação à metodologia descrita por Lien (1959). Isso foi realizado porque se observou que xilose também é detectada por esse método e, portanto, atuaria como um interferente. No procedimento apresentado em Liu et al, 2012, a xilose não foi adicionada às soluções padrão de ácido xilônico. Uma curva de calibração simulando o avanço de uma reação cuja concentração inicial de xilose foi de 10 g L^{-1} foi preparada. Assim, quando a concentração de xilose era 10 g L^{-1} , não havia a presença de ácido xilônico; com o avanço da reação, supondo que a concentração de xilose diminuiu para 8 g L^{-1} , foi adicionado ácido xilônico a essa solução padrão para uma concentração final de 2,21 g L^{-1} . Para o terceiro ponto da curva, considerouse que a concentração de xilose havia diminuído para 6 g L^{-1} ; e, neste ponto, a concentração de ácido xilônico era 4,43 g L^{-1} . As soluções padrão foram preparadas com as seguintes concentrações, em g L^{-1} , de xilose/ácido xilô-

nico: 10/0; 8/2,21; 6/4,43; 4/6,64; 2/8,85; 0/11,06. Para a proposição desses valores, foi considerado que, para cada 150 g de xilose consumida, 166 g de ácido xilônico foram formados. Em massa, a relação entre o ácido glicônico ou xilônico produzidos e a glicose ou xilose consumidas, respectivamente, é equivalente a 1,1, com base na conversão estequiométrica. Essa curva de calibração foi utilizada somente em ensaios cuja concentração inicial de xilose era de 10 g L⁻¹.

Quantificação de ácido glicônico ou xilônico por método titulométrico

A quantificação de ácido glicônico ou xilônico produzido em reator batelada foi realizada com titulador automático (modelo Titrande Stat 902, Metrohm). A solução utilizada como titulante foi hidróxido de sódio 0,020 mol L⁻¹.

Quantificação de glicose ou xilose pelo método do ácido dinitrosalicílico

Os substratos glicose ou xilose foram quantificados pelo método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (Xiao et al., 2004; Miller, 1959). Tanto a xilose quanto a glicose utilizadas para o preparo de soluções de substratos puras foram adquiridas comercialmente da marca Dinâmica. Além da glicose e da xilose puras adquiridas comercialmente, foi utilizada uma mistura de glicose e xilose, ambas presentes em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado, doado pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), apresentou a seguinte composição: 6,0 g L⁻¹ de celobiose, 40,9 g L⁻¹ de glicose, 149,4 g L⁻¹ de xilose, 4,1 g L⁻¹ de ácido acético e outras substâncias não avaliadas. Ácido glicônico ou xilônico não são interferentes para o método do ácido dinitrosalicílico, permitindo que as reações fossem monitoradas também pela diminuição da concentração de açúcar redutor do meio.

Dosagem de proteína

A determinação de proteína foi realizada pelo método do ácido bicinônico (BCA), usando o kit BCA1-1KT da Sigma Aldrich (Lowry et al., 1951; Jablonski et al., 2010).

Estratégias para imobilização da enzima

A enzima desse estudo foi a glicose oxidase (GOX) de *Aspergillus niger* (Sigma) na forma liofilizada (0,53 g de proteína por grama de material liofilizado, ou produto enzimático). Sete estratégias para a imobilização de GOX foram investigadas visando à obtenção de um biocatalisador estável e ativo. Uma representação esquemática dos biocatalisadores obtidos pode ser vista na Figura 2.

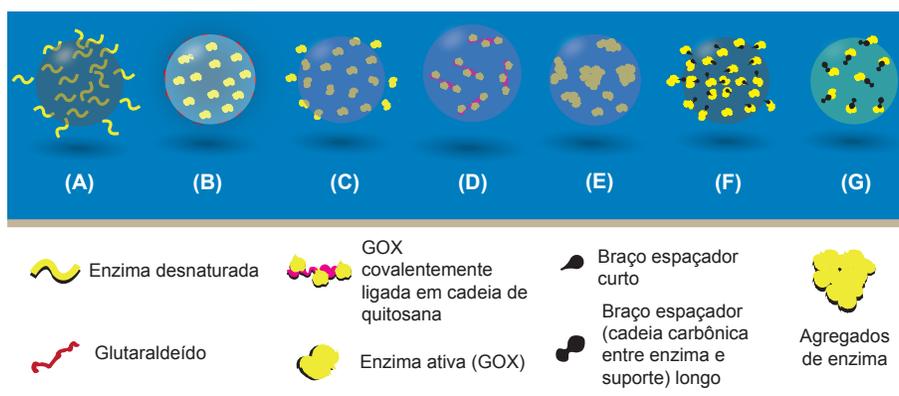


Figura 2. Representação esquemática dos sete biocatalisadores produzidos por meio de diferentes técnicas de imobilização: (A) Aprisionamento físico de GOX em esferas de quitosana; (B) aprisionamento de GOX em esferas de quitosana na presença de glutaraldeído; (C) aprisionamento físico de GOX em esferas de alginato; (D) aprisionamento de GOX quimicamente modificada com cadeias de quitosana em esferas de alginato; (E) aprisionamento físico de agregados de GOX em esferas de alginato; (F) ligação covalente de GOX em partículas de quitosana; (G) ligação covalente de GOX em esferas de agarose-alginato. Esferas cinzas indicam que o polímero utilizado para o preparo do suporte foi quitosana, esferas lilases indicam o uso de alginato e a esfera verde indica o uso de agarose. Abaixo da ilustração dos biocatalisadores, encontra-se uma legenda dos símbolos utilizados para a composição deles.

Ilustração: Maria Goreti Braga dos Santos

Aprisionamento físico de GOX

O primeiro passo para o aprisionamento físico da glicose oxidase a partir da sua forma solúvel foi o preparo de uma solução enzimática que contém 0,5 g do produto enzimático liofilizado em 0,5 mL de solução de glicose 100 g L^{-1} .

• **Aprisionamento físico de GOX em esferas de alginato (Figura 2C)**

Para o aprisionamento de GOX em esferas de alginato, foi utilizado como suporte para a enzima o hidrogel comercial Dersani (hidrogel com alginato, da Daudt). A mistura que contém o hidrogel e a solução da enzima, preparada como descrito no item “Aprisionamento físico de GOX”, foi gotejada em 100 mL de uma solução de cloreto de cálcio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (Blandino et al., 2001). As esferas obtidas no processo de gelificação foram mantidas sob agitação magnética por 2 horas à temperatura ambiente e armazenadas na mesma solução de gelificação a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, até o seu uso, a fim de evitar degradação química das esferas. Antes do uso, foi avaliada a presença de proteína na solução de gelificação para verificar se houve escape da enzima a partir das esferas de alginato.

• **Aprisionamento físico de GOX em esferas de quitosana (Figura 2A)**

Para o preparo do suporte de imobilização, a quitosana em pó (Sigma-Aldrich) foi dissolvida em uma solução de ácido acético 2% v/v, até atingir uma concentração de 2% m/v. Para completa dissolução da quitosana, a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Antes da adição da solução de enzima à solução de quitosana, o valor do pH desta última foi ajustado para 4,0, e a solução de quitosana foi resfriada até atingir a temperatura ambiente, para evitar inativação da enzima. A mistura com a quitosana e a enzima foi homogeneizada e, em seguida, gotejada em 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 2 mol L^{-1} . A mistura foi mantida sob agitação magnética por 15 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, as esferas formadas foram filtradas e exaustivamente lavadas com água destilada e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em pH 7,0. O biocatalisador foi armazenado em tampão fosfato a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o seu uso.

Aprisionamento físico e químico de GOX

Um processo de imobilização envolvendo interações químicas e físicas foi utilizado visando aumentar a estabilidade física do biocatalisador. Para realizar este procedimento, o glutaraldeído, um agente de entrecruzamento, foi utilizado. As duas estratégias investigadas para o aprisionamento físico e químico são descritas nos subitens a seguir.

- **Aprisionamento de GOX em esferas de quitosana na presença de glutaraldeído (Figura 2B)**

Em um volume de 10 mL da solução de quitosana, preparada como descrito no subitem “Aprisionamento físico de GOX em esferas de quitosana”, foi adicionado 0,5 mL da solução de enzima, cujo preparo está descrito no subitem “Aprisionamento físico de GOX”. Essa mistura foi homogeneizada e gotejada em 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com glutaraldeído a 0,25% m/v. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 15 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, as esferas formadas foram filtradas e exaustivamente lavadas com água destilada e tampão fosfato a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. O biocatalisador foi armazenado em tampão fosfato a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o seu uso.

- **Aprisionamento de GOX quimicamente modificada com cadeias de quitosana em esferas de alginato (Figura 2D)**

A fim de manter a enzima fisicamente presa no interior das esferas de alginato, cadeias poliméricas da quitosana solubilizada foram covalentemente ligadas à estrutura da enzima por meio do agente bifuncional, glutaraldeído. Inicialmente, foi preparada uma solução enzimática adicionando-se 0,5 g do produto enzimático liofilizado (GOX) a 0,5 mL de solução de ácido acético 2% v/v, com o valor do pH previamente ajustado para 5,0 utilizando solução de hidróxido de sódio a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A essa mistura, foram adicionados 60 μL de glutaraldeído 25% m/v. Em seguida, foi adicionado à solução enzimática 1 mL da solução de quitosana, preparada segundo descrição no subitem “Aprisionamento físico de GOX em esferas de quitosana”. A solução com enzima ligada ao glutaraldeído e quitosana foi homogeneizada por 5 minutos e adicionada a 9 mL do hidrogel Dersani. Em seguida, a mistura foi gotejada em 100 mL da solução de cloreto de cálcio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. As esferas obtidas no processo de gelificação foram mantidas sob agitação magnética por 2 horas à temperatura ambiente e armazenadas na mesma solução de gelificação a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o seu uso, para evitar sua degradação química. Antes do uso, foi avaliada a presença de proteína na solução de gelificação para verificar se houve escape de enzimas a partir das esferas de alginato.

Aprisionamento físico de agregados de GOX em esferas de alginato (Figura 2E)

Uma nova tentativa para evitar o escape de enzimas após a imobilização foi feita utilizando a técnica por aprisionamento físico. Essa técnica foi realizada promovendo a formação de agregados enzimáticos antes do aprisionamento em gel. Inicialmente, foi preparado 0,5 mL de uma solução enzimática com 0,25 g do material liofilizado e 0,025 g de glicose. Em seguida, essa solução foi mantida em banho de gelo enquanto álcool isopropílico foi gotejado até que a solução enzimática se tornasse turva, indicando a formação dos aglomerados (0,5 mL do álcool foram necessários). Imediatamente após a formação dos aglomerados, 5 g de hidrogel de alginato foram adicionados à suspensão dos aglomerados da enzima, e a mistura foi homogeneizada e gotejada em 100 mL de uma solução de cloreto de cálcio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, usando uma seringa. As esferas de gel foram mantidas na solução de cloreto de cálcio sob agitação magnética por 2 horas. As esferas obtidas foram armazenadas na mesma solução de gelificação a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o seu uso, para evitar degradação química das esferas. Antes do uso, foi avaliada a presença de proteína na solução de gelificação para verificar se houve escape de enzimas a partir das esferas de alginato.

Imobilização covalente de GOX)

A imobilização de GOX por meio de ligação covalente foi realizada em dois suportes diferentes: quitosana e agarose-alginato. Detalhes dos procedimentos de ativação do suporte e imobilização da enzima são apresentados nos subitens a seguir.

• Ligação covalente de GOX em partículas de quitosana (Figura 2F)

A imobilização de GOX foi realizada em partículas de quitosana ativadas com glutaraldeído. A preparação e ativação do suporte foi realizada com base na metodologia desenvolvida por Budriene et al. (2005), ligeiramente modificada. Uma solução de quitosana 2% m/v foi preparada com uma solução de ácido acético 2% v/v como solvente. Essa solução foi mantida sob agitação por 30 minutos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, 225 mL de solução de hidróxido de potássio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados a 150 mL da solução de quitosana. A mistura foi mantida sob agitação mecânica por 30 minutos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Após

gelificação, foram adicionados 0,5 mL de glutaraldeído 25% m/v ao meio reacional com as partículas de quitosana, e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. As partículas de quitosana ativadas com glutaraldeído foram filtradas e lavadas exaustivamente com água destilada para remoção do glutaraldeído que não reagiu e hidróxido de sódio. Imediatamente após a lavagem, uma solução de glicose oxidase em tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0 foi adicionada às partículas ativadas de quitosana. Foram oferecidas para imobilização 6 mg de proteína g^{-1} do suporte ativado (base úmida). O sistema de imobilização da enzima foi mantido sob agitação mecânica por 12 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as partículas de quitosana com glicose oxidase imobilizada foram lavadas com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e armazenadas nesse mesmo tampão a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o uso.

- **Ligação covalente de GOX em esferas de agarose-alginato (Figura 2G)**

As esferas de agarose-alginato foram preparadas pela dissolução de 1 g de agarose D5 (Pronadisa) em 50 mL de água destilada, a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação magnética. Após completa dissolução da agarose, 5 g do hidrogel Dersani foram adicionados à solução, e a mistura foi mantida sob agitação e aquecimento para evitar gelificação antes da formação das esferas, por gotejamento em solução de cloreto de cálcio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. As esferas obtidas foram lavadas exaustivamente com água destilada e submetidas à ativação, segundo metodologias descritas por Guisán et al. (1988) e Lafuente et al. (1993), ligeiramente modificadas. Em um béquer de vidro com capacidade para 250 mL, imerso em um banho de gelo, foram adicionados 50 g das esferas de agarose-alginato e 50 mL de hidróxido de sódio a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, sob agitação mecânica e mantendo o banho de gelo, foi adicionado ao béquer 0,3 g de boroidreto de sódio e 12 mL de glicidol. Este último foi adicionado gota a gota, evitando o aquecimento da mistura. Após completa adição do glicidol, o sistema foi mantido sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as esferas com os grupos gliceril foram lavadas com água destilada até atingir pH 7,0 e, em seguida, foram imersas em 500 mL de uma solução aquosa de periodato de sódio a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e mantidas sob agitação mecânica por 2 horas à temperatura ambiente. As esferas, com grupos glioxil, foram lavadas com água destilada e imersas em 500 mL de uma solução de etilenodiamino a 2 mol L^{-1} , pH 10,0, e mantida sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Após essa etapa, 5 g de boroidreto de sódio foram adicionados à mistura que foi mantida sob agitação por 2 horas. As esferas,

com os grupos amino na extremidade da cadeia carbônica, foram lavadas, primeiramente, com tampão borato a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0 e, em seguida, com tampão acetato a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0, ambos com cloreto de sódio a 1 mol L^{-1} . A última etapa de lavagem foi realizada com água destilada. Nesta etapa, as esferas ativadas com grupo amino puderam ser armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior ativação com glutaraldeído.

Para a ativação com glutaraldeído, foram utilizados 26,8 g das esferas ativadas com grupos amino, glutaraldeído 25% m/v (44,8 mL) e tampão fosfato a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (44,8 mL), pH 7,0. A mistura foi mantida sob agitação mecânica por 2 horas à temperatura ambiente, quando foi submetida à lavagem exaustiva com água destilada, seguida por tampão fosfato. As esferas ativadas com glicidol-etilenodiamino-glutaraldeído foram imediatamente utilizadas para a imobilização da enzima, sendo oferecida uma carga enzimática para obtenção de 5 mg de proteína g^{-1} de esferas ativadas. A imobilização da enzima foi realizada na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7, a uma razão de 1 g de suporte ativado (esferas) para 10 mL de solução enzimática. A mistura foi mantida sob agitação por 12 horas e, em seguida, armazenada em geladeira a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o seu uso. Antes do uso, as esferas com glicose oxidase imobilizada foram lavadas com água para remover enzimas que não estavam covalentemente ligadas ao suporte.

Ensaio de síntese em reator batelada

Ensaio em batelada para reação de oxidação de glicose ou xilose foram realizados em reator de vidro encamisado com capacidade para 100 mL, acoplado a banho termostático. Em cada ensaio, 20 mL da solução de substratos, preparados em tampão fosfato a $0,002 \text{ mol L}^{-1}$, e pH 7,0, foram adicionados ao reator juntamente com o biocatalisador e o sistema foi mantido a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação magnética. O produto formado, após determinado intervalo de tempo, foi quantificado por método titulométrico, hidroxilamina e/ou dinitrosalísílico (DNS).

Ensaio de síntese em reator contínuo do tipo tanque agitado (CSTR, continuous stirred tank type reactor)

Para o ensaio de oxidação de glicose em CSTR, foi utilizado o biocatalisador preparado pela ligação covalente de GOX em agarose-alginato, como descrito no item “Ligação covalente de GOX em esferas de agarose-alginato”. Um volume inicial de 25 mL de solução de glicose a 5 g L^{-1} , preparada em tampão fosfato a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, foi utilizado como substrato. Após ajuste da temperatura do meio reacional para $37 \text{ }^\circ\text{C}$, foi adicionado ao reator 0,5 g do biocatalisador. O avanço da reação nesse sistema foi monitorado por 192 horas, por meio da quantificação de glicose consumida, utilizando o método do DNS.

Ensaio de síntese em reator de leito fixo

Para o ensaio de oxidação de glicose ou xilose em reator de leito fixo, foram utilizadas duas formas do biocatalisador imobilizado: i) GOX ligada covalentemente a agarose-alginato, preparado como descrito no item “Ligação covalente de GOX em esferas de agarose-alginato”; ii) agregados de GOX aprisionados em alginato, preparado como descrito no subitem “Aprisionamento físico de agregados de GOX em esferas de alginato”. Soluções de glicose, xilose e hidrolisado de biomassa lignocelulósica foram preparadas em tampão fosfato a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e utilizadas como substrato para alimentação do reator. Uma massa de 15 g do biocatalisador, ou seja, 25,35 mg de GOX, foi introduzida no reator encamisado com temperatura ajustada para $37 \text{ }^\circ\text{C}$. O leito foi ajustado de maneira a não se fluidizar com a vazão de alimentação, mas sem que houvesse compactação do recheio. Nessa configuração, o reator apresentava volume total de 25 mL e volume útil de 3,5 mL (a diferença foi ocupada pelo biocatalisador). Foi utilizada uma vazão de alimentação ascendente. Após fechamento do reator, a solução de substrato foi bombeada nele, em vazões determinadas para cada ensaio. O reator foi operado por 18 dias sem interrupção, apenas com alteração da solução e da vazão de alimentação. O avanço da reação nesse sistema foi monitorado por meio da quantificação de glicose ou xilose consumida, com utilização do método do DNS, descrito no item “Quantificação de glicose ou xilose pelo método do ácido dinitrosalicílico”.

Resultados e Discussão

Imobilização de glicose oxidase

Para definição da melhor técnica de imobilização para GOX, de modo a se obter um biocatalisador estável e ativo, sete estratégias de imobilização de enzimas foram utilizadas, as quais são discutidas a seguir.

Aprisionamento físico em esferas de quitosana (T3)

O aprisionamento de GOX em esfera de quitosana foi conduzido conforme descrito no subitem “Aprisionamento físico de GOX em esferas de quitosana”. Nesse sistema, observou-se um lento processo de gelificação, o que levou ao escape de quase toda a carga enzimática oferecida ao suporte (Figura 2A). Além disso, as enzimas que permaneceram no interior das esferas não apresentaram atividade catalítica. O elevado valor do pH da solução de hidróxido de sódio e o longo tempo (15 minutos) necessário para a gelificação das cadeias de quitosana, associados à instabilidade da enzima nesse meio, inviabilizaram o uso dessa técnica para a imobilização de glicose oxidase.

Aprisionamento em esferas de quitosana na presença de glutaraldeído

Visando reduzir o escape de enzimas durante o processo de gelificação das esferas de quitosana, foi adicionado à solução de gelificação o agente bifuncional glutaraldeído, de acordo com procedimento descrito no item “Aprisionamento de GOX em esferas de quitosana na presença de glutaraldeído”. Esse composto reage instantaneamente com grupos amino e foi utilizado para promover o rápido entrecruzamento das cadeias de quitosana e enzimas na periferia da esfera. Comparado ao procedimento de imobilização descrito no subitem “Aprisionamento físico de GOX em esferas de quitosana”, cujo resultado está descrito no subitem “Aprisionamento físico em esferas de quitosana”, a concentração de hidróxido de sódio foi reduzida de 2 mol L^{-1} para $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, visando desacelerar a chegada do hidróxido de sódio ao interior da esfera, promovendo somente a gelificação na periferia desta. Esse procedimento foi realizado para evitar o escape e a inativação da enzima durante o processo de gelificação. A esfera obtida com esse proce-

dimento era semelhante ao ovo pochê, rígida na periferia e mole no interior (Figura 2B). Apesar de apresentar elevada estabilidade química, durante a aplicação desse biocatalisador na síntese de ácidos aldônicos, as esferas foram fragmentadas pelo sistema de agitação, liberando a enzima para o meio reacional. A estrutura rígida e quebradiça na periferia da esfera é consequência do tipo e da quantidade do agente de entrecruzamento utilizado. É provável que um reagente bifuncional com cadeia carbônica mais longa levasse a uma estrutura mais estável e flexível do biocatalisador, viabilizando, assim, a imobilização de glicose oxidase por essa técnica.

Quitosana é um biopolímero de baixo custo e com características químicas interessantes para uso como suporte para imobilização de enzimas. Entretanto, para a glicose oxidase, o lento processo de gelificação com hidróxido de sódio não permitiu o alcance de elevado rendimento de imobilização da forma ativa da enzima. Uma alternativa ao uso de hidróxido de sódio é o uso de tripolifosfato como agente de gelificação (İlgü et al., 2011), o que evitaria a inativação da enzima, mas ainda assim poderia haver escape da enzima devido à lentidão no processo de gelificação.

Uma alternativa para promover o rápido aprisionamento de GOX em condições brandas foi alcançada pela substituição da quitosana por alginato de cálcio. Os resultados obtidos são descritos a seguir.

Aprisionamento físico em esferas de alginato

Para o aprisionamento da glicose oxidase em esferas de alginato, foi utilizado o procedimento descrito no subitem “Aprisionamento físico de GOX em esferas de alginato”. Um esquema do biocatalisador obtido pode ser visto na Figura 2C. Por meio da quantificação de proteína na solução de gelificação, após a imobilização da enzima, observou-se um escape de aproximadamente 30% da enzima oferecida. A solução de gelificação foi substituída por uma nova solução de cloreto de cálcio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para verificar se o escape havia cessado e, após 12 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, sem agitação, ainda se observou escape de 2% em relação à quantidade inicial oferecida.

Durante o uso do biocatalisador na síntese de ácido xilônico em reator batelada, observou-se, por dosagem de proteína no meio reacional, que ainda houve escape da enzima. Isso ocorreu porque os íons cálcio, responsáveis por

manter as cadeias de alginato unidas, migraram para a fase aquosa, dissolvendo assim a esfera de alginato no meio reacional e liberando as enzimas.

Nesse procedimento, não foi possível evitar o escape da enzima a partir da esfera de alginato, mesmo quando a concentração de cloreto de cálcio no meio reacional foi mantida a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Devido à abertura entre as cadeias de alginato no meio reacional, houve migração das enzimas para a fase aquosa. Isso ocorreu, provavelmente, porque no meio reacional a solubilidade do cloreto de cálcio era de apenas $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e, sob esta condição, um maior afrouxamento das cadeias de alginato ocorreu, facilitando o escape das enzimas.

Ligação covalente da enzima a cadeias solúveis de quitosana e aprisionamento deste composto em esferas de alginato

Para evitar o escape de GOX das esferas de alginato, foram inseridas em sua estrutura, antes do seu aprisionamento físico, por meio de ligação covalente, cadeias de quitosana, conforme procedimento descrito no subitem “Aprisionamento de GOX quimicamente modificada com cadeias de quitosana em esferas de alginato”. O glutaraldeído funcionou como uma ponte ligando grupos amino na superfície da enzima a grupos aminos na cadeia de quitosana.

A quitosana utilizada neste estudo possui massa molecular média, entre 50 kDa e 150 kDa. Por se tratar de um polímero linear, é possível que uma ou mais enzimas, previamente ativadas com glutaraldeído, tenham sido ligadas a uma mesma cadeia de quitosana ou, ainda, que mais de uma cadeia de quitosana tenha se ligado a uma mesma enzima (Figura 2D). As ligações entre as enzimas e as cadeias de quitosana são irreversíveis e a estrutura tridimensional desse arranjo de moléculas é muito maior que a estrutura da enzima individualmente. Acredita-se que esse arranjo da enzima com cadeias de quitosana seja mais fortemente retido entre as cadeias de alginato.

Quando a solução que contém enzima ligada à cadeia de quitosana foi adicionada à solução de alginato, não foi possível homogeneizar a mistura, o que dificultou a confecção das esferas, pois isso levou ao entupimento do sistema de gotejamento, gerando esferas sem nenhum gel de quitosana e, conseqüentemente, sem enzima ou esferas com excesso do gel de quitosana

e pouco alginato. Além disso, também foi observado escape de enzimas para a solução de gelificação.

Acredita-se que essa estratégia tenha potencial de uso desde que sejam realizados ajustes na quantidade de quitosana em relação à enzima, o que facilitaria a homogeneização com as cadeias de alginato. Também poderia ser aumentado o tempo de contato da enzima com o glutaraldeído, pois em valor de pH 5,0 essa molécula torna-se menos reativa. Da mesma maneira, o tempo de contato da enzima ativada com solução de quitosana poderia ser aumentado, visto que não é possível elevar o valor do pH do meio, pois isso levaria à gelificação da quitosana antes de sua homogeneização com cadeias de alginato.

Devido ao elevado número de variáveis e à complexidade da estratégia de imobilização descrita acima, buscou-se uma estratégia mais simples e rápida, com menor número de etapas. Essa nova estratégia envolveu a formação de agregados da enzima e seu aprisionamento em esferas de alginato. Os resultados obtidos podem ser vistos no subitem a seguir.

Aprisionamento de agregados da enzima em esferas de alginato

O procedimento para o aprisionamento de GOX na forma de agregados (AGR) em alginato (ALG) está descrito no subitem “Aprisionamento físico de agregados de GOX em esferas de alginato”. Ao utilizar essa estratégia de imobilização, foi possível evitar o escape da enzima durante e após o procedimento de imobilização. Um esquema do biocatalisador produzido pode ser visto na Figura 2E.

O desempenho do biocatalisador formado pelo aprisionamento de agregados de GOX em esferas de alginato (AGR-GOX-ALG) em diferentes condições de reação é apresentado a seguir.

• Efeito do valor do pH na oxidação de glicose catalisada por AGR-GOX-ALG

Para avaliar se as enzimas imobilizadas haviam mantido a atividade após o processo de imobilização, os primeiros ensaios foram realizados com a utilização apenas de glicose como substrato, visto que GOX apresenta elevada afinidade por esse substrato, comparado à xilose, e isso implica maior sensibilidade da metodologia analítica utilizada para medir sua atividade.

Dados da literatura sobre glicose oxidase livre indicam que o valor do pH ótimo para a reação catalisada por essa enzima está entre 4,5 e 5,5. Entretanto, a enzima é capaz de atuar bem numa faixa de valores de 4,0 a 7,0 (Pazur et al., 1964). Os ensaios de oxidação de glicose a pH 5,0 e pH 7,0 com utilização de AGR-GOX-ALG indicaram melhor desempenho da enzima imobilizada em pH 7,0 (Figura 3), quando o avanço da reação é monitorado por titulador automático. A taxa de conversão a pH 7,0 foi, aproximadamente, quatro vezes maior que a taxa de conversão em pH 5. Portanto, ficou estabelecido o valor de pH 7 como o valor ótimo para os próximos ensaios de avaliação do biocatalisador.

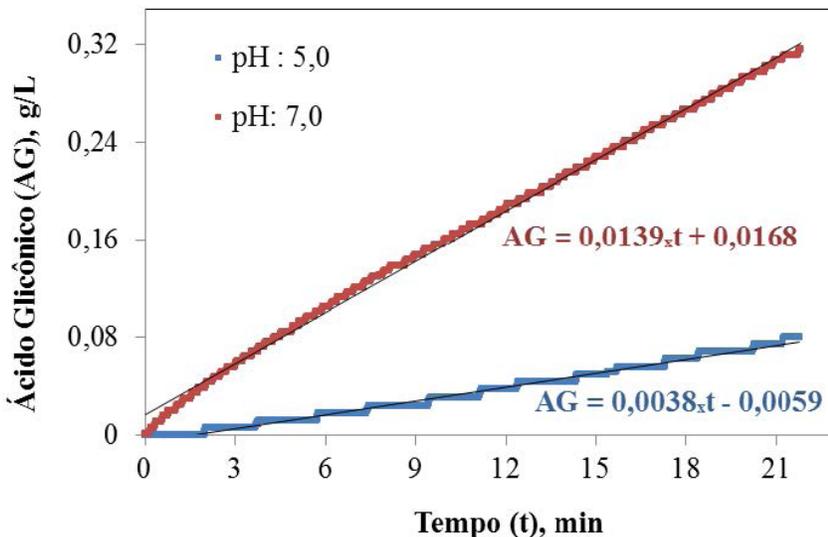


Figura 3. Efeito do valor do pH na síntese de ácido glicônico catalisada por AGR-GOX-ALG em reator encamisado, com temperatura controlada a 37 °C. O meio reacional foi composto por 20 mL de uma solução de glicose (10 g L^{-1}) e 0,25 g do biocatalisador. A linha azul é referente aos dados do ensaio realizado em pH 5,0; a linha vermelha, ao ensaio realizado em pH 7.

Não foi observado escape da enzima para o meio reacional durante os ensaios realizados para definir o valor ótimo do pH da reação. Isso indica que o tamanho dos agregados enzimáticos impediu a saída das enzimas das esferas de alginato, mesmo após o afrouxamento da estrutura das es-

feras de alginato devido à mudança de um ambiente com cloreto de cálcio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para um ambiente com menor concentração de cloreto de cálcio, ou seja, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

- **Efeito da concentração de glicose sobre o desempenho de GOX solúvel ou imobilizada (AGR-GOX-ALG)**

O efeito da concentração inicial de glicose sobre a produção de ácido glicônico foi avaliado com utilização de GOX na forma livre e imobilizada (AGR-GOX-ALG). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.

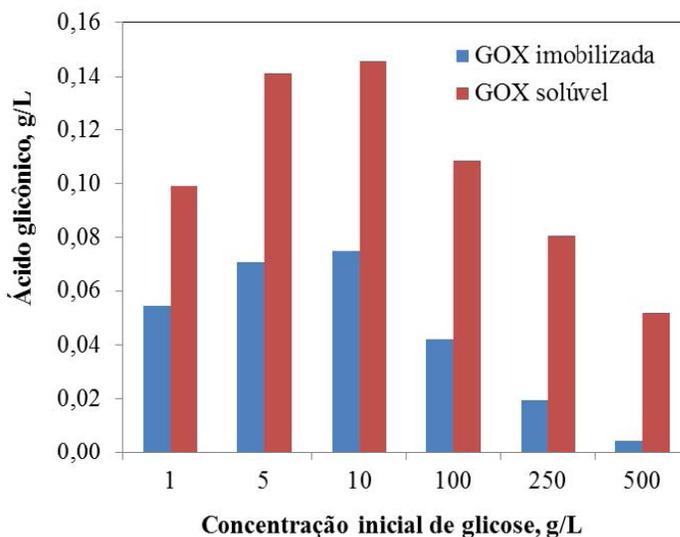


Figura 4. Efeito da concentração inicial de glicose sobre a produção de ácido glicônico catalisada por GOX solúvel (colunas vermelhas) e imobilizada (coluna azul). Os ensaios foram realizados por 15 minutos, em 20 mL de solução do substrato a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação magnética.

Tanto para a enzima solúvel quanto para a enzima imobilizada (AGR-GOX-ALG), observou-se maior velocidade de formação de ácido glicônico quando a concentração inicial de glicose foi de 5 g L^{-1} ou 10 g L^{-1} . Acredita-se que isso ocorreu porque, em concentrações abaixo de 5 g L^{-1} , ocorre escassez do

substrato, o que limita a velocidade máxima do processo, já concentrações muito acima de 10 g L^{-1} , por exemplo, 100 g L^{-1} , podem inibir a enzima. Além disso, o aumento da viscosidade do meio devido ao aumento da concentração de glicose também dificulta a homogeneização do meio reacional e, conseqüentemente, retarda a leitura do valor de pH no meio reacional e dificulta o acesso do substrato à enzima.

Esse resultado indicou que a escolha do reator e os ajustes na alimentação do substrato devem ser considerados para maximizar a produtividade do processo de síntese de ácidos aldônicos catalisada por GOX imobilizada.

• **Efeito da concentração do biocatalisador (AGR-GOX-ALG) sobre a oxidação de glicose**

Sabendo-se que a velocidade da oxidação de glicose catalisada por AGR-GOX-ALG é favorecida em pH 7,0 e concentração inicial do substrato de 10 g L^{-1} , uma avaliação da sensibilidade do método titulométrico foi realizada. Neste ensaio, a concentração inicial do substrato foi fixada e a quantidade de enzima imobilizada variou de $3,1 \text{ g L}^{-1}$ a 50 g L^{-1} . O aumento da concentração de ácido glicônico em função do tempo para cada ensaio pode ser visto na Figura 5.

Ao aumentar em 8 vezes a concentração do catalisador no meio reacional, de $0,6 (6,2 \text{ g L}^{-1})$ para $5\% \text{ m/v } (50,0 \text{ g L}^{-1})$, foi observado um aumento da taxa de produção de ácido glicônico de apenas 3,7 vezes. Uma carga de enzima relativamente baixa foi oferecida para o preparo de AGR-GOX-ALG, ou seja, 26 mg de enzima por grama do gel. Acredita-se que seria possível aumentar em pelo menos 10 vezes essa carga enzimática, visando reduzir a quantidade do biocatalisador e conseqüentemente o volume ocupado por este no reator, além de aumentar a produtividade de ácido glicônico, ou seja, a quantidade de ácido glicônico produzida por minuto por litro de reator. Por outro lado, o aparato utilizado no preparo das esferas de alginato neste trabalho só permite a produção de esferas com diâmetro de 1 mm em média. Embora uma alta carga de enzimas fosse imobilizada por grama do suporte, a dificuldade de acesso do substrato à enzima devido ao grande diâmetro da esfera poderia ser um fator limitante para aumentar a velocidade de oxidação da glicose e conseqüentemente a produtividade. Essa hipótese é reforçada, de acordo com os dados da Figura 5, visto que, ao aumentar a carga do catalisador em 8 vezes, a velocidade de produção de ácido glicônico só é

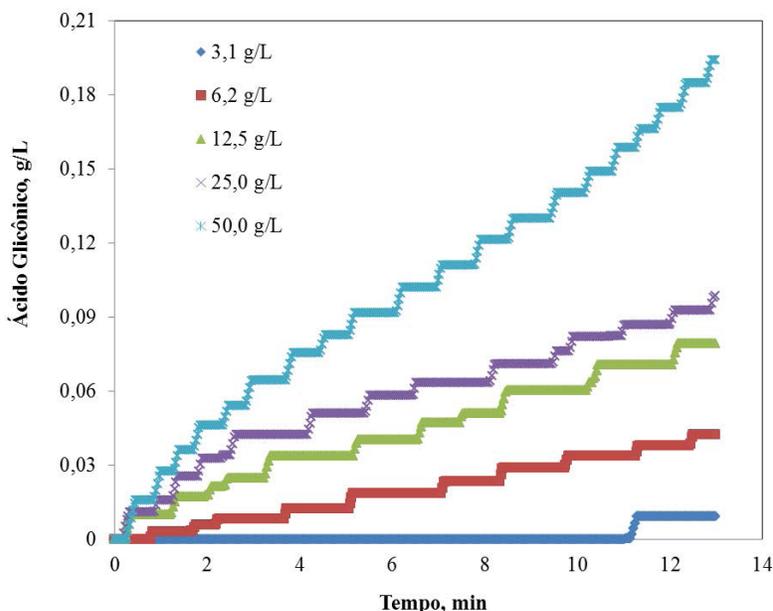


Figura 5. Efeito da concentração do biocatalisador AGR-GOX-ALG sobre a velocidade de oxidação da glicose. Neste ensaio, foram utilizados 20 mL de uma solução de glicose (10 g L^{-1}) como substrato. A reação ocorreu a 37°C e pH 7, sob agitação magnética.

aumentada em aproximadamente 4 vezes, mesmo com a utilização de um biocatalisador com baixa carga enzimática por grama do suporte. Isso ocorre porque algumas enzimas, especialmente as que estão localizadas no centro da esfera, não são alcançadas pelo substrato; ou seja, existe uma limitação na transferência de massa para esse sistema.

O aprimoramento desse biocatalisador envolve, portanto, o aumento da carga enzimática por grama do gel e a redução do diâmetro das esferas. Assim, concentrações em torno de 1% m/v do biocatalisador no reator poderiam ser utilizadas, com elevadas taxas de conversão.

• Avaliação de AGR-GOX-ALG na síntese de ácido xilônico

Para avaliar o desempenho de AGR-GOX-ALG na síntese de ácido xilônico, um ensaio com utilização de 20 mL de solução de xilose com concentração inicial de 10 g L^{-1} foi realizado a 37°C e pH 7,0, sob agitação magnética. A reação foi monitorada por 2 horas, utilizando-se o método titulométrico.

Durante a primeira hora de reação, alíquotas foram retiradas para que o monitoramento do avanço da reação fosse realizado também pelo método da hidroxilamina. Como controle para essa reação, um ensaio foi realizado com todos os componentes no reator, exceto xilose. Os gráficos produzidos a partir deste ensaio são apresentados na Figura 6.

A produtividade média estimada quando o ácido xilônico foi quantificado pelo método da hidroxilamina foi de $0,29 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ao quantificar o mesmo ácido por titulador automático, o valor de produtividade foi de $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, sendo medido um valor de $0,038 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ no controle da reação. Ou seja, a produtividade real de ácido xilônico determinada pelo método titulométrico foi, aproximadamente, $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A elevada interferência no método titulométrico deveu-se, provavelmente, à presença de ácidos graxos no hidrogel de alginato utilizado como suporte para a imobilização da enzima. Foi observado que, em tempos longos de reação, a produtividade do ácido xilônico no meio reacional com xilose é mantida, enquanto a produtividade da reação controle é gradativamente reduzida no início do ensaio e praticamente nula após longo tempo de reação, suportando a hipótese de que a acidez medida inicialmente no sistema controle pode ser o ácido graxo presente no suporte usado para imobilização da enzima.

Quanto à diferença das produtividades com utilização do método da hidroxilamina e titulométrico, é provável que neste último somente ácido xilônico tenha sido quantificado, enquanto que no método da hidroxilamina tenha sido detectado tanto o ácido xilônico quanto a xilonolactona, um intermediário da reação. Portanto, nessa condição operacional, é possível que o produto da oxidação da xilose (xilonolactona) tenha sido acumulado no meio reacional. A baixa produtividade em ambos os casos se deve à reduzida quantidade de enzima utilizada neste ensaio, que foi de $0,25 \text{ g}$ de esferas de alginato por ensaio.

Para solucionar o problema da baixa produtividade, o biocatalisador poderia ser preparado com maior quantidade de enzima por grama de hidrogel e menor diâmetro da esfera. Entretanto, antes de iniciar o preparo de um novo biocatalisador com carga enzimática mais elevada, foi feita uma avaliação da estabilidade operacional desse biocatalisador com baixa carga enzimática em reator batelada.

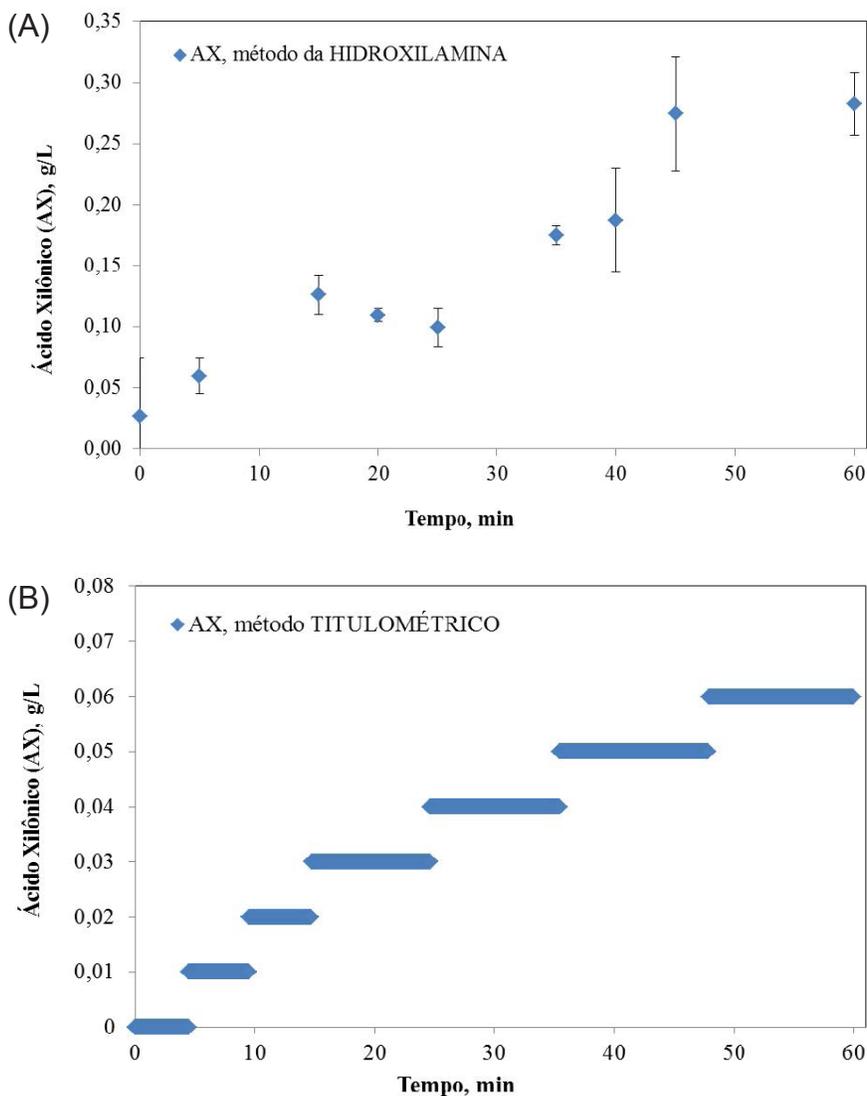


Figura 6. Síntese de ácido xilônico monitorada pelos métodos da hidroxilamina (A) e titulométrico (B). Foi utilizado como meio reacional 20 mL de uma solução de xilose (10 g L⁻¹). A reação ocorreu a 37 °C em valor de pH de 7,0, sob agitação magnética.

Um ensaio longo de oxidação de glicose (1.400 min de reação) foi realizado para avaliar a estabilidade química da enzima imobilizada no meio reacional.

Considerando a curva na Figura 7A, foi possível concluir que não houve uma redução significativa da taxa de conversão após quase 24 horas de reação.

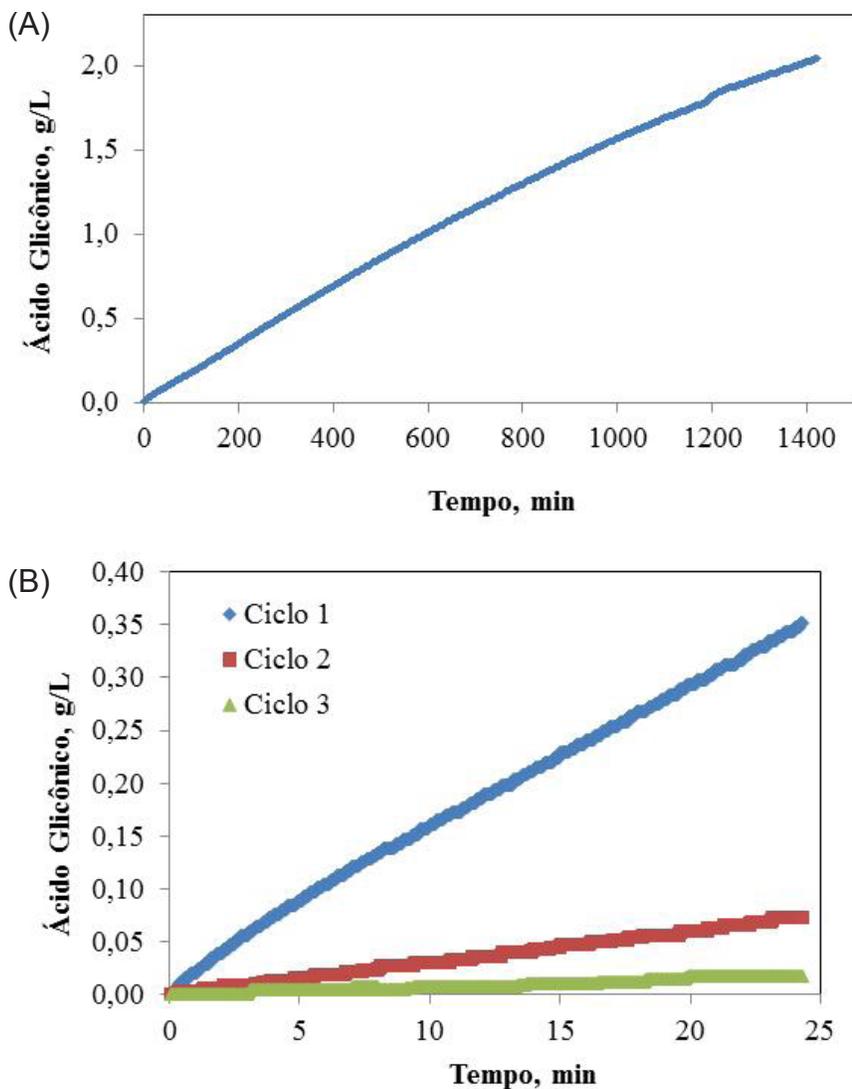


Figura 7. Síntese de ácido glicônico monitorada pelo método titulométrico em ensaio longo, 1.400 min (A) e ensaios curtos com reciclo, 24 min (B). Foi utilizado como meio reacional 20 mL de uma solução de glicose (10 g L^{-1}). A reação ocorreu a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH de 7,0, sob agitação magnética.

Para avaliar o potencial de reuso de AGR-GOX-ALG, foram realizadas reações sucessivas de síntese de ácido glicônico. A cada ciclo, o biocatalisador foi lavado com tampão para remover produtos da etapa anterior. Os resultados são apresentados na Figura 7B. No primeiro ciclo a taxa de conversão foi de $1,44 \mu\text{mol min}^{-1}$, no segundo ciclo essa taxa foi quase cinco vezes menor ($0,30 \mu\text{mol min}^{-1}$) e no terceiro ciclo quase 20 vezes menor que a taxa inicial. Essa perda brusca da atividade da enzima em sucessivos ciclos deveu-se à instabilidade física das esferas de hidrogel, as quais foram maceradas no sistema com agitação magnética, levando à liberação dos agregados imobilizados para o meio reacional e à perda da enzima durante a etapa de lavagem. Certamente, a lavagem das esferas com tampão promoveu a remoção de cálcio, o que as tornou mais susceptíveis à degradação no ciclo seguinte.

Para contornar o problema da instabilidade física observado em reator do tipo tanque agitado, o biocatalisador imobilizado foi aplicado em reator de leito fixo, onde não há agitação e, provavelmente, as esferas de hidrogel manteriam sua integridade física. O reator com o biocatalisador pode ser visualizado na Figura 8.

Foto: Dasciana Rodrigues



Figura 8. Foto do reator de leito fixo recheado com o biocatalisador AGR-GOX-ALG.

Os ensaios anteriores já haviam confirmado que a enzima estava imobilizada em sua forma ativa. Entretanto, o biocatalisador não apresentou estabilidade mecânica satisfatória em reator do tipo tanque agitado, como pode ser visto nos gráficos da Figura 7 por meio da drástica redução na taxa de produção de ácido glicônico a cada ciclo de reação.

Para os testes do biocatalisador AGR-GOX-ALG em reator de leito fixo, utilizou-se xilose como substrato, apesar da menor afinidade de GOX por esse composto. Isso foi feito porque, para qualquer resultado alcançado para xi-

lose, seria esperado que fossem melhores os resultados nessa mesma condição de ensaio, mas com utilização de glicose em vez de xilose.

As taxas de conversão de xilose em reator de leito fixo com utilização do biocatalisador AGR-GOX-ALG foram desprezíveis e, além disso, o biocatalisador sofreu degradação durante o uso, provavelmente pelo fato de que as esferas de alginato foram preparadas em cloreto de cálcio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e usadas em um meio reacional com concentração de cloreto de cálcio de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Essa instabilidade química não foi percebida no reator do tipo tanque agitado (batelada) porque a solução do substrato, preparada em cloreto de cálcio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, não era continuamente trocada ao longo da reação, como ocorre no reator de leito fixo. É possível que parte do cálcio tenha sido sequestrada no reator tanque agitado (batelada), mas a concentração de equilíbrio foi suficiente para manter a integridade das esferas. No reator de leito fixo, as esferas estavam sendo continuamente lavadas com a solução de cloreto de cálcio, cuja concentração era de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, que é uma concentração menor que aquela utilizada no preparo das esferas. Isso provavelmente promoveu maior remoção de íons cálcio da estrutura do hidrogel, causando a degradação do biocatalisador.

Apesar das vantagens da técnica de aprisionamento, como possibilidade de imobilizar elevadas cargas enzimáticas de maneira rápida e simples, os problemas relacionados à transferência de massa e instabilidade química, no caso da imobilização em alginato, levaram à busca de estratégias de imobilização covalente de GOX em suporte sólido. Os resultados obtidos da aplicação de duas estratégias de imobilização covalente em suporte sólido, utilizadas neste trabalho, são descritos nos subitens a seguir.

Ligação covalente de GOX em partículas de quitosana

A glicose oxidase foi imobilizada em gel de quitosana previamente ativado com glutaraldeído, segundo procedimento descrito no subitem “Ligação covalente de GOX em partículas de quitosana”. Um esquema desse biocatalisador pode ser visualizado na Figura 2F. A imobilização da enzima foi avaliada em dois valores de pH, 8,0 e 10,0. A imobilização da enzima ocorreu rapidamente em pH 10,0, porque os grupos aminos da enzima encontravam-se quase que totalmente desprotonados. Entretanto, nesse valor de pH ocorreu completa inativação da enzima.

Para o biocatalisador preparado em pH 8,0, era esperado que a reação de ligação da enzima ao suporte fosse mais lenta, sem ocorrer uma inativação drástica das enzimas. Ao testar esse biocatalisador na oxidação de xilose, observou-se que, após 24 horas de reação, a produção de ácido xilônico atingiu uma concentração de $8,3 \text{ g L}^{-1}$, equivalente a aproximadamente 70% de rendimento. Ao recuperar esse biocatalisador, submetê-lo a lavagem e utilizá-lo em um novo ciclo de oxidação de xilose, a concentração de ácido xilônico foi somente $0,2 \text{ g L}^{-1}$, aproximadamente 2% de rendimento. Isso indicou que a maior parte das enzimas estava somente adsorvida ao suporte, que elas atuaram na forma solúvel no primeiro ciclo de oxidação, levando a elevados valores de rendimento, e que foram removidas na etapa de lavagem, realizada antes do segundo ciclo de reação.

Neste estudo, as modificações no método descrito por Budriene et al., 2005 para o preparo e ativação do gel de quitosana foram: o aumento da concentração de quitosana e a redução na quantidade de glutaraldeído. Essas modificações podem ter levado a um menor grau de ativação do suporte e, conseqüentemente, GOX foi imobilizada preferencialmente por adsorção. Além disso, foi observado que a ausência de forma bem definida e a excessiva flexibilidade das partículas de quitosana levariam a problemas de empacotamento em reator de leito fixo, gerando caminhos preferenciais para a solução de substrato ou mesmo o entupimento e aumento de pressão. Considerando isso, uma nova estratégia foi utilizada para a imobilização de GOX, a qual é discutida a seguir.

Ligação covalente de GOX em esferas de agarose e alginato

Ao contrário do processo de gelificação de quitosana e alginato, que é alcançado pelo uso de um agente químico, hidróxido de sódio ou cloreto de cálcio, respectivamente, a gelificação de agarose ocorre por resfriamento.

Nesta etapa do estudo, esferas de agarose com alginato foram preparadas em um processo de cogelificação, como descrito no subitem “Ligação covalente de GOX em esferas de agarose-alginato”. Como a integridade do gel de alginato depende da presença de íons cálcio, era esperado que, ao lavar as esferas de agarose e alginato com água, o gel de alginato fosse dissolvido e fosse obtida uma estrutura esférica altamente porosa com apenas o gel de agarose. Isso favoreceria o aumento de área superficial, o que é

desejado para aumentar a carga de enzima imobilizada. Entretanto, após a lavagem dessas esferas de agarose e alginato com água, não se observou perda significativa de massa, indicando que o alginato não foi removido, provavelmente devido a uma forte interação entre os dois polímeros.

Após o preparo das esferas de agarose, as mesmas passaram por um processo de ativação que consistiu em inserir grupos reativos na superfície das esferas, para posterior ligação da enzima a esse suporte. O processo de ativação aplicado às esferas de agarose-alginato envolveu a inserção de um braço espaçador mais longo (glicidol-etilenodiamino-glutaraldeído) do que aquele descrito para a ativação de esferas de quitosana (glutaraldeído). Um braço espaçador — ou seja, uma estrutura química linear entre a enzima e o suporte — mais longo pode favorecer a imobilização, por minimizar prováveis problemas de impedimento estérico. Além disso, a metodologia de ativação utilizada permitiu a imobilização da enzima em pH 7,0, o que favoreceu a integridade da enzima e, conseqüentemente, manteve sua atividade catalítica.

A carga enzimática oferecida para a imobilização nos processos por encapsulamento foi de 25 mg de proteína por grama de suporte (esferas). No caso da imobilização covalente em esferas de agarose e alginato, somente 5 mg de proteína por grama de suporte foram utilizados, pois sabe-se que a enzima imobiliza-se somente na área superficial e apenas em regiões onde seja possível uma interação dos grupos aminos da enzima com os grupos aldeídos do suporte. Dessa maneira, uma carga enzimática muito menor de enzima foi imobilizada nas esferas de agarose-alginato quando comparada à carga enzimática imobilizada por aprisionamento físico. Contudo, a escolha dessa técnica para a imobilização de GOX se justifica pelo fato de a enzima adquirir elevada estabilidade operacional após a imobilização. Um esquema do biocatalisador obtido por essa técnica pode ser visualizado na Figura 2G.

Dos 5 mg de proteína oferecidos por grama de suporte durante o processo de imobilização, 23,5% foram imobilizados, de acordo com a dosagem de proteína feita no sobrenadante após a imobilização e na solução inicial da enzima utilizada para a imobilização.

Apesar da baixa carga enzimática imobilizada por grama do suporte, o biocatalisador obtido pela ligação covalente de GOX em esferas de agarose-alginato ativadas com glicidol-etilenodiamino-glutaraldeído (GOX-agarose) mostrou-se muito estável e foi utilizado para testes em dois tipos de reatores,

com utilização de três substratos diferentes (glicose, xilose e fração hemicelulósica de bagaço de cana).

Os primeiros testes para avaliação de GOX-agarose foram realizados em ensaios de oxidação de glicose com diferentes concentrações desse substrato, como 1, 5, 10 e 100 g L⁻¹, e utilização do método titulométrico para monitorar o avanço da reação em um reator batelada. Plotando-se a velocidade inicial das reações (Figura 9), em cada uma das concentrações avaliadas, observou-se que a enzima imobilizada apresentou comportamento michaeliano. Pode-se perceber que não houve aumento da velocidade de reação com o aumento da concentração de substrato de 10 para 100 g L⁻¹, o que sugere que a enzima atingiu sua condição de saturação, ou seja, todas as moléculas de enzima já estariam ligadas às moléculas de substrato.

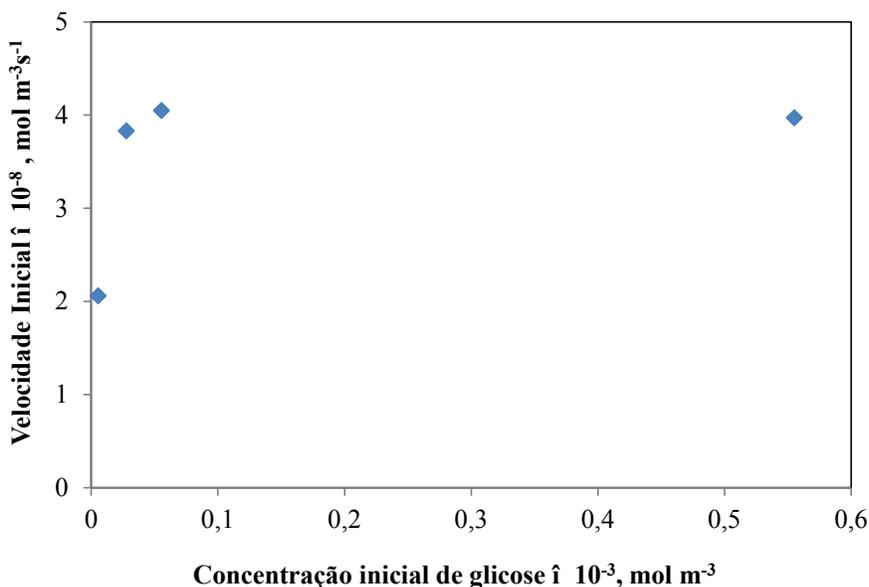


Figura 9. Velocidade inicial de síntese de ácido glicônico catalisada por GOX-agarose em função da concentração inicial de glicose.

A utilização adequada da Equação de Michaelis-Menten pode ser confirmada pelo fato de que ela é mais eficiente na descrição de processo no qual a concentração de enzima é pequena se comparada à concentração

do substrato, bem como para casos em que não há inibição da enzima pelo substrato. Para casos diferentes dos apresentados, a utilização de modelos mais elaborados faz-se necessária (Ribeiro, 1989).

Ao empregar-se a linearização de Lineweaver-Burk, obteve-se, então, os parâmetros cinéticos para o GOX-agarose, considerando-se uma cinética michaeliana. Foi determinado um $V_{\text{máx}}$ de $0,008 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e K_m de $1,10 \text{ g L}^{-1}$ (dados ajustados com coeficiente de correlação de 0,98). Após obtenção desses dados, o biocatalisador produzido foi avaliado em outros dois tipos de reator: reator contínuo do tipo tanque agitado (CSTR) e reator de leito fixo (PFR).

O reator de leito fixo (PFR), preferencialmente de fluxo ascendente para evitar empacotamento do leito, é o mais utilizado na catálise com emprego de enzimas imobilizadas, por apresentar alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação. Além disso, sabe-se que reações que obedecem à cinética de Michaelis-Menten apresentam maiores rendimentos em reatores de leito fixo ou fluidizado do que em reatores de mistura (Coelho et al., 2008). As principais desvantagens dessa configuração de reator são possibilidade de empacotamento do leito, criação de caminhos preferenciais e transferências insuficientes de calor e massa (Fernandes, 2010; Simões, 2011).

O reator CSTR, do tipo tanque agitado, apresenta a vantagem de garantir o melhor contato entre a enzima e o substrato, em função da agitação, maior versatilidade, inexistência de gradientes de temperatura e concentração, quando comparado a outros tipos de reatores, como, por exemplo, os reatores de leito fixo. No entanto, reatores de mistura, tipo CSTR, não são indicados para suportes frágeis (Chibata, 1978; Fogler, 2009). Na avaliação do processo de produção do ácido glicônico em CSTR, como era esperado, houve a gradual redução da conversão em função da cominuição das partículas imobilizadas e conseqüente arraste delas na vazão de saída. Após 72 horas de operação, a conversão havia sido reduzida a 16,7%, as partículas haviam se fragmentado e a avaliação do reator foi interrompida (Dados não mostrados). Para o biocatalisador GOX-agarose, o reator CSTR não se mostrou adequado, como previsto.

Para estimativa da influência da taxa de diluição (D) e da concentração de substrato na alimentação (S_0) sobre o grau de conversão da glicose ou

xilose empregada, foram utilizados os parâmetros cinéticos determinados anteriormente, combinados com a equação de projeto do reator, em estado estacionário, resultando na Equação 1.

$$X \cdot S_0 = K_m \cdot \ln(1-X) = V_{\max}/Q \quad (1)$$

Em que: X é a conversão do substrato (%), S_0 é concentração inicial do substrato (g L^{-1}), K_m e V_{\max} são os parâmetros cinéticos e Q é a vazão de alimentação (L h^{-1}).

Na Figura 10, pode-se observar a influência da concentração inicial de glicose na alimentação do reator (S_0) sobre a conversão em ácido glicônico, para diferentes valores de taxa de diluição. Esses perfis foram simulados com base nas condições mencionadas para o reator e no modelo cinético proposto. Nesta figura, observa-se que o aumento da concentração de glicose alimentada no reator promove uma expressiva queda da conversão. Quanto maior a taxa de diluição, maior esse efeito e, conseqüentemente, menor a conversão. Taxas de diluição maiores que $2,86 \text{ h}^{-1}$ indicaram condição de lavagem do reator, para os quais a conversão se aproximou de zero.

Os pontos apresentados na Figura 10, com seus respectivos desvios padrão em torno do ponto de estado estacionário, são dados experimentais que utilizam a mesma taxa de diluição da cor da linha. Pode-se observar que os dados experimentais estão em concordância com a simulação para as taxas de diluição avaliadas.

Diferenças entre os perfis simulados e pontos experimentais podem ser atribuídos a fatores como a existência de canais preferenciais no reator, interação enzima substrato deficiente, formação de película sobre as partículas de suporte, não consideração de efeitos de transferência de massa na simulação, perda de atividade ao longo da operação do reator (desnaturação, degradação microbiana), imprecisão na estimativa dos parâmetros e pequena oscilação na vazão de alimentação do reator.

Após os testes do biocatalisador GOX-agarose em reator CSTR, o desempenho deste também foi avaliado em reator PFR, empregando-se soluções de glicose, xilose e hidrolisado de biomassa como substrato e em uma mesma vazão de alimentação ($2,1 \text{ mL h}^{-1}$). Os resultados desses ensaios confirmam

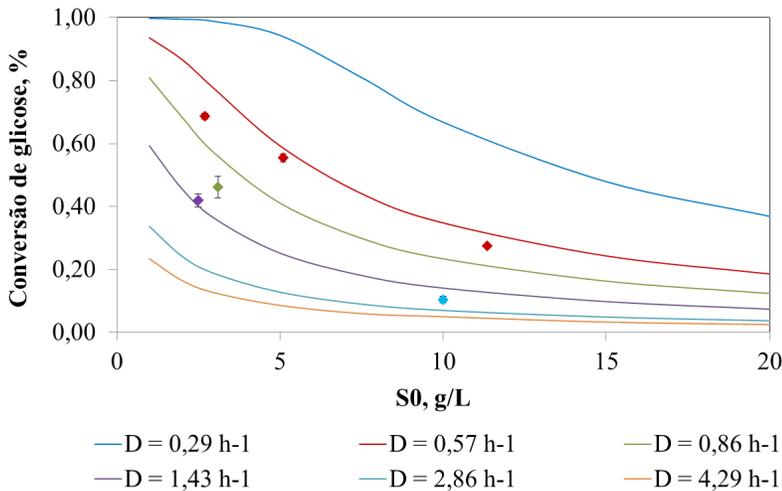


Figura 10. Efeito da concentração inicial de glicose na alimentação do reator (S_0) sobre a conversão de glicose em diferentes taxas de diluição.

a menor afinidade da enzima pela xilose. Após atingir estado estacionário, a reação com solução de glicose 5 g L^{-1} atingiu conversão de 55,5%, resultando em $3,05 \text{ g L}^{-1}$ de ácido glicônico. A solução de xilose numa mesma concentração atingiu, após estabelecimento do estado estacionário, conversão de 10,5%, ou seja, $0,58 \text{ g L}^{-1}$ de ácido xilônico produzido. A fração hemicelulósica de pré-tratamento por hidrólise ácida (solução com $1,08 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $3,92 \text{ g L}^{-1}$ de xilose), ou seja, o hidrolisado de biomassa, resultou na produção de $1,81 \text{ g L}^{-1}$ de ácidos glicônico e xilônico combinados, correspondente à conversão de 32,9% dos açúcares redutores alimentados. Essa menor afinidade de GOX por xilose também pode ser observada na Figura 11, que mostra as produtividades, em $\text{g de ácido L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, em função da variação da concentração de substrato (glicose, hidrolisado de biomassa ou xilose), para uma vazão fixa de $2,1 \text{ mL h}^{-1}$, em condição de estado estacionário.

A completa manutenção da atividade foi comprovada pela alimentação, no 18º dia, de uma solução com mesma concentração da alimentada no início da operação do reator, garantindo-se a mesma conversão.

A máxima conversão de glicose/xilose em ácidos aldônicos atingida neste estudo foi de 33%. Esse valor pode ser sensivelmente aumentado por meio

de melhorias no processo de imobilização, como, por exemplo, pelo aumento da carga de enzima imobilizada por grama de suporte, pelo preparo de partículas do suporte menores a fim de promover maior contato entre enzima e substrato e pela utilização de reciclo de parte da vazão de saída.

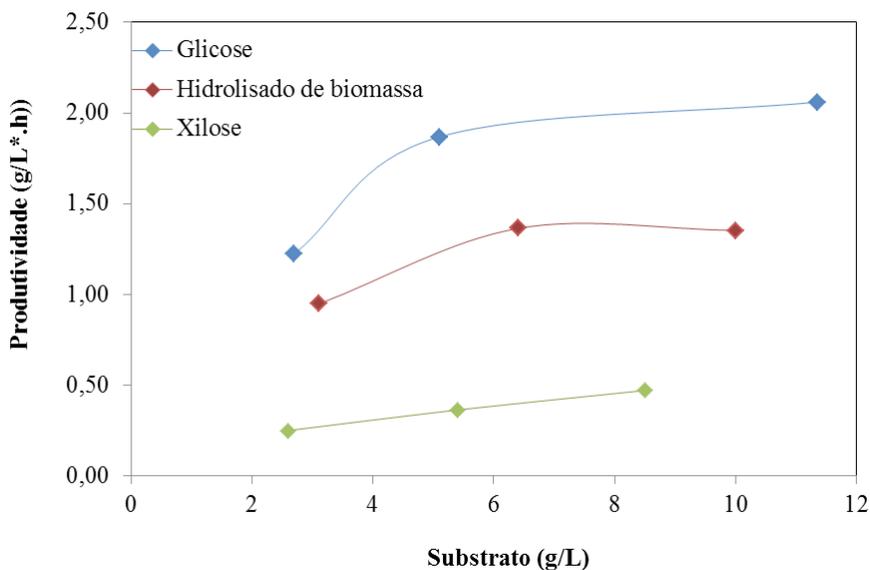


Figura 11. Dados da produtividade de ácido glicônico e xilônico em função do tipo e da concentração inicial de substrato para uma vazão fixa de $2,1 \text{ mL h}^{-1}$, em condição de estado estacionário.

Conclusões

A produção contínua de ácidos aldônicos a partir de hidrolisado de biomassa lignocelulósica é possível por meio do uso de glicose oxidase imobilizada. A ligação covalente de glicose oxidase em esferas de agarose-alginato, previamente ativadas com glicidol, etilenodiamino e glutaraldeído, permitiu a obtenção de um biocatalisador estável e ativo. O biocatalisador obtido pode ser utilizado por, no mínimo, 18 dias sem perda de atividade catalítica, mantendo uma taxa de conversão de 33% de açúcares em ácidos aldônicos.

Agradecimento

Ao Sistema Embrapa de Gestão, processo número 02.12.01.003.00.00 (Projeto C5-AGREGA).

Referências

- ABBASI, M.; AMIRI, R.; BORDBAR, A.-K.; RANJBAKHS, E.; KHOSROPOUR, A.-R. Improvement of the stability and activity of immobilized glucose oxidase on modified iron oxide magnetic nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 364, n. 28, p. 752-757, 2016.
- ABER, S.; MAHMOUDIKIA, E.; KARIMI, A.; MAHDIZADEH, F. Immobilization of glucose oxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and its application in the removal of acid yellow 12. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 227, n. 93, 2016. DOI 10.1007/s11270-016-2754-x.
- BALISTRERIA, N.; GABORIAUA, D.; JOLIVALTA, C.; LAUNAY, F. Covalent immobilization of glucose oxidase on mesocellular silica foams: characterization and stability towards temperature and organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 26–33, 2016.
- BANKAR, S. B.; BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; ANANTHANARAYAN, L. Glucose oxidase: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 489-501, 2009.
- BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 601–606, 2001.
- BUDRIENE, S.; GOROCHOVNA, N.; ROMASKEVIC, T.; YUGOVA, L. V.; MIEZELINE, A.; DIENYS, G.; ZUBRIENE, A. β -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v. 3, p. 95-105, 2005.
- CAO, Y., NIU, W., GUO, J., XIAN, M., LIU, H. Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: an efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass. **Scientific Report**, v. 5, p.18149, 2015. doi: 10.1038/srep18149.
- CHIBATA, I. **Immobilized Enzymes: research and development**. New York: John Wiley & Sons, 1978. 284 p.
- CHUN, B.W.; DAIR, B.; MACUCH, P. J.; WIEBE, D.; PORTENEUVE, C.; JEKNAVORIAN, A. The development of cement and concrete additive based on xyloonic acid derived via bioconversion of xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, n. 1-3, p. 645-658, 2006.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**, 1ª ed., Rio de Janeiro: EPUB, 2008.
- FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 1, 2010. doi:10.4061/2010/862537.
- FERRI, S.; KOJIMA, K.; SODE, K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 5, p. 1068-1076, 2011.
- FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4. ed. Curitiba: LTC, 2009.

GODJEVARGOVA, T.; DAYAL, R.; TURMANOVA, S. Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 950-956, 2004.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375-382, 1988.

İLGÜ, H.; TURAN, T.; ŞANLI-MOHAMED, G. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles as carrier for immobilization of thermophilic recombinant esterase. **Journal of Macromolecular Science - Part A**, v. 48, n. 9, p. 713-721, 2011.

JABLONSKI, J. E.; FU, T. J.; JACKSON, L. S.; GENDEL, S. M. Determination of protein levels in soy and peanut oils by colorimetric assay and ELISA. **Journal of AOAC International**, v. 93, p. 213-220, 2010.

LAFUENTE, R. F.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BATISTA, A.; GUISÁN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15 p. 546-550, 1993.

LIEN, O. G. Determination of gluconolactone, galactonolactone, and their free acids by hydroxamate method. **Analytical Chemistry**, v. 31, 1363-1366, 1959.

LIU, H.; VALDEHUESA, K.N.G.; NISOLA, G.M.; RAMOS, K.R.M.; CHUNG, W. J. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 244-248, 2012.

LIU, W.; WANG, P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 369-384, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, L. **Gluconic and xylonic acid production from lignocellulosic biomass by *Gluconobacter oxydans***. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de Auburn, Alabama.

LYR, H. Detection of a xylose-oxidase (xylose-O₂-transhydrogenase) in higher fungi. **Enzymologia**, v. 24, p. 69-80, 1962.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

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

MISLOVIČOVÁ, D.; PĀTOPRSTÝ, V.; VIKARTOVSKÁ, A. Enzymatic oxidation and separation of various saccharides with immobilized glucose oxidase. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 162, p. 1669-1677, 2010.

NIU, W.; MOLEFE, M. N.; FROST, J. W. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-butanetriol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 12998-12999, 2003.

PAZUR, J. H.; KLEPPE, K. The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Biochemistry**, v. 3, p. 578-583, 1964.

PEZZOTTI, F.; THERISOD, M. Enzymatic synthesis of aldonic acids. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2290-2292, 2006.

PUBChem. National Library of Medicine. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 27 março de 2019.

RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n 2, p. 185-195, 2006.

RAUF, S.; IHSAN, A.; AKHTAR, K.; GHOURI, M. A.; RAHMAN, M.; ANWAR, M. A.; KHALID, A. M. Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate–polymethylmethacrylate membrane. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 351–360, 2006.

RIBEIRO, E. J. **Estudo cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada**. 1989. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Campinas.

RICHARD, P.; WIEBE, M.; TOIVARI, M.; MOJZITA, D.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Manufacture of xylonic acid. United States Patent US2012/0005788A1. Depositante: Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus. WO 2010/106230 AI. Data de depósito: 17/03/2010.

SIMÕES, A. S. **Síntese enzimática de biodiesel a partir do óleo de babaçu pela rota etílica em reator de leito fixo**: estabelecimento das condições operacionais em meio isento de solvente. 2011. Dissertação (Mestrado em Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

TOIVARI, M.; VEHKOMÄKI, M. L.; NYGÅRD, Y.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M. G. Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 555–562, 2013.

TOIVARI, M. H.; NYGÅRD, Y.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M. G. Microbial D-xylonate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1-8, 2012.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1020-1025, 2007.

VAZ JUNIOR, S. (Ed.) **Biomass and green chemistry: building a renewable pathway**. Cham: Springer Nature, 2018. 248 p.

WANG, Y.; LIU, L.; LI, M.; XU, S.; GAO, F. Multifunctional carbon nanotubes for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose bioassay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 30, p. 107-111, 2011.

WERPY, T., PETERSEN, G. (Ed.) **Top value added chemicals from biomass**. Volume I: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. [s.l.]: Pacific Northwest National Laboratory (PNNL); National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2004. 74 p. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>>. Acesso em: 26 março 2019.

WIEBE, M.G.; NYGÅRD, Y.; OJA, M.; ANDBERG, M.; RUOHONEN, L.; KOIVULA, A.; PENTTILÄ, M.; TOIVARI, M. A novel aldose-aldose oxidoreductase for co-production of D-xylonate and xylitol from D-xylose with *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 9439-9447, 2015.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 832-837, 2004.

YANG, Y.; ZHU, G.; WANG, G.; LI, Y.; TANG, R. Robust glucose oxidase with a Fe₃O₄@C-silica nanohybrid structure. **Journal of Material Chemistry B**, v. 4, p. 4726-4731, 2016.

Zhou, X.; Lü, S.; Xu, Y.; Mo, Y.; Yu, S. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of xylonic acid using a compressed oxygen supply. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 196-199, 2015.

ZHU, J.; RONG, Y.; YANG, J.; ZHOU, X.; XU, Y.; ZHANG, L.; CHEN, J.; YONG, Q.; YU, S. Integrated production of xylonic acid and bioethanol from acid-catalyzed steam-exploded corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 1370-1381, 2015.

Embrapa

Agroenergia

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL