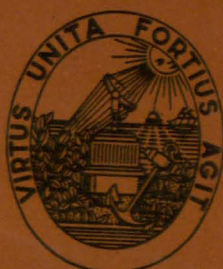


**Produção de dextrano e frutose a partir da sacarose
com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f).**

Mariana Mendes Lopes dos Santos

Novembro de 1999



**Produção de dextrano e frutose a partir da sacarose
com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f).**

Mariana Mendes Lopes dos Santos

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Tese de Doutoramento em Engenharia Química

Novembro de 1999

66(043)/SAN_m/RRO

UNIVERSIDADE DO PORTO	
Faculdade de Engenharia	
BIBLIOTECA II	
N.º	49014
CDU	
Data	08.05.2000

cat

**Produção de dextrano e frutose a partir da sacarose
com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f).**

Mariana Mendes Lopes dos Santos

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Tese de Doutoramento em Engenharia Química

Orientador: Professor Alírio Egídio Rodrigues

Co-orientador: Doutor José António Couto Teixeira

Resumo

O objectivo da tese é o estudo da produção de dextrano e frutose com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) usando a sacarose como substrato.

No início do trabalho apresentam-se uma introdução ao tema e as motivações para o trabalho. É feita uma revisão bibliográfica acerca da investigação que vem sendo feito nesta área.

Foi feito o estudo da fermentação batch de modo a determinar as condições óptimas para a produção de dextranos e frutose. Usou-se um fermentador de 1.5 litros com controlo de temperatura, pH e agitação. Foram testadas temperaturas entre 20 e 40°C, concentrações iniciais de sacarose na gama de 10 a 120 g/l, pH=6.9 e pH=5.5, e arejamento. As condições óptimas determinadas foram T=35°C, pH=5.5 e concentração inicial de sacarose de 20 g/l. Com os resultados obtidos fez-se um estudo da cinética da fermentação. O modelo proposto aproxima razoavelmente os resultados experimentais. Foi ainda estudada uma fermentação em fed-batch nas condições óptimas de temperatura e pH. O resultado obtido é semelhante ao obtido em batch. O modelo proposto é também uma boa aproximação dos resultados.

São apresentados alguns estudos comportamentais da bactéria. A evolução da relação azoto/carbono no meio de cultura ao longo da fermentação apresentou quebras coincidentes com quebras na velocidade de produção da enzima. A adição de aminoácidos nesses momentos permitiu obter uma relação azoto/carbono constante bem como melhorar a produtividade da enzima. O efeito da adição de açúcares complementares no meio de cultura foi também estudado. A lactose inibe a produção da enzima; a maltose favorece a síntese da enzima mas a velocidade de conversão da enzima é menor quando os níveis de maltose são semelhantes aos da sacarose; a galactose não altera os resultados. Os resultados apresentados foram confirmados repetindo as experiências com um aminoácido marcado com ^{14}C que foi incorporado na enzima sintetizada. O efeito dos açúcares no peso molecular dos dextranos

produzidos foi também estudado. A presença de maltose, lactose, galactose, ribose ou xilose no meio de cultura originou dextranos de pesos moleculares mais baixos.

A separação dos produtos da fermentação foi também estudada, usando-se um sistema de leito móvel simulado (SMB). Foram feitas experiências prévias da separação e reacção com separação (SMBR) da mistura glucose/frutose. Obtiveram-se purezas de extracto e refinado na ordem dos 65 e 75% respectivamente. Quanto à separação da mistura dextrano/frutose as purezas obtidas foram da ordem dos 75 e 80%.

Foram ainda feitos ensaios preliminares para a selecção de suportes adequados à imobilização da bactéria de modo a que se possa operar em contínuo. Embora a imobilização seja possível nalguns suportes há aspectos operacionais que não permitem o seu uso em contínuo. Foram testados géis de alginato e carragenina, suportes de sílica porosos, ardósia, lã de aço e cilindros de silicone.

Abstract

The general objective of this work is the study of the production of dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f).

A brief introduction to the theme is presented as well as the motivation for this work. The state of the art of the subject is addressed and then the determination of the optimum conditions in batch fermentation for the production of dextran and fructose were studied. A 1.5 l fermenter with temperature, pH and agitation control was used. Temperatures tested were between 20 and 40°C, initial sucrose concentration between 10 and 120 g/l; the pH values tested were 6.9 and 5.5. The optimum conditions were T=35°C, pH=5.5 and initial sucrose concentration of 20 g/l. The experimental results were used to develop a kinetic model of the process. The model gives a good description of the batch fermentation with *Leuconostoc mesenteroides*. A fed-batch fermentation was studied also. The working conditions were the same as the optimum pre-determined conditions. The fed-batch operation has similar performance compared to batch process and the proposed model gives also a good approximation of the experiment.

A basic knowledge of cell growth and microbial function is required to understand a biological system. The evolution of the nitrogen/carbon ratio along the fermentation was studied. A decrease in the rate of enzyme synthesis was observed when a decrease of the nitrogen/carbon ratio occurs. Addition of nitrogen pulses when the nitrogen/carbon ratio decreases allows a constant production rate of enzyme and lower fermentation time. The influence of complementary sugars in the metabolic aspects of fermentation was also addressed. Lactose inhibits enzyme production. Maltose favours the enzyme synthesis but the conversion of sucrose is lower when maltose levels are similar to sucrose. With galactose the yield is similar as in fermentation with sucrose only. All the results were confirmed by repeating the experiments using a radiotracer (¹⁴C phenylalanine) that was incorporated in the enzyme produced. The effect of complementary sugars on dextran molecular weight was also studied. The

presence of maltose, galactose, lactose, ribose or xilose in the culture media gave lower molecular weight dextran.

The separation of the products is presented. The system used was a simulated moving bed (SMB). Previous separation experiments were done with glucose/fructose mixtures. Inversion of sucrose and separation of glucose/fructose (SMBR) was also studied. The purities achieved were about 65 and 75% for extract and raffinate respectively. For dextran/fructose separation the purities obtained were about 75 and 80%.

Preliminary testes were done to select an adequate support for the immobilisation of the bacteria. Although the cell immobilization was possible in some cases there are operational aspects which prevent continuous operation.

Resumé

L'objectif de ce travail consiste en l'étude de la production du dextrane et de la fructose avec la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) employant la saccharose comme substrat.

Tout d'abord on présente une introduction au sujet et la motivation pour ce travail. Une revue bibliographique concernant ce thème de recherche est présentée.

On a étudié la fermentation batch de façon à déterminer les conditions les plus favorables pour la production de dextrane et de fructose. Un reacteur de fermentation avec une capacité de 1.5 litres et contrôle de température, pH et agitation a été utilisé. On a travaillé avec des températures comprises entre 20 et 40°C, concentration initiales de la saccharose de 10 à 120 g/l, pH=6.9 et pH=5.5, et aération. Les meilleures conditions sont T=35°C, pH=5.5 et concentration initiale de la saccharose 20 g/l. Avec les résultats obtenus on a réalisé une étude de la cinétique de la fermentation. Le modèle proposé représente assez bien les données expérimentales. On a étudié aussi une fermentation fed-batch. Les conditions expérimentales employées ont été celles décrites avant comme les meilleurs. Le résultat obtenu est très proche à celui du procédé batch. Le modèle proposé donne aussi des résultats très raisonnables.

En ce qui concerne l'étude de la croissance de la bactérie, l'évolution du rapport azote/carbone au long de la fermentation a permis de remarquer une décroissance de la vitesse de production de l'enzyme quand ce rapport se réduit. L'addition d'acides aminés a permis l'obtention d'un rapport azote/carbone constant aussi bien que d'améliorer la productivité de l'enzyme.

On a aussi étudié l'effet de l'addition de sucres complémentaires dans le métabolisme de la fermentation. La lactose empêche la production de l'enzyme. La maltose favorise la synthèse de l'enzyme mais la vitesse de conversion de la saccharose est réduite quand les niveaux de maltose et de saccharose sont similaires.

Avec de la galactose les résultats ne sont pas changés. Tous les résultats présentés ont été confirmés par répétition d'expériences avec un acide aminé avec 14 C qui avait été incorporé dans l'enzyme produit.

L'effet de sucres complémentaires dans la masse moléculaire du dextrane a été étudié. La présence de maltose, galactose, lactose, ribose ou xylose dans le milieu de culture origine du dextran avec une masse moléculaire plus faible.

La séparation des produits de la fermentation est aussi présentée. Elle a été étudiée utilisant une lit mobile simulé (SMB). Cette étude a été précédée d'expériences avec des mélanges de glucose/fructose. L'inversion de la saccharose et la séparation de glucose/fructose (SMBR) a été étudiée aussi. On a obtenu des puretés d'environ 65 et 75% pour l'extrait et pour le raffinat, respectivement. En ce qui concerne la séparation du mélange dextrane/fructose les puretés ont été environ 75 et 80%.

On a effectué aussi des essais préliminaires en vue la sélection de supports adéquats à l'immobilisation de la bactérie. Quoique l'immobilisation soit possible pour certains cas, il y a des aspects d'opération qui ne permettent pas l'opération en continue.

A meu Marido

A meus Pais

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Alírio Rodrigues, meu supervisor, a oportunidade que me deu de aprender um pouco mais na área da biotecnologia ao ter-me seleccionado para este trabalho. A sua competência e profundos conhecimentos científicos proporcionaram um grande dinamismo na execução dos trabalhos.

Desejo registar o meu reconhecimento ao Doutor José Teixeira pelas dicas preciosas de alguém que trabalha todos os dias na área da biotecnologia e pelo constante apoio. Agradeço também à Doutora Mary Lopretti, chefe internacional do projecto CYTED, em que a tese está inserida, pelas facilidades proporcionadas na Universidade da República em Montevideo e pelo acolhimento familiar num país tão distante.

Aos restantes professores do LSRE, em especial ao Doutor José Miguel Loureiro expresso a minha gratidão pela pronta disponibilidade e ajuda no esclarecimento de algumas dúvidas. À Doutora Eugénia Macedo agradeço toda a amizade. Para todos os colegas do LSRE e à Susana o meu agradecimento por palavras de apreço em momentos de desânimo e pela camaradagem. Ao colega Luís Pais pela cooperação nos trabalhos realizados no equipamento de leito móvel simulado.

Agradeço à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto a disponibilidade de meios necessários ao bom funcionamento e realização dos trabalhos realizados nesta tese de doutoramento. Ao projecto CYTED IV.7 “Produção simultânea de dextrano e frutose para uso industrial aproveitando resíduos agroindustriais” que permitiu aprofundar conhecimentos relacionados com a bactéria *L. mesenteroides* e os seus produtos de fermentação, o meu muito obrigado.

Para terminar, agradeço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo suporte financeiro através da bolsa Praxis XXI BD/5004/95 ao abrigo do sub-programa de Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio.

À minha família um reconhecimento muito especial.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
Resumo	I
Abstract	III
Resumé	V
Agradecimentos	VII
 Capítulo 1 Introdução	 1
1.1 Enquadramento do tema. Motivação.	2
1.2 Objectivos da tese.	6
Bibliografia	8
 Capítulo 2 Revisão Bibliográfica	 9
2.1 Efeito de algumas características do meio de cultura na produção da enzima extracelular dextranosacarase.	10
2.1.1 Manutenção da bactéria e inóculo	10
2.1.2 Condições nutricionais e características do meio de cultura	12
2.1.3 O pH na fermentação	13
2.1.4 Temperatura	14
2.1.5 Agitação e arejamento	14
2.2 Métodos analíticos.	16
2.2.1 Biomassa	16
2.2.2 Sacarose e fructose	17
2.2.3 Actividade da enzima	18
2.2.4 Determinação da concentração de dextrano	18
2.2.5 Determinação da viscosidade no meio de fermentação	23
2.2.6 Determinação do peso molecular dos dextranos produzidos	26
	 IX

2.3	Modelos cinéticos para a fermentação.	27
2.3.1	Introdução	27 —
2.3.2	Cinética do crescimento celular	28
2.3.3	Consumo de sacarose e produção da enzima dextranosacarase.	30
2.3.4	Cinética da enzima extracelular dextranosacarase.	33 ~
2.4	Produção de dextranos por imobilização da enzima dextranosacarase.	36
2.5	Produção de dextranos por imobilização da bactéria <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	37
2.6	Processos de separação por adsorção	40
2.6.1	Processos de separação por adsorção em contra-corrente.	40
2.6.2	Separação de misturas de glucose-frutose.	44
2.6.3	Degradação da sacarose com a dextranosacarase e separação do dextrano e da frutose.	46
2.7	Conclusões	46
	Bibliografia	48

Capítulo 3 Determinação das condições óptimas na fermentação.

3.1	Materiais e métodos	55
3.1.1	Instalação experimental.	55
3.1.2	Microorganismo, meio de cultura e preparação de inóculo	57
3.1.3	Métodos analíticos	58
3.2	Fermentação batch	59
3.2.1	Influência da temperatura na fermentação batch	61
3.2.2	Influência do pH na fermentação batch	63
3.2.3	Influência do arejamento na fermentação batch	65
3.2.4	Influência da concentração de substrato na fermentação batch	66
3.2.5	Modelo cinético para a fermentação batch.	69 ✧

3.3	Fermentação fed-batch.	81	✕
3.3.1	Modelo cinético para a fermentação fed-batch.	82	✓
3.4	Conclusões.	85	
	Bibliografia	89	

Capítulo 4 Estudos de engenharia metabólica, estudos reológicos e caracterização do peso molecular dos dextranos produzidos. 92

4.1	Estudo da relação Azoto/Carbono no meio de cultura durante a fermentação.	94
4.1.1	Produção de dextranosacarase	94
4.1.2	Produção de dextranosacarase em presença de marcadores radioactivos.	99
4.2	Produção de enzima, dextranos e fructose em presença de açucars complementares.	102
4.3	Caracterização do peso molecular dos dextranos produzidos.	107
4.4	Cinética da conversão da sacarose pela enzima dextranosacarase.	116
4.5	Estudo reológico da fermentação	118
4.6	Conclusões	122
	Bibliografia	124

Capítulo 5 Separação dextrano/frutose 127

5.1	Determinação de isotérmicas de adsorção de sacarose, glucose e frutose na resina de troca iónica AMBERLITE CR1320CA.	129
5.2	Determinação da cinética de inversão da sacarose.	139

5.3	Escolha da solução tampão a usar no sistema SBR para hidrolisar a sacarose com a enzima invertase.	144
5.4	Separação e reacção com separação de açúcares em SBR.	146
5.4.1	Separação em SBR de uma mistura glucose/frutose.	148
5.4.2	Inversão da sacarose e separação da mistura glucose/frutose num sistema SBR.	149
5.4.3	Separação da mistura dextrano/frutose.	151
5.5	Conclusões	158
	Bibliografia	160

Capítulo 6 Conclusões e sugestões para trabalho futuro.

6.1	Conclusões	163
6.2	Sugestões para trabalho futuro	166
	Bibliografia	168

APÊNDICES

Apêndice A - Fermentações batch: resultados experimentais e modelização cinética.	170
Apêndice B - Fermentação tipo: cromatogramas	276
Apêndice C - Peso molecular do dextrano produzido.	281
Apêndice D - Cromatogramas: Cinética da inversão da sacarose.	283
Apêndice E - Imobilização: Ensaios preliminares para selecção do suporte	293

Capítulo 1

Introdução

1 Introdução

1.1 Enquadramento do tema. Motivação.

A biotecnologia, entendida como a aplicação da tecnologia em sistemas que usem organismos vivos, constitui um factor chave não só no desenvolvimento e implementação de novos processos, bem como na melhoria de processos já existentes. Esses processos permitem a produção de um leque de novos produtos em indústrias alimentares (humanas e animais), farmacêuticas (vacinas e antibióticos), tratamento biológico de resíduos sólidos e de efluentes indesejáveis, produção de enzimas- que poderão ser usadas em todo o tipo de indústrias (curtumes, detergentes biodegradáveis, têxteis, etc.)- e muitas outras aplicações. Todavia, muitas vezes, os microorganismos podem também causar alterações indesejáveis em processos produtivos tais como os presentes na indústria de refinação de açúcar, na indústria têxtil (pelo ataque a corantes)e outras.

A figura 1.1 ilustra os componentes essenciais de um processo biotecnológico.

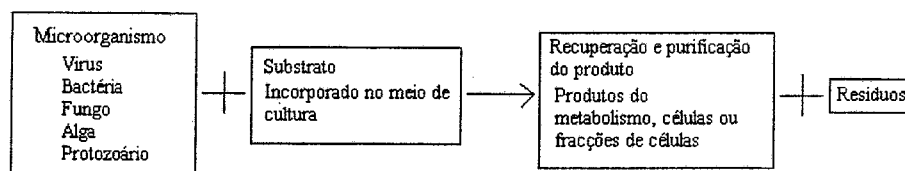


Figura 1.1 - Componentes essenciais de um processo industrial microbiológico.

Cientistas, industriais e políticos de países desenvolvidos, e até de países menos industrializados, reconhecem que no século XXI a biotecnologia afectará positivamente a vida de milhões de pessoas. Estimativas de 1992 nos Estados Unidos da América e na União Europeia (Nielsen e Villadsen, 1994) são unânimes em prever que a biotecnologia proporcionará muitas oportunidades de emprego (cerca de dois milhões na União Europeia até ao ano 2000) relacionados com a biotecnologia e um mercado mundial no valor de 50 a 100 biliões de U. S. dollars.

Pode dizer-se que a fermentação é o processo base da biotecnologia e da engenharia bioquímica. A palavra fermentação deriva do Latim, do verbo *fervere*, que descreve a acção da levedura em extractos de frutas durante a produção de bebidas alcoólicas (Walker e Gingold, 1988). Em termos processuais a palavra fermentação significa qualquer processo para a produção de um ou mais produtos através da cultura de microorganismos. É nesta perspectiva que, neste trabalho, vamos interpretar a palavra fermentação.

O aproveitamento de resíduos agro-industriais, ricos em sacarose, para produção de produtos com alto valor comercial é um bom exemplo de um processo biotecnológico. Neste trabalho a fermentação em estudo trata do consumo do açúcar corrente (sacarose) pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) para produzir a enzima extracelular dextranosacarase, que, por sua vez, degrada também a sacarose para produzir dextranos e frutose.

O amplo campo de aplicações para os dextranos e também para a frutose, assim como o seu elevado valor comercial, motivam a melhoria de um processo de fermentação que é conhecido e utilizado desde há décadas na produção destes dois açúcares.

Dextrano é o nome dado a um polissacárido de glucose de origem bacteriológica produzido por microorganismos que excretam a enzima dextranosacarase. Os dextranos são os mais antigos polissacáridos solúveis em água de origem biológica conhecidos pelo homem. Com largo campo de aplicação na indústria farmacêutica e como substituto do plasma sanguíneo (Koepsell e Tsuchiya, 1952), são também muito utilizados na indústria alimentar, na manufactura de filmes fotográficos, como meio cromatográfico e ainda como condicionador de solos (Shamala e Prasad, 1995).

Estruturalmente, os dextranos são hoje definidos como α -D-glucanos resultantes da polimerização da glucose, em que 95 % das ligações glicosídicas existentes são $\alpha(1-6)$ (figura 2.1).

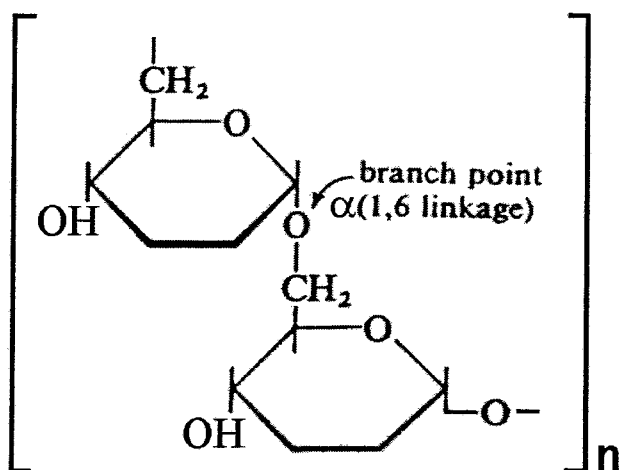
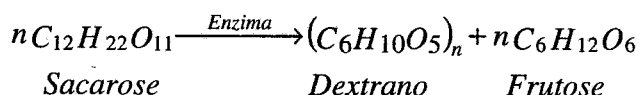


Figura 2.1 - Esquema da molécula de dextrano. Unidades de glucose com 95% de ligações $\alpha(1-6)$.

A enzima extracelular responsável pela produção de dextranos, a dextranosacarase, pode ser produzida por bactérias do género *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*; sendo no entanto, a mais utilizada em pesquisa a *Leuconostoc mesenteroides* (Barker e Ajongwen, 1991). A sacarose é o único substrato conhecido capaz de induzir nesta estirpe a elaboração da enzima extracelular dextranosacarase que actuando sobre o excesso de substrato (sacarose) produzirá o polissacárido:



Kim e Robyt (1994a e 1994b) e Kitaoaka e Robyt (1998a e 1998b) produziram e seleccionaram mutantes da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) que excretam grandes quantidades de enzima dextranosacarase. No entanto esta estirpe mutada não se adequa ao trabalho que se pretende fazer uma vez que a produção da enzima dextranosacarase só se dá em meios glucosados. Os resíduos agro-industriais a aproveitar contém altas percentagens de sacarose e não de glucose.

Além dos dextranos existe ainda neste processo um outro produto da fermentação com elevado valor comercial, a frutose. Conhecido como açúcar de baixo valor calórico é muito importante uma vez que pode ser ingerido por doentes de diabetes.

Também o “culto do corpo” e do bem estar físico deu origem a produtos dietéticos que muitas vezes contêm frutose na sua composição.

Para ter uma ideia da importância comercial destes dois produtos podem observar-se na tabela 1.1 preços praticados no mercado durante o ano de 1999.

Tabela 1.1 - Preços de mercado aproximados (em 1999) de alguns produtos puros ou derivados do dextrano e da frutose.

Produto	Preço (PTE)
Frutose para alimentação (edulcorante) 1Kg	1730
Frutose Cristalina 1Kg	5000
Dextrano com peso molecular entre 5,000,000 e 40,000,000 1Kg	27500
Dextrano com peso molecular entre 60,000 e 90,000 uso clinico 1Kg	100000
Dextrano com peso molecular entre 60,000 e 90,000 uso industrial 1Kg	55700
Dextrano com peso molecular de cerca de 70,000 uso clinico 1Kg	220000
Blue dextran 10 gr	30000
Esferas de dextrano sulfatado, para cromatografia 10 gr	13000
DEAE Sephadex, para cromatografia troca aniónica 10 gr	5700
CM Sephadex, para cromatografia troca catiónica 10 gr	5700
Sephadex, para cromatografia filtração por gel 10 gr	11300
Substitutos do plasma sanguíneo e de fracções proteicas do plasma, dextrano 70,000 em solução aquosa de NaCl, 1 L	2500 (preço hospitalar)

1.2 Objectivos da tese.

O objectivo desta tese é a produção de dextranos e frutose a partir da sacarose usando a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f).

No capítulo 2 apresenta-se o “estado da arte” relativamente a este tema.

A cultura de microorganismos pode resultar na produção de um leque variado de metabolitos. Para produzir um determinado metabolito, o organismo em questão tem que crescer em condições precisas e conhecidas. Conhecer as condições óptimas de crescimento da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) torna-se, desta forma, indispensável para que se possa produzir dextrano e frutose, constituindo, por isso, um dos objectivos deste trabalho. Uma vez conhecidas essas condições existe a necessidade de conhecer a cinética da fermentação em estudo.

No capítulo 3 é apresentado o estudo feito para determinação das condições óptimas de crescimento celular e de produção da enzima dextranosacarase. Foram feitas experiências batch variando o pH do meio, temperatura, concentração inicial de sacarose e arejamento com vista à obtenção da cinética de fermentação. Estudou-se ainda uma fermentação fed-batch.

É importante conhecer o comportamento da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) em situações em que o meio de cultura apresenta condições diferentes das estipuladas como sendo as óptimas. No capítulo 4 são feitos alguns estudos do comportamento da bactéria em presença de pulsos de aminoácidos ao longo da fermentação e em presença de fontes secundárias de carbono. Testes comparativos dos resultados foram efectuados com marcadores radioactivos.

Como se trata da produção de um polímero biológico é importante conhecer a evolução da viscosidade na fermentação. O estudo reológico ao longo da reacção e a caracterização do peso molecular dos dextranos produzidos são também motivo de estudo. A cinética de conversão de sacarose pela enzima dextranosacarase foi também determinada.

A separação dos produtos da fermentação é também um dos objectivos deste trabalho. Depois de fermentado, o meio de cultura passa a uma mistura constituída essencialmente por biomassa (células), dextrano e frutose. Antes de pensar em separar o dextrano da frutose é necessário separar a biomassa do meio fermentado, podendo então, o meio livre de células ser utilizado para separar os dois produtos. No capítulo 5 estão apresentadas as experiências de separação realizadas em leito móvel simulado (SMB). Começou-se por fazer a determinação de isotérmicas de adsorção da sacarose, glucose e frutose na resina usada. Fizeram-se experiências prévias de separação da mistura glucose/frutose para, de seguida, ser feita a reacção (inversão da sacarose) e a separação na mesma unidade (SMBR). O estudo cinético da inversão da sacarose foi também efectuado. Finalmente passou-se ao estudo da separação da mistura dextrano/frutose. Numa primeira fase foi separada uma mistura preparada a partir dos produtos puros e, finalmente, efectuou-se a separação da mistura dextrano/frutose resultante da fermentação.

Minimizar custos na produção é, obviamente, um objectivo muito importante em qualquer processo. Assim, imobilizar as células de modo a que no final da fermentação não se encontrem livres no meio de cultura é um método eficaz na eliminação de uma centrifuga na instalação industrial. Ensaios preliminares foram também realizados de modo a que se possa seleccionar um suporte adequado para a imobilização da bactéria ou da enzima dextranosacarase.

Referências bibliográficas

- Barker, P. E.; Ajongwen, N. J.; 1991, "The production of the enzyme dextran sucrose using nonaerated fermentation techniques", *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 703-707. ^[3]
- Kim, D.; Robyt, J.; 1994a, "Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucanases.", *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 659-664.
- Kim, D.; Robyt, J.; 1994b, "Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextran sucrose.", *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1010-1015.
- Kitaoka, M.; Robyt, J.; 1998a, "Use of a microtiter plate screening method for obtaining *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucanase.", *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 527-531.
- Kitaoka, M.; Robyt, J.; 1998b, "Large-scale preparation of highly purified dextran sucrose from a high producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC.", *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 386-391.
- Koepsell, H. J.; Tsuchiya, H. M.; 1952, "Enzymatic synthesis of dextran", *J. Bact.*, 63, 293-295. ^[1]
- Nielsen, J.; Villadsen, J.; 1994, "Bioreaction Engineering Principles.", Plenum Press, New York.
- Shamala, T. R.; Prasad, M. S.; 1995, "Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc* spp.", *Process Biochemistry*, 30, 237-241. ^[2]
- Walker, J. M.; Gingold, E.B.; 1988, "Molecular Biology & Biotechnology", 2nd Edition, The Royal Society of Chemistry, London, Great Britain.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo é apresentado um resumo de trabalhos efectuados e resultados obtidos por outros autores em experiências realizadas com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) com o fim de estudar o efeito de algumas características do meio de cultura na produção da enzima extracelular dextranosacarase.

Métodos analíticos utilizados para determinação de sacarose, frutose, dextrano, enzima e biomassa pelos diversos autores são também expostos neste capítulo; tal como métodos de determinação de pesos moleculares dos dextranos e viscosidade do meio de cultura fermentado.

Um resumo da modelização cinética desta fermentação feita por outros autores é também apresentada neste capítulo, tal como resultados obtidos na fermentação efectuada quer com a enzima imobilizada quer com a bactéria imobilizada.

2.1 Efeito de algumas características do meio de cultura na produção da enzima extracelular dextranosacarase.

Apresentam-se estudos sobre o efeito das condições do meio de cultura no crescimento da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* e na produção da enzima extracelular dextranosacarase.

Consideram-se como factores importantes as condições nutricionais, as condições de arejamento e agitação, temperatura e pH do meio de cultura, e o estado fisiológico e manutenção da bactéria.

2.1.1 Manutenção da bactéria e inóculo

Na generalidade a bactéria é vendida em pellets liofilizadas bem acondicionadas em ampolas de vidro e a activação é feita segundo instruções do fornecedor. Começa-se por quebrar a ampola aquecendo-a à chama e vertendo umas gotas de água fria na

zona aquecida. Depois da ampola aberta dilui-se a pellet em 5 ml de MRS Broth previamente esterilizado (ou MRS Líquido, não contém Agar) e deixa-se hidratar as células durante cerca de 20 minutos. Convém salientar que MRS é um meio de cultura standard desenvolvido por De Mann, Rogosa e Sharpe (1960), para bactérias produtoras de ácido láctico e a sua composição típica encontra-se na tabela 2.1.

Depois de hidratadas as bactérias são inoculadas na superfície de slants estéreis de MRS Agar e deixam-se por um período de cerca de 16 horas a incubar a uma temperatura de 25 a 30° C.

Depois de activada a bactéria é mantida em rampas estéreis de MRS Agar a 4° C. Os slants podem manter-se assim entre 8 e 10 semanas e ao fim desse período deverão preparar-se e inocular-se slants frescos para garantir a viabilidade das células.

Sempre que se faz a re-inoculação em slants de MRS Agar deve fazer-se um teste à viabilidade celular. Para isso basta inocular algumas placas de petri que contenham MRS Agar previamente esterilizadas e incubá-las cerca de 16 horas a uma temperatura entre 25 a 30° C. Deverão aparecer à superfície colónias de bactérias circulares brancas ou acinzentadas que indicam a presença da estirpe em boas condições.

No que diz respeito ao inóculo, representa geralmente cerca de 1 a 2 % do volume total de trabalho. Testes preliminares mostraram que volumes de inóculo superiores aceleram a fermentação mas diminuem a produção da enzima extracelular dextranosacarase (Barker e Ajongwen, 1991).

Em geral são usados como inóculo meios cultivados com a bactéria e que foram deixados a fermentar durante 16 a 24 horas. O meio de cultura utilizado no inóculo é o MRS Broth.

Tabela 2.1 - Composição do meio de cultura standard MRS.

Produto*	Concentração (g/l)
Peptona	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levedura	4.0
Glucose	20.0
Hidrogenofosfato de potássio	2.0
Tween 80	1.0
Hidrogeno citrato de amónia	2.0
Acetato de Sódio	5.0
Sulfato de magnésio	0.2
Sulfato de manganésio	0.04

* O MRS Agar contém ainda 14.0 g/l de Agar-Agar.

2.1.2 Condições nutricionais e características do meio de cultura

A fermentação necessita de sacarose no meio de cultura sendo a concentração ideal de 2 % (w/v) (Koepsell e Tsuchiya, 1952; de Man *et al.*; 1960) tendo em conta a necessidade de separar a biomassa do resto do meio. Para concentrações em sacarose superiores a viscosidade do meio devido ao dextrano produzido dificulta a separação da biomassa.

O meio de cultura deverá ainda conter uma fonte de azoto e vitaminas e ainda uma fonte de fosfatos sendo cada uma fornecida ao meio adicionando respectivamente Extracto de Levedura e Na_2HPO_4 .

Pode adicionar-se também um pouco de uma solução rica em sais (R) embora esta não seja usada quando o objectivo final é passar para níveis industriais de produção de dextranos e frutose uma vez que iria encarecer o processo sem que a produção de dextranos e frutose fosse melhorada (Landon e Webb, 1990).

Na tabela 2.2 referem-se as concentrações de cada um dos reagentes utilizados habitualmente neste tipo de fermentação.

Tabela 2.2 - Composição do meio de cultura

Sacarose	20 g/l
Extracto de Levedura	20 g/l
Na ₂ HPO ₄	10g/l
R*	0.5 % (v/v)

* R: MgSO₄ . 7H₂O, 4.0 g; NaCl, 0.2 g; FeSO₄ . 7H₂O, 0.2 g; MnSO₄ . H₂O, 0.2 g; água destilada até 100cm³.

2.1.3 O pH na Fermentação

Apesar das altas concentrações de fosfatos usadas, o pH do meio de cultura baixa durante o processo fermentativo de um valor inicial de cerca de 7.0 a 7.2 até um valor final de 4.2 - 4.3 (Tsuchiya *et al.*, 1952; Veljkovic *et al.*, 1992). Não se deve deixar a fermentação avançar até um pH inferior a 5.0 uma vez que a enzima é facilmente desactivada. O pH a que a enzima é mais estável é 5.2 (Tsuchiya *et al.*, 1952; Alsop, 1983) mas os índices de produção da enzima extracelular são mais elevados entre pH 6.0 e 6.9 (Tsuchiya *et al.*, 1952).

Conclui-se que o pH óptimo para a bactéria produzir a enzima está entre 6.0 e 6.9 mas por sua vez o pH óptimo para a manutenção da mesma está entre pH 5.0 e 5.5 (Barker *et al.*, 1993).

O pH de 6.7 tem sido largamente aceite como o pH óptimo para a produção desta enzima extracelular. Experiências realizadas a pH controlado (Lazic *et al.*, 1993) a 6.7 e 5.5 resultaram em níveis de actividade da enzima semelhantes mas, recentemente, Lazic *et al.* (1993) mostraram que a produção de dextranos é favorecida se se proceder ao controlo de pH para 5.5 (com NaOH, 5M) e com determinadas condições de arejamento (0.05 vvm de ar).

Desta experiência resultou um aumento de 10 % nos níveis de dextrano produzido e uma redução no tempo de fermentação de cerca de duas horas relativamente às experiências tradicionais (de 16 para 14 horas), isto é, sem arejamento nem controlo de pH. Estes resultados podem ser observados na tabela 2.3.

2.1.4 Temperatura

A estirpe *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) cresce entre os 5 e os 30° C, estando no entanto a temperatura óptima de crescimento entre os 25 e os 30° C.

Sabe-se também que nesta gama de temperaturas a enzima é facilmente desactivada, dependendo do pH do meio.

2.1.5 Agitação e arejamento

Pioneiros no estudo deste tipo de fermentação (Landon e Webb, 1990; Barker *et al.*, 1993) consideraram o género *Leuconostoc mesenteroides* como sendo microaerofílico. No entanto hoje em dia é sabido que o oxigénio afecta positivamente o crescimento da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (Johnson e McCleskey, 1957; Plihon *et al.*, 1995; Lebrun *et al.*, 1994).

Foram feitos estudos preliminares (Tsuchiya *et al.*, 1952; Barker *et al.*, 1993) mostrando que culturas agitadas dão consistentemente melhores resultados do que culturas estagnadas. Veljkovic *et al.* (1992) estudaram o efeito da velocidade de transferência de massa do oxigénio na produção da enzima extracelular dextranosacarase em fermentações batch sem controlo de pH. Os resultados obtidos relativamente à velocidade máxima de captação de O₂ pela bactéria podem ver-se na tabela 2.4.

Concluíram que a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* requer um nível óptimo de excesso de energia na fase biótica para o seu crescimento. Esse excesso de energia é fornecido como oxigénio.

*Tabela 2.3 - Parâmetros da fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes condições de operação (concentração inicial de sacarose, 125 g/l; inóculo, 2.5 % v/v)*

Parâmetros	Condições de operação ^a		
	Sem arejamento Sem controlo de pH	Com arejamento Sem controlo de pH	Com arejamento Com controlo de pH
Velocidade específica de crescimento, h ⁻¹	0.26 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01
Velocidade de produção máxima de enzima, h ⁻¹	0.82 ± 0.01	0.90 ± 0.04	0.93 ± 0.01
Velocidade de produção de dextrano, g/l/h ^b	6.10 ± 0.0	6.30 ± 0.1	6.60 ± 0.2
Nível máximo de enzima, DSU/ml	19.3 ± 2.1	28.5 ± 0.5	27.5 ± 2.6
Nível máximo de dextrano, g/l	48.3 ± 2.9	49.7 ± 1.1	54.9 ± 2.0
Duração da fermentação, h ^c	16	14	14

^a Com arejamento: velocidade de agitação, 200 rpm; velocidade de arejamento, 0.05 vvm.

Sem arejamento: velocidade de agitação, 200 rpm; velocidade de arejamento, 0 vvm.

Com controlo de pH: a 5.5 por adição de NaOH

Sem controlo de pH: pH inicial a 6.9-7.0

Os valores apresentados são médias de três experiências realizadas.

Os valores de níveis máximos são medidos na fase final das três fermentações.

^b A reacção de síntese do dextrano é considerada como sendo pseudo ordem zero.

^c Duração da fermentação até se alcançar o nível máximo de dextrano.

Tabela 2.4 - Resultados obtidos relativamente à velocidade máxima de captação de O₂ pela bactéria (Veljkovic et al., 1992)

Velocidade máxima de captação de O ₂ pela bactéria	1.02 mmol/l/h
Velocidade de agitação	150 rpm
Velocidade de arejamento	0.05 vvm

Por vezes o excesso de energia leva a que as células procurem fontes de alimento alternativas e recorram à enzima extracelular, usando-a como nutriente.

Lazic *et al.* (1993) estudaram mais tarde o efeito combinado do arejamento e controlo de pH na produção de dextranos com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. Na tabela 2.3 apresentam-se os resultados obtidos. Conclui-se que o arejamento da cultura pode reduzir o tempo de fermentação em duas horas e portanto aumentar produtividades. O nível máximo de dextrano obtido com arejamento é 1.4 g superior ao obtido sem arejamento. O nível máximo obtido para a produção de enzima sofre também um aumento mas mais significativo: de 19.3 DSU/ml para 28.5 DSU/ml.

2.2 Métodos analíticos.

2.2.1 Biomassa

A determinação da concentração de biomassa é feita indirectamente através da medição da densidade óptica do meio de cultura. Usando uma curva de calibração previamente determinada relaciona-se a densidade óptica com o peso seco das células e obtém-se a concentração celular do meio.

Em geral o comprimento de onda utilizado está entre os 590 e os 620 nm. O mais adequado será usar aquele a que a absorção do meio de cultura antes de inoculado seja mínima.

Para a determinação da curva de calibração são dois os métodos mais usados. O mais largamente utilizado é o método de filtração. Colocam-se alguns filtros (0.2 μm) a secar em estufa a 90° C e quando a massa for constante registam-se os valores. Filtram-se volumes conhecidos de algumas amostras com diluições diferentes. A densidade óptica destas amostras foi previamente lida. Voltam a colocar-se os filtros na estufa a 90° C até peso constante e por diferença obtém-se a quantidade de células em cada solução. Antes de cada pesagem deve ter-se o cuidado de deixar arrefecer as membranas em excicador para não haver contaminações com humidade.

Outro método que poderá ser usado, descrito por Lebrun *et al.* (1994) refere que a biomassa pode ser colhida por centrifugação do meio de cultura. A pellet formada no fundo do tubo deve ser lavada com água e novamente centrifugada. Despreza-se o

sobrenadante e volta-se a adicionar água para suspender as células. Verte-se a suspensão para um vidro pré-pesado e deixa-se secar em estufa a 105° C até peso constante.

Segundo Lawford *et al.* (1979) os métodos acima descritos não são fiáveis uma vez que existem interferências na massa final obtida a partir do momento em que a biossíntese de dextranos começa. Para ultrapassar este problema Lawford *et al.* (1979) determinaram a concentração de biomassa através do conteúdo total em proteínas.

Pode ainda determinar-se a quantidade de células viáveis no meio de cultura, ou por contagem de colónias desenvolvidas em caixa de petri, ou por determinação da quantidade de ATP libertada pela amostra.

A grande maioria dos autores considera o erro obtido em determinações de biomassa por peso seco praticamente desprezável, não fazendo sequer referência ao facto de que a presença do dextrano poderá influenciar os resultados.

2.2.2 Sacarose e frutose

O método de DNS, ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959) é usado para determinação de açúcares redutores. Assim pode determinar-se o teor de frutose e de seguida usando a enzima invertase converter a sacarose em glucose e frutose e mais uma vez determinar o teor em açúcares redutores.

Como método alternativo a este e mais eficiente pode usar-se um sistema de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), com uma coluna de troca iónica e um detector de índice de refacção.

O eluente utilizado é H₂SO₄ 0.005 N, a um caudal de 0.3 ml/min. O eluente deve ser previamente filtrado com membranas de 0.2 µm usando um sistema de vácuo e desgaseificado. A desgaseificação pode ser feita por agitação durante a filtração ou fazendo-se passar uma corrente de hélio durante cerca de 3 minutos. Obtém-se assim os picos referentes ao dextrano, à sacarose e à frutose. Fazendo-se previamente a

injecção de padrões pode determinar-se o tempo de retenção de cada açúcar bem como as áreas correspondentes de cada concentração.

2.2.3 Actividade da enzima

Na generalidade todos os autores seguem o método descrito por Tsuchiya *et al.* (1952) para determinação da actividade da enzima extracelular dextranosacarase. Assim a uma amostra do meio de cultura é ajustado o pH entre 5.0 e 5.5, intervalo onde a enzima é mais estável, e é adicionado substrato (sacarose) até obter uma concentração de 10%. Deixa-se reagir à temperatura de 30° C durante uma hora.

Uma unidade de dextranosacarase é definida como a quantidade de enzima que converte um miligrama de sacarose em dextrano (libertação de 0.52 mg de frutose) durante uma hora (DSU). Alguns autores usam como definição de unidade, a quantidade de enzima que produz uma micromole de frutose por minuto (U) e a equivalência entre elas será $1\text{DSU}=1/21\text{ U}$.

2.2.4 Determinação da concentração de dextrano

A grande maioria dos autores recorre a métodos gravimétricos para determinar a concentração de dextranos. Os dextranos produzidos neste tipo de fermentação são solúveis em meio aquoso. Com a adição de um solvente orgânico, geralmente álcoois observa-se a formação de floculos brancos de dextrano.

Na tabela 2.5 estão referidas algumas variações nos métodos usados por alguns autores.

Barker e Ajongwen (1991) analisaram a produção de dextranos com um sistema de HPLC, com uma coluna de troca iónica e um detector de índice de refração. A figura 2.1 mostra os resultados obtidos ao fim de 100 minutos de incubação de uma solução de sacarose com a enzima dextranosacarase.

Tabela 2.5 - Tipos de solvente e percentagens usadas por alguns autores para precipitação de dextranos de baixo peso molecular

Autores	Solvente (S)	S/amostra (v/v)
Shamala e Prasad, 1995	Etanol absoluto	1/1
Landon e Webb, 1990	Etanol 85 %	2/1
Veljkovic <i>et al.</i> , 1992	Etanol 96 %	----
Lebrun <i>et al.</i> , 1994	Etanol absoluto	2/1

De 20 em 20 minutos foram retiradas amostras que foram imediatamente mergulhadas em água fervente para desnaturar a enzima e assim parar a reacção. É notório o aumento da área do pico de dextrano ao longo dos 100 minutos e por sua vez a redução da área do pico de sacarose. Quanto aos picos 1 e 2 mantêm-se constantes ao longo da reacção e foram identificados como leucrose e manitol (Barker *et al.*, 1993). Pennel e Barker (1992) usaram também este procedimento na determinação da concentração de dextranos.

Também Scott e Melvin (1953) se dedicaram ao estudo da determinação da concentração de dextranos. O método usado baseia-se na reacção de uma solução de antrona em H_2SO_4 com a amostra que contém o dextrano durante 16 minutos e a $90^\circ C$. Forma-se uma cor verde que é medida em espectrofotómetro a 625 nm.

A antrona é um aromático que se apresenta na forma de um pó cristalino de cor amarela e absorve na zona do ultravioleta e do visível. Existem alguns problemas de contaminação neste método. O comportamento do polissacárido (dextrano) é semelhante ao comportamento das *moléculas* resultantes da sua hidrólise (glucose) em presença da solução ácida de antrona. Os resultados obtidos apresentados nas tabelas 2.6 e 2.7 são prova de isso.

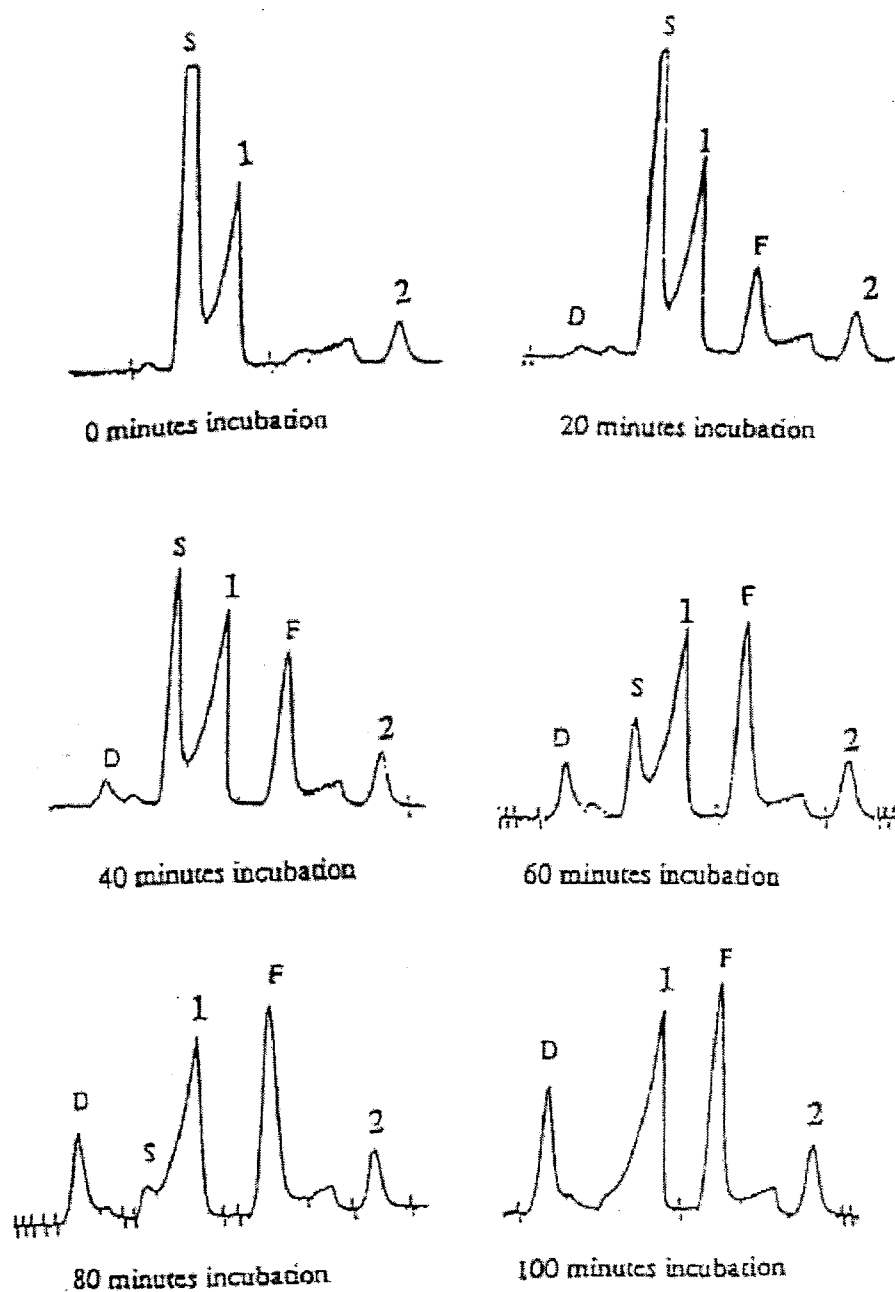


Figura 2.1 - Perfis de dextrano (D), frutose (F), e sacarose (S). Os picos 1 e 2 são Leucrose e Mannitol que estão presentes na enzima.

Tabela 2.6 - Comparação dos resultados obtidos na reacção da glucose e do dextrano com o reagente ácido de antrona. Variação da absorvância com o tempo de aquecimento (90° C, 75 % H₂SO₄) (Scott e Melvin, 1953).

Tempo de aquecimento (Minutos)	Absorvância a 625 nm (célula de 1 cm)	
	Glucose (3.00 mg/100 ml)	Dextrano (2.70 mg/100 ml)
10	0.485	0.484
14	0.536	0.536
16	0.543 ^a	0.548 ^a
18	0.541	0.542
20	0.534	0.537
24	0.511	0.510

Tabela 2.7 - Comparação dos resultados obtidos na reacção da glucose e do dextrano com o reagente ácido de antrona. Amostras aquecidas simultaneamente durante 16 minutos (90° C, 75 % H₂SO₄) (Scott e Melvin, 1953).

Absorvância a 625 nm (célula de 1 cm)		
	Glucose (3.00 mg/100 ml)	Dextrano (2.70 mg/100 ml)
	0.581	0.572
	0.569	0.569
	0.569	0.573
	0.572	0.581
	0.570	0.568
	0.570	0.575
	0.573	0.575
	0.575	0.573
	0.574	0.575
	0.572	0.572
	0.571	0.573
Média	0.5724 ^a	0.5732 ^a

^a O reagente de antrona usado nas experiências da tabela 2.6 tinha alguns dias enquanto que o reagente usado nas experiências da tabela 2.7 era preparado de fresco.

Daqui se depreende que não deverão haver contaminações por glucose nas amostras a analisar. É preciso ter em atenção contaminações por frutose uma vez que esta desenvolve a cor verde característica quando misturada com o reagente ácido de antrona em banho de água fria.

A curva de absorção obtida é idêntica em forma mas 20 % acima da curva obtida para o sistema glucose-antrona aquecido durante 16 minutos a 90° C.

Aquecendo o sistema frutose-antrona durante 16 minutos e a 90° C a absorção diminui para cerca de 94 % da absorção do sistema glucose-antrona e isto pode ser usado como factor correctivo. Existem ainda outras fontes de erro que pontualmente poderão não ser significativas mas em conjunto poderão provocar a existência de erros consideráveis.

Essas fontes são essencialmente a instabilidade do reagente antrona, a variação do tempo de aquecimento e da temperatura do banho, a variação da concentração do ácido no reagente antrona, a variação na elevação de temperatura quando se mistura a amostra com o reagente ácido de antrona, a estabilidade da cor e perdas por evaporação durante o período de aquecimento. Acredita-se que a principal fonte de erro neste método é a presença de impurezas em forma de carboidratos. A presença de 1 ou 2 µg de um carboidrato estranho ao sistema provocará cerca de 1 % de erro nos resultados.

Na tabela 2.8 pode ver-se o efeito de alguns materiais em determinações de concentrações de dextrano com o reagente ácido de antrona.

Tabela 2.8 - Efeito da materiais estranhos na determinação da concentração de dextranos com o reagente ácido de antrona.

Substância	Conc. da substância	Erro, %
Ácido acético	1	- 3.7
	0.3	- 1.1
Acetona	2.5	- 1.5
	1	< 1
Benzeno	saturado a 20 %	- 1.1
Ácido Benzoico	saturado a 80 %	+ 3.4
	saturado a 20 %	< 1
Butanol	0.08	- 9.1
	0.008	- 1.5
Etanol	3	+ 3.3
	1	< 1
Fenol	0.0006	- 3
	0.0001	< 1
Sulfato de Sódio	0.32	< 1

Conc. de substância: Gramas de substância / 100 ml de solução de dextrano.

Solução de dextrano: 3 mg de dextrano por 100 ml de água.

O sinal negativo indica um erro por defeito e o sinal positivo indica um erro por excesso.

2.2.5 Determinação da viscosidade no meio de fermentação

Quando se trabalha com concentrações de substrato (sacarose) muito elevadas a viscosidade do meio de fermentação resultante é também muito elevada tornando a análise e o controlo do processo muito complicados. Numa tentativa de ultrapassar este problema, Landon *et al.* (1993) monitorizaram as propriedades reológicas do meio de fermentação com o tempo e relacionaram-nas com outras variáveis do processo.

O estudo reológico do meio foi considerado por várias razões:

- i) A viscosidade do meio é dependente da concentração de dextrano e portanto um bom “marcador” da síntese de dextrano.
- ii) As leituras de viscosidade são obtidas com tratamentos da amostra mínimos permitindo análises mais rápidas e fiáveis podendo ainda permitir monitorização on-line.
- iii) A monitorização das propriedades reológicas do dextrano produzido deverá permitir um melhor controlo das propriedades do produto final de baixo peso molecular.

O comportamento reológico de soluções que contenham dextrano depende de um número de parâmetros incluindo a presença ou não de algumas moléculas que possam influenciar o peso molecular do dextrano produzido (“acceptor”), e a temperatura do meio de fermentação.

Tecante *et al.* 1986 observaram que temperaturas de fermentação mais baixas dão origem a soluções menos viscosas e mais newtonianas por redução do peso *molecular* do dextrano produzido. No entanto Choplin e Sabatie (1986) mostraram que o dextrano produzido a temperaturas mais baixas é menos ramificado e como resultado mais viscoso. Infelizmente neste caso a massa molecular média não foi determinada.

As experiências realizadas por Landon *et al.* (1993) estão esquematizadas nas figuras 2.2 e 2.3. O meio de fermentação continha uma concentração de sacarose de 200g/l, a temperatura de operação foi de 26°C e o pH controlado a 7.2. Não se recorreu a qualquer forma de agitação. Para recolha de amostras, 20 frascos foram inoculados em paralelo e em cada amostragem recolhia-se um frasco completo. Este tipo de amostragem provoca algumas variações bruscas nos resultados.

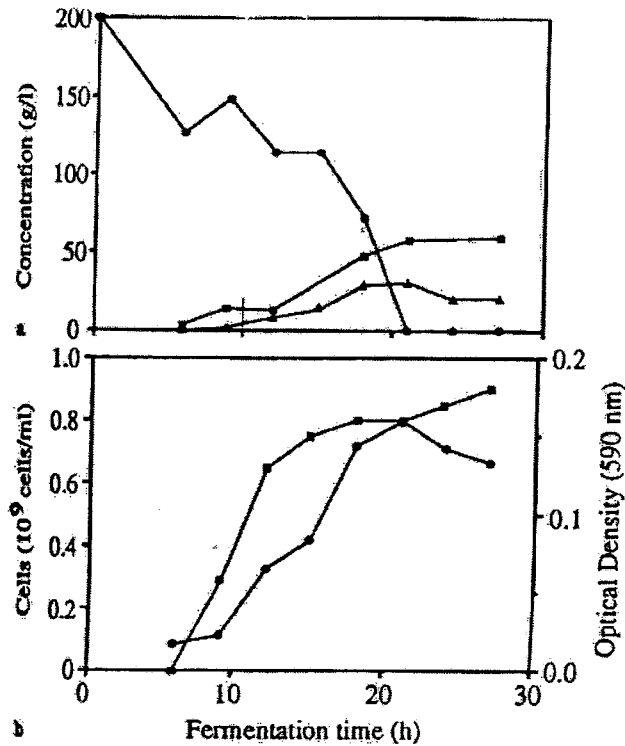


Figura 2.2.a. Curva de fermentação batch representando a variação de dextrano (■), sacarose (●) e frutose (▲) ao longo da fermentação. b. Curva de fermentação batch mostrando número de células (■) e densidade óptica (●) (Landon et al., 1993). A concentração de sacarose foi de 200 g/l, o pH controlado a 7.2 e a temperatura foi de 26°C.

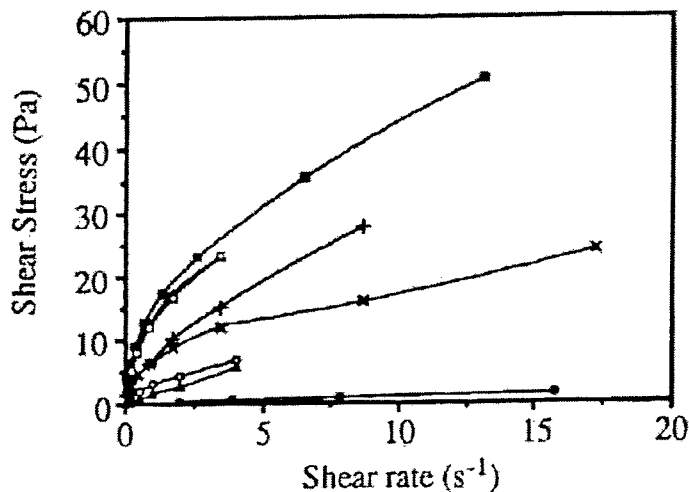


Figura 2.3. Reogramas das amostras colhidas na fermentação esquematizada na figura 2.2: ●, 9h; ○, 12h; ×, 14h; ■, 18h; □, 20h; +, 25h; ▲, 44h (Landon et al., 1993)

Para um fluido newtoniano, a viscosidade é constante sendo obtida a partir da razão entre a tensão e a velocidade de corte:

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

em que μ é a viscosidade (Pa.s), τ é a tensão de corte (Pa) e $\dot{\gamma}$ é a velocidade de corte (s^{-1}).

Para um fluido não-newtoniano esta razão não é constante, variando com a velocidade de corte aplicada na amostra e como resultado têm-se a viscosidade

aparente
$$\mu_{ap} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Se se observar a figura 2.2 verifica-se que o meio de cultura às 9 horas de fermentação tem uma concentração de dextrano de cerca de 10 g/l. Esta solução apresenta um comportamento newtoniano.

A partir deste ponto as amostras apresentam um comportamento pseudo-plástico em que a viscosidade aparente diminui com o aumento da velocidade de corte.

2.2.6 Determinação do peso molecular dos dextranos produzidos

A caracterização de distribuição de tamanhos de macromoléculas pode ser feita usando cromatografia por exclusão de tamanhos (size exclusion chromatography, SEC). O caudal de um solvente é usado para forçar a passagem de uma amostra de um polímero em solução através de colunas contendo enchimentos de materiais porosos. As moléculas mais pequenas do polímero contidas na amostra ficam retidas no enchimento durante mais tempo pois têm maior acesso ao volume de fluido do que as moléculas maiores, as moléculas de polímeros são separadas de acordo com o seu tamanho hidrodinâmico com as moléculas maiores a serem eluídas antes das mais pequenas. Usa-se um sistema de HPLC com um detector de índice de refração.

Alguns problemas têm ocorrido, ao longo dos anos, na análise SEC de polímeros com grande peso molecular ou seja macromoléculas com tamanho hidrodinâmico maior que 10 nm. Estes problemas são:

- 1-falta de material eficiente para enchimentos,
- 2-a adsorção das macromoléculas
- 3-a degradação das moléculas maiores por tensão
- 4-a fraca capacidade de detectar a presença do polímero na corrente que sai da coluna
- 5-por último, dificuldades de calibração devido à falta de standards de polímeros de grande peso molecular.

Lundi e Hester (1986) descreveram um sistema de SEC que ultrapassou muitos dos problemas citados. Um enchimento de Sephacryl (gel constituído por partículas de dextrano alil e bis-acrilamida com diâmetros entre 40 e 105 μm), uma bomba-seringa de alta precisão e um detector de pressão do eluente foram combinados para construir um sistema de SEC que pode ser usado para analisar moléculas solúveis em água com pesos moleculares acima de 10^6 daltons. A combinação de caudais de eluição baixos e volumes de enchimento grandes deram origem a tempos de análise de cerca de 4 horas, o que torna o processo muito pouco viável.

2.3 Modelos cinéticos para a fermentação

2.3.1 Introdução

A aplicação de princípios da engenharia química a processos microbiológicos são muito importantes uma vez que se torna necessário estudar a cinética das reacções envolvidas numa fermentação. No desenvolvimento de um processo industrial torna-se necessário ter em conta o seguinte (Peppler e Erlman, 1979):

1. Identificação dos principais produtos e substratos e se possível também dos principais intermediários. Quando se estudam processos fermentativos essa informação é geralmente dada por microbiologistas ou bioquímicos que efectuaram trabalhos com as culturas microbiológicas em questão.

2. Estequiometria do processo. Numa fermentação um balanço material exacto do processo quase nunca é possível. No entanto a informação disponível deve ser estudada com grande detalhe. Em alguns processos o estudo do balanço energético é também muito importante.
3. Cinética da reacção. Em processos batch é necessário conhecer a variação de concentrações com o tempo, de produtos, intermediários e de substrato. No caso de fermentações em contínuo o projecto e análise dos reactores é também baseado na cinética das reacções e nas condições de operação (caudal de alimentação, composição da alimentação).
4. Projecto do reactor. A informação contida nos pontos 1, 2 e 3 é um pré-requisito para a análise e projecto de fermentadores.

2.3.2 Cinética do crescimento celular

2.3.2.1 - Modelo empírico

A equação de Monod é basicamente uma equação empírica que correlaciona surpreendentemente bem vários dados publicados de crescimento celular (Bailey e Ollis, 1977). Para crescimento celular limitado somente por um substrato a equação de Monod escreve-se:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{k_S + S} \quad (2.1)$$

em que $\mu = R_x/X$ é a taxa específica de produção de biomassa, $\mu_{\max}$ é o máximo valor de μ quando S é muito grande, S é a concentração de substrato e k_S é uma constante. Se se fizer um gráfico $1/\mu$ em função de $1/S$ os valores de $\mu_{\max}$ e de k_S podem ser determinados a partir de dados experimentais. Quando $S \gg k_S$, μ aproxima-se de $\mu_{\max}$ e torna-se independente da concentração de substrato, isto é:

$$S \gg K_S \text{ e } \mu \rightarrow \mu_{\max} \quad (2.2)$$

e a velocidade de consumo de substrato é então:

$$R_x = \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \quad (2.3)$$

Da equação (2.3) resulta:

$$\ln X = (\mu_{\max})t + \ln X_0 \quad (2.4)$$

em que $X=X_0$ para $t=0$. A equação (2.4) prevê crescimento celular exponencial em culturas batch quando o substrato existe no meio em concentrações favoráveis ao crescimento.

2.3.2.2 - Modelo desenvolvido para a bactéria *Leuconostoc mesenteroides*.

Landon *et al.* (1990) fizeram experiências num bioreactor agitado de 2 litros. A concentração de substrato foi de 40 g/l de sacarose. O restante meio de cultura está de acordo com as concentrações referidas no ponto 2.1.2. A temperatura foi mantida a 25° C e a agitação a 100 rpm. O pH foi controlado e mantido a 6.7 (pH óptimo para o crescimento deste tipo de células).

A concentração final de células presentes é limitada pela concentração final de sacarose.

Como se viu no ponto 2.3.2.1 o crescimento esperado do tipo exponencial não foi o obtido. A concentração celular aumentou linearmente com o tempo. Este tipo de crescimento já tinha sido observado na estirpe *Leuconostoc mesenteroides* (Brown e McAvoy, 1989; Vandamme *et al.*, 1987).

Lawford *et al.* (1979) especularam que em condições de fermentação em contínuo o crescimento celular é limitado por outro nutriente que não a sacarose; no entanto esse

componente até à data ainda não foi identificado. Barker e Ajongwen (1991) testaram a biotina e o ácido fólico como possíveis candidatos mas os resultados não foram os que esperavam.

Uma vez que não se consegue estabelecer qual o nutriente que governa o crescimento das células de *Leuconostoc mesenteroides*, foi determinado um modelo empírico (Landon *et al.*, 1994), começando por um período inicial de adaptação (fase lag ou de arranque), e crescendo como uma função linear do tempo até à sua concentração máxima, altura em que a concentração de sacarose no meio é mínima:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= 0 & t &\leq t_{\text{lag}} \\ \frac{dX}{dt} &= k & t > t_{\text{lag}}, S > 0 \\ \frac{dX}{dt} &= 0 & S &= 0 \end{aligned} \quad (2.5)$$

A constante desta equação pode ser obtida por regressão linear da parte da curva em que se dá o crescimento e é apresentada na tabela 2.9.

2.3.3 Consumo de sacarose e produção de enzima extracelular dextranosacarase.

Para melhor descrever a cinética de crescimento de um microorganismo foram definidos coeficientes de rendimento (Shuler e Kargi, 1992) baseados na quantidade consumida de substrato. Assim o rendimento do crescimento numa fermentação é:

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (2.6)$$

No final de um período de crescimento tem-se um rendimento aparente de crescimento uma vez que o substrato pode ser consumido por:

$$\Delta S = \Delta S_{\text{na biomassa}}^{\text{assimilado}} + \Delta S_{\text{numproducto extracelular}}^{\text{assimilado}} + \Delta S_{\text{crescimento}}^{\text{energia para}} + \Delta S_{\text{manutenção}} \quad (2.7)$$

Landon *et al.* (1994) indicam que os gastos de sacarose para a produção de dextrano são mínimos uma vez que o pH é mantido a 6.7. Assim o consumo da fonte de carbono neste tipo de fermentação pode ser representado por:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{dt} \frac{1}{Y_{X/S}} + m_S X \quad (2.8)$$

onde a velocidade de consumo é função da velocidade de crescimento celular e da concentração celular.

O coeficiente de rendimento para a formação de um produto pode ser definido por (Shuler e Kargi, 1992):

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (2.9)$$

ou por:

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (2.10)$$

A taxa específica de produção de produtos associados ao crescimento, neste caso a enzima extracelular dextranosacarase, é proporcional à velocidade específica de crescimento:

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \mu \quad (2.11)$$

Landon *et al.* (1994) bem como outros autores (Alsop, 1983; Brown e McAvoy, 1989) verificaram que a quantidade de enzima produzida variava linearmente com a biomassa produzida, e descreveram-na pela equação:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} = \frac{dP}{dX} \mu X \quad \text{com } Y_{P/X} = \text{const.} \quad \text{e} \quad \mu = \frac{dX}{dt} \frac{1}{X} \quad (2.12)$$

De acordo com estes autores, e em condições batch, a síntese da enzima ocorre somente durante a fase de crescimento. No entanto enquanto a concentração celular aumentava com o tempo a concentração de enzima inicial era ainda baixa.

A velocidade específica de formação da enzima aumenta durante a fermentação enquanto o crescimento celular específico decresce (ver figura 2.4). Outros autores chegaram a resultados semelhantes (Monsan e Lopez, 1981; Robyt e Walseth, 1978; Kim e Robyt, 1994).

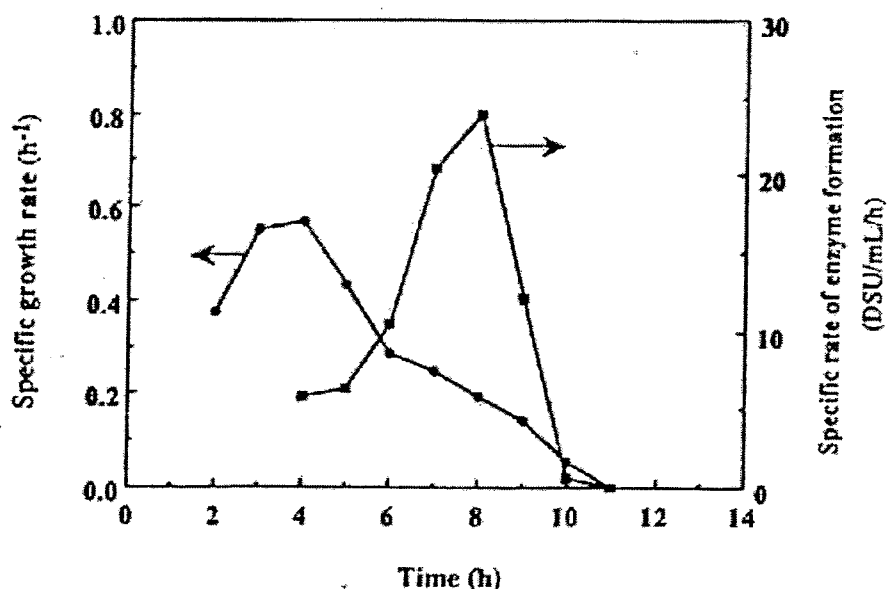


Figura 2.4 - Crescimento celular específico e velocidade específica de síntese da enzima durante a fermentação (Landon et al., 1994).

Nos resultados obtidos por Monsan e Lopez (1981) em que se compara o processo batch com o processo fed-batch nota-se que apesar da adição inicial de sacarose suprimir a produção de enzima, assim que as células tenham crescido e consumido sacarose a produção de enzima tem início e a velocidades específicas elevadas.

2.3.4 Cinética da enzima extracelular dextranosacarase.

A enzima dextranosacarase é produzida intracelularmente sendo de seguida excretada para o meio de cultura. Ao que parece quando a sacarose não está presente no meio esse metabolismo não está activo (Landon *et al.*, 1994). No entanto para uma dada concentração de sacarose a velocidade de síntese mantém-se constante. Se se aumentar a concentração de sacarose a síntese de enzima vai até um máximo e depois decresce (ver figura 2.5).

Landon *et al.* (1994) formularam então um modelo para este tipo de comportamento, em tudo semelhante ao efeito da concentração de iões de hidrogénio na actividade da enzima descrito por Bailey e Ollis (1977).

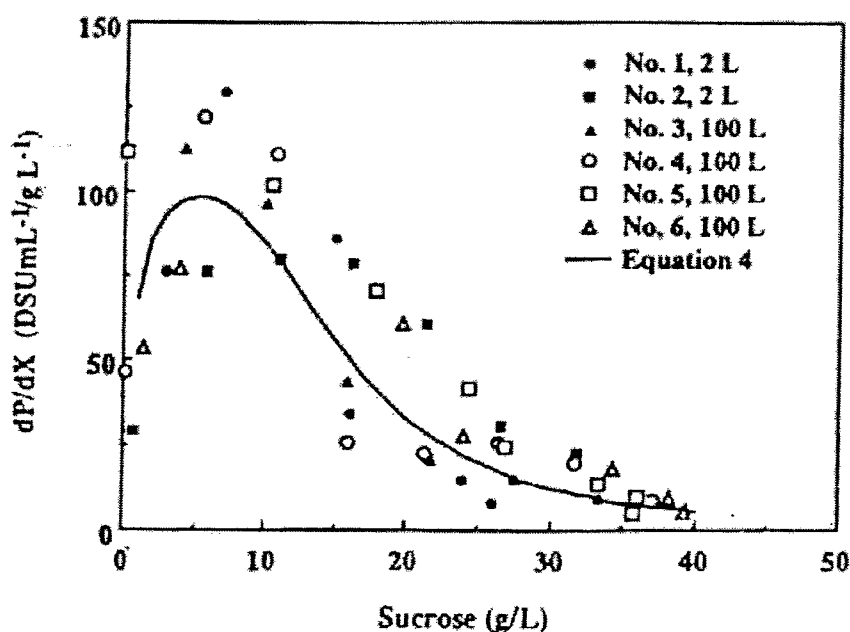


Figura 2.5 - dP/dX como função da concentração da sacarose. Os vários pontos correspondem a experiências diferentes (Landon *et al.*, 1994).

Assim a actividade da enzima depende da presença de uma forma da enzima activada pela sacarose e é limitada pela velocidade específica de crescimento celular. A forma activada enzima-sacarose está em equilíbrio com a enzima livre, com a sacarose do meio e ainda com a enzima inibida pela sacarose.



Então a velocidade de formação do produto P pode ser descrita como:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dP}{dX} \mu X, \quad \text{com} \quad \mu = \frac{dX}{dt} \frac{1}{X} \quad (2.14)$$

em que:

$$\frac{dP}{dX} = a[ES] = \frac{a[E_{tot}]}{\frac{k_1}{[S]} + 1 + \frac{[S]^n}{k_2}} \quad (2.15)$$

Assumindo ainda que a concentração extracelular de sacarose é directamente proporcional à concentração intracelular $S = b[S]$, vem então:

$$\frac{dP}{dX} = \frac{A}{\frac{B}{S} + 1 + \frac{S^n}{C}} \quad (2.16)$$

em que:

$$A = a[E_{tot}] = \text{constante}, B = b k_1 = \text{constante} \text{ e } C = b^n k_2 = \text{constante}.$$

Apresenta-se agora um quadro resumo (tabela 2.9) das equações e uma representação gráfica dos resultados experimentais comparados com o modelo cinético proposto por Landon *et al.* (1994) para este tipo de fermentação.

Tabela 2.9 - Sumário das equações e respectivas constantes Landon et al. (1994).

Equações	Constantes
$\frac{dX}{dt} = k \quad t > t_{lag}, S > 0$ $\frac{dX}{dt} = 0 \quad t \leq t_{lag}, S > 0$	$k = 0.448 \text{ g cél.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ $t_{lag} = 3.1 \text{ h}$
$\frac{dS}{dt} = Q - \frac{dX}{dt} \frac{1}{Y_{X/S}}$	$Y_{X/S} = 0.074 \text{ g cel./ g sac.}$ $Q = 0 \text{ (Batch)}$
$\frac{dP}{dt} = \frac{dP}{dX} \mu X$ $\frac{dP}{dX} = \frac{A}{\frac{B}{S} + 1 + \frac{S^n}{C}}$	$A = 116 \text{ (DSU/ml)/(gcel/l)}$ $B = 0.71 \text{ g/l}$ $C = 3263 \text{ (g/l)}^n$ $n = 3$

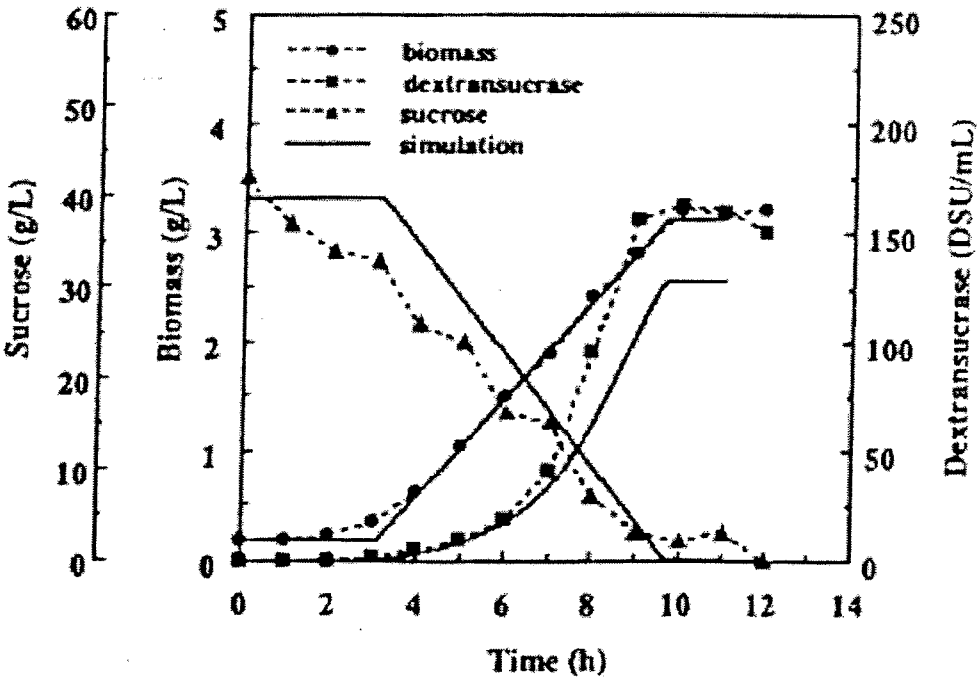


Figura 2.6 - Comparação dos dados obtidos na fermentação batch com os resultados da modelização da fermentação (Landon et al., 1994).

2.4 Produção de dextrano por imobilização da enzima dextranosacarase.

A enzima dextranosacarase pode ser purificada e depois utilizada na produção de dextranos. A produção pode ser feita usando-se a enzima livre ou imobilizada.

Segundo Monsan e Lopez (1981) a produção de dextranos com a enzima imobilizada em sílica pode dar problemas uma vez que o crescimento das cadeias de dextrano dentro dos poros provocam resistências difusionais que afectam a velocidade global da reacção.

Apesar das características, tais como pH e temperatura não serem alteradas com a imobilização existem diferenças nas características do dextrano sintetizado. Isto deve-se aos gradientes de viscosidade que aparecem nos microambientes criados pela enzima (especialmente dentro dos poros).

Outros autores como Kaboli e Reilly (1980) dizem que a enzima dextranosacarase é extraordinariamente difícil de imobilizar. No entanto Reilly e Landis (1981) imobilizaram a enzima em fenoxiacetil celulose porosa. Os resultados foram surpreendentes já que a actividade da enzima imobilizada foi mais de uma centena de vezes maior do que a obtida por Kaboli e Reilly (1980) ou o dobro da actividade encontrada por Monsan e Lopez (1981).

O uso da adsorção hidrofóbica na fenoxiacetil celulose em vez da ligação covalente com glutaraldeído na sílica alquilamina aumentou grandemente a actividade da enzima imobilizada, não se notando no entanto um grande aumento na estabilidade da enzima.

2.5 Produção de dextranos por imobilização da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f)

El-Sayed *et al.* (1990 e 1992) fizeram experiências para produção da enzima dextranosacarase e de dextranos em que a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512(f) foi imobilizada. Começaram (El-Sayed *et al.*, 1990) por fazer um estudo comparativo da produção de dextranosacarase e de dextrano imobilizando a biomassa em Celite e em Alginato de cálcio.

Foram usados três tipos diferentes de Celite: R 630, R 633 e a R 648. As principais características físico-químicas de cada uma podem ser vistas na tabela 2.10.

Foi estudada também a estabilidade da Celite R630. Uma vez que pode facilmente ser desintegrada em partículas muito finas através da agitação a Celite R630 foi coberta por uma camada de alginato de cálcio para lhe conferir alguma resistência mecânica. O tipo de reactor utilizado foi uma coluna "Air-Lift" e as fermentações foram feitas em Fed-Batch.

Foram efectuadas experiências com células em suspensão e com células imobilizadas nos três tipos de Celite, em Alginato de cálcio e em Celite R630 coberta de Alginato de cálcio. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 2.11.

Tabela 2.10 - Análise química típica e algumas propriedades físicas importantes dos três tipos de Celite usados no trabalho de El-Sayed et al. (1990).

	R630	R633	R648
Análise Química:			
SiO ₂	88.2	88.2	87
Al ₂ O ₃	3.5	3.5	6.1
CaO	0.5	0.5	0.9
MgO	0.6	0.6	0.8
Fe ₂ O ₃	1.3	1.3	1.6
Na ₂ O	4.6	4.6	1.2
K ₂ O	0.7	0.7	0.4
P ₂ O ₅	0.2	0.2	0.1
TiO ₂	0.2	0.2	0.1
pH	9.8	10.4	8.5-9.0
Propriedades Físicas:			
Forma	Esfera(4/6.73 mm)	Esfera(297/600 µm)	Esfera(297/600 µm)
Tamanho médio poros (µm)	6.6	6.5	0.14
Área superficial, BET(m ² /g)	1.3	1.3	46.0
Volume total poros(ml/g)	1.45	1.46	1.186
Densidade do leito compactado(g/ml) ^c	0.26	0.28	0.32
Dureza	1.3 ^a	27-28 ^b	4.1 ^b

^a Teste de dureza de Monsanto (Kg)

^b Percentagem de finos produzidos com uma carga de 100 psi

^c As densidades foram calculadas determinando-se a massa das amostras empacotadas em volumes conhecidos.

Tabela 2.11 - Comparação das produtividades máximas em enzima dextranosacarase e em dextrano a partir de fermentações Fed-Batch com células de L. mesenteroides em suspensão e imobilizadas num reactor de coluna Air-Lift (El-Sayed et al., 1990).

	Celite R630	Celite R633	Celite R648	Celite R630 com película de Alginato de cálcio	Esferas de Alginato de cálcio	Células suspensão
Diâmetro médio das partículas(mm)	6.4	0.64	0.64	6.4	3.0	
Diâmetro médio dos poros(μm)	6.6	6.5	0.14		0.0125	
NaOH adicionado para manter o pH=6.7(g/l)	11.63	12.9	11.44	9.8	12.16	6.58
Enzima(IU/ml meio) ^a	5.83(5h)	5.01(12h)	7.2(10h)	6.41(7h)	3.5(12h)	4.26(12h)
Dextrano(g D/100g Sac.)	48.1(6h)	43(5h)	41.3(5h)	46.5(6h)	43.2(5h)	40.4(5h)

^a Uma IU é a quantidade de enzima requerida para produzir uma micromole de frutose num minuto a partir de uma solução com 100g/l de sacarose a pH 5.2 e temperatura de 30°C.

Como se pode ver na tabela 2.11 as fermentações com células imobilizadas (excepto o caso da Celite revestida com alginato) dão melhores resultados na produção de dextranosacarase.

A quantidade de NaOH adicionada para manter o pH=6.7, que pode ser directamente relacionada com o crescimento celular, é menor para a fermentação com células em suspensão. Este facto pode ser explicado uma vez que num reactor Air-Lift se trabalha com arejamentos elevados (0.5 vvm) para manter uma mistura do meio perfeita. Uma vez que se está a trabalhar com bactérias microaerófilas o excesso de O₂ não se torna tão prejudicial para as bactérias imobilizadas.

2.6 Processos de separação por adsorção

Quase todos os processos da indústria química requerem o uso de processos de separação para recuperar e purificar os produtos desejados. Na maioria dos casos a eficiência destes processos tem um grande impacto no preço final dos produtos.

Um processo de separação muito usado na indústria química, pela sua simplicidade e largo campo de aplicação, é a destilação. Outros processos, baseados nas propriedades físico-químicas dos compostos a separar, tal como a cristalização e extracção por solventes também são usadas. No entanto muitas situações envolvem a separação de componentes quimicamente semelhantes ou a remoção de componentes em concentrações muito baixas. Nestes casos, técnicas tradicionais de separação baseadas em propriedades físico-químicas podem ser bastante limitadas ou nem sequer funcionar (Johnson e Kabza, 1993).

Nos dias de hoje muitos problemas de separação são resolvidos por adsorção em sistemas cromatográficos. O grande potencial de separação e a versatilidade da cromatografia como processo de separação está amplamente aceite. Durante os últimos 20 anos a indústria usou processos em larga escala, de variadas configurações, especialmente nos campos da petroquímica, óleos essenciais e carboidratos (Ganetsos e Barker, 1993). No campo dos carboidratos a separação de misturas de glucose e frutose tem sido amplamente estudada.

2.6.1 Processos de separação por adsorção em contra-corrente.

O processo de separação por adsorção mais simples consiste na adsorção de um determinado componente (ou família de componentes com as mesmas características físico-químicas) presente numa solução em que o solvente não é adsorvido. Este método requer um adsorvente altamente selectivo de modo a que uma separação eficaz possa ser alcançado em alguns (às vezes num só) pratos de equilíbrio. Alguns exemplos da aplicação deste método são o amaciamento de águas ou a recuperação de solventes orgânicos do ar ou de águas residuais (Ruthven e Ching, 1989). Este tipo de processos difere essencialmente no método usado para fazer o transporte do sólido, o

tipo de contacto entre líquido e sólido (leito fixo/leito fluidizado), o número de andares e a natureza da etapa de regeneração do sólido (geralmente feita a temperaturas mais elevadas). O princípio básico deste tipo de operação está representado na figura 2.7 a) e b).

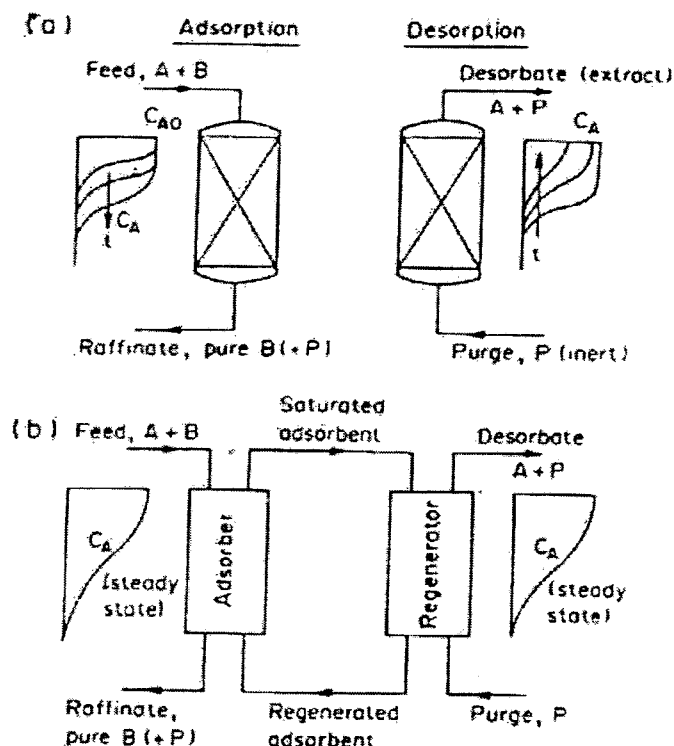


Figura 2.7 - Diagrama esquemático mostrando os dois modos de operação para um processo de separação por adsorção simples. a) operação cíclica em batch, b) operação contínua em contra-corrente. Os perfis de concentração ao longo do leito estão indicados. A é a espécie mais fortemente adsorvida (Ruthven e Ching, 1989).

Se se combinar um módulo de limpeza/lavagem do adsorvente obtém-se o esquema representado na figura 2.8 em que uma alimentação que contenha dois compostos A e B pode ser separada em dois produtos, um extracto contendo essencialmente A (a espécie mais fortemente adsorvida) e um refinado contendo B (a espécie menos adsorvida). Os caudais em cada uma das quatro secções são ajustados de modo a que para ambos os componentes A e B a dessorção ocorre nas secções I e II e a adsorção nas secções III e IV. A direcção do fluxo de A deverá ser descendente nas secções I, II e III e ascendente na secção IV de modo a que esta espécie se mova continuamente em

direcção ao ponto de extracto. Do mesmo modo o fluxo de B deverá ser descendente na secção I e ascendente nas secções II, III e IV de modo a que se mova no sentido da recolha do refinado.

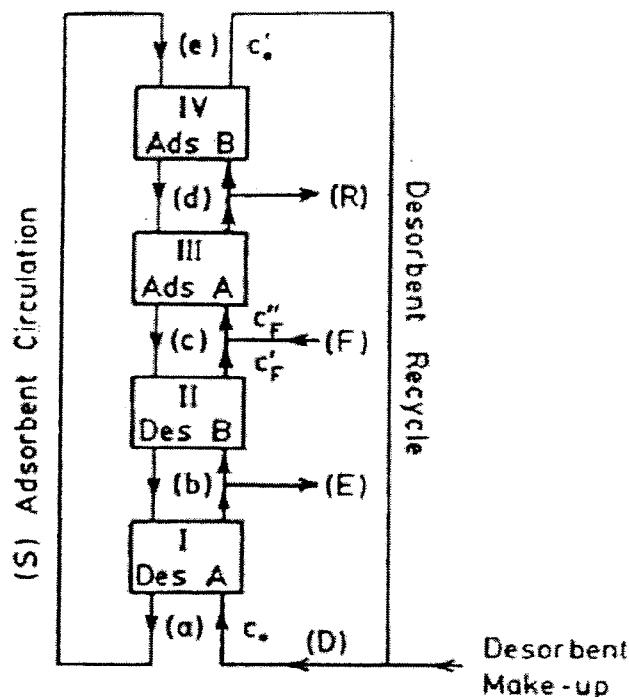


Figura 2.8 - Esquema representativo de um leito móvel de quatro secções (Ruthven e Ching, 1989).

O movimento do sólido adsorvente neste tipo de processos é muito importante. O modo mais óbvio de o fazer circular em contra-corrente com o líquido é mantê-lo na forma fluidizada. No entanto este processo sofre de uma grande desvantagem que influencia negativamente este processo: “backmixing”.

Para ultrapassar este problema foram desenvolvidos sistemas tais como o sistema “pulsed bed” em que o leito é contactado como um leito fixo que é intermitentemente fluidizado e deslocado em contra-corrente com o fluxo do fluido em contacto. Basicamente o que se faz é inverter a direcção do fluido, i. e. fluxo descendente na fase de contacto e ascendente para obter a fluidização do leito.

Outro processo também usado é o leito fluidizado estabilizado magneticamente. Sob a influência de um campo magnético o “backmixing” de um leito fluidizado de partículas magnéticas é bastante reduzido (Ruthven e Ching, 1989). O maior contra deste método é a necessidade de usar adsorventes magnéticos especiais e o custo adicional e complexidade do sistema de magnetos.

Se se usar um sistema de colunas de leito fixo com uma determinada sequência com um processo que permita trocar de coluna ao fim de um determinado período de tempo, tem-se um método que simula um sistema em contra-corrente. A figura 2.9 ilustra o princípio de funcionamento deste tipo de sistema.

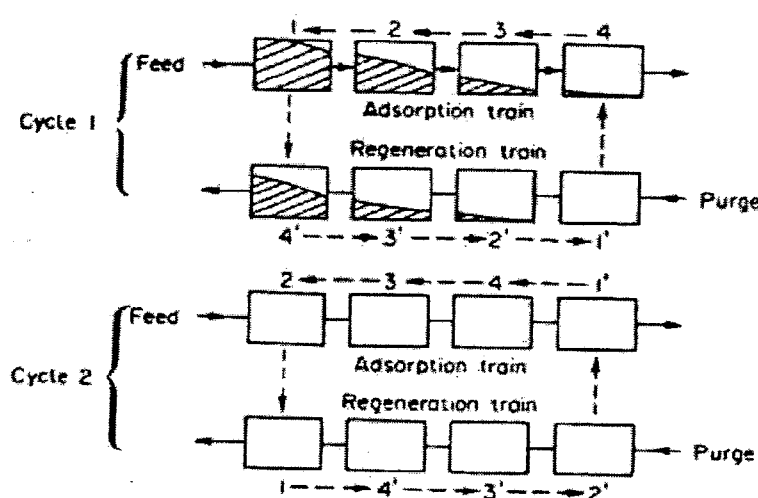


Figura 2.9 - Diagrama esquemático mostrando a sequência da troca de colunas num sistema de leito móvel simulado. O sombreado indica os perfis de concentração imediatamente antes de “saltar” de coluna (Ruthven e Ching, 1989).

Um sistema de leito móvel simulado (de quatro secções) pode ser representado pelo esquema da figura 2.10 em que o adsorvente está contido num determinado número de colunas idênticas ligadas em série através de válvulas controladas pneumaticamente que permitem a saída de extracto ou refinado ou a entrada de eluente ou alimentação entre qualquer par de colunas.

O sistema está dividido em quatro secções; a secção I entre a entrada de eluente e a saída do extracto, a secção II entre a saída do extracto e a entrada da alimentação, a secção III entre a entrada da alimentação e a saída do refinado e finalmente a secção IV entre a saída do refinado e o ponto de recirculação do eluente. O fluxo em contra-corrente é simulado fazendo avançar de uma coluna os pontos de entrada de eluente e alimentação e saída de extracto e refinado depois de um determinado período de tempo previamente especificado, na direcção do fluxo do fluído.

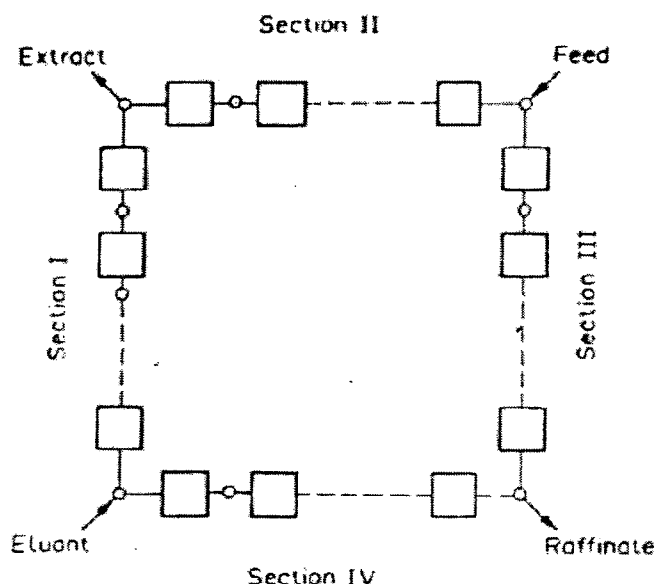


Figura 2.10 - Sistema em contra-corrente simulado para um processo de quatro secções (Ruthven e Ching, 1989).

2.6.2 Separação de misturas de glucose e frutose.

Vários autores (Hashimoto *et al.*, 1983; Ching, 1983; Ching e Ruthven, 1986; Lukác e Perina, 1991; Lameloise e Viard, 1993) estudaram e modelizaram a separação da mistura glucose/frutose em adsorvedores em contracorrente contínuos ou semi-contínuos.

Ching e Ruthven (1984) fizeram experiências num adsorvedor em contra-corrente simulado operando isotermicamente. A diferença entre o equipamento utilizado neste

trabalho e o descrito na secção 2.6.1 é que se trata de um sistema de três secções. Neste tipo de sistema a secção I ou pré-alimentação está entre a entrada de eluente e a entrada de alimentação; a secção II ou pós-alimentação está entre a entrada da alimentação e a saída de refinado; a secção III é constituída somente por uma coluna a que se chama coluna de purga (saída de refinado). Ching *et al.* (1985) fizeram também estudos experimentais em leito móvel simulado (SMB).

Foi feito um estudo comparativo entre sistemas SMB de três e quatro secções (Ching *et al.*, 1992). Foram feitas experiências com três misturas diferentes: dextrano (MW 9400)/frutose, dextrano (MW 6000)/rafinose e frutose/rafinose (a rafinose é um trissacárido constituído por uma unidade de D-galactose, uma unidade de D-glucose e uma unidade de D-frutose).

Observou-se que em misturas com factor de separação pequeno o esquema das quatro secções permite menores consumos de eluente e portanto menores custos nos gastos subsequentes de evaporação para produzir o refinado com uma determinada concentração. No entanto este esquema deu origem a um extracto de menor pureza comparando com o esquema de três secções.

Nicoud (1995) apresentou resultados para separação em SMB (quatro secções) de misturas de glucose e frutose conseguindo purezas na ordem dos 98% tanto no extracto como no refinado. Usou um sistema de quatro secções com seis colunas em cada secção. O volume total de adsorvente usado nesta planta piloto chegou quase aos sete litros distribuídos por 24 colunas enquanto Ching *et al.* (1992) usou um volume de adsorvente somente de cerca de 600 ml distribuídos por oito colunas.

A integração de reacções químicas ou bioquímicas em processos de separação cromatográficos também foi estudada. Meurer *et al.* (1997) fizeram uma simulação num reactor de leito móvel simulado para a inversão da sacarose. Atingiram com este método as mesmas purezas, comparando com processos convencionais, mas o novo reactor permite não só a redução de custos mas aumenta a produtividade em termos da quantidade de sacarose convertida em glucose e frutose.

2.6.3 Degradação da sacarose com a enzima dextranosacarase e separação dos produtos formados: frutose e dextrano (reacção e separação em SMB: SMBR)

A reacção irreversível da enzima dextranosacarase sobre a sacarose e a separação dos produtos obtidos, frutose e dextrano foi estudada por Zafar e Barker (1988) usando um reator e separador cromatográfico (SMBR). Mais tarde Barker *et al.* (1992) estudaram a mesma bioreacção e separação mas usando um sistema simulado de contracorrente em contínuo (SCCR-S). O sistema consistiu de 12 colunas com 5.4 cm de diâmetro por 70 cm de comprimento cheias com uma resina na forma cálcio. Em primeiro lugar encheram-se as colunas com a enzima dissolvida em água (eluente) e só depois se iniciou a adição de sacarose (5% w/w) na corrente de alimentação. Conseguiram purezas no produto rico em dextrano de cerca de 100% e no produto rico em frutose de cerca de 97%.

Barker *et al.* (1993) usando o sistema descrito acima propuseram um esquema de produção de dextrano de grau clínico. Numa primeira fase e num reator cromatográfico (SCCR-S) dá-se a bioreacção saindo uma corrente rica em frutose e outra rica em dextrano. Esta corrente entra num outro sistema similar ao descrito acima mas somente com dez colunas usado para remover os dextransos com pesos moleculares mais elevados obtendo-se uma outra corrente rica em dextransos de baixo peso molecular. Cerca de 55% de todo o dextrano produzido foi recuperado obedecendo às especificações da Pharmacopea Britânica para ser usado como dextrano clínico. O restante dextrano é reciclado para uma fase de hidrólise.

2.7 Conclusões

Alguns autores ao longo dos anos têm investigado a bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. Para melhorar os processos de produção industrial de dextransos ou de xaropes de frutose muito trabalho pode ainda ser feito.

Uma vez que a origem da bactéria não permite garantir que esta não tenha sofrido mutações o primeiro passo a dar será, depois de adquirir o microorganismo, tratar de

conhecer quais na realidade serão as condições ótimas de crescimento celular e de produção da enzima extracelular dextranosacarase.

O modelo cinético proposto por Landon *et al.* (1994) tem somente em conta a produção de dextranosacarase. A partir de resultados experimentais obtidos na procura das condições ótimas para o sistema será proposto um modelo cinético para a produção de enzima dextranosacarase, de dextrano e de frutose, para o crescimento celular e para o consumo de sacarose.

Interessante será fazer o estudo da influência de fontes de carbono secundárias na produção de dextrano e frutose com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. Verificar se existem alterações no peso molecular do dextrano produzidos ou se existe qualquer tipo de influência na produção da enzima extracelular dextranosacarase.

Uma vez conhecido o comportamento do microorganismo ao longo de uma fermentação experimentar-se-á o método do Leito Móvel Simulado (SMB) para separar os dois produtos a partir do meio fermentado e assim obter duas correntes puras em dextrano e frutose.

A produção de dextrano e frutose pode ser feita em sistemas imobilizados, quer da bactéria quer da enzima previamente purificada. Estudar a produção de dextrano e frutose com o microorganismo imobilizado permitirá eliminar no processo equipamento de remoção da biomassa no meio fermentado uma vez que os produtos praticamente não estarão contaminados pelo microorganismo. Experimentar a imobilização da bactéria em suportes diferentes do alginato de cálcio será um passo importante uma vez que este gel é enfraquecido pela permuta de iões Na^+ presentes no meio de cultura e os iões Ca^{2+} que lhe conferem a rigidez.

Referências Bibliográficas

- Alsop, R. M.; 1983, "Industrial production of dextrans.", *Progress in Industrial Microbiology*, 18, 1-44.
- Bailey, J. E.; Ollis, D. F.; 1977, "Biochemical Engineering Fundamentals", 1st edition McGraw-Hill, New York.
- Barker, P. E.; Ajongwen, N. J.; 1991, "The production of the enzyme dextransucrase using nonaerated fermentation techniques", *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 703-707.
- Barker, P. E.; Ganetsos, G.; Ajongwen, N. J.; Akintoye, A.; 1992, "Bioreaction separation on continuous chromatographic systems.", *The Chemical Engineering Journal*, Vol. 50, B23-B28.
- Barker, P. E.; Ganetsos, G.; Ajongwen, N. J.; 1993, "A novel approach to the production of clinical grade dextran", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 57, 21-26. [S]
- Brown, D. E., McAvoy, A.; 1989, "A pH controlled fed-batch process for dextransucrase production.", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 48, 405-414
- Ching, C. B.; 1983, "A Theoretical model for the simulation of the operation of the semi-continuous chromatographic refiner for separating glucose and fructose", *Journal of Chemical Engineering of Japan*, vol. 16, No. 1, pp.49-53.
- Ching, C. B.; Ruthven, D. M.; Hidajat, K.; 1985, "An experimental study of a simulated counter-current adsorption system-III. Sorbex operation.", *Chemical Engineering Science*, vol. 40, No. 8, pp. 1411-1417.
- Ching, C. B.; Ruthven, D. M.; 1986, "An improved adsorption process for the production of high-fructose syrup", *AIChE Journal*, vol. 32, No. 11, pp. 1876-1880.

- Ching, C. B.; Chu, K. H.; Hidajat, K.; Uddin, M. S.; 1992, "Comparative study of flow schemes for a simulated countercurrent adsorption separation process.", *AIChE Journal*, vol. 38, No. 11, pp. 1744-1750.
- Choplin, L.; Sabatie, J.; 1986, "The effect of synthesis temperature on the reological properties of native dextran.", *Biotechnol. Lett*, 6, 425-430.
- De Man, J. C.; Rogosa, M.; Sharpe, E.; 1960, "A medium for the cultivation of lactobacilli", *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 130-138.
- El-Sayed, A. M. M.; Mahmoud, W. M.; Coughlin, R. W.; 1990, "Comparative study of production of dextransucrase and dextran by cells of *Leuconostoc mesenteroides* immobilized on celite and in calcium alginate beads.", *Biotec. Bioengineering*, 36, pag. 83-91.
- El-Sayed, A. M. M.; Mahmoud, W. M.; Coughlin, R. W.; 1990, "Production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized in calcium alginate beads: I. Batch and Fed-Batch fermentations.", *Biotec. Bioengineering*, 36, pag. 338-345.
- El-Sayed, A. M. M.; Mahmoud, W. M.; Coughlin, R. W.; 1990, "Production of dextransucrase and dextran by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized in calcium alginate beads: II. Semi-Continuous Fed-Batch fermentations.", *Biotec. Bioengineering*, 36, pag. 346-353.
- El-Sayed, A. M. M.; Mahmoud, W. M.; Coughlin, R. W.; 1992, "Investigation of production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized within porous stainless steel.", *Biotec. Bioengineering*, 40, pag. 617-624.
- Ganetsos, G.; Barker, P. E.; 1993, "Preparative and production scale chromatography - Semicontinuous Countercurrent Chromatographic Refiners", *Chromatographic Science Series*, Vol. 61, Chapter 11.

- Hashimoto, K.; Adachi, S.; Noujima, H.; Maruyama, H.; 1983, "Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving bed adsorber", Journal of Chemical Engineering of Japan, vol. 16, No. 5, pp. 400-406.
- Horák, D.; Hradil, J.; Benes, M. J.; 1995, "Packings for size exclusion chromatography: Preparation and some properties", in "Strategies in Size exclusion chromatography", Edited by M. Potschka and Paul L. Dubin, ACS Symposium Series 635, Chapter 11.
- Johnson, J. A.; Kabza, R. G.; 1993, "Preparative and production scale chromatography - Sorbex: Industrial-Scale Adsorptive Separation", Chromatographic Science Series, Vol. 61, Chapter 12.
- Johnson, M. K.; McCleskey, C. S.; 1957,"Studies on the aerobic carbohydrate metabolism of *Leuconostoc Mesenteroides*.", J. Bacteriology, 74, 22-25. (6)
- Kaboli, H.; Reilly, P. J.; 1980, "Immobilization and properties of *Leuconostoc Mesenteroides* dextranucrase.", Biotechnology and Bioengineering, 22, 1055-1069.
- Kim, D.; Robyt, J. F.; 1994, "Properties of *Leuconostoc Mesenteroides* B-512F constitutive dextranucrase.", Enzyme Microb. Technol., 16, 1010-1015.
- Koepsell, H. J.; Tsuchiya, H. M.; 1952, "Enzymatic synthesis of dextran", J. Bact., 63, 293-295.
- Lameloise, M. L.; Viard, V.; 1993; "Modelling and simulation of a glucose-fructose simulated moving bed adsorber", Trans IChemE, Vol. 71, Part C, pp. 27-32.
- Landon, R. S.; Hudson, I. H.; Kramer, W.; Webb, C.; 1994, "A model of dextranucrase synthesis by *Leuconostoc Mesenteroides*.", Trans IChemE, 72, Part C, 209-215.

- Landon, R. S.; Webb, C.; 1990, "Separating enzyme (dextransucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process", *Process Biochemistry*, 25, 19-23.
- Landon, R. S.; Law, R. C. S.; Webb, C.; 1993, "Fermentation broth rheology during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512(f)", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 251-257. [4]
- Lawford, G. R.; Kligerman, A.; Williams, T.; 1979, "Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of *Leuconostoc Mesenteroides*.", *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 1121-1131.
- Lazic, M. L.; Veljkovic, V. B.; Vucetic, V. B.; Vrvic, M. M.; 1993, "Effect of pH on dextran production by *Leuconostoc Mesenteroides*.", *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 334-338. [5]
- Lebrun, L.; Junter, G. A.; Jouenne, T.; Mignot, L.; 1994, "Exopolysaccharide production by free and immobilized microbial cultures.", *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1048-1054.
- Lukác, M.; Perina, Z.; 1991; "A Dynamic model of physical processes in chromatographic glucose-fructose separation.", *Chemical Engineering Science*, vol. 46, No. 4, pp. 959-965.
- Lundy, C. E.; Hester, R. D.; 1986, "Characterization of large water-soluble macromolecules by size exclusion chromatography", *Journal of polymer science: Parte A: Polymer Chemistry*, 24, 1829-1838. [11]
- Meurer, M.; Altenhoner, U.; Strube, J.; Untiedt, A.; Schmidt-traub, H.; 1997, "Dynamic simulation of a simulated moving bed chromatographic reactor for the inversion of sucrose", *Journal of chromatography*, A769, pp. 71-79.

Miller, G. L.; 1959, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars.", *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. {9}

Monsan, P.; Lopez, A.; 1981, "On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase.", *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 2027-2037.

Nicou, R. M.; 1995, "The simulated moving bed: a powerful chromatographic process", *LC-GC INTL.*, 5 (5), pp 43-47.

Pennell, R. D.; Barker, P. E.; 1992, "The production of the enzyme dextransucrase using unaerated continuous fermentations.", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 53, 21-27.

Peppler, H. J.; Erlman, D. P.; 1979, "Microbial Technology", 2nd Edition, Academic Press, New York. {10}

Plihon, F.; Taillandier, P.; StreHaiano, P.; 1995, "Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc Mesenteroides*: relationship between oxygen uptake, growth and end-products.", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 117-122.

Reilly, P. J.; Landis, D. A.; 1981, "Immobilization of *Leuconostoc Mesenteroides* dextransucrase to porous phenoxyacetyl cellulose beads.", *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 2647-2653.

Robyt, J. F.; Walseth, T. F.; 1978, "Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B-512F.", *Carbohydrate Research*, 68, 95-111.

Ruthven, D. M.; Ching, C. B.; 1989, "Counter current and simulated counter current adsorption separation processes.", *Chemical Engineering Science*, 44(5), 1011-1038. {11}

Scott, T. A.; Melvin, E. H.; 1953, "Determination of dextran with anthrone.", *Analytical Chemistry*, 25, 1656-1661. {12}

Shuler, M. L., Kargi, F.; 1992, "Bioprocess Engineering, Basic Concepts", Prentice Hall, New Jersey, USA.

Tecante, A.; Lopez-Munguia, A.; Garcia-Rejon, A.; 1986, "Rheological characterisation of dextran-enzymatic synthesis media.", J. Appl. Polym. Sci., 31, 2337-2350.



Tsuchiya, H. M., et. al.; Koepsell, H. J.; Corman, J.; Bryant, M. O.; Feger, V. H. and Jackson, R. W.; 1952, "The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc Mesenteroides*.", J. Bact., 64, 521-526.

Veljkovic, V. B.; Lazic, M. L.; Rutic, D. J.; Jovanovic, S. M.; Skala, D. U.; 1992, "Effects of aeration on extracellular dextransucrase production by *Leuconostoc Mesenteroides*.", Enzyme Microb. Technol., 14, 665-668.

Zafar, I.; Barker, P. E.; 1988, "An experimental and computational study of a biochemical polymerisation reaction in a chromatographic reactor separator", Chemical Engineering Science, 43(9), 2369-2375.

Capítulo 3

Determinação das condições óptimas na fermentação

3. Determinação das condições óptimas na fermentação.

As experiências realizadas nesta fase têm como objectivo principal testar as condições ideais de crescimento da bactéria bem como as condições ideais para a produção da enzima extracelular dextranosacarase, dextrano e frutose.

Foram realizadas experiências batch a temperaturas diferentes, sem controlo de pH; realizaram-se também experiências com o pH controlado e com arejamento. Foram ainda testadas várias concentrações de sacarose a pH e temperaturas diferentes. Uma vez determinadas as condições óptimas de produção de enzima, dextrano e frutose realizou-se uma experiência em fed-batch.

Foi ainda desenvolvido um modelo cinético para a produção de dextranosacarase, dextrano e frutose, crescimento celular e consumo de sacarose nas fermentações batch e fed-batch.

3.1 Materiais e métodos

3.1.1. Instalação experimental

O volume máximo de trabalho do fermentador SGI SET02 é de 1.5 litros; equipado com um agitador mecânico, sonda de pressão de O₂, sondas de pH e de temperatura, uma resistência de aquecimento, e um sistema de arejamento pela base interior do reactor. Está ainda equipado com um tubo para recolha de amostras, uma alheta em forma de u para circulação de água de arrefecimento e um septo de borracha para injectar o inoculo ou outras soluções. A cuva é de vidro temperado e com fundo arredondado.

Acoplado ao bioreactor existe uma unidade de controlo e uma válvula que permite a adição de ácido ou base para fermentações com controlo de pH. A unidade de controlo possui módulos que permitem a regulação da agitação, a leitura e regulação da

temperatura, pH e oxigénio dissolvido, a leitura do potencial redox e a regulação de nível de espuma. A sonda de pH disponível é da marca INGOLD, modelo 465, próprio para fermentações uma vez que pode ser autoclavado.

Na figura 3.1 apresenta-se o diagrama esquemático do sistema de fermentação.

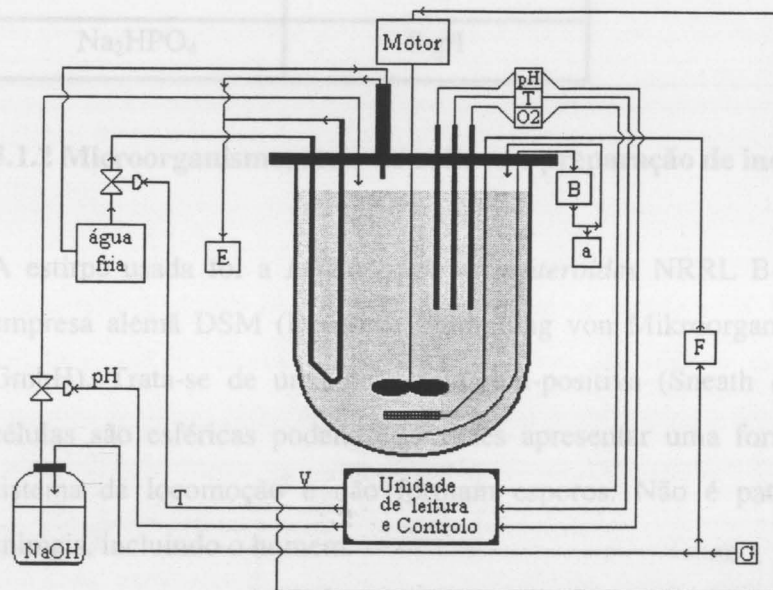


Figura 3.1 - Diagrama esquemático da instalação de fermentação batch. E-esgoto, B-bomba peristáltica, a-amostra, F-filtro para gases, G-gás, T-temperatura, V-velocidade

A composição do meio de cultura utilizado nas experiências realizadas encontra-se na tabela 3.1.

Relativamente às composições mencionadas na revisão bibliográfica a concentração de Na_2HPO_4 foi alterada. O pH inicial do meio de cultura com 10 g/l de Na_2HPO_4 era muito elevado por isso usou-se somente 8 g/l de Na_2HPO_4 . Mesmo assim o pH inicial do meio tem que ser ajustado para 7.2 com uma solução de HCl de concentração 1mol/l.

O meio de cultura foi esterilizado num autoclave vertical A. J. da Costa “Semi automático uniclave 87” durante 15 minutos a 121° C.

Tabela 3.1 - Composição do meio de cultura. Todos os produtos provém da Merck.

Produto	Concentração (g/l)
Sacarose	20 g/l
Extracto de Levedura	20 g/l
Na ₂ HPO ₄	8 g/l

3.1.2 Microorganismo, meio de cultura e preparação de inóculo.

A estirpe usada foi a *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(f), com origem na empresa alemã DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Trata-se de uma bactéria Gram-positiva (Sneath *et al.*,1986) em que as células são esféricas podendo às vezes apresentar uma forma lenticular. Não têm sistema de locomoção e não formam esporos. Não é patogénica para plantas e animais, incluindo o homem.

Foi recebida em pellets liofilizadas e começou por fazer-se a sua activação seguindo as instruções da DSM descritas a seguir.

Quebra-se a ampola aquecendo-a à chama e vertendo umas gotas de água fria na zona aquecida. Depois da ampola aberta dilui-se a pellet em 5 ml de MRS Broth previamente esterilizado (ou MRS Líquido, não contém Agar) e deixa-se hidratar as células durante cerca de 20 minutos. Convém salientar que MRS é um meio de cultura standard desenvolvido por De Mann *et al.* (1960), para bactérias produtoras de ácido láctico e a sua composição típica é apresentada na tabela 2.1.

Depois de hidratadas as bactérias são inoculadas na superfície de tubos inclinados estéreis de MRS Agar e deixam-se por um período de cerca de 16 horas a incubar a uma temperatura de 25 a 30°C.

Depois de activada a bactéria é mantida em slants estéreis de MRS Agar a 4° C. Os slants podem manter-se assim entre 8 e 10 semanas e ao fim desse período deverão preparar-se e inocular-se slants frescos para garantir a viabilidade das células.

3.1.3 Métodos analíticos

O crescimento das bactérias foi determinado espectrofotometricamente a 660 nm uma vez que é o comprimento de onda ao qual a absorção pelo meio de cultura antes de ser inoculado é mínima. Foi utilizado um espectrofotometro de UV e visível da série Pye Unicam SP6. A curva de calibração foi previamente determinada usando o método da filtração.

Colocaram-se alguns filtros (0.2 μ m) a secar em estufa a 90° C até massa constante e registaram-se os valores. Filtraram-se volumes conhecidos de algumas amostras com diluições celulares diferentes às quais se leu previamente a densidade óptica. Voltaram a colocar-se os filtros na estufa a 90° C até peso constante e por diferença obteve-se a quantidade de células em cada solução.

Antes de cada pesagem teve-se o cuidado de deixar arrefecer as membranas em excicador para não haver contaminações com humidade.

A actividade da enzima foi medida em DSU/ml. A uma amostra de volume conhecido do meio de cultura foi adicionado substrato (sacarose) até perfazer uma concentração de 10% (solução com pH previamente ajustado a 5.0). Deixa-se reagir à temperatura de 30° C durante uma hora.

Uma unidade de dextranosacarase é definida como a quantidade de enzima que converte um miligrama de sacarose em dextrano (libertação de 0.52 mg de frutose) durante uma hora (DSU).

As determinações de sacarose, frutose e dextrano foram feitas com um sistema de HPLC da GILSON com um módulo manométrico (modelo 802C), uma bomba (modelo 302) e um detector de índice de refração (modelo 131). A coluna utilizada foi uma INTERACTION, IonGuard 300 com um enchimento polimérico em que a

pressão máxima de trabalho é de 150 bar. Assim usou-se um caudal de eluente (H_2SO_4 0.005 N) de 0.3ml/min em que a pressão de trabalho esteve durante as análises entre 80 e 125 bar.

Foram também previamente determinadas as curvas de calibração para a sacarose, frutose e dextrano. Por injeção de concentrações conhecidas de sacarose, frutose e dextrano determinaram-se as áreas correspondentes dos picos.

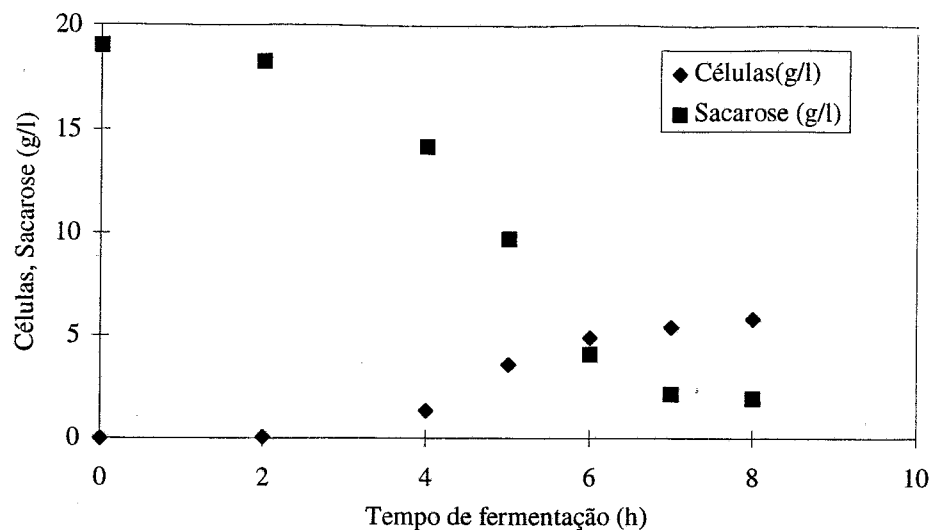
3.2 Fermentação batch

Neste trabalho foi estudado o crescimento celular, o consumo de sacarose e a formação de produtos na fermentação usando diferentes condições de operação.

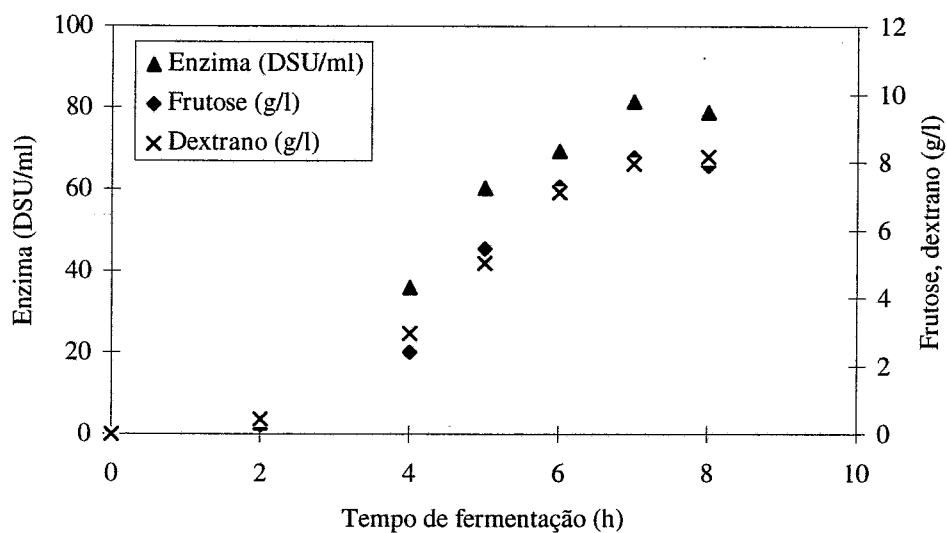
As fermentações batch foram efectuadas com concentrações de sacarose numa gama entre 10 e 120 gdm-3, temperaturas de 20, 25, 27.5, 30, 35 e 40°C, pH controlado a 6.9 (pH óptimo para o crescimento celular) e a 5.5 (para minimizar a perda de actividade enzimática); ainda se efectuaram experiências com 0.05 vvm de arejamento.

A figura 3.2.a e 3.2.b mostra um exemplo de uma fermentação batch (fermentação #31: T=35°C, pH=5.5, agitação=150 rpm, sem arejamento, concentração inicial de sacarose=20 g/l).

Observando a figura nota-se que quando a sacarose esgota no meio de cultura a fonte de carbono alternativa para a bactéria passa a ser a frutose. Interessa então retirar a frutose do meio à medida que é produzida ou então não deixar que a sacarose esgote.



(a)



(b)

Figura 3.2 - Resultados experimentais obtidos na fermentação #31: a) crescimento celular e consumo de sacarose, b) produção de enzima, dextrano e frutose.

Condições de operação: Concentração inicial de sacarose=20 g/l, $T=35^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5.5$, sem arejamento, agitação=150 rpm.

3.2.1 Influência da Temperatura na fermentação Batch

A temperatura tem influência sobre a cinética das reacções químicas; numa fermentação dão-se reacções bioquímicas sendo a sua cinética também influenciada pelas variações de temperatura. Assim foram feitas experiências para testar a influência da temperatura no crescimento da bactéria. A fermentação foi estudada a 6 temperaturas diferentes na gama de temperatura óptima para o desenvolvimento da bactéria (entre 25 e 30° C segundo Sneath *et al.*, 1986) e a temperaturas limite. As temperaturas estudadas foram 20, 25, 27.5, 30, 35 e 40° C. Não houve controlo de pH nem arejamento e a agitação foi feita a 150 rpm.

Tabela 3.2 - Comparação dos resultados das fermentações batch a temperaturas diferentes. A concentração inicial de sacarose foi de 20 g dm⁻³ e não houve controlo de pH nem arejamento; a agitação foi de 150 rpm.

Run	Temperatura (° C)	Dextrano produzido, D' (g dm ⁻³)	Frutose produzida, F' (g dm ⁻³)	Actividade Enzima, E (DSU cm ⁻³)	Peso Células seco, X (g dm ⁻³)	Tempo fermentação (h)
10	20	6.91	8.16	71.7	5.21	12.0
1	25	6.46	8.09	67.0	5.46	11.5
3	27.5	5.47	7.76	63.2	5.03	11.0
2	30	5.99	7.01	57.2	5.70	10.0
12	35	7.94	8.39	55.6	7.85	7.0
16	40	-	-	11.9	-	15.0

Da observação dos resultados apresentados na tabela 3.2 e da análise das figuras 3.3.a e 3.3.b pode concluir-se que na realidade a temperatura afecta o crescimento das bactérias. Na gama de temperaturas entre 20 e 30° C o máximo peso seco de células mantém-se constante e à volta dos 5.5 g dm⁻³. No entanto para 35° C a massa de células obtida aumentou e foi de 7.85 g dm⁻³. A 35° C a fermentação demora menos 4 horas do que a 20° C. Verificou-se ainda que a 40° C o crescimento celular foi

praticamente nulo. A actividade da enzima decresce com a temperatura mas a produção de dextrano e frutose não foi afectada

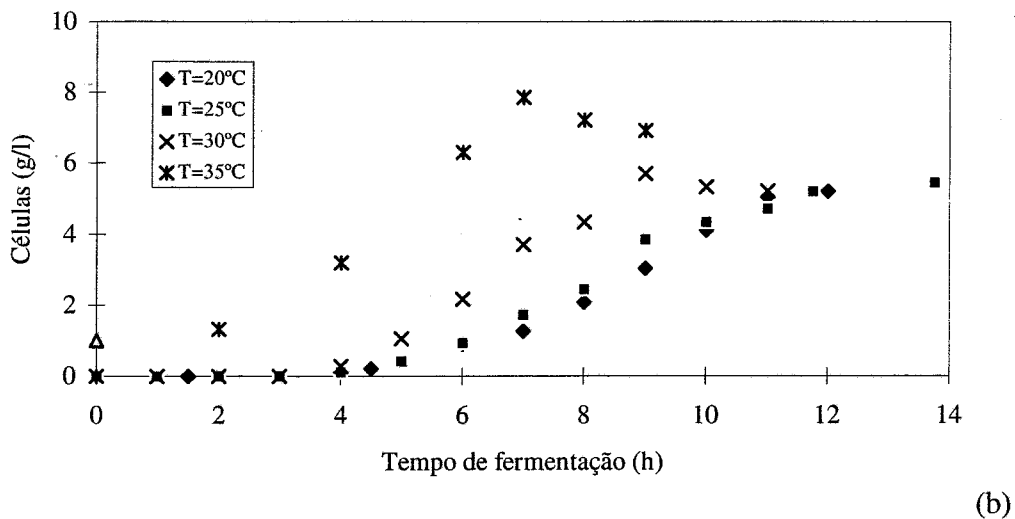
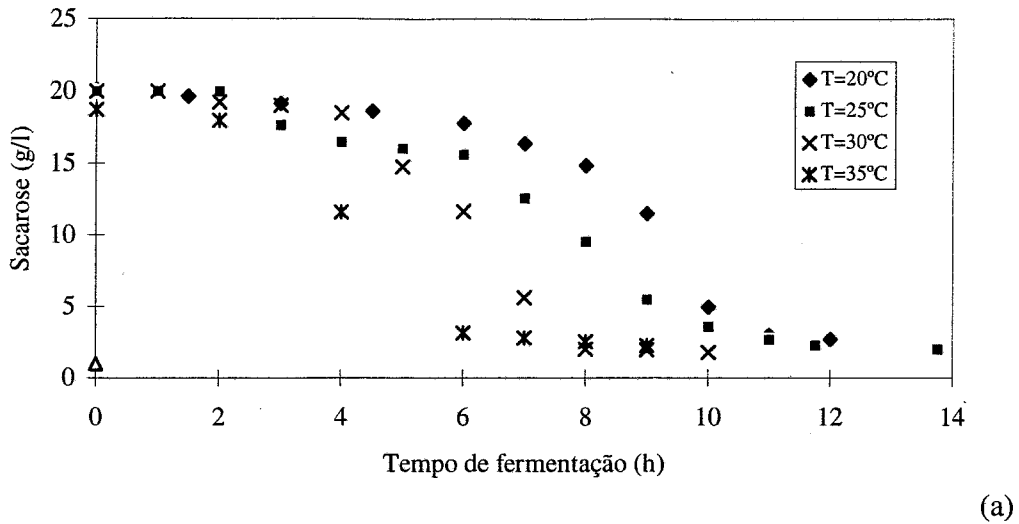


Figura 3.3 - Efeito da temperatura na fermentação: a) no consumo da sacarose, b) no crescimento celular. Condições de trabalho: sem controlo de pH, concentração inicial de sacarose=20 g/l, sem arejamento, agitação=150 rpm.

3.2.2 Influência do pH na fermentação Batch

Todos os microorganismos têm um pH ótimo de crescimento que conduz à concentração final de biomassa na fermentação máxima. Para a estirpe *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512(f) o pH de 6.7 foi determinado como sendo o pH ótimo de crescimento desta espécie (Lazic *et al.*, 1993). No entanto a enzima extracelular produzida durante a fermentação tem máxima estabilidade (desactivação mínima) a pH 5.5 (Lazic *et al.*, 1993).

Daqui surge a necessidade de estudar o crescimento celular e a produção de enzima extracelular dextranosacarase, e produção de frutose e de dextrano a pH constante e igual a 6.7 e 5.5. O controlo de pH é feito por adição de hidróxido de sódio de concentração 4 M.

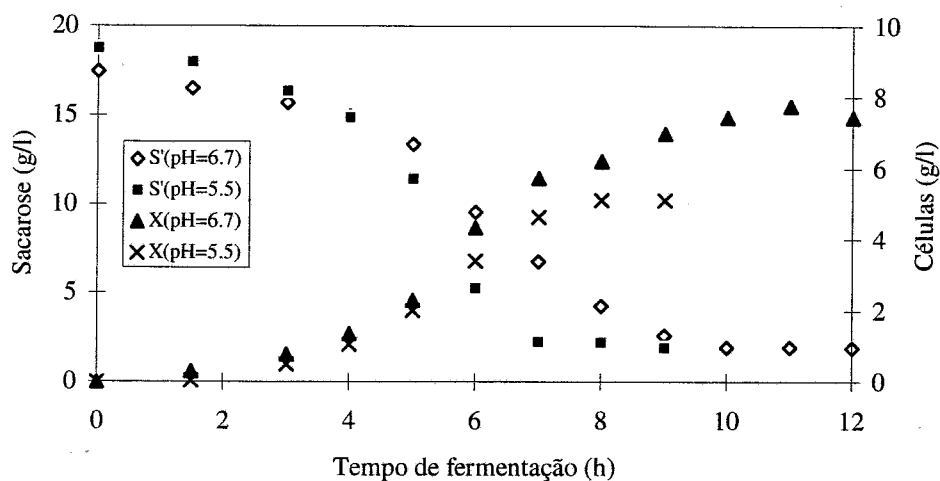
A tabela 3.3 e as figuras 3.4.a e 3.4.b mostram que o pH de 6.7 é favorável ao crescimento celular atingindo-se cerca de 7.8 g dm^{-3} de massa de células sem controlo de pH a massa celular obtida foi de 5.03 g dm^{-3} . Por outro lado a pH 5.5 a actividade da enzima é mais alta chegando aos 85 DSU cm^{-3} enquanto que a pH 6.7 a actividade da enzima é 57 DSU cm^{-3} . Existem ainda diferenças no tempo de fermentação que a pH 5.5 é 3 horas mais curto do que a pH 6.7.

Tabela 3.3 - Comparação dos resultados de fermentações batch a diferentes valores de pH. A concentração inicial de sacarose foi de 20 g dm^{-3} . A temperatura de operação foi 25°C e a agitação de 150 rpm.

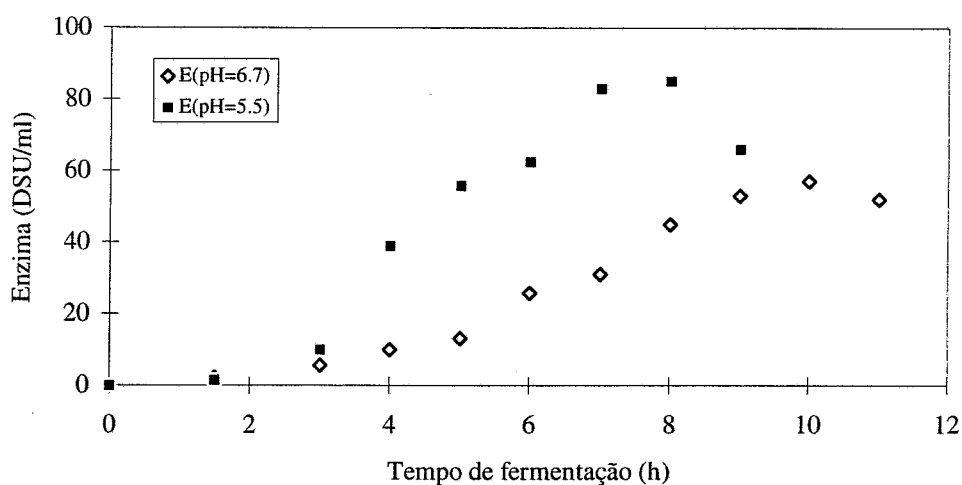
Run	pH	Dextrano produzido (g dm^{-3})	Frutose produzida (g dm^{-3})	Actividade Enzima (DSU cm^{-3})	Peso células seco (g dm^{-3})	Tempo Fermentação (h)
1	Sem	6.46	8.08	67.0	5.46	11.5
4	6.7	6.71	7.01	57.0	7.76	11.0
5	5.5	7.74	8.10	85.0	5.11	8.0
13	5.0	8.51	8.54	51.1	5.11	10.0
11	4.0	-	-	-	0	-

Os resultados de uma fermentação standard (sem controlo de pH) estão incluídos na tabela 3.3 para comparação de resultados.

A pH 4 não houve crescimento celular e a pH=5 o crescimento celular foi semelhante ao de pH 5.5 mas a actividade da enzima diminuiu.



(a)



(b)

Figura 3.4 - Influência do pH na fermentação: a) no consumo da sacarose e no crescimento celular, b) na produção da enzima. Condições de trabalho: T=25°C, concentração inicial de sacarose=20 g/l, sem arejamento, agitação=150 rpm.

3.2.3 Influência do arejamento na fermentação Batch

Foi demonstrado por Barker e Ajongwen (1991) que o tipo de extracto de levedura era muito mais importante para este tipo de fermentação do que o arejamento. No entanto outros autores (Johnson e McCleskey, 1957; Plihon *et al.*, 1995; Lebrun *et al.*, 1994) afirmam que sendo a estirpe microaerofílica o oxigénio afecta positivamente o crescimento celular.

Foram então feitas experiências para testar o efeito do arejamento nas fermentações com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f).

As experiências foram realizadas com um caudal de arejamento de 0.05 vvm. Os resultados obtidos usando a mesma concentração de sacarose (20 g/l), o mesmo tipo de extracto de levedura (Merck), a mesma agitação (150 rpm) e temperatura (25° C) podem ser vistos na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Efeito do arejamento em fermentações com Leuconostoc mesenteroides.

Concentração de sacarose foi de 20 g dm⁻³, a agitação de 150 rpm e a temperatura de 25° C.

Run	Arejamento (vvm)	pH	Dextrano produzido (g dm ⁻³)	Frutose produzida (g dm ⁻³)	Actividade Enzima (DSU cm ⁻³)	Peso Células seco (g dm ⁻³)	Tempo Fermentação (h)
5	Sem arej.	5.5	7.74	8.10	85.04	5.11	8
4	Sem arej.	6.7	6.71	7.01	57.02	7.76	11
9	0.05	5.5	8.21	8.27	83.42	5.58	9
8	0.05	6.7	7.47	7.60	56.37	7.75	11

Foram testados os dois valores de pH estudados anteriormente: 5.5 e 6.7.

Como pode ver-se o arejamento não influencia significativamente os resultados das fermentações. O crescimento celular é sensivelmente superior mas por outro lado a actividade da enzima é, também sensivelmente, inferior.

3.2.4 Influência da concentração de sacarose na fermentação Batch

É fundamental para que a reacção se dê que exista sacarose no meio de cultura. A sua concentração pode variar mas segundo alguns autores (Koepsell e Tsuchiya, 1952; de Man *et al.*, 1960) a concentração ideal seria 20 g dm^{-3} (2% w/v) tendo em conta a necessidade de separar a biomassa do resto do meio.

Como um dos produtos resultantes da reacção é um polímero (dextrano) a viscosidade do meio aumenta com o aumento da concentração de sacarose o que torna muito difícil o processo de separação da biomassa do meio de cultura. Assim foram realizadas algumas experiências a várias concentrações de sacarose numa gama entre 10 e 120 g dm^{-3} . Cada concentração foi testada a dois pH diferentes: 5.5 e 6.7. Duas temperaturas de operação foram usadas nestas experiências: 25 e 35° C.

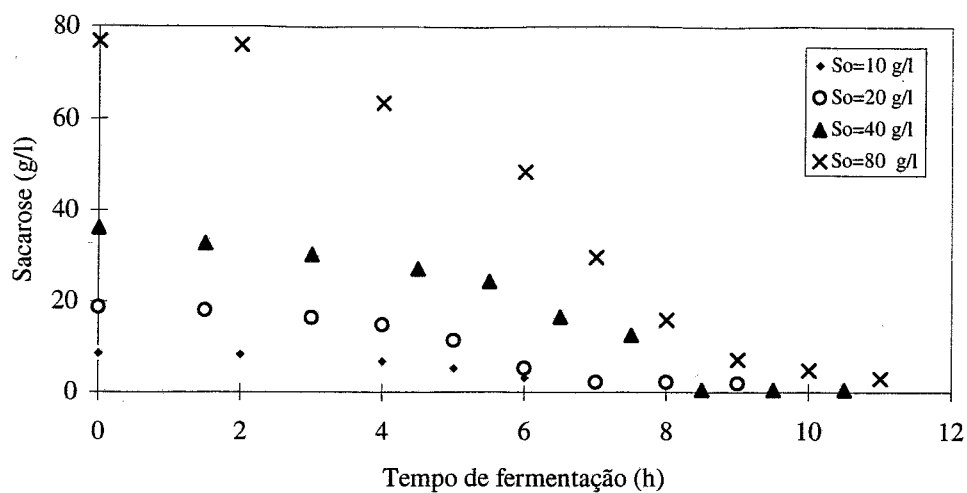
Como se pode ver, da análise da tabela 3.5 e das figuras 3.5.a e 3.5.b, um aumento de concentração de sacarose traduz-se num aumento da concentração celular, de dextrano e de frutose no final da fermentação.

Quanto à actividade da enzima esse aumento também é verificado até uma concentração de sacarose de 40 g dm^{-3} . Para concentrações de 80 e 120 g dm^{-3} as determinações de actividade de enzima no meio são falseadas pois quando se centrifuga a amostra para retirar as células, parte da enzima e até uma pequena parte do dextrano e da frutose são arrastados com a massa celular.

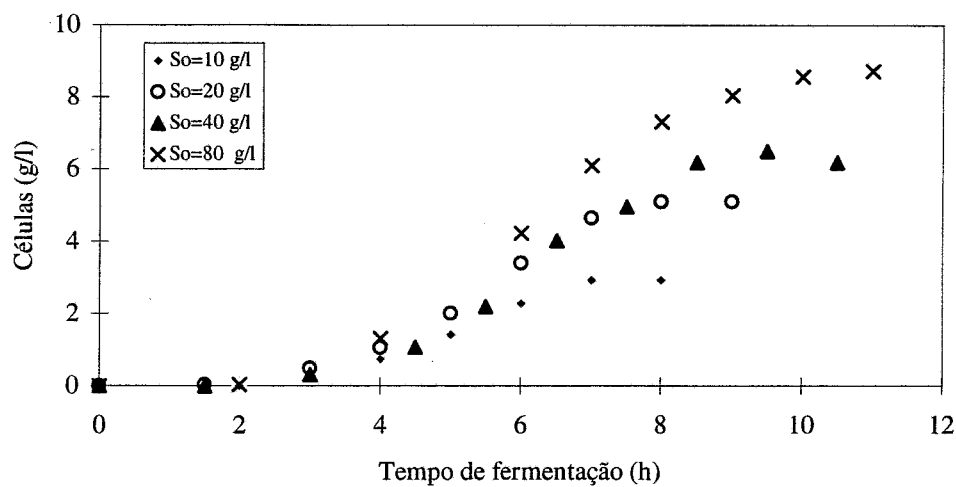
Foi efectuado um pequeno teste ao resíduo colhido na centrifugação para verificar se na realidade era isso que acontecia. Foram detectados vestígios de dextrano e de frutose bem como de sacarose na água de lavagem do resíduo e o teste à enzima dessa água revelou a existência de alguma actividade. Essa actividade é difícil de quantificar uma vez que durante esse processo a enzima que possa existir sofre desactivação.

*Tabela 3.5 - Efeito da concentração de sacarose na produção da dextranosacarase usando a estirpe *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). A agitação foi de 150 rpm.*

Run	Sacarose (g dm ⁻³)	T (° C)	pH	Dextrano produzido (g dm ⁻³)	Frutose produzida (g dm ⁻³)	Actividade Enzima (DSU cm ⁻³)	Peso Células seco (g dm ⁻³)	Tempo Fermentação (h)
15	10	25	5.5	3.04	2.82	54.01	2.94	7
34	10	35	5.5	3.24	3.28	51.30	3.52	6.5
14	10	25	6.7	2.74	2.69	14.36	4.02	8
5	20	25	5.5	7.74	8.10	85.04	5.11	8
31	20	35	5.5	8.17	8.15	81.53	5.85	7
4	20	25	6.7	6.71	7.01	57.02	7.76	11
32	20	35	6.7	6.89	7.09	50.34	8.02	10
7	40	25	5.5	13.53	15.78	107.29	6.51	9.5
33	40	35	5.5	16.24	18.94	101.92	7.86	9
6	40	25	6.7	11.91	13.77	76.91	9.46	10
19	80	25	5.5	20.06	22.73	62.42	8.74	11
20	80	35	5.5	24.63	24.98	60.02	10.86	9
17	80	25	6.7	19.69	21.79	42.86	13.04	12
18	80	35	6.7	22.90	23.89	41.53	13.50	10.5
22	120	35	5.5	34.56	36.19	89.23	12.42	10
21	120	35	6.7	44.21	46.95	42.94	15.52	11



(a)



(b)

Figura 3.5 - Influência da Sacarose na fermentação: a) no consumo da sacarose, b) no crescimento celular. Condições de trabalho: sem arejamento, agitação=150 rpm, $T=25^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=5.5$.

3.2.5 Modelo cinético para a fermentação batch

Os estudos cinéticos de uma reacção são uma parte vital em qualquer processo de investigação de formação de produtos em biotecnologia. Um modelo matemático permite uma análise simples dos dados e ajuda a resolver problemas na etapa de projecto de uma unidade de produção.

Foram publicadas leis cinéticas relativas à produção de alguns polissacáridos microbianos (Klimek e Ollis, 1980; Weiss e Ollis, 1980; Lam e Ollis, 1981). Estes autores desenvolveram modelos para reacções simples em que o polissacárido é produzido dentro da célula e depois excretado para o meio de cultura. No caso em estudo, a produção de dextrano é feita no exterior da célula por uma enzima extracelular produzida também pela bactéria. Isto resulta num modelo mais complicado.

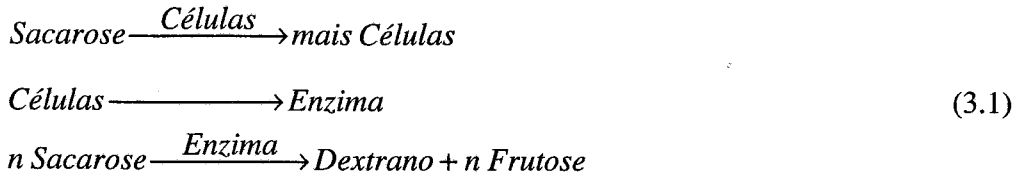
Outros autores (Bailey e Ollis, 1977; Nielsen e Villadsen, 1994; Schügerl, 1987; Shuler e Kargi, 1992) propõem também equações cinéticas para modelizar processos biológicos. Por exemplo a equação de Monod correlaciona surpreendentemente bem vários dados publicados de crescimento celular (Bailey e Ollis, 1977).

Um modelo matemático para a degradação da sacarose pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) e produção da enzima dextranosacarase foi desenvolvido por Landon *et al.* (1994). Partiram do princípio de que os gastos de sacarose para a produção de dextrano e frutose são mínimos uma vez que o pH foi controlado a 6.7 (pH óptimo para o crescimento celular). Brown e McAvoy (1990) e Alsop (1983) seguiram a produção de dextranosacarase pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* e concluíram que esta enzima é um produto tipicamente associado ao crescimento celular.

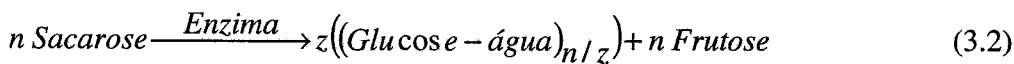
No modelo proposto neste trabalho, a produção de dextrano e frutose foi tomada em conta e o mesmo estudo foi feito para experiências a diferentes pH, concentrações iniciais de sacarose e temperaturas.

3.2.5.1 Bioreacções e estequiometria

A sacarose é consumida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) para crescer e produzir a enzima extracelular dextranosacarase. Esta por sua vez degrada a sacarose existente no meio de cultura para produzir dextrano e frutose. As reacções que ocorrem nesta fermentação são então:



O dextrano é um polímero constituído por unidades de glucose, podendo escrever-se a equação de consumo de sacarose pela enzima da seguinte maneira:



em que n é o número de moles de sacarose disponíveis para a reacção e z é o número de moles de dextrano produzido contendo na sua constituição n/z moles de glucose.

Os balanços de massa são agora escritos para cada espécie em jogo na reacção (3.1).

Para as células tem-se:

$$\text{Células:} \quad r_X = \frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.3)$$

em que r_X é a velocidade de crescimento celular (g/l/h), X é a concentração mássica de células (g/l), t é o tempo (h) e μ é a taxa específica de crescimento celular (h^{-1}).

Para a produção de enzima dextranosacarase o balanço será:

$$\text{Enzima:} \quad r_E = \frac{dE}{dt} = Y_{E/X} \frac{dX}{dt} \quad (3.4)$$

em que r_E é a velocidade de produção de enzima (DSU/ml/h), E é a enzima produzida (DSU/ml), e $Y_{E/X}$ é o coeficiente de rendimento de produção de enzima relativamente à massa de células produzidas (DSU/mg células).

Para a produção de dextrano e frutose foram considerados balanços molares e tanto para a concentração de substrato como para a concentração de enzima foi assumida uma lei cinética de primeira ordem, originando:

$$\text{Frutose:} \quad r_F = \frac{dF}{dt} = nkE(t)S(t) \quad (3.5)$$

$$\text{Dextrano:} \quad r_D = \frac{dD}{dt} = zkE(t)S(t) \quad (3.6)$$

em que r_F e r_D são respectivamente as velocidades de produção para a frutose e o dextrano (mol/l/h), F e D são as concentrações molares da frutose e do dextrano (mol/l), S é a concentração molar da sacarose (mol/l), k é a constante cinética ($\text{h}^{-1}\text{ml DSU}^{-1}$) e n e z são os coeficientes estequiométricos para a frutose e para o dextrano, respectivamente (ver equação 3.2).

Usando concentrações mássicas (g/l) para a frutose (F'), dextrano (D') e sacarose (S'), as equações 3.5 e 3.6 ficam:

$$r_F = \frac{1}{M_F} \frac{dF'}{dt} = nkE(t) \frac{S'(t)}{M_S} \quad (3.7)$$

$$r_D = \frac{1}{M_D} \frac{dD'}{dt} = zkE(t) \frac{S'(t)}{M_S} \quad (3.8)$$

em que M_F , M_D e M_S são as massas molares da frutose, dextrano e sacarose (g/mol). Da equação 3.2 é possível relacionar a massa molar do dextrano M_D com as massas molares da glucose (M_G) e da água (M_W):

$$M_D = \frac{n}{z}(M_G - M_W) \quad (3.9)$$

As velocidades de produção de frutose e de dextrano expressas em g/l/h são então:

$$r'_F = \frac{dF'}{dt} = k' \frac{M_F}{M_S} E(t) S'(t) \quad (3.10)$$

$$r'_D = \frac{dD'}{dt} = k' \frac{(M_G - M_W)}{M_S} E(t) S'(t) \quad (3.11)$$

em que $k' = nk$.

Landon et al. (1994) propuseram um modelo para a síntese da enzima extracelular dextranosacarase com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* e tiveram somente em consideração o consumo de sacarose pelo metabolismo celular. No modelo proposto neste trabalho tomou-se em consideração o consumo de sacarose não só pela biomassa mas também pela enzima produzida pela bactéria para originar frutose e dextrano, i.e.,

$$\Delta S = \Delta S_{\text{assimilado na biomassa}} + \Delta S_{\text{usado pela enzima para produzir dextrano e frutose}}$$

Para o substrato (sacarose) tem-se então o seguinte balanço mássico:

$$\text{Sacarose:} \quad -r'_S = -\frac{dS'}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + nkE(t) S'(t) \quad (3.12)$$

em que r'_S é a velocidade de consumo de sacarose (g/l/h), e $Y_{X/S}$ é o rendimento de crescimento celular da fermentação (g células/g sacarose).

3.2.5.2 Cinética do crescimento celular

Se se observar a curva de crescimento celular na figura 3.2.a verifica-se que esta apresenta uma forma sigmoidal. A aproximação usada para modelizar o crescimento celular é a equação logística que caracteriza o aparecimento da biomassa em termos do valor máximo obtido. Uma aproximação usualmente feita (Klimek e Ollis, 1980; Weiss e Ollis, 1980; Lee *et al.*, 1983; Lam e Ollis, 1981; Ollis, 1983; Humphrey, 1985) relaciona a taxa específica de crescimento com a biomassa (X) como se descreve:

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (3.13)$$

em que μ_m e X_{max} são a taxa específica máxima de crescimento e a concentração máxima de biomassa atingida. A velocidade de crescimento celular r_x é então:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu X = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) X \quad (3.14)$$

Integrando a equação 3.14 com a condição inicial $X(0)=X_0$ (concentração inicial de células) tem-se a equação logística:

$$X(t) = \frac{X_0 \exp(\mu_m t)}{1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - \exp(\mu_m t))} \quad (3.15)$$

ou,

$$\text{Ln} \left(\frac{\bar{X}}{1 - \bar{X}} \right) = \mu_m t - \text{Ln} \left(\frac{X_{max}}{X_0} - 1 \right) \text{ com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{max}} \quad (3.16)$$

Como exemplo e a partir de resultados experimentais (fermentação #31 com $T=35^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=5.5$) $X_{\text{max}}=5.85\text{gcélulas/l}$, e de um gráfico representando $\ln\left[\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right]$ versus tempo obtém-se uma recta com declive $\mu_m=1.423\text{ h}^{-1}$ e ordenada na origem $X_0/(X_{\text{max}} - X_0)=0.894\times 10^{-3}$ correspondendo a $X_0=0.00523\text{ g/l}$.

A figura 3.6 mostra a curva experimental obtida para a concentração celular $X(t)$ em função do tempo comparada com os resultados obtidos com a equação 3.15 do modelo.

Os parâmetros μ_m e X_0 foram calculados (apêndice A) também para outras experiências e são apresentados na tabela 3.7.

μ_m e X_0 variam com a concentração inicial de sacarose, com o pH e com a temperatura de operação em cada experiência.. Da tabela 3.7 pode observar-se que μ_m apresenta valores mais elevados para $T=35^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=5.5$. O parâmetro μ_m também tende a decrescer à medida que a concentração inicial de sacarose aumenta.

Relativamente aos valores obtidos para X_0 não são afectados por variações na temperatura, pH ou concentração inicial de sacarose. No entanto, a variação deste parâmetro deve-se ao facto de que dois inóculos nunca são iguais. São preparados exactamente da mesma maneira mas o número de células viáveis presentes no slant de agar previamente preparado e conservado a 4°C nunca é igual entre slants. Este aspecto tem uma influência muito grande na concentração final de células do inóculo dando origem a diferenças nos valores calculados no início de cada fermentação.

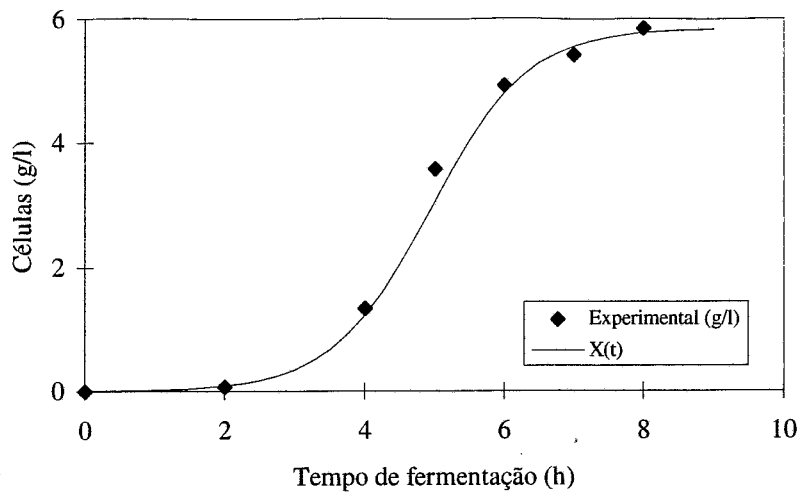


Figura 3.6 - Crescimento celular: comparação dos resultados experimentais com os resultados obtidos com o modelo (fermentação #31).

3.2.5.3 Cinética de produção da enzima extracelular dextranosacarase.

A concentração da enzima em função do tempo pode ser obtida substituindo dX/dt (equação 3.14) na equação 3.4. Depois de integrar obtém-se:

$$E(t) = Y_{E/X} X_0 \left(\frac{\exp(\mu_m t)}{1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - \exp(\mu_m t))} - 1 \right) \quad (3.17)$$

O rendimento $Y_{E/X}$ foi calculado usando os resultados experimentais da fermentação #31:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{max} - E_0}{X_{max} - X_0} = \frac{81.53 - 0}{5.85 - 0} = 13.95 \frac{DSU/ml}{g \text{ células/l}} \quad (3.18)$$

Na figura 3.7 comparam-se os resultados experimentais da produção de enzima $E(t)$ com os resultados obtidos com o modelo.

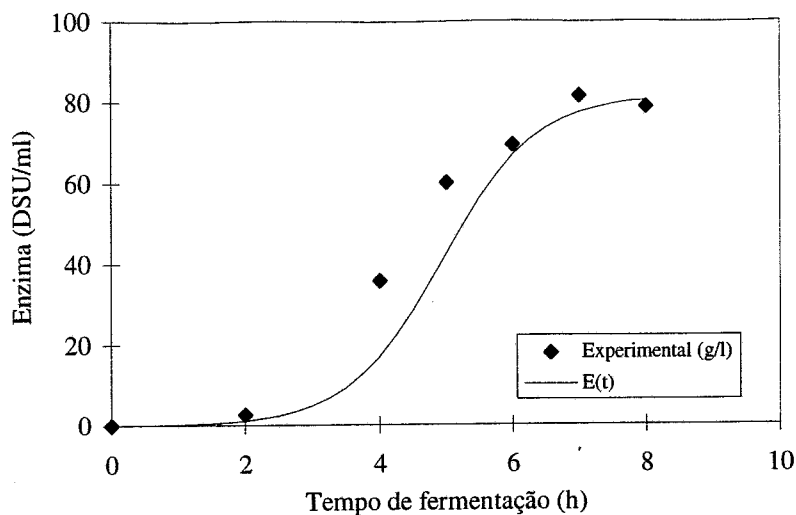


Figura 3.7 - Produção de enzima $E(t)$: comparação dos resultados experimentais com os resultados obtidos com o modelo (fermentação #31).

3.2.5.4 Modelo para o consumo de sacarose e produção de dextrano e frutose

O coeficiente de rendimento da biomassa: Y_{XS}

Para resolver $-r'_s$ (equação 3.12) é necessário calcular o rendimento em Y_{XS} . Este rendimento foi calculado relativamente à quantidade de sacarose usada no crescimento celular i. e., a concentração inicial de sacarose (19.02 g/l) menos a sacarose consumida para produzir dextrano e frutose menos a sacarose residual. Esta quantidade de sacarose pode ser calculada usando-se o seguinte balanço de massa:

$$-\frac{dS'_{\text{Usada pela enzima}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt} \quad (3.19)$$

Integrando a equação 3.19 tem-se:

$$S'_{\text{Usada pela enzima}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{M_G - M_W} D'_{\text{final}} \quad (3.20)$$

A concentração final de frutose será usada para calcular a quantidade de sacarose consumida pela enzima dextranosacarase. A concentração final de frutose foi de 8.15 g/l; da equação 3.20 tira-se que a sacarose usada pela enzima foi 1.89×8.15 g/l. Como a concentração final de sacarose foi 0.96 g/l, o rendimento Y_{xs} pode ser calculado:

$$Y_{x/s} = \frac{5.85}{19.02 - (1.89 \times 8.15) - 0.96} = 3.57 \text{ g cel./g sacarose} \quad (3.21)$$

Agora é possível resolver as equações 3.10, 3.11 e 3.12 para se obter os perfis teóricos para a frutose, o dextrano e a sacarose.

Para resolver este sistema de equações foi usado num PC o pacote MAPLE 5.0 e o método numérico Runge-Kutta-Fehlberg de 4ª e 5ª ordem (Conte e de Boor, 1982).

A produção de frutose $F'(t)$ e dextrano $D'(t)$ e o consumo de sacarose $S'(t)$ ao longo do tempo são apresentados nas figuras 3.8 a 3.10. As curvas teóricas que se mostram foram determinadas usando o melhor valor de $k'=0.015$ ml/DSU.h.

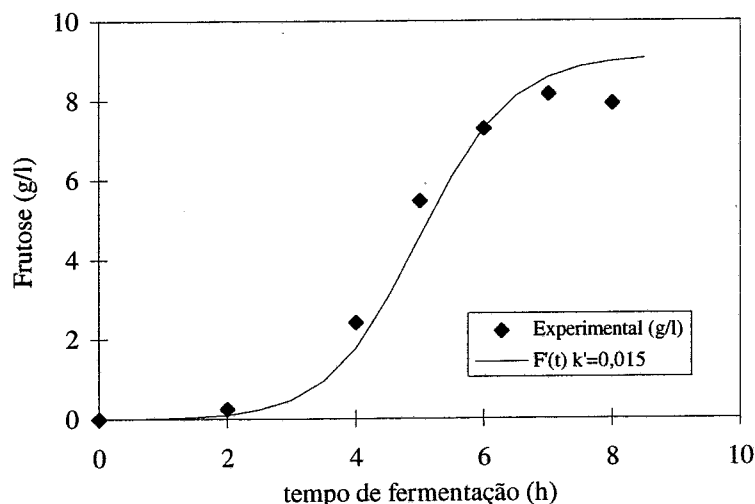


Figura 3.8 - Produção de frutose $F'(t)$: comparação dos resultados experimentais com os resultados obtidos com o modelo (fermentação #31).

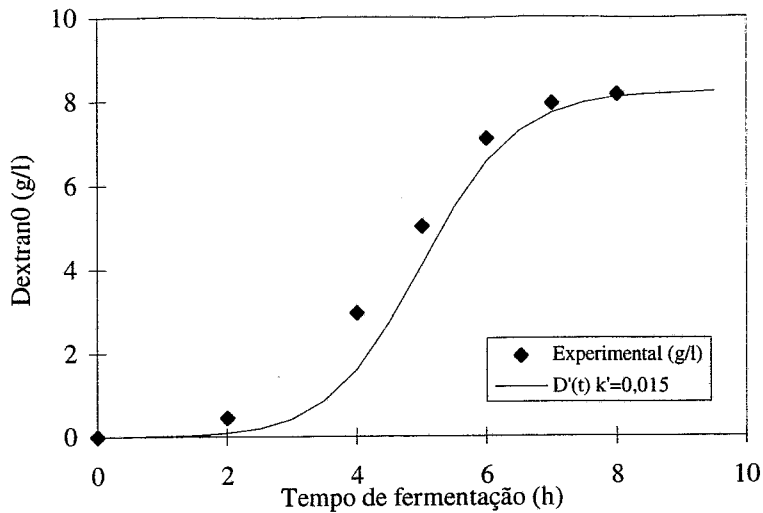


Figura 3.9 - Produção de dextrano $D'(t)$: comparação dos resultados experimentais com os resultados obtidos com o modelo (fermentação #31).

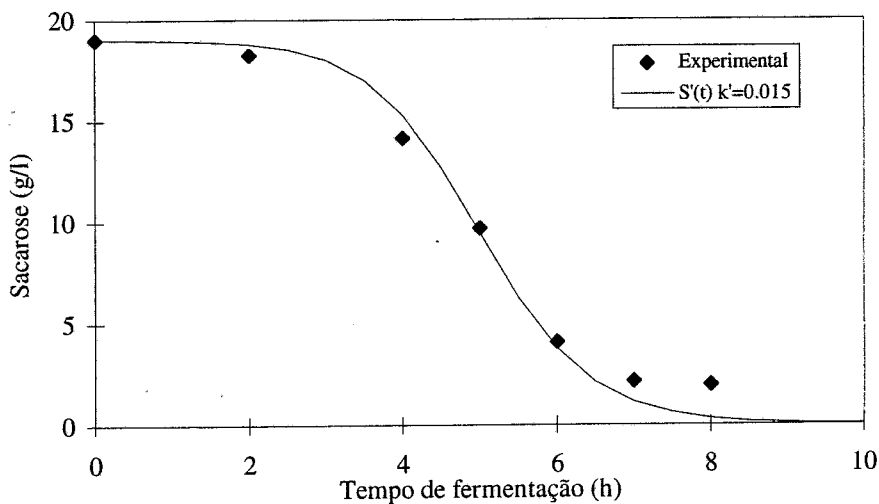


Figura 3.10 - Consumo de sacarose $S'(t)$: comparação dos resultados experimentais com os resultados obtidos com o modelo (fermentação #31).

A suposição de que se partiu para uma cinética de primeira ordem relativamente à concentração de enzima e de sacarose na produção de dextrano e frutose confirma-se ao rearranjar as equações 3.10 e 3.11; fazendo $E(t)/r'_F$ e $E(t)/r'_D$ versus $1/S'(t)$ obtiveram-se duas linhas rectas que passam pela origem indicando uma cinética de primeira ordem. Do declive pode estimar-se $1/k'$.

Na tabela 3.6 é apresentado um resumo das equações do modelo cinético e todos os dados necessários para se proceder à modelização.

Tabela 3.6 - Equações do modelo, dados de entrada e parâmetros calculados para fermentação batch da sacarose para produzir dextrano e frutose (fermentação #31).

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= \mu X = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X \\ \frac{dE}{dt} &= Y_{E/X} \frac{dX}{dt} \\ \frac{dF'}{dt} &= k' \frac{M_F}{M_S} E(t) S'(t) \\ \frac{dD'}{dt} &= k' \frac{(M_G - M_W)}{M_S} E(t) S'(t) \\ -\frac{dS'}{dt} &= \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + nkE(t) S'(t)\end{aligned}$$

Condições iniciais:
 $t = 0; S = S_0; X = X_0$

Dados de entrada:
 $X_{\max}; E_{\max}; S_0$

Parâmetros calculados:
 $X_0; \mu_{\max}; Y_{E/X}; Y_{X/S}$

O parâmetro k' é otimizado.

Ainda se apresenta na tabela 3.7 um resumo de todos os parâmetros calculados em várias experiências. No apêndice A apresenta-se um resumo de todos os cálculos efectuados e gráficos relativos às experiências mencionadas na tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Parâmetros do modelo μ_m , X_0 , $Y_{E/X}$, $Y_{X/S}$, e k' calculados para outras experiências.

Run	T (°C)	pH	S' (g/l)	μ_m (h ⁻¹)	X_0 (g/l)	$Y_{E/X}$ (DSU/ mg cel.)	$Y_{X/S}$ (g cel./g sac.)	k' (ml/DSU.h)
5	25	5.5	20	1.272	0.00654	16.64	3.41	0.015
31	35	5.5	20	1.423	0.00523	13.95	3.57	0.015
5	25	5.5	20	1.272	0.00654	16.64	3.41	0.015
4	25	6.7	20	0.748	0.09220	7.36	3.35	0.010
1	25	s. c.	20	0.808	0.00723	12.27	2.03	0.011
1	25	s. c.	20	0.808	0.00723	12.27	2.03	0.011
2	30	s. c.	20	1.037	0.00599	10.02	1.15	0.012
6	25	6.7	40	0.877	0.02860	8.13	1.10	0.010
7	25	5.5	40	0.947	0.01880	16.48	1.12	0.010
14	25	6.7	10	0.968	0.12290	3.57	2.65	0.017
4	25	6.7	20	0.748	0.09220	7.36	3.35	0.010
6	25	6.7	40	0.877	0.02860	8.13	1.10	0.010
17	25	6.7	80	0.822	0.02270	3.29	0.33	0.010
31	35	5.5	20	1.423	0.00523	13.95	3.57	0.015
20	35	5.5	80	1.306	0.00764	5.53	0.39	0.013
22	35	5.5	120	1.076	0.01432	7.18	0.27	0.014
15	25	5.5	10	1.181	0.00838	18.37	1.26	0.017
5	25	5.5	20	1.272	0.00654	16.64	3.41	0.015
7	25	5.5	40	0.947	0.01880	16.48	1.12	0.010
19	25	5.5	80	1.073	0.00962	7.14	0.28	0.010

3.3 Fermentação fed-batch

Numa cultura fed-batch, os nutrientes são adicionados ao reactor por um processo contínuo ou semi-contínuo não existindo uma corrente de saída havendo portanto acumulação. Geralmente recorre-se a um processo fed-batch quando o microorganismo sofre inibição por concentração de um ou mais nutrientes, ou quando por exaustão de um dos nutrientes se iniciam processos secundários (Nielsen e Viladsen, 1994).

No caso em estudo, a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) recorre a um dos produtos (frutose) para continuar activa quando o substrato (sacarose) se esgota. É interessante então estudar o comportamento da bactéria num processo fed-batch.

Nesta experiência foi usada a mesma instalação experimental que na fermentação batch. Foi usada somente uma segunda bomba peristáltica para adicionar os nutrientes ao reactor.

Antes de dar início à fermentação é importante definir alguns parâmetros: volume inicial no reactor (V_0 , l), caudal de alimentação (Q , l/h), concentração de sacarose no reactor e na corrente de alimentação (S_0 e S_F , g/l) e tempo de fermentação batch a que se deve iniciar a fermentação fed-batch (t_{F-B} , h).

O volume de trabalho do reactor é de 1.5 l. O volume inicial de meio de cultura V_0 fica automaticamente definido uma vez que o volume mínimo de líquido dentro do reactor para que a pá de agitação e as sondas de pH e temperatura e alheta de arrefecimento fiquem submersas é 0.5 l. Optou-se por um tempo de fermentação semelhante ao tempo de fermentação batch e usou-se o valor médio de 10 horas. A temperatura de trabalho foi 35°C, pH=5.5 e agitação 150 rpm. A experiência foi realizada sem arejamento. O tempo de fermentação batch a que se inicia a fermentação fed-batch deverá ser de tal ordem que o crescimento celular se encontre em plena fase exponencial de crescimento. Tomou-se então como valor óptimo o tempo ao qual a concentração celular é metade da concentração máxima. A

concentração inicial de sacarose no reactor foi de 10 g/l (para arrancar com o processo não faz sentido usar concentrações muito elevadas, normalmente usam-se concentrações mais baixas do que a da corrente de alimentação do reactor) e a concentração de sacarose na corrente de alimentação foi de 20 g/l.

Recorrendo a experiências previamente realizadas em batch com concentração inicial de sacarose de 10 g/l, verificou-se que o tempo para o qual a concentração de células é metade da concentração máxima é de 5 horas ($t_{F-B}=5$ h). Para determinar o caudal a usar assume-se que para completar o volume máximo do reactor (1.5 l) nas cinco horas que restam tem que se adicionar a alimentação ao reactor a 0.2 l/h.

Assim usou-se um inóculo de 25 ml para dar início à fermentação batch em 500 ml de meio de cultura. Ao fim de 5 horas de fermentação batch deu-se início ao processo fed-batch adicionando a alimentação durante mais cinco horas a um caudal de 0.2 l/h. As percentagens de extracto de levedura (20 g/l) e de Na_2HPO_4 (8 g/l) no meio de cultura são iguais às usadas nas experiências batch. Os resultados podem ser observados nas figuras 3.11.a e 3.11.b.

3.3.1 Modelo cinético para a fermentação fed-batch

O modelo proposto para a fermentação fed-batch é nas primeiras 5 horas o mesmo já apresentado para a fermentação batch na secção 3.2.5. Para as restantes 5 horas de fermentação o modelo proposto é em tudo semelhante ao apresentado para um processo batch com as devidas alterações por variação de volume no reactor com a entrada de uma corrente a um caudal de alimentação Q . As equações do modelo são apresentadas na tabela 3.8.

Para simular a experiência até às 5 horas de fermentação batch foram usados os parâmetros calculados para a fermentação 15 (ver tabela 3.7). As condições de trabalho são iguais com a excepção da temperatura (fermentação 15 é a experiência mais aproximada).

Na simulação do processo aquando do início da fermentação fed-batch, foram usados os parâmetros calculados para a fermentação batch realizada nas mesmas condições (fermentação 31, ver tabela 3.7).

Tabela 3.8 - Equações do modelo, dados de entrada e parâmetros calculados para fermentação fed-batch da sacarose para produzir dextrano e frutose.

$$V(t) = V_0 + Q \times t$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X(t)}{X_{\max}} \right)$$

$$\frac{dX}{dt} = \left(\mu - \frac{Q}{V(t)} \right) X(t)$$

$$\frac{dE}{dt} = Y_{E/X} \mu_{\max} \left(1 - \frac{X(t)}{X_{\max}} \right) X(t) - \frac{Q}{V(t)} E(t)$$

$$\frac{dF'}{dt} = k' \frac{M_F}{M_S} E(t) S'(t) - \frac{Q}{V(t)} F'(t)$$

$$\frac{dD'}{dt} = k' \frac{(M_G - M_W)}{M_S} E(t) S'(t) - \frac{Q}{V(t)} D'(t)$$

$$-\frac{dS'}{dt} = -\frac{Q}{V(t)} (S'_F - S'(t)) + \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + nkE(t) S'$$

Condições iniciais:

No início da fermentação fed-batch, S' e X tomam os valores obtidos ao fim de 5 horas de fermentação batch.

Dados de entrada para a fermentação batch realizada nas mesmas condições que a fed-batch (fermentação 31):

$$X_{\max}; E_{\max}; S'_F; Q; V_0$$

Parâmetros calculados para a fermentação 31:

$$X_0; \mu_{\max}; Y_{E/X}; Y_{X/S}; k' \text{ é otimizado.}$$

Na figura 3.11.a e 3.11.b podem comparar-se os resultados experimentais com os resultados obtidos na modelização. Existe um desfasamento no consumo da sacarose entre a 5ª e a 10ª hora de fermentação que se nota também no crescimento celular e na produção de enzima.

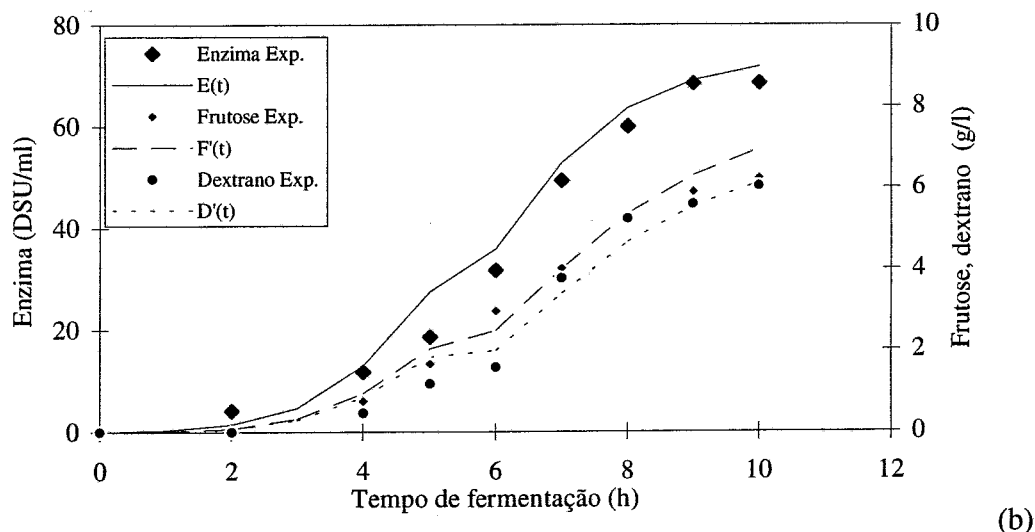
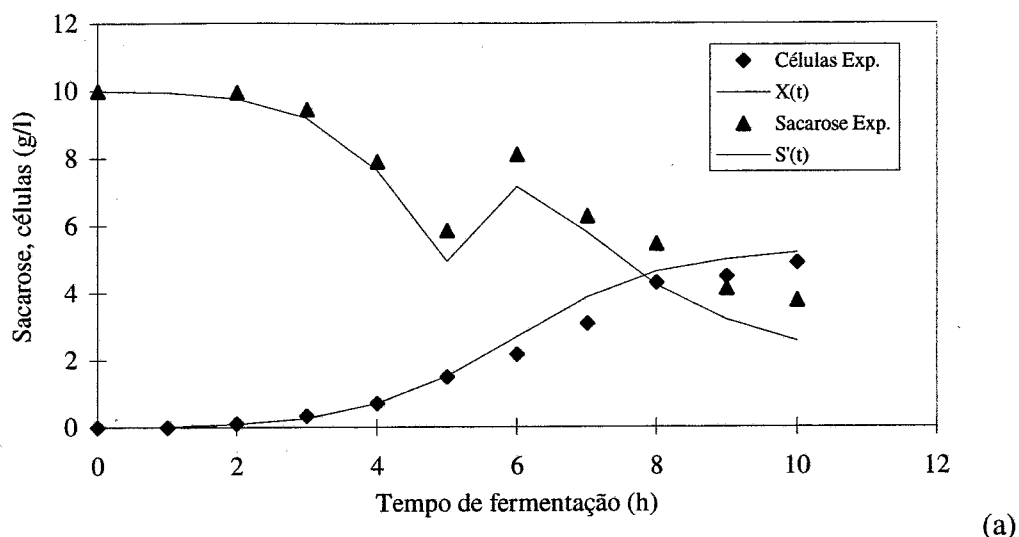


Figura 3.11 - Resultados experimentais obtidos na fermentação fed-batch comparados com os resultados obtidos com o modelo proposto, (a) Consumo de sacarose e crescimento celular, (b) produção de enzima, frutose e dextrano.

3.4 Conclusões

Neste capítulo foram apresentados resultados obtidos nas fermentações batch e fed-batch com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* e foi desenvolvido um modelo cinético para ambas.

Os valores mais elevados de enzima produzida na fermentação batch foram obtidos a 35°C e pH=5.5 para concentrações iniciais de sacarose até 40 g dm⁻³. Para concentrações mais elevadas (80 e 120 g dm⁻³) houve dificuldade na centrifugação da biomassa. Neste passo alguma enzima, dextrano e frutose são arrastados com as células.

A velocidade de produção da enzima dextranosacarase é mais alta para pH=5.5 e diminui com o aumento da concentração inicial de sacarose.

Da observação dos resultados apresentados na tabela 3.6 a gama de concentração inicial de sacarose entre 20 e 40 g dm⁻³ parece ser a ideal uma vez que a enzima produzida apresenta os valores mais elevados. A pH=6.7 os valores obtidos são sempre mais baixos.

A enzima é mais activa para temperaturas mais baixas e pH=5.5. A 25°C e pH=5.5 o rendimento Y_{EX} tende a diminuir quando a concentração inicial de sacarose está acima dos 40 g dm⁻³.

Para ambos os pH's (5.5 e 6.7) o rendimento Y_{XS} tem um máximo para concentração inicial de sacarose=20 g dm⁻³. Este rendimento é influenciado pela temperatura e atinge o valor mais alto para T=35°C quando se usa uma concentração inicial de sacarose de 20 g dm⁻³. O arejamento do meio de cultura não melhorou a produção de enzima, dextrano e frutose.

A fermentação em fed-batch realizada não melhora a produção de enzima dextrano ou frutose. A vantagem em usar este processo está em fazer processos cíclicos de fed-batch em que no fim de cada um se esvazia o reactor até ao volume V_0 e se reinicia a

alimentação ao fermentador. Com este método a sacarose no meio de cultura nunca se esgota e portanto a bactéria não tem de recorrer à frutose produzida para se manter activa.

O modelo proposto é uma aproximação razoável dos resultados experimentais obtidos para a fermentação tipo #31. No final da fermentação (ver figura 3.8) os resultados do modelo para a frutose desviam-se dos dados experimentais. Isto deve-se ao facto de que quando no meio de cultura a sacarose se encontra em concentrações muito baixas, a frutose é consumida pela bactéria como fonte alternativa de carbono. Quanto à fermentação em fed-batch os resultados de modelização são também razoáveis.

A constante cinética k' tem o valor mais elevado nas fermentações #14 e #15 ($k'=0.017$ ml/DSU.h, ver tabela 3.8). Estas experiências realizadas com concentração de sacarose de 10 g dm^{-3} (muito baixa) são extremamente rápidas; as células entram em stress muito cedo devido à baixa concentração de substrato e devido à competição pela sacarose entre as células e a enzima produzida.

Para a concentração inicial de sacarose de 20 g dm^{-3} e $\text{pH}=5.5$, a constante cinética k' é 0.015 ml/DSU.h . Quando o $\text{pH}=6.7$ ou não é controlado e também a 20 g dm^{-3} de concentração de sacarose inicial, k' encontra-se na gama entre 0.010 e 0.012 ml/DSU.h . Para $\text{pH}=5.5$ e $T=35^\circ\text{C}$, o parâmetro cinético k' tem um valor óptimo para a concentração inicial de sacarose= 20 g dm^{-3} ($k'=0.015 \text{ ml/DSU.h}$).

A previsão do modelo respeitante à actividade da enzima (ver figura 3.7) mostra um desfasamento relativamente aos resultados experimentais. Isto pode ser explicado pelo facto de que no modelo proposto não se considerou o transporte de massa desde a célula, aonde a enzima é produzida, até ao meio de cultura (fase líquida).

O modelo desenvolvido para simular a conversão de sacarose em dextrano e frutose apresenta bons resultados para fermentação batch com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides*.

Valores óptimos para a constante cinética k' foram encontrados para uma concentração inicial de substrato de 20 g dm^{-3} , confirmando que esta é a melhor concentração inicial de sacarose para a estirpe *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f).

Lista de símbolos:

D	concentração molar de dextrano (mol/l)
D'	concentração mássica de dextrano (g/l)
E	actividade da enzima (DSU/ml)
F	concentração molar da frutose (g/l)
F'	concentração mássica da frutose (mol/l)
k	parâmetro cinético nas equações 3.5 e 3.6
k'	parâmetro cinético nas equações 3.11 e 3.12 (ml/DSU.h)
M _s	massa molar da sacarose (g/mol)
M _F	massa molar da frutose (g/mol)
M _w	massa molar da água (g/mol)
n	coeficiente estequiométrico para a sacarose
Q	Caudal de alimentação em fed-batch (l/h)
S	concentração molar da sacarose (mol/l)
S'	concentração mássica da sacarose (g/l)
S' _F	concentração mássica da sacarose na corrente de alimentação (g/l)
r _x	velocidade de crescimento celular (g cel./l/h)
(-r' _s)	velocidade de consumo de substrato (g/l/h)
t	tempo (h)
T	temperatura (°C)
V	Volume do reactor (l)
V ₀	Volume inicial no reactor num processo fed-batch (l)
X	concentração mássica de biomassa (g/l)
z	coeficiente estequiométrico para o dextrano
Y _{E/X}	rendimento enzima/substrato
Y _{X/S}	rendimento biomassa/substrato

Símbolos gregos:

μ	velocidade específica de crescimento celular (h ⁻¹)
$\mu_{\max}$	velocidade específica máxima de crescimento celular (h ⁻¹)

Referências Bibliográficas

Alsop, R. M.; 1983, "Industrial production of dextrans.", *Progress in Industrial Microbiology*, 18, 1-44.

Bailey, J. E.; Ollis, D. F.; 1977, "Biochemical Engineering Fundamentals", 1st edition McGraw-Hill, New York.

Barker, P. E.; Ajongwen, N. J.; 1991, "The production of the enzyme dextransucrase using nonaerated fermentation techniques", *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 703-707.

Brown, D. E., McAvoy, A.; 1989, "A pH controloled fed-batch process for dextransucrase production.", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 48, 405-414

Conte, S., D.; de Boor, C.; 1982, "Elementary Numerical Analysis, An Algorithmic Approach", Third Edition, McGraw-Hill, Japan.

De Man, J. C.; Rogosa, M.; Sharpe, E.; 1960, "A medium for the cultivation of lactobacilli", *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 130-138.

Humphrey, A. E.; 1985, "Substrate utilization models for controlo of bioreactors", *Chem. Eng. Commun.*, 45, 1-13.

Johnson, M. K.; McCleskey, C. S.; 1957, "Studies on the aerobic carbohydrate metabolism of *Leuconostoc mesenteroides*.", *J. Bacteriology*, 74, 22-25.

Klimek, J.; Ollis, D. J.; 1980, "Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter vinelandii* and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations.", *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 2321-2342.

Koepsell, H. J.; Tsuchiya, H. M.; 1952, "Enzymatic synthesis of dextran", *J. Bact.*, 63, 293-295.

Lee, I. M.; Pollard, J. F.; Coulman, G. A.; 1983, "Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation", *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 497-511.

Lam, J. C.; Ollis, D. F.; 1981, "Kinetics of Multiproduct Fermentations", *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1517-1525.

Landon, R. S.; Hudson, I. H.; Kramer, W.; Webb, C.; 1994, "A model of dextransucrase synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*.", *Trans IChemE*, 72, Part C, 209-215.

Lazic, M. L.; Veljkovic, V. B.; Vucetic, V. B.; Vrvic, M. M.; 1993, "Effect of pH on dextran production by *Leuconostoc Mesenteroides*.", *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 334-338.

Lebrun, L.; Junter, G. A.; Jouenne, T.; Mignot, L.; 1994, "Exopolysaccharide production by free and immobilized microbial cultures.", *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1048-1054.

Nielsen, J.; Viladsen, J.; 1994; "Bioreaction Engineering Principles", Plenum Press, New York.

Plihon, F.; Taillandier, P.; StreHaiano, P.; 1995, "Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc mesenteroides*: relationship between oxygen uptake, growth and end-products.", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 117-122.

Ollis, D. F.; 1983, "A simple batch and fermentation model: theme and variations", *Annals New York Academy of Sciences*, 413, 144-156.

Schugler, K.; 1987, "Bioreaction Engineering: Reactions involving microorganisms and cells.", volume 1, John Wiley & Sons, England.

Sneath, P.; Mair, N.; Sharpe, M.; Holt, J.; 1986, "Berguey's Manual of Systematic Bacteriology", volume 2, Williams & Wilkins, 1071-1074.

Weiss, R. M.; Ollis, D. F.; 1980, "Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation.", *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 859-873.

Capítulo 4

**Estudos de engenharia metabólica, estudos reológicos e
caracterização do peso molecular dos dextranos produzidos.**

4. Estudos de engenharia metabólica, estudo reológico do meio fermentado e caracterização do peso molecular dos dextranos produzidos.

Para entender o funcionamento de um sistema biológico é necessário um conhecimento básico do crescimento celular e da função microbiana. Usualmente estes factores dominam um processo bioquímico.

Sistemas com células ou com enzima, imobilizados ou livres foram estudados (Lebrun et al., 1994; Kaboli e Reilly, 1980; Monsan e Lopez, 1981; Reilly e Landis, 1981). Também as necessidades nutricionais da bactéria (Koepsell e Tsuchiya, 1952) e a influência de outras fontes de azoto ou cofactores têm sido estudados (Barker e Ajongwen, 1991). No entanto pouco tem sido feito no que diz respeito a comparações entre a principal fonte de carbono e a fonte de azoto. A transformação da fonte de carbono pelo microorganismo não é uma função separada do metabolismo mas sim parte de um leque de reacções bioquímicas em que o azoto tem um papel fundamental. Neste capítulo é feito um estudo do efeito da relação azoto/carbono ao longo da fermentação na produção da enzima extracelular dextranosacarase. Tentou-se também melhorar a síntese enzimática por adição de pulsos de aminoácidos (extracto de levedura) ao longo da fermentação.

Muitos autores (Dols et al., 1997a e 1998a; Funame et al., 1995 e 1998; Kim e Robyt, 1994; Monchois et al., 1996; Monchois et al., 1997, Robyt e Walseth, 1979) dedicaram-se a estudar modos de purificar a enzima dextranosacarase e de a caracterizar. No campo da engenharia metabólica é importante estudar a influência de outras fontes de carbono primárias ou complementares (Dols et al., 1997b, 1998b e 1998c; Robyt e Walseth, 1978; Robyt e Eklund, 1983) para assim poder manipular o crescimento celular e a produção de enzima usando um substrato menos específico e com valor comercial mais baixo. O estudo da influência de fontes de carbono complementares na fermentação da sacarose com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F foi também feito e é apresentado neste capítulo.

4.1 Estudo da relação azoto/carbono no meio de cultura durante a fermentação.

É conhecida a dependência da fonte de carbono (Sacarose) para a indução da síntese da enzima dextranosacarase; no entanto não se sabe se é necessária uma relação constante entre a concentração de azoto e a concentração de carbono para a síntese. Esta relação é muito estudada em metabolismos secundários, no entanto para este tipo de indução em que é necessária uma quantidade de sacarose que não seja em excesso não foram feitos estudos.

Será feita a análise da relação azoto aminoacídico/carbono. Se esta não for constante verificar-se-á a conveniência de corrigir o nível de azoto com um sistema Fed-Batch.

Todas as experiências realizadas foram repetidas incorporando no meio de cultura alguns dpm (“desintegrations per minute”) de um aminoácido marcado ^{14}C fenilalanina de modo a que fosse possível verificar a quantidade de precursor incorporado na proteína (enzima) sintetizada.

4.1.1. Produção da enzima dextranosacarase.

Para a operação do digestor tomam-se as condições óptimas estabelecidas anteriormente: 20g/l de sacarose, $T=35^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=5.5$. A concentração de extracto de levedura usada foi mais baixa (7 g/l) pois não se justifica, a nível industrial, trabalhar com fontes de nutrientes em excesso.

Às amostras colhidas foram feitas as análises habituais de peso de células seco, concentração de sacarose e frutose, a actividade da enzima e ainda, a quantidade de proteínas correspondentes à enzima sintetizada usando-se o método de Lowry (Lowry et al., 1951) e a quantidade de aminoácidos livres no meio de cultura provenientes do extracto de levedura pelo método do formol e NaOH (em mg de azoto aminoacídico) (Herlich, 1995). Nestas experiências foi usada a técnica de DNS (Miller, 1959) para determinação da sacarose uma vez que o local onde se realizaram as experiências

(Universidade da Republica, Montevideo, Uruguay) não dispunha de uma unidade de HPLC. Não foi determinada a concentração de dextranos.

Os resultados para a fermentação batch da sacarose com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) apresentam-se na tabela 4.1. A figura 4.1.a mostra a curva de crescimento celular e a curva de consumo de sacarose ao longo da fermentação. A figura 4.1.b mostra a evolução na actividade da enzima e a razão azoto/carbono durante a fermentação.

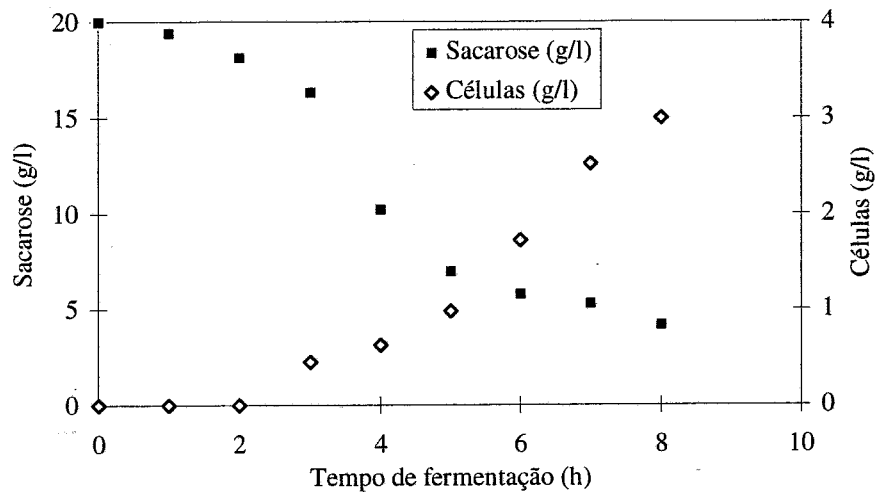
Tabela 4.1 - Resultados obtidos na fermentação batch para a produção de dextranosacarase.

Tempo (h)	azoto/carbono (mg azoto aminoacídico/g sacarose)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0	0.70	0.00	20.00	0.00
1	0.70	0.00	19.42	1.00
2	0.71	0.00	18.12	2.40
3	0.65	0.45	16.33	8.30
4	0.6	0.63	10.20	20.00
5	0.75	0.98	6.98	25.00
6	0.72	1.72	5.80	32.00
7	0.60	2.52	5.30	38.00
8	0.60	3.00	4.20	40.00

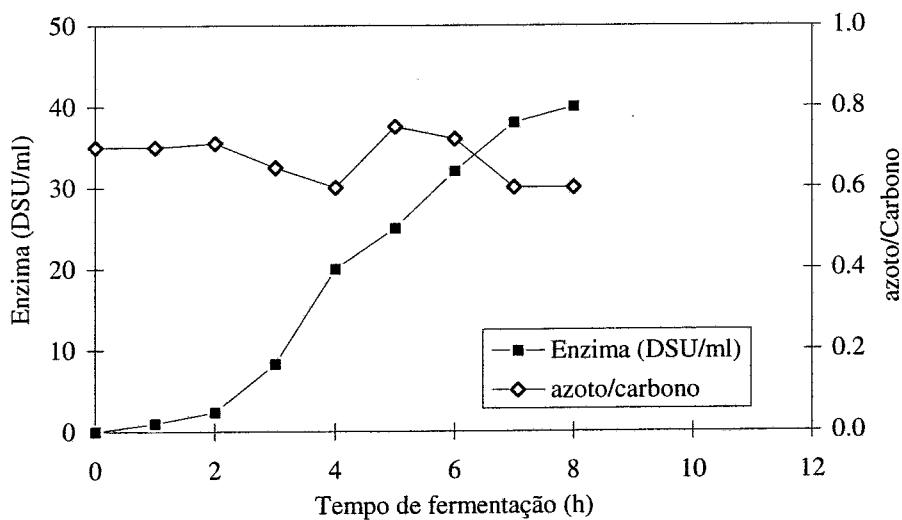
Se observarmos a curva de produção da enzima dextranosacarase (figura 4.1.b) nota-se que por volta das 4 e das 7 horas de fermentação existe uma quebra na sua produção. No gráfico apresentado na figura 4.1.b pode comparar-se a relação aminoácidos/carbono com a curva de produção de enzima. Existe também uma quebra na relação aminoácidos/carbono por volta das 4 e das 7 horas de fermentação.

Perante estes resultados achou-se conveniente realizar uma fermentação nas mesmas condições mas corrigindo-se o teor de azoto aminoacídico (por adição de Extracto de Levedura) por Fed-Batch às 3.5 e 6.5 horas de fermentação.

Nos gráficos apresentados nas figuras 4.2.a e 4.2.b podem observar-se as curvas de crescimento celular, de consumo de sacarose e de produção de enzima bem como a relação azoto/carbono para a fermentação fed-batch.



(a)



(b)

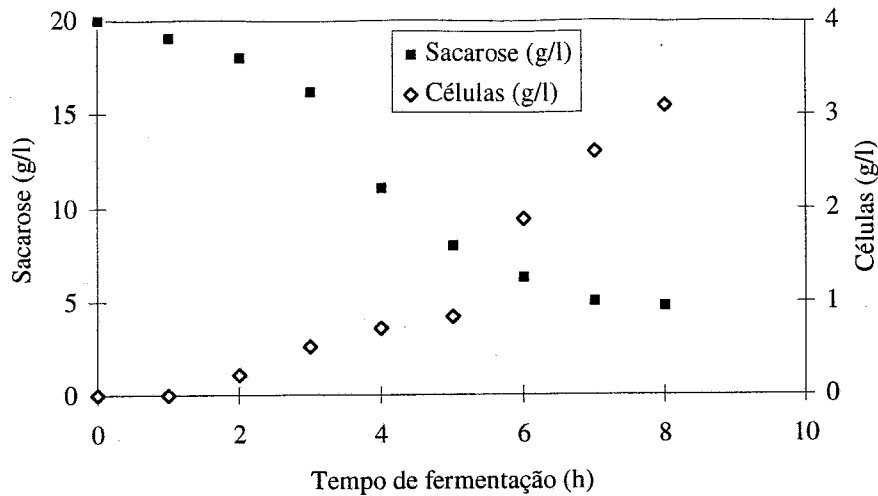
Figura 4.1 - (a) Curvas de crescimento celular e de consumo de sacarose durante a fermentação batch, (b) curva de produção de enzima e relação azoto/carbono ao longo da fermentação batch. A temperatura usada foi de 35°C, o pH controlado a 5.5, e a concentração de sacarose foi de 20g/l.

Comparando as figuras 4.1.b e 4.2.b pode ver-se que a actividade final da enzima está em ambos os casos à volta de 40 DSU/ml mas na fermentação fed-batch em que pulsos de azoto aminoacídico foram adicionados a razão azoto/carbono mantém-se constante ao longo da fermentação e a velocidade de produção de enzima é mais elevada, encurtando assim o tempo de fermentação.

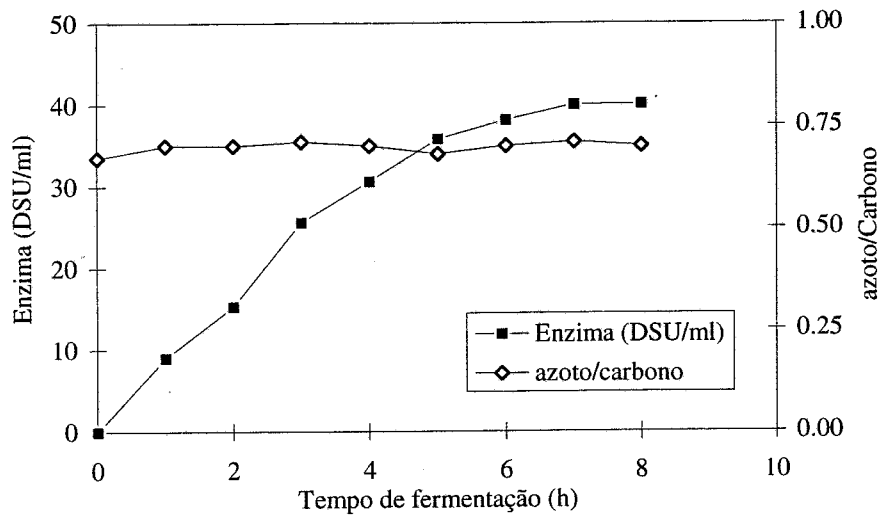
Tabela 4.2 - Resultados obtidos na fermentação fed-batch para a produção de dextranosacarase.

Tempo (h)	azoto/carbono (mg azoto aminoacídico/g sacarose)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Enzima. (DSU/ml)
0	0.67	0.00	20.00	0.00
1	0.70	0.00	19.10	9.01
2	0.70	0.22	18.02	15.32
3	0.71	0.52	16.23	25.06
4	0.70	0.72	11.11	30.61
5	0.68	0.84	8.02	35.82
6	0.70	1.89	6.31	38.13
7	0.71	2.61	5.01	40.01
8	0.70	3.10	4.80	40.10

O primeiro pulso de extracto de levedura foi injectado no reactor às 3.5 horas de fermentação, o segundo pulso foi injectado às 6.5 horas de fermentação mas não influenciou em nada a mesma uma vez que a sacarose se encontrava praticamente exausta. Quanto à curva de produção de enzima na figura 4.2.b verifica-se uma continuidade na produção de enzima e não as quebras verificadas no caso anterior. O mesmo se passa para a relação azoto/carbono. Como conclusão pode dizer-se que em termos de produtividade de enzima a experiência realizada com pulsos de azoto aminoacídico é mais interessante.



(a)



(b)

Figura 4.2 - (a) Curvas de crescimento celular e de consumo de sacarose, (b) curva de produção de enzima e relação azoto/carbono ao longo da fermentação realizada com um pulso de extracto de levedura às 3,5 horas. A temperatura usada foi de 35°C, o pH controlado a 5.5, e a concentração de sacarose foi de 20g/l. O pulso de extracto de levedura foi de 10 ml a 20% (w/v).

4.1.2 Produção da enzima dextranosacarase em presença de marcadores radioactivos.

Nesta secção foram repetidas as experiências realizadas na secção anterior mas com incorporação de 2150 dpm de ^{14}C fenilalanina. Estas fermentações foram realizadas de modo a que se pudesse investigar a síntese real de enzima medindo a quantidade incorporada de aminoácido marcado na enzima produzida.

Para fazer a quantificação da radioactividade recuperada na enzima foram retiradas amostras de 10 ml no final de cada experiência às quais se retirou a biomassa por centrifugação (crude enzimático). A radioactividade foi determinada num contador de Beckman. As medidas de actividade enzimática tradicionais ao longo da fermentação mostram um pouco do funcionamento da enzima, para completar, com o estudo da mesma fermentação usando marcadores radioactivos pode determinar-se a quantidade de enzima realmente sintetizada.

Nesta fase foi ainda feito o estudo de purificação parcial da enzima. Depois de se remover a biomassa do meio fermentado por centrifugação o crude enzimático (sobrenadante) foi tratado usando-se duas técnicas diferentes de extracção: a) usando PEG 4000, b) usando etanol. Na purificação com etanol parte do dextrano produzido é precipitado junto com a enzima; na extracção com PEG observa-se uma partição entre os dois polímeros (dextrano e PEG) ficando a enzima na fase PEG.

a) Purificação com PEG 4000: 1 litro de crude enzimático colhido no final da fermentação foi tratado com 200 ml de PEG 4000 em banho de gelo. Agitou-se durante 10 minutos e deixou-se em repouso durante uma hora. Centrifugou-se durante 20 minutos a 5000 rpm para separar as duas fases. O sobrenadante foi novamente tratado usando-se a mesma proporção de PEG 4000. O precipitado recolhido nas duas etapas foi misturado e lavado resuspendido duas vezes em tampão de citrato de sódio (0.1 mol/l, pH=5.5).

b) Purificação alcoólica: 1 litro de crude enzimático colhido no final da fermentação foi precipitado com 500 ml de uma solução de etanol (10%). A mistura foi deixada

durante duas horas a precipitar ($T=25^{\circ}\text{C}$) e foi depois centrifugada a 5000 rpm durante 20 minutos. A enzima e parte do dextrano produzido aparecem no precipitado. Também se procedeu à lavagem com tampão de citrato de sódio.

A tabela 4.3 mostra os resultados obtidos no final das fermentações realizadas com ^{14}C fenilalanina incorporado no meio de cultura: fermentação batch e fermentação fed-batch com pulsos de extracto de levedura. Nos dois casos registam-se valores de dpm, actividade enzimática (DSU/ml) e % de síntese para o crude enzimático e para as fracções resultantes da purificação com PEG e etanol.

Tabela 4.3 - Incorporação de ^{14}C fenilalanina na dextranosacarase sintetizada nas fermentações batch e fed-batch com pulsos de extracto de levedura.

	Batch			Fed-batch		
	^{14}C (dpm/ml)	Enzima (DSU/ml)	% síntese	^{14}C (dpm/ml)	Enzima (DSU/ml)	% síntese
dpm ^{14}C adicionados	2150			2150		
recuperado no crude	2100	25	100	2100	55	100
recuperado na purif. PEG 4000	280	60	13	820	95	38
recuperado na purif. etanólica	230	50	10.7	561	65	20

A actividade mais elevada foi encontrada quando a purificação é feita com PEG 4000 comparando com os resultados obtidos com a purificação etanólica.

Na tabela 4.3 é ainda possível ver a síntese real da enzima por incorporação de um aminoácido marcado com ^{14}C . A recuperação com a purificação com PEG foi de 38% (% de síntese) quando se injectaram os pulsos de aminoácido no meio de cultura.



Este valor pode comparar-se com os 13% obtidos na fermentação batch tradicional. Novamente se pode concluir que existe uma redução na síntese da enzima dextranosacarase quando a razão azoto/carbono não é constante ao longo da fermentação.

Quando a purificação é feita com PEG a actividade enzimática mostra valores mais elevados; isto confirma-se quando se faz a concentração da enzima recuperada por ultrafiltração. Na tabela 4.4 mostram-se os resultados das fracções obtidas na fermentação batch; a actividade da enzima da fracção obtida na extracção com PEG 4000 é de 60 DSU/ml e depois da ultrafiltração 85 DSU/ml. Para o caso da purificação etanólica a actividade da enzima foi de 50 DSU/ml e depois da ultrafiltração aumentou para 70 DSU/ml.

A conversão de actividade enzimática em DSU/ml para actividade específica em DSU/mg de proteína foi feita considerando a concentração de enzima 0.4 mg/ml, previamente medida pelo método de Lowry.

Tabela 4.4 - Produção de dextranosacarase na fermentação batch: purificação da enzima com PEG (a) e com etanol (b).

Fracção (a)	Volume (ml)	Enzima (DSU/ml)	Enzima (DSU/mg)
Crude	1000	25	62.5
PEG 4000	300	60	150.0
Ultrafiltração	200	85	212.5
Fracção (b)	Volume (ml)	Enzima (DSU/ml)	Enzima (DSU/mg)
Crude	1000	25	62.5
Etanol	300	50	125
Ultrafiltração	200	70	175

Do mesmo modo para a enzima produzida na fermentação fed-batch com pulsos de aminoácidos e relativamente à purificação com PEG 4000, a actividade foi de 95 DSU/ml que depois da ultrafiltração aumentou para 125 DSU/ml. Para a purificação

etanólica a actividade foi de 65 DSU/ml aumentando para 95 DSU/ml por ultrafiltração (ver tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Produção de dextranosacarase na fermentação fed-batch com pulsos de aminoácidos: purificação da enzima com PEG (a) e com etanol (b).

Fracção (a)	Volume (ml)	Enzima (DSU/ml)	Enzima (DSU/mg)
Crude	1000	55	137
PEG 4000	200	95	237
Ultrafiltração	100	125	312
Fracção (b)	Volume (ml)	Enzima (DSU/ml)	Enzima (DSU/mg)
Crude	1000	55	75
Etanol	200	65	162
Ultrafiltração	100	95	237

4.2 Produção de enzima, dextranos e frutose em presença de açúcares complementares.

O objectivo destas experiências está em determinar se a presença de outros açúcares no meio de cultura influenciam a síntese da enzima dextranosacarase. Os açúcares ensaiados têm algumas diferenças entre si tais como o peso molecular e o tipo de ligação entre anéis, ou a associação homogénea ou heterogénea de monossacáridos. Outro parâmetro importante a determinar é o tipo de dextrano produzido relativamente ao seu peso molecular em função do açúcar utilizado.

Assim foram realizados também nas instalações da Universidade da Republica três ensaios com três açúcares diferentes: maltose, lactose e galactose. A concentração de cada um dos açúcares foi de 0.5% (w/v). O meio de cultura além destes açúcares contém os reagentes habituais: sacarose 20g/l, extracto de levedura 7g/l e Na_2HPO_4 8g/l.

A extracção das amostras foi feita de duas em duas horas e analisou-se o teor em sacarose, frutose, e a actividade da enzima dextranosacarase. Os resultados obtidos nestas experiências são apresentados nas tabelas 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente para os açúcares maltose, lactose e galactose. Na figura 4.3 pode comparar-se a produção de enzima nos três casos.

Tabela 4.6 - Fermentação da sacarose com Leuconostoc mesenteroides NRRL B512(f) usando maltose como açúcar secundário.

Tempo de fermentação (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0	0.00	20.00	0.00
2	0.10	18.50	4.50
4	1.15	17.20	42.20
6	2.20	10.12	50.10
8	3.12	8.30	53.80
10	4.00	6.20	54.00

Tabela 4.7 - Fermentação da sacarose com Leuconostoc mesenteroides NRRL B512(f) usando lactose como açúcar secundário.

Tempo de fermentação (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0	0.00	20.00	0.00
2	0.08	18.25	2.13
4	0.61	17.30	3.51
6	1.24	12.63	7.25
8	2.55	9.42	15.22
10	2.90	6.12	26.20

Tabela 4.8 - Fermentação da sacarose com Leuconostoc mesenteroides NRRL B512(f) usando galactose como açúcar secundário.

Tempo de fermentação (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0	0.00	20.00	0.00
2	0.62	17.00	4.20
4	1.12	12.13	15.32
6	2.15	8.20	33.30
8	3.20	3.98	48.20
10	3.99	3.00	50.10

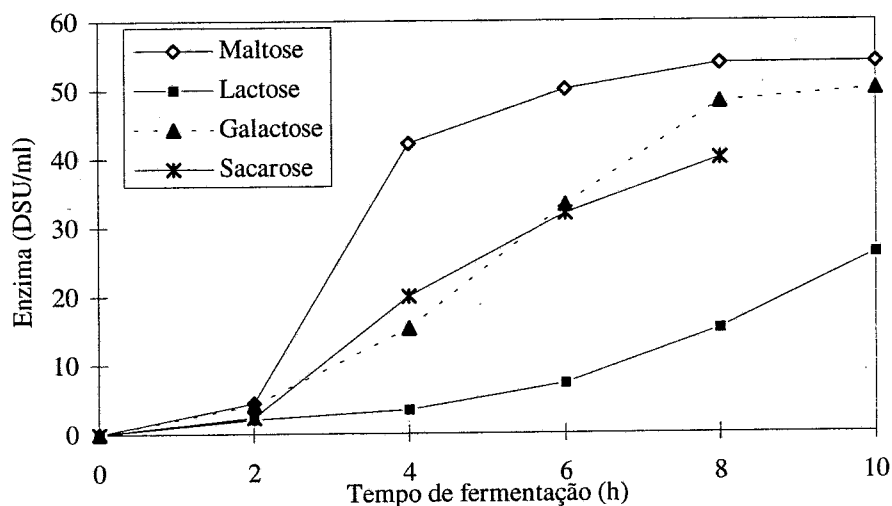


Figura 4.3 - Produção de dextranosacarase em presença de açúcares complementares (maltose, lactose e galactose). Mostra-se a fermentação usando somente sacarose (resultados da tabela 4.1) para comparação.

Existe uma clara inibição da síntese de dextranosacarase quando a lactose é usada como açúcar complementar, observando-se uma diminuição na actividade final da enzima (ver tabela 4.7 e figura 4.3). A maltose parece favorecer a velocidade da síntese da enzima apesar da actividade final ser semelhante à obtida numa fermentação convencional (Ver tabela 4.6 e figura 4.3). Com a galactose os resultados

finais para a actividade da enzima foram também similares aos resultados obtidos na fermentação convencional .

Nesta secção foi também analisada a incorporação de ^{14}C fenilalanina na síntese da enzima dextranosacarase. As experiências foram repetidas nas mesmas condições usadas anteriormente mas desta vez adicionou-se ao meio de cultura 1150 dpm de ^{14}C fenilalanina. Os crudes enzimáticos foram também purificados usando os dois métodos propostos na secção 4.1.2. Os resultados podem ser observados na tabela 4.9 confirmando-se que a presença de lactose inibe a síntese da dextranosacarase. Quando a galactose está presente a quantidade de dextranosacarase sintetizada é mais elevada, no entanto a actividade final da enzima neste caso é semelhante à obtida usando somente sacarose. Mais uma vez se observa que a recuperação da enzima com PEG 4000 é mais eficiente do que a recuperação com etanol.

Tabela 4.9 - Incorporação de ^{14}C fenilalanina na síntese de dextranosacarase em presença de açúcares complementares: maltose, lactose e galactose.

	^{14}C (dpm/ml)	^{14}C (dpm/ml)	^{14}C (dpm/ml)	^{14}C (dpm/ml)
	Sacarose	Maltose	Lactose	Galactose
Crude	1000	1000	1000	1050
purif. PEG	120	140	80	200
purif. Etanol	100	110	68	160

Já em Portugal nas instalações do LSRE, foram repetidas as experiências realizadas nesta secção para que se pudesse fazer um estudo sobre a influência de açúcares complementares no peso molecular dos dextranos produzidos (Secção 4.3). Além das três experiências realizadas com a maltose , lactose e galactose foram feitas mais três usando-se como açúcares complementares a rafinose, a xilose e a ribose. A rafinose (Rf) é constituída por três anéis de açúcares: uma galactose, uma glucose e uma frutose; a lactose e a maltose são dímeros em que a lactose (L) é constituída por um anel de galactose e um anel de glucose, e a maltose (M) é constituída por dois anéis de glucose. A xilose (X), a ribose (Rb) e a galactose (G) são monómeros.

Na tabela 4.10 podem observar-se os resultados obtidos nas experiências realizadas no LSRE usando fontes de carbono complementares. A principal diferença entre as duas séries de experiências (realizadas no Uruguay e em Portugal) está no crescimento celular. A principal causa para a flutuação nos resultados obtidos para a biomassa é o facto de a origem do extracto de levedura ser diferente. No Uruguay o produto disponível era da DIFCO e em Portugal o fornecedor foi a MERCK.

Em apêndice, apresenta-se a título de exemplo uma colecção de cromatogramas resultantes da análise das amostras colhidas na fermentação tipo realizada no LSRE (apêndice B).

Apesar de haver diferenças no crescimento celular, mantém-se o facto de que em presença de maltose e galactose o crescimento é semelhante ao caso em que se usa somente sacarose; quando se usa lactose como fonte de carbono secundária, o crescimento é cerca de 20% menor que no caso em que é usada somente a sacarose.

Quanto à enzima regista-se também o observado nas experiências efectuadas no Uruguay. A presença da maltose aumenta a produtividade da enzima, a presença da galactose não tem influência e a presença da lactose inibe a actividade da enzima. A presença de rafinose, ribose e xilose não influenciam muito a actividade final da enzima (ver tabela 4.10).

Com a coluna de HPLC disponível no laboratório torna-se difícil quantificar as quantidades finais de açúcares complementares no meio de cultura uma vez que os picos relativos à maltose e à lactose são sobrepostos pelo pico da sacarose e os picos dos monómeros são sobrepostos pelo da frutose. Para testar se na realidade a bactéria consome ou não os açúcares complementares procedeu-se do seguinte modo: em matrizes de 250 ml, incubaram-se 100 ml de meio de cultura com as características habituais, com a excepção de que se substitui a sacarose por outro açúcar como única fonte de carbono. Os açúcares utilizados como fonte de carbono foram a maltose, a galactose e a lactose com uma concentração de 5g/l. As células cresceram durante 12 horas e no final depois de centrifugada a biomassa foi analisado o teor de frutose,

dextranos e o açúcar usado, e a actividade enzimática. A temperatura do ensaio foi de 35°C e não houve controlo de pH (pH inicial=7.0).

Tabela 4.10 - Concentrações finais de biomassa, frutose e dextrano, actividade final da enzima, tempo de fermentação para as experiências realizadas no LSRE com açúcares complementares: rafinose (Rf), maltose (M), lactose (L), ribose (Rb), xilose (X) e galactose (G).

	Rf	M	L	Rb	X	G	Sac.
Tempo (h)	7.5	8	10	9	10	10	10
Células (g/l)	4.57	5.73	4.8	5.27	5.58	5.89	6.04
Frutose (g/l)	7.23	7.79	7.00	7.88	7.91	7.37	7.19
Dextrano (g/l)	7.01	7.66	6.88	7.58	7.88	7.08	7.48
Enzima (DSU/ml)	48.02	49.73	30.64	48.20	49.68	52.74	55.28

Em nenhum dos três ensaios houve produção de dextrano ou frutose e o teste à actividade da enzima como era de esperar foi negativo. As concentrações finais das fontes de carbono alternativas para a indução da produção da enzima mantêm-se nos níveis iniciais o que indica que a bactéria não as utiliza como fonte de carbono para o seu crescimento e reprodução.

Da análise dos resultados pode concluir-se que os açúcares maltose, lactose e galactose não são indutores do crescimento celular nem da produção da enzima dextranosacarase com a estirpe *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f).

4.3 Caracterização do peso molecular dos dextranos produzidos

As características básicas para um material de enchimento em SEC ("Size exclusion chromatography") são a inércia química e a adsorção mínima dos compostos a separar de modo que a retenção se baseie somente no volume hidrodinâmico. Outro requisito é a alta porosidade.

São importantes também as propriedades físicas do enchimento, tais como o tamanho das partículas (uniforme) e a forma (esférica), de modo a que se consiga uma resolução adequada e que se minimizem limitações por transferência de massa. Como a eficiência de separação na coluna aumenta com a diminuição do tamanho das partículas, estas deverão ser o mais pequenas possível mantendo no entanto boas propriedades do fluxo.

Existem no mercado vários enchimentos para SEC. São na generalidade classificados em enchimentos poliméricos orgânicos sintéticos ou naturais, e enchimentos de materiais inorgânicos. Na tabela 4.11 são apresentados alguns exemplos de enchimentos poliméricos orgânicos disponíveis no mercado.

A coluna usada para a caracterização dos dextranos produzidos nas experiências realizadas com açúcares complementares (amostras reservadas e congeladas) foi a Nucleogel GFC 4000-8 preparada pela Macherey-Nagel. As características da coluna são apresentadas adiante.

O método utilizado na caracterização do peso molecular dos dextranos produzidos durante a fermentação foi cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC) usando uma coluna de filtração por gel (GFC) inserida no mesmo sistema de HPLC usado para a determinação de açúcares.

A coluna foi preparada pela Macherey-Nagel, com a referência VA 300/7.7 NUCLEOGEL GFC 4000-8. A fase estacionária da coluna é constituída por uma matriz de um gel hidrofílico com poros de 4000 Å e partículas de 8 µm. O comprimento da coluna é de 300 mm e o diâmetro interno de 7.7 mm.

Tabela 4.11 - Enchimentos poliméricos orgânicos sintéticos para SEC disponíveis no mercado (Horák et al., 1995).

Product Name	Matrix	Producer (Distributor)
Bio-Beads S-X	ST/DVB	Bio-Rad, USA
Bio-Gel SEC	ST/DVB	Bio-Rad
Hamilton PRP	ST/DVB	Hamilton, Switzerland (Alltech, USA)
Nucleogel GPC	ST/DVB	Macherey-Nagel, Germany
PLgel	ST/DVB	Polymer Laboratories, USA (Alltech)
Progel-TSK H	ST/DVB	Supelco, USA
Shodex GPC	ST/DVB	Showa Denko, Japan (Alltech, Waters, USA)
Styragel	ST/DVB	Waters
TSK-Gel H	ST/DVB	TosoHaas, USA
Jordi GPC	DVB	Jordi (Alltech)
Bio-Gel P	acrylamide and <i>N,N'</i> -methylenebisacrylamide	Bio-Rad
Trisacryl GF	<i>N</i> -acryloyl-2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol	Serva, Germany (Sigma, USA)
Progel-TSK PW	"ethylene glycol and methacrylate"	Supelco
TSK-GEL PW	"ethylene glycol and methacrylate"	TosoHaas
Toyopearl HW	"ethylene glycol and methacrylate"	TosoHaas (Supelco)
BiospherGM	GMA/EDMA	Labio, Czech Rep.
Fractogel	"methacrylate"	Merck, Germany
Separon	HEMA/EDMA	Tessek, Czech Rep.
Shodex OHpak SB-800HQ	"polyhydroxymethacrylate"	Showa Denko, Japan (Waters)
PL aquagel-OH	"polyhydroxyl"	Polymer Laboratories
Asahipak GF-HQ	poly(vinyl alcohol)	Showa Denko
Shodex OHpak Q-800	poly(vinyl alcohol)	Showa Denko (Waters)
Nucleogel GFC (aqua-OH)	"hydrophilic"	Macherey-Nagel

DVB - divinylbenzene, EDMA - ethylene dimethacrylate, GMA - glycidyl methacrylate, HEMA - 2-hydroxyethyl methacrylate (ethylene glycol methacrylate), ST - styrene

Estas colunas podem ser usadas numa gama de pH entre 1 e 13, permitindo a remoção de formas muito resistentes de microorganismos e esterilização fazendo passar na coluna uma solução de NaOH 0.1M. A temperatura máxima de operação é de 80°C.

Para fazer a calibração da coluna utilizaram-se três tipos de dextrano adquiridos à SIGMA; trata-se de produtos de baixa pureza uma vez que a finalidade dos mesmos não é terapêutica. As referências dos produtos são D-1390, D-4876 e D-5501 e os pesos moleculares são respectivamente 74 000, 167 000 e 5 000 000-40 000 000 Dalton. A temperatura de análise foi de 26°C e o pH=7. O eluente usado foi água bidestilada e degaseificada a um caudal de 1 ml/min, a temperatura de operação foi de 25°C.

A curva de calibração obtida está representada na figura 4.4.a e 4.4.b (dois formatos diferentes da mesma calibração) e a equação usada para ajustar os pontos experimentais na figura 4.4a foi:

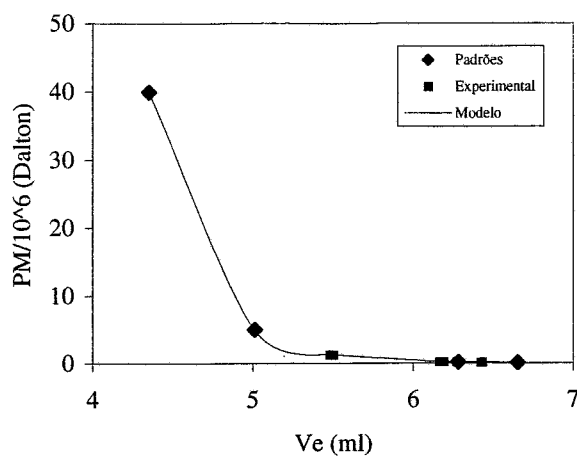
$$Mw = a V_e^b \quad (4.1)$$

em que MW é o peso molecular em dalton, V_e o volume de eluição em ml e a e b são constantes determinadas por ajuste dos pontos experimentais. A equação vem então:

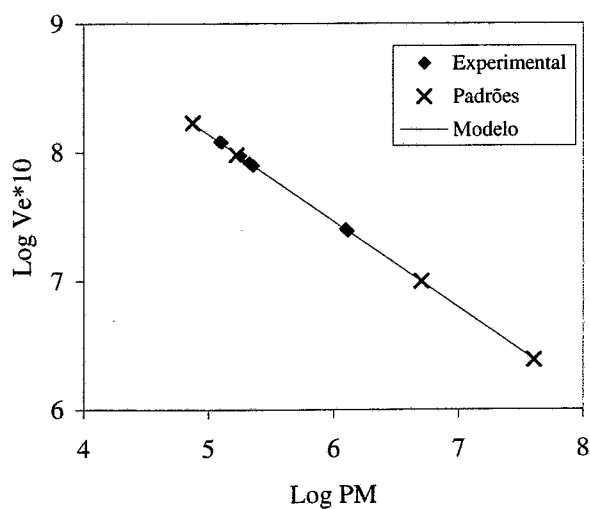
$$Mw = 1.27 \times 10^{17} V_e^{-14.88} \quad (4.2)$$

Pode agora conhecer-se o peso molecular dos dextranos produzidos usando fontes de carbono complementares e verificar se existe alguma influência nos resultados.

Nas figuras 4.5a a 4.5c apresentam-se os cromatogramas obtidos da análise dos dextranos com peso molecular conhecido comprados à SIGMA.

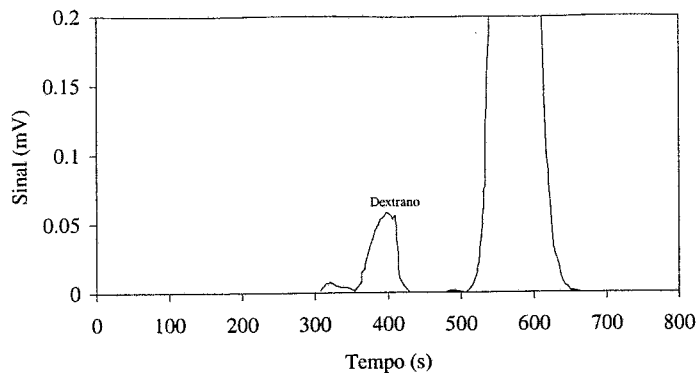


(4.4a)

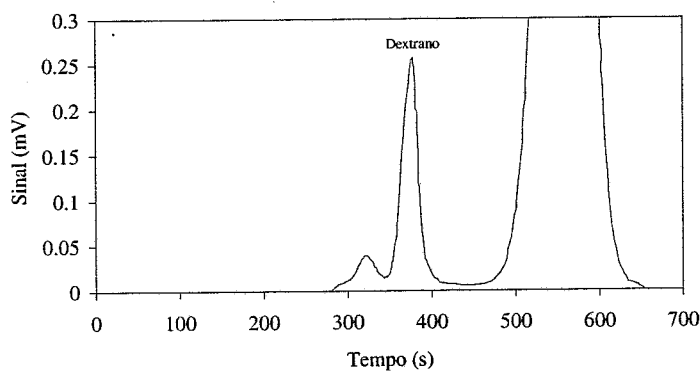


4.4b

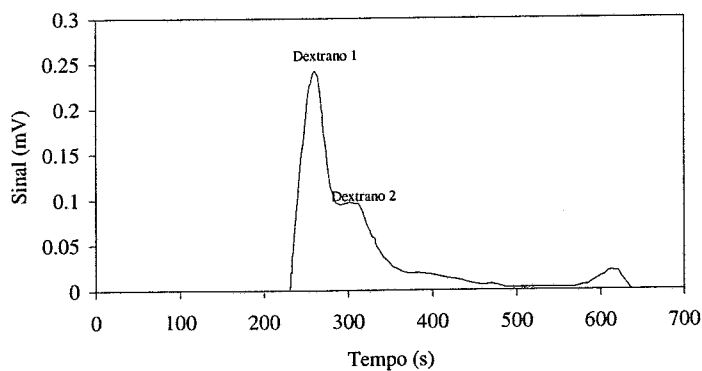
Figura 4.4 - Curva de calibração da coluna de GFC com padrões de dextrano. A temperatura de análise foi de 26°C, o caudal de 1 ml/min e o eluente foi água.



(4.5a)



(4.5b)

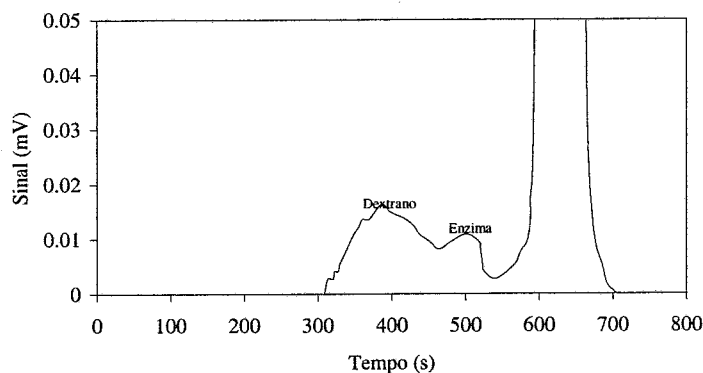


(4.5c)

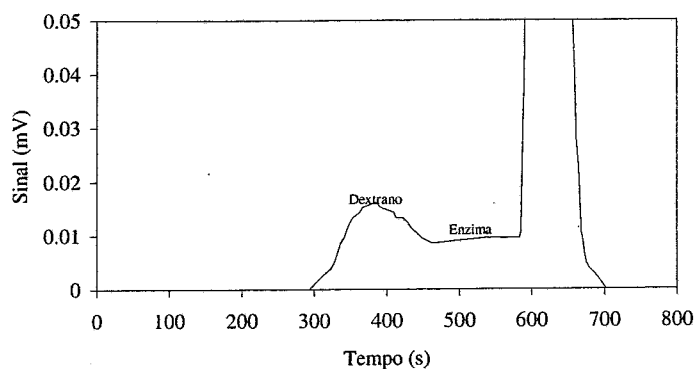
Figura 4.5 - Cromatogramas de uma solução padrão de 50 g/l de dextrano de peso molecular: a) 74 000, b) 167 000, c) 5 a 40 milhões dalton. O 1º e o 3º pico nas figuras 4.5a e b são contaminantes. O último pico da figura 4.5c é também um contaminante.

Da análise do cromatograma da figura 4.5c podem distinguir-se os dois tipos de dextrano apresentados no produto, correspondendo o dextrano 1 ao de maior peso molecular (40 000 000) e o dextrano 2 ao de menor peso molecular (5 000 000). Explica-se assim o facto de se encontrarem 4 pontos na curva de calibração quando só foram adquiridos três produtos à SIGMA.

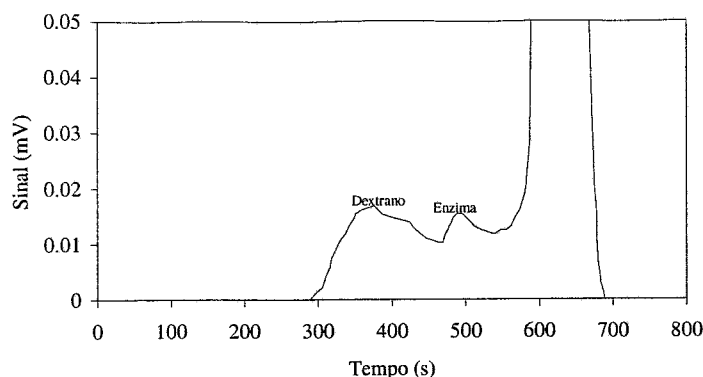
Nas figuras 4.6a a 4.6d apresentam-se os cromatogramas obtidos na análise das amostras colhidas na última hora de fermentação das experiências realizadas com os açúcares complementares maltose, lactose e galactose , e da fermentação realizada somente com sacarose.



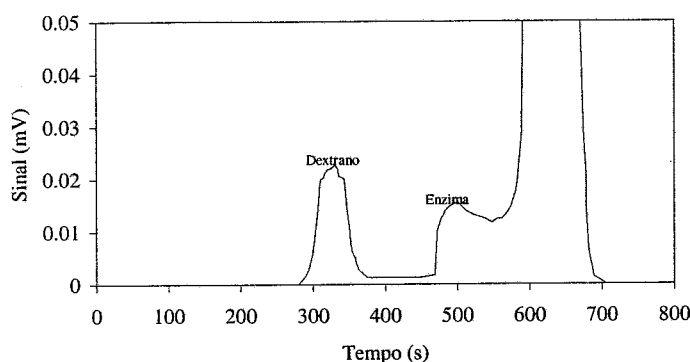
(4.6a)



(4.6b)



(4.6c)



(4.6d)

Figura 4.6 - Cromatogramas da análise em GFC da última amostra colhida nas fermentações realizadas com os açúcares complementares: a) maltose, b) lactose, c) galactose, d) só sacarose. O pico encontrado a seguir ao dextrano é a enzima e o pico seguinte são os restantes componentes do meio de cultura de peso molecular mais baixo.

Foi feito um estudo da distribuição dos pesos moleculares obtidos nas várias experiências (Billmeyer, 1984). Calculou-se o peso molecular médio em número $\overline{M}_n$ (equação 4.3) e o peso molecular médio em massa $\overline{M}_w$ (equação 4.4). Uma vez calculados estes valores foi determinada a polidispersidade como sendo a razão $\overline{M}_w / \overline{M}_n$. Na tabela 4.12 apresenta-se um resumo dos resultados obtidos.

$$\overline{Mn} = \frac{\int y dv}{\int \frac{y}{Mw} dv} \quad (4.3)$$

$$\overline{Mw} = \frac{\int Mw \times y dv}{\int y dv} \quad (4.4)$$

$$Q = \frac{\overline{Mw}}{\overline{Mn}} \quad (4.5)$$

Nas equações 4.3 e 4.4 y representa o valor do sinal nos cromatogramas, v é o volume de eluição (ml) e Mw é a massa calculada através da curva de calibração (equação 4.2).

Como se pode observar da análise dos resultados apresentados na tabela 4.12 a presença de açúcares complementares pode fazer baixar o peso molecular médio do dextrano produzido aumentando também a polidispersidade. Quando existem açúcares complementares no meio de cultura estes podem interromper a ligação de mais unidades de glucose na molécula de dextrano que está a ser produzida pela dextranosacarase ligando-se à extremidade da molécula. O dextrano libertado pela enzima tem então um peso molecular mais baixo.

Foram ainda testados outros açúcares complementares como a rafinose (trissacárido) que origina resultados semelhantes aos obtidos somente com sacarose. A xilose e a ribose apresentaram resultados semelhantes aos apresentados na tabela 4.12. No apêndice C apresentam-se os resultados obtidos para o peso molecular máximo obtido para os vários açúcares secundários testados.

Tabela 4.12 – Valores calculados de $\overline{Mw}$, $\overline{Mn}$, Q e intervalo de Mw obtidos em cada uma das experiências realizadas com açúcares complementares.

Açúcar complementar	$\overline{Mw}$	$\overline{Mn}$	Q	Intervalo de Mw obtidas
Maltose	240 828	35 830	6.72	3 440 651-7 941
Lactose	311 708	39 697	7.85	7 294 851-8 209
Galactose	398 524	34 008	7.85	9 255 139-6 740
Só Sacarose	1 890 504	10 011 165	1.87	14 677 264-183 127

4.4 Cinética da conversão da sacarose pela enzima dextranosacarase.

Fizeram-se dois estudos da cinética da enzima. Um primeiro em que o substrato adicionado foi a sacarose e um outro em que além da sacarose se adicionou outra fonte de carbono (maltose) na mesma proporção. O objectivo desta última é verificar em que medida a presença da maltose afectará a cinética da enzima dextranosacarase. Todos os ensaios foram efectuados a 30°C e a pH=5.5. Foi usado como extracto enzimático o crude produzido na fermentação com sacarose referenciada na tabela 4.10.

A figura 4.7 mostra os resultados obtidos nos estudos cinéticos com a enzima dextranosacarase. Como se pode ver o comportamento cinético da enzima é alterado em presença de maltose. A velocidade de conversão de sacarose é menor quando se adiciona ao meio uma percentagem de maltose igual à de sacarose.

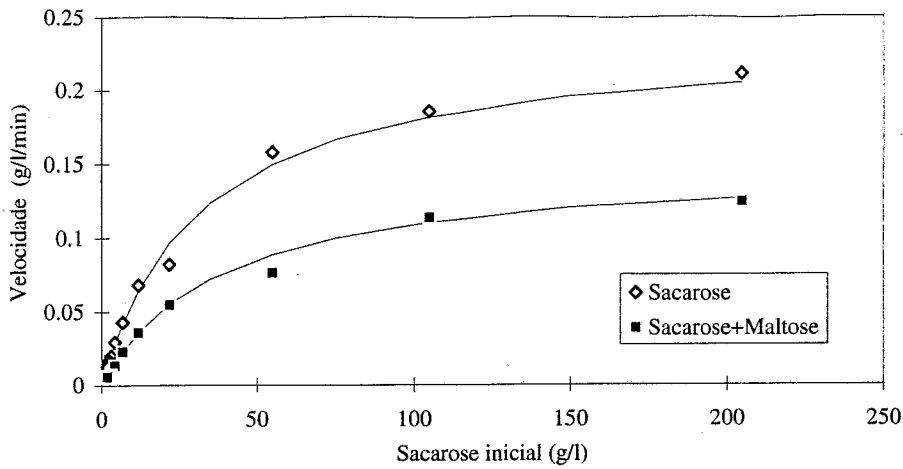


Figura 4.7 - Velocidade de consumo da sacarose em função da concentração inicial de sacarose.

A cinética é bem descrita pela equação de Michaelis-Menten (Shuler e Kargi, 1992):

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (4.6)$$

em que v é a velocidade de reacção (g/l/min), $[S]$ é a concentração de substrato (sacarose em g/l), V_m é a velocidade máxima (g/l/min) e K_m (g/l) é a constante de dissociação de Michaelis.

Rearranjando a equação 4.6 obtém-se a equação:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} \quad (4.7)$$

Fazendo um gráfico de $1/v$ versus $1/[S]$ encontra-se uma recta e pode determinar-se o declive K_m/V_m e também $1/V_m$. Os resultados encontrados foram:

i) para a cinética da enzima somente com sacarose

$$V_m = 0.2378 \text{ g/l/min}$$

$$K_m = 31.87 \text{ g/l}$$

ii) para a cinética da enzima quando a maltose é adicionada:

$$V'_m = 0.151 \text{ g/l/min}$$

$$K'_m = 37.93 \text{ g/l}$$

4.5 Estudo reológico da fermentação

Tal como mencionado no capítulo 2, amostras da fermentação com cerca de 10 g/l de dextrano e concentrações celulares entre 5 e 10 g/l, comportam-se como fluidos newtonianos, mantendo-se a viscosidade constante com a variação da velocidade de corte.

Como se trabalha essencialmente com concentrações de substrato na ordem dos 20 g/l, a concentração de dextrano e celular final obtida numa fermentação nunca ultrapassa os 10 g/l podendo fazer-se um estudo de viscosidades bastante mais simples.

O aparelho escolhido foi do tipo “Moving body” em que o movimento de uma esfera, uma bolha, ou até uma agulha através da amostra é estudado. Os viscosímetros de esfera baseiam-se na lei de Stokes (Kroschwitz, 1990) que relaciona a viscosidade de um fluido newtoniano com a velocidade de uma esfera que cai no seio desse líquido. Se uma esfera é lançada livremente no seio de um fluido, acelera até a força viscosa ser exactamente igual à força gravitacional. A equação de Stokes pode ser escrita:

$$\eta = \frac{2r^2 g(\rho_s - \rho_l)}{9v} \quad (4.8)$$

em que r é o raio da esfera, ρ_s e ρ_l são a densidade da esfera e do líquido, respectivamente; g é a força gravitacional e v é a velocidade da esfera.

A velocidade com que a esfera cai num tubo cilíndrico cheio com o líquido a analisar pode ser usada na equação de Stokes de forma generalizada:

$$\eta = \frac{k(\rho_s - \rho_l)}{v} \quad (4.9)$$

onde v é a velocidade translacional da esfera e k é a constante do instrumento, que é determinada por calibração com fluidos standard.

Um viscosímetro deste tipo pode ser construído com um tubo de ensaio ou um cilindro graduado com uma rolha no topo onde se insere um tubo de vidro mais fino por onde se introduz a esfera, como se pode ver na figura 4.8. As esferas podem ser obtidas de diferentes materiais e de diferentes tamanhos.

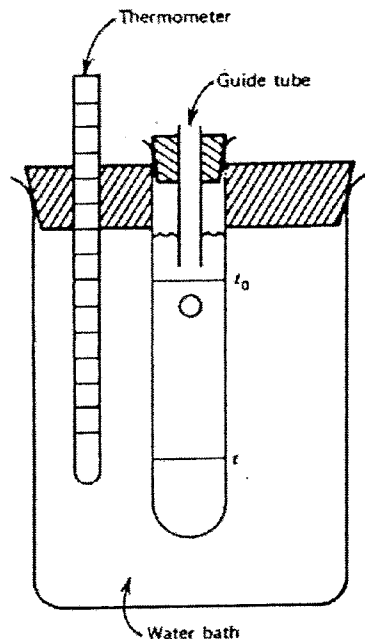


Figura 4.8 - Viscosímetro de esfera em queda. Os traços t_0 e t são os limites de tempo para a determinação da velocidade.

O estudo de viscosidade do meio ao longo da fermentação foi feito com amostras colhidas durante duas fermentações com concentração inicial de sacarose diferente. Os resultados podem ser observados nas figuras 4.9 e 4.10.

As condições de operação foram $T=35^{\circ}\text{C}$, sem controlo de pH, agitação de 150 rpm, concentração de sacarose respectivamente de 20 e 120 g/l, concentração de extracto de levedura de 7 g/l e concentração de Na_2HPO_4 de 8 g/l. As amostras para determinação de viscosidade foram colhidas de duas em duas horas.

O viscosímetro usado foi do tipo “Queda de esfera” disponível no laboratório e da marca GILMONT® Instruments. A temperatura de medida da viscosidade foi de 26°C .

A equação para o cálculo da viscosidade relativa ao aparelho usado é:

$$\eta = K \times (\rho_s - \rho_l) \times t \quad (4.10)$$

onde, η é a viscosidade em centipoises (cp), ρ_l a massa volumica da esfera usada em g/ml (neste caso foi a esfera de vidro com massa volumica de 2.53 g/ml), ρ é a massa volumica do líquido em g/ml, t é o tempo de queda da esfera em minutos e K é a constante do viscosímetro fornecida com o equipamento ($K=3.3 \text{ cp ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Como se pode verificar da observação das figuras 4.9 e 4.10 a viscosidade não é muito afectada sofrendo uma variação muito pequena do início para o final da fermentação.

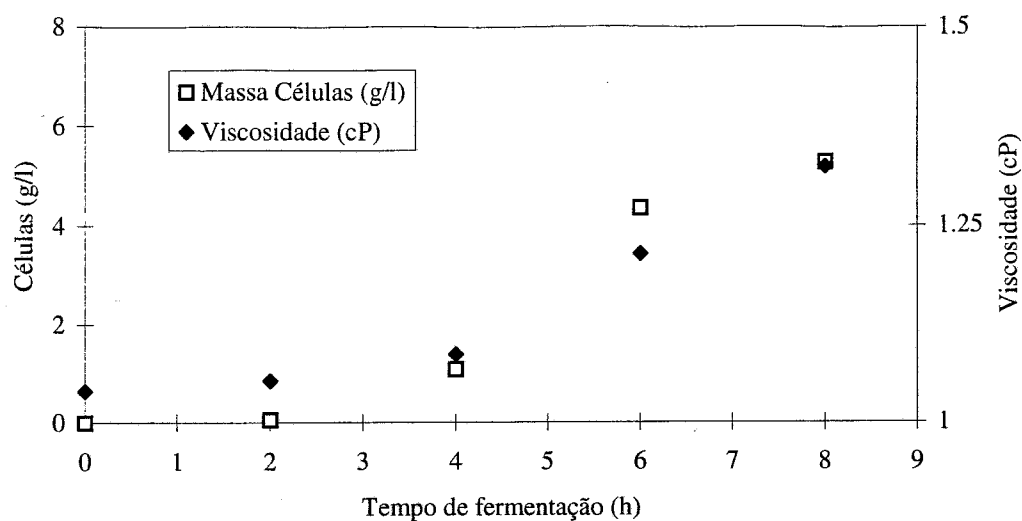


Figura 4.9 - Comparação da curva de crescimento celular com a evolução da viscosidade ($T=25^{\circ}\text{C}$) ao longo da experiência. A fermentação foi realizada sem controlo de pH, $T=35^{\circ}\text{C}$ e concentração de sacarose de 20 g/l.

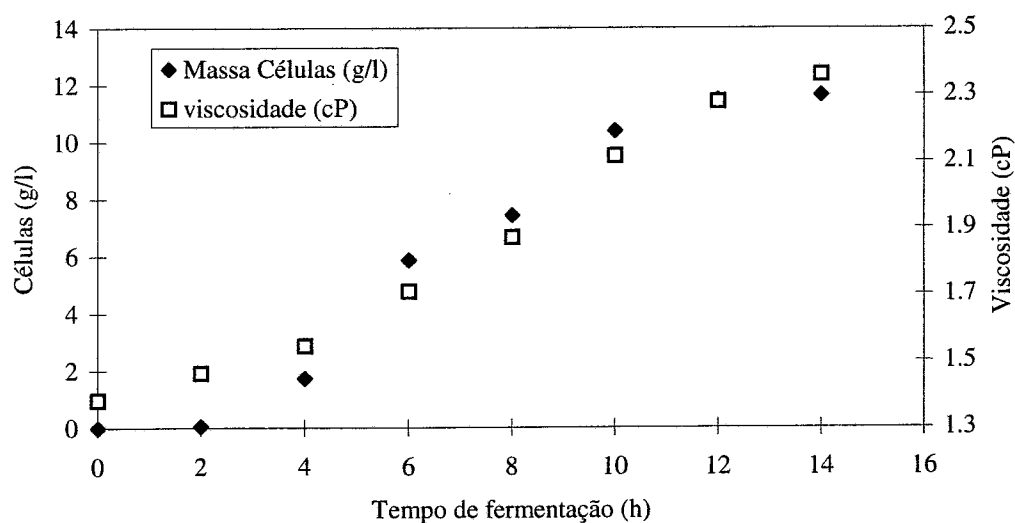


Figura 4.10 - Comparação da curva de crescimento celular com a evolução da viscosidade ($T=25^{\circ}\text{C}$) ao longo da experiência. A fermentação foi realizada sem controlo de pH, $T=35^{\circ}\text{C}$ e concentração de sacarose de 120 g/l.

4.6 Conclusões

Na fermentação batch da sacarose com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) observou-se a redução da velocidade de síntese da enzima dextranosacarase coincidente com a redução na razão azoto/carbono. A adição de pulsos de extracto de levedura (azoto aminoácido) aquando da diminuição da razão azoto/carbono permite obter uma velocidade de produção da enzima constante e um tempo de fermentação mais baixo.

A concentração de enzima foi também medida fazendo-se testes com marcadores radioactivos. O aminoácido marcado ^{14}C fenilalanina foi incorporado na proteína enzimática produzida. Esta metodologia permitiu a determinação da concentração real de dextranosacarase, confirmando a diminuição na síntese quando há uma ligeira diminuição na razão azoto/carbono.

A purificação da enzima com PEG 4000 mostrou-se mais eficiente do que a purificação etanólica. Este resultado é também confirmado com as experiências realizadas em presença de um marcador radioactivo.

A influência de açúcares complementares no metabolismo da bactéria foi também estudada. Em presença de lactose a produção da enzima é inibida. Quando se usa galactose o rendimento é semelhante ao obtido usando somente sacarose. A presença da maltose favoreceu a síntese de dextranosacarase; a velocidade de síntese da enzima é mais elevada do que usando somente sacarose. Experiências realizadas com ^{14}C fenilalanina confirmam os resultados obtidos. Os açúcares rafinose, ribose e xilose não influenciam muito a actividade da enzima. Estes resultados são de grande importância quando existe a possibilidade de usar resíduos agro-industriais para a produção de dextranosacarase.

Conseguir controlar o peso molecular dos dextranos produzidos manipulando a composição do meio de cultura é bastante importante. Cortes nos custos de hidrólise de cadeias longas de dextrano em cadeias mais curtas podem ser feitos uma vez que a presença de açúcares complementares no meio de cultura permite produzir dextranos

com pesos moleculares médios mais baixos. Nos casos estudados neste trabalho o peso molecular médio em massa do dextrano produzido baixou em presença de açúcares complementares de 1 240 000 para valores na ordem dos 240 000 a 400 000 dalton.

A velocidade de conversão de sacarose pela enzima dextranosacarase é menor quando se adiciona ao meio, uma percentagem igual à da sacarose, em maltose. É importante conhecer em que condições se poderá usar um resíduo agro-industrial que contenha maltose uma vez que ela melhora a síntese de enzima pela bactéria mas reduz a síntese de dextrano e frutose pela enzima sintetizada.

Do estudo da evolução da viscosidade conclui-se que a variação da mesma não é muito acentuada e portanto a homogeneização do meio de cultura ao longo da fermentação é feita com eficiência a 150 rpm.

Referências bibliográficas

Barker, P. E.; Ajongwen, N. J.; 1991, "The production of the enzyme dextranucrase using nonaerated fermentation techniques", *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 703-707.

Billmeyer, F. W.; 1984, "Text Book of Polymer Science", Third Edition, John Wiley & Sons, New York, USA.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Willemot, R.; Vignon, M.; Monsan, P.; 1997a, "Characterization of dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 62, 47-59.

Dols, M.; Chraïbi, W.; Remaud-Simeon, M.; Lindley, N.; Monsan, P.; 1997b, "Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextranucrase production..", *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (6), 2159-2165.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Monsan, P.; 1998a, "Optimization of the production of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 and its application to the synthesis of non digestible glucoligosaccharides.", 2nd European Symposium on biochemical Engineering Science, Porto, Portugal.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Willemot, R.; Vignon, M.; Monsan, P.; 1998b, "Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 dextranucrase.", *Carbohydrate Research*, 305, 549-559.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Willemot, R.; Vignon, M.; Monsan, P.; 1998c, "Characterization of the different dextranucrase activities excreted in glucose, fructose or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.", *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (4), 1298-1302.

Funame, K.; Yamada, M.; Shiraiwa, M.; Takahara, H.; Yamamoto, N.; Ichishima, E.; Kobayashi, M.; 1995, "Aggregated form of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F and its constitutive mutant.", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 (5), 776-780.

Funame, K.; Ookura, T.; Kobayashi, M.; 1998, "Glucan binding regions of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F.", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62 (1), 123-127.

Horák, D.; Hradil, J.; Benes, M. J.; 1995, "Packings for size exclusion chromatography: Preparation and some properties", in "Strategies in Size exclusion chromatography", Edited by M. Potschka and Paul L. Dubin, ACS Symposium Series 635, Chapter 11.

Kaboli, H.; Reilly, P. J.; 1980, "Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase.", *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 1055-1069.

Kim, D.; Robyt, J. F.; 1994, "Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F constitutive dextransucrase.", *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1010-1015.

Kroschwitz, J.; 1990, "Polymers: Polymer Characterization and analysis", John Wiley & Sons, USA.

Lebrun, L.; Junter, G. A.; Jouenne, T.; Mignot, L.; 1994, "Exopolysaccharide production by free and immobilized microbial cultures.", *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1048-1054.

Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R.; 1951, "A method on protein determination.", *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Miller, G. L.; 1959, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars.", *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

Monchois, Willemot, R.; Remaud-Simeon, M.; Croux, C.; Soucaille, P.; Monsan, P.; 1996, "Primary structure of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299. Comparison with dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F.", Annals of New York Academy of Sciences, 799, 151-156.

Monchois, V.; Remaud-Simeon, M.; Russel, R.; Monsan, P.; Willemot, R.; 1997, "Characterisation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity.", Applied Microbiol. Biotechnol., 48, 465-472.

Monsan, P.; Lopez, A.; 1981, "On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase.", Biotechnology and Bioengineering, 23, 2027-2037.

Reilly, P. J.; Landis, D. A.; 1981, "Immobilization of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase to porous phenoxyacetyl cellulose beads.", Biotechnology and Bioengineering, 23, 2647-2653.

Robyt, J. F.; Walseth, T. F.; 1978, "The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase.", Carbohydrate Research, 61, 433-445.

Robyt, J. F.; Walseth, T. F.; 1979, "Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.", Carbohydrate Research, 68, 95-111.

Robyt, J. F.; Eklund, S. H.; 1983, "Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase.", Carbohydrate Research, 121, 279-286.

Shuler, M. L., Kargi, F.; 1992, "Bioprocess Engineering, Basic Concepts", Prentice Hall International Series, New Jersey, USA.

Capítulo 5

Separação do dextrano e frutose

5. Separação do dextrano e frutose

Os processos de separação têm um papel crítico na indústria. No total estes processos custam cerca de 40 a 70% (Humphrey e Keller, 1997) do capital na indústria e uma utilização apropriada pode significar uma redução dos custos e um aumento dos lucros.

A grande capacidade de separação e a versatilidade de um processo cromatográfico têm sido largamente aceites. Nas duas últimas décadas a indústria assistiu a uma grande evolução no que diz respeito ao emprego da cromatografia para separação de produtos, essencialmente na indústria petroquímica e usando-se processos contínuos uma vez que os processos batch (descontínuos) não se adequam às quantidades industriais de produtos a separar. Os custos de separação (Nicoud, 1995) são muitas vezes superiores a 200USD/kg quando se usam sistemas de HPLC, baixando esse valor para cerca de 0.1USD/kg em produção de larga escala com sistemas de cromatografia em contínuo. As vantagens inerentes a uma operação em contínuo são maior flexibilidade, operação autónoma, qualidade de produto constante (Ching *et al.*, 1985; Broughton *et al.*, 1970; Broughton, 1968).

Um sistema com leito móvel em contracorrente (SMB) permite a separação cromatográfica em contínuo. Neste capítulo pretende-se estudar a separação da mistura dextrano/frutose em SMB. Começou-se por estudar a separação glucose/frutose e a inversão da sacarose em SMBR medindo isotérmicas de adsorção dos reagentes na resina, a cinética de inversão da sacarose e a influência da composição do tampão usado na mesma resina.

5.1 Determinação de isotérmicas de adsorção de sacarose, glucose e frutose na resina de permuta iónica AMBERLITE CR1320CA.

A principal informação para se poder modelizar um processo cromatográfico é o conhecimento das isotérmicas de adsorção dos solutos na resina utilizada na separação.

Existem diferentes métodos para determinação experimental das isotérmicas de adsorção. Um dos métodos é a cromatografia frontal. A coluna está inicialmente equilibrada com uma solução contendo o eluente puro sendo de seguida alimentada com uma solução de uma concentração C_A no tempo $t=0$. À saída da coluna a concentração mantém-se igual a zero durante algum tempo antes de atingir no equilíbrio o patamar da solução concentrada C_A . O passo seguinte é fazer passar o solvente puro para levar a concentração C_A novamente a zero dentro da coluna. Este eluído é recolhido e posteriormente analisado podendo determinar-se o número de moles de A. A determinação de uma isotérmica completa exige várias experiências a diferentes concentrações do componente em estudo.

Nesta fase do trabalho os objectivos são a determinação das isotérmicas de adsorção da sacarose, glucose e frutose na resina AMBERLITE CR1320CA (Rohm and Haas, France S. A.).

A classe mais importante de permutadores iónicos é a das resinas orgânicas de permuta iónica (Helfferich, 1962). A resina AMBERLITE CR1320CA de permuta iónica (forma Ca^{2+}) é constituída por partículas com um diâmetro médio de 320 μm e a temperatura máxima de operação é 120°C. Algumas propriedades da resina são apresentadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Propriedades da resina AMBERLITE CR1320CA.

Matriz	Poliestireno reticulado com divinilbenzeno
Grupos funcionais	Sulfónicos
Forma física	partículas translúcidas de cor castanha
Forma iónica quando fornecida	Ca ²⁺
Capacidade total de permuta	≥1.55 eq. L (forma H ⁺)
Densidade do leito	820 g/l (forma Ca ²⁺)
Diâmetro médio das partículas	320±10 µm
Swelling máximo reversível	Ca ²⁺ → H ⁺ : 15 a 20%
Temperatura máxima de operação	120°C
Resistência química	Insolúvel em soluções diluídas de ácidos ou bases e solventes comuns
Grau de reticulação	4 a 5%

O sistema experimental consiste numa coluna Superformance®, Universal glass-cartridge System, fornecida pela Merck. As dimensões da coluna são diâmetro interno de 2.6 cm e comprimento de 11.5 cm (volume da coluna=61.06*10⁻³ dm³). Está ainda equipada com uma camisa onde circula água à temperatura que se deseja fazer a experiência.

Numa primeira fase em que a coluna estava ligada a um injector e a um detector de índice de refração (Gilson, modelo 131) foram efectuados pulsos dos açúcares sacarose, glucose, frutose e do traçador blue dextran (MW=2 000 000 dalton) a quatro temperaturas diferentes: 20, 30, 40 e 50°C. A concentração das soluções de açúcar injectadas na coluna foi de 10 g/l e o volume de solução injectada foi de 200 µl. O caudal de trabalho foi de 5 ml/min. Os picos obtidos foram gravados e posteriormente foram tratados para determinação do volume médio de eluição de cada um dos açúcares a cada temperatura.

Ainda foram feitos dois pulsos da mistura glucose/frutose com uma concentração de 100g/l em cada um dos açúcares às temperaturas de 20 e 55°C. O pulso durou um minuto e o caudal de alimentação foi de 5 ml/min. Foram colhidas amostras de 30 em 30 segundos posteriormente analisadas com o sistema de HPLC descrito abaixo. Foram depois determinadas isotérmicas pelo método da cromatografia frontal para os três açúcares a 20 e 50°C. O eluente puro usado foi a água e as experiências foram realizadas com cinco concentrações diferentes para cada açúcar: 100, 75, 50, 25 e 5 g/l.

A análise das soluções eluídas da coluna foi feita com um sistema de HPLC da GILSON com um módulo manométrico (modelo 802C), uma bomba (modelo 302) e um detector de índice de refração. A coluna utilizada foi uma INTERACTION, IonGuard 300 com um enchimento polimérico em que a pressão máxima de trabalho é de 150 bar. Usou-se um caudal de eluente (H_2SO_4 0.005 N) de 0.3ml/min em que a pressão de trabalho esteve durante as análises entre 85 e 90 bar. Trabalhou-se à temperatura ambiente ($T \cong 23^\circ C$).

Para o cálculo da quantidade adsorvida fez-se o seguinte balanço:

Massa de soluto total na coluna = massa de soluto retido na fase fluída entre as partículas + massa de soluto retido na fase fluída nos poros da resina + massa de soluto adsorvido na resina

$$V_{el} \times C_{el} = \varepsilon \times C_{in} \times V + (1 - \varepsilon) \times \varepsilon_p \times C_{in} \times V + (1 - \varepsilon) \times q_{in} \times V \quad (5.1)$$

em que V_{el} é o volume eluído da coluna com uma determinada concentração de soluto (l), C_{el} (g/l). ε é a porosidade do meio, ε_p é a porosidade da partícula, V é o volume da coluna (l), C_{in} é a concentração mássica inicial (g/l) e q_{in} é a quantidade adsorvida em equilíbrio com a concentração do fluído C_{in} (g/l). Considerando que a fase fluída retida no volume de poros da partícula é desprezável, a equação 5.1 pode escrever-se:

$$q_{in}^* = \frac{V_{el} \times C_{el} - \varepsilon \times C_{in} \times V}{(1 - \varepsilon) \times V} \quad (5.2)$$

Nos cálculos de q_{in}^* efectuados tomou-se a porosidade do meio $\varepsilon=0.4$ e o volume da coluna $V=0.06106 \text{ dm}^3$.

Se se considerar que um determinado produto não é adsorvido, toma-se $q_{in} = 0$ e pode assim calcular-se a porosidade das partículas de resina:

$$\varepsilon_p = \frac{V_{el} \times C_{el} - \varepsilon \times C_{in} \times V}{(1 - \varepsilon) \times C_{in} \times V} \quad (5.3)$$

Na tabela 5.2 estão apresentados os volumes de eluição e volumes médios de eluição determinados por tratamento dos resultados obtidos com os pulsos dos três açúcares e do tracer.

Tabela 5.2 - Volume de eluição e volume médio de eluição calculado para os três açúcares estudados a diferentes temperaturas.

Açúcar	Temperatura (°C)	Volume eluição (ml)	Volume médio eluição (ml)
		Máximo pico	
Sacarose	20	26.3	29.91
Sacarose	30	26.8	30.95
Sacarose	40	27.44	31.77
Sacarose	50	27.45	32.67
Glucose	20	28.4	32.52
Glucose	30	29.00	33.52
Glucose	40	29.41	34.43
Glucose	50	30.75	38.22
Frutose	20	34.14	44.67
Frutose	30	34.58	43.89
Frutose	40	33.53	43.80
Frutose	50	33.67	44.35
Tracer	20	-	26.93
Tracer	30	-	25.73
Tracer	40	-	25.43
Tracer	50	-	25.26

As figuras 5.1 e 5.2 mostram os pulsos efectuados com a mistura glucose/frutose.

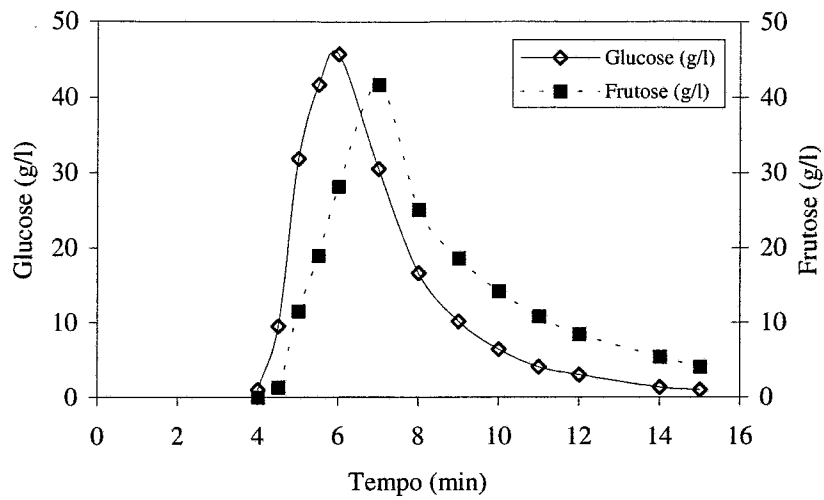


Figura 5.1 - Pulso da mistura glucose/frutose de concentração 100g/l em cada açúcar, durante um minuto, $T=20^{\circ}\text{C}$ e caudal de 5 ml/min.

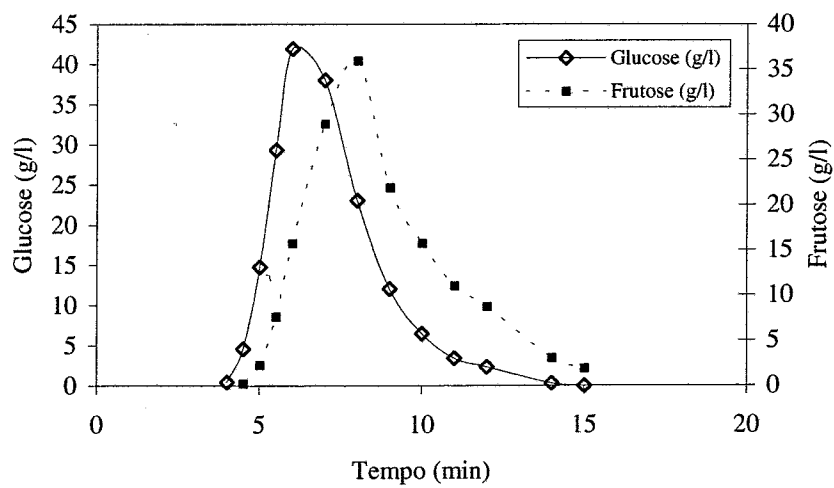


Figura 5.2 - Pulso da mistura glucose/frutose de concentração 100g/l em cada açúcar, durante um minuto, $T=55^{\circ}\text{C}$ e caudal de 5 ml/min.

Nas tabelas 5.3 a 5.5 são apresentados os resultados obtidos na determinação das curvas de ruptura (breakthrough curves, BTC) para a glucose e frutose a 20 e 50°C e para a sacarose a 20°C. A quantidade adsorvida é calculada em gramas de açúcar adsorvido por litro de sólido na coluna. A porosidade considerada para o meio foi de 0.4 e a porosidade interna das partículas não foi tida em conta neste cálculo.

As figuras 5.3 e 5.4 mostram as isotérmicas de adsorção obtidas a 20 e 50°C para a glucose e frutose respectivamente. Na tabela 5.6 apresentam-se as constantes de equilíbrio de adsorção obtidas para a glucose e frutose a 20 e 50°C. Na figura 5.5 pode observar-se a variação da constante de equilíbrio da isotérmica com a temperatura para os açúcares glucose e frutose.

Tabela 5.3 - Resultados obtidos na BTC para glucose a 20 e 50°C.

T(°C)	C _{in} (g gluc./l flui.)	Volume eluído (ml)	Concentração no eluído (g/l)	massa no eluído (g)	q _{in} [*] (g gluc./l sól.)	q _{in} [*] /C _{in}
20	98.24	79.10	44.67	3.53	30.95	0.315
20	74.80	82.00	32.77	2.69	23.48	0.314
20	45.23	73.80	22.14	1.63	14.45	0.319
20	22.11	64.40	12.37	0.80	7.00	0.317
20	5.45	70.60	2.79	0.20	1.74	0.320
50	95.24	69.60	48.55	3.38	28.74	0.302
50	65.69	64.90	36.04	2.34	20.05	0.305
50	47.57	76.20	22.13	1.69	14.32	0.301
50	23.06	64.80	12.63	0.82	6.97	0.302
50	5.27	62.70	2.98	0.19	1.59	0.301

Da observação dos resultados apresentados na tabela 5.6 e na figura 5.6 conclui-se que a constante de equilíbrio de adsorção da glucose é praticamente constante com a variação da temperatura, enquanto que a mesma constante para a frutose decresce com o aumento da temperatura.

Tabela 5.4 - Resultados obtidos na BTC para frutose a 20 e 50°C.

T(°C)	C_{in} (g frut./l flui.)	Volume eluído (ml)	Concentração no eluído (g/l)	massa no eluído (g)	q_{in}[*] (g frut./l sól.)	q_{in}[*] / C_{in}
20	99.60	118.10	39.92	4.72	62.29	0.625
20	72.68	129.60	26.56	3.44	45.50	0.626
20	45.03	134.30	15.84	2.13	28.05	0.623
20	23.90	124.80	9.09	1.13	15.03	0.629
20	5.79	123.90	2.21	0.27	3.61	0.624
50	93.11	99.01	41.57	4.12	50.27	0.540
50	71.98	90.70	34.80	3.16	38.17	0.530
50	47.77	97.70	21.45	2.10	25.36	0.531
50	29.08	91.70	14.00	1.28	15.66	0.539
50	5.39	86.00	2.77	0.24	2.91	0.540

Quanto à sacarose considerou-se que não é praticamente adsorvida usando-se os resultados obtidos e apresentados na tabela 5.5 para calcular a porosidade das partículas de resina.

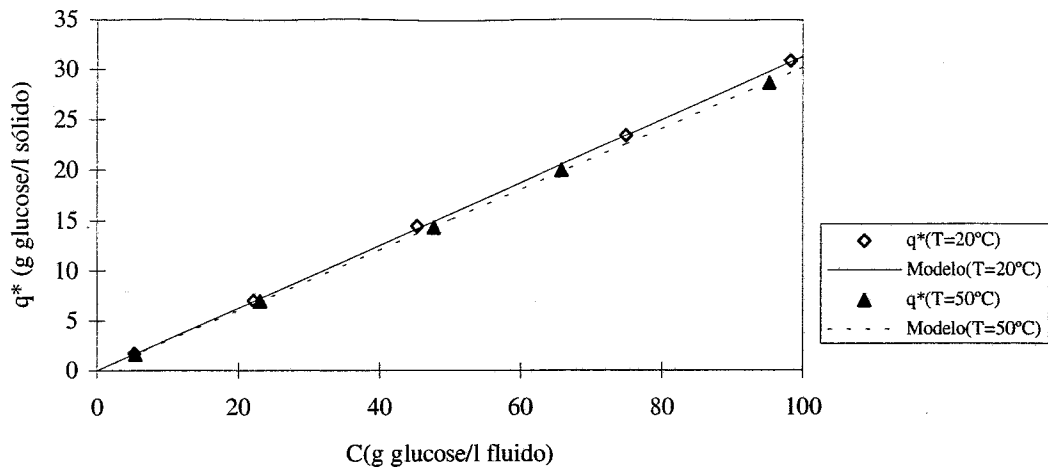


Figura 5.3 - Isotérmicas de adsorção da glucose a 20 e 50°C.

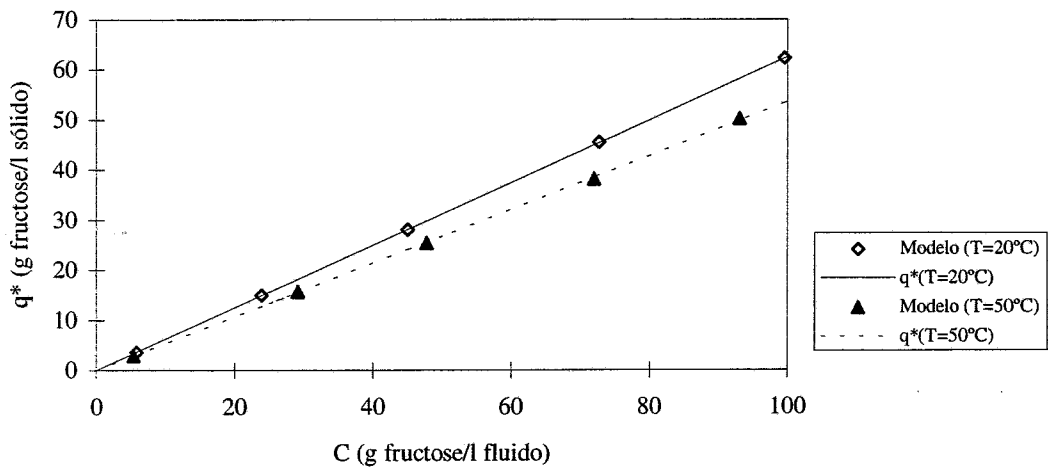


Figura 5.4 - Isotérmicas de adsorção da frutose a 20 e 50°C.

Tabela 5.5 - Resultados obtidos na BTC para a sacarose a 20°C.

T(°C)	C _{in} (g sac./l flui.)	Volume eluído (ml)	Concentração no eluído (g/l)	massa no eluído (g)	Q ⁽¹⁾ (g sac./l sól.)	ε _p
20	96.53	81.80	32.64	2.67	8.52	0.088
20	69.25	77.70	24.78	1.92	6.39	0.092
20	44.98	68.60	18.26	1.25	4.20	0.093
20	24.34	66.00	10.23	0.68	2.20	0.090
20	5.03	65.10	2.15	0.14	0.47	0.093

⁽¹⁾ Q representa a quantidade retida nos poros das partículas da resina $Q=C_{in}\epsilon_p$

O valor médio calculado para ϵ_p será 0.0912.

Altenhöner *et al.* (1996) determinaram também constantes de equilíbrio de adsorção para a glucose e frutose numa resina com características muito semelhantes: resina Imac HP 1320 Ca, tipo gel de troca iónica na forma cálcio e com diâmetro médio de partícula de 0.320 mm (Rohm and Haas). Os resultados obtidos a 39°C para a glucose e frutose foram respectivamente, 0.340 e 0.563. Verificaram ainda que o aumento da temperatura reduz o declive das isotérmicas para ambas as espécies sendo este efeito mais acentuado para a frutose (componente mais retido). Isto indica que a separação piora com o aumento da temperatura uma vez que a razão entre as constantes de equilíbrio dos componentes a separar (factor de separação ou selectividade) diminui.

Tabela 5.6 - Constantes de adsorção obtidas para a glucose e frutose a 20 e 50°C.

Açúcar	Temperatura (°C)	K
Glucose	20	0.314
Glucose	50	0.303
Frutose	20	0.625
Frutose	50	0.536

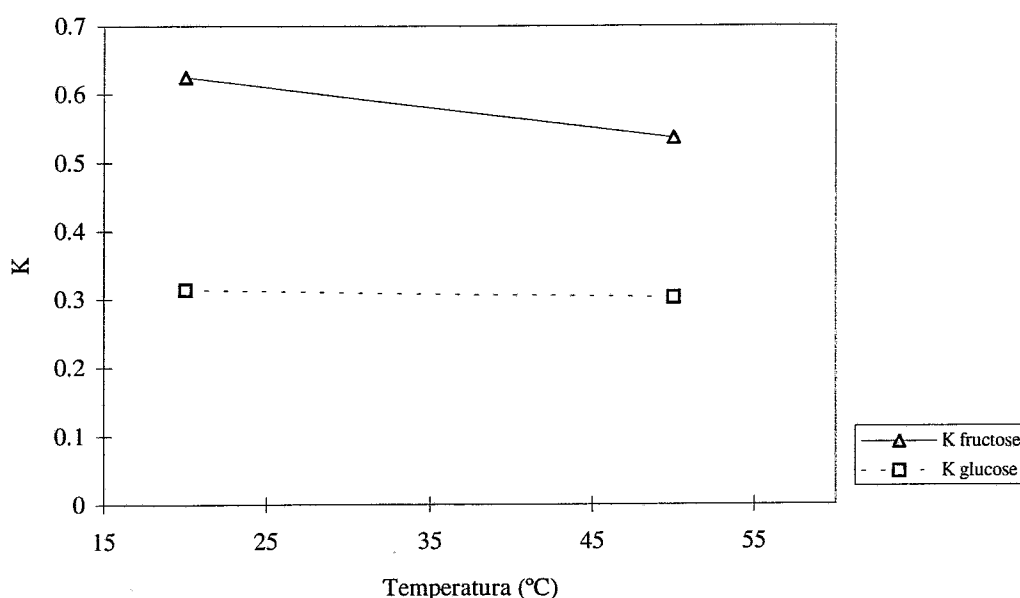


Figura 5.6 - Variação da constante de equilíbrio de adsorção com a temperatura.

Ao realizar a BTC para a sacarose suspeitou-se que poderia existir enzima invertase imobilizada na resina que mesmo depois da lavagem da coluna não foi removida. Para confirmação deste resultado foram efectuadas duas outras BTC com a concentração da alimentação de 100g/l em sacarose.

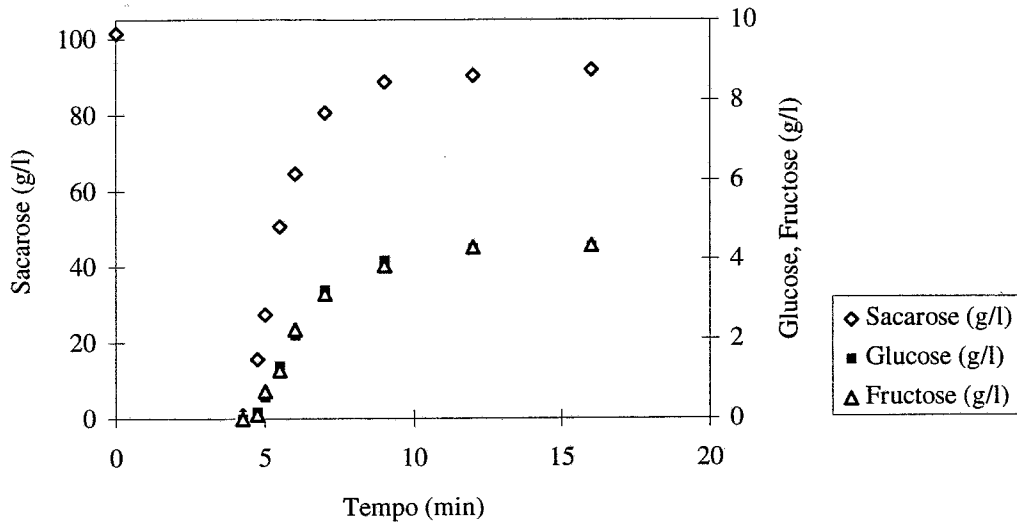


Figura 5.7 - BTC obtida para a sacarose a 100g/l, $T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=7$.

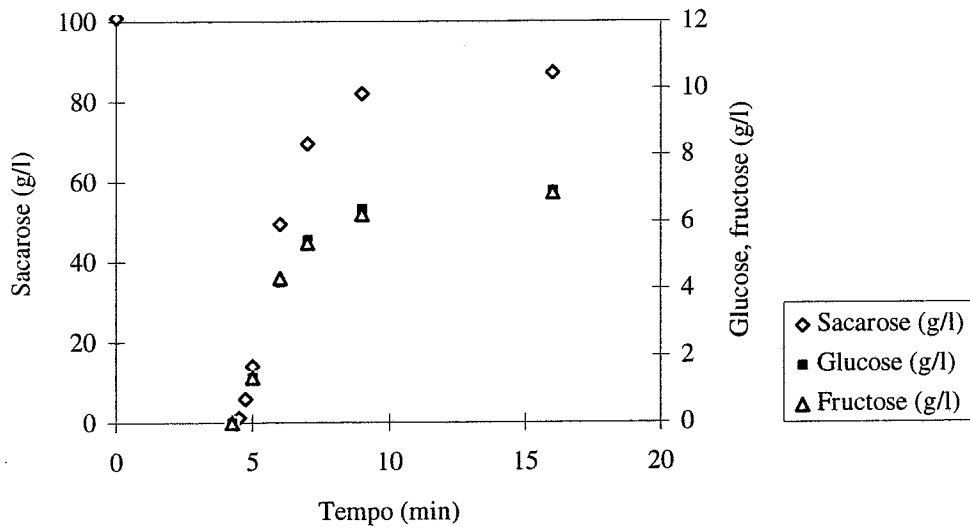


Figura 5.8 - BTC obtida para a sacarose a 100g/l, $T=55^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=4.5$.

A experiência apresentada na figura 5.7 foi realizada a $T=20^{\circ}\text{C}$ e a $\text{pH}=7$, condições pouco favoráveis à actividade da enzima. Na figura 5.8 estão apresentados os resultados obtidos para $T=55^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=4.5$, condições óptimas para o funcionamento da enzima invertase. Em ambas as experiências se verifica a presença de glucose e frutose o que indica a existência de enzima imobilizada dentro da coluna.

5.2 Determinação da cinética de inversão da sacarose.

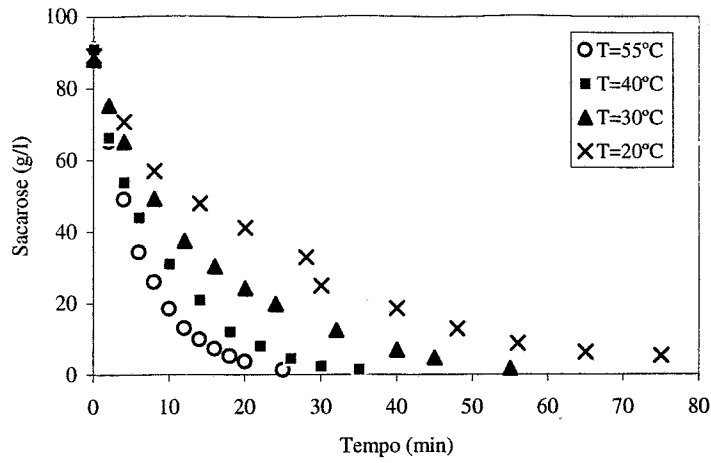
A cinética da hidrólise da sacarose pela enzima invertase foi estudada a três concentrações de sacarose iniciais diferentes: 100, 50 e 20 g/l. Para cada concentração foram feitas quatro experiências às temperaturas de 55, 40, 30 e 20°C .

A concentração de enzima invertase (SIGMA) utilizada foi de 250 mg/l. A actividade da enzima é de 46 unidades/mg sólido e uma unidade de actividade hidroliza $1.0\ \mu\text{mol}$ de sacarose por minuto a $\text{pH}=4.5$ e à temperatura de 55°C .

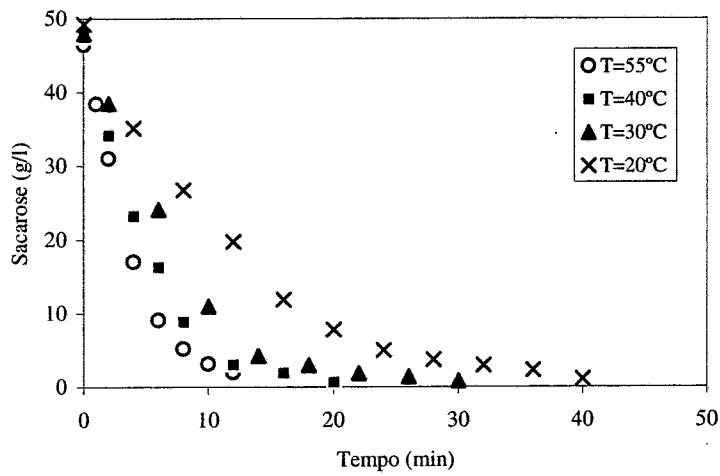
O tampão utilizado para manter o $\text{pH}=4.5$ foi acetato de cálcio/ácido acético. Misturaram-se 300 ml de uma solução 0.1 mol/l de acetato de cálcio com 200 ml de uma solução 0.2 mol/l de ácido acético. A esse volume foi adicionada água destilada até um litro.

As experiências foram feitas num fermentador de 2 litros (SETRIC GENIE). O fermentador permitiu o controlo da temperatura, da agitação (100 rpm) e do pH (eléctrodo de vidro INGOLD). O volume de trabalho foi de 1000 ml.

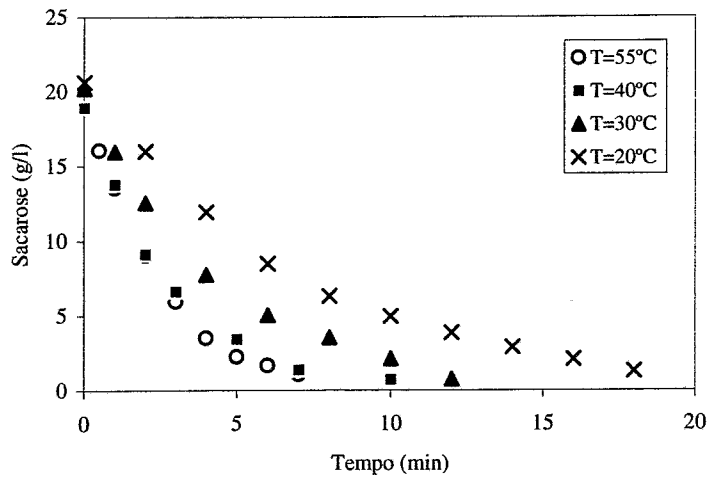
As amostras colhidas foram colocadas num banho de água fervente para desnaturar a enzima e assim parar a reacção. As amostras foram de seguida congeladas até o teor em sacarose ser analisado. Essa análise foi feita por HPLC no mesmo equipamento usado na secção 5.1. Usou-se um caudal de eluente (H_2SO_4 0.005 N) de 0.3ml/min em que a pressão de trabalho esteve durante as análises entre 85 e 90 bar. Trabalhou-se à temperatura ambiente ($T\cong 23^{\circ}\text{C}$). As figuras 5.9a a 5.9c mostram os perfis experimentais encontrados para as três concentrações iniciais de sacarose: 100, 50 e 20 g/l.



(5.9a)



(5.9b)



(5.9c)

Figura 5.9 - Inversão da sacarose. Resultados experimentais obtidos para concentração inicial de sacarose, a) 100 g/l, b) 50 g/l, c) 20 g/l.

A cinética de inversão da sacarose é usualmente bem descrita pela equação de Michaelis-Menten (Shuler e Kargi, 1992):

$$v = \frac{kS}{K + S} \quad (5.4)$$

Em que v é a velocidade da reacção (g/l/min) e S é a concentração da sacarose (g/l), k representa a velocidade máxima de inversão da sacarose (g/l/min) e K a constante de Michaelis-Menten (g/l). Linearizando a equação anterior vem:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k} + \frac{K}{k} \frac{1}{S} \quad (5.5)$$

Usando-se as velocidades iniciais v_0 (g/l/min) calculadas em cada experiência (ver tabela 5.7) fez-se um estudo em que se traçou um gráfico $\frac{1}{v_0}$ em função de $\frac{1}{S_0}$.

Obtém-se rectas com declive $\frac{K}{k}$ e intercepção com o eixo das abcissas em $\frac{1}{k}$ (ver figura 5.10).

Bowski et al. (1971) fizeram um estudo cinético também para a enzima invertase. Concluíram que a cinética da enzima é bem descrita pela equação de Michaelis-Menten para concentrações de sacarose abaixo dos 100 g/l ($k=5.61$ g/l/min e $K=54.77$ g/l). A temperatura de trabalho foi de 25° C e o pH foi mantido a 4.5 usando um tampão fosfato.

No entanto as condições de trabalho são ligeiramente diferentes. Uma vez que a resina a usar na separação dos açúcares é mais eficiente na forma cálcio, substituiu-se o tampão tradicionalmente utilizado, rico em iões sódio ou potássio que permutam com os iões cálcio da resina (acetato de sódio/ácido acético ou um tampão fosfato) por um tampão do tipo acetato de cálcio/ácido acético (ver secção 5.3).

Tabela 5.7 – Resultados obtidos no cálculo das velocidades iniciais para as várias experiências de realizadas para determinação da cinética de inversão da sacarose.

T=20°C			
S_0	$1/S_0$	v_0	$1/v_0$
89.16	0.011	4.60	0.217
49.26	0.020	3.52	0.284
20.65	0.048	2.32	0.430
T=30°C			
S_0	$1/S_0$	v_0	$1/v_0$
88.88	0.011	6.37	0.157
48.02	0.021	4.75	0.210
20.23	0.049	4.25	0.235
T=40°C			
S_0	$1/S_0$	v_0	$1/v_0$
91.00	0.011	9.28	0.108
47.52	0.021	6.68	0.149
18.94	0.053	5.15	0.194
T=55°C			
S_0	$1/S_0$	v_0	$1/v_0$
91.04	0.011	10.47	0.096
46.48	0.021	8.05	0.124
18.91	0.053	5.72	0.175

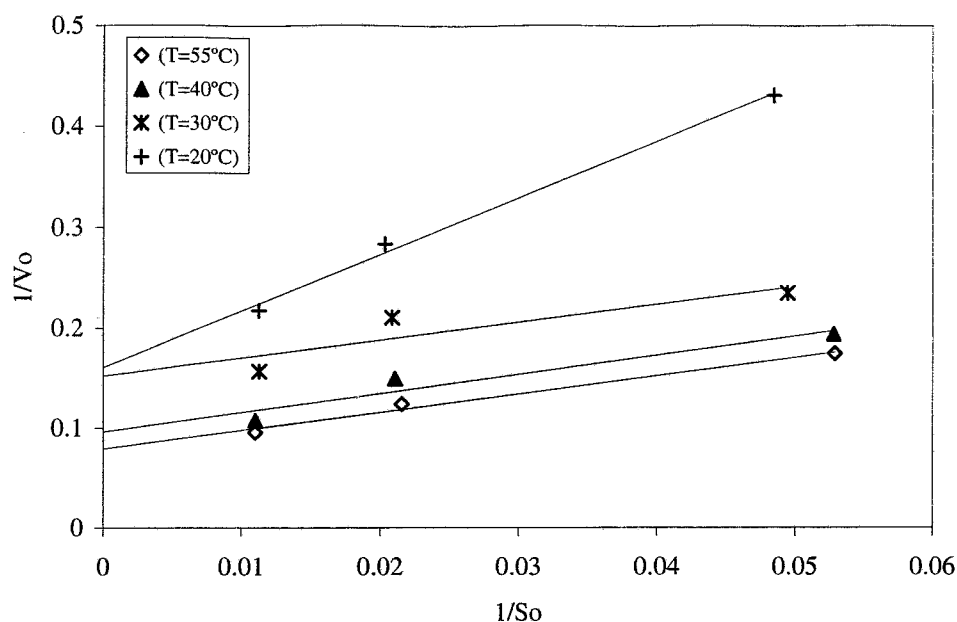


Figura 5.10 - Variação do inverso da velocidade inicial de consumo de sacarose pela enzima invertase com o inverso da concentração inicial de sacarose para as temperaturas de 20, 30, 40 e 55°C.

Na tabela 5.8 apresentam-se os valores calculados para as duas constantes k e K . Nota-se que a velocidade máxima k aumenta com a temperatura. De facto a temperatura óptima de reacção para a invertase é 55°C, podendo a uma temperatura tão baixa como 20°C sofrer uma alteração de comportamento.

Tabela 5.8 - Constantes cinéticas calculadas para uma cinética do tipo Michaelis-Menten.

Temperatura (°C)	K (g/l)	k (g/l/min)
20	34.94	6.22
30	11.65	6.55
40	19.78	10.35
55	23.00	12.58

A figura 5.11 mostra o consumo da sacarose com concentração inicial de 100, 50 e 20 g/l na experiência realizada a $T=55^{\circ}\text{C}$ (conhecida como a temperatura óptima para a enzima invertase. No apêndice D são apresentados os cromatogramas obtidos numa das experiências de cinética (Concentração de sacarose=100 g/l e $T=40^{\circ}\text{C}$) bem como os resultados experimentais mostrados na figura 5.9 mas em forma de tabela.

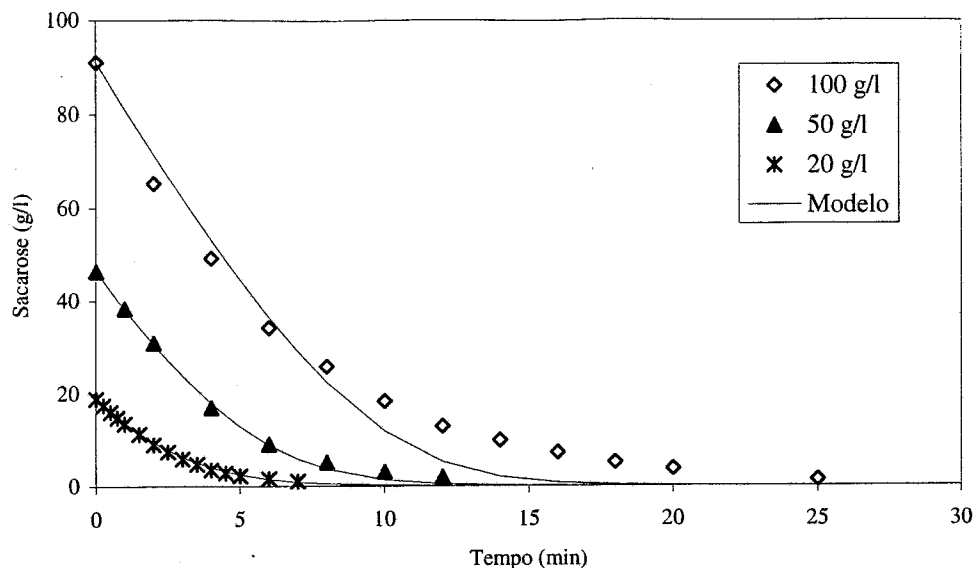


Figura 5.11 - Inversão da sacarose. Temperatura de operação 55°C e concentrações de sacarose testadas: 100, 50 e 20 g/l.

Da análise da figura 5.11 pode concluir-se que a equação de Michaelis-Menten ajusta melhor os resultados obtidos para concentrações mais baixas. Para concentrações de sacarose mais elevadas (100 g/l) o que poderá acontecer é a enzima invertase sofrer inibição por concentração de substrato.

5.3 Escolha da solução tampão a usar no sistema SMBR para hidrolisar a sacarose com a enzima invertase.

Normalmente as soluções tampão utilizadas para pH=4.5 (pH ótimo para a enzima invertase) são do tipo acetato de sódio/ácido acético ou citrato de sódio/ácido cítrico.

No nosso caso como a resina é mais eficiente na separação dos açúcares se estiver na forma cálcio não interessa fazer entrar nas colunas outros iões que possam deslocar o cálcio (como exemplo o Na^+ , K^+ ou o H^+). Assim optou-se por usar uma solução tampão do tipo acetato de cálcio/ácido acético.

Torna-se ainda necessário conhecer a fracção de iões H^+ presentes na solução tampão para verificar se a sua influência será muito negativa.

Para o cálculo da fracção de iões H^+ é necessário conhecer a constante de dissociação do ácido acético (Dean, 1979), $pK_a=4.76$ ($T=25^\circ C$). Conhecendo o pK_a do ácido pode calcular-se a concentração de iões H^+ na solução:

$$pK_a = -\log_{10} K_a = 4.76 \quad \Rightarrow \quad K_a = 10^{-4.76} = 1.74 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$$

$$K_a = \frac{[H^+] \times [CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]} \quad \Rightarrow \quad 1.74 \times 10^{-5} = \frac{[H^+] \times [CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]}$$

com $[CH_3COOH] = 0.2 \text{ N}$, vem a concentração de H^+ :

$$[H^+] = 1.8654 \times 10^{-3} \text{ N}$$

A solução tampão foi preparada misturando 300 ml de uma solução 0.1 mol/l de acetato de cálcio (0.05 N em iões Ca^{2+}) com 200 ml de uma solução 0.2 N de ácido acético ($1.8654 \times 10^{-3} \text{ N}$ em iões H^+). Adicionou-se água destilada até um litro.

A concentração total de iões será:

$$C_T = [Ca^{2+}] + [H^+] = 0.3 \times 0.05 + 0.2 \times 1.8654 \times 10^{-3} = 0.015 + 0.373 \times 10^{-3} \text{ N}$$

$$C_T = 0.015373 \text{ N}$$

As fracções de iões Ca^{2+} e H^+ na solução tampão serão:

$$x_{Ca^{2+}} = \frac{[Ca^{2+}]}{C_T} = \frac{0.015}{0.0154} = 0.9756 = 97.56\%$$

$$x_{H^+} = \frac{[H^+]}{C_T} = \frac{0.373 \times 10^{-3}}{0.0154} = 0.0243 = 2.43\%$$

Como se pode observar a percentagem de H^+ é muito menor do que a percentagem de iões cálcio. Em princípio a quantidade de Ca^{2+} deslocados pelos hidrogeniões na resina vai ser muito pequena.

5.4 Separação e reacção com separação de açúcares em SMB.

Ao longo dos últimos anos a separação por cromatografia tem vindo a ser cada vez mais utilizada no campo da química fina e farmacêutica mas até agora a aplicação mais importante e mais estudada (Hashimoto *et al.*, 1983a e 1983b; Ching, 1983; Lukác e Perina, 1991; Lameloise e Viard, 1993) é a separação glucose-frutose.

A separação da mistura dextrano-frutose por cromatografia foi estudada por Barker e Zafar (1988) que usaram um reactor em coluna com um enchimento da Bayer na forma cálcio. A sacarose foi injectada em pulsos e os produtos foram analisados à saída. Mais tarde Barker *et al.* (1992 e 1993) depois de produzirem e purificarem a enzima dextranosacarase combinaram a biorreacção e a separação numa mesma unidade contínua em contracorrente obtendo bons resultados nas purezas das correntes de extracto e refinado.

Um sistema de leito móvel simulado (SMB) permite proceder a separações cromatográficas em continuo como exposto no capítulo 2 deste trabalho. O equipamento de SMB disponível no laboratório foi fornecido pela SEPAREX, França actual NOVASEP (LICOSEP 12-26).

O sistema é constituído por doze colunas ligadas em série. Uma bomba de três cabeças permite ter um dado caudal de reciclo. Como se pode ver na figura 5.12 quatro linhas estão ligadas a cada coluna:

- F i: Linha de alimentação ligada à bomba de alimentação
- E i: Linha de eluente ligada à bomba de eluente
- Ex i: Linha de extracto ligada à bomba de extracto
- R i: Linha de refinado ligada à bomba de refinado.

Consequentemente existem doze linhas de cada tipo e a um dado momento apenas uma linha de cada tipo tem de estar aberta. As linhas de alimentação, eluente, extracto e refinado são trocadas ao fim de um determinado período de tempo Δt . Um ciclo completo é composto por períodos sucessivos permitindo às diferentes linhas voltarem às posições iniciais. Podem ser distinguidas quatro zonas no sistema:

- Zona I: Entre a linha de eluente e a linha de extracto
- Zona II: Entre a linha de extracto e a linha de alimentação
- Zona III: Entre a linha de alimentação e a linha de refinado
- Zona IV: Entre a linha de refinado e a linha de eluente.

Dependendo da posição das linhas de injeção ou recolha, a bomba de reciclo pode estar sucessivamente na zona I, II, III ou IV.

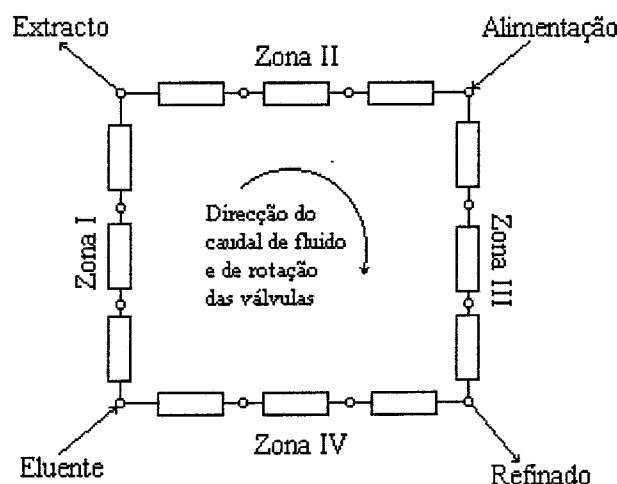


Figura 5.12 - Esquema do sistema LICOSEP 12-26 com três colunas em cada zona.

Neste sistema existem quatro bombas. A de reciclo (LEWA) é uma bomba de membrana e três cabeças com um caudal máximo de trabalho de 120 ml/min e uma pressão máxima de 100 bar.

As bombas de alimentação e eluente são bombas Merck-Hitachi L-6200 respectivamente com caudais máximos de 10 e 30 ml/min. As bombas de refinado e

extracto são bombas Merck-Hitachi L-6000 também e respectivamente com caudais máximos de 10 e 30 ml/min.

As colunas são Superformance®, Universal glas-cartridge System, fornecidas pela Merck. As dimensões das colunas são diâmetro interno de 2.6 cm e comprimento de 11.5 cm (volume de cada coluna= $61.06 \cdot 10^{-3} \text{ dm}^3$). Estão ainda equipadas com uma camisa onde circula água à temperatura que se deseja fazer a experiência. A pressão máxima aceitável é de 60 bar.

As válvulas (48) são pneumáticas que trabalham a pressões até 1000 bar da TOP Industrie (França). A pressão mínima do ar é 6 bar.

O equipamento SMB é controlado por um sistema central composto por um micro-computador ARCHE 386 SX 25 MHz e uma interface electrónica. O software de controlo é o LICOSEP 1.1 e está escrito em Turbo-Pascal (versão 7).

5.4.1 Separação em SMB de uma mistura Glucose/frutose.

Foram usadas nesta separação doze colunas (quatro em cada zona) cheias com a resina de troca iónica AMBERLITE CR1320CA (Rohm and Haas, France S. A.) já referida na secção 5.1.

A fase móvel usada foi água e a concentração na alimentação de glucose e de frutose foi de 30 g/l. A temperatura de operação foi de 20°C. Foram testados diferentes períodos de rotação (Δt) e os melhores resultados obtidos foram para $\Delta t=123$ segundos. Os caudais de trabalho foram:

Q eluente=10.22 ml/min

Q extracto=7.81 ml/min

Q refinado=5.43 ml/min

Q alimentação=3.02 ml/min

Q reciclo=29.08 ml/min

Depois de se atingir o estado estacionário as correntes de extracto e refinado foram colhidas durante um ciclo completo e foram determinadas as concentrações dos açúcares presentes a fim de avaliar as purezas obtidas nestas correntes. Neste mesmo ciclo foi determinado o perfil interno de concentrações com a recolha de amostras para cada coluna decorrido 50% de um período de rotação.

Purezas de 68.1 e de 73.3% foram obtidas respectivamente no extracto e no refinado colhidos no vigésimo ciclo. Os perfis internos de concentração podem ser observados na figura 5.13.

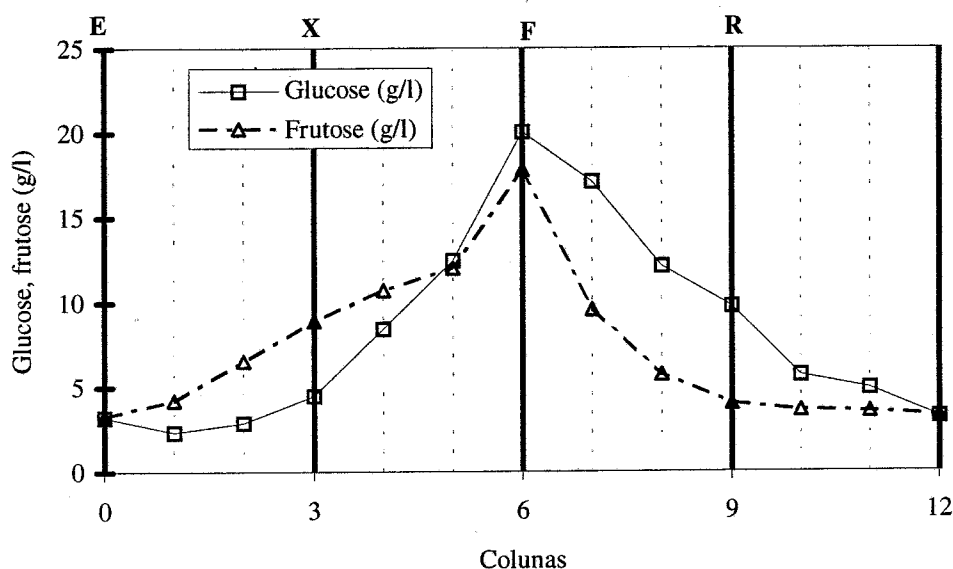


Figura 5.13 - Perfil interno de concentração obtido na separação da mistura glucose/frutose (run 04). Cada ponto foi obtido a 50% de um período.

5.4.2 Inversão da sacarose e separação da mistura glucose/frutose num sistema SMBR.

A enzima usada foi a invertase (Sigma) adicionada ao sistema junto com o eluente (0.25 g/l). O eluente, que normalmente em separação de açúcares é água teve de ser substituído por um tampão a pH=4.5, pH em que a enzima é mais estável.

Como explicado na secção 5.3, o tampão tradicional de acetato de sódio ou potássio/ácido acético foi substituído por um tampão do tipo acetato de cálcio/ácido

acético para evitar ao máximo a entrada de iões que possam deslocar os iões cálcio da resina e assim não haver perda de eficiência da mesma na separação dos açúcares.

A alimentação foi uma solução de sacarose 60 g/l também no mesmo tampão. A temperatura de trabalho foi de 50°C muito próxima da temperatura óptima da enzima (55°C).

A configuração usada nesta experiência foi alterada para 2 colunas nas zonas I, II e IV e 6 colunas na zona III (zona mais longa aonde se dá a reacção para garantir que toda a sacarose é invertida). O Δt usado foi de 126 segundos. Durante os 5 primeiros ciclos só se fez circular o eluente de modo a que as colunas ficassem saturadas com a enzima.

Os caudais de trabalho foram:

Q eluente=8.67 ml/min

Q extracto=6.21 ml/min

Q refinado=4.31 ml/min

Q alimentação=1.84 ml/min

Q reciclo=29.08 ml/min

No final do 25º ciclo purezas de 66.1 e de 77.5% foram obtidas respectivamente no extracto e no refinado (colhidos durante todo o ciclo). Os perfis internos de concentração podem ser observados na figura 5.13.

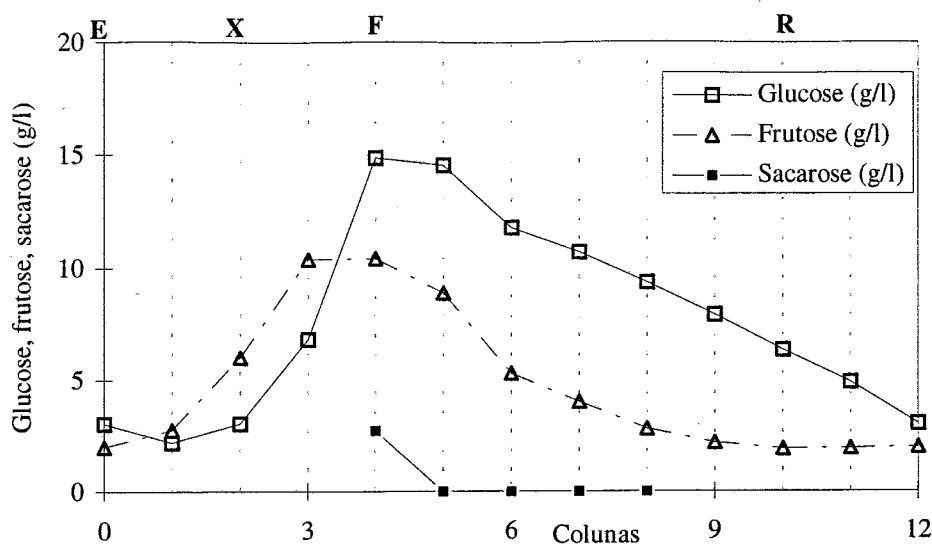


Figura 5.14 - Perfil interno de concentração obtido na inversão da sacarose e separação da mistura glucose/frutose (run 08). Cada ponto foi obtido a 50% de um período.

5.4.3 Separação da mistura dextrano/frutose resultante da fermentação da sacarose pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f)

Barker *et al.* (1992 e 1993) produziram previamente em batch a enzima e de seguida purificaram-na. Usaram a enzima pura num sistema de biorreacção e separação simultâneo. Neste trabalho o objectivo é separar o dextrano e a frutose directamente a partir do meio fermentado livre de células. Evitam-se assim os custos do processo de purificação da enzima.

5.4.3.1 Eliminação de iões sódio do meio de cultura fermentado.

No final de uma fermentação com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* existem no meio de cultura além dos produtos formados e da biomassa alguns resíduos de sacarose e de aminoácidos e ainda uma grande quantidade de iões Na^+ adicionados ao meio inicial sob a forma de Na_2HPO_4 . Como o pH final da fermentação é cerca de 4.5, também existem alguns iões H^+ no meio de cultura fermentado:

$$pH = -\log[H^+] \quad 4.5 = -\log[H^+] \quad [H^+] = 0.032 \times 10^{-3} \text{ mol / l}$$

$$[H^+] = 0.032 \times 10^{-3} \text{ equiv./l}$$

Este tipo de iões poderá deslocar o ião cálcio da resina usada no SMB (como apresentado na secção 5.3 a resina usada neste trabalho é uma resina de troca iónica na forma Ca^{2+}) perdendo-se assim eficiência na separação.

Como a quantidade de iões de hidrogénio é muito baixa tentou-se remover iões sódio do meio fermentado. Assim como primeiro passo reduziu-se a quantidade de Na_2HPO_4 adicionado ao meio de cultura inicial para metade. Preparou-se então um meio de cultura com apenas 4 g/l de Na_2HPO_4 ao invés dos tradicionais 8 g/l. Como resultado obteve-se uma fermentação mais demorada (cerca de 11 horas) mas obtiveram-se aproximadamente as mesmas quantidades de produto (dextrano cerca de 8.1 g/l e frutose cerca de 7.8 g/l).

Foram feitas análises ao teor em iões sódio no início e no final da fermentação (usou-se um fotómetro de chama DR LANGE 131 disponível no laboratório de métodos instrumentais de análise).

Assim,

i) Antes da fermentação:

$$[Na^+] = 2 \times [Na_2HPO_4] = 2 \times 4 = 8 \text{ g / l} = 0.348 \text{ mol / l} = 0.348 \text{ equiv./l}$$

ii) Depois da fermentação:

$$[Na^+] = 1632 \text{ mg / l} = 1.632 \text{ g / l} = 0.071 \text{ eq./l}$$

A quantidade de iões sódio presentes no meio de cultura é ainda muito elevado sendo necessário retirá-los do meio antes de efectuar a separação.

Foi usada uma coluna cheia com uma resina catiónica (Duolite C20, Rohm and Haas) na forma cálcio de capacidade 1.4 eq./l (V=121.6 ml). Fez-se passar o fermentado sem células em partidas de 250 ml na coluna, lavando-se de seguida com água destilada e regenerando-a novamente à forma cálcio passando uma solução de CaCl_2 a 10%. O fermentado foi novamente analisado para verificar o teor em iões sódio:

iii) Depois de passar o fermentado na coluna:

$$[\text{Na}^+] = 312 \text{ mg / l} = 0.312 \text{ g / l} = 0.0136 \text{ eq./l}$$

Durante esta operação houve perda de dextrano e frutose. A concentração final de cada um no fermentado tratado é de cerca de 5 g/l. O fermentado passou a ter na sua constituição iões cálcio devido à permuta que houve com os iões sódio sendo a percentagem de iões cálcio relativamente aos iões sódio cerca de 81%.

5.4.3.2 *Determinação da curva de adsorção/desorção para a mistura dextrano/frutose.*

Foi preparada uma solução sintética de dextrano (SIGMA, referência D-5501) e frutose a 5g/l de cada um. Fez-se passar essa solução a um caudal de 5 ml/min pela mesma coluna usada na determinação das isotérmicas de adsorção da glucose e da frutose na secção 5.1. A temperatura de trabalho foi de 20°C. Colheram-se amostras da solução de saída da coluna que foram posteriormente analisadas no mesmo sistema de HPLC também já referido anteriormente.

Depois da coluna saturada foi regenerada com água destilada e foram colhidas novamente amostras também posteriormente analisadas para obter a curva de desorção dos açúcares da resina.

Na figura 5.15 podem observar-se os resultados obtidos. A curva de adsorção vai até aos vinte minutos aonde tem início a curva de desorção da mistura.

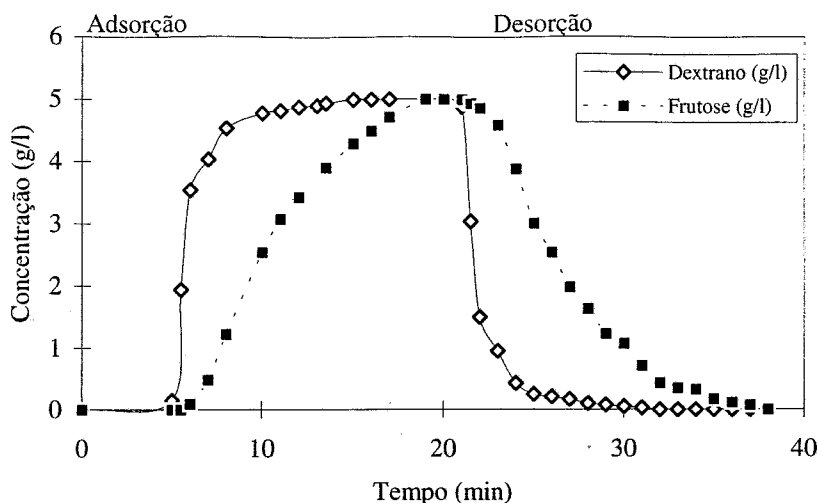


Figura 5.15 - Curva de adsorção e desorção da mistura sintética de dextrano/frutose 5g/l na resina de troca iônica AMBERLITE CR1320CA.

Da observação dos resultados experimentais o tempo estequiométrico para o dextrano anda à volta dos 6 minutos e para a frutose à volta dos 10 minutos. Podem comparar-se estes resultados com os tempos teóricos. Assim para o dextrano:

$$t_{st}^D = \frac{\varepsilon V + V_{morte}}{Q} = \frac{0.4 \times 61.06 + 7}{5} = 6.28 \text{ min}$$

E para a frutose:

$$t_{st}^F = \frac{\varepsilon V}{Q} \left[1 + \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \frac{q_0}{C_0} \right] = \frac{0.4 \times 61.06}{5} \left[1 + \frac{1 - 0.4}{0.4} \times 0.625 \right] = 9.46 \text{ min}$$

5.4.3.3 Separação em SMB de uma mistura dextrano/frutose.

A extracção do dextrano produzido biologicamente pela estirpe *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) é feita através de precipitações do fermentado com solventes orgânicos. Uma das fábricas que usa este método situa-se em Cuba, La Havana (Bell *et al.*, 1968). É um método em que além de se gastar muito solvente (mesmo volume de solvente que solução a tratar) não permite purificar ao mesmo tempo a frutose sendo esta descartada.

A separação deste tipo de mistura em SMB é interessante do ponto de vista em que se podem obter duas correntes, uma de extracto rica em frutose e outra de refinado rica em dextrano.

Foram usadas nesta separação doze colunas (quatro em cada zona), esquema semelhante ao usado na separação da mistura glucose/frutose, cheias com a resina de troca iónica AMBERLITE CR1320CA (Rohm and Haas, France S. A.) referida na secção 5.1. A fase móvel usada foi água e a concentração na alimentação de dextrano e de frutose foi de 5 g/l. A temperatura de operação foi de 20°C.

Os caudais de trabalho usados foram:

Q eluente=7.0 ml/min

Q extracto=6.0 ml/min

Q refinado=3.0 ml/min

Q alimentação=2.0 ml/min

Q reciclo=29 ml/min

Purezas de 72.6 e de 81.7% foram obtidas respectivamente no extracto e no refinado para $\Delta t=66.6$ segundos, colhidos durante o trigésimo ciclo e os perfis internos de concentração podem ser observados na figura 5.16.

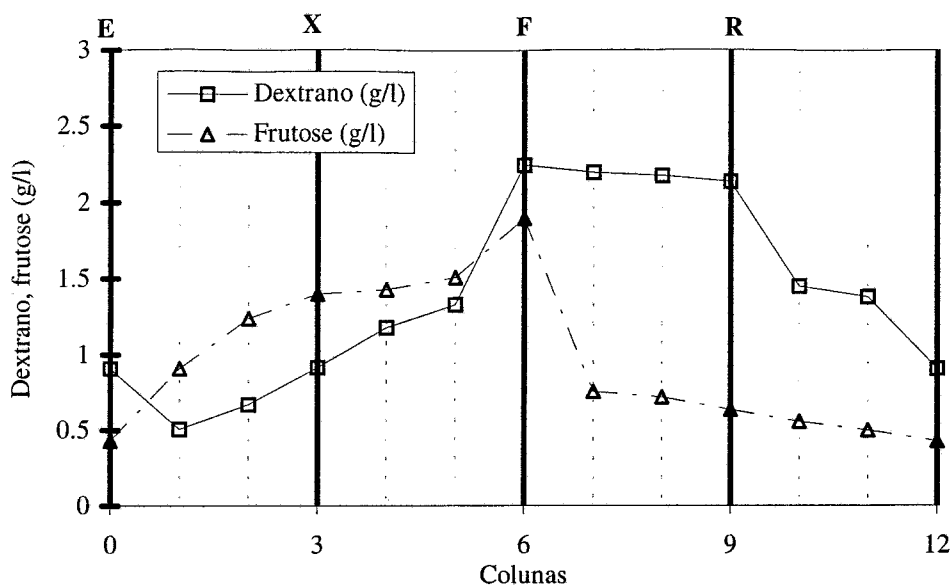


figura 5.16 - Perfil interno de concentração obtido na separação da mistura dextrano/frutose com $\Delta t=66.6$ segundos (run 02). Cada ponto foi obtido a 50% de um período.

Usando os mesmos caudais de trabalho variou-se o Δt para 70.2 segundos para ver se se consegue melhorar a separação. As purezas obtidas foram de 81.4 e 74.2% respectivamente para o refinado e para o extracto também colhidos durante o trigésimo ciclo verificando-se uma melhoria de 1.6 % na pureza do extracto. Os perfis internos de concentração podem ser observados na figura 5.17.

Como se pode observar dos resultados obtidos nas separações a tempos diferentes houve uma pequena melhoria na pureza do extracto para $\Delta t=70.2$ segundos. Usando esse Δt (70.2 segundos) procedeu-se então à separação da mistura de dextrano e frutose resultante da fermentação, não sem antes se ter centrifugado a biomassa do fermentado e de se ter efectuado o tratamento descrito para reduzir ao máximo possível a presença de iões sódio no meio. As concentrações iniciais de dextrano e frutose na solução tratada são respectivamente 5.16 e 4.98 g/l.

Os perfis internos de concentração obtidos podem ser observados na figura 5.18 e as purezas encontradas foram de 77.9 e 72.2% respectivamente para o refinado e para o

extracto colhidos num ciclo completo, ao fim de 30 ciclos. Na tabela 5.9 apresenta-se um resumo das várias purezas encontradas nas diferentes experiências.

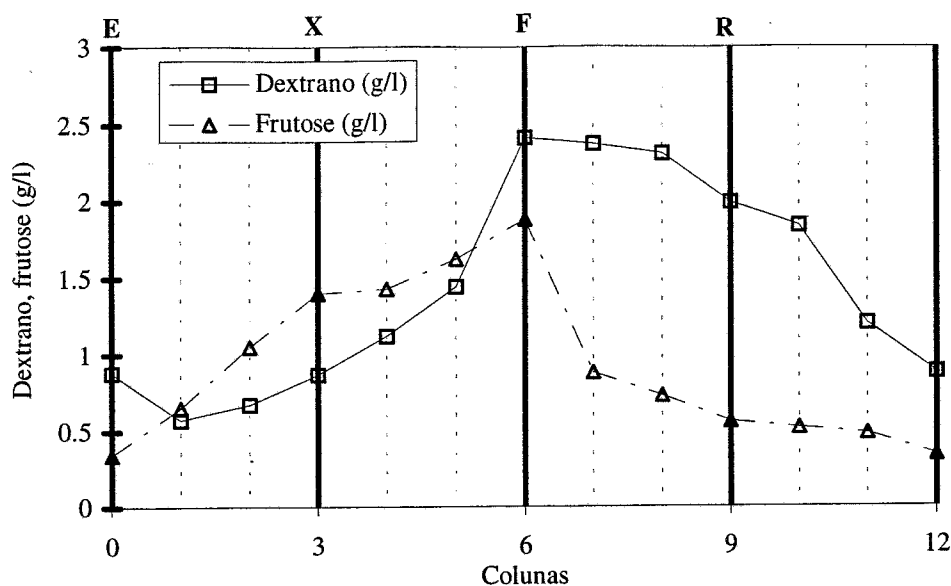


figura 5.17 - Perfil interno de concentração obtido na separação da mistura dextrano/frutose $\Delta t=70.2$ segundos (run 03). Cada ponto foi obtido a 50% de um período.

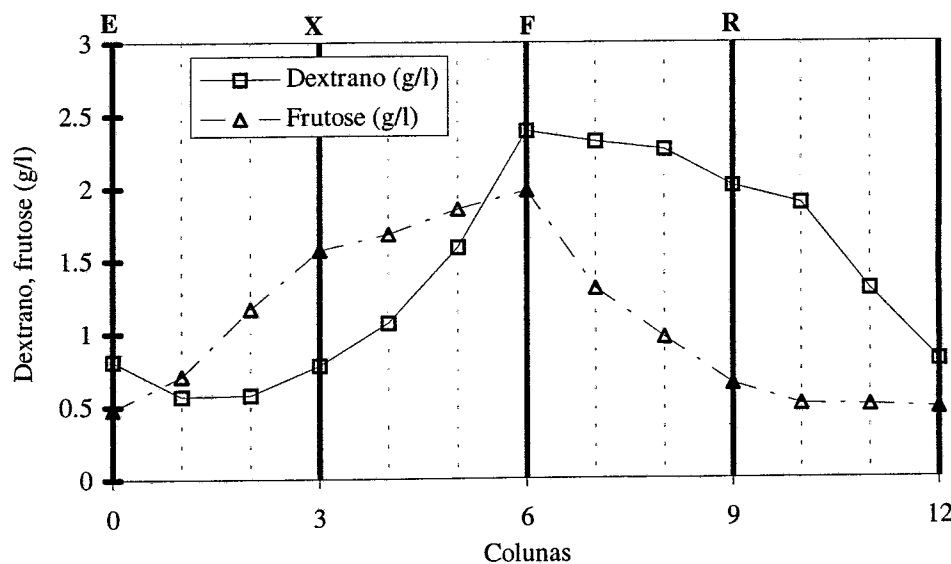


figura 5.18 - Perfil interno de concentração obtido na separação da mistura dextrano/frutose $\Delta t=70.2$ segundos (run 04). Cada ponto foi obtido a 50% de um período.

Tabela 5.9 - Purezas obtidas para o refinado e para o extracto colhidos para 1 ciclo completo a tempos de ciclo diferentes.

Δt (segundos)	Solução	P_R	P_X
66.6	Sintética, 5g/l em dextrano e frutose.	81.7%	72.6%
70.2	Sintética, 5g/l em dextrano e frutose.	81.4%	74.2%
70.2	Fermentado com 5.16 g/l de dextrano e 4.98 g/l de frutose.	77.9%	72.2%

5.5 Conclusões

Na primeira parte deste capítulo procedeu-se à determinação das isotérmicas de adsorção para a glucose, frutose e sacarose em AMBERLITE CR1320CA. Considerou-se que a sacarose não é praticamente adsorvida, sendo a porosidade das partículas de resina: $\epsilon_p=0.09$. Quanto às isotérmicas de adsorção da glucose e da frutose verifica-se uma redução na constante K com o aumento da temperatura, sendo este efeito mais acentuado para a frutose.

A cinética da inversão da sacarose catalisada pela enzima invertase em solução tampão acetato de cálcio/ácido acético pH=4.5 é bem descrita por uma cinética de Michaelis-Menten. Bowski et al. (1971) descreveram a cinética da invertase com a equação de Michaelis-Menten para as concentrações de sacarose mais baixas, usando soluções tampão fosfatadas.

Ao usar-se uma solução tampão de acetato de cálcio/ácido acético no processo de reacção e separação simultâneo, a resina não deverá perder eficiência uma vez que a fracção de iões cálcio é de 97.6% contra 2.3% de iões hidrogénio.

Na separação em SMB da mistura glucose/frutose e no sistema SMBR em que se faz a inversão e separação ao mesmo tempo, as percentagens baixas de pureza do extracto e do refinado obtidas justificam-se pelo facto do volume total de resina ser baixo. O nosso sistema tem 12 colunas de 0.061 dm³ enquanto que o sistema usado por Nicoud

(1995) contém 24 colunas com 0.476 dm³ de resina cada uma. A sacarose foi invertida na totalidade.

A operação de remoção de iões Na⁺ do meio de cultura fermentado antes de se proceder à separação do dextrano e da frutose permitiu obter uma solução em que a percentagem de iões cálcio relativamente à percentagem de iões sódio é de 81%.

Quanto à separação da mistura dextrano/frutose conseguiram-se purezas de extracto e de refinado para a mistura sintética de 74.2% e 81.4% e para o fermentado de 72.2% e 77.9%. Esta diferença tem a ver com o facto de que o fermentado ter ainda na sua composição alguns iões sódio que podem provocar a perda de alguma eficiência da resina. Para melhorar a separação, uma vez que o peso molecular do dextrano é muito elevado e a temperatura de trabalho foi baixa, dever-se-ia usar uma resina com tamanho de partícula médio superior ao usado. Barker et al. (1992) usaram uma resina com diâmetro médio de partícula de 450 µm e conseguiram melhores resultados de separação. Outro factor importante a ter em conta é também o facto de o número de colunas e o volume de resina de trabalho serem baixos.

Referências bibliográficas

Altenhöner, U.; Meurer, M.; Strube, J.; Schmidt-Traub, H.; 1996, "Parameter Estimation for the Simulation of Fluid-Chromatography", Proceedings of Prep'96.

Barker, P.; Ganetsos, G.; Ajongwen, J.; Akyntoye, A.; 1992, "Bioreaction-separation on continuous chromatographic systems", The Chemical Engineering Journal, vol. 50, B23-B28.

Barker, P.; Ganetsos, G.; Ajongwen, J.; 1993, "A novel approach to the production of clinical grade dextran.", Journal of Chemical Technology and Bioechnology, vol. 57, 21-26.

Bell, A.; Alvarez, X.; Aguilera, M.; 1968, "Estudio de las propiedades de la dextrana", ICIDCA, 2 (2), 47-55.

Bowski, L.; Saini, R.; Ryu, D.; Vieth, W.; 1971, "Kinetic modeling of the hidrolisis of sucrose by invertase", Biotechnology and Bioengineering, vol 13, 641-656.

Broughton, D. B.; 1968, "Molex:Case history of a process", Chemical Engineering Progress, 64-8, 60-65.

Broughton, D. B.; Neuzil, R. W.; Pharis, J. M.; Brearley, C. S.; 1970, "The Parex process for recovering paraxylene", ", Chemical Engineering Progress, 64-8, 60-65.

Ching, C. B.; 1983, "A theoretical model for de simulation of the operation of the semi-continuous chromatographic refiner for separating glucose and fructose.", Journal of Chemical Engineering of Japan, vol. 16-1, 49-53.

Ching, C. B.; Ruthven, D. M.; Hidajat, K.; 1985, "Experimental study of a simulated counter-current adsorption system-III. Sorbex operation.", Chemical Engineering Science, vol. 40-8, 1411-1417.

Dean, A. J.; 1979, "Lange's Handbook of Chemistry", McGraw-Hill Book Company.

Hashimoto, K.; Adachi, S.; Noujima, H.; Ueda, Y.; 1983a, "A new process combining adsorption and enzyme reaction for producing higher fructose syrup.", *Biothechnology and Bioengineering*, vol. 25, 2371-2393.

Hashimoto, K.; Adachi, S.; Noujima, H.; Maruyama, H.; 1983b, "Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving bed adsorber.", *Journal of Chemical Engineering of Japan*, vol. 16-5, 400-406.

Helfferich, F.; 1962, "Ion Exchange", McGraw-Hill, New York.

Humphrey, J. L.; Keller, G. E.; 1997, "Separation process technology", McGraw-Hill, New York.

Lameloise, M.; Viard, V.; 1993, "Modelling and simulation of a glucose-fructose simulated moving bed adsorber", *Trans IChemE*, vol. 71, part C, 27-32.

Lukác, M.; Perina, Z.; 1991, "A dynamic model of physical processes in chromatographic glucose-fructose separation.", *Chemical Engineering Science*, vol. 46-4, 959-965.

Nicoud, R. M.; 1995, "The simulated moving bed: a powerful chromatographic process.", *LC-GC INTL.*, vol. 5-5, 43-47.

Shuler, M. L., Kargi, F.; 1992, "Bioprocess Engineering, Basic Concepts", Prentice Hall International Series.

Capítulo 6

Conclusões e sugestões para trabalho futuro

6 Conclusões e trabalho futuro

Neste capítulo apresentam-se as conclusões gerais dos trabalhos realizados e fazem-se algumas sugestões para continuação dos mesmos no futuro.

6.1 Conclusões

Para a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) foram determinadas as condições óptimas de crescimento. Num sistema batch foram tomadas como condições óptimas para a produção de dextranos e frutose, $T=35^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5.5$, e concentração inicial de sacarose de 20 gdm^{-3} (valor para o qual $Y_{X/S}$ é máximo). Concentrações iniciais de sacarose mais elevadas deram origem a problemas na separação da biomassa por centrifugação.

Foi realizada a fermentação num sistema fed-batch mantendo constantes as condições de trabalho. Partiu-se de um volume inicial de meio litro de meio de cultura com a concentração inicial de sacarose de 10 gdm^{-3} e ao fim de 5 horas de fermentação batch deu-se início ao processo fed-batch adicionando a alimentação com a sacarose a 20 gdm^{-3} a um caudal de 0.2 l/h . Os resultados obtidos foram semelhantes aos resultados obtidos no processo batch.

Foi desenvolvido um modelo cinético que aproxima razoavelmente os resultados experimentais obtidos nos processos batch e fed-batch. Para a fermentação batch #31 (fermentação tipo, $T=35^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5.5$, Concentração inicial de sacarose= 20 gdm^{-3}) os parâmetros determinados foram: $\mu_m=1.423 \text{ h}^{-1}$, $X_0=0.00523 \text{ gdm}^{-3}$, $Y_{E/X}=13.95 \text{ DSU/mg cél.}$, $Y_{X/S}=3.57 \text{ g cél./g sac.}$, e $k'=0.015 \text{ ml/DSU.h}$.

No final da fermentação a previsão do modelo para a produção de frutose tem um desvio ligeiro. Este facto explica-se uma vez que quando a sacarose se esgota no meio a bactéria recorre à frutose como fonte de carbono. Também no que diz respeito à produção de enzima existe um desfasamento relativamente ao modelo, pois o modelo proposto não considera o transporte da enzima desde a célula até ao meio de cultura.

Ao estudar a razão azoto/carbono ao longo de uma fermentação tipo verificou-se que esta sofria quebras. Existe uma redução na velocidade de síntese da enzima ao mesmo tempo que se observa uma redução na razão azoto/carbono. Para ultrapassar esse problema foram adicionados pulsos de azoto aminoacídico no meio de cultura nos momentos em que se observaram as quebras. A velocidade de produção da enzima passou a ser constante e o tempo de fermentação mais baixo.

Testes de produção de enzima realizados com a incorporação de aminoácidos marcados com ^{14}C permitiram confirmar que a síntese real da enzima de facto diminui aquando da quebra da razão azoto/carbono e também a purificação usando PEG 4000 é mais eficiente do que a purificação etanólica.

Do estudo efectuado quando se adicionam ao meio de cultura fontes de carbono complementares conclui-se que a lactose inibe a produção de enzima dextranosacarase, a galactose não tem influência na síntese e a maltose favorece a síntese da enzima; neste último caso a velocidade de produção de enzima é mais elevada do que quando se usa somente sacarose como fonte de carbono. Do estudo cinético da enzima resulta no entanto que a maltose quando presente na mesma proporção que a sacarose reduz a velocidade de conversão da sacarose. Experiências realizadas nas mesmas condições mas usando um aminoácido marcado com ^{14}C confirmam os resultados obtidos.

Obtiveram-se ainda resultados importantes no estudo efectuado usando fontes de carbono complementares. Pode controlar-se o peso molecular médio dos dextranos produzidos por manipulação da constituição do meio de cultura. Observou-se um abaixamento na gama de dextranos produzidos de 6 500 000 a 180 000 para 5 000 000 a 10 000 dalton em presença de açúcares complementares.

Uma vez conhecidas as condições óptimas para a produção de dextrano e frutose torna-se necessário estudar processos de separação de modo a obter dois produtos puros. Neste trabalho o processo estudado foi a separação em leito móvel simulado (SMB). Do estudo prévio efectuado à resina usada tiraram-se os valores obtidos para as constantes de adsorção da glucose e da frutose a 50°C : para a glucose $K=0.303$ e

para a frutose $K=0.536$. Considerou-se que a sacarose não é praticamente adsorvida na resina podendo calcular-se a porosidade das partículas: $\epsilon_p=0.09$.

Foram feitos estudos preliminares de separação da mistura glucose/frutose em SMB e da reacção com a enzima invertase e separação da mesma mistura em simultâneo num sistema SMBR. Conclui-se que a cinética da invertase em solução tampão acetato de cálcio/ácido acético é bem descrita por uma cinética de Michaelis-Menten para as concentrações de sacarose mais baixas. A 100 g/l deverá existir inibição por concentração de substrato.

As percentagens de pureza obtidas para o extracto e para o refinado na ordem dos 70 a 80% podem ser melhoradas uma vez que com sistema usado a quantidade de resina é muito baixa. Nicoud (1995) conseguiu se purezas muito elevadas dobrando o número de colunas e aumentando o volume de resina em cerca de 8 vezes.

Também na separação da mistura dextrano/frutose é necessário aumentar o volume de resina para melhorar a separação obtida (também na ordem dos 70 a 80% de pureza no extracto e no refinado). Neste caso deve-se ainda tomar outra medida; uma vez que o peso molecular do dextrano é elevado e a temperatura de trabalho é baixa (20°C) dever-se-ia usar uma resina com um diâmetro de partícula médio superior ao usado aumentando-se a porosidade do leito e por sua vez a sua permeabilidade a moléculas de peso molecular elevado como os dextranos (Barker et al., 1992).

De modo a que se possa integrar o processo seria interessante produzir o dextrano e a frutose em contínuo usando um sistema em que a bactéria esteja imobilizada. Neste trabalho foram feitas algumas experiências preliminares no estudo do suporte mais adequado. Embora a imobilização seja possível nalguns suportes há aspectos operacionais que não permitem o seu uso em contínuo. Na secção 6.2 apresentam-se algumas sugestões para dar continuidade aos trabalhos iniciados nesta área e apresentados no apêndice E.

6.2 Sugestões para trabalho futuro

A produção de dextranos e frutose por via biológica é muito importante uma vez que se podem usar matérias primas ricas em sacarose com valor comercial muito baixo. No nosso país pode usar-se como fonte de sacarose a alfarroba. O largo campo de aplicação dos dextranos e o desenvolvimento de novos produtos a partir dos dextranos e a produção de xaropes de frutose, são motivo de interesse para que os trabalhos nesta área continuem a ser desenvolvidos.

De modo a que se possa integrar o processo é muito importante conseguir imobilizar a bactéria e produzir os dextranos e a frutose num sistema contínuo. Para atingir esse objectivo sugere-se um estudo aprofundado da superfície do microorganismo uma vez que as propriedades dessa superfície são o factor determinante da capacidade que cada microorganismo tem de aderir em superfícies sólidas. A composição química e o arranjo estrutural da superfície celular são a base das suas propriedades físicas tais como o potencial zeta ou a energia livre superficial (Busscher *et al.*, 1990). Estudos preliminares sobre imobilização da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) e da enzima estão reportados no apêndice E.

Um outro aspecto a ter em conta será o facto de que segundo LaMer e Healy (1963) uma produção excessiva de polímeros pelo microorganismo pode efectivamente dispersar a bactéria em suspensão e impedir a sua adesão em superfícies sólidas. De facto Faurie *et al.* (1996) verificaram que a mobilidade electroforética da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NCDO 523 é duas vezes maior em presença de 10 g/l de dextranos do que sem dextranos podendo este aumento reduzir a adesão da bactéria em superfícies inertes. Este facto mostra mais uma vez a importância de estudar e conhecer as características do microorganismo no seu meio natural.

Outro aspecto importante a estudar será o crescimento celular e a produção de dextranos e frutose num meio de cultura em que a fonte de sacarose seja um xarope previamente preparado a partir de resíduos agro-industriais. No nosso país com uma forte produção de alfarroba, em que se usam as sementes para a produção de espessantes alimentares, pode usar-se a vagem para extrair um caldo rico em sacarose

a ser usado como substrato na fermentação. O estudo da influência da adição ao meio de cultura de extractos de malte (ricos em maltose) conseguidos na indústria cervejeira também será interessante.

Processos alternativos à separação da mistura dextrano/frutose poderão também ser estudados. Um processo de separação que se sugere é a separação por membranas.

Kim e Robyt (1994a e 1994b) prepararam e isolaram um mutante da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). Kitaoaka e Robyt (1998a e 1998b) descobriram que essa mesma estirpe mutada produz grandes quantidades de dextranosacarase. Não foi possível usar este microorganismo neste trabalho pois só produz a enzima em meios glucosados. Seria interessante utilizar diferentes mutagénicos de modo a produzir e isolar uma estirpe produtora de grandes quantidades de enzima mas mantendo a sacarose como fonte de carbono.

Referências bibliográficas

Barker, P.; Ganetsos, G.; Ajongwen, J.; Akyntoye, A.; 1992, "Bioreaction-separation on continuous chromatographic systems", The Chemical Engineering Journal, vol. 50, B23-B28.

Busscher, H. J.; Quirynen, M.; Van Der Mei, H. C.; 1992, "Formation and prevention of dental plaque - A physico-chemical approach", L. F. Melo et al. (eds.), Biofilms - Science and Technology, 327-354.

Faurie, J.; Leveau, J.; Bouix, M.; 1996, "The macromolecular environment and the electrophoretic mobility of microorganisms: example of *Leuconostoc mesenteroides* - dextran concentration and molecular weight increase the electrophoretic mobility.", vol. 10-7, 501-506.

Kim, D.; Robyt, J.; 1994a, "Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases.", Enzyme Microb. Technol., 16, 659-664.

Kim, D.; Robyt, J.; 1994b, "Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextransucrase.", Enzyme Microb. Technol., 16, 1010-1015.

Kitaoka, M.; Robyt, J.; 1998a, "Use of a microtiter plate screening method for obtaining *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucansucrase.", Enzyme Microb. Technol., 22, 527-531.

Kitaoka, M.; Robyt, J.; 1998b, "Large-scale preparation of highly purified dextransucrase from a high producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC.", Enzyme Microb. Technol., 23, 386-391.

LaMer, V. K.; Healy, T. W.; 1963, "Adsorption flocculation of macromolecules at the solid-liquid surface.", Rev. Pure and Appl. Chem., 13, 112-133.

Nicoud, R. M.; 1995, "The simulated moving bed: a powerful chromatographic process.", LC-GC INTL., vol. 5-5, 43-47.

Apêndice A

Fermentações batch: resultados experimentais e modelização cinética.

Sistema de equações proposto para o modelo:

$$X(t) = \frac{X_0 \exp(\mu_m t)}{1 - \frac{X_0}{X_{\max}} (1 - \exp(\mu_m t))} \quad (\text{A.1})$$

$$E(t) = Y_{E/X} X_0 \left(\frac{\exp(\mu_m t)}{1 - \frac{X_0}{X_{\max}} (1 - \exp(\mu_m t))} - 1 \right) \quad (\text{A.2})$$

$$\frac{dF'}{dt} = k' \frac{MF}{MS} E(t) S'(t) \quad (\text{A.3})$$

$$\frac{dD'}{dt} = k' \frac{(MG - MW)}{MS} E(t) S'(t) \quad (\text{A.4})$$

$$-\frac{dS'}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + k' E(t) S'(t) \quad (\text{A.5})$$

Parâmetros a calcular:

X_0

μ_m

$Y_{E/X}$

$Y_{X/S}$

k'

Valores de μ_m , X_0 , $Y_{E/X}$, $Y_{X/S}$, e k' calculados para outras experiências.

Run	T (°C)	pH	Suc. (g/l)	μ_m	X_0 (g/l)	$Y_{E/X}$	$Y_{X/S}$	k'
5	25	5.5	20	1.272	0.00654	16.61	3.41	0.015
31	35	5.5	20	1.423	0.00523	13.95	3.57	0.015
5	25	5.5	20	1.272	0.00654	16.64	3.41	0.015
4	25	6.7	20	0.748	0.09220	7.36	3.35	0.010
1	25	s. c.	20	0.808	0.00723	12.27	2.03	0.011
1	25	s. c.	20	0.808	0.00723	12.27	2.03	0.011
2	30	s. c.	20	1.037	0.00599	10.02	1.15	0.012
6	25	6.7	40	0.877	0.02860	8.13	1.10	0.010
7	25	5.5	40	0.947	0.01880	16.48	1.12	0.010
14	25	6.7	10	0.968	0.12290	3.57	2.65	0.017
4	25	6.7	20	0.748	0.09220	7.36	3.35	0.010
6	25	6.7	40	0.877	0.02860	8.13	1.10	0.010
17	25	6.7	80	0.822	0.02270	3.29	0.33	0.010
31	35	5.5	20	1.423	0.00523	13.95	3.57	0.015
20	35	5.5	80	1.306	0.00764	5.53	0.39	0.013
22	35	5.5	120	1.076	0.01432	7.18	0.27	0.014
15	25	5.5	10	1.181	0.00838	18.37	1.26	0.017
5	25	5.5	20	1.272	0.00654	16.64	3.41	0.015
7	25	5.5	40	0.947	0.01880	16.48	1.12	0.01
19	25	5.5	80	1.073	0.00962	7.14	0.28	0.010

Fermentação #31:

Fermentação realizada no dia 3/9/96 a 35°C, com pH controlado a 5.5 e sacarose inicial de 20g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 20 g dm⁻³

pH: 5.5

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 35° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Resultados experimentais na fermentação #1:

Tempo (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Dextran0 (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0	0.00	19.02	0	0	0
2	0.07	18.26	0.25	0.45	2.71
4	1.34	14.18	2.41	2.97	35.87
5	3.58	9.72	5.46	5.03	60.34
6	4.93	4.12	7.29	7.12	69.46
7	5.43	2.17	8.15	7.96	81.53 ↗
8	5.85	1.98	7.91	8.17	78.95

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

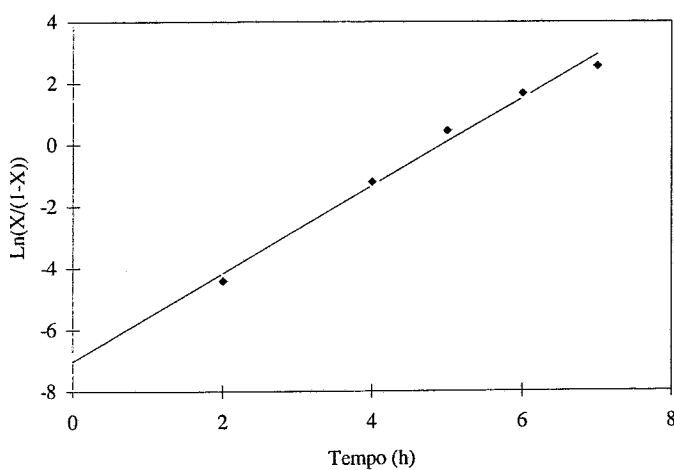
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\ln\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	LN(X/(1-X))
0	0.00	0.000	-
2	0.07	0.012	-4.414
4	1.34	0.229	-1.214
5	3.58	0.612	0.456
6	4.93	0.842	1.679
7	5.43	0.928	2.559
8	5.85	1.000	-

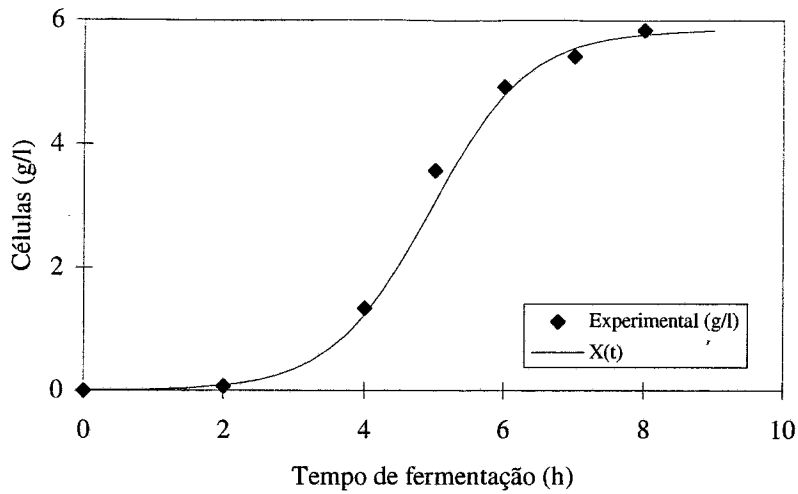
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 1.423 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.00523 \text{ g/l.}$$

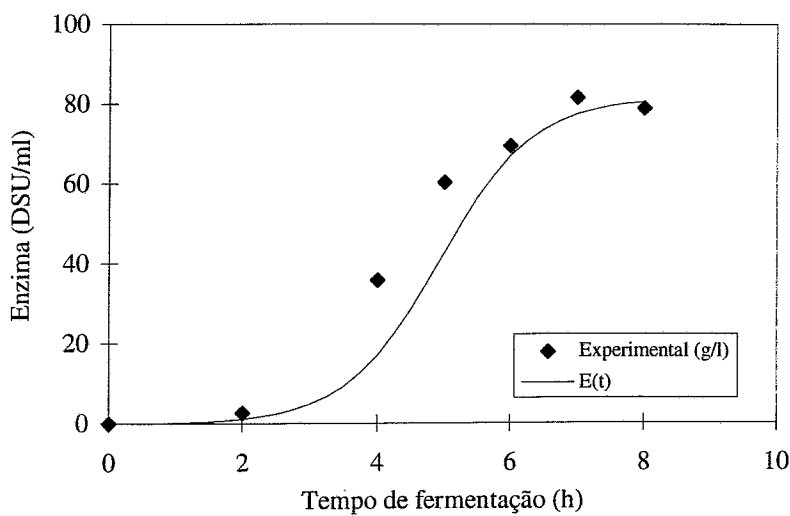
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{8153 - 0}{5.85 - 0} = 13.95 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{5.85}{19.02 - 1.89 \cdot 8.15 - 1.98} = 3.57 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.00523 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 1.423 \text{ h}^{-1}$$

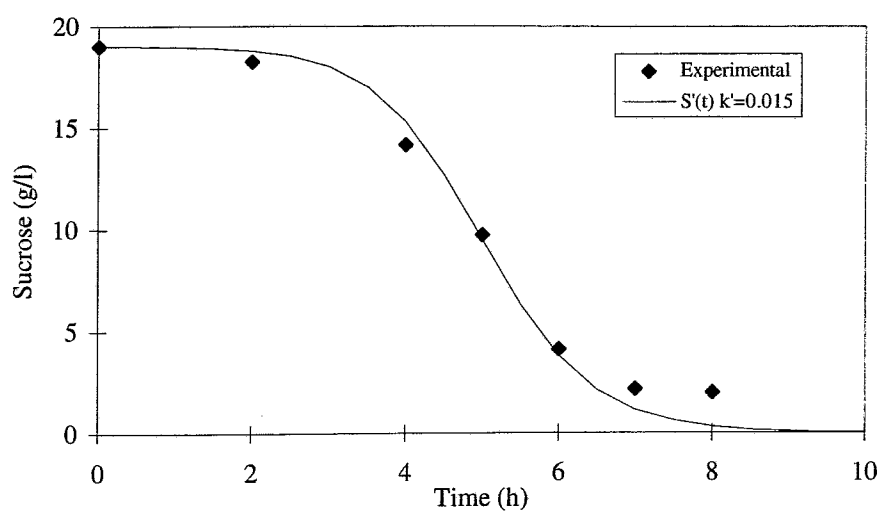
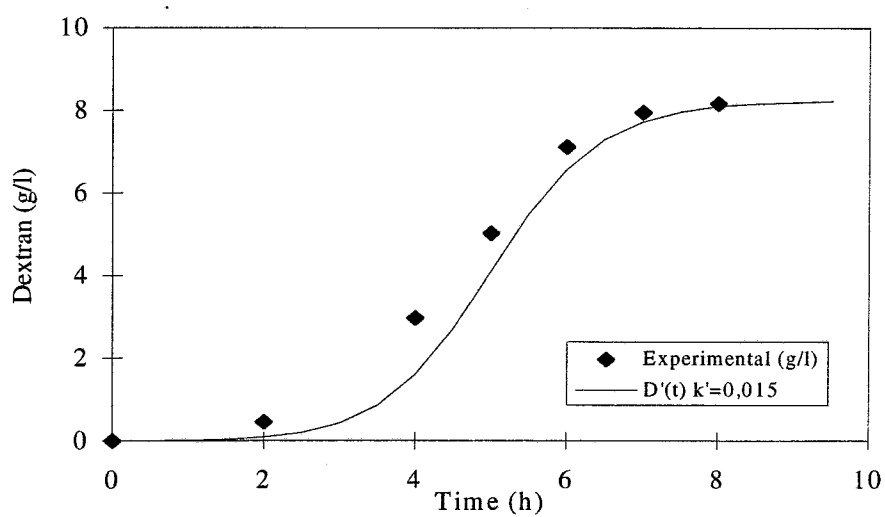
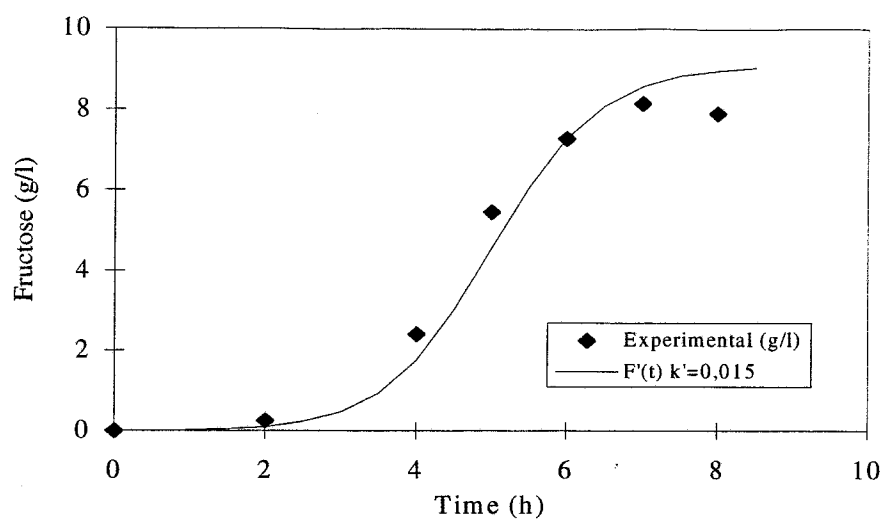
$$Y_{E/X} = 13.95 \text{ DSU/mg células}$$

$$Y_{X/S} = 3.57 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.015 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.



Cálculo do parâmetro k' :

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k' .

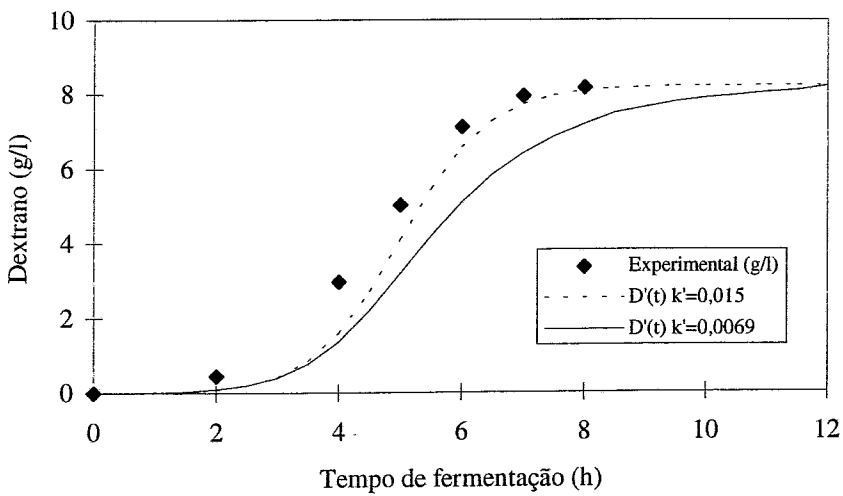
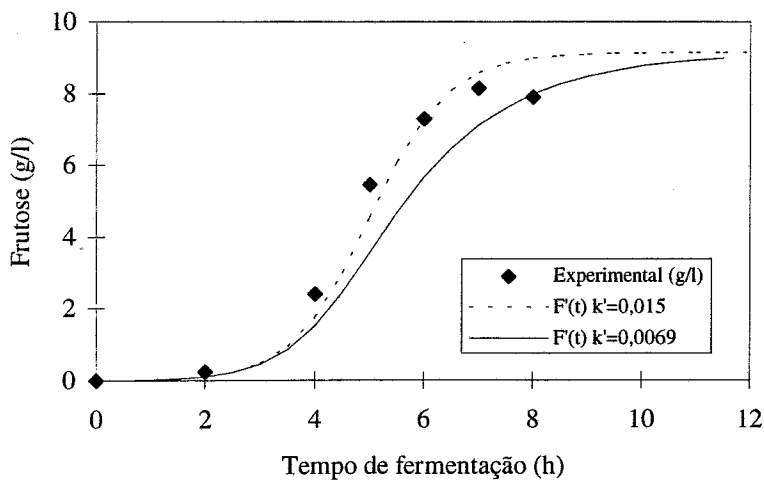
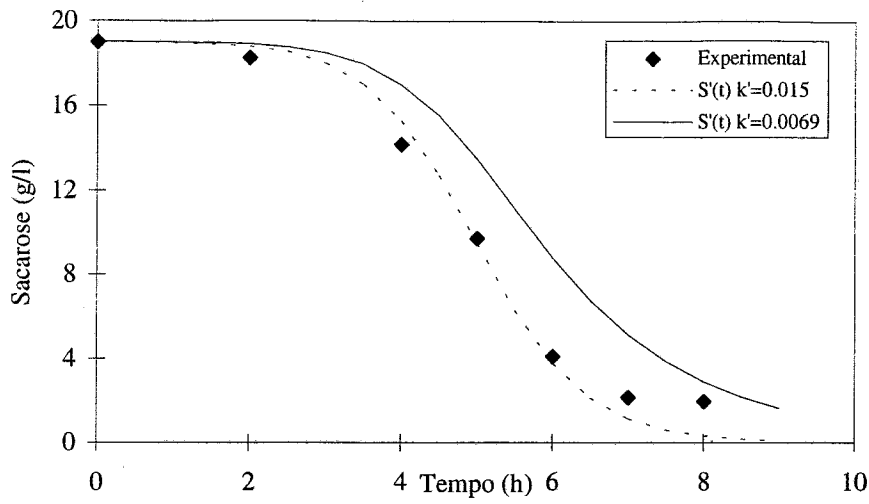
Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0	19.02	0	0
2	18.26	0.25	2.71
4	14.18	2.41	35.87
5	9.72	5.46	60.34
6	4.12	7.29	69.46
7	2.17	8.15	81.53
8	1.98	7.91	78.95

tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt=rF	(0.526*E)/rF
1	18.97		0.3	0.125	1.26
3	17.95	0.0557	10	1.08	4.87
4.5	12.61	0.0793	48.5	3.05	8.36
5.5	6.51	0.1536	65	1.83	18.68
6.5	2.95	0.3390	75	0.86	45.87
7.5	2.05	0.4878			

Foi feito um gráfico representando $(0.526*E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k'=0.0069$. Este valor de k' não dá bons resultados de modelização como se pode observar nas figuras abaixo:



Fermentação #1:

Fermentação realizada no dia 29/1/96 a 25°C, sem controlo de pH e sacarose inicial de 20g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 20 g dm⁻³

pH: Sem controlo

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo		Células	Sacarose	Frutose	Dextrano	Enzima
(h)	pH	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(DSU/ml)
0,00	7,22	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00
1,00	7,20	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00
2,00	7,19	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00
3,00	7,16	0,00	17,66	0,00	0,00	0,52
4,00	7,11	0,12	16,49	0,00	0,00	0,71
5,00	7,01	0,43	-	0,00	0,00	1,76
6,00	6,87	0,93	15,60	0,83	0,00	3,35
7,00	6,70	1,74	-	1,81	-	11,70
8,00	6,49	2,45	9,53	2,79	0,93	22,00
9,00	6,28	3,84	5,49	4,66	2,13	34,90
10,00	5,96	4,34	3,58	7,12	4,04	50,00
11,00	5,37	4,72	2,69	8,09	4,92	63,00
11,75	5,09	5,21	2,29	7,48	5,39	67,00
13,75	4,92	5,46	2,02	7,10	6,46	65,00

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

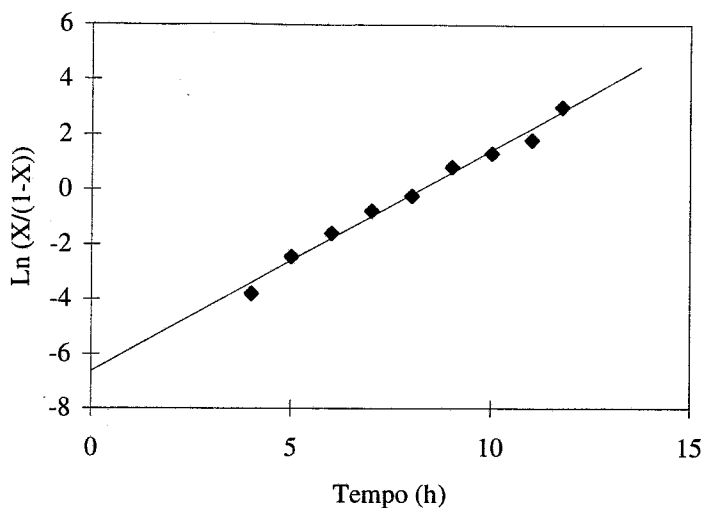
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\ln\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com} \quad \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	LN(X/(1-X))
0,00	0,00	0,00	
1,00	0,00	0,00	
2,00	0,00	0,00	
3,00	0,00	0,00	
4,00	0,12	0,02	-3,78
5,00	0,43	0,08	-2,45
6,00	0,93	0,17	-1,58
7,00	1,74	0,32	-0,76
8,00	2,45	0,45	-0,20
9,00	3,84	0,70	0,87
10,00	4,34	0,80	1,36
11,00	4,72	0,86	1,84
11,75	5,21	0,95	3,04
13,75	5,46	1,00	

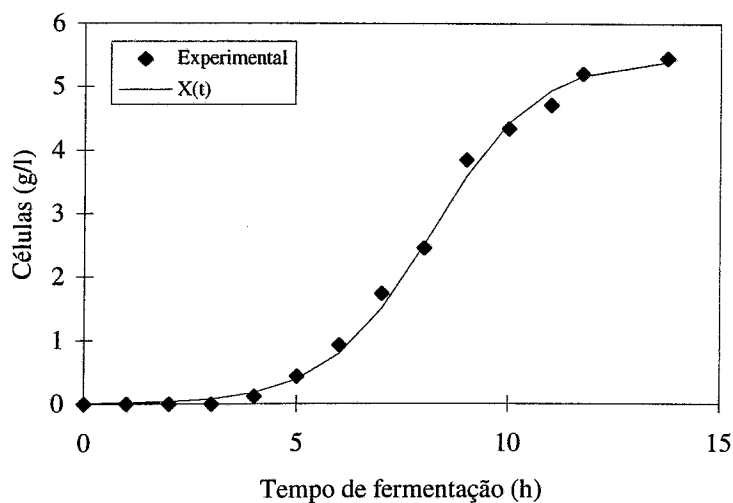
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 0.808 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.00723 \text{ g/l.}$$

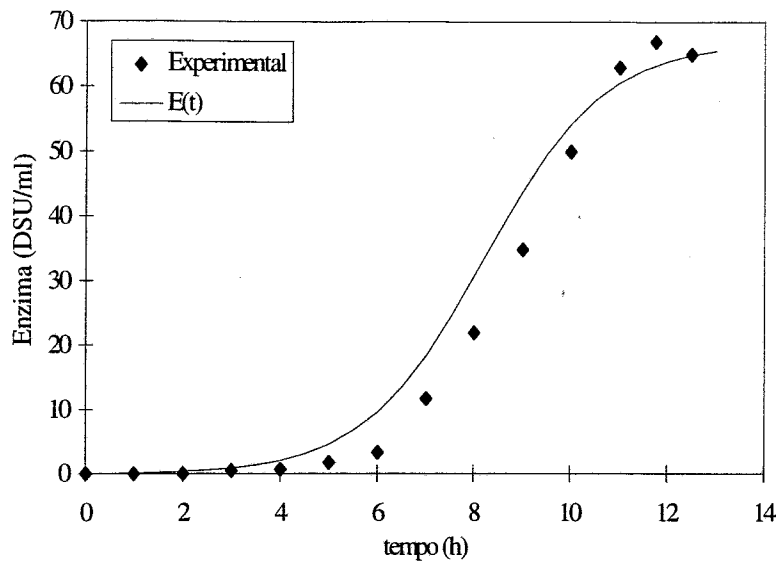
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{67.00 - 0}{5.46 - 0} = 12.27 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{5.46}{20.00 - 1.89 * 8.09 - 2.02} = 2.03 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.00723 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 0.808 \text{ h}^{-1}$$

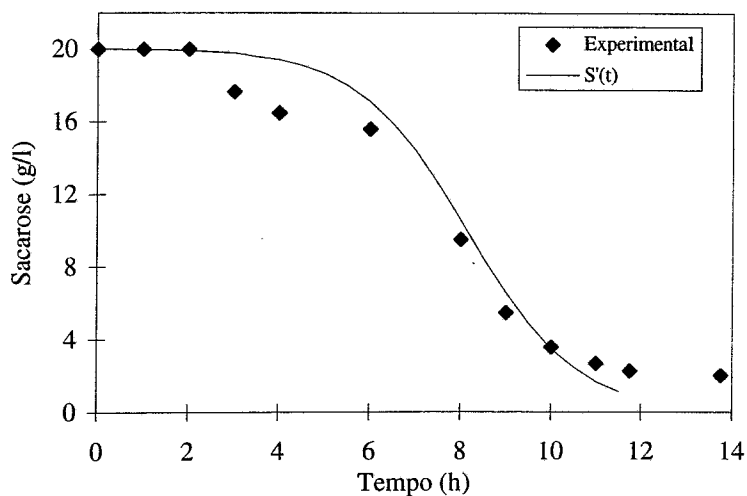
$$Y_{E/X} = 12.27 \text{ DSU/mg células}$$

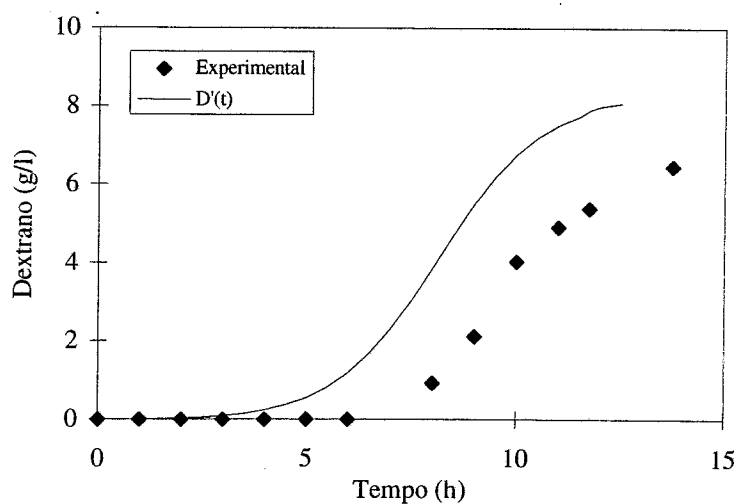
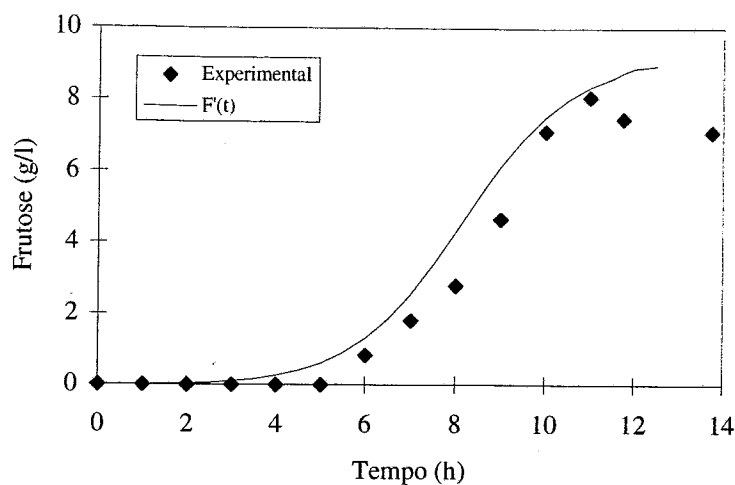
$$Y_{X/S} = 2.03 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.011 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





O desvio na curva de dextrano e de frutose pode ser explicado pelo facto de as amostras terem sido previamente filtradas com um filtro de 0.2 μm . O processo de filtração da amostra apresentou resistência o que pode indicar a retenção de dextrano e frutose no filtro.

Não esquecer que o passo de centrifugação de biomassa da amostra pode sempre arrastar um pouco de dextrano e frutose para a pellet.

Cálculo do parâmetro k' :

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k' .

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0	20.00	0.00	0.00
1	20.00	0.00	0.00
2	20.00	0.00	0.00
3	17.66	0.00	0.52
4	16.49	0.00	0.71
5	16.04	0.00	1.76
6	15.60	0.83	3.35
7	12.57	1.81	11.70
8	9.53	2.79	22.00
9	5.49	4.66	34.90
10	3.58	7.12	50.00
11	2.69	8.08	63.00
11.75	2.29	7.48	67.00
13.75	2.02	7.10	65.00

Tempo'	Sacarose(t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
0.50	20.00	0.05	0.00	0.00	
1.50	20.00	0.05	0.00	0.00	
2.50	18.83	0.05	0.26	0.00	
3.50	17.08	0.06	0.62	0.00	
4.50	16.27	0.06	1.24	0.00	
5.50	15.82	0.06	2.56	0.83	1.62
6.50	14.08	0.07	7.53	0.98	4.03
7.50	11.05	0.09	16.85	0.98	9.03
8.50	7.51	0.13	28.45	1.87	8.00
9.50	4.54	0.22	42.45	2.46	9.09
10.50	3.14	0.32	56.50	0.97	30.77
11.38	2.49	0.40	65.00		
12.75	2.16	0.46	66.00		

Foi feito um gráfico representando $(0.526 \cdot E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k' = 0.011$.

Fermentação #2:

Fermentação realizada no dia 5/2/96 a 30°C, sem controle de pH e sacarose inicial de 20g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 20 g dm⁻³

pH: Sem controle

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 30° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo		Células	Sacarose	Frutose	Dextrano	Enzima
(h)	pH	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(DSU/ml)
0.00	7.26	0.00	20.00	0.00	0.00	0.00
1.00	7.22	0.00	20.00	0.00	0.00	0.00
2.00	7.19	0.00	19.26	0.00	0.00	0.00
3.00	7.13	0.00	18.03	0.00	0.00	0.00
4.00	7.04	0.28	18.50	0.00	0.00	0.23
5.00	6.79	1.05	14.76	0.84	0.62	6.98
6.00	6.49	2.17	11.65	1.49	0.91	18.03
7.00	6.10	3.72	5.61	3.56	1.86	24.97
8.00	5.54	4.34	2.01	6.53	4.11	42.01
9.00	4.96	5.71	1.99	7.01	4.70	43.08
10.00	4.85	5.33	1.79	6.00	5.98	57.21
11.00	4.81	5.21	1.79	5.87	5.99	48.97
13.75	4.79	-	-	-	-	-

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

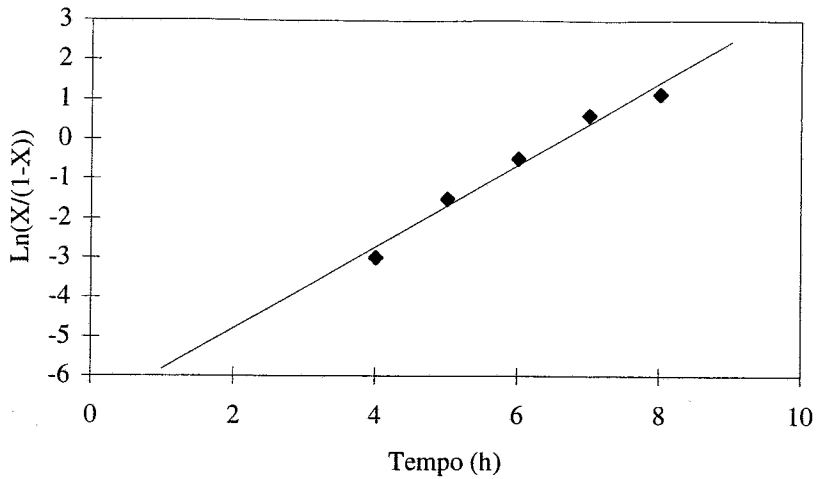
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\text{Ln}\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \text{Ln}\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	LN(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
1.00	0.00	0.00	
2.00	0.00	0.00	
3.00	0.00	0.00	
4.00	0.28	0.05	-2.98
5.00	1.05	0.18	-1.49
6.00	2.17	0.38	-0.49
7.00	3.72	0.65	0.63
8.00	4.34	0.76	1.15
9.00	5.71	1.00	

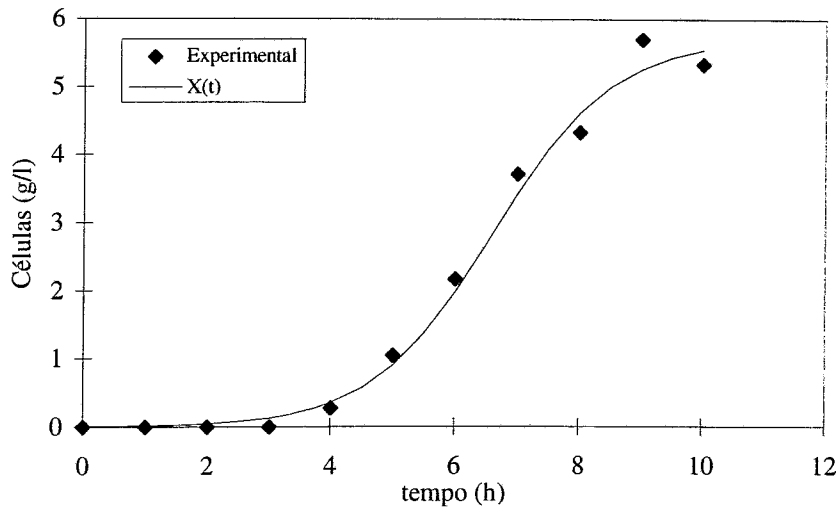
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 1.037 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.00599 \text{ g/l.}$$

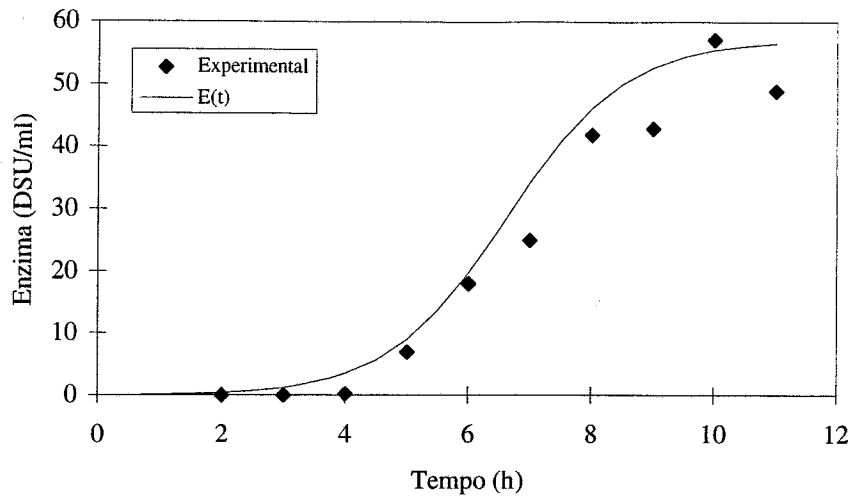
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{57.21 - 0}{5.71 - 0} = 10.02 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{d S'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{5.71}{20.00 - 1.89 * 7.01 - 1.79} = 1.15 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.00599 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 1.037 \text{ h}^{-1}$$

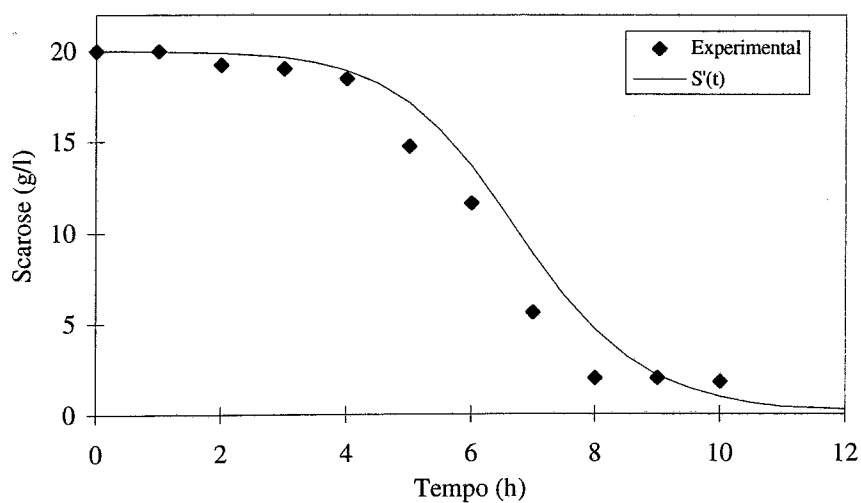
$$Y_{E/X} = 10.02 \text{ DSU/mg células}$$

$$Y_{X/S} = 1.15 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.012 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.



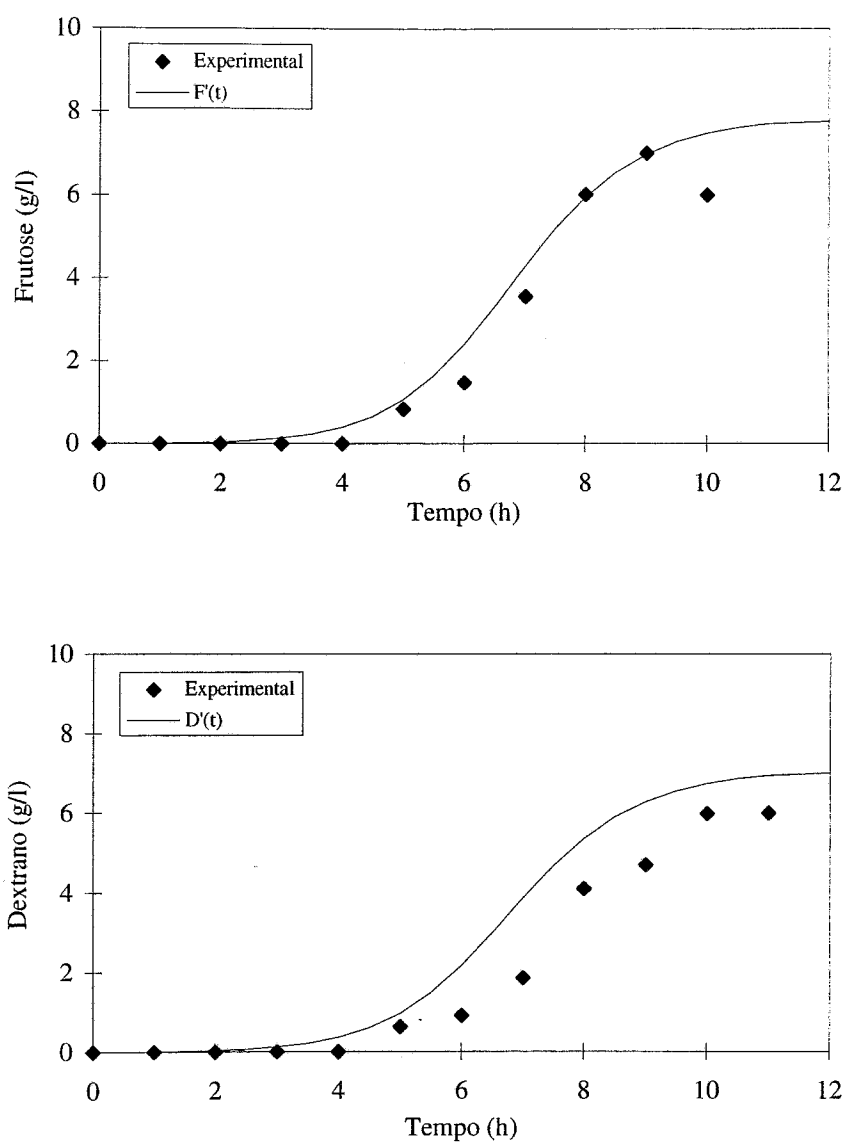


Figura 5 - Produção de dextrano: resultados experimentais comparados com o modelo.

A justificação nos desvios das curvas de dextrano e de frutose é a mesma que na fermentação #1.

Cálculo do parâmetro k' :

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k' .

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo de ferm.(h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	20.00	0.00	0.00
1.00	20.00	0.00	0.00
2.00	19.26	0.00	0.00
3.00	19.03	0.00	0.00
4.00	18.50		0.23
5.00	14.76	0.84	7.01
6.00	11.65	1.49	18.11
7.00	5.61	3.56	25.05
8.00	2.01	6.53	42.00
9.00	1.99	7.01	43.02
10.00	1.79	6.00	57.21

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
0.50	20.00	0.05	0.00	0.00	
1.50	19.63	0.05	0.00	0.00	
2.50	19.14	0.05	0.00	0.00	
3.50	18.77	0.05	0.12	0.00	
4.50	16.63	0.06	3.62	0.84	2.27
5.50	13.21	0.08	12.56	0.65	10.22
6.50	8.63	0.12	21.58	2.07	5.48
7.50	3.81	0.26	33.53	2.97	5.93
8.50	2.00	0.50	42.51	0.48	46.46
9.50	1.89	0.53	50.12		

Foi feito um gráfico representando $(0.526 \cdot E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k' = 0.011$.

Fermentação #4:

Fermentação realizada no dia 23/4/96 a 25°C, com pH controlado a 6.7 e sacarose inicial de 20g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 20 g dm⁻³

pH: Controlo a 6.7

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo		Células	Sacarose	Frutose	Dextrano	Enzima
(h)	pH	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(DSU/ml)
0,00	6,70	0,00	17,48	0,00	0,00	0,00
1,50	6,70	0,31	16,50	0,00	0,00	2,34
3,00	6,70	0,77	15,71	0,26	0,23	5,67
4,00	6,70	1,36	14,96	0,73	0,42	10,03
5,00	6,70	2,29	13,37	1,66	0,89	13,17
6,00	6,70	4,34	9,55	3,08	1,65	25,86
7,00	6,70	5,73	6,76	4,82	3,52	31,00
8,00	6,70	6,20	4,27	6,12	5,13	45,00
9,00	6,70	6,98	2,60	7,01	5,92	53,00
10,00	6,70	7,44	1,93	6,42	6,71	57,02
11,00	6,70	7,75	1,93	6,16	6,71	52,00
12,00	6,70	7,44	1,92	-	-	-

Cálculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

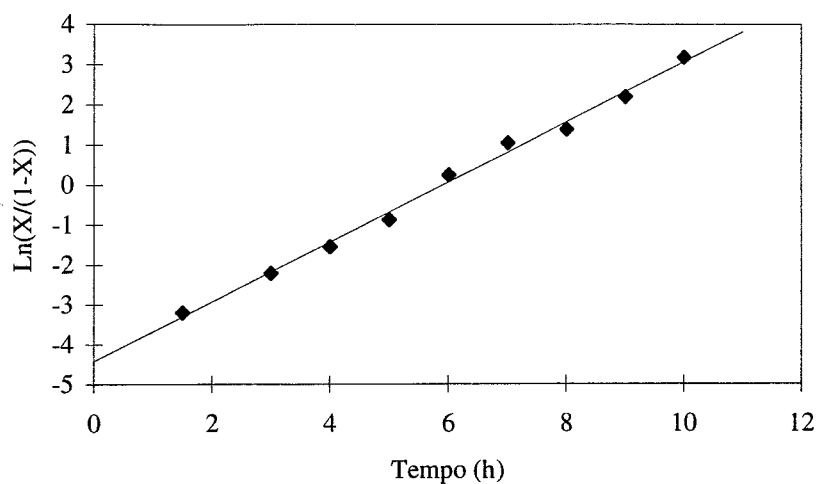
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\ln\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
1:50	0.31	0.04	-3.19
3.00	0.77	0.10	-2.20
4.00	1.36	0.18	-1.54
5.00	2.30	0.30	-0.87
6.00	4.34	0.56	0.24
7.00	5.73	0.74	1.04
8.00	6.20	0.80	1.38
9.00	6.98	0.90	2.19
10.00	7.44	0.96	3.18
11.00	7.75	1.00	

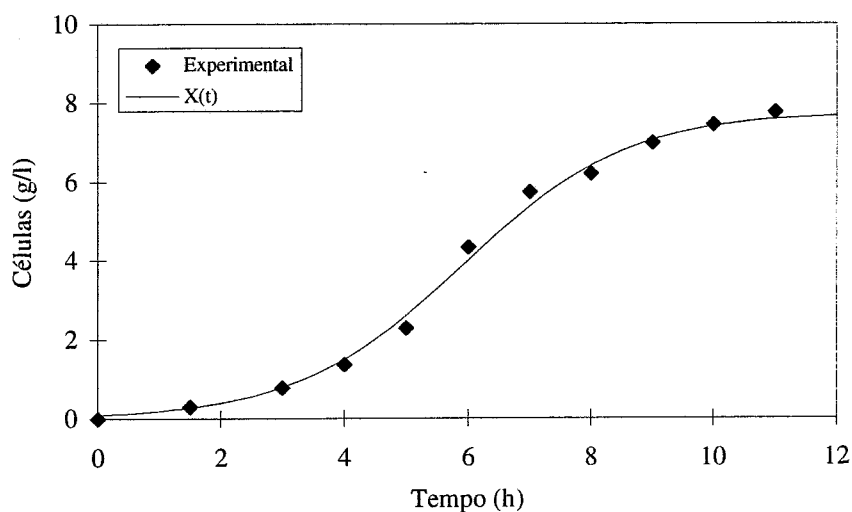
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 0.748 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.0922 \text{ g/l.}$$

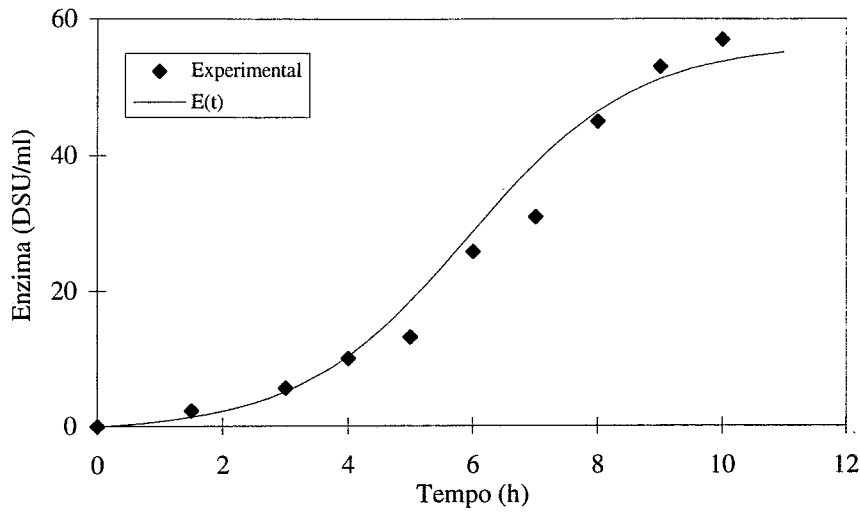
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{57.02 - 0}{7.75 - 0} = 7.36 \frac{\text{DSU}}{\text{mg cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{7.75}{17.48 - 1.89 * 7.01 - 1.92} = 3.35 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.0922 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 0.748 \text{ h}^{-1}$$

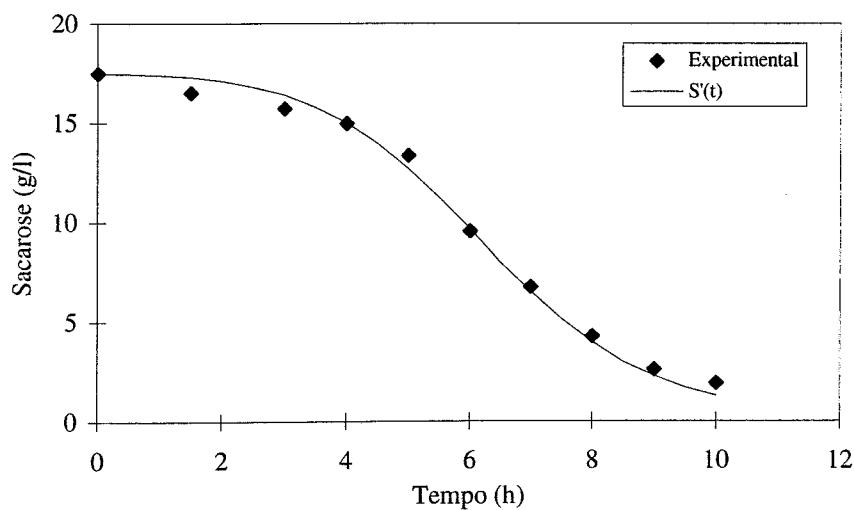
$$Y_{E/X} = 7.36 \text{ DSU/mg células}$$

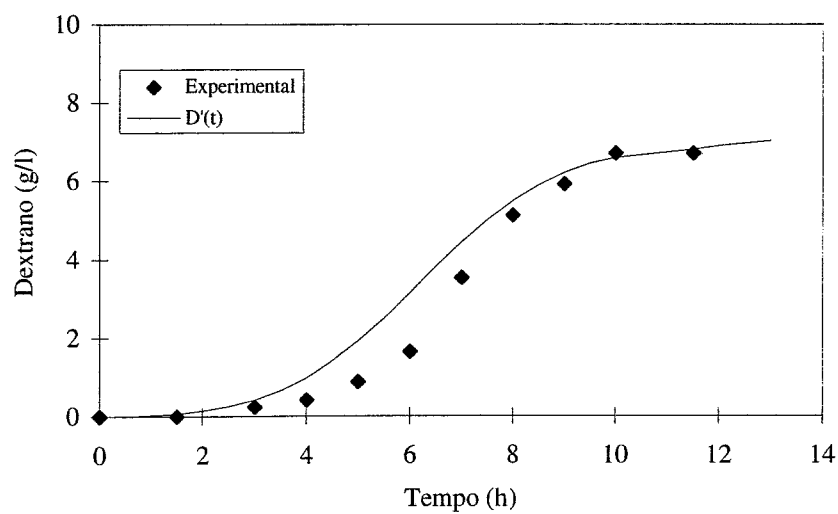
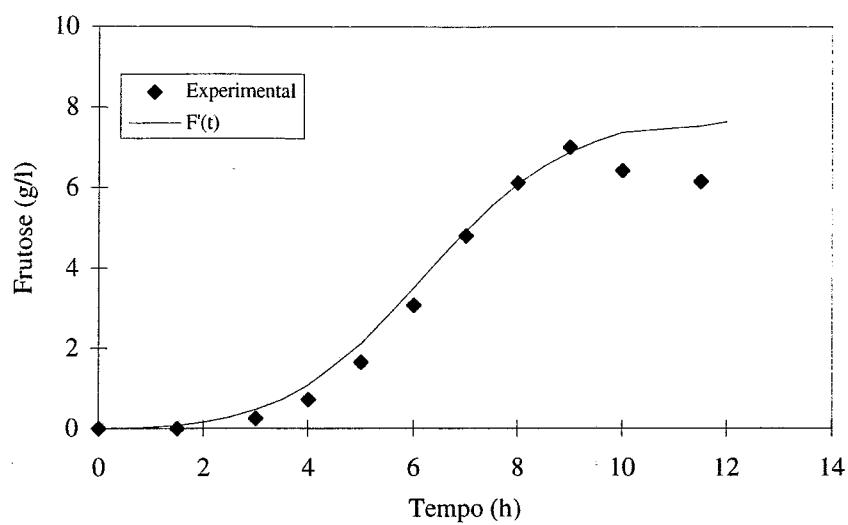
$$Y_{X/S} = 3.35 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.010 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k':

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k'.

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	17.48	0.00	0.00
1.50	16.50	0.00	2.34
3.00	15.71	0.26	5.67
4.00	14.96	0.73	10.03
5.00	13.37	1.66	13.17
6.00	9.55	3.08	25.86
7.00	6.76	4.82	31.00
8.00	4.27	6.12	45.00
9.00	2.60	7.01	53.00
10.00	1.93	6.42	57.02
11.00	1.93	6.16	52.00

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
0.75	16.99	0.06	1.17	0.00	
2.25	16.10	0.06	4.01	0.17	
3.50	15.33	0.07	7.85	0.47	8.73
4.50	14.17	0.07	11.60	0.92	6.60
5.50	11.46	0.09	19.52	1.42	7.21
6.50	8.15	0.12	28.43	1.74	8.61
7.50	5.51	0.18	38.00	1.31	15.28
8.50	3.43	0.29	49.00	0.89	28.94
9.50	2.26	0.44	55.01		
10.50	1.93	0.52	54.51		
11.50	1.92	0.52			

Foi feito um gráfico representando $(0.526*E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k'=0.0104$.

Fermentação #5:

Fermentação realizada no dia 26/4/96 a 25°C, com pH controlado a 5.5 e sacarose inicial de 20g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 20 g dm⁻³

pH: Controlo a 5.5

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo		Células	Sacarose	Frutose	Dextrano	Enzima
(h)	pH	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(DSU/ml)
0,00	5,5	0,00	18,77	0,00	0,00	0,00
1,50	5,5	0,03	18,00	0,04	0,00	1,56
3,00	5,5	0,49	16,37	0,88	0,75	10,00
4,00	5,5	1,05	14,90	1,30	1,40	39,00
5,00	5,5	2,02	11,43	3,19	2,57	55,75
6,00	5,5	3,40	5,30	7,42	5,51	62,47
7,00	5,5	4,65	2,25	8,10	6,26	83,00
8,00	5,5	5,11	2,24	7,65	7,43	85,04
9,00	5,5	5,12	1,96	7,07	7,74	66,04

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

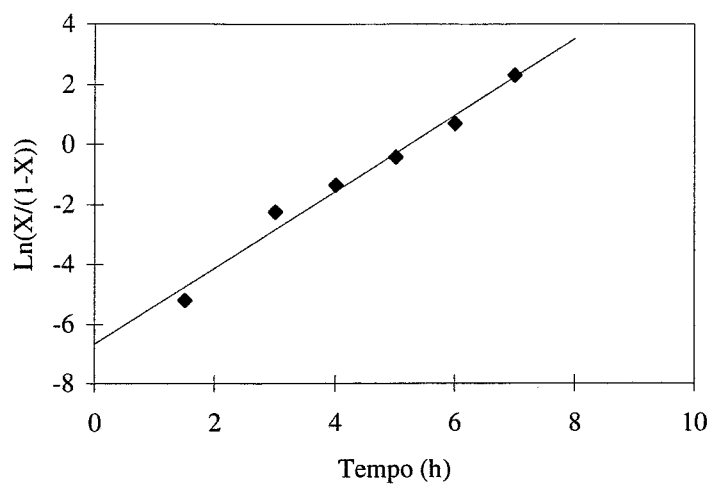
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\ln\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0	0	0	
1.5	0.02788	0.005454	-5.20601
3	0.49408	0.096647	-2.23505
4	1.05352	0.20608	-1.34872
5	2.017	0.394546	-0.42824
6	3.4028	0.665623	0.688456
7	4.646	0.908806	2.299147
8	5.1122	1	

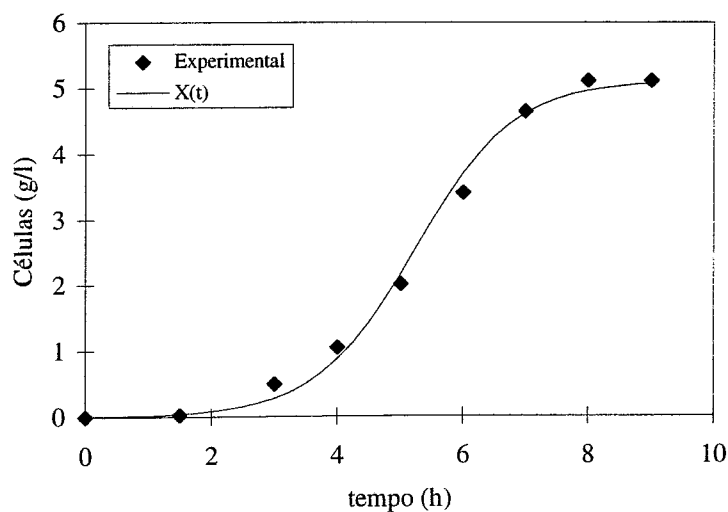
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$\mu_m = 1.272 \text{ h}^{-1}$ e $X_0 = 0.00654 \text{ g/l}$.

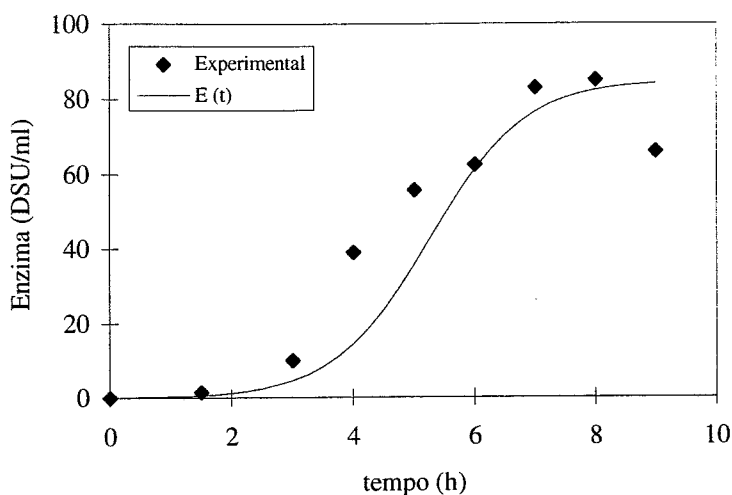
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{85.04 - 0}{5.12 - 0} = 16.61 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva E(t) (equação 2) em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{5,12}{18,77 - 1,89 * 8,10 - 1,96} = 3,41 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.00654 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 1.272 \text{ h}^{-1}$$

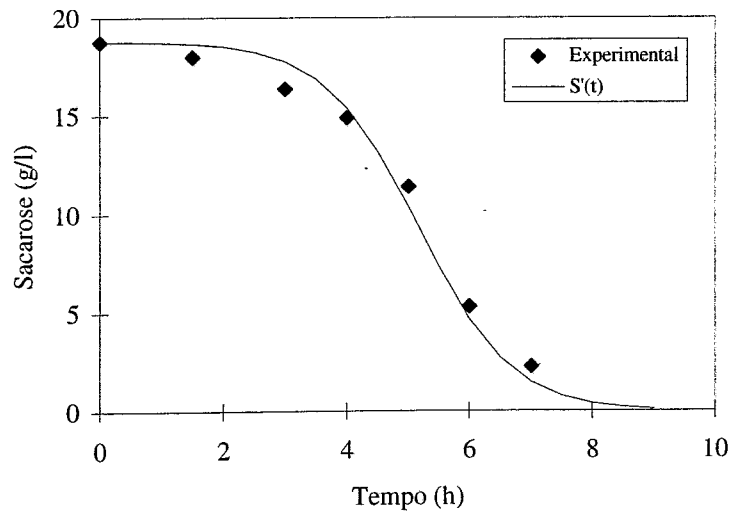
$$Y_{E/X} = 16.61 \text{ DSU/mg células}$$

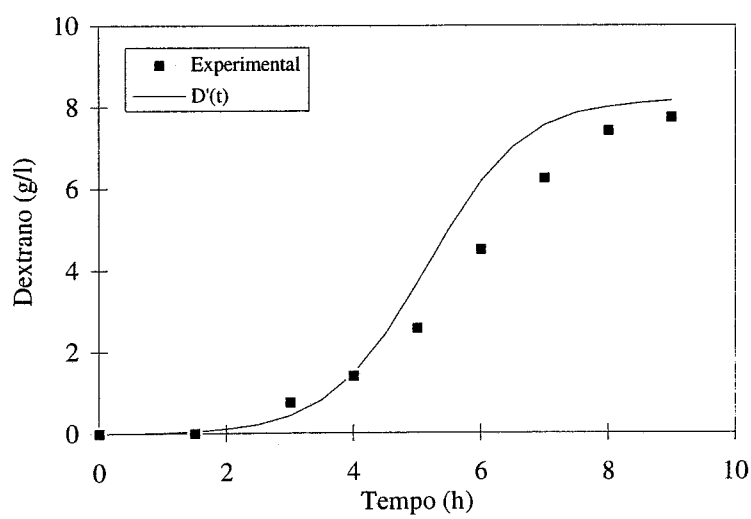
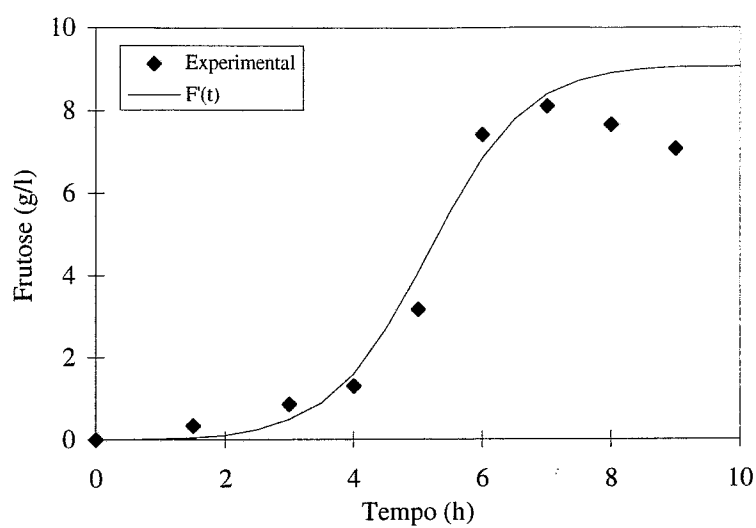
$$Y_{X/S} = 3.41 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.015 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k' :

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k' .

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	18.77	0.00	0.00
1.50	18.00	0.34	1.56
3.00	16.37	0.87	6.50
4.00	14.90	1.30	39.00
5.00	11.43	3.19	55.75
6.00	5.30	7.42	62.47
7.00	2.25	8.10	83.00
8.00	2.24	7.65	85.04
9.00	1.96	7.07	66.04

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima(t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
0.75	18.38	0.05	0.78	0.23	1.80
2.25	17.18	0.06	4.03	0.35	6.00
3.50	15.63	0.06	22.75	0.43	27.56
4.50	13.16	0.08	47.37	1.88	13.25
5.50	8.37	0.12	59.11	4.23	7.34
6.50	3.78	0.26	72.73		
7.50	2.24	0.45	84.02		
8.50	2.10	0.48	75.54		
4.50	0.98	1.02			

Foi feito um gráfico representando $(0.526*E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k'=0.018$.

Fermentação #6:

Fermentação realizada no dia 30/4/96 a 25°C, com pH controlado a 6.7 e sacarose inicial de 40g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 40 g dm⁻³

pH: Controlo a 6.7

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Dextrano (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	0.00	36.21	0.00	0.00	0.00
1.50	0.06	33.37	0.00	0.00	1.12
3.00	0.49	29.98	0.00	0.00	10.75
4.00	1.12	27.20	0.91	0.46	31.84
5.00	2.08	24.49	2.07	1.52	68.19
6.00	4.02	19.28	4.38	4.11	76.11
7.00	5.73	14.07	7.29	6.44	71.78
8.00	7.13	8.47	9.51	8.41	76.91
9.00	8.06	5.17	11.85	9.81	69.88
10.00	9.46	1.60	13.77	11.91	48.52
11.00	9.46	-	-	-	-

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

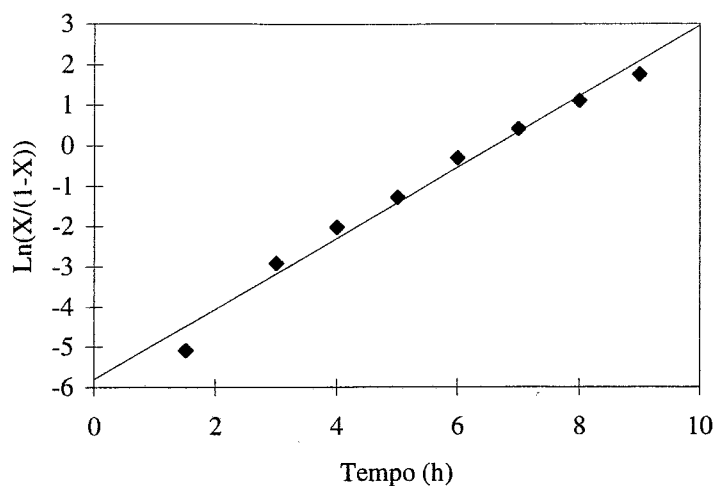
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\text{Ln}\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \text{Ln}\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
1.50	0.06	0.01	-5.07
3.00	0.49	0.05	-2.90
4.00	1.12	0.12	-2.01
5.00	2.08	0.22	-1.27
6.00	4.02	0.43	-0.30
7.00	5.73	0.61	0.43
8.00	7.13	0.75	1.12
9.00	8.06	0.85	1.75
10.00	9.46	1.00	

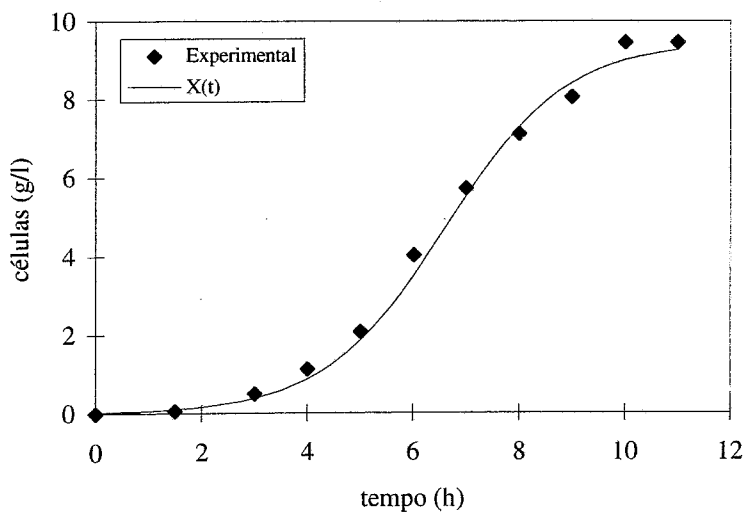
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 0.877 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.0286 \text{ g/l.}$$

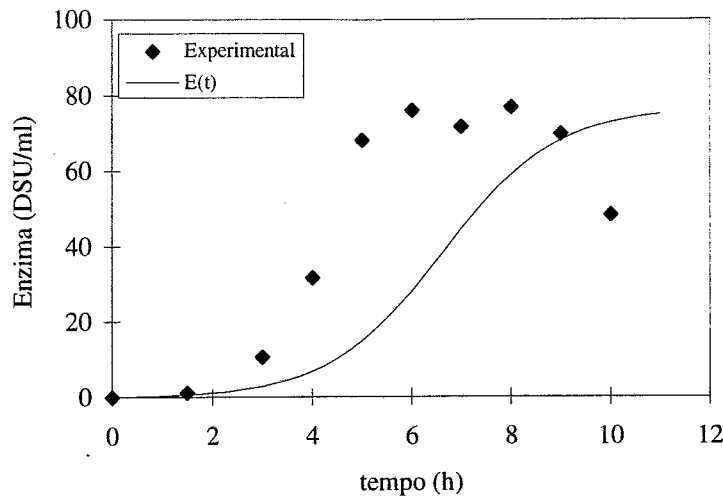
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{76.91 - 0}{9.46 - 0} = 8.13 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Nesta experiência devido à alta concentração de sacarose houve grande dificuldade na centrifugação da biomassa. Os desvios na curva da enzima devem-se ao facto de que a amostra usada para efectuar o teste à actividade da mesma estavam ainda contaminados com biomassa falseando os resultados relativos à quantidade de sacarose consumida no teste por excesso o que implica o falseamento da actividade da enzima também por excesso.

Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{9.46}{36.21 - 1.89 \cdot 13.77 - 1.60} = 1.10 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.0286 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 0.877 \text{ h}^{-1}$$

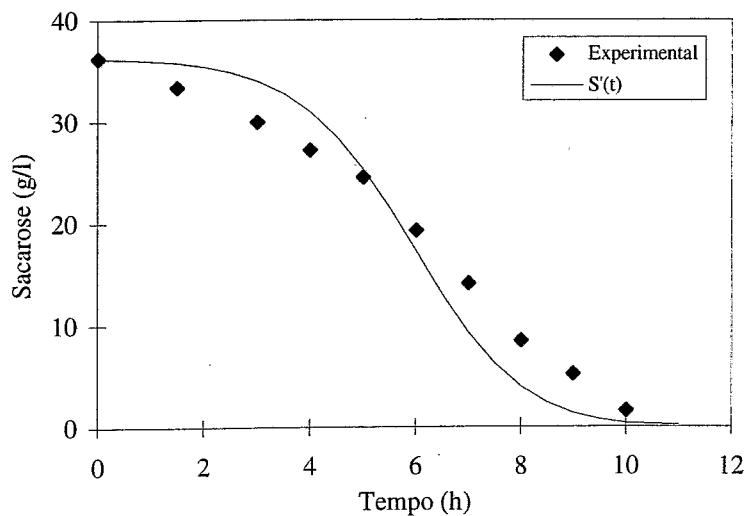
$$Y_{E/X} = 8.13 \text{ DSU/mg células}$$

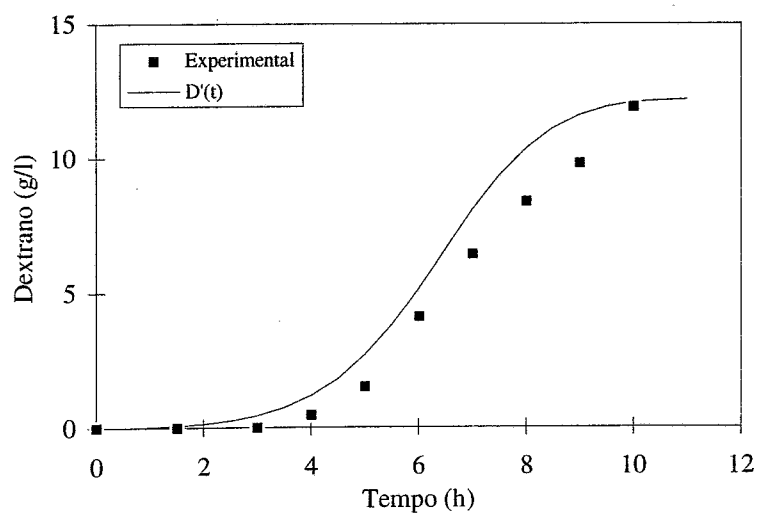
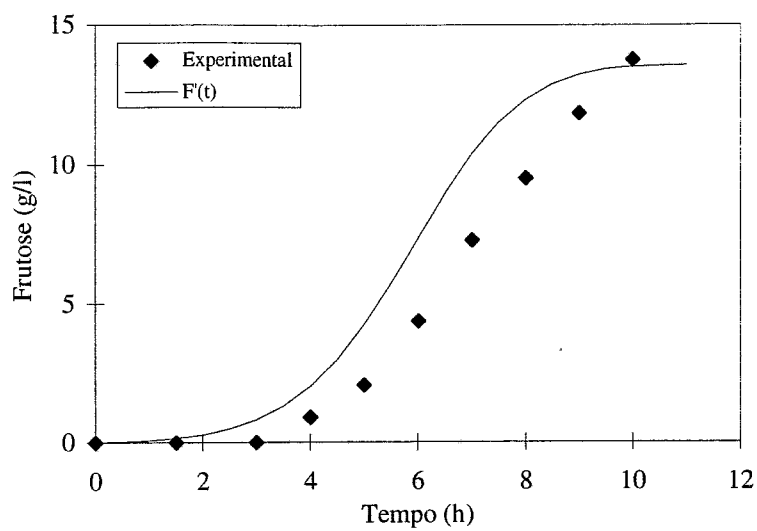
$$Y_{X/S} = 1.10 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.010 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k' :

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k' .

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacaros e (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima* (DSU/ml)
0.00	36.21	0.00	0.00
1.50	33.37	0.00	0.63
3.00	29.98	0.00	2.87
4.00	27.20	0.91	6.83
5.00	24.49	2.07	14.8
6.00	19.28	4.38	28.14
7.00	14.07	7.29	44.7
8.00	8.47	9.51	59.1
9.00	5.17	11.85	68.23
10.00	1.60	13.77	72.92

*Os valores de enzima são os resultados do modelo $E(t)$

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
0.75	34.79	0.03	0.315	0.00	
2.25	31.67	0.03	1.75	0.00	
3.50	28.59	0.03	4.85	0.91	2.79
4.50	25.85	0.04	10.815	1.15	4.93
5.50	21.89	0.05	21.47	2.31	4.89
6.50	16.68	0.06	36.42	2.91	6.58
7.50	11.27	0.09	51.9	2.22	12.29
8.50	6.82	0.15	63.66	2.33	14.35
9.50	3.38	0.30			

Foi feito um gráfico representando $(0.526*E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k'=0.01$.

Fermentação #7:

Fermentação realizada no dia 3/5/96 a 25°C, com pH controlado a 5.5 e sacarose inicial de 40g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 40 g dm⁻³

pH: Controlo a 5.5

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Dextrano (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	0.00	36.21	0.00	0.00	0.00
1.50	0.00	32.74	0.00	0.00	6.19
3.00	0.31	30.33	0.45	0.28	13.78
4.50	1.08	27.22	1.14	0.93	49.22
5.50	2.20	24.45	3.04	2.19	80.54
6.50	4.02	16.68	7.05	4.76	89.98
7.50	4.96	12.60	9.50	7.85	107.30
8.50	6.20	0.60	15.09	11.68	97.43
9.50	6.51	0.60	15.78	12.51	92.79
10.50	6.20	0.60	14.04	13.53	-

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

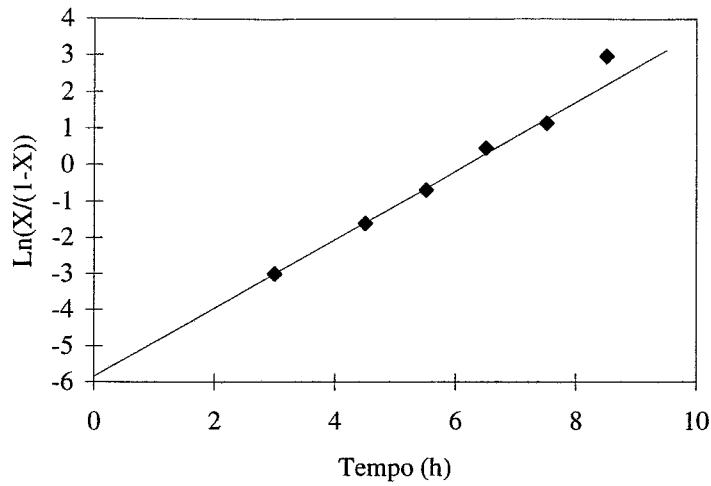
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\ln\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com} \quad \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
1.50	0.00	0.00	
3.00	0.31	0.05	-3.00
4.50	1.08	0.17	-1.61
5.50	2.20	0.34	-0.67
6.50	4.02	0.62	0.48
7.50	4.96	0.76	1.16
8.50	6.20	0.95	2.99
9.50	6.51	1.00	

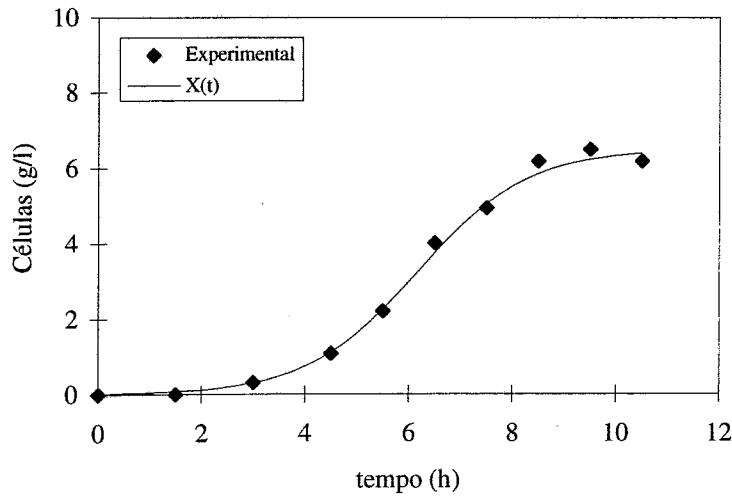
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 0.947 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.0188 \text{ g/l.}$$

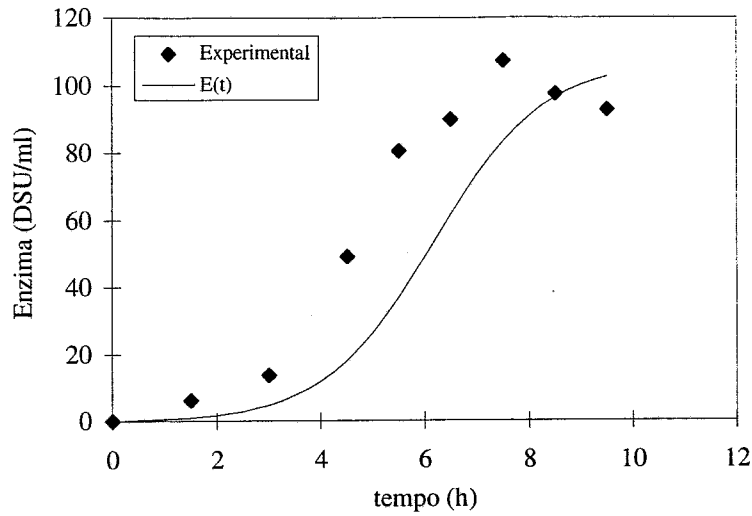
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{107.3 - 0}{6.51 - 0} = 16.48 \frac{\text{DSU}}{\text{mg cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Nesta experiência repete-se o mesmo erro que na experiência anterior (fermentação #6).

Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{x/s} = \frac{6.51}{36.21 - 1.89 * 15.78 - 0.6} = 1.12 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.0188 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 0.947 \text{ h}^{-1}$$

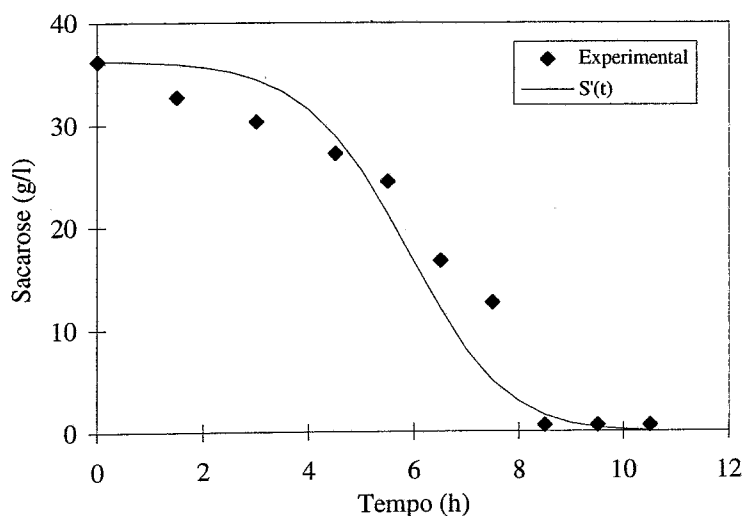
$$Y_{E/X} = 16.48 \text{ DSU/mg células}$$

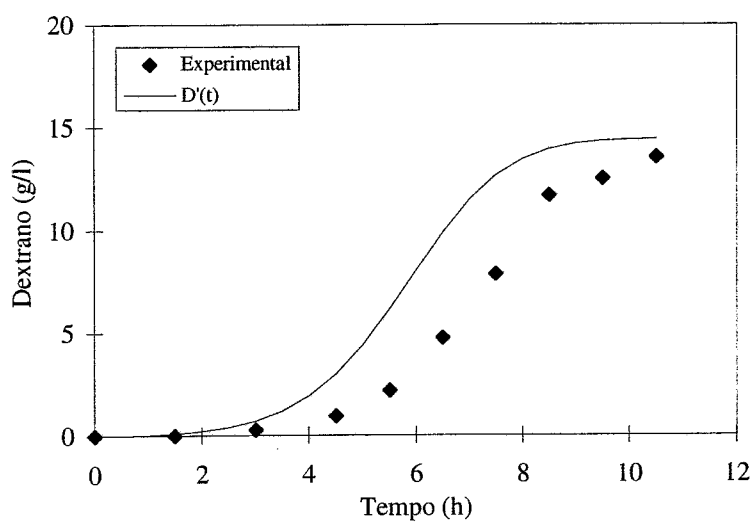
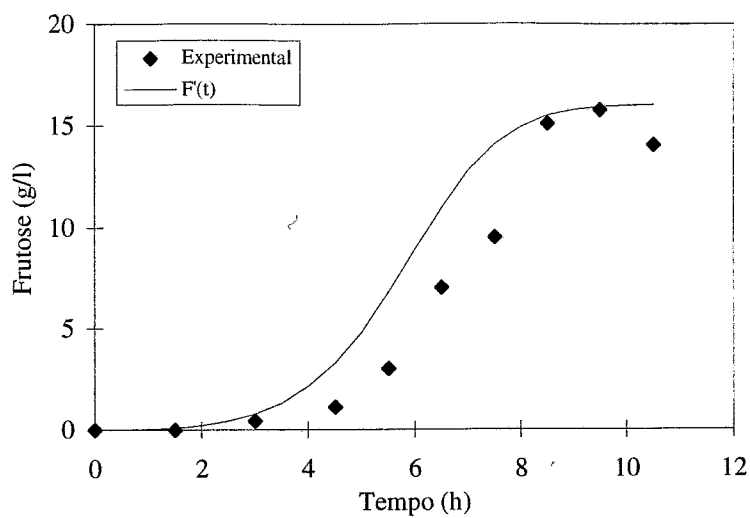
$$Y_{X/S} = 1.12 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.010 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k':

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k'.

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima* (DSU/ml)
0.00	36.21	0.00	0.00
1.50	32.74	0.00	0.96
3.00	30.33	0.45	4.77
4.50	27.22	1.14	18.00
5.50	24.45	3.04	36.88
6.50	16.68	7.05	61.68
7.50	12.60	9.50	83.29
8.50	0.60	15.09	96.35
9.50	0.60	15.78	102.60
10.50	0.60	14.04	105.23

*Os valores de enzima são os resultados do modelo E(t)

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
0.75	34.47	0.029	0.48		
2.25	31.53	0.032	2.87	0.30	5.07
3.75	28.78	0.035	11.39	0.46	13.03
5.00	25.84	0.039	27.44	1.90	7.59
6.00	20.56	0.049	49.28	4.01	6.47
7.00	14.64	0.068	72.49	2.45	15.54
8.00	6.60	0.152	89.82	5.59	8.45
9.00	0.60	1.669	99.48	0.69	75.54
10.00	0.60	1.669	103.92		

Foi feito um gráfico representando $(0.526*E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k'=0.024$.

Fermentação #14:

Fermentação realizada no dia 30/5/96 a 25°C, com pH controlado a 6.7 e sacarose inicial de 10g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 10 g dm⁻³

pH: Controlo a 6.7

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo	Células	Sacarose	Frutose	Dextrano	Enzima
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(DSU/ml)
0.00	0.00	7.25	0.00	0.00	0.00
2.00	0.71	6.82	0.04	0.00	2.05
4.00	1.18	4.89	0.64	0.56	9.33
6.00	3.71	2.74	2.69	2.65	14.36
7.00	3.87	1.87	2.33	2.74	13.85
8.00	4.02	0.65	-	-	-

Cálculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

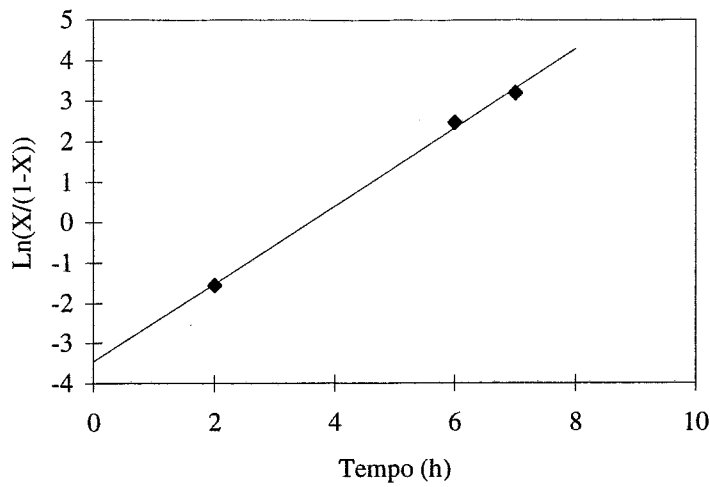
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\ln\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com} \quad \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
2.00	0.71	0.18	-1.55
4.00	1.18	0.29	-0.88
6.00	3.71	0.92	2.48
7.00	3.87	0.96	3.21
8.00	4.02	1.00	

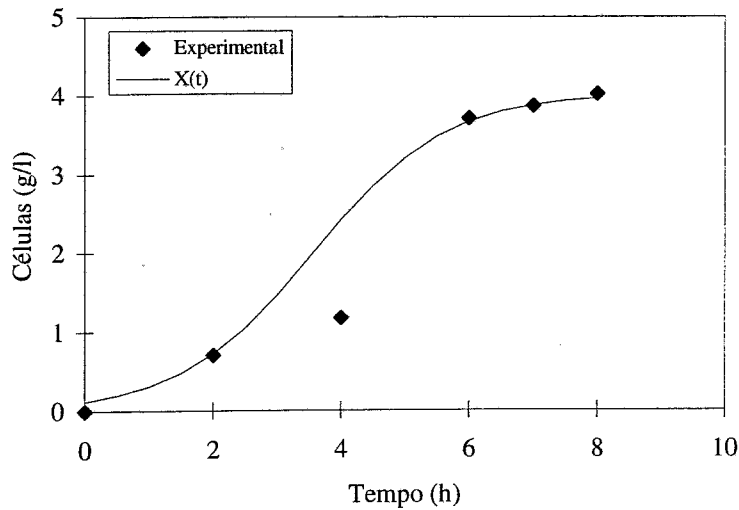
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 0.968 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.1229 \text{ g/l.}$$

Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{14.36 - 0}{4.02 - 0} = 3.57 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:

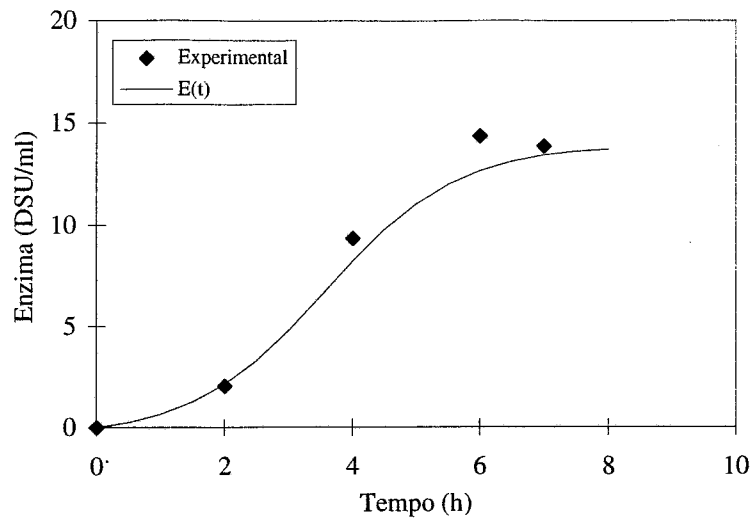


Figura 14.2 - Produção de enzima: resultados experimentais comparados com o modelo.

Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{4.02}{7.25 - 1.89 * 2.69 - 0.65} = 2.65 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.1229 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 0.968 \text{ h}^{-1}$$

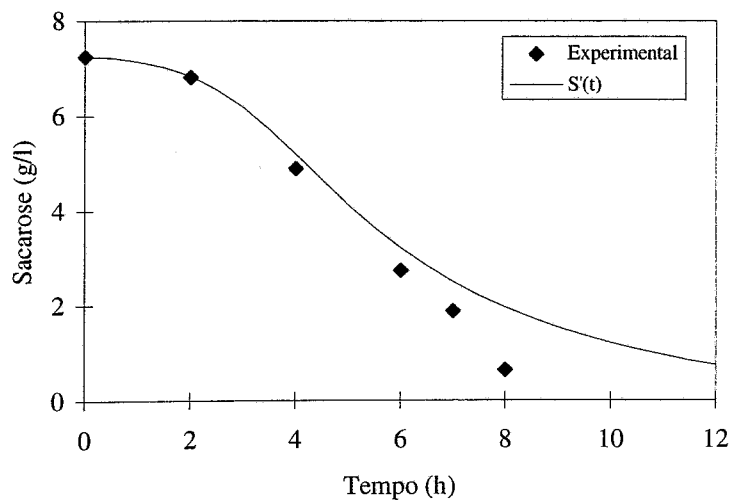
$$Y_{E/X} = 3.57 \text{ DSU/mg células}$$

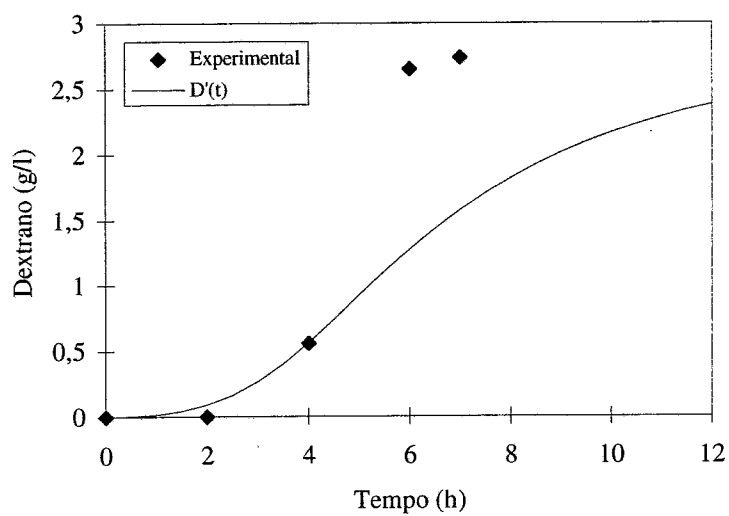
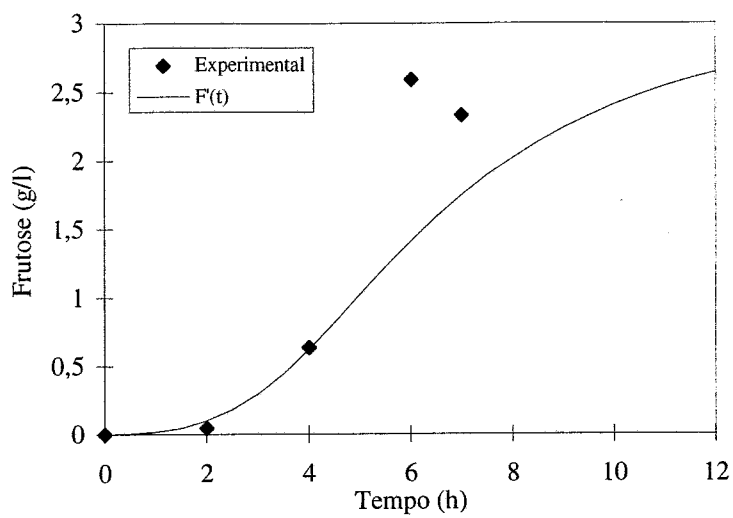
$$Y_{X/S} = 2.65 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O valor de k' usado foi:

$$k' = 0.017 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k' :

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k' .

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_s}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	7.25	0.00	0.00
2.00	6.82	0.04	2.05
4.00	4.89	0.64	9.33
6.00	2.74	2.69	14.36
7.00	1.87	2.33	13.85
8.00	0.65		

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
1.00	7.04	0.14	1.03	0.02	24.51
3.00	5.86	0.17	5.69	0.30	10.04
5.00	3.81	0.26	11.84	1.03	6.07
6.50	2.30	0.43	14.10		
7.50	1.26	0.79			

Foi feito um gráfico representando $(0.526 \cdot E)/r_F$ versus $1/S$. Uma vez que os erros são grandes usou-se o segundo ponto no cálculo do declive. O inverso do declive da recta dá-nos nesse ponto $k'=0.017$.

Fermentação #15:

Fermentação realizada no dia 3/6/96 a 25°C, com pH controlado a 5.5 e sacarose inicial de 10g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 10 g dm⁻³

pH: Controlo a 5.5

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Dextrano (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	0.00	8.65	0.00	0.00	0.00
2.00	0.00	8.29	0.00	0.00	5.70
4.00	0.74	6.77	0.55	0.47	10.92
5.00	1.43	5.32	1.41	1.17	20.94
6.00	2.30	3.22	2.82	2.56	32.26
7.00	2.94	2.08	2.73	3.04	54.01
8.00	2.94				

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

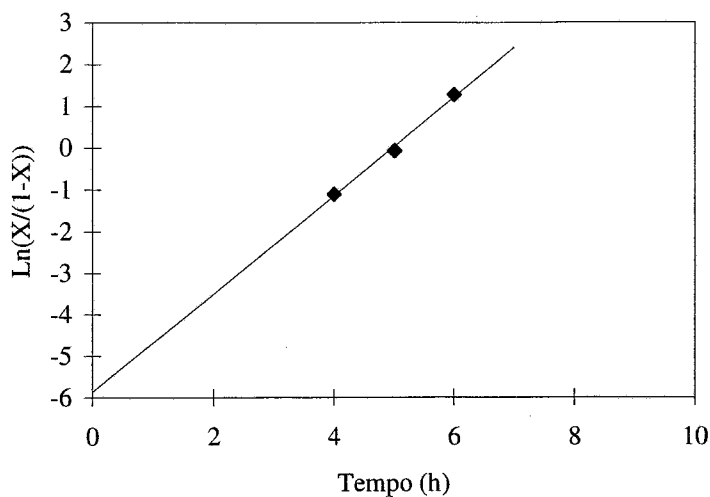
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\text{Ln}\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \text{Ln}\left(\frac{X_{\text{max}}}{X_0} - 1\right) \text{ com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\text{max}}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
2.00	0.00	0.00	
4.00	0.74	0.25	-1.08
5.00	1.43	0.49	-0.06
6.00	2.30	0.78	1.28
7.00	2.94	1.00	

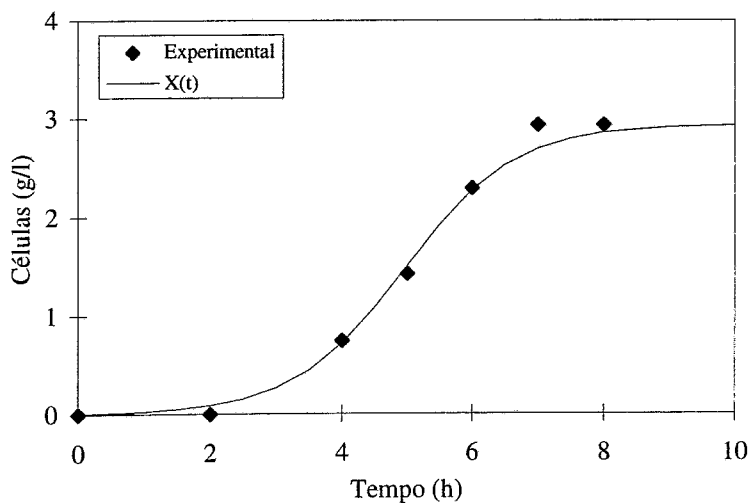
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 1.181 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.00838 \text{ g/l.}$$

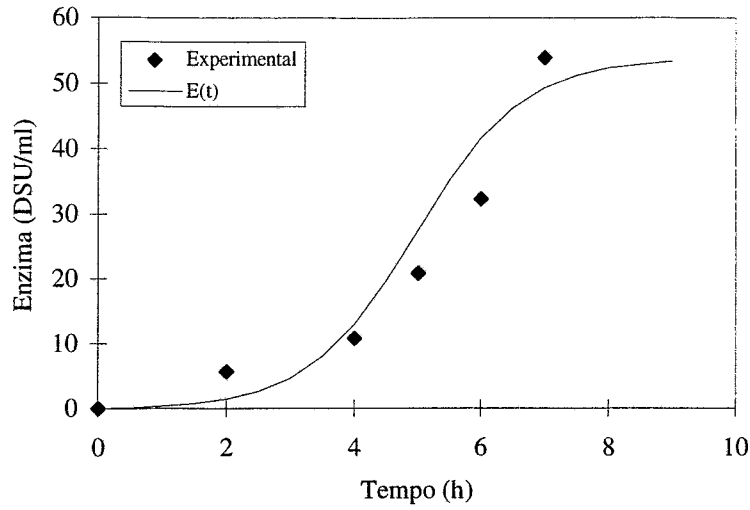
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{54.01 - 0}{2.94 - 0} = 18.37 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{2.94}{8.65 - 1.89 * 2.82 - 2.08} = 2.37 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.00838 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 1.181 \text{ h}^{-1}$$

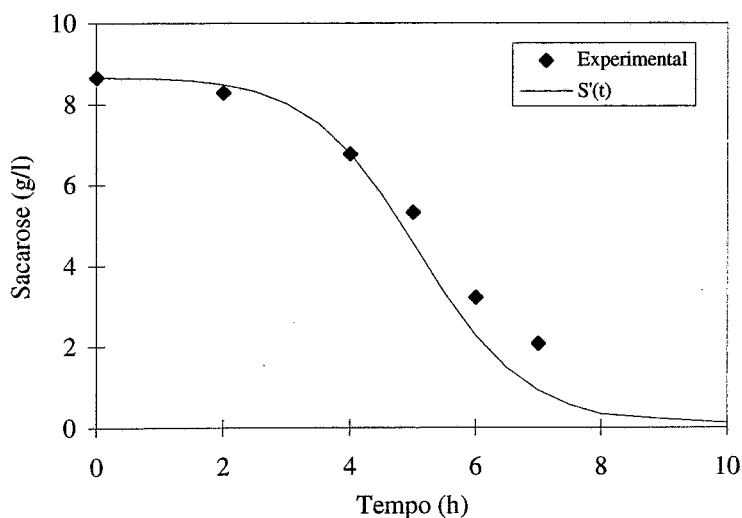
$$Y_{E/X} = 18.37 \text{ DSU/mg células}$$

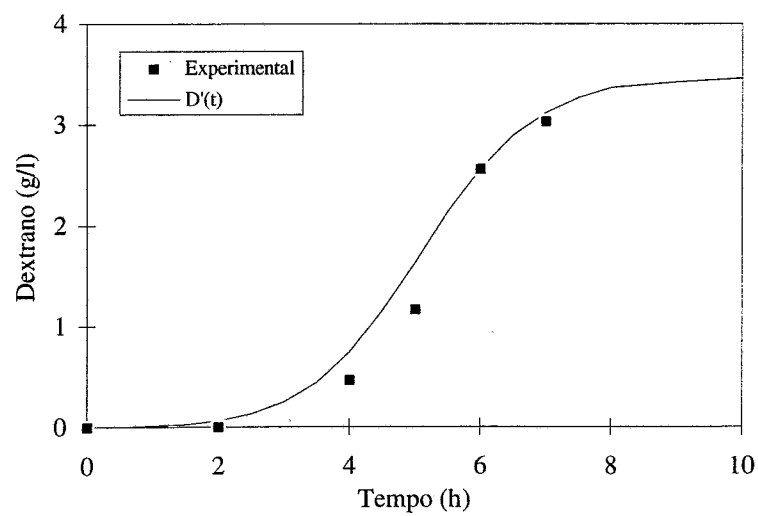
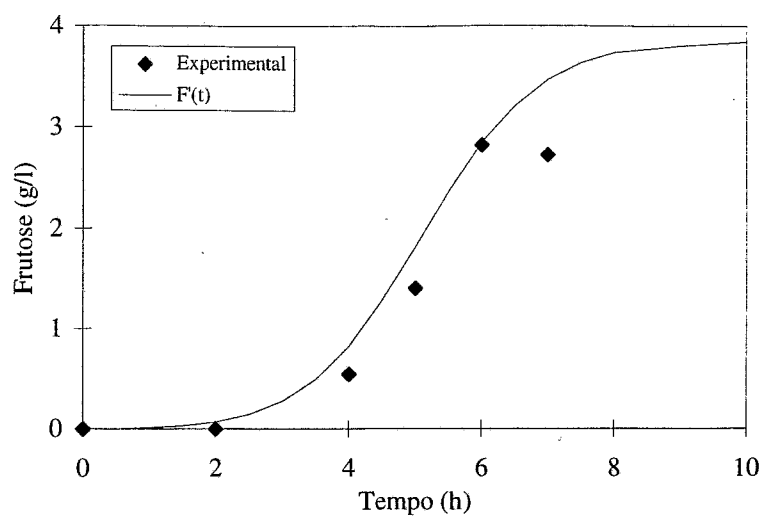
$$Y_{X/S} = 2.37 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.017 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k':

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k'.

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	8.65	0.00	0.00
2.00	8.29	0.00	5.70
4.00	6.77	0.55	10.92
5.00	5.32	1.41	20.94
6.00	3.22	2.82	32.26
7.00	2.08	2.73	54.01

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima(t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
1.00	8.47	0.118	2.85	0.00	
3.00	7.53	0.133	8.31	0.28	15.88
4.50	6.05	0.165	15.93	0.86	9.80
5.50	4.27	0.234	26.60	1.42	9.88
6.50	2.65	0.377	43.13		

Foi feito um gráfico representando $(0.526 \cdot E)/r_F$ versus $1/S$. Do mesmo modo que na fermentação #14 usou-se o segundo ponto no cálculo do declive. O inverso do declive da recta dá-nos nesse ponto $k' = 0.017$.

Fermentação #17:

Fermentação realizada no dia 12/6/96 a 25°C, com pH controlado a 6.7 e sacarose inicial de 80g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 80 g dm⁻³

pH: Controlo a 6.7

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Dextrano (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	0.00	76.37	0.00	0.00	0.00
2.00	0.06	73.92	0.00	0.00	0.02
4.00	0.93	71.79	1.71	1.17	0.38
6.00	4.18	52.36	3.95	3.17	2.44
7.00	6.51	42.35	8.31	7.58	26.87
8.00	8.22	28.49	13.48	11.68	41.17
9.00	9.00	13.76	16.21	16.03	42.86
10.00	11.17	9.42	18.66	16.72	42.64
11.00	12.26	5.77	20.80	17.26	38.04
12.00	13.04	3.27	20.66	17.69	27.27
13.00	-	2.31	18.82	18.12	19.73

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

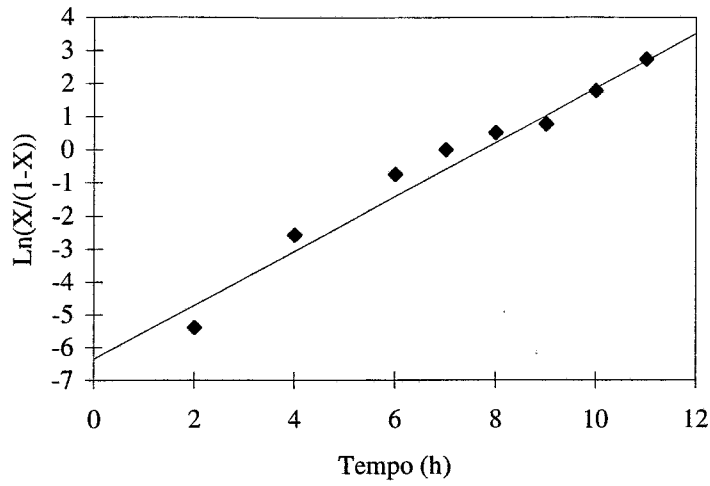
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\text{Ln}\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \text{Ln}\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
2.00	0.06	0.00	-5.39
4.00	0.93	0.07	-2.57
6.00	4.18	0.32	-0.75
7.00	6.51	0.50	0.00
8.00	8.22	0.63	0.53
9.00	9.00	0.69	0.80
10.00	11.17	0.86	1.79
11.00	12.26	0.94	2.76
12.00	13.04	1.00	

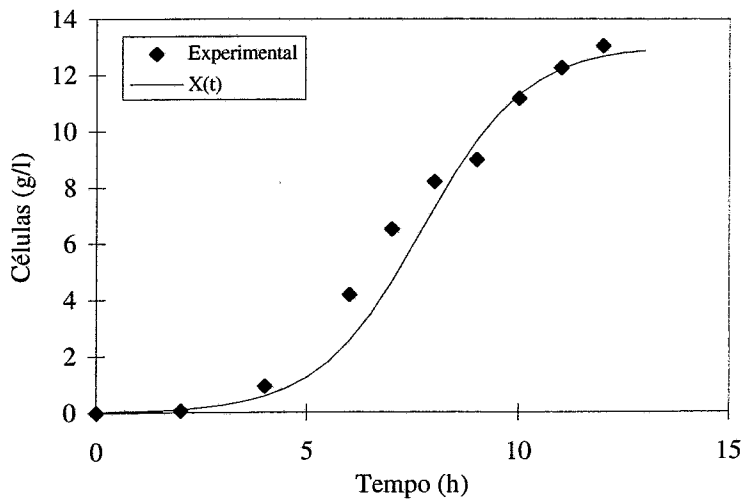
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 0.822 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.0227 \text{ g/l.}$$

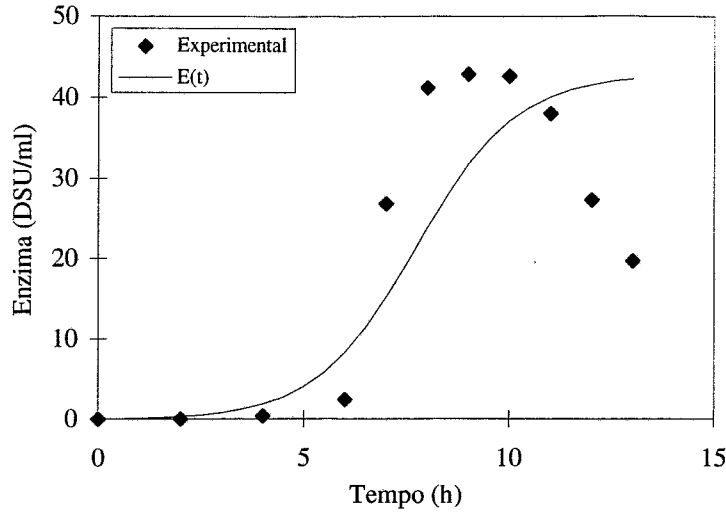
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{42.86 - 0}{13.04 - 0} = 3.29 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Apesar de nesta experiência o nível de sacarose inicial ser superior ao das experiências #6 e #7, os desvios na curva de actividade da enzima não são tão acentuados. Isso deve-se ao facto de que o tempo de centrifugação foi aumentado de 5 para 8 minutos aumentando a quantidade biomassa centrifugada, diminuindo portanto as contaminações na amostra usada no teste.

Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{13.04}{76.37 - 1.89 \cdot 18.12 - 2.31} = 0.33 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.0227 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 0.822 \text{ h}^{-1}$$

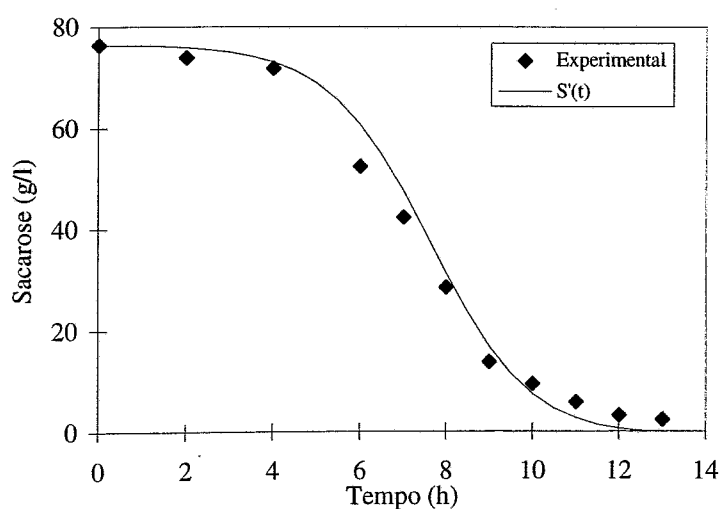
$$Y_{E/X} = 3.29 \text{ DSU/mg células}$$

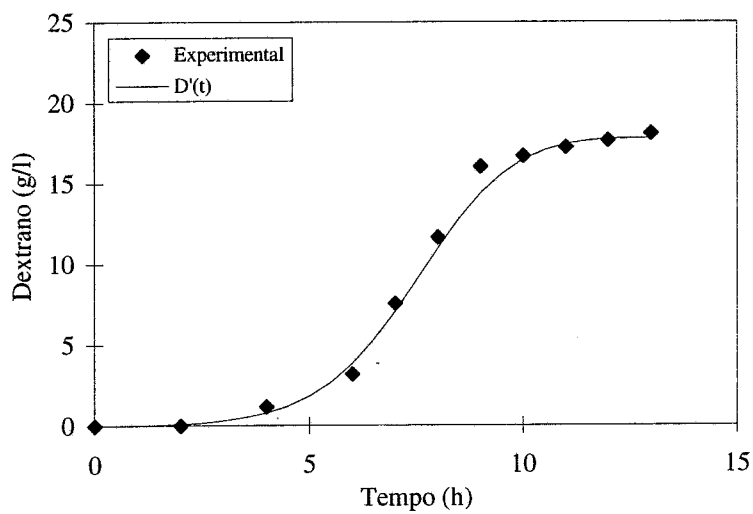
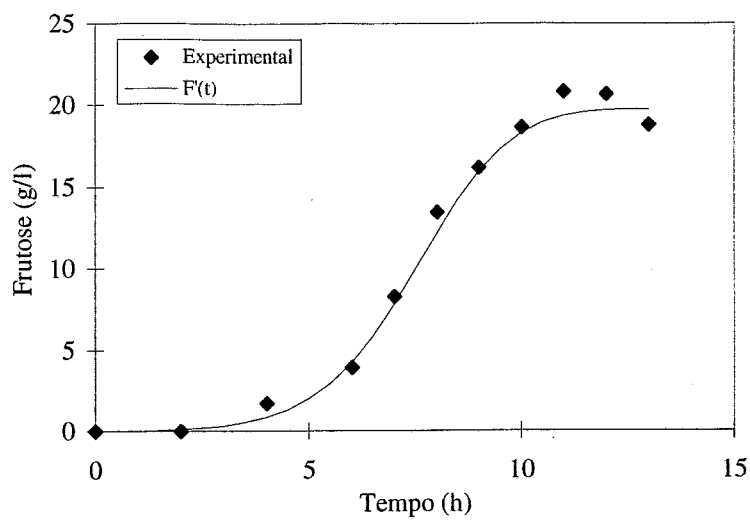
$$Y_{X/S} = 0.33 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.01 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k' :

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k' .

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima* (DSU/ml)
0	76.37	0.00	0.00
2	73.92	0.00	0.31
4	71.79	1.71	1.84
6	52.36	3.94	8.28
7	42.35	8.31	15.15
8	28.49	13.48	23.8
9	13.76	16.21	31.67
10	9.42	18.66	37.09
11	5.77	20.81	40.10
12	3.27	20.66	41.58
13	2.31	18.82	42.27

* Os valores de enzima foram os calculados com $E(t)$

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
1.00	75.14	0.013	0.16	0.00	
3.00	72.85	0.014	1.08	0.86	0.66
5.00	62.07	0.016	5.06	1.12	2.38
6.50	47.36	0.021	11.72	4.37	1.41
7.50	35.42	0.028	19.48	5.17	1.98
8.50	21.13	0.047	27.74	2.73	5.35
9.50	11.59	0.086	34.38	2.45	7.39
10.50	7.60	0.132	38.60	2.15	
11.50	4.52	0.221	40.84		
12.50	2.79	0.358	41.93		

Foi feito um gráfico representando $(0.526 \cdot E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k' = 0.011$.

Fermentação #19:

Fermentação realizada no dia 18/6/96 a 25°C, com pH controlado a 5.5 e sacarose inicial de 80g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 80 g dm⁻³

pH: Controlo a 5.5

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 25° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo	Células	Sacarose	Frutose	Dextrano	Enzima
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(DSU/ml)
0.00	0.00	76.87	0.00	0.00	0.00
2.00	0.04	75.93	0.00	0.00	2.97
4.00	1.32	63.42	2.31	2.02	18.23
6.00	4.23	48.54	7.86	6.35	29.20
7.00	6.11	29.76	15.78	13.96	34.21
8.00	7.33	16.02	19.64	18.54	41.52
9.00	8.05	7.23	20.98	19.04	52.83
10.00	8.57	4.86	22.73	19.47	59.57
11.00	8.74	3.12	21.01	20.06	62.42

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

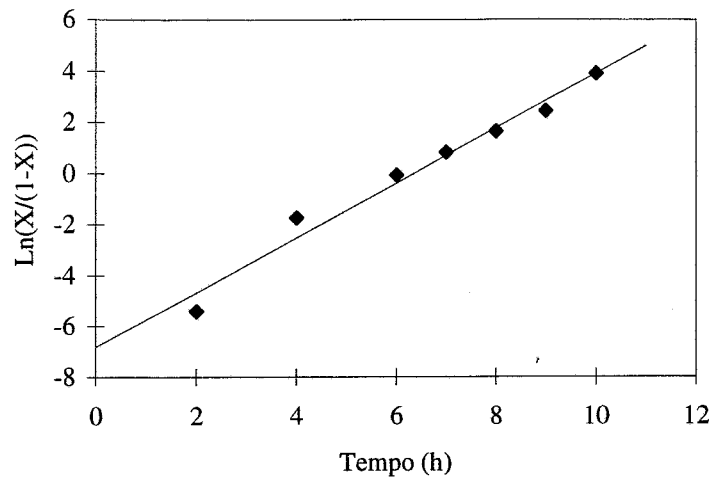
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\text{Ln}\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \text{Ln}\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
2.00	0.04	0.00	-5.38
4.00	1.32	0.15	-1.73
6.00	4.23	0.48	-0.06
7.00	6.11	0.70	0.84
8.00	7.33	0.84	1.65
9.00	8.05	0.92	2.46
10.00	8.57	0.98	3.92
11.00	8.74	1.00	

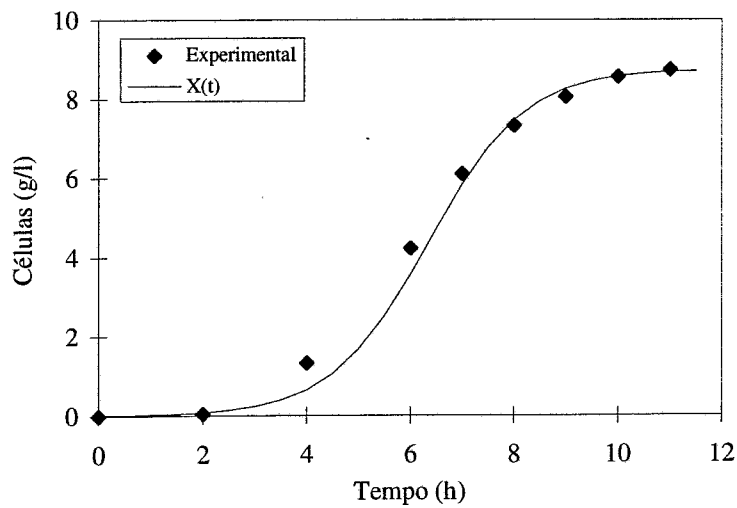
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 1.073 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.00962 \text{ g/l.}$$

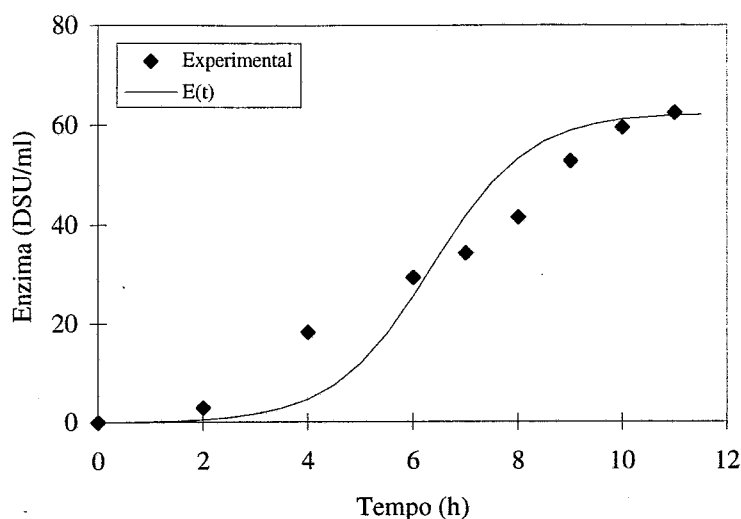
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{62.42 - 0}{8.74 - 0} = 7.14 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Nesta fermentação usou-se também um tempo de centrifugação superior (8 min.) aos habituais 5 minutos.

Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{x/s} = \frac{8.74}{76.87 - 1.89 * 22.73 - 3.12} = 0.28 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.00962 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 1.073 \text{ h}^{-1}$$

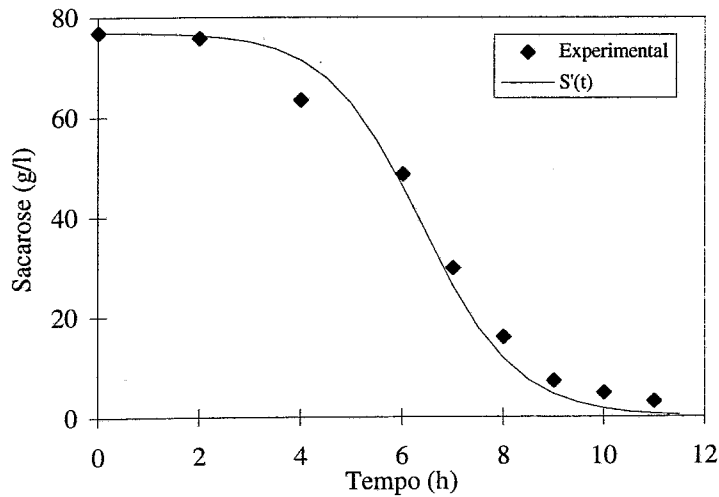
$$Y_{E/X} = 7.14 \text{ DSU/mg células}$$

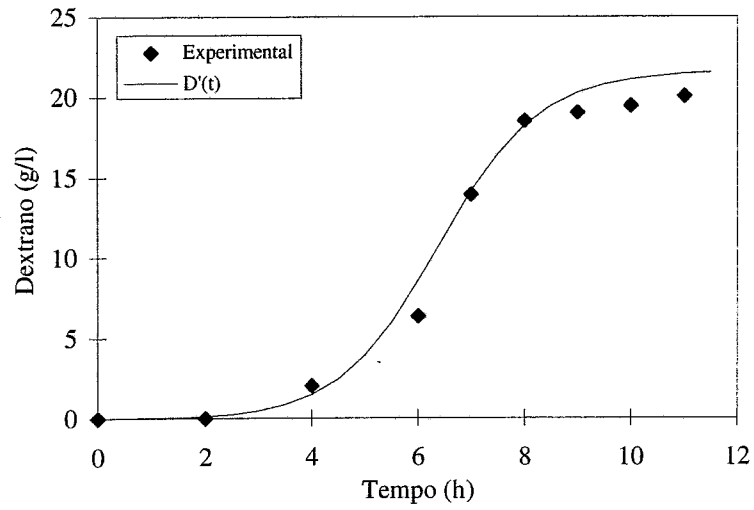
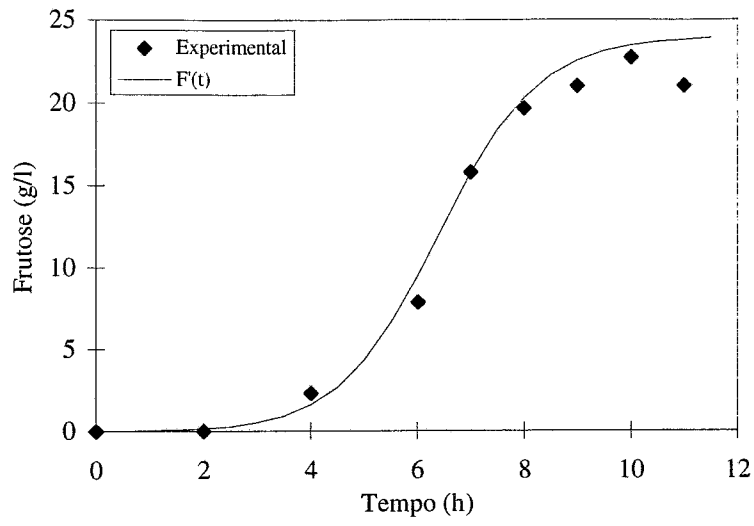
$$Y_{X/S} = 0.28 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.01 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k':

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k'.

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	76.87	0.00	0.00
2.00	75.93	0.00	2.97
4.00	63.42	2.31	18.23
6.00	48.54	7.86	29.20
7.00	29.76	15.78	34.21
8.00	16.02	19.64	41.52
9.00	7.23	20.98	52.83
10.00	4.86	22.73	59.57
11.00	3.12	21.01	62.42

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
1.00	76.40	0.013	1.49	0.00	
3.00	69.68	0.014	10.60	1.16	4.83
5.00	55.98	0.018	23.72	2.78	4.50
6.50	39.15	0.026	31.71	7.92	2.11
7.50	22.89	0.044	37.87	3.86	5.16
8.50	11.63	0.086	47.18	1.34	18.52
9.50	6.05	0.165	56.20	1.75	16.89
10.50	3.99	0.251	61.00		
11.50	1.56	0.641			

Foi feito um gráfico representando $(0.526 \cdot E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k' = 0.0097$.

Fermentação #20:

Fermentação realizada no dia 20/6/96 a 35°C, com pH controlado a 5.5 e sacarose inicial de 80g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 80 g dm⁻³
pH: Controlo a 5.5
Arejamento: Sem arejamento
Temperatura: 35° C
Inoculo: 5% com 17 horas
Agitação: 150 rpm
Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo	Células	Sacarose	Frutose	Dextrano	Enzima
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(DSU/ml)
0.00	0.00	77.14	0.00	0.00	0.00
2.00	0.06	76.85	0.00	0.00	3.55
4.00	1.68	61.39	3.21	3.01	23.53
5.00	5.11	44.95	9.91	9.27	29.13
6.00	7.44	23.62	17.92	16.66	35.33
7.00	9.15	6.60	20.60	19.85	42.71
8.00	10.24	3.81	24.98	23.35	53.93
9.00	10.86	2.03	21.83	24.63	60.02

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

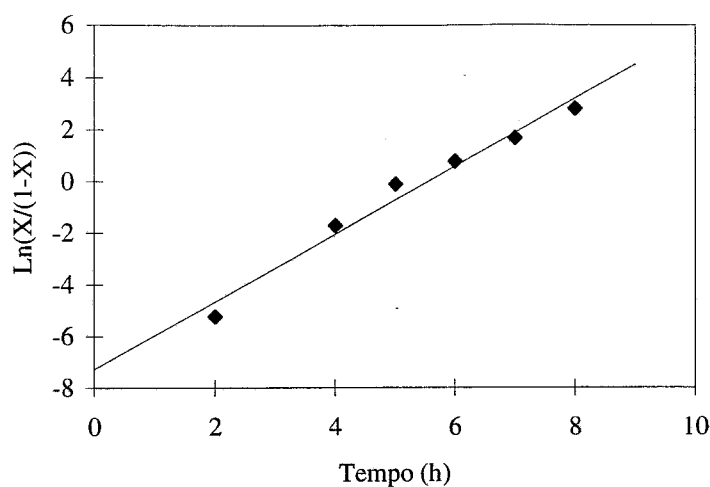
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\text{Ln}\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \text{Ln}\left(\frac{X_{\text{max}}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com } \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\text{max}}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
2.00	0.06	0.01	-5.21
4.00	1.68	0.15	-1.70
5.00	5.11	0.47	-0.12
6.00	7.44	0.69	0.78
7.00	9.15	0.84	1.68
8.00	10.24	0.94	2.80
9.00	10.86	1.00	

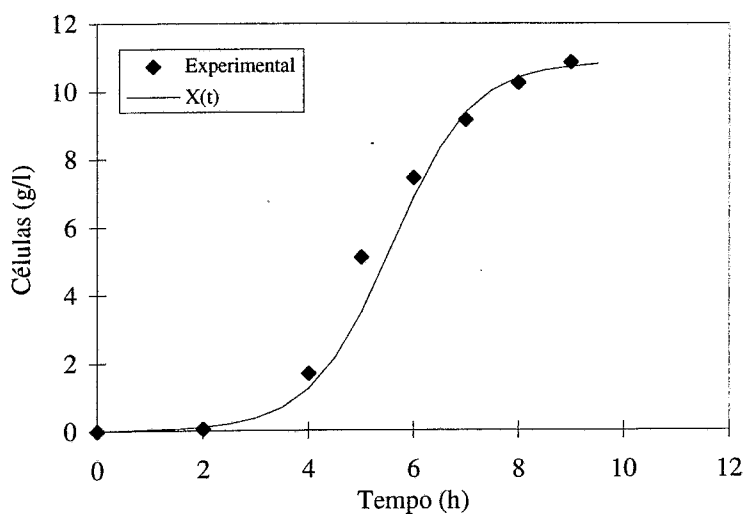
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 1.306 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.00764 \text{ g/l.}$$

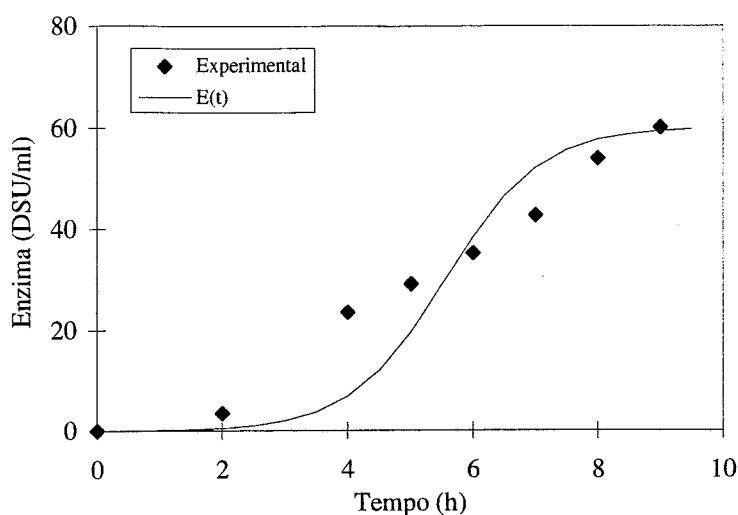
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{60.02 - 0}{10.86 - 0} = 5.23 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva E(t) (equação 2) em função do tempo:



Nesta fermentação usou-se também um tempo de centrifugação superior (8 min.) aos habituais 5 minutos.

Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{dS'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{x/s} = \frac{10.86}{77.14 - 1.89 * 24.98 - 2.03} = 0.39 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0.00764 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 1.306 \text{ h}^{-1}$$

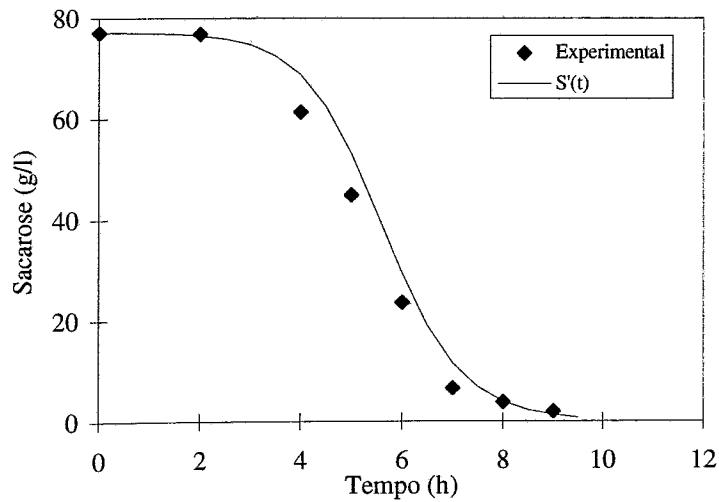
$$Y_{E/X} = 5.53 \text{ DSU/mg células}$$

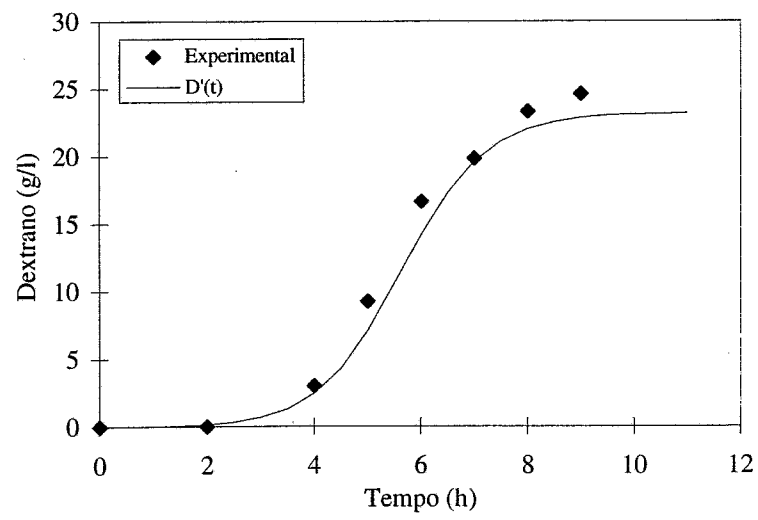
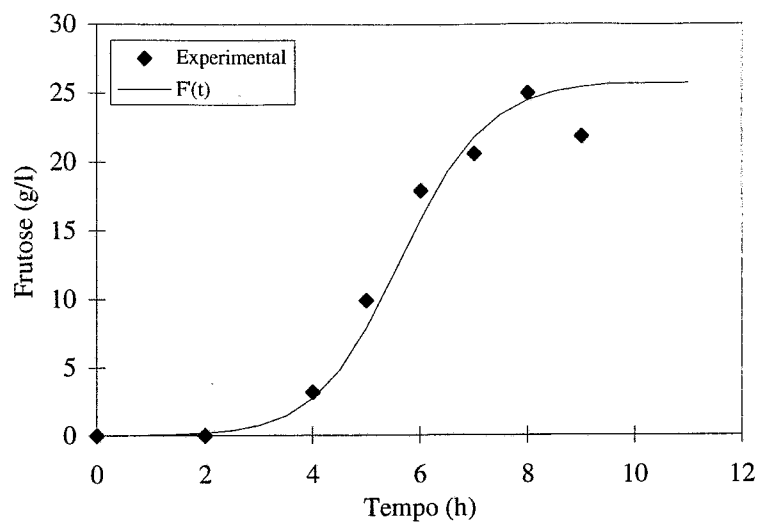
$$Y_{X/S} = 0.39 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0.013 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Cálculo do parâmetro k':

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k'.

Cálculos efectuados:

$$\frac{E(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	77.14	0.00	0.00
2.00	76.85	0.00	3.55
4.00	61.39	3.21	23.53
5.00	44.95	9.91	29.13
6.00	23.62	17.92	35.33
7.00	6.60	20.60	42.71
8.00	3.81	24.98	53.93
9.00	2.03	21.83	60.02

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
1.00	77.00	0.013	1.77	0.00	
3.00	69.12	0.014	13.54	1.60	4.44
4.50	53.17	0.019	26.33	6.71	2.07
5.50	34.29	0.029	32.23	8.01	2.12
6.50	15.11	0.066	39.02	2.67	7.68
7.50	5.21	0.192	48.32		
8.50	2.92	0.342	56.97		

Foi feito um gráfico representando $(0.526 \cdot E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k' = 0.011$.

Fermentação #22:

Fermentação realizada no dia 28/6/96 a 35°C, com pH controlado a 5.5 e sacarose inicial de 120g/l.

Condições de operação:

Sacarose: 120 g dm⁻³

pH: Controlo a 5.5

Arejamento: Sem arejamento

Temperatura: 35° C

Inoculo: 5% com 17 horas

Agitação: 150 rpm

Esterilização: 15 minutos a 121° C

Tempo (h)	Células (g/l)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Dextrano (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	0.00	117.25	0.00	0.00	0.00
2.00	0.06	115.52	0.00	0.00	2.34
4.00	1.74	101.93	4.91	4.20	5.98
6.00	7.44	60.39	14.00	17.75	45.54
8.00	10.40	16.07	22.77	23.35	80.06
9.00	11.48	5.01	27.90	30.20	89.23
10.00	12.42	3.50	36.19	34.56	86.70

Calculo dos parâmetros X_0 e μ_m :

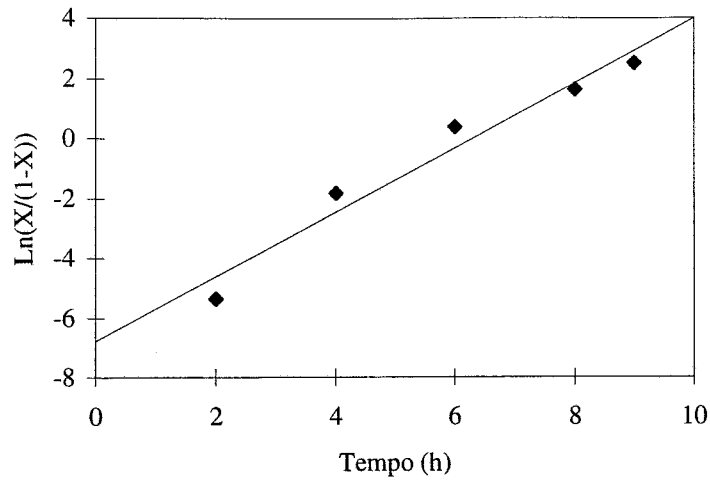
A equação 1 foi transformada na seguinte forma:

$$\text{Ln}\left(\frac{\bar{X}}{1-\bar{X}}\right) = \mu_m t - \text{Ln}\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \quad \text{com} \quad \bar{X} = \frac{X(t)}{X_{\max}}$$

e trataram-se os resultados experimentais da seguinte forma:

Tempo (h)	Células (g/l)	X/Xmax	Ln(X/(1-X))
0.00	0.00	0.00	
2.00	0.06	0.00	-5.35
4.00	1.74	0.14	-1.82
6.00	7.44	0.60	0.40
8.00	10.40	0.84	1.64
9.00	11.48	0.92	2.51
10.00	12.42	1.00	

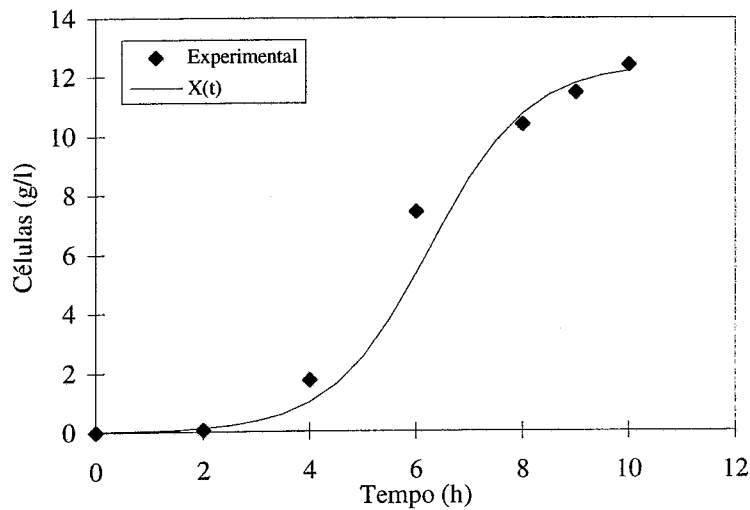
Resultando o gráfico:



Os parâmetros resultantes foram então:

$$\mu_m = 1.076 \text{ h}^{-1} \text{ e } X_0 = 0.01432 \text{ g/l.}$$

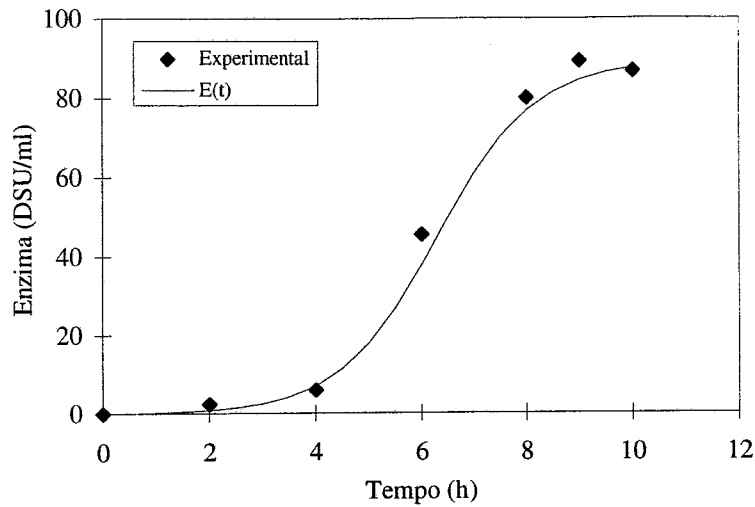
Com estes dois parâmetros calculados é possível traçar a curva $X(t)$ em função do tempo:



Calculo do parâmetro $Y_{E/X}$:

$$Y_{E/X} = \frac{E_{\max} - E_0}{X_{\max} - X_0} = \frac{89.23 - 0}{12.42 - 0} = 7.18 \frac{DSU}{mg \text{ cells}}$$

Uma vez calculado este parâmetro é possível traçar a curva $E(t)$ (equação 2) em função do tempo:



Nesta fermentação usou-se também um tempo de centrifugação de 8 minutos.

Calculo do parâmetro $Y_{X/S}$:

$Y_{X/S}$ é calculado relativamente à quantidade de sacarose gasta pela bactéria. Para isso é necessário conhecer a quantidade de sacarose gasta pela enzima:

$$-\frac{d S'_{\text{used by the enzyme}}}{dt} = \frac{M_S}{M_F} \frac{dF'}{dt} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} \frac{dD'}{dt}$$

Integrando vem:

$$S'_{\text{used by the enzyme}} = \frac{M_S}{M_F} F'_{\text{final}} = \frac{M_S}{(M_G - M_W)} D'_{\text{final}}$$

Assim pode calcular-se $Y_{X/S}$:

$$Y_{x/s} = \frac{12.41}{117,25 - 1,89 * 36,19 - 3,50} = 0,27 \text{ g cell / g sucrose}$$

Parâmetros calculados:

$$X_0 = 0,01432 \text{ g/l}$$

$$\mu_m = 1,076 \text{ h}^{-1}$$

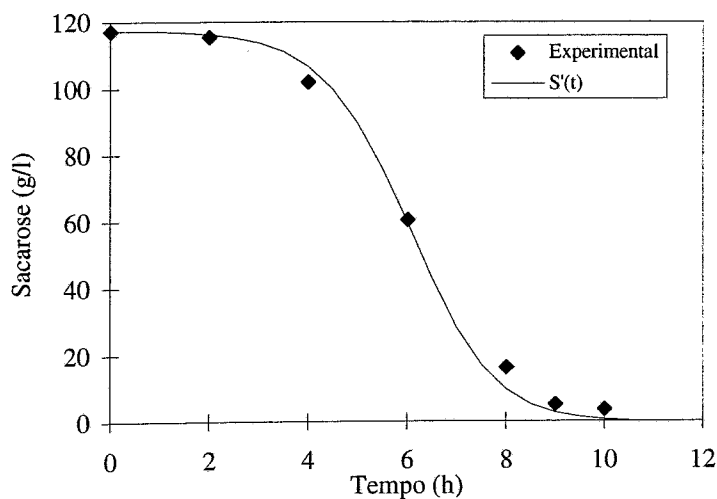
$$Y_{E/X} = 7,18 \text{ DSU/mg células}$$

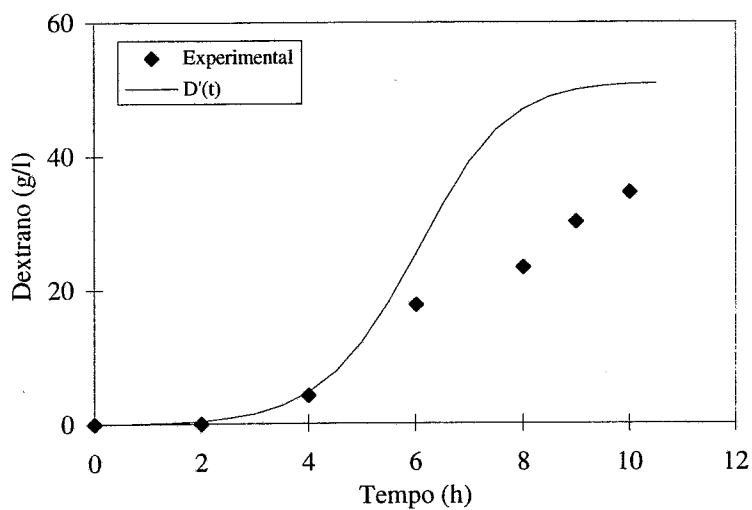
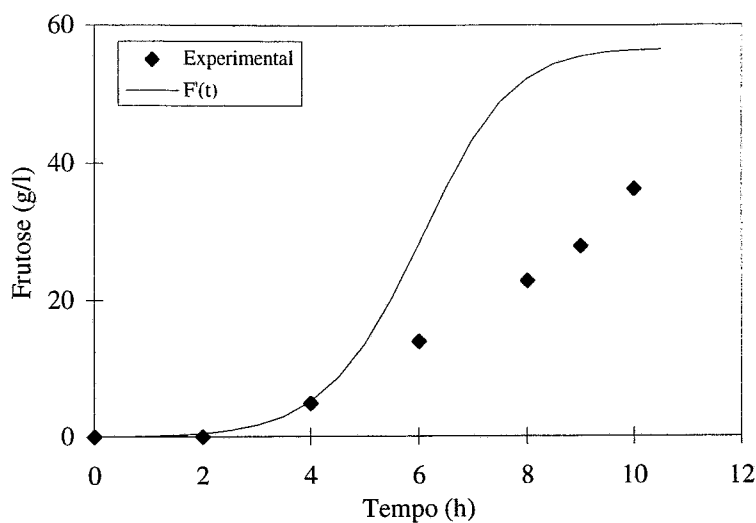
$$Y_{X/S} = 0,27 \text{ g células/g suc.}$$

Falta conhecer k' para poder traçar as curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. Resolveu-se o sistema de equações de modo a obter o valor de k' que dá melhores resultados na obtenção das curvas $S'(t)$, $F'(t)$ e $D'(t)$. O melhor k' obtido foi:

$$k' = 0,014 \text{ ml/DSU.h}$$

E os resultados para a sacarose, frutose e dextrano são apresentados de seguida.





Neste caso, a concentração de sacarose inicial é muito elevada dando origem a concentrações de biomassa e de dextrano também muito elevadas, assim a partir de determinada altura, o dextrano e a frutose começam a ser arrastados para a pellet de células que se forma aquando da centrifugação da amostra para retirar a biomassa.

Cálculo do parâmetro k':

k' pode ser calculado através das equações relativas ao dextrano e à frutose. Partindo dos resultados experimentais da produção de frutose foi calculado o valor de k'.

Cálculos efectuados:

$$\frac{\dot{E}(t)}{r'_F} = \frac{1}{k'} \frac{M_S}{M_F} \frac{1}{S'(t)}$$

Tempo (h)	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Enzima (DSU/ml)
0.00	117.25	0.00	0.00
2.00	115.52	0.00	2.34
4.00	101.93	4.91	5.98
6.00	60.39	14.00	45.54
8.00	16.07	22.77	80.06
9.00	5.01	27.90	89.23
10.00	3.50	36.19	86.70

Tempo'	Sacarose (t')	1/S	Enzima (t')	dF/dt	(0.526*E)/rF
1.00	116.39	0.009	1.17	0.00	
3.00	108.73	0.009	4.16	2.46	0.89
5.00	81.16	0.012	25.76	4.55	2.98
7.00	38.23	0.026	62.80	4.38	7.54
8.50	10.54	0.095	84.65	5.13	8.67
9.50	4.25	0.235			

Foi feito um gráfico representando $(0.526 \cdot E)/r_F$ versus $1/S$. O inverso do declive da recta dá-nos $k' = 0.014$.

Apêndice B

Fermentação tipo: cromatogramas

Neste apêndice estão apresentados os cromatogramas da análise das amostras colhidas ao longo de uma fermentação tipo. As condições de operação foram: 20 g/l de Sacarose, 7 g/l de extracto de levedura, 8 g/l de Na_2HPO_4 , Agitação de 150 rpm, sem arejamento, sem controlo de pH e a uma temperatura de 35°C.

Para a análise o eluente usado foi H_2SO_4 0.005 N a um caudal de 0.3 ml/min. A temperatura de operação foi de 25°C.

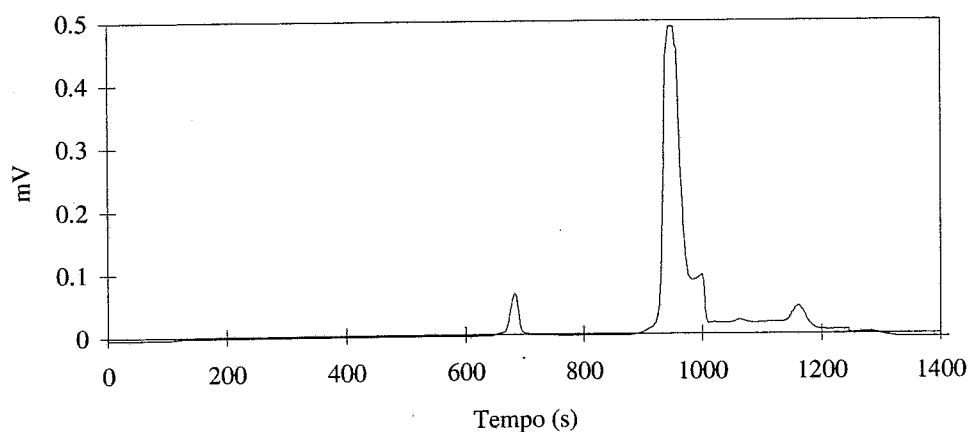


Gráfico 1 - Cromatograma da amostra colhida às zero horas de fermentação. O primeiro pico é relativo a impurezas presentes no extracto de levedura, o segundo relativo à sacarose e o terceiro é um pico de glucose que se encontra presente também na composição do extracto de levedura.

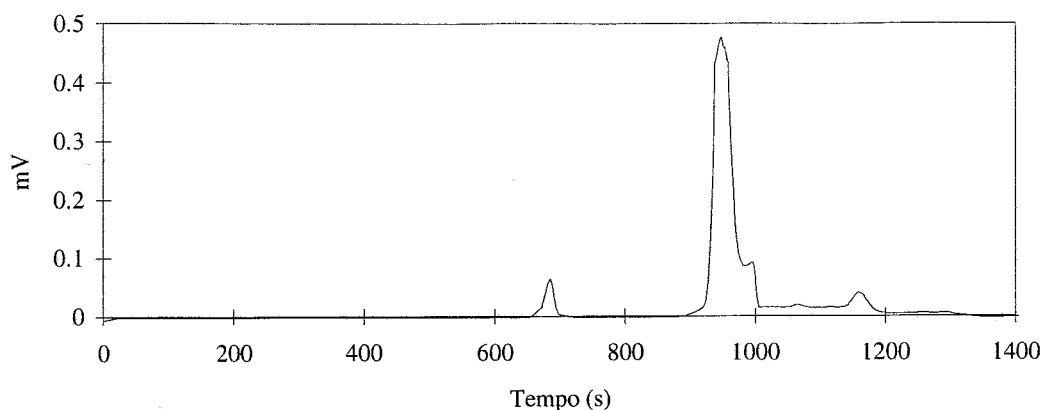


Gráfico 2 - Cromatograma da amostra colhida às duas horas de fermentação. O primeiro pico é relativo a impurezas presentes no extracto de levedura, o segundo relativo à sacarose e o terceiro é um pico de glucose que se encontra presente também na composição do extracto de levedura.

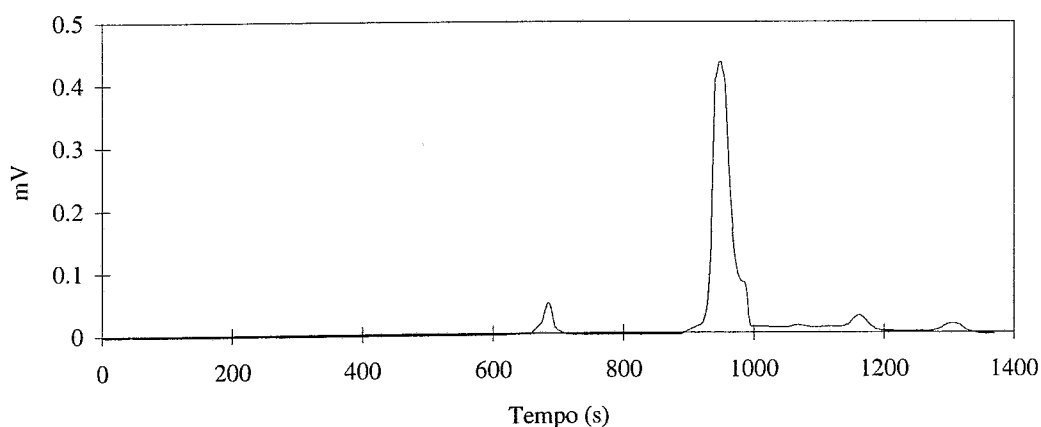


Gráfico 3 - Cromatograma da amostra colhida às quatro horas de fermentação. O primeiro pico é relativo a impurezas presentes no extracto de levedura, o segundo relativo à sacarose e o terceiro é um pico de glucose que se encontra presente também na composição do extracto de levedura. Começa-se a notar a presença de um quarto pico aos 1300 segundos relativo à frutose. A área calculada do primeiro pico também é um pouco maior o que indica já a presença de algum dextrano.

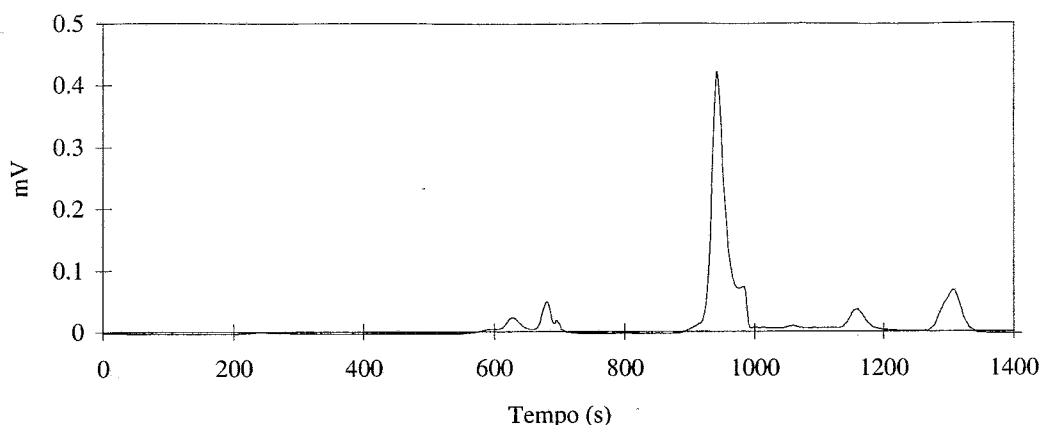


Gráfico 4 - Cromatograma da amostra colhida às seis horas de fermentação. O primeiro pico é relativo ao dextrano e logo a seguir vem o pico das impurezas em que misturadas com estas pode sair dextrano, o terceiro pico é relativo à sacarose que se nota a decrescer e o quarto é o pico da glucose que se mantém constante (ou poderá subir um pouco). O quinto pico é a frutose que continua a aumentar.

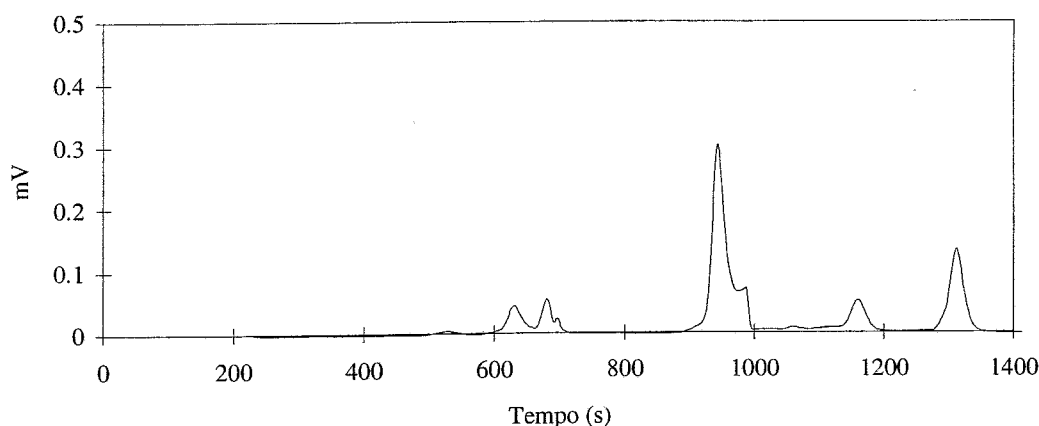


Gráfico 5 - Cromatograma da amostra colhida às oito horas de fermentação. O primeiro pico é relativo ao dextrano e logo a seguir vem o pico das impurezas em que misturadas com estas já se nota a saída de dextrano, o terceiro pico é relativo à sacarose que se nota a decrescer e o quarto é o pico da glucose que se mantém constante (ou poderá subir um pouco). O quinto pico é a frutose que continua a aumentar.

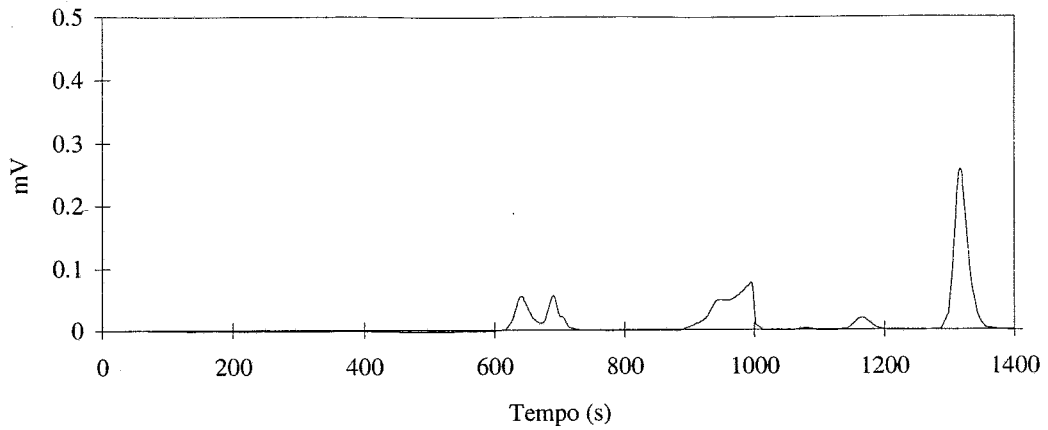


Gráfico 6 - Cromatograma da amostra colhida às dez horas de fermentação. O primeiro pico é relativo ao dextrano e logo a seguir vem o pico das impurezas em que misturadas com estas se continua a notar a saída de dextrano, o terceiro pico é relativo à sacarose que está praticamente esgotada e o quarto é o pico da glucose que de decresceu pois a bactéria começa-a a usar como fonte de carbono alternativa. O quinto pico é a frutose que está ainda maior (a determinada altura o pico da frutose vai decrescer também pois a bactéria também a vai usar como fonte de carbono alternativa).

Apêndice C

Peso molecular do dextrano produzido.

Neste apêndice apresentam-se os resultados obtidos do peso molecular do dextrano produzido em presença de açúcares secundários.

Açúcar complementar	$\overline{M_w}$	$\overline{M_n}$	Volume de eluição no máximo do pico (ml)	Q	Mw máximo obtido	Intervalo de Mw obtidas
Rafinose	-	-	5.48	-	1 290 470	-
Ribose	-	-	6.19	-	210 590	-
Xilose	-	-	6.16	-	226 380	-
Maltose	240 828	35 830	6.43	6.72	121 524	3 440 651-7 941
Lactose	311 708	39 697	6.42	7.85	127 134	7 294 851-8 209
Galactose	398 524	34 008	6.27	7.85	179 039	9 255 139-6 740
Só Sacarose	1 890 504	10 011 165	5.50	1.87	1 241 281	14 677 264-183 127

Apêndice D

Cromatogramas: Cinética da enzima invertase.

Neste apêndice estão apresentados os cromatogramas resultantes da análise das amostras colhidas na experiência para determinação da cinética da invertase com concentração inicial de sacarose 100 g/l e $T=40^{\circ}\text{C}$. O eluente usado foi H_2SO_4 0.005N a um caudal de 0.3 ml/min. A temperatura de operação foi de 25°C . Em todos os cromatogramas o 1º pico refere-se à sacarose, o 2º à glucose e o 3º à frutose.

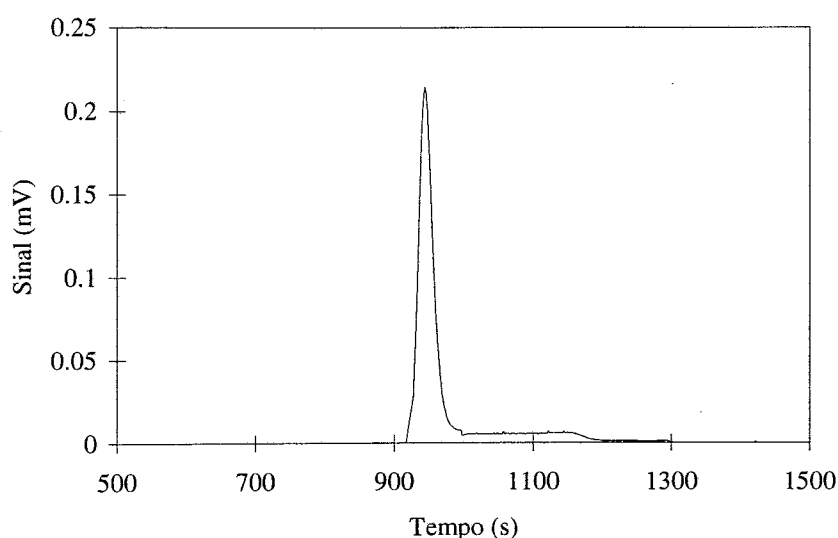


Gráfico 1 - Cromatograma da amostra colhida antes do início da inversão ($t=0$ s). A amostra foi diluída 10 vezes. A concentração de sacarose obtida foi 91.01 g/l.

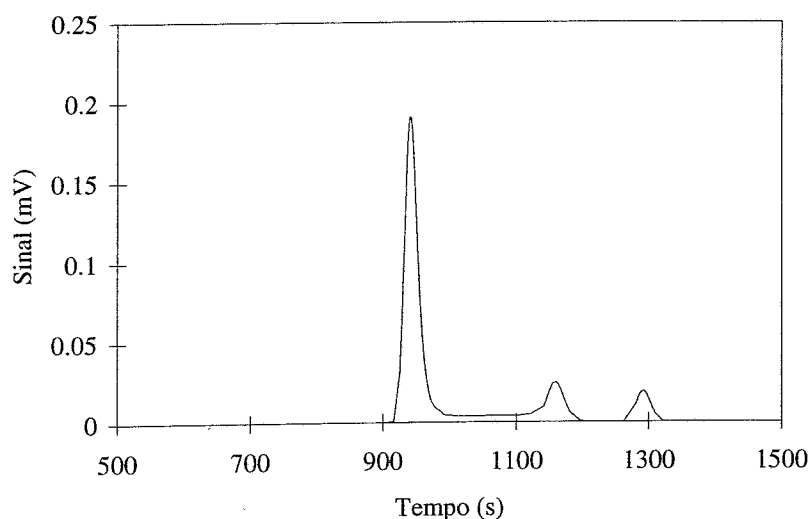


Gráfico 2 - Cromatograma da amostra colhida aos 2 minutos de reação. A amostra foi diluída 10 vezes.

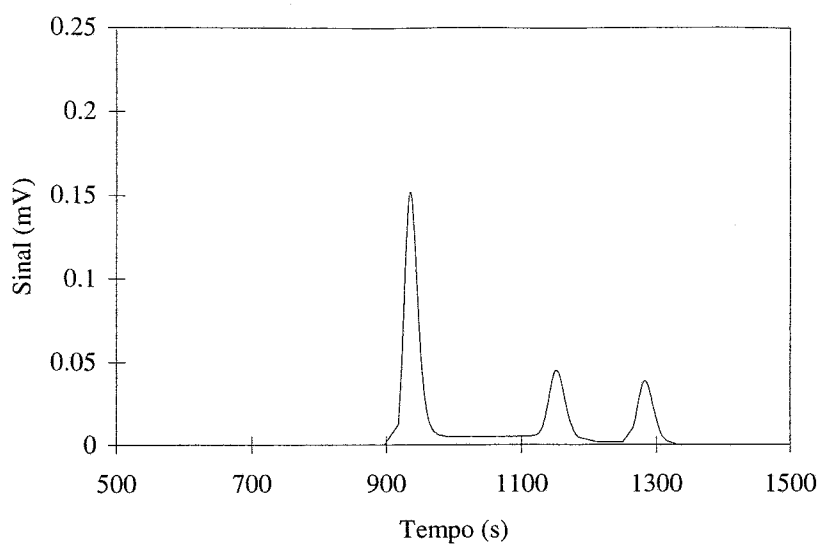


Gráfico 3 - Cromatograma da amostra colhida aos 4 minutos de reacção. A amostra foi diluída 10 vezes.

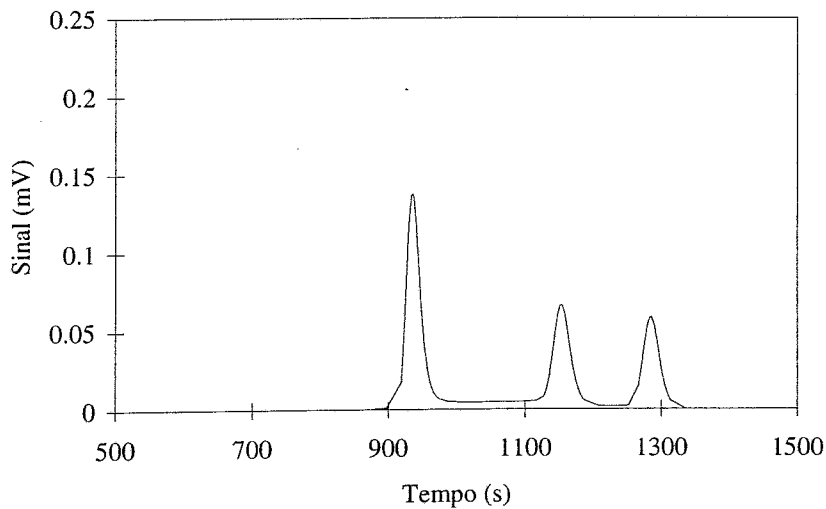


Gráfico 4 - Cromatograma da amostra colhida aos 6 minutos de reacção. A amostra foi diluída 10 vezes.

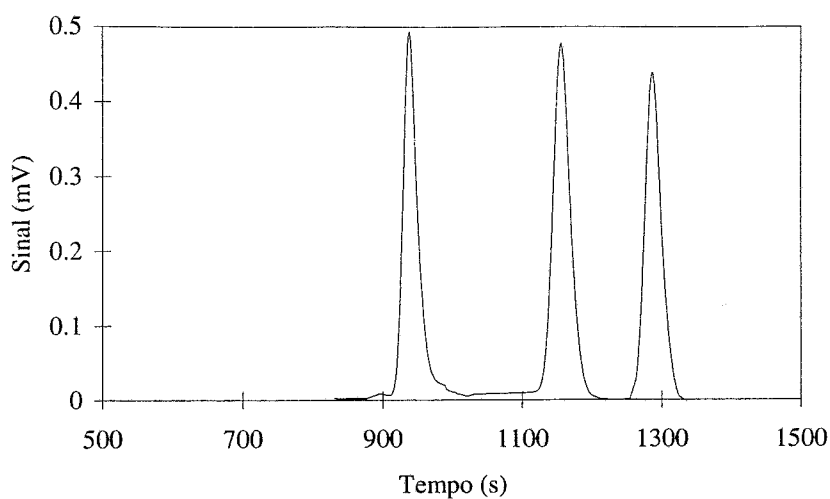


Gráfico 5 - Cromatograma da amostra colhida aos 10 minutos de reacção. A amostra foi diluída 2 vezes.

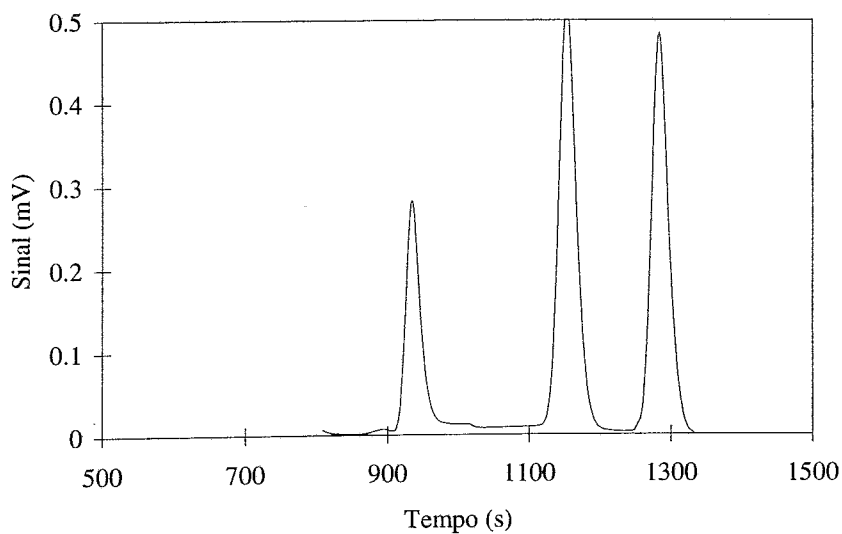


Gráfico 6 - Cromatograma da amostra colhida aos 14 minutos de reacção. A amostra foi diluída 2 vezes.

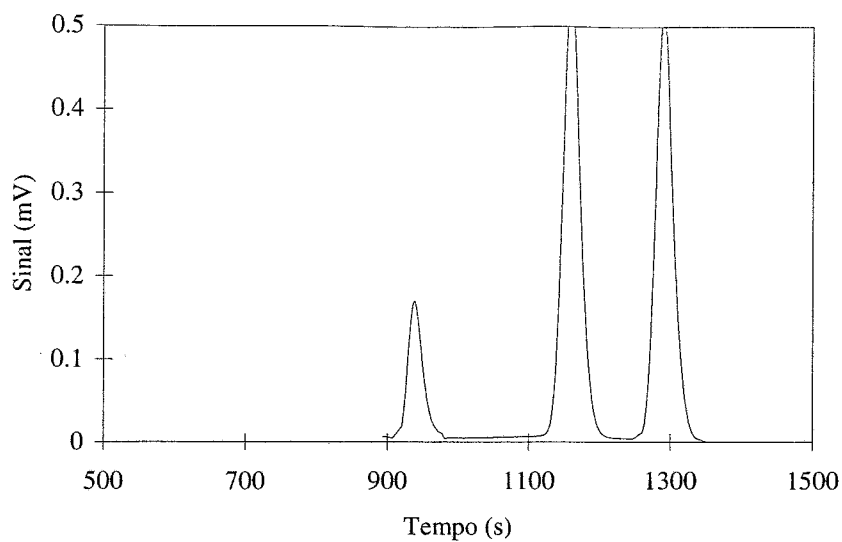


Gráfico 7 - Cromatograma da amostra colhida aos 18 minutos de reacção. A amostra foi diluída 2 vezes.

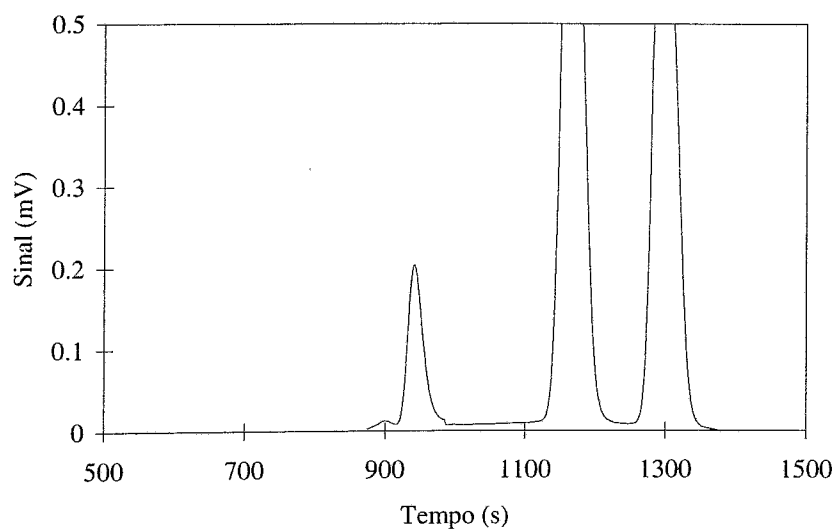


Gráfico 8 - Cromatograma da amostra colhida aos 22 minutos de reacção. A amostra não foi diluída.

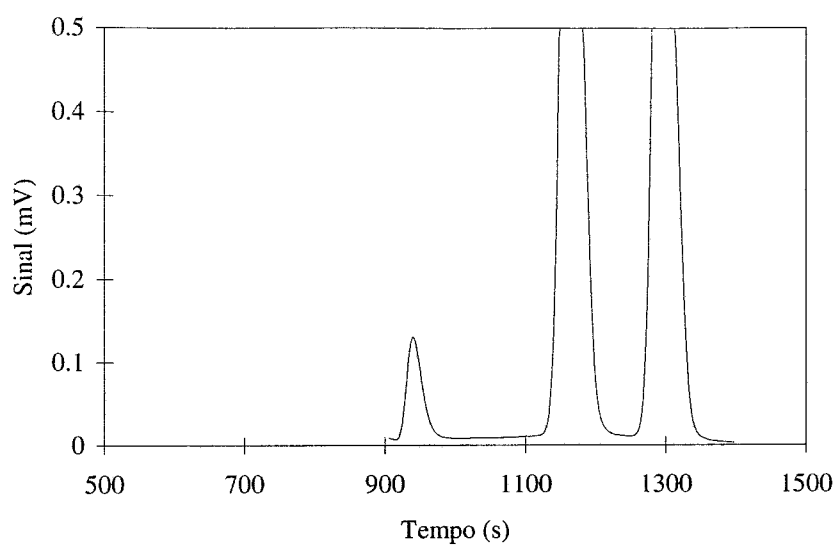


Gráfico 9 - Cromatograma da amostra colhida aos 26 minutos de reacção. A amostra não foi diluída.

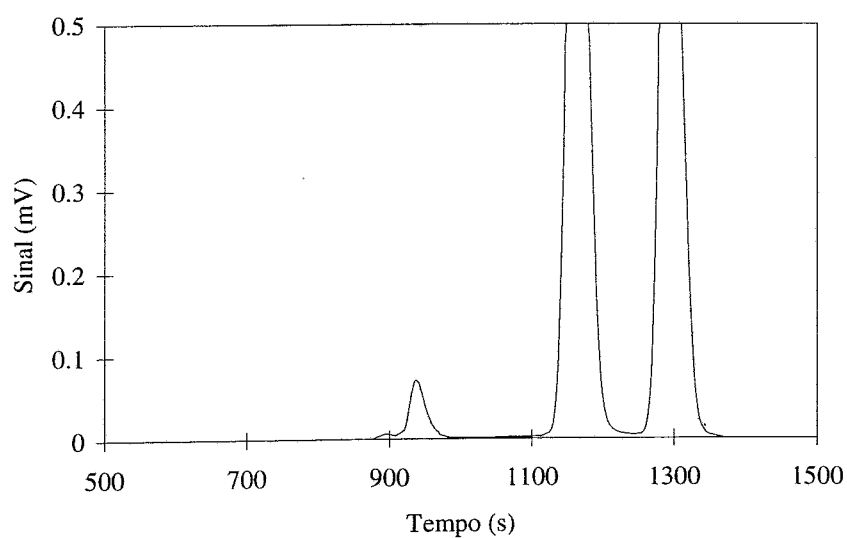


Gráfico 10 - Cromatograma da amostra colhida aos 30 minutos de reacção. A amostra não foi diluída.

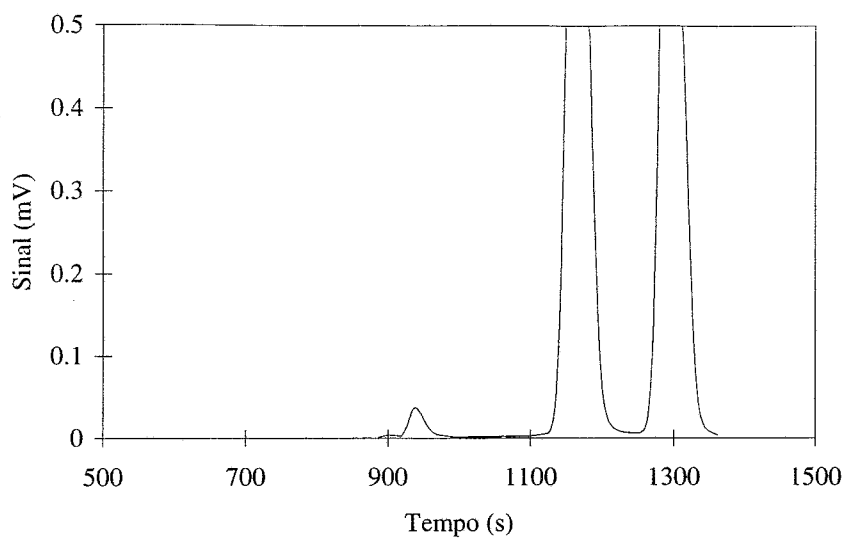


Gráfico 11 - Cromatograma da amostra colhida aos 35 minutos de reação. A amostra não foi diluída.

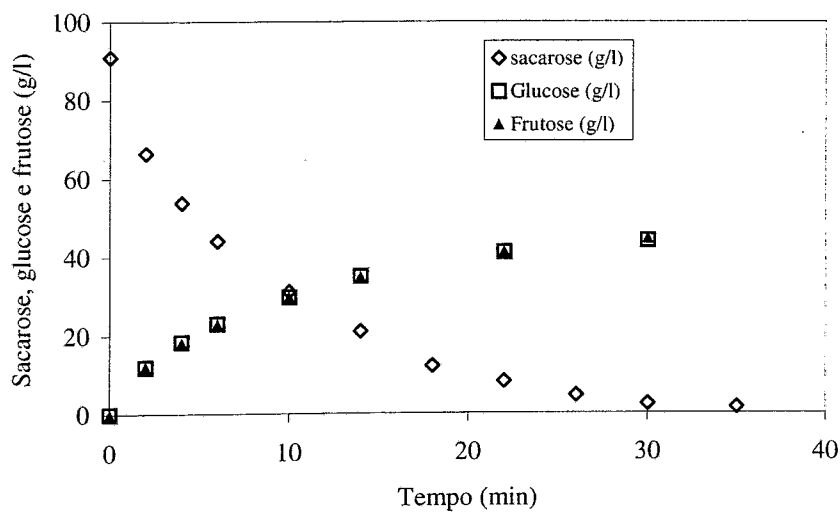


Gráfico 12 - Curva de consumo de sacarose pela enzima invertase com uma concentração inicial de sacarose de 100 g/l e $T=40^{\circ}\text{C}$.

Tabela D.1 - Resultados experimentais obtidos para as experiências de inversão de sacarose com concentração inicial desta de 100 g/l.

Tempo (min)	T=55°C	T=40°C	T=30°C	T=20°C
0	91.04	91	88.08	89.16
2	65.23	66.42	75.34	
4	49.15	53.87	65.26	70.73
6	34.28	44.05		
8	25.95		49.32	57.01
10	18.43	31.16		
12	12.99		37.57	
14	9.96	20.97		48.03
16	7.3		30.53	
18	5.2	12.17		
20	3.72		24.37	41.29
22		8.15		
24			19.92	
25	1.35			
26		4.59		
28				32.97
30		2.39		24.97
32			12.47	
35		1.48		
36				
40			6.96	18.63
45			4.79	
48				12.97
55			1.78	
56				8.75
65				6.27
75				5.29

Tabela D.2 - Resultados experimentais obtidos para as experiências de inversão de sacarose com concentração inicial desta de 50 g/l.

Tempo (min)	T=55°C	T=40°C	T=30°C	T=20°C
0	46.48	47.52	48.02	49.26
1	38.43			
2	31.02	34.17	38.52	
4	16.99	23.27		35.16
6	9.1	16.34	24.13	
8	5.2	8.9		26.8
10	3.13		11.02	
12	1.98	3.05		19.76
14			4.25	
16		1.92		11.91
18			2.96	
20		0.66		7.84
22			1.86	
24				5.02
26			1.41	
28				3.73
30			0.85	
32				2.96
36				2.3
40				1.12

Tabela D.3 - Resultados experimentais obtidos para as experiências de inversão de sacarose com concentração inicial desta de 20 g/l.

Tempo (min)	T=55°C	T=40°C	T=30°C	T=20°C
0	18.91	18.94	20.23	20.65
0.5	16.06			
1	13.53	13.79	15.97	
2	9.03	9.14	12.58	16.01
3	5.95	6.63		
4	3.51		7.77	11.97
5	2.25	3.45		
6	1.66		5.06	8.5
7	1.06	1.36		
8			3.55	6.31
10		0.74	2.13	4.95
12			0.76	3.86
14				2.89
16				2.09
18				1.3

Apêndice E

Imobilização: Ensaios preliminares para selecção do suporte

Apêndice E. Imobilização: Ensaios preliminares para selecção do suporte

Em muitos casos o desenvolvimento de um processo biológico depende da utilização adequada de procedimentos para a estabilização ou retenção do componente biológico. Em alguns sistemas a imobilização do microorganismo ou da enzima são uma boa alternativa aos processos batch tradicionais. A metodologia de imobilização tem um papel cada vez mais importante no campo da biotecnologia. Nas áreas da medicina (Busscher et al., 1992; Denyer et al., 1992; Wilcox, 1992), processamento de alimentos (Timperley et al., 1992; Rönner e Husmark, 1992) e tratamento de águas (Mendez e Lema, 1992; Monteiro, 1998) muito trabalho vem sendo feito.

Neste apêndice apresentam-se estudos acerca da capacidade de imobilização da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) e produção de dextrano e frutose em diversos suportes. Investigou-se ainda o comportamento da enzima dextranosacarase imobilizada em poliacrilamida.

E.1 Imobilização da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f)

Um vasto leque de suportes é usado para imobilizar microorganismos. A encapsulação em matrizes gelificadas (Lebrun et al., 1994; Matsunaga et al., 1980; Constantinides, 1980; Kierstan e Bucke, 1977) e a adsorção em suportes porosos (El-Sayed et al, 1990 e 1992) são os mais usados.

Alguns autores (El-Sayed et al, 1990a, 1990b, 1990c e 1992; Lebrun et al., 1994); estudaram a produção de dextranosacarase e de dextrano com a bactéria imobilizada em alginato de cálcio, membranas de agar, aço inoxidável poroso e celite (88% SiO₂). Neste trabalho os primeiros suportes a serem testados foram a ardósia (pequenos pedaços com 1.5 cm de diâmetro e 5 mm de espessura), lã de aço e Poraver (material poroso com diâmetro médio de 1.5 cm e com cerca de 70% em SiO₂).

Os três suportes foram esterilizados em água destilada durante 20 minutos a 121°C. Com exceção do suporte Poraver (composição química na tabela E.1) em que se repetiu o procedimento três vezes para garantir que todo o ar contido nos poros fosse libertado.

Tabela E.1 - Composição química do material poroso Poraver.

Material	%
CaO	10.54
SiO ₂	69.39
Al ₂ O ₃	1.95
TiO ₂	0.09
Fe ₂ O ₃	0.44
Mn ₂ O ₃	0.03
MgO	2.07
K ₂ O	0.78
Na ₂ O	14.39
SO ₃ ⁻	0.11
Cl ⁻	0.001
outros	0.209

Para preparar o inóculo, centrifugou-se um fermentado de modo a aproveitar as células. Fez-se uma suspensão em água estéril duas vezes para lavar as células. Finalmente as células foram suspensas em água destilada e estéril de modo a dar uma leitura de densidade óptica de 0.5 a 660 nm. Esta suspensão foi usada para inocular os materiais em estudo. Para isso adicionou-se a cada um dos suportes previamente esterilizados uma quantidade de suspensão de modo a cobrir todo o material. Deixou-se durante duas horas a 35°C e 50 rpm de modo a que a bactéria aderisse à superfície do material. Depois deste passo os suportes foram lavados duas vezes assepticamente e foram transferidos para uma coluna de vidro encamisada para controlo da temperatura.

Fez-se passar, primeiro em circuito fechado e de seguida em contínuo, meio de cultura de modo a promover o crescimento celular à superfície dos suportes. A bactéria cresceu no meio de cultura (que indica a presença do microrganismo no suporte) mas não formou biofilme.

Uma vez que não houve adesão da bactéria aos suportes imobilizou-se a mesma em matrizes de géis. Começou-se por testar o alginato de cálcio uma vez que é um gel bastante usado neste tipo de fermentações (Kierstan et al., 1982, Lee e Woodward, 1983, Kierstan e Buck, 1977, Woodward, 1985).

O procedimento de imobilização foi o seguinte (Kierstan e Buck, 1977): misturaram-se iguais volumes de solução de alginato de sódio (Sigma) a 4% (w/v) e de suspensão celular com cerca de 20 g de células/100 ml. Usando uma seringa de 10 ml pingou-se a mistura a uma altura de 20 cm em solução de CaCl_2 0.2 mol/l. Um litro de solução CaCl_2 é o volume adequado para 100 ml de mistura. Deixou-se endurecer as esferas de alginato de cálcio durante cerca de 20 minutos na solução de CaCl_2 e lavaram-se as esferas duas vezes em água destilada e esterilizada. As esferas resultantes apresentaram um diâmetro médio de cerca de 4 mm.

Realizaram-se duas experiências com as esferas de alginato de potássio preparadas: uma fermentação batch e outra em contínuo. Ao meio de cultura foi adicionado além dos ingredientes habituais, 4 g/l de carbonato de cálcio (El-Sayed et al., 1990) e reduziu-se a quantidade de Na_2HPO_4 para 4 g/l. Estas alterações devem-se ao facto de que os iões Na^+ fragilizam a matriz do gel tal como os fosfatos que se ligam aos iões cálcio existentes na matriz. Mesmo assim nas duas experiências houve problemas de ruptura da matriz do gel e rebentamento das esferas ao fim de 2.5 horas de fermentação. De facto a presença de fosfatos e iões sódio indispensáveis para o crescimento desta estirpe não permite a produção de dextrano e frutose com a bactéria imobilizada em alginato de cálcio.

Procurou-se um gel alternativo para a imobilização da bactéria que seja estável em presença de iões monopositivos tais como o sódio ou o potássio. A χ -carragenina é uma boa alternativa uma vez que é insolúvel em presença de iões potássio. O método

de imobilização seguido (Wang e Hettwer, 1982; Tosa et al., 1979; Woodward, 1985) foi: preparou-se a solução de χ -carragenina a 4% (w/v) em 0.9% (w/v) NaCl e manteve-se a 40°C; misturou-se a solução de χ -carragenina com a suspensão celular (cerca de 20 gr de células/100 ml de água) na razão de 9:1. Ainda a 40°C pingou-se a mistura com uma seringa de 10 ml numa solução de KCl (2%, w/v) à temperatura ambiente (22°C). Deixou-se endurecer as esferas de carragenina durante cerca de 20 minutos na solução de KCl e lavaram-se as esferas duas vezes em água destilada e estéril. As esferas resultantes apresentaram um diâmetro médio de cerca de 4 mm.

Foram realizadas duas experiências: batch e em contínuo. A fermentação batch foi realizada em frasco de pirex de 2 litros em que a temperatura e a agitação foram controlados com um banho termoestático. O volume de esferas disponíveis foi de 500 ml e foram deixadas na véspera da experiência mergulhadas em MRS broth (ver composição em tabela 2.1) de modo a activar a bactéria. Preparou-se um litro de meio de cultura com 30 g de sacarose, 10.5 g de extracto de levedura e o Na_2HPO_4 foi substituído por K_2HPO_4 em excesso (20g/l). A temperatura de operação foi de 35°C, a agitação de 150 rpm, não houve controlo de pH. Na figura E.1 pode observar-se o resultado obtido na fermentação batch com a bactéria imobilizada em carragenina.

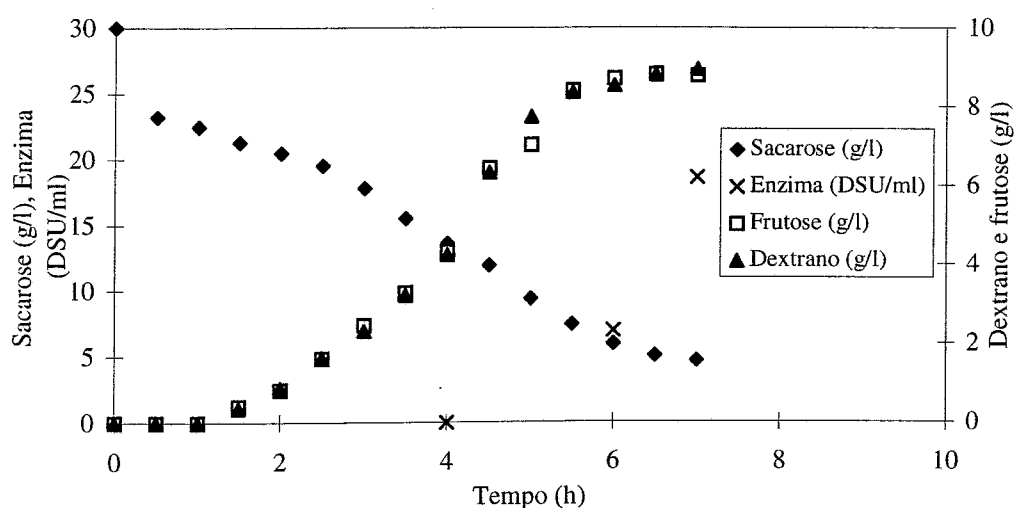


Figura E.1 - Perfis de concentração obtidos para a fermentação batch da sacarose com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) imobilizada em carragenina.

Ao fim de sete horas a sacarose estava praticamente esgotada. A quantidade de dextrano e frutose (cerca de 9 g/l) obtida está dentro dos valores esperados mas o mesmo não se passa com a enzima. No final da fermentação a quantidade de enzima no meio de cultura era somente 18.6 DSU/ml, valor muito diferente do obtido numa fermentação batch com a bactéria em suspensão (cerca de 50 DSU/ml). Para verificar se a enzima ficou retida no interior das esferas de carragenina amassou-se num almofariz 1 ml de esferas e repeti o teste à enzima. A actividade obtida foi 146.1 DSU/ml de esferas. Multiplicando pelo volume de esferas e dividindo pelo volume de trabalho obteve-se o valor de 48.7 DSU/ml para a actividade enzimática.

Lavaram-se as esferas duas vezes com água destilada e estéril e guardaram-se a 4°C para serem reutilizadas na fermentação em contínuo. A bactéria foi novamente activada com o meio MRS broth e antes das esferas serem transferidas para a coluna de pirex encamisada, foram novamente lavadas duas vezes com água destilada e estéril. Aqui surgiu um problema, tantas lavagens com água fragilizaram a matriz do gel e as esferas começaram a desfazer-se.

Produziram-se novas esferas de carragenina (500 ml) que foram também activadas mas lavadas dentro da coluna fazendo passar uma solução de KCl 2% (w/v).

A coluna usada é encamisada e tem 50 cm de altura e 4.8 cm de diâmetro interno (volume=900 ml).

O caudal médio de alimentação ascendente foi de 1.9 ml/min e fluidizaram-se as esferas (de modo a homogeneizar o meio) aplicando um caudal de refluxo de 325 ml/min. A temperatura foi de 35°C e não houve controlo de pH. O meio de cultura na alimentação continha 18.5 g/l de sacarose, 13.3 g/l de K₂HPO₄ e 10.5 g/l de extracto de levedura.

Como se pode observar na figura E.2 depois de 10 horas de fermentação atingiu-se o estado estacionário. A produção de enzima continua a ser baixa (cerca de 16 DSU/ml) confirmando os resultados obtidos na fermentação batch. Depois de 24 horas de fermentação em contínuo, apesar da sacarose ser consumida, as concentrações de

dextrano, frutose e enzima baixaram. Estes resultados indicam que a matriz do gel de carragenina ao fim de algumas horas de operação satura, não só com o crescimento celular mas também com a acumulação de dextrano e enzima na matriz do gel.

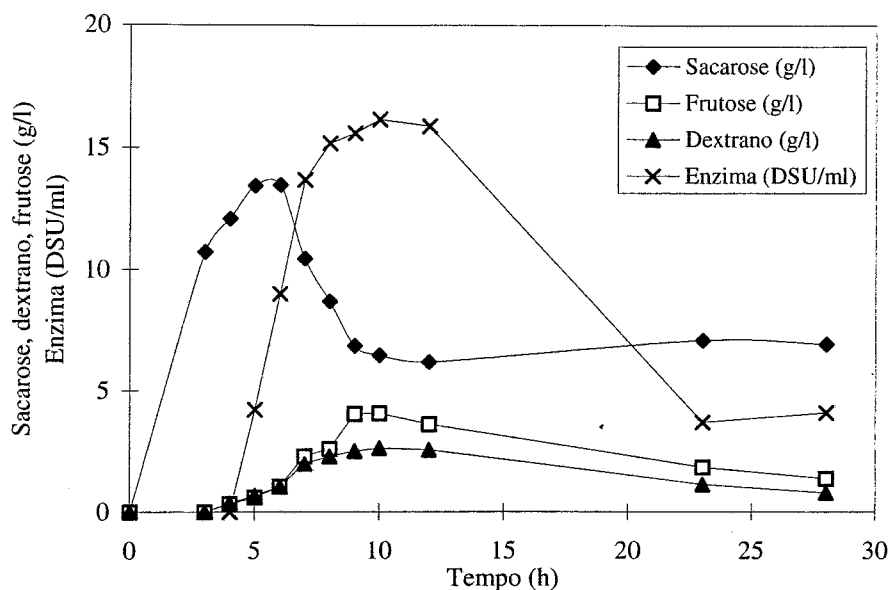


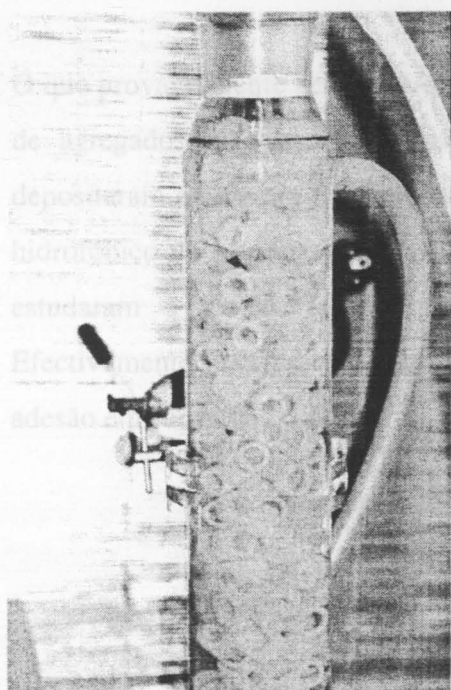
Figura E.2 - Perfis de concentração obtidos para a fermentação em contínuo da sacarose com a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) imobilizada em carragenina.

Apesar da carragenina apresentar uma matriz mais resistente ao meio necessário para fermentar a sacarose continua a não ser o suporte ideal para produzir dextrano e frutose em contínuo. O tempo de vida das esferas é curto uma vez que ao fim de 24 horas de operação a matriz do gel já está saturada e seria necessário rearrancar o fermentador com novas esferas.

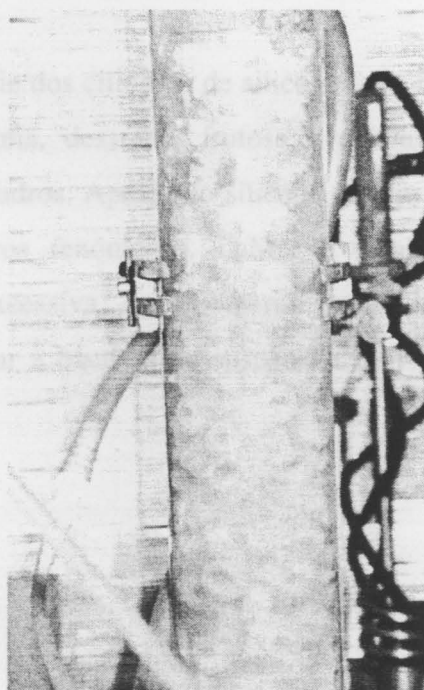
Durante as experiências realizadas observou-se que uma fina camada de células aderiu às paredes das mangueiras de silicone usadas no aparato experimental. De facto Azeredo *et al.* (1999) concluíram que em muitos casos as interações hidrofóbicas têm um papel importante na adesão dos microorganismos. O silicone (material hidrofóbico) ao contrário do vidro (material hidrofílico) deverá apresentar melhores propriedades para a adesão da bactéria.

Realizou-se uma ultima experiência de imobilização em que o suporte usado foi o silicone (cilindros ocos de silicone com 1 cm de altura, 2 mm de espessura e 6 mm de diâmetro interno). Assim mergulharam-se os cilindros de silicone na suspensão celular previamente preparada durante duas horas de modo a que alguma biomassa aderisse na superfície do material. De seguida lavaram-se duas vezes os cilindros com água destilada e estéril e transferiram-se para a mesma coluna de vidro usada anteriormente. Arrancou-se o sistema com 20 g/l de sacarose na alimentação, 35°C e um caudal de 1.5 ml/min.

Somente ao fim de duas semanas se observou na superfície dos cilindros o que poderia ser um biofilme (ver figura E.3). Deixou-se o sistema em contínuo durante mais uma semana para observar o crescimento do mesmo mas não houve um aumento considerável. Efectuaram-se algumas experiências em contínuo depois de lavar cuidadosamente o biofilme com água destilada e estéril.



(E.3a)



(E.3b)

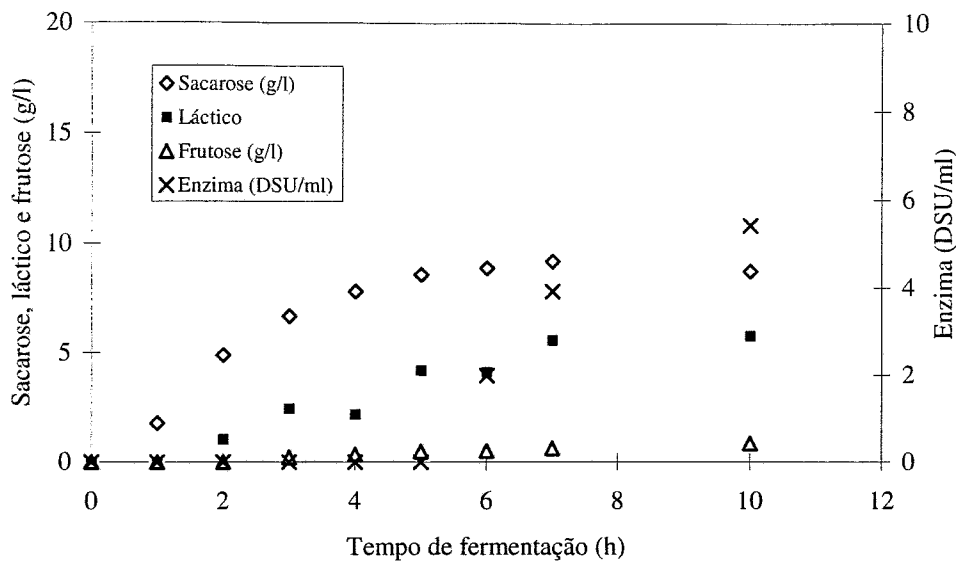
Figura E.3 – Imagem captada da coluna com anéis de silicone: a) sem biofilme, b) com biofilme.



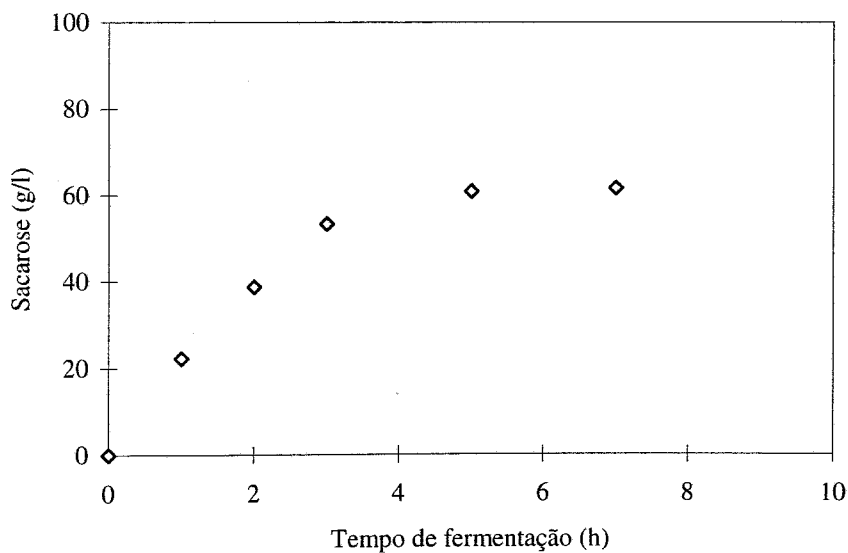
Testaram-se dois caudais (1.5 e 4 ml/min) e duas concentrações de sacarose na alimentação (20 e 100 g/l). A sacarose foi consumida e chegou a níveis de cerca de 8 e 60 g/l respectivamente nas experiências realizadas a 20 e 100 g/l e caudal de 4 ml/min (figuras E.4a e E.4b); nas correntes de saída para a experiência a 20 g/l encontrou-se alguma actividade da dextranosacarase (cerca de 6 DSU/ml), não se encontrou dextrano e os níveis de frutose foram de cerca de 1 g/l; para a experiência a 100 g/l à saída só existia sacarose.

Para investigar o que se passou foram retiradas amostras do biofilme de massa conhecida e foram dissolvidas em água para verificar se havia dextrano ou frutose na sua composição. Não foi possível diluir as amostras a frio. Foram parcialmente dissolvidas a quente e da análise dos resultados encontrou-se num grama de biomassa 0.1 gr de dextrano, 0.085 gr de frutose e resultante do consumo da frutose pela bactéria, 0.17 gr de ácido láctico. Estes não são os valores exactos uma vez que não foi possível dissolver toda a amostra.

O que provavelmente aconteceu na superfície dos cilindros de silicone foi a formação de agregados insolúveis contendo a enzima, dextrano, frutose e células que se depositaram e colaram nas paredes dos cilindros. Apesar do silicone ser um material hidrofóbico é importante considerar outros fenómenos. LaMer e Healy (1963) estudaram a influência da produção excessiva de polímeros pelas bactérias. Efectivamente essa produção pode dispersar a bactéria na suspensão e evitar a sua adesão em superfícies sólidas.



(E.4a)



(E.4b)

Figura E.4 – Perfis obtidos à saída da coluna encamisada nas experiências realizadas com anéis de silicone: a) concentração inicial de sacarose=20g/l, b) concentração inicial de sacarose=100g/l. Caudal=4 ml/min.

E.2 Imobilização da enzima dextranosacarase em poliacrilamida usando a radioactividade como agente polimerisante

Alguns autores têm vindo a estudar a imobilização de células e de enzimas, nomeadamente a enzima extracelular dextranosacarase (Freeman e Aharonowitz, 1981; Kaboli e Reilly, 1980; Reilly *et al.*, 1981; Monsan e Lopez, 1981). Freeman e Aharonowitz (1981) e Kaboli e Reilly (1980) usaram na imobilização em poliacrilamida reagentes químicos como agentes polimerisantes. Neste trabalho pretende-se imobilizar a enzima dextranosacarase no mesmo suporte mas usando radiação de ^{60}Co como agente polimerisante (trabalho realizado no Centro de Investigações Nucleares, Faculdade de Ciências, Universidade da Republica, Montevideo, Uruguay).

Em primeiro lugar produziu-se a enzima dextranosacarase. Para isso deixou-se fermentar durante 10 horas um litro de meio de cultura com 20 g/l de sacarose, 7 g/l de extracto de levedura e 8 g/l de Na_2HPO_4 . No final da fermentação centrifugou-se o meio para retirar as células e ao sobrenadante adicionou-se o mesmo volume de etanol a 95%. Procedimento semelhante ao usado na precipitação etanólica efectuada no capítulo 4. Reservou-se a enzima purificada.

Para a imobilização prepararam-se 100 ml de uma solução a 20% em acrilamida e 1.5% em bisacrilamida. A essa solução adicionou-se 1 ml de uma solução 0.1% em amido e 20 ml da solução resultante da purificação da enzima. Congelou-se a solução a -16°C e expôs-se a mesma a 5 kev, em que a fonte de radiação foi ^{60}Co com 1.4 kev/h. O tempo de exposição foi então cerca de 3.5 horas. O gel obtido foi cortado em cilindros de 2.5 mm de diâmetro e 5 mm de altura. Conservaram-se a 4°C em solução tampão fosfato a $\text{pH}=5.5$.

A actividade enzimática no crude obtido no final da fermentação foi de 44.7 DSU/ml. Depois de purificada a concentração passou a ser de 62.3 DSU/ml. A actividade encontrada nas partículas gelificadas foi de 3 DSU/g, valor muito baixo o que indica perda de actividade da enzima no processo de gelificação.

Procedeu-se à fermentação enzimática já nas instalações do LSRE. A concentração inicial de sacarose foi de 20 g/l, o volume de trabalho foi de 1 litro, a massa de enzima imobilizada foi de 50 gr dividida por dois sacos de malha de plástico para que as pás de agitação não danificassem as partículas. A temperatura de operação foi 35°C e o pH=5.5. A agitação foi de 40 rpm.

Ao fim de algumas horas a sacarose ainda não tinha começado a ser consumida. Esperou-se então até às 24 horas de fermentação para ver o que acontece. Nesta altura, a concentração de frutose encontrada no meio foi de 1.22 g/l. Não foi encontrado dextrano no meio mas sim igual quantidade de glucose.

Tudo indica que a enzima dextranosacarase apresenta propriedades hidrolíticas sobre a sacarose (semelhantes às da invertase) quando imobilizada por este método. Luzio e Mayer (1983) concluíram também que a enzima dextranosacarase apresentava propriedades hidrolíticas quando se encontra imobilizada em discos usados em electroforese em que o gel é a poliacrilamida.

E.3 Conclusões

Neste apêndice foram feitos alguns ensaios para determinar qual o suporte mais adequado para a imobilização da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) ou da enzima extracelular dextranosacarase.

Quanto à enzima apenas um suporte foi testado: gel de poliacrilamida. Conclui-se que para o processo em estudo o método usado não é de todo interessante uma vez que os produtos obtidos não são os desejados no projecto. A enzima dextranosacarase imobilizada por este método apresenta propriedades hidrolíticas sobre a sacarose e produz glucose e frutose.

Foram testados vários suportes para produzir dextrano e frutose com a bactéria imobilizada. Desde os géis às superfícies de vidro poroso (Poraver) até a superfícies lisas e hidrofóbicas nenhuma provou ser adequada à imobilização da bactéria. Torna-se necessário fazer estudos mais profundos das características da superfície celular no bem como das características das superfícies sólidas a usar como suporte. Alguns autores (Rijnaarts et al., 1995; Faurie et al., 1996; Millsap et al., 1996; Martine et al., 1997) têm vindo a fazer estes estudos que provaram ser importantes no que diz respeito à imobilização celular em superfícies sólidas.

Referências bibliográficas

Azeredo, J.; Visser, J.; Oliveira, R.; 1999, "Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories.", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, a aguardar publicação.

Busscher, H. J.; Quirynen, M.; Van Der Mei, H. C.; 1992, "Formation and prevention of dental plaque - A physico-chemical approach", L. F. Melo et al. (eds.), Biofilms - Science and Technology, 327-354.

Constantinides, A.; 1980, "Steroid transformation at high substrate concentrations using immobilized *Corynebacterium simplex* cells.", Biotechnology and Bioengineering, vol. 22, 119-136.

Denyer, S. P.; Finch, R. G.; Davies, M. C.; Evans-Hurrell, J. A.; Williams, P.; 1992, "Attachment in infection: the influence of environment on staphylococcal surface plasticity", L. F. Melo et al. (eds.), Biofilms - Science and Technology, 355-361.

El-Sayed, A. M. M.; Mahmoud, W. M.; Coughlin, R. W.; 1990a, "Comparative study of production of dextransucrase and dextran by cells of *Leuconostoc mesenteroides* immobilized on celite and in calcium alginate beads.", Biotec. Bioengineering, 36, pag. 83-91.

El-Sayed, A. M. M.; Mahmoud, W. M.; Coughlin, R. W.; 1990b, "Production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized in calcium alginate beads: I. Batch and Fed-Batch fermentations.", Biotec. Bioengineering, 36, pag. 338-345.

El-Sayed, A. M. M.; Mahmoud, W. M.; Coughlin, R. W.; 1990c, "Production of dextransucrase and dextran by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized in calcium alginate beads: II. Semi-Continuous Fed-Batch fermentations.", Biotec. Bioengineering, 36, pag. 346-353.

El-Sayed, A. M. M.; Mahmoud, W. M.; Coughlin, R. W.; 1992, "Investigation of production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized within porous stainless steel.", *Biotec. Bioengineering*, 40, pag. 617-624.

Faurie, J.; Leveau, J.; Bouix, M.; 1996, "The macromolecular environment and the electrophoretic mobility of microorganisms: example of *Leuconostoc mesenteroides* - dextran concentration and molecular weight increase the electrophoretic mobility.", vol. 10-7, 501-506.

Freeman, A.; Aharonowitz, Y.; 1981, "Immobilization of microbial cells in crosslinked, prepolymerized, linear polyacrilamide gels: antibiotic production by immobilized *Streptomyces clavuligerus* cells.", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 23, 2747-2759.

Kaboli, H.; Reilly, P.; 1980, "Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 22, 1055-1069.

Kierstan, M.; Bucke, C.; 1977, "The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 19, 387-397.

Kierstan, M.; McHale, A.; Coughlan, M.; 1982, "The production of ethanol from cellobiose using immobilized β -glucosidase coentrapped with yeast in alginate gels.", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 24, 1461-1463.

LaMer, V. K.; Healy, T. W.; 1963, "Adsorption flocculation of macromolecules at the solid-liquid surface.", *Rev. Pure and Appl. Chem.*, 13, 112-133.

Lebrun, L.; Junter, G. A.; Jouenne, T.; Mignot, L.; 1994, "Exopolysaccharide production by free and immobilized microbial cultures.", *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1048-1054.

- Lee, J. M.; Woodward, J.; 1983, "Properties and application of immobilized β -D-glucosidase coentrapped with *Zymomonas mobilis* in calcium alginate.", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 25, 2441-2451.
- Luzio, G. A.; Mayer, R. M.; 1983, "The hydrolysis of sucrose by dextransucrase", *Carbohydrate Research*, vol. 111, 311-318.
- Martine, M.; van der Mei, H.; Reid, G.; Busscher, H.; 1997, "Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* to solid substrata by an adsorbed biosurfactant layer from *Lactobacillus acidophilus*.", *Urology*, vol. 49-5, 790-794.
- Matsunaga, T.; Karube, I.; Suzuki, S.; 1980, "Some observations on immobilized hydrogen-producing bacteria: behavior of hydrogen in gel membranes.", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 22, 2607-2615.
- Mendez, R.; Lema, J. M.; 1992, "Biofilm reactors technology in wastewater treatment", L. F. Melo et al. (eds.), *Biofilms - Science and Technology*, 409-419.
- Millsap, K.; Reid, G.; van der Mei, H.; Busscher, H.; 1997, "Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow.", *Biomaterials*, vol. 18-1, 87-91.
- Monsan, P.; Lopez, A.; 1981, "On the production of dextran by free and Immobilized dextransucrase", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 23, 2027-2037.
- Monteiro, A.; 1998, "Degradação biológica de fenol com bactérias imobilizadas em suportes de poros largos.", Tese de Doutorado.
- Wang, H. Y.; Hettwer, D. J.; 1982, "Cell immobilization in χ -carrageenan with tricalcium phosphate.", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 24, 1827-1838.
- Wilcox, M. H.; 1992, "Coagulase-Negative staphylococci: adherence and slime production.", L. F. Melo et al. (eds.), *Biofilms - Science and Technology*, 363-370.

Woodward, J.; 1985, "Immobilized cells and enzymes: a practical approach.", IRL PRESS, Washington DC, USA.

Reilly, P.; Landis, D.; Chang, H.; Ghim, Y.; Cho, Y.; 1981, "Immobilization of *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase to porous phenoxycetyl cellulose beads.", Biotechnology and Bioengineering, vol. 23, 2647-2653.

Rijnaarts, H.; Norde, W.; Lyklema, J.; Zehnder, A.; 1995, "The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion.", Colloides and Surfaces B: Biointerfaces, 4, 191-197.

Rönner, U.; Husmark, U.; 1992, "Adhesion of *Bacillus cereus* spores - a hazard to the dairy industry.", L. F. Melo et al. (eds.), Biofilms - Science and Technology, 403-406.

Timperley, D. A.; Thorpe, R. H.; Holah, J. T.; 1992, "Implications of engineering design in food industry hygiene.", L. F. Melo et al. (eds.), Biofilms - Science and Technology, 379-393.

Tosa, T.; Sato, T.; Mori, T.; Yamamoto, K.; Takata, I.; Nishida, Y.; Chibata, I.; 1979, "Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix.", Biotechnology and Bioengineering, vol. 21, 1697-1709.





FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000049014

FACULDADE DE ENGENHARIA

Rua dos Bragas - 4099 PORTO CODEX - PORTUGAL

Telef.: 351 22 204 16 00 • Fax: 351 22 205 92 80 • Telex: 27323 FEUP P