

ESTUDO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA INVERTASE
EXTRACELULAR POR *Kluyveromyces bulgaricus*

19/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

ESTUDO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA INVERTASE EXTRACELULAR
POR *Kluyveromyces bulgaricus*

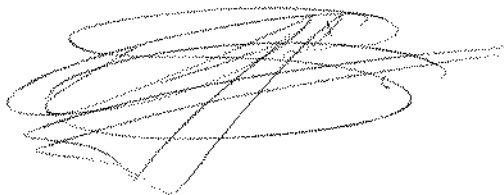
JONAS CONTIERO n.º 767

ORIENTADOR: Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO

Parecer

Este exemplar corresponde
a relação final da
tese defendida por
Jonas Contiero e
aprovada pela Co-
missão Julgadora
em 15.06.92

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do grau
de Doutor em Engenharia de
Alimentos.



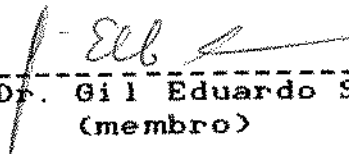
Campinas

1992

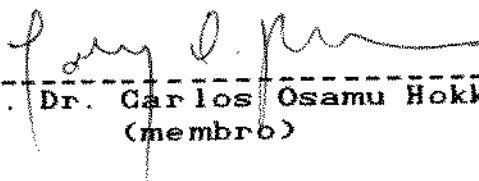
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(orientador)



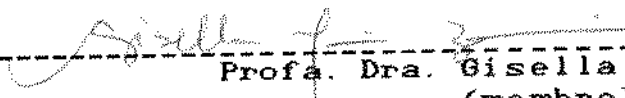
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(membro)



Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka
(membro)



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
(membro)



Profa. Dra. Gisella Maria Zanin
(membro)



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(membro)



Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes
(membro)

15 junho
Campinas, 12 de maio de 1992.

A meus pais, PRIMO e ANGELA, à
minha esposa ELIANA e a meu
filho MATHEUS, dedico este
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Francisco Maugeri Filho, pela orientação desse trabalho.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Departamento de Engenharia, que possibilitou o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação do Instituto de Química de Araraquara, pela concessão do afastamento.

Ao PICD/CAPEES, pela bolsa concedida.

Aos colegas de pós-graduação, Fernando Antônio Cabral, Isabel Rodrigues, Eloisio Júlio Ribeiro e Fátima Aparecida de Almeida Costa, pelo companheirismo e colaboração.

Aos funcionários do laboratório de Bioengenharia do D.E.A., Antônio José Quirino Simões e Maria Domingos Gonçalves, pelos trabalhos prestados.

A Maria do Carmo Leopoldo, funcionária do D.Q.T.A., pelos trabalhos prestados.

A Eliana e Matheus, por terem abdicado de muitas coisas, em favor do desenvolvimento desse trabalho.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram no desenvolvimento desse trabalho.

SUMARIO

Indice	i
Indice de Tabelas	ix
Indice de Figuras	xv
Resumo	xxiii
Summary	xxv
I - Introdução	1
II - Revisão Bibliográfica	3
III - Material e Métodos	61
IV - Resultados e Discussão	96
V - Conclusões	227
VI - Referências Bibliográficas	231

INDICE

	pág.
I - Introdução	1
II - Revisão Bibliográfica	3
2.1 - Aplicação de enzimas	3
2.2 - Microrganismos produtores	7
2.3 - Aspectos gerais	9
2.4 - Especificidade	10
2.5 - Ocorrência	11
2.6 - Obtenção	14
2.7 - Purificação da enzima	19
2.8 - Características da enzima	21
2.8.1 - Estabilidade térmica da enzima	22
2.9 - Emprego da Invertase	26
2.10 - Fermentação	28
2.10.1 - Classificação dos processos fermentativos	28
2.10.2 - Processo contínuo	29
2.11. - Reator microbiológico	30
2.12 - Reatores utilizados em fermentação	32
2.12.1 - Quimiostato	32
2.12.2 - Quimiostato com reciclo de células	33
2.12.3 - Sistema multiestágio	33
2.12.4 - Reatores tubulares	35
2.13 - Técnicas de imobilização	39
2.13.1 - Agregação	40

2.13.2 - Adesão à superfície	41
2.13.2.1 - Mecanismos de adesão	41
2.13.3 - Aprisionamento celular	41
2.13.3.1 - Encapsulação	42
2.13.3.2 - Aprisionamento em membranas	42
2.13.3.3 - Aprisionamento em materiais porosos	42
2.13.4 - Características da imobilização	43
2.13.5 - Cinética do biofilme	43
2.13.6 - Estudo sobre transferência de massa	43
2.13.7 - Cinética dos processos fermentativos	44
2.13.7.1 - Velocidades das transformações	44
2.13.7.2 - Equação de Monod	47
2.14 - Inibição pelo substrato	52
2.14.1 - Mecanismos de inibição pelo substrato	52
2.14.2 - Modelo cinético para inibição pelo substrato	53
2.15 - Inibição pelo produto	57
2.15.1 - Modelo cinético de inibição pelo produto	57
III - Material e Métodos	61
3.1 - Processos fermentativos	61
3.1.1 - Reagentes	61
3.1.2 - Microrganismo	61
3.1.3 - Manutenção da cultura	61
3.1.4 - Condição de cultura	61
3.1.5 - Preparo do inóculo	62
3.1.6 - Meio de cultura utilizado nos processos	62

3.1.7 - Preparo do meio de cultura	63
3.1.8 - Determinação da taxa de crescimento do microrganismo	64
3.1.9 - Processo de produção da enzima invertase por batelada alimentada	67
3.1.10 - Fermentação contínua em reator duplo estágio	69
3.1.11 - Cálculo da taxa de diluição	70
3.1.12 - Cálculo da produtividade	71
3.1.13 - Cálculo do rendimento	71
3.1.14 - Fermentação contínua utilizando células imobilizadas	72
3.1.14.1 - Suporte utilizado para imobilização	75
3.1.15 - Estudo do comportamento do reator	75
3.1.16 - Cálculo da taxa de diluição	77
3.1.17 - Cálculo da produtividade	77
3.1.18 - Cálculo do rendimento	78
3.1.19 - Retirada de amostra	78
3.1.20 - Métodos analíticos para os processos	78
3.1.20.1 - Curva padrão para massa seca	78
3.1.20.2 - Crescimento celular	79
3.1.20.3 - Determinação do açúcar redutor total (ART)	80
3.1.20.4 - Determinação da atividade enzimática	80
3.2 - Cinética microbiana	81
3.2.1 - Influência do substrato na produção da enzima	81
3.2.1.1 - Retirada da amostra	83

3.2.1.2 - Determinação da glicose através de teste enzimático colorimétrico	83
3.2.2 - Estudo cinético da fermentação empregando a técnica de pulso	85
3.2.2.1 - Meio de cultura utilizado	85
3.2.2.2 - Injeção de substrato por pulso	86
3.2.3 - Estudo cinético da fermentação empregando a técnica de degrau	87
3.2.3.1 - Meio de cultura utilizado no experimento	88
3.2.3.2 - Preparo do inóculo	89
3.3 - Caracterização da enzima invertase produzida por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045	89
3.3.1 - Produção da enzima utilizada no estudo de caracterização	89
3.3.2 - Preparo do inóculo	90
3.3.2.1 - Fermentação em reator	90
3.3.2.2 - Precipitação da enzima com etanol	90
3.3.2.3 - Método de purificação da enzima	91
3.3.2.4 - Eluição da enzima da coluna de DEAE-celulose gradiente salino	92
3.3.2.5 - Estabilidade térmica da enzima	93
3.3.2.6 - Determinação do K_m e V_{max} da enzima	94
3.3.3 - Preparação da resina DEAE-celulose	94
3.3.4 - Determinação da atividade enzimática	94
3.3.5 - Determinação de proteína	95

IV - Resultados e Discussão	96
4.1 - Determinação da taxa específica de crescimento do microrganismo	96
4.2 - Produção da enzima invertase através de fermentação em processo batelada	97
4.2.1 - Produção da enzima por processo batelada simples	97
4.2.2 - Fermentação em batelada alimentada	99
4.3 - Estudo da produção da enzima invertase em reator contínuo duplo estágio	118
4.3.1 - Experimento utilizando concentração de melaço 30,0 g/l	118
4.3.2 - Experimento utilizando concentração de melaço 60,0 g/l	123
4.3.3 - Experimento utilizando concentração de melaço 90,0 g/l	127
4.3.4 - Experimento utilizando concentração de melaço 140,0 g/l	131
4.3.5 - Comparação do efeito da concentração do substrato na produção da enzima	135
4.4 - Fermentação em reator contínuo com células imobilizadas	139
4.4.1 - Estudo da comportamento do reator	139
4.4.2 - Quantidade de células imobilizadas no suporte	141
4.4.3 - Fermentação	143

4.5.3 - Verificação da influência de sacarose, glicose e frutose no crescimento do microrganismo e produção da invertase através da técnica de perturbação por degrau, em fermentação contínua	183
4.5.3.1 - Estudo da influência da sacarose	183
4.5.3.2 - Estudo da influência do substrato glicose através da técnica de degrau	188
4.5.3.3 - Estudo da influência do substrato frutose através da técnica de degrau	193
4.6 - Modelagem do crescimento celular e da produção da enzima invertase por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	198
4.6.1 - Determinação dos parâmetros μ_{max} e K_S para o substrato sacarose	198
4.6.2 - Determinação dos parâmetros μ_{max} e K_S para o substrato glicose	202
4.6.3 - Determinação dos parâmetros μ_{max} e K_S para o substrato frutose	204
4.6.4 - Modelo de produção da enzima invertase	206
4.7 - Caracterização da enzima invertase produzida por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045	213
4.7.1 - Purificação com etanol	213
4.7.2 - Purificação em coluna de troca iônica	214
4.7.3 - Estabilidade térmica da enzima após precipitação com etanol e após coluna DEAE-celulose seguida de precipitação com etanol	217

4.7.4 - Caracterização cinética da enzima após precipitação com etanol	225
V - Conclusões	227
VI - Referências Bibliográficas	231

ÍNDICE DE TABELAS

II - Revisão Bibliográfica

2.1 - Estimativa do mercado anual das enzimas de maior aplicação industrial	4
2.2 - Utilização industrial das enzimas	5
2.3 - Enzimas comumente utilizadas em alimentos	7
2.4 - Aplicação de enzimas em alimentos	7
2.5 - Enzimas microbianas utilizadas industrialmente	8
2.6 - Produção de invertase extracelular por leveduras	16
2.7 - Modelos cinéticos de inibição pelo substrato	54
2.8 - Modelos matemáticos para cinética de inibição	59

IV - Resultados e Discussão

4.1 - Evolução do crescimento celular de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 para determinação da taxa de crescimento	96
4.2 - Fermentação em batelada simples, utilizando meio de cultura M ₂ , temperatura de 30°C e aeração de 0,2 a 0,3 vvm	97
4.3 - Fermentação em batelada alimentada com solução de sacarose 240,0 g/l desde o início, vazão de 10,0 ml/h	99
4.4 - Fermentação com alimentação de solução de sacarose 240,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h a partir da sexta hora	102

4.5 - Fermentação com alimentação de solução de sacarose 240,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, com início a partir do tempo 5,40 h e término 30,0 h	104
4.6 - Fermentação com alimentação de melaço com concentração 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na sexta hora e término na trigésima hora	106
4.7 - Fermentação em batelada alimentada, concentração de melaço 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora e término no final do experimento	108
4.8 - Experimento em batelada alimentada, concentração de melaço 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora e término na vigésima sexta hora	110
4.9 - Fermentação em batelada alimentada, concentração de melaço 440,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora até final do experimento	112
4.10 - Vazão de alimentação de melaço em função do tempo, na alimentação	116
4.11 - Fermentação com alimentação exponencial, com concentração de melaço 440,0 g/l, início da alimentação na segunda hora e término na décima segunda hora	116
4.12 - Fermentação em reator duplo estágio utilizando concentração de melaço 30,0 g/l	120

4.13 - Fermentação utilizando concentração de melaço	
60,0 g/l	124
4.14 - Fermentação utilizando concentração de melaço	
90,0 g/l	127
4.15 - Fermentação utilizando concentração de melaço	
140,0 g/l	132
4.16 - Concentração de sacarose na saída do reator,	
em função do tempo	139
4.17 - Fermentação utilizando concentração de melaço	
20,0 g/l	144
4.18 - Fermentação utilizando concentração de melaço	
30,0 g/l	147
4.19 - Fermentação utilizando concentração de melaço	
60,0 g/l	151
4.20 - Fermentação utilizando concentração de melaço	
90,0 g/l	155
4.21 - Valores máximos obtidos nos processos	163
4.22 - Valores de pH em função do tempo de fermentação	169
4.23 - Valores de atividade enzimática em função do tempo	171
4.24 - Valores de ln (D.O) em função do tempo	173
4.25 - Influência do substrato glicose na fermentação	
contínua	176
4.26 - Influência do substrato frutose na fermentação	
contínua	178

4.27 - Influência do substrato sacarose na fermentação continua	180
4.28 - Efeito do pulso na produção específica da enzima	182
4.29 - Influência do substrato sacarose, concentração 10,0 g/l	184
4.30 - Influência do substrato sacarose, concentração 30,0 g/l	185
4.31 - Influência do substrato sacarose, concentração 50,0 g/l	186
4.32 - Influência do substrato sacarose, concentração 70,0 g/l	187
4.33 - Influência do substrato glicose, concentração 10,0 g/l	189
4.34 - Influência do substrato glicose, concentração 30,0 g/l	190
4.35 - Influência do substrato glicose, concentração 50,0 g/l	191
4.36 - Influência de substrato glicose, concentração 70,0 g/l	192
4.37 - Influência do substrato frutose, concentração 10,0 g/l	194
4.38 - Influência do substrato frutose, concentração 30,0 g/l	195
4.39 - Influência do substrato frutose, concentração 50,0 g/l	196

4.40 - Influência do substrato frutose, concentração	
70,0 g/l	197
4.41 - Experimento utilizando concentração de sacarose	
10,0 g/l	198
4.42 - Experimento utilizando concentração de sacarose	
30,0 g/l	201
4.43 - Experimento utilizando concentração de sacarose	
50,0 g/l	201
4.44 - Experimento utilizando substrato glicose,	
concentração 10,0 g/l	202
4.45 - Experimento utilizando substrato glicose	
concentração 30,0 g/l	203
4.46 - Experimento utilizando substrato glicose	
concentração 50,0 g/l	203
4.47 - Experimento utilizando substrato frutose	
concentração 10,0 g/l	204
4.48 - Experimento utilizando substrato frutose	
concentração 30,0 g/l	204
4.49 - Experimento utilizando substrato frutose	
concentração 50,0 g/l	204
4.50 - Valores de parâmetros cinéticos obtidos	205
4.51 - Valores de q_p calculados para sacarose (30,0 g/l)	207
4.52 - Valores de q_p calculados para glicose (30,0 g/l)	207
4.53 - Valores de q_p calculados para frutose (30,0 g/l)	207

4.54 - Porcentagem de etanol utilizado para precipitação da enzima e rendimento correspondente	213
4.55 - Etapas de purificação da enzima	216
4.56 - Estabilidade à temperatura de 56 °C	217
4.57 - Estabilidade à temperatura de 58 °C	217
4.58 - Estabilidade à temperatura de 60 °C	218
4.59 - Estabilidade à temperatura de 62 °C	218
4.60 - Valores de K_d em função da temperatura	219
4.61 - Estabilidade da enzima purificada, temperatura 56 °C	221
4.62 - Estabilidade da enzima purificada, temperatura 58 °C	221
4.63 - Estabilidade da enzima purificada, temperatura 60 °C	221
4.64 - Estabilidade da enzima purificada, temperatura 62 °C	222
4.65 - Valores de K_d em função da temperatura	222
4.66 - Tempos de meia vida ($t_{1/2}$) estimados para as duas etapas de purificação	224
4.67 - Taxas iniciais de reação em função da concentração do substrato	225

ÍNDICE DE FIGURAS

II - Revisão Bibliográfica

2.1 - Campos de aplicação das enzimas	5
2.2 - Tipos de reatores utilizados em fermentação contínua	31
2.3 - Esquema do quimiostato	32
2.4 - Esquema do reator com reciclo de células	33
2.5 - Esquemas de diferentes tipo de reatores multiestágio	34
2.6 - Esquema dos reatores tubulares	37
2.7 - Diagrama esquemático do fermentador tipo torre	38
2.8 - Representação da variação da concentração das substâncias S e P da reação com o tempo	45
2.9 - Representação esquemática da equação de Monod	48
2.10 - Efeito da concentração do substrato na velocidade específica de crescimento	49
2.11 - Efeito da concentração do substrato na velocidade específica de crescimento - forma de Lineweaver-Burk	50
2.12 - Diagrama esquemático mostrando o efeito da concentração do substrato na taxa específica de crescimento	52

III - Material e Métodos

3.1 - Curva padrão de densidade ótica versus massa seca	65
3.2 - Evolução do crescimento celular em função do tempo	66
3.3 - Esquema do fermentador utilizado	68
3.4 - Esquema do reator duplo estágio	69
3.5 - Esquema do reator utilizado na fermentação contínua com células imobilizadas	74
3.6 - Esquema do reator de mistura	76
3.7 - Esquema do fermentador	87

IV - Resultados e Discussão

4.1 - Fermentador em batelada simples, meio M_2 pH = 3,5, temperatura 30 °C e aeração de 0,2 a 0,3 vmm	98
4.2 - Fermentação em batelada alimentada com solução de sacarose igual a 240,0 g/l, vazão de 10,0 ml/h	100
4.3 - Experimento em batelada alimentada, concentração de sacarose 240,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, alimentação partir da sexta hora	103
4.4 - Experimento em batelada alimentada, concentração de sacarose 240,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, com início da alimentação a partir de 5,40 h e término 30,0 h	105
4.5 - Experimento em batelada alimentada, substrato melaço (350,0 g/l), vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na sexta hora e término na trigésima hora	107

4.6 - Experimento em batelada alimentada, concentração de melaço 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora e término no final do experimento	109
4.7 - Fermentação em batelada alimentada, concentração de melaço 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora e término na vigésima hora sexta hora	111
4.8 - Experimento em batelada alimentada, concentração de melaço 440,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação da segunda hora até o final da fermentação	113
4.9 - Experimento com alimentação exponencial, com concentração de melaço 440,0 g/l, início na segunda hora e término na décima segunda hora	117
4.10 - Atividade enzimática e massa seca em função da taxa de diluição	120
4.11 - Produtividade e açúcar redutor total em função da taxa de diluição	121
4.12 - Rendimento em função da taxa de diluição	122
4.13 - Atividade enzimática e massa seca em função da taxa de diluição	124
4.14 - Produtividade e açúcar redutor total em função da taxa de diluição	125
4.15 - Rendimento em função da taxa de diluição	126

4.16 - Atividade enzimática e massa seca em função da taxa de diluição	128
4.17 - Produtividade e açúcar redutor total em função da taxa de diluição	129
4.18 - Rendimento em função da taxa de diluição	130
4.19 - Atividade enzimática e massa seca em função da taxa de diluição	132
4.20 - Produtividade e açúcar redutor total em função da taxa de diluição	133
4.21 - Rendimento em função da taxa de diluição	134
4.22 - Fermentação em reator duplo estágio, atividade em função da taxa de diluição	136
4.23 - Fermentação em reator contínuo duplo estágio, produtividade em função da taxa de diluição	137
4.24 - Fermentação em reator contínuo duplo estágio, rendimento em função da taxa de diluição	138
4.25 - Tempo de residência experimental	140
4.26 - Fermentação utilizando concentração de melaço 20,0 g/l, massa seca e atividade em função da taxa de diluição	144
4.27 - Fermentação utilizando concentração de melaço 20,0 g/l, açúcar total e atividade em função da taxa de diluição	145
4.28 - Fermentação utilizando concentração de melaço 20,0 g/l, produtividade e rendimento em função da taxa de diluição	146

4.29 - Fermentação utilizando concentração de melaço 30,0 g/l, massa seca e atividade em função da taxa de diluição	148
4.30 - Fermentação utilizando concentração de melaço 30,0 g/l, açúcar total e atividade em função da taxa de diluição	149
4.31 - Fermentação utilizando concentração de melaço 30,0 g/l, produtividade e rendimento em função da taxa de diluição	150
4.32 - Fermentação utilizando concentração de melaço 60,0 g/l, massa seca e atividade em função da taxa de diluição	152
4.33 - Fermentação utilizando concentração de melaço 60,0 g/l, açúcar total e atividade em função da taxa de diluição	153
4.34 - Fermentação utilizando concentração de melaço 60,0 g/l, produtividade e rendimento em função da taxa de diluição	154
4.35 - Fermentação utilizando concentração de melaço 90,0 g/l, atividade e massa seca em função da taxa de diluição	156
4.36 - Fermentação utilizando concentração de melaço 90,0 g/l, açúcar total e atividade em função da taxa de diluição	157

4.37 - Fermentação utilizando concentração de melaço 90,0 g/l, produtividade e rendimento em função da taxa de diluição	158
4.38 - Fermentação contínua com células imobilizadas, atividade em função da taxa de diluição	160
4.39 - Fermentação contínua com células imobilizadas, produtividade em função da taxa de diluição	161
4.40 - Fermentação contínua com células imobilizadas, rendimento em função da taxa de diluição	162
4.42 - Evolução da concentração celular, do pH, da atividade enzimática (A) e do substrato (glicose 0,0 g/l) e sacarose 10,0 g/l) (B) durante fermentação em batelada (fermentação 1)	165
4.42 - Evolução da concentração celular, pH, da atividade enzimática (A) e do substrato (glicose 3,5 g/l e sacarose 6,5 g/l) (B) durante fermentação em batelada (fermentação 2)	166
4.43 - Evolução da concentração celular, do pH, da atividade (A) e do substrato (glicose 6,5 g/l e sacarose 3,5 g/l) (B) durante a fermentação em batelada (fermentação 3)	167
4.44 - Evolução da concentração celular, do pH, da atividade enzimática (A) e do substrato (glicose 10,0 g/l e sacarose 0,0 g/l) (B) durante fermentação em batelada (fermentação 4)	168
4.45 - Valores de pH em função do tempo	170

4.46 - Valores de atividade enzimática em função do tempo	172
4.47 - Logaritmo natural da densidade ótica em função do tempo	174
4.48 - Influência do substrato glicose na fermentação contínua - técnica de pulso	177
4.49 - Influência do substrato frutose na fermentação contínua - técnica de pulso	179
4.50 - Influência do substrato sacarose na fermentação contínua - técnica de pulso	181
4.51 - Influência do substrato sacarose, concentração 10,0 g/l	184
4.52 - Influência do substrato sacarose, concentração 30,0 g/l	185
4.53 - Influência do substrato sacarose, concentração 50,0 g/l	186
4.54 - Influência do substrato sacarose, concentração 70,0 g/l	187
4.55 - Influência do substrato glicose, concentração 10,0 g/l	189
4.56 - Influência do substrato glicose, concentração 30,0 g/l	190
4.57 - Influência do substrato glicose, concentração 50,0 g/l	191
4.58 - Influência do substrato glicose, concentração 70,0 g/l	192

4.59 - Influência do substrato frutose, concentração 10,0 g/l	194
4.60 - Influência do substrato frutose, concentração 30,0 g/l	195
4.61 - Influência do substrato frutose, concentração 50,0 g/l	196
4.62 - Influência do substrato frutose, concentração 70,0 g/l	197
4.63 - Velocidade específica de crescimento em função do substrato	199
4.64 - Gráfico de $1/\mu$ em função de $1/S$ para substrato sacarose, concentração 10,0 g/l	200
4.65 - Valores de q_p em função de μ para substrato sacarose, concentração 30,0 g/l	208
4.66 - Valores de q_p em função de μ para substrato glicose, concentração 30,0 g/l	209
4.67 - Valores de q_p em função de μ para substrato frutose, concentração 30,0 g/l	210
4.68 - Purificação da enzima invertase em coluna DEAE - celulose	215
4.69 - Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação K_d em função da temperatura	220
4.70 - Ajuste dos dados experimentis das constantes de desativação K_d em função da temperatura	223
4.71 - Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para a enzima precipitada com etanol	226

RESUMO.

O principal objetivo deste trabalho, foi estudar a produção da enzima invertase por *Kluyveromyces fragilis* utilizando diferentes processos de fermentação com células livres e imobilizadas. Estudou-se igualmente a influência dos substratos sacarose, glicose e frutose na cinética de crescimento do microrganismo e de produção da enzima, além de procurar caracterizá-la cineticamente.

As fermentações foram realizadas à temperatura de 30°C e aeração entre 0,2 a 0,3 vvm, sendo que dos processos estudados, os melhores resultados foram obtidos para reator contínuo com células imobilizadas, com volume líquido de 530 ml, utilizando melaço como fonte de carbono e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio.

Os valores de atividade enzimática, produtividade e rendimento para os diferentes processos foram: para o processo batelada simples respectivamente 9,17 U.I./ml, 0,19 U.I./ml.h e 424,34 U.I./g ART; para processo batelada alimentada 11,0 U.I./ml, 1,3 U.I./ml.h e 883,66 U.I./g ART; para processo em reator contínuo duplo estágio 32,0 U.I./ml, 5,30 U.I./ml.h e 1749,60 U.I./g ART e para reator contínuo com células imobilizadas 97,3 U.I./ml, 5,74 U.I./ml.h e 5322,97 U.I./g ART.

Para o estudo da influência do substrato na produção da enzima, verificou-se tratar-se de enzima constitutiva e que a produção é inibida pela presença em excesso de sacarose, glicose e frutose. Através da técnica de perturbação por degrau, em fermentação contínua determinou-se $\mu_{\text{máx}}$ e a constante de saturação K_s para o microrganismo.

As constantes cinéticas de crescimento μ_{max} (velocidade específica de crescimento máxima) e K_s (constante de saturação) foram determinadas em fermentação contínua. Verificou-se que para qualquer dos substratos utilizados (sacarose, glicose e frutose) μ_{max} foi aproximadamente constante e igual a $0,24 \text{ h}^{-1}$, enquanto que K_s foi $1,4 \cdot 10^{-4}$, $1,15 \cdot 10^{-3}$ e $1,77 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$, respectivamente para sacarose, glicose e frutose.

Os valores das constantes cinéticas μ_{max} e K_s para a produção da enzima nos diferentes substratos foram: $3099,51 \text{ U.I./g}_{\text{cél}} \text{ h}$ e $0,0181 \text{ mol/l}$; $5264,8 \text{ U.I./g}_{\text{cél}} \text{ h}$ e $0,0023 \text{ mol/l}$ e $1450,99 \text{ U.I./g}_{\text{cél}} \text{ h}$ e $0,0097 \text{ mol/l}$ para a sacarose, glicose e frutose respectivamente.

Quanto a caracterização da enzima foram encontrados os valores da energia de desativação para a enzima precipitada com álcool e após passagem por coluna de DEAE-celulose, 61043 cal/gmol e $93861,9 \text{ cal/gmol}$ respectivamente. Para a enzima bruta (após precipitação com álcool) foram encontrados os valores de K_m igual $0,0662 \text{ mol/l}$ e $V_{\text{máx}}$ igual a 2037 U.I./ml .

SUMMARY

The main objective of this work was to study the production of enzyme invertase by *Kluyveromyces fragilis* using immobilized cell and free cell fermentations. Parallel with this, it was studied the influence of the substrates sucrose, glucose and fructose on the kinetics of cell growth and enzyme production.

The fermentations were carried out at a temperature of 30°C and with aeration at a level between 0.2 and 0.3 vvm. The best results were obtained utilizing the continuous reactor operating with immobilized cells and a liquid volume of 530 ml. Molasse from sugar cane juice was the carbon source and the nitrogen source was the corn steep liquor.

The values found for enzyme production, and productivity and yield for the various process studied were as follows: for the simple batch process respectively 9.17 U.I./ml, 0.19 U.I./ml.h and 424.34 U.I./g ART; for fed batch 11.0 U.I./ml, 1.3 U.I./ml.h and 883.66 U.I./g ART; for 2 stage continuous culture 32.0 U.I./ml, 5.30 U.I./ml.h and 1749.60 U.I./g ART; and for continuous culture with immobilized cells 97.3 U.I./ml, 5.74 U.I./ml.h and 5322.97 U.I./g ART.

The study of influence on enzyme production confirmed that the enzyme is produced constitutively and is inhibited by excess sucrose, glucose or fructose. Using the technique of graded perturbation in continuous culture, values for μ_{max} (specific growth rate) and K_s (saturation constant) of the microorganism were determined, μ_{max} was found to be

approximately constant at 0.24 h^{-1} while K_s was found to be 1.4×10^{-4} , 1.15×10^{-3} and $1.77 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ for sucrose, glucose and fructose respectively.

The kinetics constant μ_{\max} and K_s for enzyme production were: $3099.51 \text{ U.I./g}_{\text{cells}} \cdot \text{h}$ and 0.0181 mol/l ; $5264.8 \text{ U.I./g}_{\text{cells}} \cdot \text{h}$ and 0.0023 mol/l , and $1450.99 \text{ U.I./g}_{\text{cells}} \cdot \text{h}$ and 0.0097 mol/l for sucrose, glucose and fructose respectively.

With respect the characterization of the enzyme itself, the deactivation of the energy of the purified enzyme after precipitation with ethanol was 61043 cal/gmol while after further purification using a DEAE-celulose column was 93861.9 cal/gmol . For the raw enzyme (after simply precipitating with ethanol) a K_m value of 0.0662 mol/l and a V_{\max} value of 2037 U.I./ml .

I - INTRODUÇÃO.

Na confecção de determinados produtos, adiciona-se alguns açúcares com o objetivo de controlar o processo de cristalização. Dentre esses açúcares os de maior importância são glicose, frutose e açúcar invertido (glicose e frutose oriundos da hidrólise total ou parcial da sacarose).

A obtenção do açúcar invertido (que é a forma mais econômica da mistura glicose e frutose) pode ser feita através da hidrólise ácida ou enzimática da sacarose. A hidrólise ácida traz inconvenientes devido a formação de subprodutos que escurecem o xarope.

A alternativa da hidrólise ácida, é realizar a hidrólise enzimática da sacarose através da enzima invertase. Esse processo tem a vantagem de fornecer um produto de melhor qualidade, sem os inconvenientes da hidrólise ácida. Apesar da vantajosa, a inversão enzimática é pouco utilizada devido ao custo da enzima.

Paralelamente ao estudo de obtenção da enzima, o uso de invertase imobilizada torna o processo de inversão mais econômico, permitindo a reutilização da enzima por um longo período, e obtenção de produtos com características constantes.

A enzima invertase disponível no mercado é obtida através da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo uma enzima produzida intracelularmente.

Muitos microrganismos estão sendo estudados quanto a produção extracelular da enzima. Neste trabalho foi utilizado a

levedura *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, que em trabalhos anteriores demonstrou ser uma boa linhagem para a produção da enzima extracelularmente.

Neste trabalho procurou-se utilizar matérias primas como o melaço e água de maceração de milho, de ampla disponibilidade e baixo custo, com o intuito de diminuir o custo de produção da enzima.

Os objetivos do presente trabalho foram:

i - Estudar a produção da enzima invertase, com a finalidade de obter melhor produtividade e rendimento, utilizando diferentes procedimentos:

- Processo de produção em batelada simples
- Processo de produção em batelada alimentada
- Processo de produção em reator contínuo duplo estágio
- Processo de produção em reator contínuo de leito fixo com células imobilizadas.

ii - Estudar influência dos substratos sacarose, glicose e frutose na produção da enzima.

iii - Determinar os parâmetros cinéticos para a produção da enzima e modelar o crescimento celular e a produção de invertase.

iv - Caracterizar a enzima cineticamente e operacionalmente.

II.- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1- Aplicação de enzimas.

O emprego de enzimas para fins industriais teve início no final do século XIX, porém seu desenvolvimento junto à indústria agroalimentícia foi de natureza empírica até a II Guerra Mundial. A descoberta de técnicas que permitiram um melhor conhecimento das proteínas, bem como sua purificação, impulsionou a utilização industrial das enzimas a partir da década de 50.

Atualmente as enzimas industrialmente utilizáveis representam um mercado global da ordem de 340 milhões de dólares (TABELA 2.1), para uma produção de 70.000 toneladas/ano, sendo que os dois principais setores de aplicação são (55, 108):

a) A indústria de transformação do amido, principalmente na obtenção de produtos alimentícios intermediários.

b) A indústria de detergentes.

Deve-se observar que esses dois segmentos são responsáveis por 70% do mercado mundial de enzimas, sendo que os 30% restantes são representados por aplicações na indústria alimentícia onde se utilizam; proteases, pectinases, amilases e outras enzimas (FIGURA 2.1 e TABELA 2.2).

TABELA 2.1 Estimativa do mercado anual das enzimas de maior de maior aplicação industrial (55).

Grupo da enzima	Enzima	Mercado anual em US\$(Milhões)	Subtotal %
Enzimas Proteolíticas	Protease de bactéria	105	
	Renina de estômago de bezerro	50	
	Papaína	19	
	Protease pancreática	7	
	Renina microbiológica	18	
	Protease fúngica	6	
	Pepsina	1	
		200	59
Enzimas que degradam polissacarídeos	Amiloglucosidase	55	
	α -amilase bacteriana	25	
	Pectinase	20	
	α -amilase fúngica	5	
	Celulases e outras		
	β -glucanases	2	
		107	32
Outras enzimas	Glicose isomerase	29	
	Invertase	9	
	Glicose oxidase e catalase	2	
	Lipase	1	
	β -galactosidase	1	
		40	9
Total		337	

TABELA 2.2 Utilização industrial das enzimas (80).

Indústria	Enzima	N	Subtotal
Detergentes	Protease	55	35
Produtos alimentícios intermediários	Amilase	10	
	Glicose isomerase	12	
	Amiloglicosidase	13	
Alimentícios	Coalho(Renina)	10	30
	Proteases, Pectinases,	20	
	Amilases, outras enzimas		

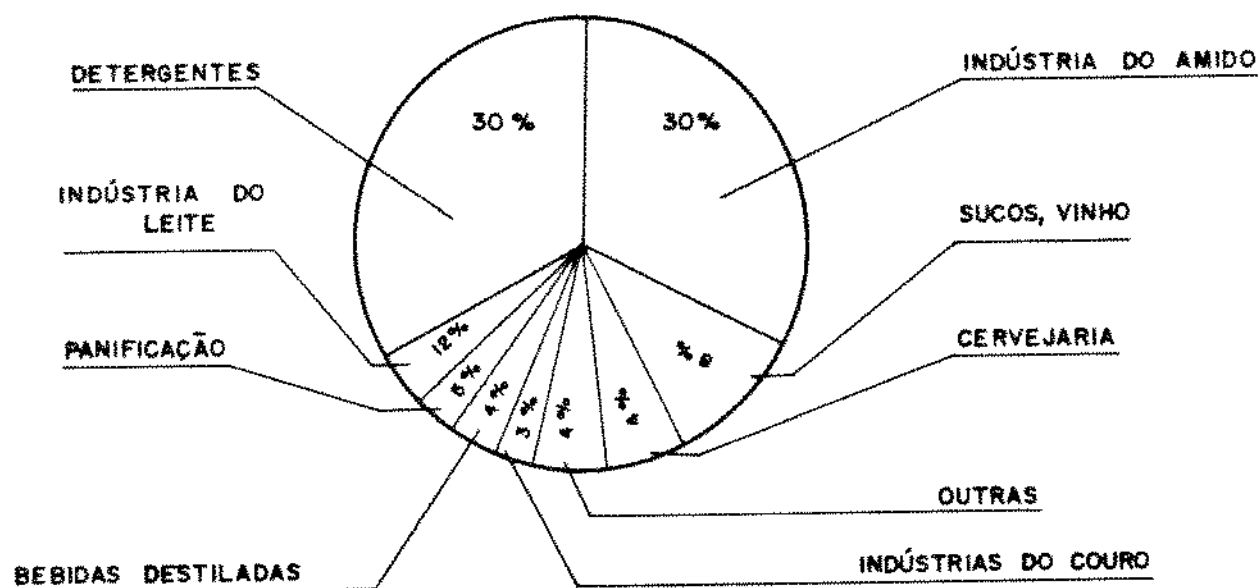


FIGURA 2.1 Campos de aplicação das enzimas (55).

O uso de enzimas pode ser visto como benéfico sob vários aspectos:

- As condições suaves quando se trabalha com enzimas, tais como temperatura, pH, etc.

- Também pode-se citar a especificidade da enzima em relação ao substrato utilizado.

- Uma terceira vantagem do uso de enzimas na indústria é que o processo onde se usa enzima, requer um baixo custo do tratamento do efluente, pois enzima são proteínas e portanto biodegradáveis, e são usadas em doses muito baixas, geralmente na faixa de 0,1 % a 1 % do peso do substrato.

- Outra vantagem é o baixo investimento, na planta do processo, quando este é enzimático.

Essas vantagens, aliadas ao grande número de sistemas enzimáticos que podem ser utilizados para processos em alimentos fez com que houvesse um aumento significativo do emprego de enzimas no processamento de alimentos nestes últimos 30 anos.

Os sistemas enzimáticos utilizados na indústria, são produzidos por microrganismos, sendo que o número de fungos produtores não ultrapassa de 11, o número de bactérias chega a ser 8 e o de leveduras está em torno de 4 (46), sendo que os mesmos são já utilizados nos processos há muitos anos e aceitos do ponto de vista toxicológico por muitas autoridades no assunto. Os sistemas enzimáticos conhecidos, bem como suas aplicações em alimentos, são relacionados nas TABELAS 2.3 e 2.4.

TABELA 2.3 Enzimas comumente utilizadas em alimentos (108).

α -amilase	β -amilase	Amiloglicosidase
β -gluconase	Pentosanase	Celulase
Hemicelulase	Protease alcalina	Lactase
Glucose isomerase	Pectinase	Protease Ácida e neutra
Renina microbiológica	Invertase	Glucose oxidase
Lipase		

TABELA 2.4 Aplicações de enzimas em alimentos (108).

Processamento de amido	Utilização de soro de leite
Tratamento de farinha	Concentração de ovo
Xarope de açúcar	Sabores e cores
Cerveja, licores, vinagre	Modificação proteica
Fabricação de queijo	Proteínas vegetais
Confeitaria	Hidrolisados
Processamento de sucos e frutas	Alimentos dietéticos
Panificação	Bebidas não alcólicas

2.2- Microrganismos produtores.

O reduzido número de microrganismos produtores de enzimas pode ser explicado pelo fato de que um mesmo organismo pode produzir diferentes enzimas durante uma fermentação e que técnicas apuradas tornam possível o isolamento de diferentes enzimas.

A TABELA 2.5 dá a relação de enzimas de uso industrial, bem como os microrganismos responsáveis pela produção.

TABELA 2.5 Microrganismos produtores de enzimas (36).

Enzimas	Microrganismos
α -amilase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
β -amilase	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
Amiloglicosidase	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus sp</i>
β -glucanase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Penicillium emersonii</i>
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Sporotrichum dimorphosporum</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Dextranase	<i>Penicillium sp</i> <i>Trichoderma sp</i>
Glucose isomerase	<i>Actinophanes sp</i> <i>Arthrobacter sp</i> <i>Bacillus sp</i> (thermophile) <i>Streptomyces sp</i>
Glucose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>
Invertase	<i>Saccharomyces sp</i>
Lactase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>
Lipase	<i>Aspergillus sp</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Rhizopus sp</i>
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus sp</i>
Penicillinase	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Erwinia carotovorum</i> <i>Escherichia coli</i>
Pentonase	<i>Aspergillus sp</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Protease ácida	<i>Aspergillus sp</i> <i>Rhizopus sp</i>
Protease neutra	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus thermoproteolyticus</i>
Protease alcalina	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus sp</i> (alcalophile) <i>Streptomyces griseus</i>
Pululanase	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces aerogenes</i>
Enzimas coagulantes do leite	<i>Endothia parasitica</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Mucor pusillus</i>

As pesquisas na área de produção de enzimas, bem como de suas aplicações na indústria, tem se desenvolvido muito nestes últimos anos. A invertase tem sido utilizada quase que exclusivamente na indústria de doces. Esse uso restrito, de um lado se deve ao tipo de substrato e ao alto custo de obtenção da enzima, o que tem impedido uma maior aplicação da mesma, sendo que sua substituição ocorre através da hidrólise ácida. Atualmente existe interesse de se produzir xarope com alto teor de frutose, tanto para exportação como para consumo interno, pois a hidrólise enzimática não traz os inconvenientes da inversão ácida (23, 115).

2.3- Aspectos gerais.

A invertase (β -D-frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26.), também conhecida como invertina (nome comercial), sucrase ou sacarase, é uma enzima que hidrolisa a sacarose, fornecendo uma mistura equimolar de glicose e frutose. O xarope resultante desta inversão é mais doce devido ao maior poder adoçante da frutose, tem ponto de ebulição mais alto e ponto de congelamento mais baixo. Os monossacarídeos formados são mais solúveis e conseqüentemente não se cristalizam tão facilmente, mesmo quando em soluções altamente concentrada. O nome invertase é derivado da mudança de rotação que ocorre quando a sacarose é hidrolisada a glicose e frutose (101).

Históricamente a invertase foi uma das primeiras enzimas a ser obtida na forma de extrato bruto (118) e já em meados desse século encontrava-se disponível no comércio (105).

Segundo Hartmeier (55), a produção de invertase representa um mercado de 3 milhões de dólares em relação a um movimento global anual de 340 milhões de dólares de enzimas utilizáveis industrialmente, mostrando com isso um mercado bem modesto.

A enzima invertase, já era conhecida por volta de 1860 por Berthelot (14), tornando-se um fácil objeto de estudo devido a sua ação poder ser seguida facilmente através do uso de polarímetro. Essa enzima foi utilizada por Sørensen em 1909, citado por Vitolo (118), para o clássico estudo sobre o efeito do pH na atividade enzimática e determinação da concentração de ions hidrogênio; servindo também para o estudo de Michaelis em 1913 (82), o qual culminou no modelo conhecido como equação de Michaelis-Menten. Por outro lado, a enzima não tem sido obtida em estado satisfatório de homogeneidade (95), sendo a razão disso sua natureza glicoproteica.

2.4- Especificidade.

Especificidade de uma enzima é definida pela natureza do composto que pode ser convertido a um produto.

A invertase atua sobre radicais β -D-frutofuranosil, insubstituído. O substrato típico da ação da invertase, a sacarose, sendo ao mesmo tempo um β -frutofuranosídeo e um α -glicosídeo, pode ser hidrolisado por dois tipos diferentes de enzima:

-A β -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) e a α -D-glucosidase (E.C.3.2.1.20) que atacam a sacarose nos

terminais da frutose e glicose respectivamente (89, 101, 125).

A caracterização das duas enzimas foi baseada originalmente na habilidade delas hidrolisarem além da sacarose, a rafinose e melezitose (60, 61, 101, 125) sendo que a β -frutofuranosidase hidrolisa a rafinose e não hidrolisa a melezitose, enquanto que a glucosidase age de modo contrário.

Barnett (10), trabalhando com leveduras, verificou que entre várias cepas, somente duas faziam uso do substrato rafinose e sacarose, sendo essas, produtoras de invertase.

2.5- Ocorrência.

A invertase ocorre largamente na natureza tendo sido observada em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*) (101), fungos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spurulosum* e *Penicillium chrysogenum*); e outros microrganismos (*Actinomicetos*, *Puricularia oryzae*, *Micorryza fungi*, *Polistictus sanguineus* e certos liquens); animais (insetos, abelhas, ratos, coelhos, porcos) assim como em plantas (trigo, beterraba doce, banana, mamão, cevada germinada e alfafa) (90, 124).

Reed (101) considera que dentre as diversas fontes de invertase, somente a enzima obtida de levedura é importante para a produção industrial de invertase, sendo que na França somente se permite o uso de invertase proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (85).

A enzima invertase ocorre em células de leveduras, sendo encontrada em duas formas:

-Uma glicoproteína contendo 50% de manana e 3% de glicosamina, localizada entre a membrana plasmática e a parede celular, também conhecida como enzima externa de alto peso molecular (44, 45, 94).

-Uma enzima intracelular desprovida de carboidratos, localizada exclusivamente no protoplasma e de peso molecular inferior (44, 45, 94).

Em geral a invertase produzida pela levedura é intracelular, contudo, Wickerham (120), Dworschack e Wickerham (38), Izuka e Yamamoto (64), Costa (26) e Madyastha e colaboradores (78), verificaram que algumas espécies são capazes de produzir enzimas extracelularmente.

A invertase externa tem peso molecular de aproximadamente 270.000 e corresponde à maior parte da enzima produzida pelas células, enquanto que a enzima interna tem peso molecular de 135.000 (1, 103).

O teor de invertase em leveduras é dependente das condições de crescimento e especialmente da concentração de glicose no meio (31). Em células que crescem a baixas concentrações de glicose, a maior parte da invertase produzida é de alto peso molecular e está localizada fora da membrana citoplasmática (110).

Moreno e colaboradores (86) trabalhando com linhagem de *Saccharomyces* 303-67 e um mutante FH 4C em concentrações variadas de substrato, verificaram a presença de uma terceira enzima. Através da técnica de eletrofocalização foi possível separar as três formas de invertase:

- A enzima mais leve cujo ponto isoeletrico era 3.4.
- A enzima mais pesada com ponto isoeletrico 4.2.
- E a forma intermediária com ponto isoeletrico 5.0.

A presença de diferentes formas de enzimas foi sugerida por alguns autores. Cahib (21) em 1952, demonstrou por cromatografia, a presença de várias formas de invertase obtida de levedura. Gascom e Ottolenghi (44) encontraram duas formas dessa enzima em leveduras, sendo uma de alto peso molecular, na membrana citoplasmática; outra de baixo peso molecular, no interior da célula, sendo que essas duas formas foram isoladas e purificadas. Mas Moreno e colaboradores (86) acreditam que a forma existente fora da membrana citoplasmática seja homogênea.

Gascom e Lampem (45) verificaram a presença de invertase interna à membrana citoplasmática, além da enzima externa (localizada na parede celular). Alguns autores (1, 9, 62, 70) acreditam que a enzima interna possa ser um precursor da externa, outros, um produto de degradação durante a síntese da enzima pesada (71).

Beteta e Gascom (15) acreditam que primeiro ocorra a síntese da proteína (enzima leve) e depois uma adição sequencial de manose, formando um espectro contínuo de invertase com pesos moleculares crescentes de acordo com o teor de manana, sendo então formada a enzima pesada, contendo 50% de carboidratos, excretada no espaço periplasmático. A transformação da enzima leve para pesada parece ser compatível com os dados obtidos por Moreno e colaboradores (86), que verificaram um acúmulo das formas moleculares leve e intermediárias quando na

presença de 2-deoxy-D-glicose.

Tashiro e Trevithick (113) verificaram em *Neurospora crassa* duas formas de invertase, sendo ambas glicoproteínas, possuindo constantes de Michaelis idênticas e as mesmas propriedades enzimáticas.

Babizinski e Tuner (9) descreveram um método com glicose oxidase para localização de atividade de invertase diretamente sobre gel de poliacrilamida-sulfato dodecil sódio. Eles verificaram a presença de um precursor da invertase externa, sendo que a atividade do mesmo era menos que 5% da atividade total da invertase.

A existência de três tipos diferentes de invertase também foi constada por Rodrigues e colaboradores (103), sendo que duas se encontravam no citoplasma, uma livre de carboidrato e solúvel no citoplasma e a outra parcialmente glicosilada, ligada a membrana. A terceira forma, também glicosilada era excretada para o exterior celular.

2.6- Obtenção

A invertase de levedura foi descoberta por Persoz em 1833 e purificada pela primeira vez em 1860 por Berthelot através de precipitação alcólica. Embora muitos estudos fundamentais de cinética enzimática tenham sido realizados, a enzima de levedura ainda não foi obtida na forma cristalina. Isto se deve provavelmente à presença de polimananas que se aderem à enzima durante o processo de purificação (90, 94). Várias técnicas têm sido utilizadas no sentido de obter a enzima.

Podendo-se citar entre elas: sonificação (121), autólise (96), lise enzimática (100), disrupção mecânica das células (41, 43), sendo que os métodos mais empregados são lise enzimática e disrupção mecânica (124).

Wickerham (120) trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-898, verificou que a enzima era excretada por células vivas, sendo que para verificar esse fato, trabalhou com cultura, com e sem adição de tolueno. O mesmo autor também verificou se a invertase era produzida por células propagadas aerobicamente. Com esse experimento pode comprovar que a produção da enzima é aproximadamente associada ao crescimento microbiano.

A TABELA 2.6, obtida por Dworschack e Wickerham (39) mostra que a produção da enzima é característica de cada linhagem.

TABELA 2.6 Produção de invertase extracelular por leveduras (39).

Nome da cultura	Número	Atividade(U.I./ml)	
		Aeróbico	Anaeróbico
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (haploide unisexual)	Y-4288-7H1	298.4	-----
Do	Y-4288-13H2	253.4	-----
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (diploide unisexual)	Y-4288-7D2	337.6	-----
Do	Y-4288-13D2	360.8	-----
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (poliploide unisexual)	Y-4288-cod 2	791.6	162.8
Do	Y-4288-cod 4	491.0	267.8
Do	Y-4288-cod 15	380.5	223.6
Do	Y-4288-cod 18	278.5	434.4
Do	Y-4288-cod 20	580.0	201.2
Do	Y-4288-cod 25	385.0	465.2
Do	Y-4288-cod 27	385.0	-----
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (diploide bisexual)	Y-4288-7H1X13H2	13.1	-----
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (triploide bisexual)	Y-4288-7H1X13H2	24.8	-----
<i>Saccharomyces kluyveri</i> (tetraploide bisexual)	Y-4288-7D2X13D2	25.1	-----
<i>Candida utilis</i>	Y-900	243.6	10.0
<i>Candida utilis</i> v. <i>Thermophila</i>	Y-1082	209.0	15.1
<i>Candida utilis</i> v. <i>major</i>	Y-1084	134.0	18.7
<i>Torulopsis colliculosa</i>	Y-172	210.8	7.1
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Y-972	138.0	51.0
<i>Saccharomyces validus</i>	Y-1374	53.9	26.0
<i>Saccharomyces flagillis</i>	Y-1109	38.3	8.3
<i>Saccharomyces auriformis</i>	Y-1356	36.0	20.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y-898	31.6	45.4
<i>Saccharomyces lactis</i>	Y-1205	27.7	30.7
<i>Saccharomyces</i> <i>carlsbergensis</i>	Y-379	5.7	4.0
<i>Kluyveromyces polysporus</i>	Y-2309	54.6	54.2
<i>Torulospira rosei</i>	Y-1567	50.6	7.1
<i>Schizosaccharomyces</i> <i>japonicus</i>	Y-1361	41.3	38.6
<i>Schizosaccharomyces</i> <i>lidwigii</i>	Y-974	14.0	16.7
<i>Endomycopsis chodali</i>	Y-1933	2.0	3.5
<i>Endomycopsis fibuliger</i>	Y-25	2.9	20.8
<i>Candida flareri</i>	Y-1476	5.4	15.4
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-833	0.0	20.5

Dworschack e Wickerham (39) trabalhando com *Saccharomyces uvarum* NRRL-Y-972, estudaram condições de aerobiose e anaerobiose, bem como a produção de invertase extra e intracelular. O preparo e manuseio da cultura foi similar ao empregado por Wickerham (120).

Esses autores (39) concluíram através de seus trabalhos que a produção de invertase é proveniente de células vivas, e que taxas de transferência de oxigênio de 0,2 a 1,6 μ moles de O_2 /ml/min favoreciam a produção de invertase e que concentrações de sacarose variando de 3% a 10% são propícias a produção da enzima durante as primeiras 48 horas de fermentação.

Izuka e Yamamoto (64) verificaram em seus trabalhos com *Candida utilis* 6020, em condições aeróbicas, que a máxima produção de invertase ocorre quando o crescimento celular é máximo e quando praticamente todo o substrato foi consumido.

Dodyk e Rothstein (35) concluíram que o aparecimento da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, parece ser controlada pela concentração de glicose no meio. O aparecimento da atividade não tem relação com a fase de crescimento, sendo retardado com aumento da concentração inicial de glicose.

Trabalhando com *Candida utilis*, Izuka e Yamamoto (64) puderam verificar que diferentes fontes de carbono não tem uma influência marcante no crescimento e produção de invertase, mostrando com isso que a invertase é uma enzima constitutiva, o que foi de encontro aos estudos realizados por Wickerham (120) quando trabalhou com diversas linhagens.

Marquez e Acosta (81) estudaram a produção e

atividade da enzima invertase por *Saccharomyces sp*, verificando a influência de sais no meio de cultivo, concluindo que os sais acrescentados ao meio (lactato de sódio, sulfato de amônio, fosfato monossódico e cloreto de magnésio) aumentavam a produção da enzima.

Auzans (7) trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae* 14, concluiu que a síntese da enzima pela levedura era 30% maior em meio natural (melaço) do que em meio sintético; a síntese de invertase diminuía à medida que se aumentava a concentração de sacarose, enquanto que o aumento da concentração de melaço, não provocava nenhum decréscimo na síntese da enzima. O pH ótimo para a produção da enzima estava na faixa 4,7 a 5,2 e o decréscimo na aeração diminuía a formação de invertase.

Hang e colaboradores (53), estudando a produção de invertase por *Candida utilis*, crescendo sobre efluente de indústria de chucrutes, verificou ser este resíduo, um ótimo meio para produção de invertase. Eles obtiveram uma produção de 672.000 unidades de invertase por grama de levedura seca, sendo bem provável que a presença do ácido láctico era favorável a produção da enzima.

Costa e Maugeri (27) trabalhando com diferentes linhagens de leveduras, para verificar a produção de invertase, concluíram que a melhor linhagem era *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, sendo que a produção da enzima era favorecida em aerobiose; a produção da mesma era bem maior extracelularmente e se tratava de uma enzima constitutiva.

Os autores (27) verificaram ainda que concentrações de melão acima de 50,0 g/l não favorecia a produção da enzima, e que a temperatura ótima para produção da enzima era em torno de 30°C.

2.7- Purificação da enzima.

Nos últimos anos, um grande interesse tem surgido com relação as técnicas de purificação de proteínas obtidas por fermentação em larga escala. Após obter a enzima na forma solúvel, é necessário separá-la dos demais compostos indesejáveis na solução (proteínas, outras enzimas, etc) (34).

Sabendo-se que as proteínas diferem entre si quanto a solubilidade, densidade, grupos reativos específicos e estabilidade relativa, é possível isolar, uma determinada proteína baseando-se nestas propriedades características. Não existe um critério rigoroso para a purificação, mas um procedimento aconselhável, inicia-se com precipitação fracionada por solvente orgânico ou sulfato de amônio. Esta etapa não apresenta grande capacidade de resolução e geralmente faz-se em seguida a utilização de métodos cromatográficos (34).

Frequentemente é empregado cromatografia de exclusão molecular e a cromatografia de troca iônica, para se obter frações enriquecidas da enzima desejada, e tendo como base seu tamanho molecular e carga elétrica respectivamente. Para uma purificação final, a enzima é submetida a eletroforese de disco ou eletrofocalização, a fim de se detectar o grau de pureza da mesma (72, 126).

Leskovac e colaboradores (73) purificaram invertase por cromatografia em DEAE-Sephadex obtendo uma atividade específica de 1400 a 2000 unidades/g de proteína.

Neunann e Lampen (94) após precipitarem com etanol e sulfato de amônio, invertase de *Saccharomyces* FH 4C, fizeram cromatografias consecutivas de Sephadex G-25, SE-Sephadex C-50 e DEAE-Sephadex A-50, conseguindo uma enzima com atividade específica de 2700 a 3000 μ moles de sacarose/min./mg de proteína a 30°C.

Iglesias e colaboradores (62) utilizaram colunas com Sephadex G-200 e conseguiram separar a invertase de *Saccharomyces* 303-67, em isoenzimas de pesos moleculares distintos obtendo-se as formas extracelular [volume eluido (Ve)/volume morto (Vo) = 1,07], e intracelular (Ve/Vo = 1,65) e a intermediária (Ve/Vo) variando de 1,07 a 1,65, dependendo da concentração de glicose do meio.

Gascom e Lampen (45) obtiveram invertase interna do mutante *Saccharomyces* FH 4C por precipitação com sulfato de amônio e posterior cromatografia em DEAE-Sephadex A-50. As frações ativas foram reunidas e passadas em coluna de Sulfoetil-Sephadex, atingindo uma purificação da ordem de 2500 vezes em termos de concentração de proteína.

Izuka e Yamamoto (64) obtiveram a invertase de *Candida utilis* através de precipitação com acetona, seguida por cromatografia com DEAE-Celulose e Sephadex G-200.

Moreno e colaboradores (86) investigando formas intermediárias de invertase em células não reprimidas de

Saccharomyces 303-67, verificaram que a invertase pesada é extremamente abundante e parece mascarar a presença das outras formas. Sua remoção é feita através de precipitação por sulfato de amônio a 70% de saturação. Através de filtração em gel Sephadex G-200, os autores conseguiram separar além da forma leve ($V_e/V_o = 1,75$), duas formas de invertase intermediária com $V_e/V_o = 1,20$ e $1,34$, respectivamente.

Vega e colaboradores (115) estudando produção de invertase por *Azotobacter cloacocccum* ATCC 4412 e *A.vinelandii* vw, verificaram que a enzima produzida por *Azotobacter* era extracelular e aquela produzida por *A.vinelandii* era intracelular, sendo o peso molecular estimado em 57 KDa através da filtração em gel e 59 KDa através de SDS-PAGE.

Chan e colaboradores (33) verificaram que a invertase produzida por *Saccharomyces uvarum* era uma enzima extracelular e que a proteína era facilmente purificada em coluna de DEAE-celulose, atingindo um ótimo grau de pureza.

2.8- Características da enzima.

A invertase de levedura é composta de uma forma externa à membrana citoplasmática e uma forma intracelular. A enzima externa tem peso molecular de aproximadamente 270.000 e é constituída de aproximadamente 30 cadeias de manana ligadas à proteína por ligações glicosamílicas asparagina (94, 95). Foi constatado por Colonna e colaboradores (25) que essa enzima contém ligações covalentes de fosfato, sugerindo que a acidez da enzima externa varia de acordo com o grau de fosforilação.

A enzima intracelular com peso molecular de 135.000 além de diferir da invertase externa quanto à localização, difere na estrutura primária, possuindo quantidades distintas de glicina, tirosina, cisteína e histidina (45).

A condição de máxima atividade para invertase é encontrada a pH entre 4 e 5, temperatura entre 50 e 60°C. A reação é máxima para solução com 5 a 10% de sacarose (37, 46, 124) caindo 25% para soluções concentradas a 70% (46).

Costa (26) trabalhando com invertase produzida por *Kluyveromyces bulgaricus* verificou que a máxima atividade era alcançada em pH próximo de 4,0 e temperatura ótima ao redor de 50°C.

2.8.1- Estabilidade térmica da enzima.

Sendo as enzimas de natureza proteica, sofrem desnaturação térmica, perdendo com isso, total ou parcialmente sua atividade. O conhecimento da estabilidade térmica é de grande importância, pois como sabemos, a maioria das reações em que as enzimas estão envolvidas, sofrem um aumento na taxa de reação, a medida que se aumenta a temperatura (34).

As constantes de taxa de reação variam com a temperatura, segundo a equação de Arrhenius.

$$K = A.e^{-E_a/RT} \quad (2.1).$$

onde: K = constante da taxa de reação.

A = fator de frequência para a reação.

E_a = energia de ativação.

T = temperatura absoluta.

R = constante dos gases ideais (1,9872 cal/mol.K).

A expressão de Arrhenius descreve bem a dependência da taxa de reação com a temperatura, numa ampla faixa da mesma, porém, o comportamento de uma reação enzimática difere em relação a faixa de temperatura, pois as enzimas são proteínas e a faixa de temperatura em que se trabalha é pequena, em relação as reações químicas. Em uma reação enzimática, a velocidade de reação aumenta com o aumento da constante de velocidade, até a chamada "temperatura ótima" depois decresce rapidamente, devido à desnaturação da enzima. O conhecimento da cinética de desativação das enzimas é de grande importância no projeto de reatores enzimáticos (57).

Normalmente uma cinética de desativação térmica de primeira ordem é suficiente para descrever o comportamento da atividade com o tempo de operação (34). Utilizando-se do modelo

$$\frac{dA}{dt} = -K_d A \quad (2.2)$$

onde: A = concentração de enzima ativa ou atividade num tempo t qualquer.

K_d = constante da taxa de desativação.

Integrando a equação anterior entre $t = 0$ e t , obtém-se :

$$-\ln(A/A_0) = K_d \cdot t \text{ ou } A = A_0 \exp(-K_d \cdot t) \quad (2.3)$$

onde: A = concentração inicial de enzima ativa ou atividade inicial.

Costuma-se também expressar a estabilidade térmica em termos de meia vida, a qual é definida como sendo o

tempo necessário para perder 50% da sua atividade inicial (34), ou seja:

$$A/A_0 = 0.5 \quad (2.4).$$

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) pode ser relacionado a constante de desativação K_d , através da equação abaixo.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0.5)}{K_d} \quad (2.5).$$

Pode-se obter o valor da constante de desativação (K_d) plotando $-\ln(A/A_0)$ versus t , para uma dada temperatura, sendo que K_d varia com a temperatura segundo a equação de Arrhenius.

$$K_d = A.e^{-E_d/RT} \quad \text{ou} \quad \ln K_d = \ln A - E_d/R \cdot 1/T \quad (2.6)$$

onde: E_d = energia de desativação da enzima ou a energia de ativação para a reação de desativação.

R = constante da lei de gases, cujo valor é 1.9872 cal/mol $^\circ$ K

A = constante da equação de Arrhenius (fator de frequência).

Com valores de K_d , a várias temperaturas, pode-se obter o valor de E_d , plotando K_d em função de $1/T$.

Embora o modelo de reação de primeira ordem seja utilizado frequentemente para descrever a desativação enzimática, Heenley e Sadana (56), através de uma revisão de literatura, classificaram as curvas de desativação em dois grandes grupos: em um a atividade será sempre menor que a atividade inicial, e no outro, a atividade pode ser maior que a inicial em algum período de tempo. Para isso os autores propõem um modelo cinético intermediário denominado "modelo em série".

A estabilidade térmica é dependente das condições do meio em que a enzima se encontra. Wiseman e Woodward (123) estudando a estabilidade térmica da enzima verificaram que na ausência de substrato a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* perde quase toda sua atividade quando aquecida a 65°C por 15 minutos.

A invertase de *Candida utilis* tratada similarmente, perde 25% de atividade quando previamente purificada, ao passo que na forma bruta é termooestável a esta temperatura. A invertase de *Kluyveromyces bulgaricus* perde sua atividade rapidamente à temperatura acima de 60°C, enquanto que a 46°C, perde 8% de sua atividade em uma hora (25).

Alguns autores verificaram que a estabilidade enzimática está diretamente relacionada com o teor de carboidratos da molécula. Arnold (6) verificou que a manana estabiliza a proteína. Por outro lado, Smith e Ballou (109) verificaram que a completa remoção do carboidrato não afetava a atividade, nem a estabilidade térmica da enzima a 37°C.

Woodward e Wiseman (127) confirmaram os resultados obtidos por Smith e Balou (109), quando removeram completamente a manana da invertase externa, enquanto que a enzima interna mostrava-se instável.

Vários outros autores verificaram a estabilidade da enzima invertase em relação ao meio em que se encontrava, sendo que podemos citar os trabalhos de Ooshima e colaboradores (97); Monsan e Durand (85); Maeda e Suzuki (79) e Arnold (6).

2.9- Emprego da invertase.

A invertase tem sido muito empregada na indústria de alimentos por hidrolisar soluções concentradas de sacarose, fornecendo soluções com maior poder adoçante, com temperatura de ebulição mais elevada e ponto de congelamento mais baixo.

A inversão da sacarose pode ser feita tanto por hidrólise ácida como por via enzimática. A hidrólise ácida usando HCl 2N é o processo comercial preferido nos E.U.A., enquanto que a conversão enzimática é praticada em alguns países da Europa e Japão (47). Na hidrólise enzimática temos alto custo do catalisador, alta porcentagem de conversão (90%), tempo de residência menor no reator, solução incolor de açúcar invertido e temperatura do processo mais baixa. O inconveniente deste método é que a operação precisa ser realizada em batelada, e a enzima não pode ser reutilizada. Na hidrólise ácida tem-se baixo custo do catalisador e facilidade em se usar reator tubular, em processo contínuo

Como desvantagem, depara-se com a baixa porcentagem de conversão (65 a 70%), tempo de residência elevado no reator, solução de açúcar invertido colorido e temperatura do processo elevada. A hidrólise ácida pode produzir furfural e outros agentes aromáticos indesejáveis, assim como oligossacarídeos por reações de polimerização (122).

A tendência atual é o emprego da hidrólise enzimática, sendo que o desenvolvimento de enzimas imobilizadas oferece uma maneira alternativa de tornar o processo contínuo possível e economicamente viável. Neste sentido, já existem

trabalhos publicados (20, 47, 97, 102).

O maior emprego da enzima invertase se encontra na manufatura de confeitos com recheios liquefeitos. Tais formulações consistem principalmente de sacarose, xarope de glicose, açúcar invertido e outros componentes. A invertase é agregada a uma baixa dosagem e hidrolisa a sacarose lentamente. A adição da enzima resulta em:

- O centro do confeito torna-se mais mole ou mesmo liquefeito.

- A frutose resultante da hidrólise da sacarose é higroscópica e previne a perda de umidade do produto.

- A frutose inibe a cristalização de outros componentes e assegura uma consistência adequada.

- A inversão da sacarose aumenta a pressão osmótica o suficiente para inibir a fermentação (99).

Foi proposto para a invertase ainda as seguintes aplicações:

- Em produtos para a higiene oral, a fim de evitar a formação de placas dentárias ou remoção das mesmas (12).

- Na indústria de refrigerantes.

- Na indústria de papel, para produzir levulose, usada como agente plastificante (39).

- No preparo de D-frutose a partir de insulina, melebirose a partir de rafinose, gentiose a partir de gentianose, e hexose fosforilada a partir de sacarose monofosfatada (39).

- Na hidrólise de sacarose em fermentação contendo meio de cultura com melaço, para melhorar crescimento de

microrganismos.

2.10- Fermentação.

O termo "fermentação", no sentido mais amplo possível, pode ser definido como todo processo no qual microrganismos catalisam a conversão de uma dada substância num determinado produto. O processo de conversão pode ou não requerer oxigênio, e os próprios microrganismos podem estar incluídos entre os produtos formados (17).

2.10.1- Classificação dos processos fermentativos.

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a maneira através da qual o substrato é adicionado e o produto retirado. Assim sendo, numa fermentação descontínua, o substrato é inicialmente carregado num recipiente e, ao término do processo, o produto é retirado do mesmo.

Em operação contínua, a matéria prima é adicionada com uma vazão constante e o meio fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação. Devem ser ainda mencionados os processos semi contínuos, nos quais a adição de meio e a retirada de produtos são efetuados intermitentemente. Tais processos podem ser considerados como intermediários entre os descontínuos e os contínuos (119).

2.10.2- Processo contínuo.

Em 1949, Monod alterou um processo descontínuo através do fornecimento contínuo de meio de cultura fresco, enquanto que simultaneamente fazia a retirada de células e produtos (84).

Apesar do grande esforço devotado por inúmeros pesquisadores ao assunto, a fermentação contínua ainda constitui um enorme campo a ser explorado, principalmente no que se refere a sua aplicação em processos de interesse econômico. Esse fato poderá ser melhor observado se atentarmos para o número relativamente pequeno de instalações industriais que utilizam os processos contínuos de fermentação e, entre as instalações existentes, para o número ainda pequeno de produtos fabricados por esses processos (2,19).

O processo apresenta certas vantagens em relação ao processo descontínuo, podendo ser citado a redução do tempo, instalações de menor capacidade, trabalho em condições ótimas para o microrganismo durante o processo, devido ao estado estacionário; produto com maior uniformidade, além de permitir uma maior facilidade de controles automáticos, podendo ser associado a outras operações contínuas da linha de fabricação (17).

Quanto as desvantagens, pode-se citar como a mais séria de todas elas, a manutenção de esterilidade por longo período de tempo. Além deste, o fato do microrganismo sofrer alteração genética. O problema prático importante está relacionado com a falta de homogeneidade no reator,

principalmente quando se trabalha com vazões específicas baixas e/ou quando se trabalha com meios muito viscosos, dificultando assim a uniformidade de concentração de nutrientes no fermentador (17, 119).

2.11- Reator microbiológico.

O reator microbiológico ou biorreator é concebido em função do tipo do processo em que será desenvolvido. Qualquer que seja o microrganismo, o reator deve permitir um contato tão bom quanto possível entre as duas fases, biótica e abiótica do sistema. O bom desenvolvimento do processo, segundo a distribuição cinética ótima, está ligado aos fenômenos de transferência entre a célula e o meio de cultura. Trata-se antes de tudo, de transferência de matéria, do meio externo para a célula, no que se refere ao substrato e aos compostos do meio de cultura, necessários ao crescimento celular, e no sentido inverso, para os produtos do metabolismo (107).

O reator biológico deve facilitar as transferências de calor, do meio em circulação em direção as células, e inversamente à medida que o crescimento celular for ocorrendo. A distribuição homogênea das células do meio evita então todo fenômeno de superaquecimento local, dado a sensibilidade dos processos microbiológicos ao calor. Como última limitação imposta ao biorreator, devemos lembrar que o mesmo deve ser livre de contaminação, evitando assim problemas ao processo fermentativo (107).

A Figura 2.2 ilustra alguns tipos de reatores

utilizados em fermentação contínua.

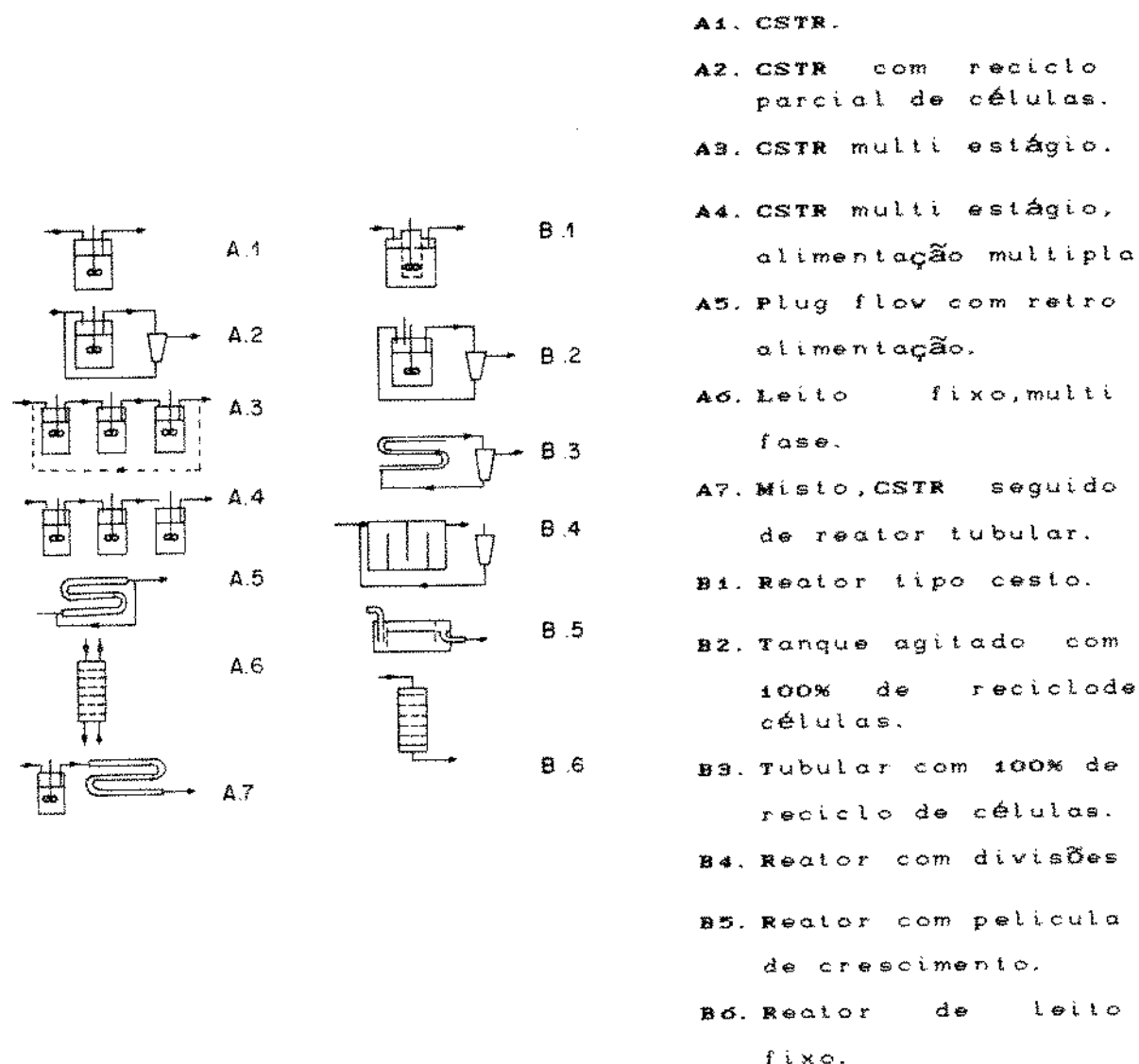


FIGURA 2.2 Tipos de reatores utilizados em fermentação contínua (87).

Segundo Moser (87) podemos classificar os sistemas

contínuos em:

- Sistemas contínuos abertos.
- Sistemas contínuos fechados.

Esta classificação é baseada no fato do reator permitir ou não a passagem do microrganismo para fora do mesmo.

Esses sistemas podem ser ainda:

-Sistemas homogêneos:- aqueles em que somente uma fase está presente.

-Sistemas heterogêneos:- são aqueles em que aparece uma fase contínua líquida (substrato) e outra fase descontínua sólida, onde o biocatalisador está imobilizado.

2.12- Reatores utilizados em fermentação.

2.12.1- Quimiostato.

Nesse sistema o meio de cultura é introduzido continuamente no reator através de uma bomba, sendo que o volume do reator é mantido constante. O reator se encontra esquematizado na FIGURA 2.3 (119).

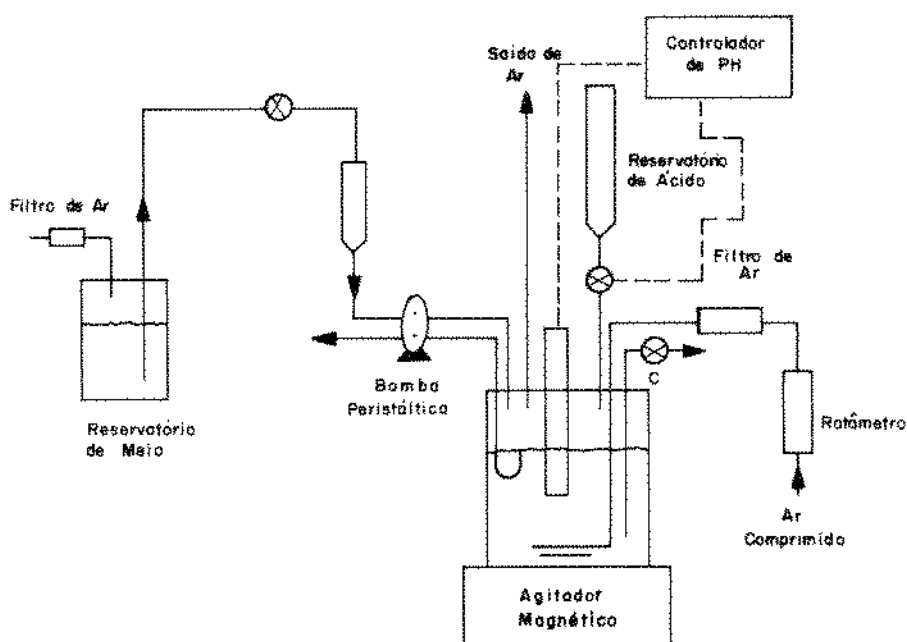


FIGURA 2.3 Esquema do quimiostato (119).

2.12.2- Quimiostato com reciclo de células.

Esse sistema proporciona o inóculo contínuo do meio contido no reator, permitindo uma boa estabilidade do sistema e minimizando os efeitos de perturbação no processo. Esse tipo de reator permite trabalhar com uma alta conversão celular (119).

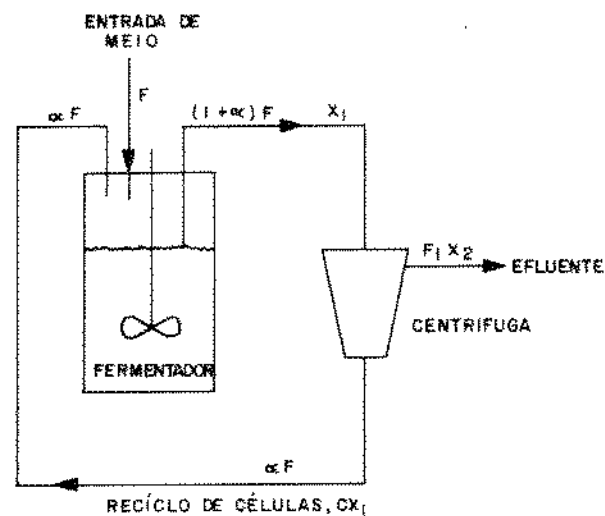


FIGURA 2.4 Esquema do reator com reciclo de células (119).

2.12.3- Sistema multiestágio.

Conforme a FIGURA 2.5, podemos distinguir três tipos de sistemas multiestágios (87).

- Sistema multiestágio com alimentação simples.
- Sistema multiestágio com alimentação múltipla.
- Sistema multiestágio com reciclo.

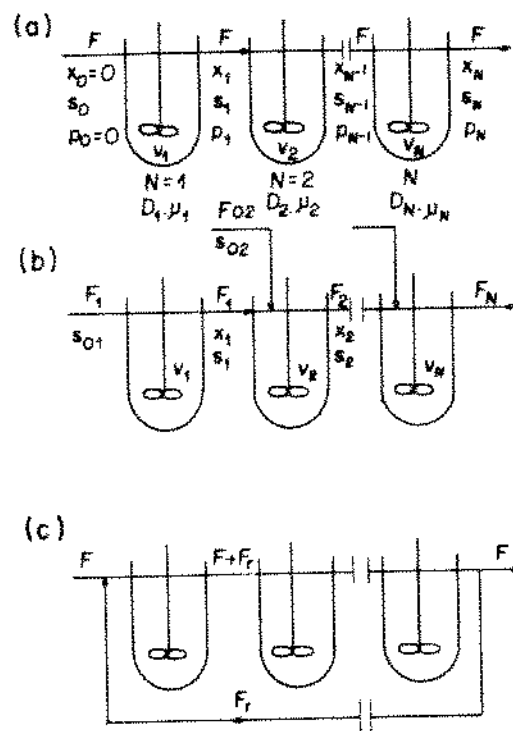


FIGURA 2.5 Esquemas de diferentes tipos de reatores multiestágio (87).

O sistema multiestágio com alimentação simples possui em geral, as seguintes características (87):

- O estágio posterior não afeta o anterior.
- O primeiro estágio comporta-se como um reator de

mistura.

A taxa de diluição (D) não pode ser variada em nenhum estágio sem que ocorra variação da mesma nos outros, pois o fluxo é constante.

A taxa de diluição em cada estágio depende somente do volume e do reator.

$$F = D_1 V_1 = D_2 V_2 = D_3 V_3 \quad (2.7)$$

onde: F = vazão do meio de alimentação.

D_1, D_2 e D_3 = taxa de diluição nos estágios 1, 2 e 3, respectivamente.

V_1, V_2 e V_3 = volume dos reatores 1, 2 e 3.

O sistema multiestágio com alimentação múltipla possui as seguintes características:

- Estágios anteriores são independentes dos estágios posteriores, e o primeiro comporta-se como um C.S.T.R.

- A alimentação com diferentes meios pode ser variada independentemente, e a taxa de diluição em cada reator independe da variação no processo (87).

- O sistema multiestágio com reciclo, tem-se tornado importante, permitindo uma alta taxa de tratamento, reatores de pequenos tamanhos e alta conversão (52).

2.12.4- Reatores tubulares.

Esse tipo de reator é chamado de "reator gradiente" ou "reator com parâmetros distribuídos" ou ainda de "reator integral".

Em um caso ideal desse reator, existe um fluxo ordenado através do mesmo. Num reator real, o escoamento do

fluido tende a se diferenciar da condição ideal, pois aparecem gradientes na direção normal ao escoamento. Pode-se destacar aqui os reatores de leito fixo, e os reatores de leito fluidizado (117).

Segundo Chibata (29), os reatores de leito fixo são bastante usados para células imobilizadas, podendo ser de fluxo ascendente, descendente ou ter uma corrente de reciclo de parte do efluente do reator.

A limitação do uso do reator de leito fixo está diretamente ligado ao tamanho das partículas de suportes utilizados na imobilização, pois fatores tais como difusão, queda de pressão, passam a ter grande influência. Também devemos ressaltar que o controle de pH é impraticável nos reatores de leito fixo (117).

Num reator de leito fixo fluidizado tem-se um fluxo ascendente de substrato, o qual permite que as partículas permaneçam em suspensão. Esse tipo de reator situa-se em relação ao grau de mistura, numa faixa intermediária, entre o de mistura e o tubular. Esses reatores tem seu uso preferencialmente, quando se trabalha com soluções de substrato viscosos ou quando contém partículas em suspensão permitindo uma porcentagem de conversão maior que em um reator de mistura contínuo (29).

Além de outras características, pode-se citar a fácil remoção de calor nesse tipo de reator, além de se poder utilizar menores tempos de residência.

A FIGURA 2.6 mostra o esquema dos reatores descritos.

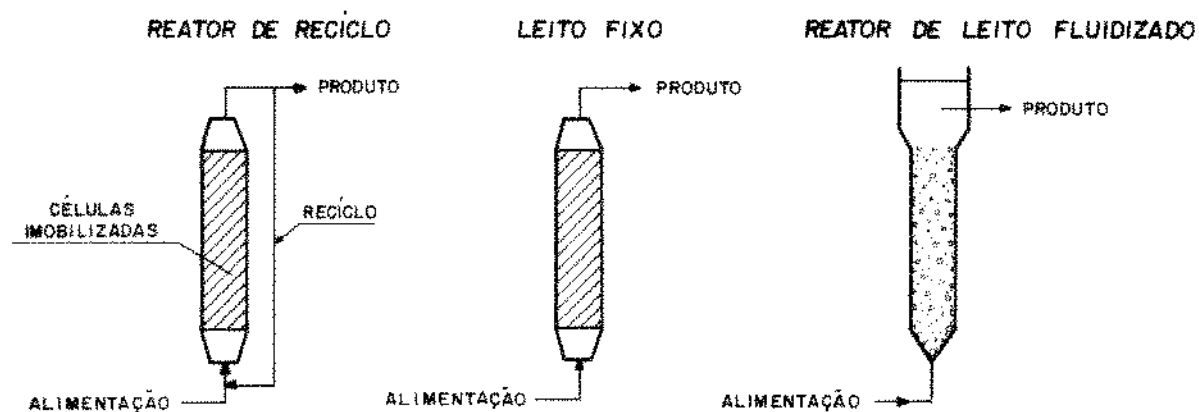


FIGURA 2.6 Esquema dos reatores tubulares (117).

Um reator derivado desses tipos descritos, é o fermentador de Torre ("tower fermentors"), o qual foi desenvolvido para a indústria da cerveja em 1960, cuja finalidade era produzir continuamente cerveja, com uma maior produtividade e eficiência que o sistema em batelada (104).

Sua principal característica é a utilização de leveduras floculantes (67).

Esse reator tem um comportamento próximo ao de um reator de leito fixo, devido ao leito de leveduras, que se forma. Por outro lado à altas taxas de vazão e alta produção de CO_2 o reator tem comportamento de reator de leito fluidizado (104).

A maior vantagem do fermentador tipo torre é sua habilidade de manter estável a operação por grandes períodos de tempo.

A FIGURA 2.7 ilustra o esquema do fermentador tipo torre.

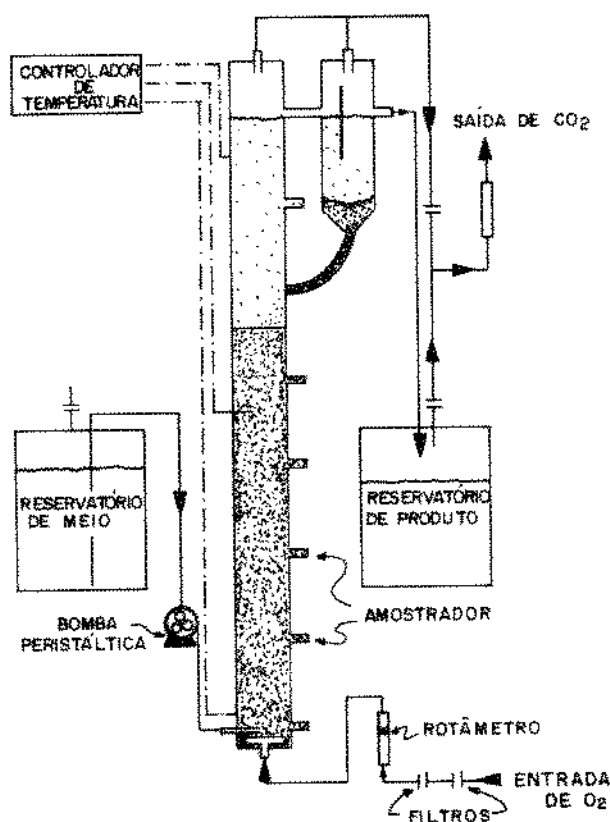


FIGURA 2.7 Diagrama esquemático do fermentador tipo torre (66).

Muitos reatores requerem que o biocatalisador (microrganismos, células de planta ou animal), seja imobilizado dentro ou na superfície de um sólido, visando a redução do "washout" celular, aumentando significativamente a concentração do biocatalisador, enquanto promove um excelente contato do mesmo com o substrato. Alguns microrganismos e outros materiais celulares tem uma inclinação natural para aderir na superfície, tornando possível a sua imobilização. Durante os últimos cinco anos, novas técnicas de imobilização por aprisionamento ou encapsulação tem sido desenvolvidas, resultando com isso em uma quantidade grande de artigos sobre imobilização celular (106).

2.13- Técnicas de imobilização.

A imobilização de microrganismos pode ser definida como uma técnica que limita a livre migração de células. A mobilidade celular pode ser restringida por agregação das células ou por confinamento das mesmas, ou por ligação das mesmas a um suporte sólido (106).

Vários termos têm sido usados para descrever diferentes tipos de imobilização, mas os mesmos não têm sido aceitos universalmente.

Pode-se classificar as técnicas de imobilização celular em dois grupos:

- Adesão celular, onde um microrganismo adere a superfície ou a outro microrganismo por auto adesão ou por ligação química (30).

- Aprisionamento ("entrapment") onde o microrganismo

é aprisionado nos interstícios de materiais fibrosos ou porosos ou é fisicamente restringido com ou por sólido ou por matriz porosa, tal como alginato, carragenato ou membrana (30).

Esses dois grupos de técnicas de imobilização podem ser subdivididos em grupos menores, os quais serão discutidos adiante.

2.13.1 Agregação.

Muitas células tem a habilidade de aderir a outros organismos (agregados) ou a superfícies sólidas. Sendo que esse mecanismo pode ser natural ou induzido.

Alguns microrganismos tendem a formar agregados ou partículas floculantes, principalmente quando se encontram em uma suspensão, em alta concentração, por extenso período.

Esse fenômeno ocorre com várias espécies de leveduras incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, onde o agregado pode ser utilizado em reatores de torres contínuos (69, 93) e algumas bactérias (por ex. espécies de *Zymomonas mobilis*), que formam agregados naturais que são relativamente estáveis sempre que expostas a um campo de cisalhamento em um reator de coluna, tal como o reator de leito fluidizado (48).

O agregado celular também pode ser induzido através de condições ambientais que favorecem a agregação celular, tais como aeração (33), certos polieletrólitos (24) e variação na taxa de diluição (13).

2.13.2- Adesão à superfície.

A tendência natural de muitos microrganismos de aderir a superfícies sólidas pode algumas vezes causar problemas, como no caso das placas dentárias, deposições em navios, etc. Entretanto, essa característica também pode ser útil no caso de aplicações na biotecnologia, principalmente na área de controle ambiental, onde filmes microbianos são utilizados em biorreatores. Alguns microrganismos que não aderem naturalmente, podem ser induzidos a aderir a superfície, através da alteração de suas propriedades físicas ou químicas, ou da superfície, por atração iônica ou por ligação química (75).

2.13.2.1- Mecanismos de adesão.

Os mecanismos de adesão celular não têm sido completamente elucidados, mas foi verificado que alguns tipos de microrganismos excretam macromoléculas, tais como polimucossacarídeos que atuam como uma "cola", interagindo assim o organismo com a superfície (75).

Outros microrganismos podem em uma cultura mista fazer uma ação simbiótica, promovendo com isso a formação de um filme microbiológico.

2.13.3- Aprisionamento celular.

O aprisionamento de células é um método muito difundido, pois o mesmo não tem uma dependência significativa das propriedades das células. As células são aprisionadas nos interstícios de materiais porosos, tais como esponja ou

substâncias fibrosas, ou por aprisionamento físico em membranas ou por encapsulação em matrizes de géis (30).

2.13.3.1- Encapsulação.

O aprisionamento físico de microrganismos dentro de uma matriz polimérica é uma das técnicas mais conhecidas de imobilização celular. O material utilizado deve ser suficientemente poroso, para permitir o transporte de substrato e de produto e ao mesmo tempo não permitir a saída de célula. Géis hidrocoloidais são geralmente usados para essa aplicação, onde pode-se destacar : alginato, carragenato, pectina, agar, como géis naturais; sendo que o gel poliacrilamida, embora seja um material sintético, é muito utilizado (22, 28, 30, 65).

2.13.3.2- Aprisionamento em membranas.

Células de microrganismos podem ser aprisionadas em membranas semipermeáveis que isolam os mesmos do meio líquido. As células podem ser imobilizadas dentro destas membranas (técnica frequentemente utilizada para fabricação de biosensores) ou então elas são mantidas dentro de um espaço vazio, envolvido por membranas (técnica usada com reator de membrana) (63).

Um exemplo prático de reator de membrana, seria o reator "hollow-fiber".

2.13.3.3- Aprisionamento em materiais porosos.

Alguns materiais porosos tem vazios que permitem que o microrganismo penetre e cresça dentro dos mesmos formando

colônias. Esses vazios devem ser suficientemente grandes para permitir a fácil penetração do microrganismo, mas não maior que poucas vezes o diâmetro da célula (116). Os materiais utilizados podem ser fibras (algodão ou malha de nylon ou tecido), malha metálica e vários tipos de espuma ou esponjas (32, 92).

2.13.4- Características da imobilização.

Como a imobilização de células está se tornando relativamente comum, ênfase está sendo dada no sentido de definir e caracterizar o material imobilizado. Para isso leva-se em conta três diferentes aspectos:

- Quantidade de biocatalizador na matriz.
- Dimensão das partículas.
- Limitações difusionais à reação biológica.

2.13.5-Cinética do biofilme.

Muito se tem estudado sobre a cinética e dinâmica de filme microbiano. Como já citado, existem alguns resultados sobre a adesão de microrganismos à superfície, bem como tem sido desenvolvidos modelos para explicar o sistema biofilme (75).

2.13.6- Estudo sobre transferência de massa.

Importantes estudos tem sido realizados no intuito de verificar a difusão interna em sistemas imobilizados. Investigações tem demonstrado que o coeficiente de difusão da glicose em géis de alginato sem microrganismos aproxima do coeficiente da glicose em água (54, 112). Entretanto, tais

materiais não têm uma resistência difusional para moléculas grandes, embora algumas formulações de géis possuam tamanhos de poros que são suficientemente grande para permitir a excreção de enzimas produzidas (68).

2.13.7- Cinética dos processos fermentativos.

O estudo da cinética dos processos fermentativos está voltada para dois grandes objetivos:

- Medir as velocidades das transformações que ocorrem durante o processo.

- Estudar a influência de fatores nas velocidades das transformações.

Assim, a cinética dos processos fermentativos permite o conhecimento das condições mais favoráveis de se conduzir e controlar um processo fermentativo.

Fundamentalmente, o estudo cinético envolve duas partes. O trabalho experimental de coleta de dados em laboratório, onde procura-se medir velocidades e estudar a influência de fatores. Após obtenção desses dados, resta interpretá-los, consistindo em correlacioná-los empiricamente ou através de modelos matemáticos.

2.13.7.1- Velocidades das transformações.

Para se medir velocidade em um processo fermentativo, precisamos definir antes velocidade de uma transformação.

Essa definição é feita, utilizando-se um processo

genérico, em que uma substância S é transformada em uma substância P.



A velocidade pode então ser definida através do consumo da substância S ou através da produção de P.

Tendo a curva de variação da concentração das substâncias S e P em função do tempo, como mostra a FIGURA 2.8, pode-se determinar as velocidades através da derivada às curvas, no instante considerado.

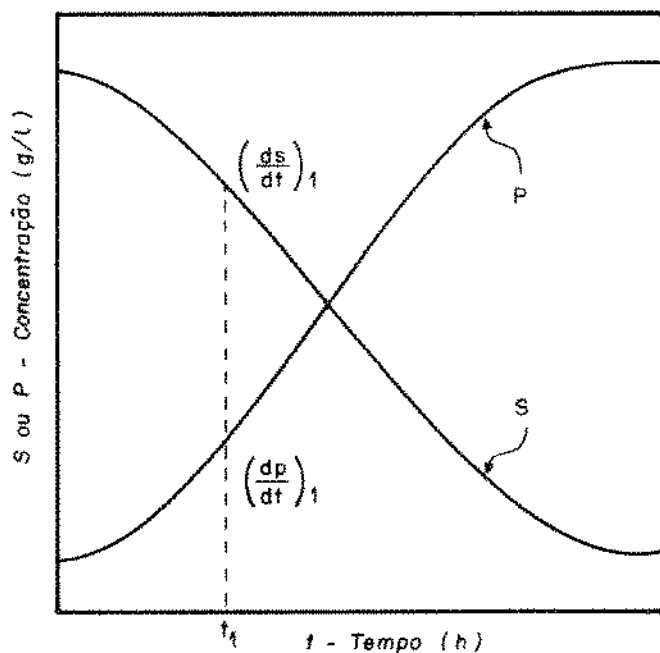


FIGURA 2.8 Representação da variação da concentração das substâncias S e P da reação com o tempo.

Da FIGURA 2.8 tem-se:

$(dS/dt)_1$ = velocidade de consumo da substância S no instante t_1 (g/l.h).

$(dP/dt)_1$ = velocidade de formação da substância P no instante t_1 (g/l.h).

Em um estudo de cinética química, estas seriam as velocidades, mas no caso de microrganismos, em que tem-se uma variação da concentração de células com o tempo, usa-se a definição de velocidade específica:

$$\mu_s = 1/x \cdot dS/dt \quad (2.8).$$

$$\mu_p = 1/x \cdot dP/dt \quad (2.9).$$

Além da velocidade de consumo de substrato e da formação de produto, outra velocidade muito utilizada é:

$$\mu_x = 1/x \cdot dX/dt \quad (2.10).$$

onde: X = concentração do microrganismo no instante considerado (g/l).

dX/dt = velocidade de crescimento microbiano no instante considerado (g/l)

μ_x = velocidade específica de crescimento do microrganismo (1/h).

No caso dos processos fermentativos, o agente responsável pela formação é uma célula viva que assimila diversos materiais, se reproduz e produz outras substâncias alterando profundamente a composição do meio em que vive. O estudo da cinética desses processos defronta-se com obstáculos tais como:

-velocidade que devem ser medidas.

-técnicas empregadas nas medidas de velocidades.

- medida da concentração celular.
- medida das concentrações dos substratos e produtos.
- variação do volume da fase aquosa durante a fermentação.
- influência da retirada de amostra durante a fermentação
- influência da geometria do fermentador; podendo estar voltada para o crescimento do microrganismo, para a produção de um determinado produto, ou mesmo para o consumo de substrato (17).

2.13.7.2- Equação de Monod.

Trabalhando com sistemas de fermentação contínua de produção de microrganismos, baseados na existência de um substrato limitante, Monod propôs um modelo empírico para relacionar a velocidade específica de crescimento com a concentração do substrato limitante (84).

Correlacionando a velocidade específica, em função da concentração de substrato, Monod obteve uma curva como está representada na FIGURA 2.9.

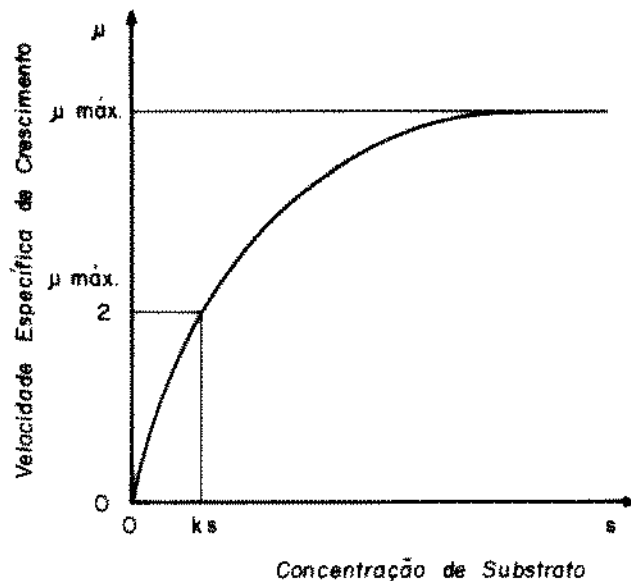


FIGURA 2.9 Representação esquemática da equação de Monod (107).

Com base nos dados experimentais, Monod propôs a seguinte equação para representar a curva da FIGURA 2.9.

$$\mu = \mu_{\text{máx.}} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (2.11).$$

onde: K_s = constante de saturação e corresponde à concentração de substrato que fornece uma velocidade específica de crescimento, igual à metade da velocidade específica máxima.

O ajuste da equação 2.11 nos pontos experimentais, através da FIGURA 2.9, não é tão simples. No entanto, invertendo-se ambos os membros da equação 2.11, pode-se escrever:

$$1/\mu = K_s/\mu_{\text{máx}} \cdot 1/S + 1/\mu_{\text{máx}} \quad (2.12).$$

A equação 2.12 representada na FIGURA 2.11,

permite obter, com maior precisão, os parâmetros da equação 2.11.

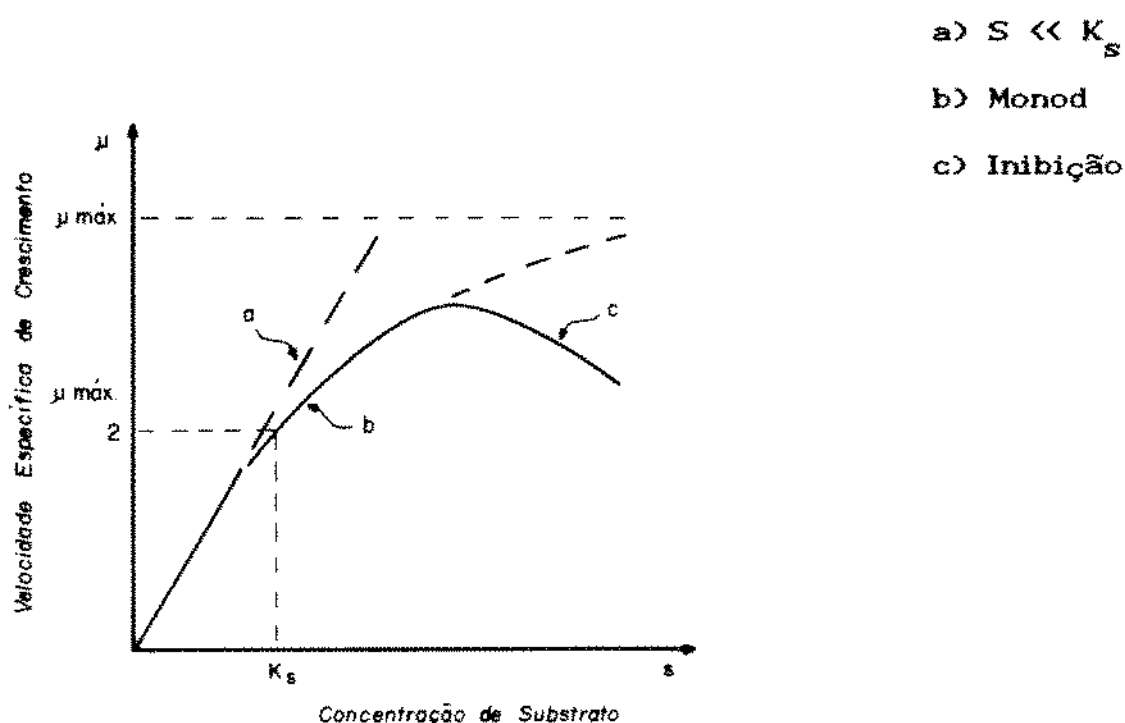


FIGURA 2.10 Efeito da concentração do substrato na velocidade específica de crescimento (107).

A equação de Monod nem sempre se aplica, e corresponde a uma simplificação do que realmente ocorre na prática. Tem-se problema de inibição que incluem inibição devido a alta concentração do substrato, inibição devido a formação de produtos, além de problemas relacionados com o emprego de meios com mais de um substrato, além da morte de células durante o

processo. A FIGURA 2.10 representa um caso típico da relação existente entre a velocidade específica de crescimento e a concentração de substrato (119).

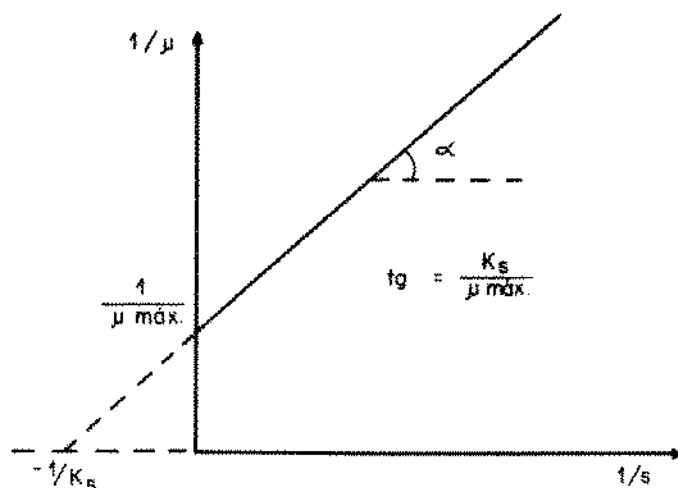


FIGURA 2.11 Efeito da concentração do substrato na velocidade específica de crescimento (119).

Quando $S \ll K_s$, a equação 2.12 permite escrever que:

$$\mu = \mu_{\max} / K_s \cdot S \quad (2.13)$$

Assim, para $S \ll K_s$ existe uma relação linear entre a velocidade específica de crescimento e a concentração do substrato limitante, como mostrado na FIGURA 2.11.

Para $S \gg K_s$ a velocidade específica tende a velocidade específica máxima de crescimento. No entanto, existindo a inibição devido à presença de produtos do metabolismo ou devido à presença do substrato, a curva tende a se comportar

como no caso mostrado na FIGURA 2.11. Nesse caso, uma equação do tipo

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \cdot K_1 / (K_1 + S) \quad (2.14)$$

poderia ser empregada para relacionar a velocidade específica de crescimento com a concentração do substrato (2).

Devido a natureza complexa do metabolismo microbiano e de seu comportamento, alguns modelos matemáticos tem sido desenvolvidos com a finalidade de quantificar os efeitos inibitórios do substrato e produto final. A forma exata do modelo matemático, depende da espécie do microrganismo, condições de operação e estado do meio (88).

Quando microrganismos crescem sobre soluções concentradas de carboidratos, o produto final se acumula no meio e a atividade do microrganismo é suprimida, provocando o fenômeno conhecido como inibição pelo produto final. Altas concentrações de substrato também inibem o crescimento e desenvolvimento do microrganismo, dando origem ao fenômeno denominado inibição pelo substrato. Esses dois fenômenos são de grande importância num processo industrial pois estão relacionados diretamente com a eficiência do biorreator, redução da capacidade de entrada e saída do equipamento (107).

2.14- Inibição pelo substrato.

2.14.1- Mecanismos de inibição pelo substrato

A literatura fornece muitos dados sobre a forte influência da concentração do substrato sobre o crescimento microbiano. A baixas concentrações, a velocidade específica de crescimento (μ) é próxima de zero, indicando uma variação negligenciável da população. Quando a concentração de substrato é aumentada acima de uma concentração limite, a velocidade específica de crescimento é proporcional ao aumento do nível de substrato, e aproxima de um valor máximo. Um subsequente aumento na concentração fará com que haja um decréscimo na taxa específica de crescimento (FIGURA 2.12) (77, 114).

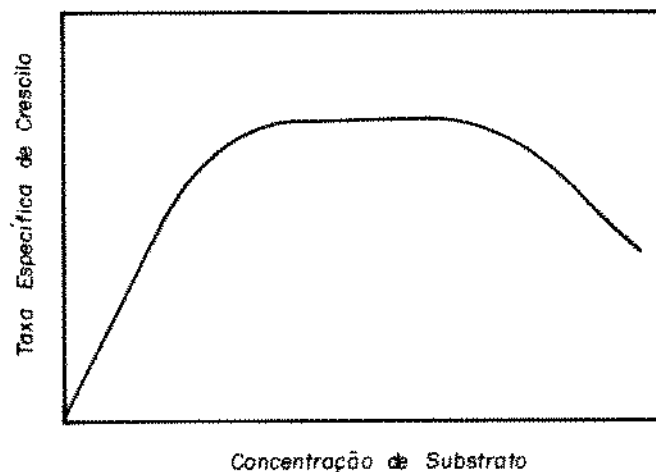


FIGURA 2.12. Diagrama esquemático mostrando o efeito da concentração do substrato na taxa específica de crescimento (77).

A resposta do crescimento microbiano, A variação da concentração de substrato não é totalmente inesperada, pois quando se varia a concentração do substrato, ocorre alteração na atividade de água (50, 67) e variando também as propriedades físico químicas, tais como: pressão osmótica, força iônica, constante dielétrica, etc, podendo alterar com isso a membrana celular (40).

Uma alta concentração de substrato provoca um aumento na adsorção ou complexação entre enzimas, coenzimas, e substrato, o que por sua vez reduz a atividade enzimática (40).

Do ponto de vista biológico, um aumento na concentração de substrato pode causar uma alteração no metabolismo celular de tal maneira que pode ocorrer uma maior produção de uma substância por um outro caminho metabólico, provocando uma inibição por retroalimentação de um caminho metabólico conhecido. O exemplo mais conhecido é o efeito Pasteur, o qual ilustra bem o efeito do oxigênio (substrato) no metabolismo da levedura (98).

2.14.2 - Modelo cinético para inibição pelo substrato

A TABELA 2.7 mostra vários modelos matemáticos, que foram desenvolvidos no intuito de quantificar o efeito inibitório do substrato.

TABELA 2.7 Modelos cinéticos de inibição pelo substrato (77).

Eq N°	Modelo cinético
2.15	$\mu_i = \mu_m \frac{S}{(S+K_s)(1+S/K_i)}$
2.16	$\mu_i = \mu_m \frac{S(1+S/K)}{K_s + S + S^2/K_{si}}$
2.17	$\mu_i = \mu_m \frac{S}{S+K_s + (S^2/K_{si})(1+S/K)}$
2.18	$\mu_i = \mu_m \frac{S}{S + K_s} e^{-S/K_{si}}$
2.19	$\mu_i = \mu_m (e^{-S/K_{si}} - e^{-S/K_s})$
2.20a	$\mu_i = \mu_m \frac{S}{S + K_s} \text{ quando } S < S^*$
2.20b	$\mu_i = \mu_m \frac{S}{S + K_s} - K_{si}'' (S - S^*)$ quando $S > S^*$
2.21	$\mu_i = \mu_m \frac{S}{S + K_s} \left(1 - \frac{S}{S_m}\right)^\alpha$

Boon e Laudelout (18) obtiveram sucesso ao explicar um modelo de inibição enzimática para microrganismo. Eles verificaram que a equação proposta por Haldane (51) (equação 2.15 da TABELA 2.7) para representar inibição enzimática, era aplicável para descrever a inibição de *Nitrobacter winogradskyi* quando se usava excesso de nitrito como substrato.

Andrews (5) e Edwards (40) puderam também mais

tarde comprovar que a referida equação representava a cinética de inibição pelo substrato para vários microrganismos cultivados em batelada ou continuamente.

Haldane (51) baseava a inibição enzimática pelo fato de haver formação de um complexo inativo da enzima, com duas moléculas de substrato.

Edwards (40) trabalhando com dois outros modelos de cinética enzimática, equações 2.16 e 2.17 da TABELA 2.7 para descrever cinética de crescimento de microrganismo, chegou a conclusão que essas equações não eram melhores que a equação 2.15, quando utilizada para descrever microrganismos cultivados em batelada ou continuamente.

Assumindo uma analogia entre o mecanismo de inibição pelo substrato e pelo produto, Edwards utilizou a equação 2.29, TABELA 2.8, proposta por Aiba e colaboradores (3) para descrever inibição pelo produto, como modelo para descrever a cinética de inibição pelo substrato, obtendo a equação 2.18. Verificando diferentes microrganismos, ele concluiu que a equação 2.15 não era muito diferente da equação 2.18 quando analisadas pelos dados, mas as equações eram estaticamente indistinguíveis.

Edwards (40) propôs a equação 2.19, a qual levava em conta o efeito difusional, o efeito de proteção difusional quando se utilizava concentrações altas e inibitórias.

Tseng e Wayman (114) propuseram as equações 2.20a e 2.20b para descrever cinética de inibição pelo substrato, quando trabalharam com *Candida lipolytica* e *Candida utilis*, crescendo sobre etanol e n-butanol, respectivamente.

O modelo mostra que abaixo de uma concentração S^* , não ocorre inibição (equação 2.20a). Entretanto, quando a concentração excede S^* , o crescimento decresce linearmente com respeito a diferença da concentração $(S - S^*)$ equação 2.20b.

Assumindo um mecanismo comum para inibição pelo substrato e produto, Luong (77) adaptou um modelo de inibição pelo produto, não linear, proposto por Levenspiel (74) para descrever cinética de inibição pelo substrato (equação 2.21).

Para baixas concentrações de substrato a taxa específica de crescimento (μ) aumenta com a concentração concordando assim com a equação de Monod.

A concentração S^* correspondente ao máximo μ era estabelecida por:

$$S^* = \left[\left(\frac{\alpha + 1}{\alpha} \right)^2 K_s^2 + \frac{4 K_s S_m}{\alpha} \right]^{1/2} - \left(\frac{\alpha + 1}{\alpha} \right) K_s \quad (2.22)$$

Quando $S > S^*$, o valor de μ decresce. O tipo de relação entre μ e S depende da magnitude da constante α .

Luong (77) em seu artigo relata que seu modelo descreve a cinética de crescimento melhor que outros (equação 2.15; 2.18 e 2.19), para vários microrganismos, e que também seu modelo poderia prever o valor máximo S_m , concentração acima da qual o crescimento era totalmente inibido.

2.15- Inibição pelo produto.

O efeito negativo do produto final sobre atividade microbiana constitui problema de interesse biológico em uma fermentação. O acúmulo de produtos tais como etanol, butanol, acetona, ácido láctico, etc, resulta em um decréscimo contínuo na taxa específica de crescimento e taxa de formação de produto.

2.15.1- Modelo cinético de inibição pelo produto.

Quando a presença de produtos metabólicos não desempenha um papel importante, a taxa específica de crescimento (μ) pode ser expressa como função da concentração de substrato limitante através da equação de Monod.

Entretanto, quando a presença de produtos afeta o crescimento celular, a equação 2.11 deve incluir a concentração do produto P.

$$\mu = f (S, P) \quad (2.23)$$

Estudos sobre inibição de crescimento microbiano por etanol, têm demonstrado que ele comporta-se como um inibidor não competitivo (3, 11, 49). Isso implica que somente a taxa específica de crescimento é afetada e não K_s na equação 2.23.

Entretanto, a taxa específica de crescimento na presença de inibidor pode ser representada por:

$$\mu = \mu_i \frac{S}{S + K_s} \quad (2.24)$$

onde μ_i é a taxa específica de crescimento máximo na presença do inibidor.

A TABELA 2.8 ilustra vários modelos que tentam estabelecer uma relação entre μ_1 / μ_{\max} e concentração do produto durante o experimento.

A equação 2.25 proposta por Hinshelwood (58) propõe um modelo linear para cinética de inibição, enquanto que Holzberg e colaboradores (59) modificaram a equação 2.25 para explicarem a inibição que aparecia quando fermentava suco de uva, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, a equação por eles modificada, era o modelo 2.26.

Já Egamberdiev e Ierusalimsky (42) sugeriram o modelo 2.27 para explicar a inibição pelo etanol da espécie *S. vini*, verificando que a taxa específica de crescimento era função hiperbólica da concentração do produto.

Nagatami e colaboradores (91) e Aiba e colaboradores (3) propuseram uma relação exponencial entre taxa específica de crescimento e concentração de etanol quando utilizavam levedura na fermentação, propondo a equação 2.28.

TABELA 2.8 Modelos matemáticos para cinética de inibição (77).

Eq N°	Modelo cinético
2.25	$\mu_i = \mu_m - K_1 P$
2.26	$\mu_i = \mu_m - K_1 (P - K_2)$
2.27	$\mu_i = \mu_m \frac{K_{pi}}{K_{pi} + P}$
2.28	$\mu_i = \mu_m e^{-K_3 P}$
2.29	$\mu_i = \mu_m - \frac{K_4 P}{K_2 + P_m}$
2.30	$\mu_i = \mu_m \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)$
2.31	$\mu_i = \mu_m \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^\beta$
2.32	$\mu_i = \mu_m \left[1 - \left(\frac{P}{P_m}\right)^\gamma\right]$

Bazua e Wilke (11) verificaram que os dados cinéticos de *S.cerevisiae* cultivada em quimiostato não seguia uma relação linear, exponencial ou hiperbólica, sendo que os mesmos eram descritos pela equação 2.29, a qual foi utilizada por outros autores para explicar o efeito inibitório de butanol sobre *Clostridium acetobutylicum*.

A equação 2.30 foi proposta por Ghose e Tyagi (49) e é uma extensão da equação 2.25.

Levenspiel (74) propôs um modelo cinético não linear (equação 2.31), onde a constante β , de acordo com seu

valor pode tornar a equação 2.23 na equação 2.30 ($\beta = 1$), na equação 2.27 e 2.28 ($\beta > 1$), na equação 2.29 ($\beta < 1$).

Luong (77) propôs uma modificação da equação 2.31 obtendo a equação 2.32, sendo que nessa equação, a magnitude da constante γ determina a relação entre μ e D. Quando $\gamma = 1$ a equação 2.32 se assemelha a equação 2.30. Para $\gamma < 1$ a equação 2.32 passa a representar o modelo cinético proposto por Aiba e colaboradores (equação 2.28). Quando $\gamma > 1$ ela representa os dados cinéticos de Bazua e Wilke (equação 2.29).

Devido a natureza complexa dos microrganismos um conhecimento completo dos mecanismos de inibição não está bem estabelecido. Consequentemente temos vários modelos para descrever a cinética, tanto para inibição pelo produto, como para inibição pelo substrato, sendo que a maioria desses modelos possuem uma aplicação específica.

III - MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 - Processos fermentativos.

3.1.1 - Reagentes.

Os reagentes químicos utilizados nos experimentos foram todos produtos P.A.. No caso de meio de cultura, além de substâncias P.A., foi utilizado como fonte de carbono, melaço (ART = 56%), e como fonte de nitrogênio água de maceração de milho, produtos esses de natureza complexa.

3.1.2 - O microrganismo utilizado nos experimentos foi a levedura *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045.

3.1.3 - Manutenção da cultura.

O microrganismo era repicado periodicamente em tubos contendo meio de cultura P.D.A. (Potato Dextrose Agar). Esses tubos contendo o meio inclinado serviam mais tarde como cultura estoque.

3.1.4 - Condição de cultura.

O meio de cultura para desenvolvimento do microrganismo foi o mesmo utilizado por Costa em seu trabalho (26), cuja composição se encontra descrita abaixo:

Meio de cultura (M_1)

composição	concentração (g/l)
sacarose	20,0
extrato de levedura	5,0
K_2HPO_4	5,0
NH_4Cl	1,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,65
KCl	1,15
pH	6,8

3.1.5 - Preparo do inóculo.

Tubos de ensaio contendo 5,0 ml de meio de cultura M_1 , previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos, foram inoculados com uma alçada da cultura estoque. Estes tubos foram mantidos em incubadora por 24 horas a 30°C. A seguir o conteúdo de cada tubo era transferido para erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de meio de cultura M_1 , previamente esterilizado.

Os erlenmeyers contendo o meio inoculado eram incubados em "shaker" da News Brunswick Y.I., a uma rotação de 200 rpm, em uma temperatura de 30°C, por 12 horas.

3.1.6 - Meio de cultura utilizado nos processos de fermentação.

O meio de cultura utilizado nos três processos

fermentativos possuía a seguinte composição:

Meio de cultura M₂

composição	concentração (g/l)
melaço	30,0
água de maceração de milho	40,0
K ₂ HPO ₄	5,0
pH	3,5

3.1.7 - Preparo do meio de cultura.

Na elaboração do meio de cultura a ser utilizado na fermentação, o melaço e a água de maceração, após pesagem, eram diluídos em água e filtrado através de um filtro centrifugo tipo F.10 marca Janke & Kunkel KG, utilizando-se de filtros de papel Ika-Filtray nº. 545.

Após a filtração, acertava-se o pH para 3,5 e completava-se o volume com água. Para acerto do pH era utilizado ácido ortofosfórico.

O meio era esterilizado em galões Pirex de 15 litros a 121°C por 20 minutos, sendo que no mesmo era adicionado algumas gotas de anti espumante, a base de silicone (A - E - FG 10).

O fosfato de potássio era esterilizado em separado, sendo adicionado ao meio quando resfriado, o seu pH também era acertado para 3,5.

No preparo do meio de cultura, o melaço foi

fornecido gentilmente pela Usina Ester e a água de maceração de milho ou milhocina, pela Refinações de Milho Brasil.

3.1.8 - Determinação da taxa de crescimento do microrganismo

Foi realizada uma fermentação em batelada, utilizando meio M_1 descrito no item 3.1.4, mas utilizando pH 3,5. A fermentação transcorreu em reator agitado, a uma temperatura de 30°C, a qual era mantido por um banho termostatizado, modelo U^{2c} , marca MLW, e aeração entre 0,2 a 0,3 vvm, regulada através de um rotâmetro modelo OM 0425 P1, marca OMEL. O volume de meio no reator era de 400 ml.

As amostras eram retiradas em intervalos de uma hora, durante seis horas. Após centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos em centrífuga Spin VI Incibrás, as mesmas eram diluídas convenientemente com água destilada, e feita a leitura da absorbância a 600nm, usando água destilada como branco em espectrofotômetro modelo Spectronic 20, da Baush & Lomb.

A absorbância foi convertida em massa seca, através de uma curva padrão. Utilizando-se da curva de absorbância (D.O) versus massa seca (FIGURA 3.1), obteve-se a equação de massa seca (g/l) = $1,025 \times \text{ABS}$. Através da equação podemos transformar densidade ótica em massa seca e, portanto, graficar logaritmo da concentração celular versus tempo, para achar o valor da taxa específica de crescimento (FIGURA 3.2).

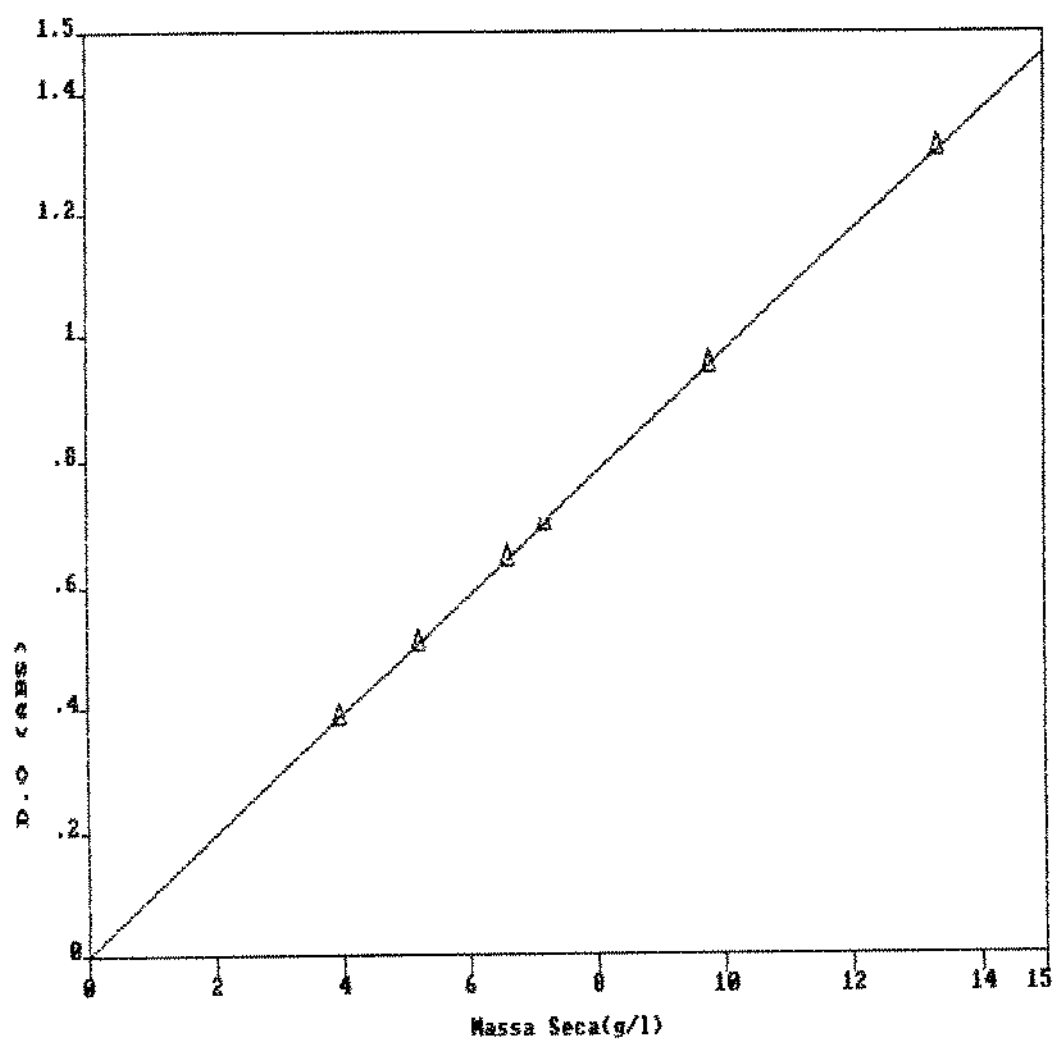


FIGURA 3.1 Curva padrão de densidade ótica versus massa seca.

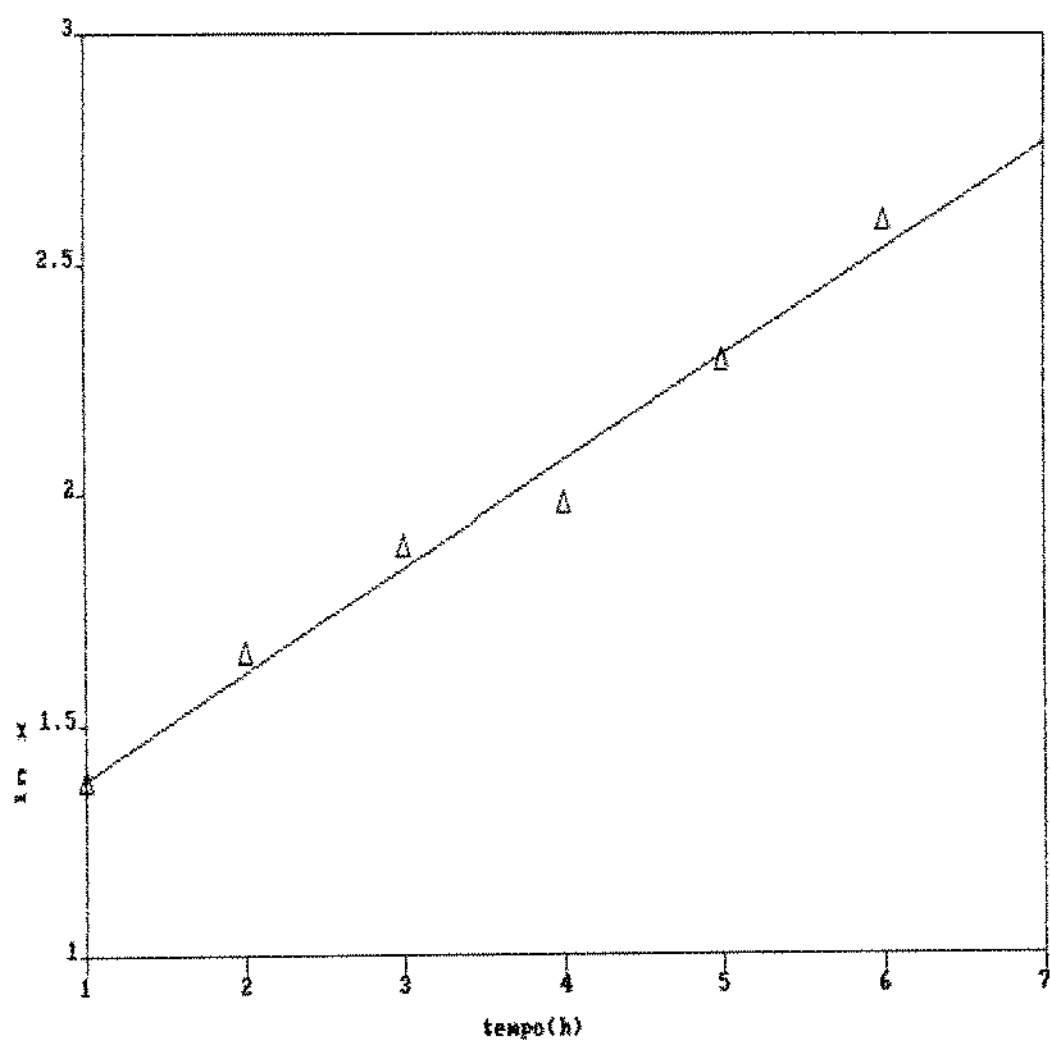


FIGURA 3.2 Evolução do crescimento celular em função do tempo

3.1.9 - Processos de produção da enzima invertase por batelada alimentada

Fez-se inicialmente fermentação em batelada simples utilizando-se o meio de cultura M_2 citado no item 3.1.6, a qual serviria como base para as fermentações em batelada alimentada. As fermentações em batelada alimentada eram conduzidas em reator da Fermentation Design Inc., FIGURA 3.3, modelo M-1000, dotado de agitação magnética, controle de aeração (0,2 a 0,3 vvm), controle de temperatura (30°C), controle este feito por banho termostatzado modelo U^{2C} , marca MLW. A alimentação da fonte de carbono (sacarose/melaço) era feita por uma bomba peristáltica modelo B 33211, marca Micronal, a uma vazão de 3,0 ml/h. O meio de cultura utilizado nos experimentos foi o meio M_2 , e as concentrações de sacarose/melaço utilizadas nos experimentos foram 240,0; 350,0 e 440,0 g/l.

Também fez-se fermentação em batelada alimentada com alimentação exponencial, cuja finalidade era de se obter uma maior produção de enzima. A concentração de melaço utilizada nesse experimento foi de 440,0 g/l. O volume de meio de cultura no reator em todos os experimentos de batelada alimentada foi de 600 ml.

As amostras de 10 ml eram retiradas assepticamente e feitas análises de densidade ótica, açúcar redutor total e atividade enzimática. A densidade ótica, por meio de uma curva padrão era convertida em massa seca (g/l).

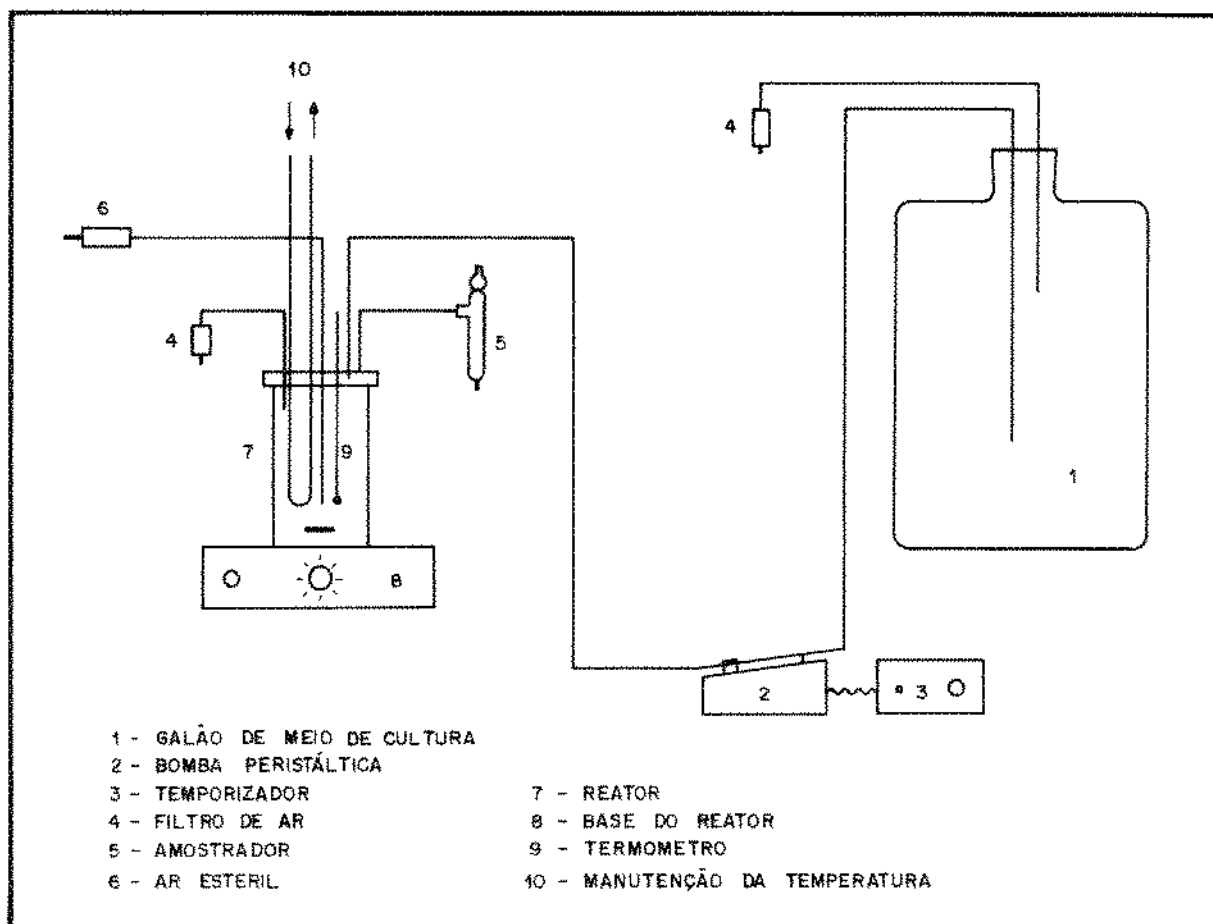


FIGURA 3.3 Esquema do fermentador utilizado

3.1.10 - Fermentação contínua em reator duplo estágio

O reator duplo estágio utilizado para os experimentos de fermentação contínua foi montado, usando-se de dois reatores modelo M-1000 da Fermentation Design Inc., com capacidade de um litro cada, fazendo-se as adaptações necessárias conforme o esquema da FIGURA 3.4.

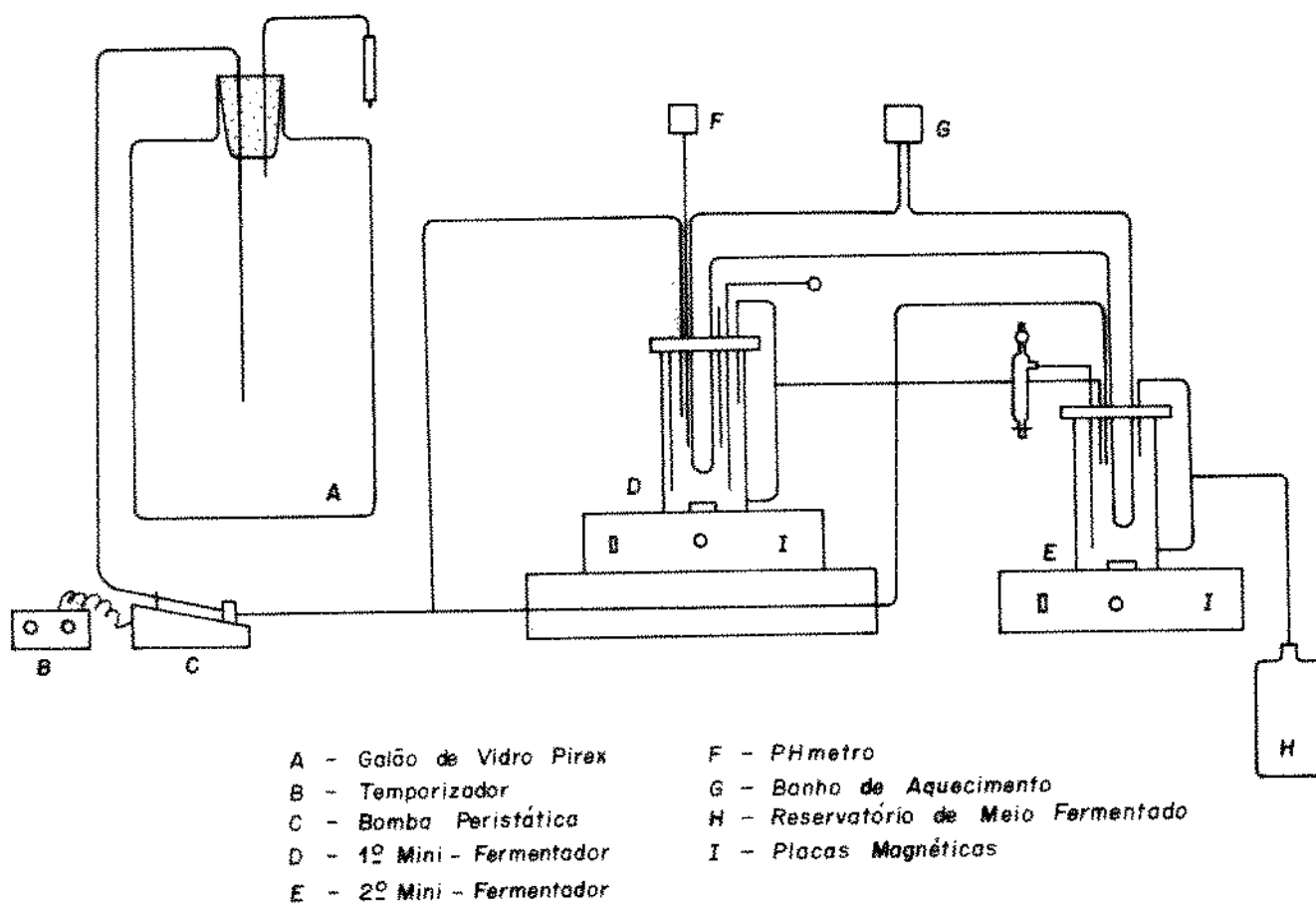


FIGURA 3.4 Esquema do reator duplo estágio.

A alimentação do meio de cultura fresco, era feito nos dois estágios, através de uma bomba peristáltica modelo B 33211, marca Micronal, cuja calibração foi feita previamente. A bomba peristáltica estava acomplada a um temporizador, o qual auxiliava no controle da vazão do meio .

A vazão do meio de cultura no segundo estágio era o dobro da vazão no primeiro estágio.

No experimento de fermentação contínua em reator duplo estágio, procurava-se variar a vazão de alimentação, sendo que para cada variação da mesma, esperava-se no mínimo três tempos de residência, para a retirada de amostra. A retirada de amostra de 10 ml era feita assepticamente; e para cada amostra retirada era feito controle de densidade ótica, açúcar redutor total e atividade enzimática.

O volume útil nos dois reatores que compunham o sistema era estabelecido, e a fermentação mantida a 30°C, através de um banho termostatzado modelo U^{2c}, marca MLW, sob agitação e uma aeração que variava de 0,2 a 0,3 vvm nos dois estágios.

3.1.11 - Cálculo da taxa de diluição.

A taxa de diluição era expressa pela vazão de alimentação em cada estágio, dividida pelo volume de cada um.

$$D_1 = \frac{F}{V_1} \qquad D_2 = \frac{2.F}{V_2} \qquad (3.1)$$

onde : D_1 = taxa de diluição no primeiro estágio (h^{-1})

D_2 = taxa de diluição no segundo estágio (h^{-1})

F = vazão de alimentação no primeiro estágio
(ml/h).

V₁ = volume do primeiro reator (ml)

V₂ = volume do segundo reator (ml)

A vazão era medida à saída do segundo reator e, como as mangueiras de alimentação eram idênticas, a vazão do primeiro reator foi estimada como sendo a metade da obtida no segundo estágio.

3.1.12 - Cálculo da produtividade.

A produtividade era calculada em função do volume útil dos reatores.

$$Pr = \frac{Atv_2 \cdot F}{V_1 + V_2} \quad (3.2)$$

onde : Atv₂ = atividade enzimática no segundo reator
(U.I/ml)

Pr = produtividade (U.I/ml.h)

V₁ = volume do reator 1

V₂ = volume do reator 2

3.1.3 - Cálculo do rendimento.

O rendimento foi calculado com base na atividade enzimática do segundo reator dividida pelo açúcar total da alimentação menos o açúcar total obtido na saída do segundo reator.

$$\gamma = \frac{Atv_2 \cdot \text{Fator}}{ART_{\text{alim}} - ART_2} \quad (3.3)$$

onde: γ = rendimento (U.I/g de ART)

ART_{alim} = açúcar redutor total no meio de alimentação (g/l)

ART_2 = açúcar redutor total no segundo reator (g/l)

Atv_2 = atividade enzimática no segundo estágio (U.I/ml)

Fator = conversão de ml para litros.

3.1.14 - Fermentação contínua utilizando células imobilizadas

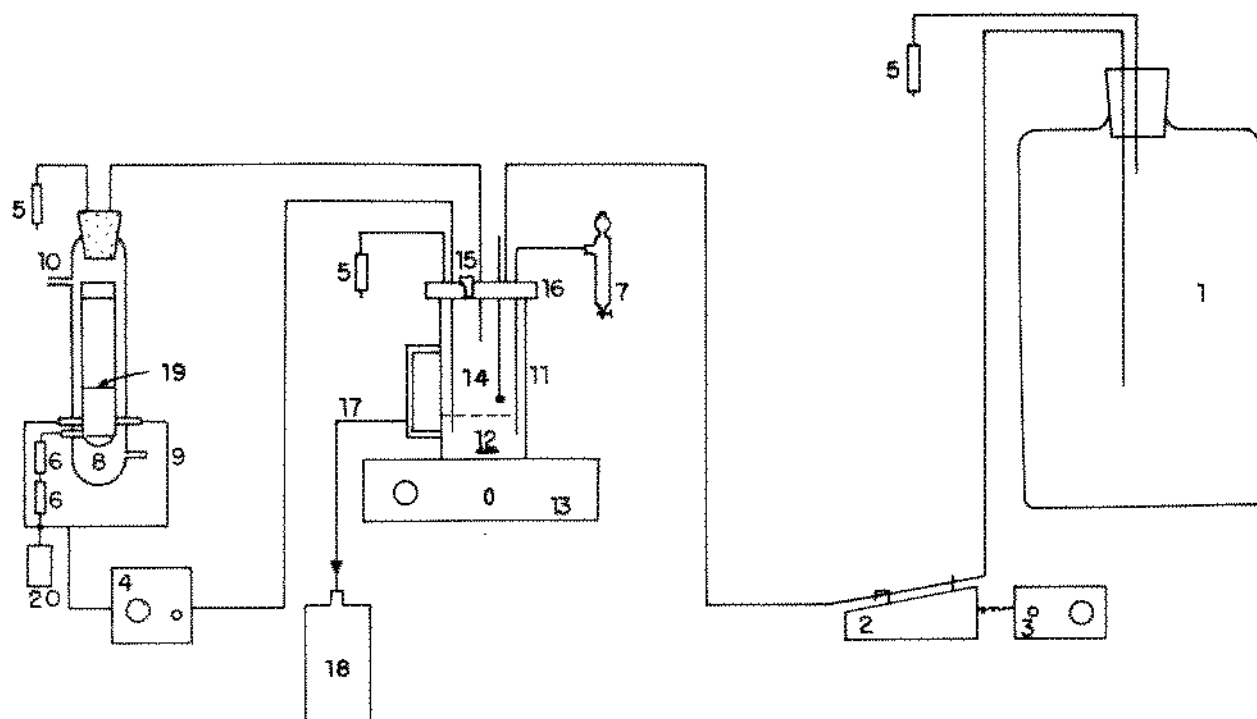
Os estudos de fermentação contínua com células imobilizadas foram conduzidos em um sistema de reator contínuo, com reciclo de parte do efluente. Nesse reator foram realizados estudos relativos à influência da concentração de substrato e vazão de alimentação, na produtividade e rendimento da produção da enzima invertase por *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045.

O sistema era constituído de uma coluna de vidro, de diâmetro interno 40 mm, altura 300 mm, com camisa externa para controle de temperatura; sendo dotado de uma placa porosa, de vidro sinterizado na sua parte inferior, com a finalidade de suportar a célula imobilizada no suporte e distribuir melhor a aeração no reator. A coluna possuía ainda telas de aço inox mesh

100, as quais facilitavam a distribuição dos cubos de poliuretano de densidade $37,5 \pm 1,5 \text{ Kg/m}^3$ e porosidade de 14 a 18 células por centímetro linear, dentro da mesma, evitando que o suporte se compactasse na extremidade superior da coluna.

A alimentação do meio de cultura fresco, que entrava no sistema, era feito por uma bomba peristáltica, modelo 204, marca Milan, a qual era acoplada a um temporizador, com a finalidade de dar um controle melhor da vazão. Essa alimentação era feita em um tanque regulador, juntando-se a corrente de reciclo que saía do topo da coluna. O tanque regulador possuía duas correntes de saída, sendo uma de reciclo, que através de uma bomba modelo IM-35, marca Sigma Motor, alimentava a coluna pela parte inferior e a outra, de produto, conforme esquema da FIGURA 3.5.

A fermentação transcorria a 30°C , temperatura essa mantida através de um banho termostatzado modelo U^{2c} , marca MLW. O tanque regulador permanecia sob agitação, utilizando para isso da base do fermentador M-1000 da Fermentation Design Inc. A aeração era fornecida por linha de ar, sendo que antes de entrar no fermentador, passava por filtros estéreis, de lã de vidro. A taxa de aeração era de 0,2 a 0,3 vvm, controlada através de um rotâmetro modelo OM 0425P1, marca OMEL. Para experimentos com esse tipo de reator, foram utilizadas as seguintes concentrações de melaço: 20,0; 30,0; 60,0 e 90,0 g/l. O volume de meio de cultura no fermentador foi de 530 ml.



- | | |
|---------------------------|--------------------------------|
| 1 - GALÃO DE VIDRO | 11 - TANQUE REGULADOR |
| 2 - BOMBA PERISTÁLTICA | 12 - AGITADOR MAGNÉTICO |
| 3 - TEMPORIZADOR | 13 - BASE |
| 4 - BOMBA CENTRÍFUGA | 14 - TERMÔMETRO |
| 5 - FILTRO DE AR | 15 - INÓCULO |
| 6 - ENTRADA DE AR ESTÉRIL | 16 - TAMPA DO TANQUE REGULADOR |
| 7 - RETIRADA DE AMOSTRA | 17 - FERMENTADO - SAÍDA |
| 8 - COLUNA DE VIDRO | 18 - GALÃO - FERMENTADO |
| 9 - ENTRADA DE ÁGUA | 19 - TELA METÁLICA |
| 10 - SAÍDA DE ÁGUA | 20 - ROTÂMETRO |

FIGURA 3.5 Esquema do reator utilizado na fermentação contínua com células imobilizadas.

3.1.14.1 - Suporte utilizado para imobilização.

Como suporte para imobilização de células de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045, foram utilizados cubos de poliuretano de 5 mm, cortados a partir de uma placa de espuma gentilmente cedida pela Trorion S/A.

A escolha do suporte foi baseada em trabalhos de alguns pesquisadores (4, 8, 16), os quais usaram leitos empacotados de cubos de material poroso (poliuretano, polietileno, etc.) e esferas de aço inox, com a finalidade de fornecer às células microbianas um ambiente permeável e protegido do atrito provocado pelo escoamento, a fim de que elas possam se desenvolver, ocupando o interior dos cubos.

3.1.15 - Estudo do comportamento do reator.

Um reator de leito fixo com altas vazões de reciclo, comporta-se como um reator de mistura.

Para verificar se o comportamento do reator era de um reator de mistura em uma dada condição de operação, usava-se a técnica de passar um traçador no sistema em forma de degrau. Utilizou-se para isso, de uma solução de sacarose 10 g/l.

O reator era alimentado primeiramente com água, e após entrar em regime, substituiu-se essa pela solução de sacarose.

A intervalos regulares de tempo, recolhia-se uma amostra na saída e determinava-se a concentração de sacarose em graus brix, através de um refratômetro, Carl Zeiss Jena, modelo I.

Para verificar o comportamento do reator, considerou-se um reator de mistura hipotético, conforme esquema abaixo FIGURA 3.6.

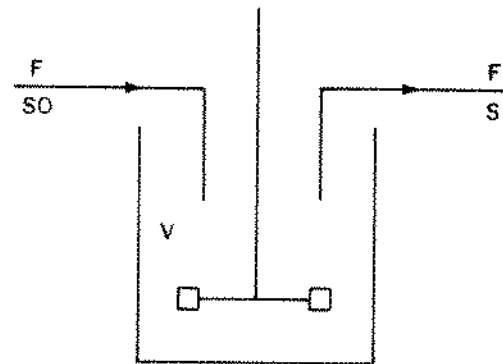


FIGURA 3.6 Esquema do reator de mistura.

Onde:

F = vazão inicial e final.

S_0 = concentração de sacarose na entrada.

S = concentração de sacarose na saída.

V = volume do reator.

Fazendo um balanço de massa tem-se:

$$F \cdot S_0 - F \cdot S - \frac{dS}{dt} \cdot V = 0 \quad (3.4)$$

$$F(S_0 - S) = \frac{dS}{dt} \cdot V \quad (3.5)$$

$$F/V (S_0 - S) = \frac{dS}{dt} \quad (3.6)$$

$$\int_0^S \frac{dS}{(S_0 - S)} = \int_0^t dt \cdot \frac{1}{\tau} \quad (3.7)$$

onde:

$$F/V = 1/\tau$$

τ = tempo de residência médio.

Considerando os limites de integração:

$$t = 0 + S = 0$$

$$t = t' + S = s'$$

Chega-se a seguinte equação:

$$\ln \frac{S_0 - S'}{S_0} = 1/\tau \cdot t \quad (3.8)$$

A tangente da curva de $\ln \frac{S_0 - S'}{S_0}$ em função do tempo (t) corresponde ao tempo de residência médio experimental (τ).

O tempo de residência teórico foi considerado como sendo a razão entre o volume de líquido contido no sistema, dividido pela vazão de alimentação.

3.1.16 - Cálculo da taxa de diluição.

A taxa de diluição é expressa pela vazão de alimentação no reator dividida pelo volume de líquido do reator.

$$D = F/V \quad (3.9)$$

onde: D = taxa de diluição (h^{-1})

F = vazão de alimentação (ml/h)

V = volume de líquido no reator (ml)

3.1.17 - Cálculo da produtividade.

A produtividade era calculada com base na atividade enzimática do reator e no volume do reator.

$$Pr = \frac{Atv \cdot F}{V_{\text{reator}}} \quad (3.10)$$

onde: Pr = produtividade (U.I./ml.h)

Atv = atividade enzimática (U.I./ml)

V = volume do reator (ml)

F = vazão (ml/h)

3.1.18 - Cálculo do rendimento.

O rendimento foi calculado dividindo-se a atividade enzimática pelo açúcar redutor total consumido.

$$\gamma = \frac{Atv \cdot Fator}{(ART_{alim} - ART_{res})} \quad (3.11)$$

onde:

γ = rendimento (U.I/g de ART)

At = atividade enzimática (U.I/ml)

ART_{alim} = açúcar redutor total na alimentação (g/l)

ART_{res} = açúcar redutor total residual (g/l)

Fator = conversão de ml para litro

3.1.19 - Retirada de amostra.

A amostra era retirada assépticamente, e medida a absorbância, açúcar redutor total e atividade enzimática. Para cada alteração na taxa de diluição, esperava-se três tempos de residência para retirada da próxima amostra.

3.1.20 - Métodos analíticos para os processos.

3.1.20.1 - Curva padrão para massa seca.

Para obtenção da curva padrão (absorbância em função da massa seca), filtrou-se 400 ml de caldo fermentado em filtro Sartorius S. M. II 307, com membrana Millipore de porosidade média 0.2μ .

Após lavagem do precipitado com água destilada, secava-se em estufa à vácuo (50°C), determinando-se a massa seca

em g/l. Paralelamente, centrifugou-se 100 ml do caldo fermentado, concentrando-o até um volume final de 10 ml. Procedeu-se diluições sucessivas e leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. A partir da massa seca obtida, determinou-se indiretamente a massa seca para cada leitura de absorbância.

3.1.20.2 - Crescimento celular.

O crescimento celular do microrganismo foi determinado através da leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro Spectron-20 da Bausch & Lomb, utilizando água destilada para a calibração do aparelho.

Foram retiradas amostras de 10 ml, centrifugadas em centrífuga refrigerada Spin VI, da Incibrás, a 5000 rpm por 10 minutos, a temperatura de 5°C.

O sobrenadante era utilizado para determinação de atividade enzimática e açúcar redutor total.

O precipitado era lavado com água destilada e novamente centrifugado. Após a centrifugação, descartava-se o sobrenadante e ressuspensava o precipitado em 10 ml de água destilada. Após essa etapa, fazia-se a diluição convenientemente para a leitura contra água.

Para a conversão de absorbância (D.O) em massa seca, utilizava-se a curva padrão descrita no item anterior.

3.1.20.3 - Determinação do açúcar redutor total (ART).

A análise de açúcar redutor total era através do método que utiliza o ácido denitrosalicílico (DNS) (83).

Previamente, fazia-se a hidrólise da amostra com HCl 2N. Após hidrolisar a mesma, neutralisava-se com NaOH 2N. Em seguida, adicionava-se 1 ml da amostra hidrolisada convenientemente diluída a 1 ml do reagente DNS e mantinha-se em banho maria a 100°C por 5 minutos. Resfriava-se imediatamente em banho de gelo, fazia-se diluição com solução de tartarato duplo de sódio e potássio para leitura de absorbância. O branco era feito substituindo-se a amostra por 1 ml de água destilada. A leitura da absorbância era feita em espectrofotômetro Micronal modelo B 382 a 540 nm.

3.1.20.4 - Determinação da atividade enzimática.

Para determinar a atividade enzimática no caldo fermentado, procedeu-se segundo Suzuki e colaboradores (111), fazendo-se o seguinte procedimento.

Em um reator encamisado, sob agitação, e controle de temperatura, colocava-se :

5 ml de solução de sacarose 0,06 M

2,5 ml de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 5,2

1,5 de água destilada

1,0 da amostra convenientemente diluída.

A reação processava-se à temperatura de 40°C com agitação. A cada três minutos, tomava-se amostra de 1,0 ml e

reagia com DNS para determinação de açúcares redutores. No total eram retiradas 5 amostras.

As curvas de açúcar redutor (absorbância versus tempo) e padrão (concentração de açúcar versus absorbância) forneciam a atividade enzimática, expressa em U.I./ml.

A unidade de invertase U.I é definida como sendo a capacidade da enzima para hidrolizar 1 μ mol de sacarose por minuto.

3.2 - Cinética microbiana.

3.2.1 - Influência do substrato na produção da enzima.

A fim de verificar a influência dos substratos, glicose e sacarose, na fermentação com *Kluyveromyces fragilis*, realizaram-se ensaios em batelada, variando as concentrações destes açúcares.

As fermentações foram preparadas, inoculando o microrganismo em dois tubos de ensaio contendo meio de cultura M₁, previamente esterilizado. Após 24 horas de incubação a 30°C em câmara climatizada marca Fanen, transferiu-se o material desses tubos para um erlenmeyer de 500 ml de volume, contendo 150 ml de meio M₅. Após a transferência deixou-se o frasco sob agitação a 30°C por 12 horas, em "shaker" da News Brunswick.Y.I., a uma rotação de 200 rpm.

Utilizando-se do material desse erlenmeyer, inocularam-se com 20 ml, quatro erlenmeyers com defletores, contendo 200 ml de meio M₄, a fim de se estudar a influência dos açúcares glicose e sacarose na produção da enzima invertase.

Composição dos meios de culturas.

Meio de cultura M₃

composição	concentração(g/l)
sacarose	10,0
extrato de levedura	10,0
peptona	20,0
K ₂ HPO ₄	5,0
pH	6,8

Meio de cultura M₄

composição	concentração(g/l)
glicose	variável
sacarose	variável
extrato de levedura	10,0
peptona	20,0
K ₂ HPO ₄	5,0
pH	6,8

A concentração de açúcar no ensaio realizado, encontra-se descrita na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 Concentração de açúcar no meio Ms.

Frasco	Sacarose(g/l)	glicose(g/l)
1	10,0	0,0
2	0,5	9,5
3	9,5	0,5
4	0,0	10,0

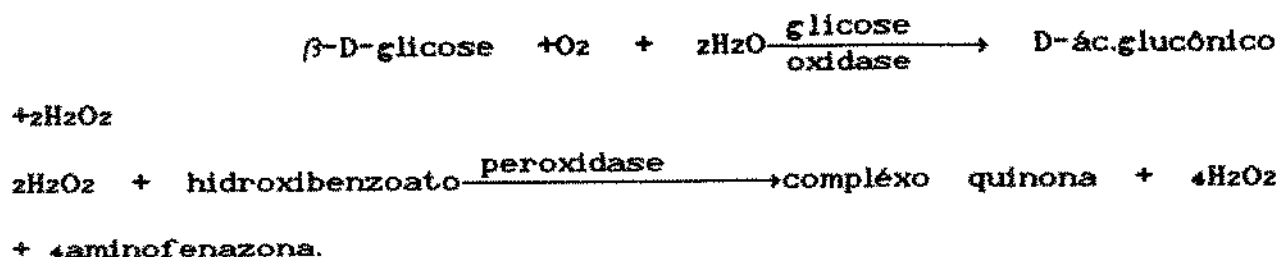
Os erlenmeyers contendo o meio de cultura inoculados foram incubados sob agitação em "shaker" da News Brunswick Y.La 200 rpm e temperatura de 30°C.

3.2.1.1 - Retirada de amostra.

As amostras foram retiradas de hora em hora, de cada frasco, durante doze horas de fermentação. As análises realizadas nessas amostras foram: absorbância, açúcar redutor total e análise de glicose, como descrito anteriormente no item 3.1.20.

3.2.1.2 - Determinação de glicose através de teste enzimático colorimétrico.

Utilizou-se o método da Bio Diagnóstica Glicose Enz-Color, código B.D.101. Este método fundamentava-se na reação de oxidação da D glicose pela glicose oxidase para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença da peroxidase, reage com o hidroxibenzoato de sódio e 4-aminofenazona para formar o complexo quinona. A intensidade da cor formada é proporcional a concentração da glicose na amostra.



Após reconstituído, o método enzimático apresenta as seguintes concentrações mínimas de reativos:

composição	concentração
4-aminofenazona	0,2 $\mu\text{mol/l}$
hidróxibenzoato	5,0 $\mu\text{mol/l}$
glicose oxidase	10000 U/l
peroxidase	5000 U/l

Tampão e estabilizador também são adicionados ao reagente.

Utiliza-se como padrão de glicose 100 mg/dl de glicose em solução preservada com ácido benzóico a 0,16%.

A reação consiste em misturar 20 μl da amostra convenientemente diluída, com 2,5 ml do reagente Glicose Enz-Color e incubar durante 10 minutos à 37°C ou por 30 minutos à temperatura ambiente. Proteger da luz direta, resfriar e ler absorbância contra branco em espectrofotômetro a 510 n. O branco é feito substituindo-se a amostra por 20 μl de água destilada.

O cálculo da concentração de glicose era feito da seguinte modo:

$$\text{mg de glicose/dl} = \frac{\text{ABS(teste)} \times 100}{\text{ABS(padão)}} \quad (3.12)$$

3.2.2 - Estudo da cinética da fermentação empregando a técnica de pulso.

Este trabalho foi realizado através da fermentação contínua utilizando um reator modelo M-1000 da Fermentation Design Inc. com capacidade para 1 litro.

O volume útil do reator foi de 755 ml e a vazão de alimentação no mesmo era estabelecida em 156 ml/h, sendo utilizada uma bomba peristáltica modelo 204 marca Milan, acoplada a um temporizador (FIGURA 3.7).

O meio de cultura em fermentação era mantido sob agitação, e a aeração era de 0,2 a 0,3 vvm. A temperatura no reator era de 30°C, sendo mantida por um banho termostatzado modelo U^{2c} marca MLW.

3.2.2.1 - Meio de cultura utilizado.

Para esse ensaio foi utilizado o seguinte meio de cultura:

composição	concentração(g/l)
sacarose	10,0
extrato de levedura	10,0
peptona	10,0
K ₂ HPO ₄	5,0
pH	3,5

O reator contendo 750 ml do meio descrito no item 3.2.2.1, era inoculado com 75 ml do inóculo preparado conforme item 3.1.5 e deixado fermentando por 12 horas. Após esse tempo iniciava-se a alimentação do reator por 12 horas com meio de cultura fresco.

3.2.2.2 - Injeção de substrato por pulso.

Inicialmente foi dado um pulso de glicose, cuja concentração final no reator foi de 10,0 g/l.

Antes de injetar a glicose, foi retirada amostra para análise de densidade ótica e pH.

Após centrifugação da amostra em centrífuga refrigerada Spin VI da Incibrás, a 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante era congelado para análises posteriores de açúcar redutor (glicose), açúcar redutor total e atividade enzimática, enquanto que no precipitado (massa celular), após lavagem fazia-se imediatamente a análise de densidade ótica.

As amostras de 10 ml foram retiradas de meia em meia hora, até que não se percebeu mais variação na densidade ótica.

Em seguida foram dados consecutivamente pulsos de frutose e sacarose, com concentrações e procedimentos idênticos ao da glicose.

3.2.3 - Estudo da cinética da fermentação empregando a técnica de degrau.

Esse ensaio foi realizado através de fermentação contínua em reator modelo M-1000 da Fermentation Design Inc., com capacidade para um litro, de acordo com FIGURA 3.7.

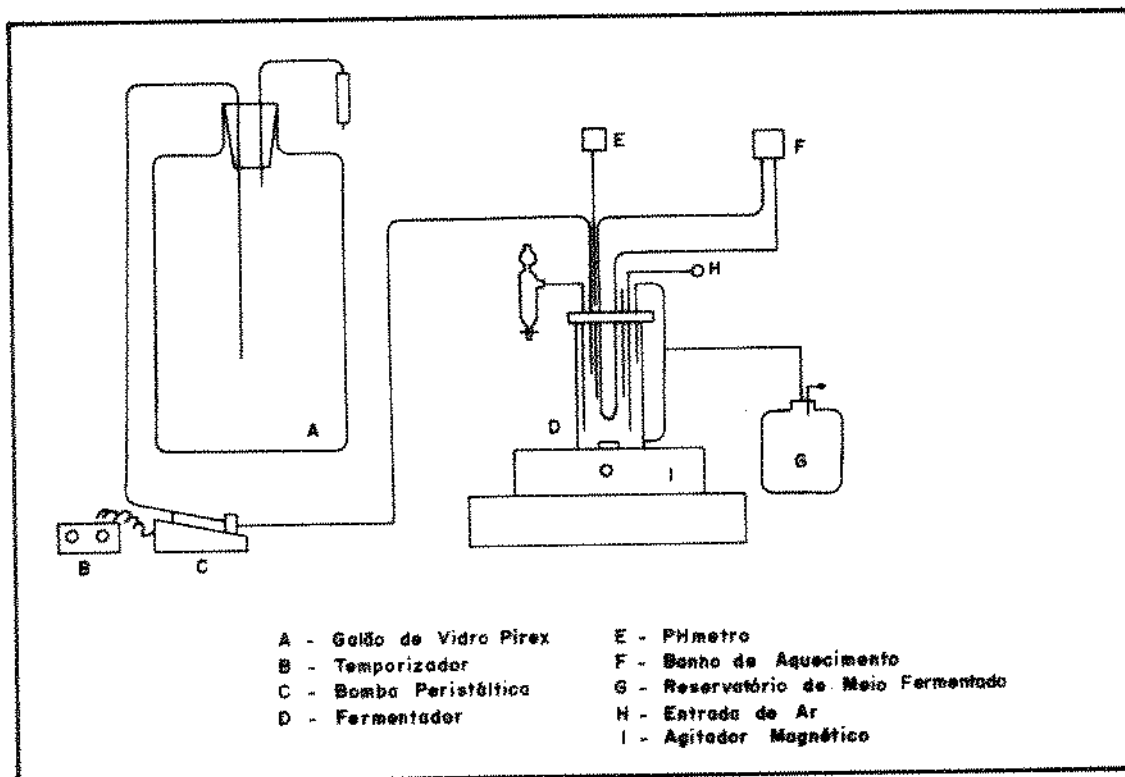


FIGURA 3.7 Esquema do fermentador

O volume útil desse reator foi de 550 ml, sendo que nesse experimento variou-se a concentração de sacarose, glicose e frutose, também variou-se a taxa de diluição para uma mesma concentração de açúcar na alimentação.

O controle da vazão de alimentação era feito por uma bomba peristáltica modelo 204 marca Milan, acoplada a um temporizador.

A agitação era feita através de agitador magnético, modelo 752 marca Fisaton e a aeração era de 0,2 a 0,3 vvm, controlada através de um rotâmetro modelo PG 02 marca MLW e a temperatura mantida a 30°C por um banho termostatizado modelo UHa marca MLW.

Quando se fazia alimentação do meio, com uma concentração de açúcar pré-estabelecida, para cada taxa de diluição especificada, esperava-se três vezes o tempo de residência para a retirada de amostra. Após a retirada da amostra, mudava-se a vazão de alimentação. Na amostra retirada, eram feitas análises de densidade ótica, açúcar redutor total e atividade enzimática através de métodos descritos anteriormente no item 3.1.20.

3.2.3.1 - Meio de cultura utilizado no experimento.

Para os ensaios foi utilizado o seguinte meio de cultura (26):

composição	concentração (g/l).
sacarose	variável
glicose	variável
frutose	variável
extrato de levedura	5,0
NH_4Cl	1,5
K_2HPO_4	5,0
KCl	1,15
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,65
pH	3,5

As concentrações dos açúcares utilizados nos experimentos foram: 10,0; 30,0; 50,0 e 70,0 g/l.

3.2.3.2 - Preparo do inóculo.

O preparo do inóculo era o mesmo utilizado no item 3.1.5, sendo que nesse caso, utilizava-se de 55 ml para inocular o reator cujo volume útil era de 550 ml.

3.3 - Caracterização da enzima invertase produzida por *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045.

3.3.1 - Produção da enzima utilizada no estudo de caracterização.

Para a produção da enzima utilizada neste estudo, usou-se um meio de cultivo com a seguinte composição (26):

composição	concentração(g/l)
melaço	30,0
água de maceração de milho	40,0
K_2HPO_4	5,0
pH	3,5

3.3.2 - Preparo do inóculo.

O preparo do inóculo para este estudo foi o mesmo utilizado no item 3.1.5.

3.3.2.1 - Fermentação em reator.

Um reator modelo M-1000 da Fermentation Design Inc., com capacidade de 1000 ml, contendo 600 ml de meio de cultura previamente esterilizado, era inoculado com 10% de inóculo, sendo a fermentação mantida a 30°C , sob agitação e aeração entre 0,2 a 0,3 vvm. A obtenção da enzima era feito no reator descrito acima, sendo utilizado o meio de cultura do item 3.3.1.

3.3.2.2 - Precipitação da enzima com etanol.

O caldo fermentado era centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, a 5°C. Após centrifugação ~~dosava-se a atividade~~ enzimática do sobrenadante, para em seguida precipitar a enzima com etanol.

O sobrenadante era mantido em banho de gelo sob

agitação, ao mesmo tempo em que se adicionava etanol, cuja temperatura estava em torno de -20°C , variando-se a concentração do mesmo de 20% a 70% (v/v). Após a precipitação, centrifugava-se a 5000 rpm por 15 minutos a 5°C , sendo que o precipitado era em seguida ressuspendido em solução tampão fosfato 0.05 M, pH 5,2 com 2mM de ions cálcio (CaCl_2). Na solução obtida, era determinada atividade enzimática, e calculava-se o rendimento atingido na precipitação.

3.3.2.3 -Método de purificação da enzima.

O precipitado obtido era dializado em tampão e percolado em coluna de DEAE-celulose (previamente equilibrada), eluida com tampão.

Para passar a enzima através da coluna de troca iônica, determinou-se inicialmente o pH ideal para a retenção da enzima na coluna. Nesse caso foram utilizadas pequenas colunas (volume de 4,0 ml), usando a resina DEAE-celulose para empacotamento da mesma e como eluente tampão fosfato de sódio 0,05 M a diferentes pHs.

Inicialmente foi determinada a atividade enzimática no composto enzimático, sendo encontrado um valor de 2926 U.I./g de composto enzimático

Foi preparada então uma solução com 0,06 g de composto enzimático/ 10 ml de tampão fosfato. Dessa solução enzimática, foi passado através de uma coluna de DEAE-celulose, equilibrada em pH 4,5, 100 μl (1,76 U.I.). Nas frações eluidas da coluna era determinada a atividade enzimática, sendo que as

leituras não indicavam a presença de enzima. Passou-se em seguida 3 ml da solução enzimática, de concentração 0,015 g de composto enzimático/10 ml de tampão, totalizando 14,93 U.I retidas na coluna. Aplicou-se então 1,0 ml da solução 0,06 g de composto enzimático/10 ml de tampão, totalizando 32,49 U.I. Na determinação da atividade nas frações coletadas, houve a presença de 0,315 U.I., indicando que a coluna conseguiu reter 32.18 U.I.

Aplicou-se 1 ml da solução enzimática 0,06 g de composto enzimático/10 ml de tampão em colunas de DEAE-celulose equilibradas em pHs 6,0 e 7,0, as quais reteram, respectivamente, 13,59 e 10,36 U.I.

Verificou-se então que o pH ideal para a eluição da coluna era em torno de 4,5.

3.3.2.4 - Eluição da enzima da coluna de DEAE-celulose por gradiente salino.

Para a retirada da enzima da coluna, foi utilizado um gradiente salino. A concentração salina utilizada foi de 1,2 M (NaCl), dissolvido em tampão fosfato pH 4,5.

Foram retiradas alíquotas de 2 ml e feitas leituras em espectrofotômetro a 280 nm, para determinação de proteína, sendo usado como branco, água destilada. A comprovação da proteína era feita também através do método de Lowry (76).

Após retirada da enzima, desmontou-se a coluna, para posteriormente secar a resina e determinar o volume, no sentido de fazer uma extrapolação para uma coluna maior.

Massa de resina = 0,817 g

Volume aproximado = 4 ml

Sabendo-se que a coluna conseguiu reter 32,18

U.I., temos:

$32,18 \text{ U.I.} / 0,817 \text{ g} = 39,39 \text{ U.I./g}$ de resina

Utilizamos, em seguida, uma coluna maior com as seguintes características:

Diâmetro = 1,5 cm

Altura = 20 cm

Volume = 35 ml

Através dos cálculos efetuados, chegamos a um valor de 280 U.I./35 ml.

3.3.2.5 - Estabilidade térmica da enzima.

Soluções de enzima eram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 5,2. Essas soluções eram incubadas a diferentes temperaturas (56 a 62°C). De cada amostra incubada, após atingir a referida temperatura, tomava-se a primeira amostra considerada como inicial ($t=0$). Tomou-se em sequência, amostras em espaços de tempo apropriados. Para cada amostra retirada, procedia-se a análise de açúcar redutor, através do método DNS para determinação da atividade no tempo coletado.

Os dados de atividade em relação ao tempo de incubação para cada temperatura e considerando-se cinética de primeira ordem, procedeu-se à determinação das constantes de desativação K_d , graficando-se $\ln(a/a_0)$ em função do tempo. Após determinação de K_d e sendo $K_d = f(T)$, determinou-se a energia de ativação da reação de degradação E_d , graficando-se estes dados na

forma de Arrhenius.

3.3.2.6 - Determinação do K_m e $V_{máx}$ da enzima.

Para esse estudo, fez-se diluição da enzima obtida por precipitação com etanol, procurando trabalhar com uma solução enzimática de atividade conhecida. A determinação dos parâmetros foi realizada a 40°C e pH igual 5,2, com concentrações do substrato sacarose variando de 5 mg/ml a 200 mg/ml.

Determinou-se taxas iniciais de reação a 40°C para cada concentração de substrato, retirando-se amostras de 1 ml de 3 em 3 minutos, para uma posterior dosagem de açúcar redutor, através do método DNS. Após coletas de dados de taxas iniciais de reação em função da concentração do substrato, procedeu-se aos métodos usuais de determinação das constantes cinéticas.

3.3.3 - Preparação da resina DEAE-celulose.

A resina foi tratada inicialmente com NaOH 0,5 N durante 2 horas e posteriormente lavada com água destilada até a neutralidade. Depois foi tratada com HCl 0,5 N durante 2 horas e lavada com água destilada até a neutralidade.

Para o empacotamento lavou-se o material com o tampão de eluição inicial (tampão fosfato), para que seja atingido o equilíbrio.

3.3.4 - Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática era feita através da dosagem de açúcares redutores, utilizando o método DNS, como descrito anteriormente, no item 3.1.20.4..

3.3.5 - Determinação de proteína.

Para determinação de proteína foi utilizado o método de Lowry (76). sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro a 660 nm. Também para análise de proteína foi necessário fazer uma curva padrão, sendo utilizado a proteína albumina bovina.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 - Determinação da taxa específica de crescimento do microrganismo

A necessidade de determinar a taxa específica de crescimento do microrganismo, deve-se ao fato de posteriormente trabalharmos com processo contínuo, o que nos permitiria fazer uma análise a respeito da comparação da taxa específica de crescimento e a taxa de diluição utilizada no processo.

Através do experimento descrito no item 3.1.8, determinou-se a taxa específica de crescimento para o microrganismo.

Utilizando-se dos dados contidos na TABELA 4.1, e plotando logaritmo da concentração celular em função do tempo obtém-se a velocidade específica de crescimento para o microrganismo em estudo, onde se obteve o valor $\mu = 0.231 \text{ h}^{-1}$ para um coeficiente de correlação de 0.991.

TABELA 4.1 Evolução do crescimento celular de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 para determinação da taxa de crescimento.

Tempo(h)	Massa seca(g/l)	ln(x)
1	3,95	1,37
2	5,21	1,65
3	6,60	1,88
4	7,19	1,97
5	9,78	2,28
6	13,96	2,59

4.2 - Produção da enzima invertase através de fermentação em processo batelada.

4.2.1 - Produção da enzima por processo de batelada simples.

Inicialmente foi realizada uma fermentação em batelada simples a fim de se estabelecer parâmetros de comparação para os demais experimentos. Os resultados obtidos são mostrados na TABELA 4.2 e FIGURA 4.1.

TABELA 4.2 Fermentação em batelada simples, utilizando meio de cultura M_2 , temperatura 30°C e aeração de 0,2 a 0,3 vvm.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	Atv(U.I/ml)
0,0	3,68	1,28	22,44	1,15
1,0	3,72	1,31	22,95	1,19
2,0	3,73	1,70	21,18	1,24
4,0	3,73	3,38	19,59	1,23
5,0	3,71	5,11	14,45	1,09
6,0	3,70	8,09	5,17	0,91
7,0	3,72	8,94	2,03	2,22
7,50	3,77	8,94	2,17	2,54
24,0	4,95	9,08	1,96	6,14
26,0	4,97	9,22	1,96	6,44
28,0	4,98	9,36	1,96	6,76
30,0	4,98	9,36	1,99	6,89
31,30	4,93	9,65	2,17	7,52
48,0	5,03	9,08	1,89	9,17

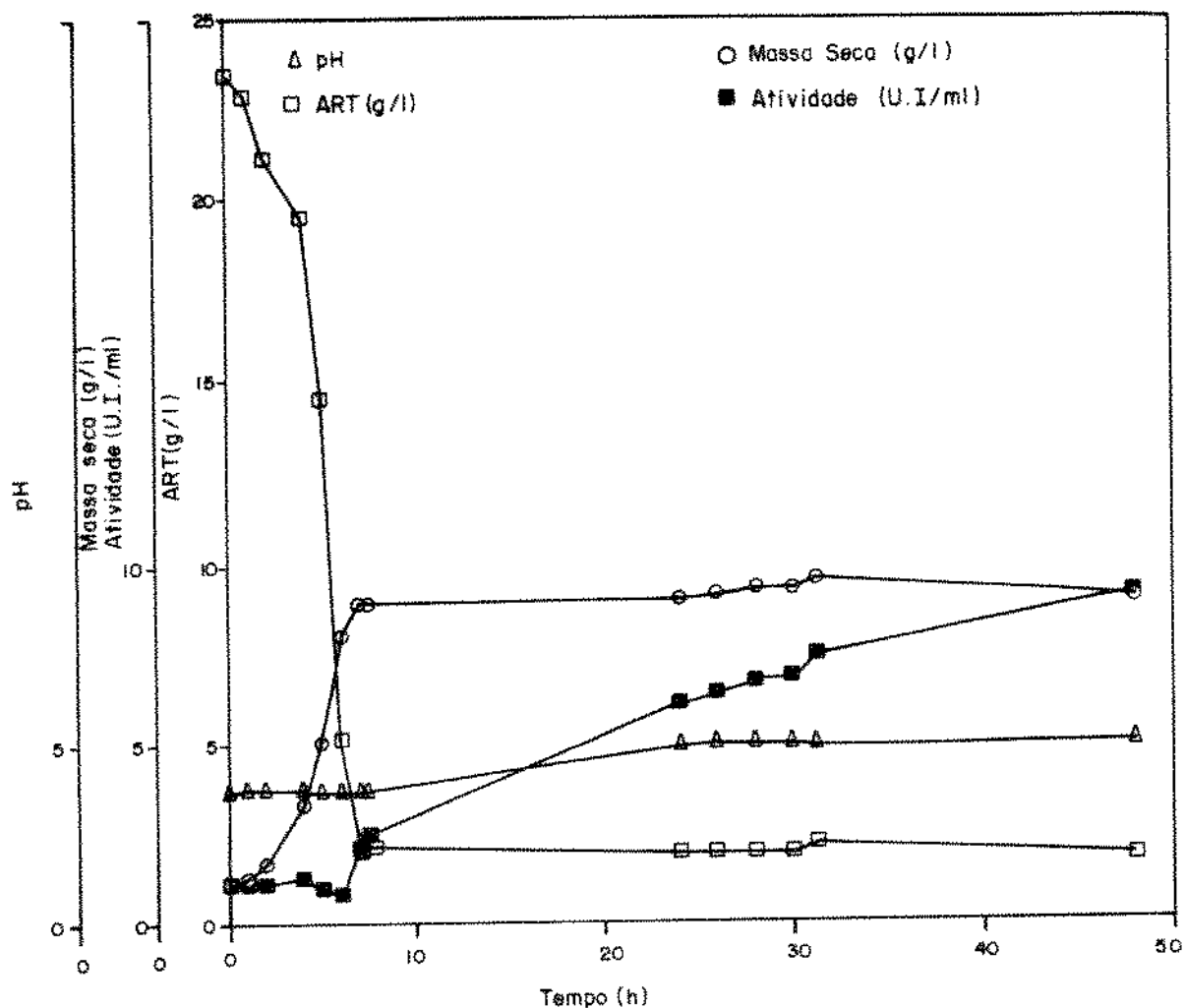


FIGURA 4.1 Fermentação em batelada simples, meio M_2 pH = 3.5 e temperatura de 30°C e aeração de 0,2 a 0,3 vvm.

Pode-se observar que o consumo de substrato foi rápido, atingindo níveis mínimos ao redor de 8,0 horas de fermentação. O crescimento celular se deu praticamente até 8 horas e a atividade enzimática cresceu durante todo o experimento. O pH manteve-se aproximadamente constante até a

sétima hora subindo então gradativamente até atingir 5.03 no final da fermentação.

4.2.2 - Fermentação em batelada alimentada.

Foi realizado experimento em batelada alimentada, utilizando uma solução de sacarose a 240,0 g/l como substrato.

A alimentação nesse caso foi desde o início do processo (TABELA 4.3 e FIGURA 4.2).

TABELA 4.3 Fermentação em batelada alimentada com solução de sacarose 240,0 g/l desde o início, vazão 10,0 ml/h.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	Atv(U.I./ml)
0,0	3,44	1,14	23,53	1,19
1,0	3,44	1,14	25,91	1,06
2,0	3,48	1,42	29,58	1,08
3,0	3,47	1,92	31,41	0,84
4,3	3,46	3,26	33,61	0,64
5,0	3,45	4,11	34,70	1,32
6,15	3,36	6,74	26,92	1,44
7,0	3,31	8,37	19,87	1,71
7,50	3,30	9,36	13,18	2,49
24,0	3,00	8,37	2,47	0,45

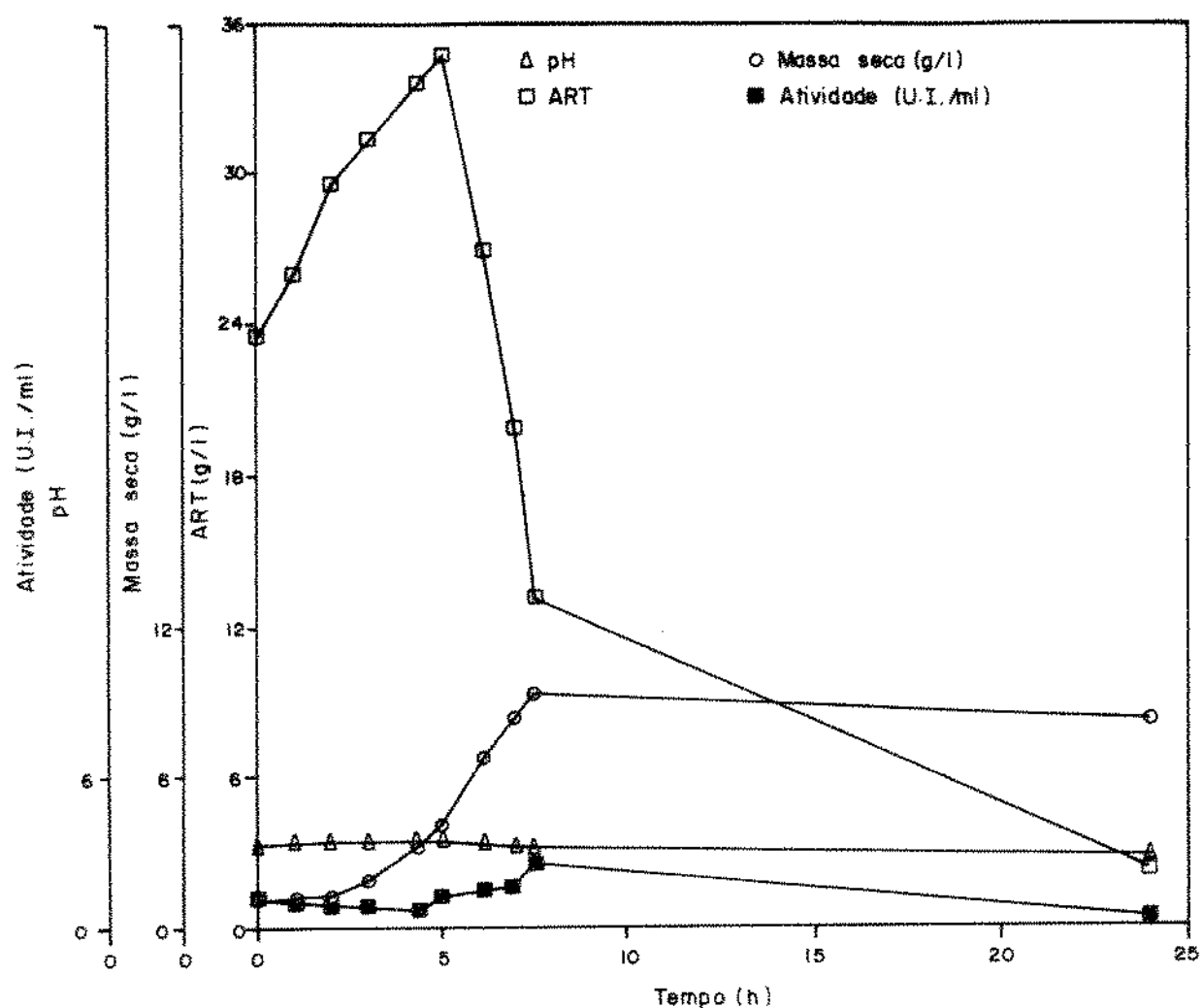


FIGURA 4.2 Fermentação em batelada, alimentada com solução de sacarose na concentração de 240,0 g/l, vazão de 10,0 ml/h.

Esperava-se com a alimentação, que ocorresse um aumento na atividade enzimática, porém houve uma diminuição da atividade, embora ocorresse um aumento na massa seca. Provavelmente este fato deveu-se ao fenômeno de inibição da produção de enzima, devido ao acúmulo de substrato no meio de fermentação. Verifica-se também através da TABELA 4.3 e FIGURA 4.2

que o pH praticamente não sofreu grandes alterações.

Comparando com os dados da fermentação por batelada simples, observa-se que ao redor de 8.0 horas, praticamente o açúcar havia se esgotado, enquanto que para este experimento, na mesma hora de fermentação o acúmulo de açúcar no meio era bem alto. Este fato levou a se diminuir a vazão de alimentação de solução de sacarose para 3.0 ml/h, tentando assim evitar que houvesse acúmulo de substrato no meio. Ao realizar a fermentação em batelada simples, verificou-se que o declínio de açúcar no meio ocorria a partir da sexta hora de fermentação. Resolveu-se então alimentar com substrato, na vazão escolhida, a partir dessa hora.

Os dados obtidos encontram-se na TABELA 4.4 e na FIGURA 4.3. Pode-se observar que a produção da enzima foi mais rápida e eficiente, atingindo 9.24 U.I./ml, enquanto que na fermentação em batelada simples obteve-se 6.14 U.I./ml. Pode-se notar igualmente que no final da fermentação, houve um pequeno declínio na atividade enzimática, devido a possível desnaturação da enzima.

TABELA 4.4 Fermentação com alimentação de solução de sacarose
240,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h a partir da sexta hora.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	Atv(U.I/ml)
0,0	3,54	1,06	23,99	0,64
1,0	3,53	1,28	23,87	0,33
2,0	3,55	1,56	23,56	0,65
3,0	3,56	2,06	22,34	0,60
5,0	3,55	4,89	12,21	0,86
6,0	3,52	6,81	3,60	1,10
7,0	3,52	7,94	1,75	4,29
7,40	3,55	8,09	1,93	4,31
12,00	3,78	8,65	1,67	7,25
23,30	3,73	8,65	1,66	9,24
25,00	3,72	8,65	1,64	9,20
27,00	3,76	8,51	1,67	9,45
37,00	3,68	8,09	1,87	9,72
46,30	3,41	7,09	3,64	8,37
50,00	3,42	7,09	7,33	8,39

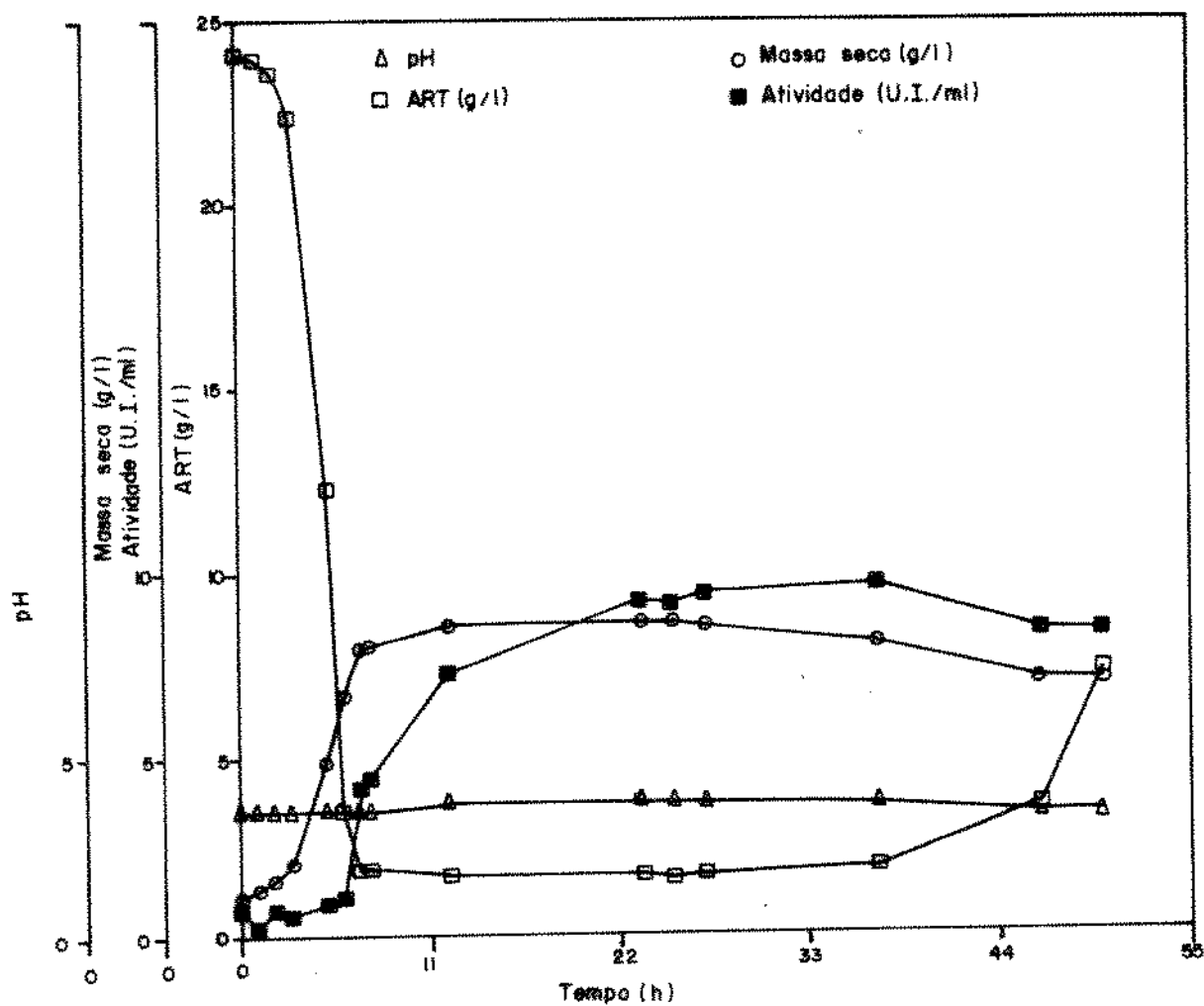


FIGURA 4.3 Experimento em batelada alimentada, concentração de sacarose 240,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, alimentação a partir da sexta hora.

Realizou-se em seguida um novo experimento, mas alimentando o reator a partir da 5,4 h até a trigésima hora. Os

resultados encontram-se reunidos na TABELA 4.5 e FIGURA 4.4.

Verifica-se que o pH manteve-se praticamente constante durante todo o experimento. A partir do início da alimentação com solução de sacarose 240,0 g/l, houve um aumento significativo da atividade enzimática até 24,0 horas de fermentação e depois não ocorreu alteração significativa, mesmo com o final da alimentação.

Os açúcares foram consumidos nas primeiras horas de fermentação e mesmo com a alimentação da solução de sacarose, os níveis mantiveram-se baixos. O crescimento da massa seca mostrou-se concordante com o aumento da atividade enzimática até 36,0 h de fermentação, então houve uma diminuição da massa seca.

TABELA 4.5 Fermentação com alimentação de sacarose 240,0 g/l, vazão de 3,0 ml/h, com início a partir do tempo 5,40 h e término 30,0 h.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	Atv(U.I/ml)
0,0	3,52	1,14	24,91	0,87
1,0	3,52	1,25	23,33	0,95
2,0	3,52	1,56	22,95	0,93
2,40	3,52	1,97	21,06	1,19
4,10	3,51	3,94	15,69	0,78
5,00	3,48	5,25	9,77	0,67
5,40	3,42	6,64	2,88	1,51
7,00	3,47	7,07	1,87	3,16
7,25	3,47	7,21	1,91	3,31
23,00	3,66	7,94	1,75	7,81
24,10	3,65	7,94	1,75	8,52
26,00	3,67	7,87	1,77	8,47
30,00	3,67	7,87	1,70	8,98
31,00	3,63	7,84	1,78	8,26
36,00	3,67	7,84	2,04	8,34
47,00	3,73	7,02	1,89	8,59
50,00	3,72	6,24	1,83	8,50
57,00	3,70	5,39	1,91	8,80
59,00	3,65	4,40	1,95	8,81

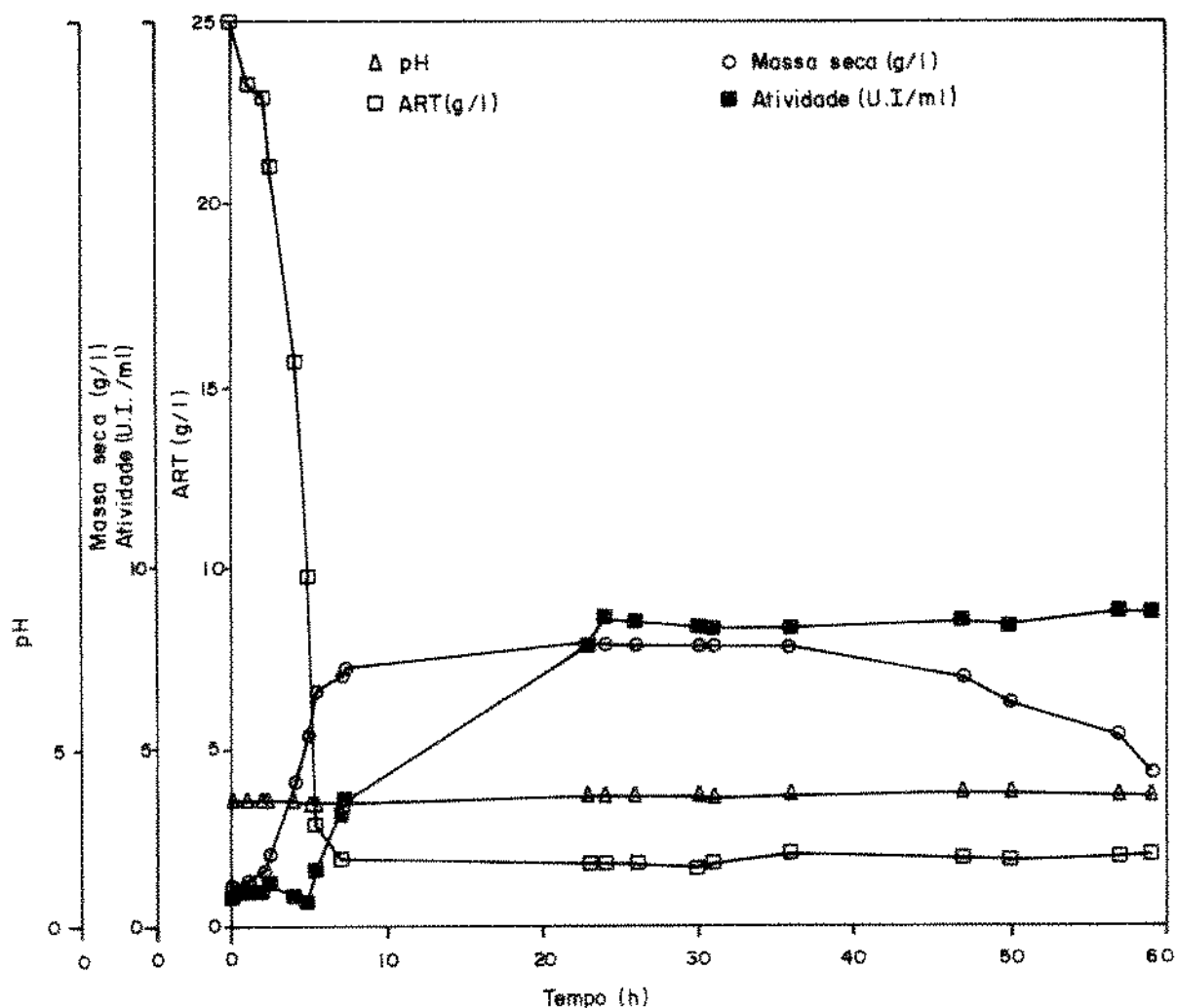


Figura 4.4 Experimento em batelada alimentada, concentração de sacarose 240,0 g/l, vazão de 3,0 ml/h, com início de alimentação a partir de 5,40 h e término 30,0 h.

Com os resultados satisfatórios obtidos, decidiu-se substituir a sacarose da alimentação por melaço. Os

resultados deste experimento estão reunidos na TABELA 4.6 e FIGURA 4.5.

Através de cálculos chegou-se a uma concentração de 350,0 g/l, a qual correspondia aos 240,0 g/l de açúcar que estava sendo utilizado.

TABELA 4.6 Fermentação com alimentação de melaço com concentração 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na sexta hora e término na trigésima hora.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	Atv(U.I./ml)
0,0	3,68	1,06	21,0	0,60
1,0	3,73	1,24	20,82	0,65
2,0	3,71	1,69	20,27	0,70
3,0	3,72	2,48	18,74	0,68
4,0	3,75	3,40	16,79	0,65
5,0	3,72	5,11	10,56	0,47
6,0	3,73	7,98	3,30	0,82
7,0	3,73	7,94	2,36	3,04
8,0	3,78	8,23	2,42	3,65
11,0	3,96	8,51	2,55	4,42
13,0	4,08	8,79	2,57	5,03
22,55	4,17	9,08	3,18	6,45
24,40	4,21	9,01	3,20	6,40
26,30	4,22	9,08	3,43	6,38
30,0	4,25	9,01	3,71	6,43
31,0	4,26	9,08	3,72	6,49
34,10	4,77	9,22	4,18	6,15
47,10	4,93	11,06	3,69	8,81
49,10	4,71	12,48	3,60	9,03

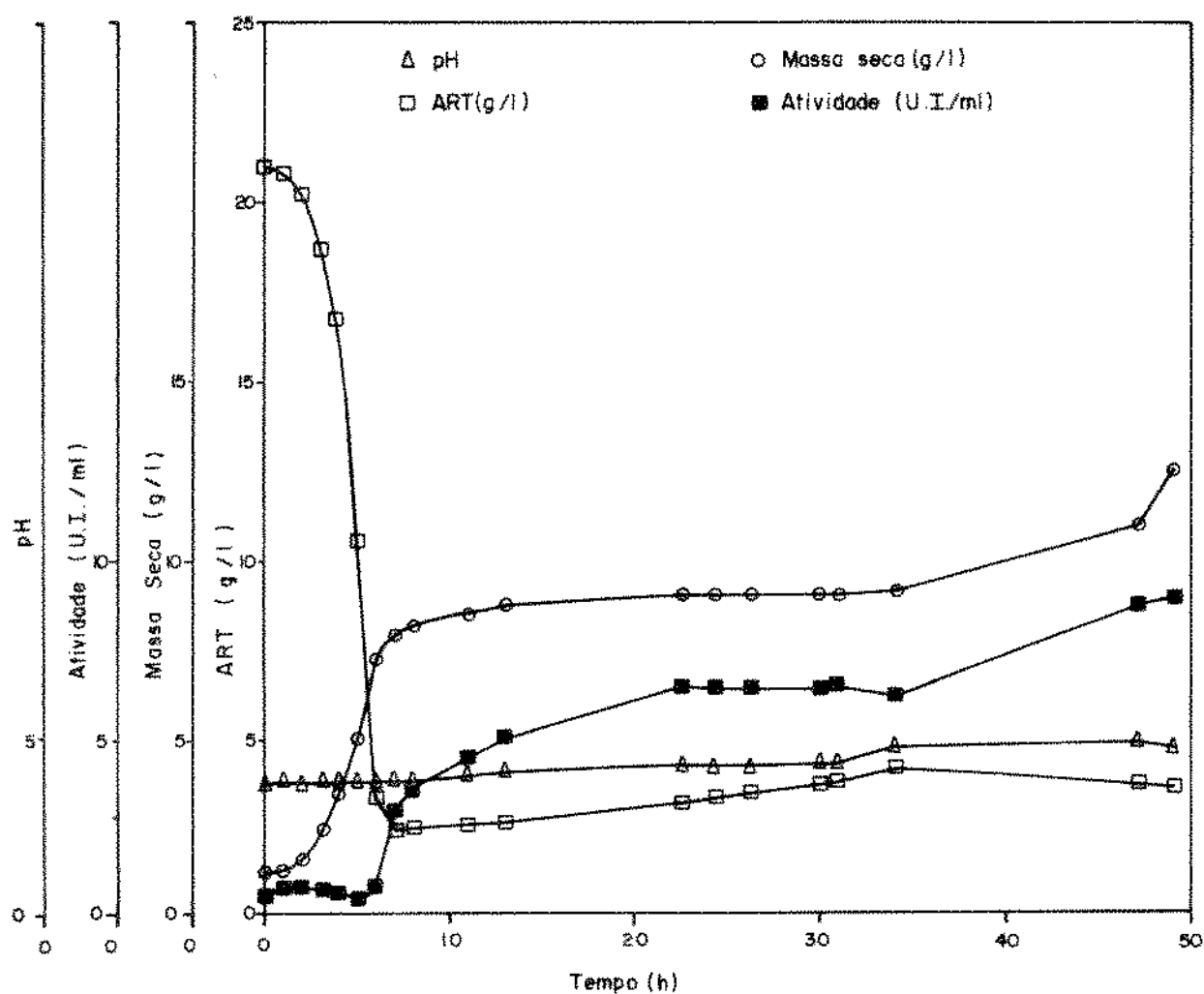


FIGURA 4.5 Experimento em batelada alimentada, substrato melaço (350,0 g/l), vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na sexta hora e término na trigésima hora.

A atividade enzimática final obtida nesta fermentação foi similar ao experimento anterior com alimentação de sacarose pura. Por outro lado os valores de massa seca tiveram um aumento considerável. Os açúcares foram consumidos e mantiveram-se a níveis constantes e baixos, mesmo com a alimentação de melaço. O pH não apresentou variação significativa nas amostras consideradas.

A TABELA 4.7 e FIGURA 4.6 reúnem os dados obtidos em fermentação com alimentação a partir da segunda hora. Neste caso a concentração inicial de substrato no meio descrito no item 3.16 foi de 3,0 g/l para evitar acúmulo.

Essa mudança visava uma diminuição do tempo de fermentação, ou seja, atingir uma maior atividade enzimática em um período de tempo menor, mantendo os níveis de açúcares baixos.

TABELA 4.7 Fermentação em batelada alimentada, concentração de melaço 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora e término no final do experimento.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	Atv(U.I/ml)
0,0	9,98	0,90	4,45	0,45
1,0	9,42	1,19	4,01	0,45
2,0	9,51	1,56	3,94	0,50
3,35	9,52	2,70	2,91	0,65
4,35	9,55	9,55	1,56	2,70
5,35	9,62	4,26	1,51	5,03
10,35	9,87	6,81	1,65	9,00
23,00	4,14	7,94	2,07	9,43
24,05	4,14	7,94	2,12	9,52
25,05	4,16	8,08	2,11	9,67
26,05	4,17	8,23	2,18	9,54
27,35	4,19	8,23	2,23	9,75
29,05	4,19	8,37	2,31	9,50
30,35	4,23	8,51	2,36	9,56
35,35	4,31	9,64	2,67	9,91
45,05	4,65	14,18	3,31	8,90

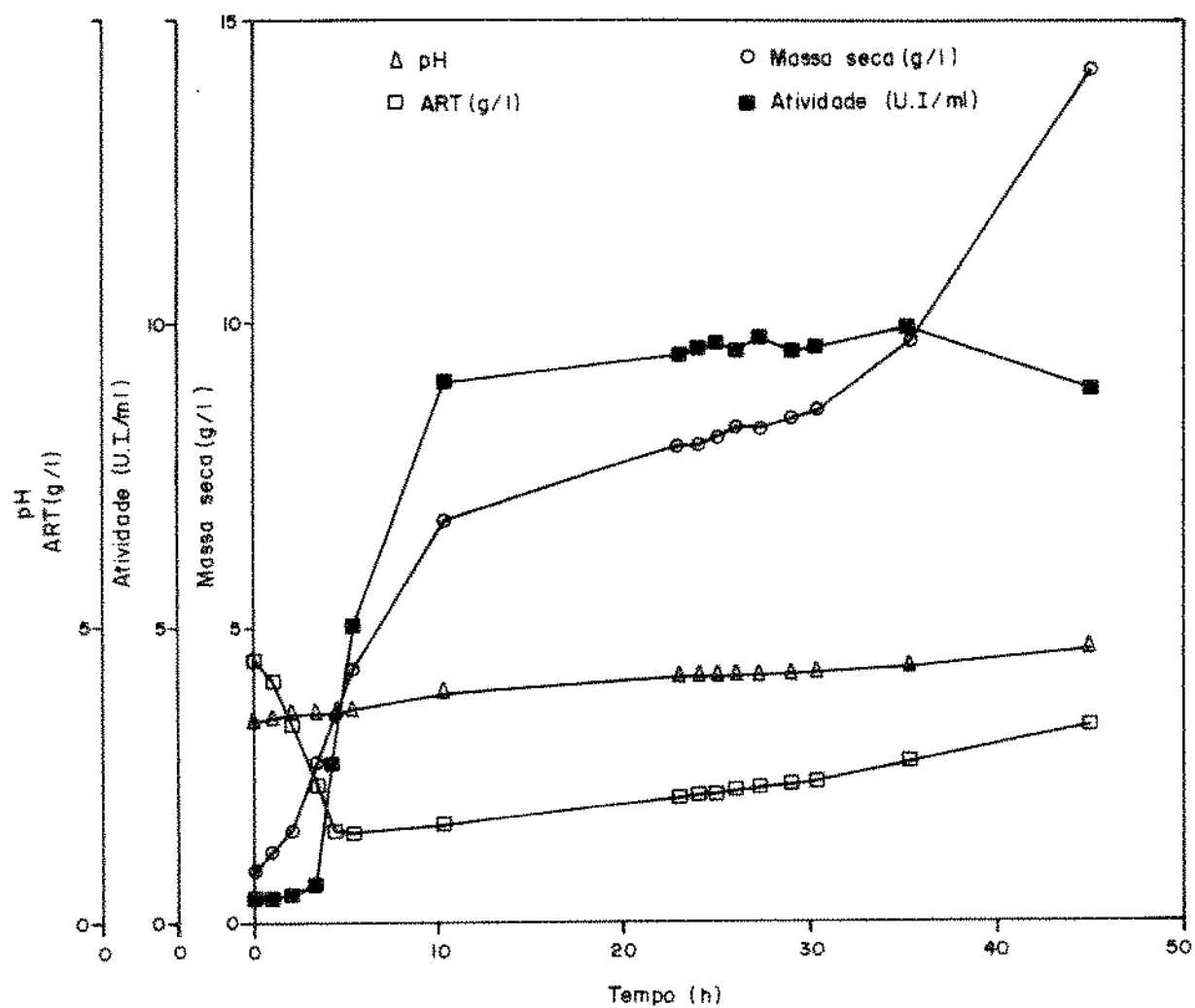


FIGURA 4.6 Experimento em batelada alimentada, concentração de melaço 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora e término no final do experimento.

Analisando os dados, pode-se notar que houve efetivamente uma diminuição do tempo de fermentação, se comparado com os experimentos anteriores, visto a atividade enzimática ter atingido um máximo praticamente após 10 horas de fermentação.

Nas fermentações anteriores, a atividade atingiu o seu pico em tempos posteriores a 10 horas. O significado prático deste resultado é um aumento na produtividade, embora a atividade final seja próxima às anteriores.

Interessante notar que os níveis de açúcares dedutor mantiveram-se baixos durante todo experimento, sem ocorrência de acúmulo. No entanto, este fato não contribuiu para o aumento da atividade enzimática.

A seguir, foi realizado uma fermentação com alimentação até 26,0 horas, a fim de se estudar o comportamento da produção da enzima após o término da alimentação.

TABELA 4.8 Experimento em batelada alimentada, concentração de melaço 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora e término na vigésima sexta hora.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	Atv(U.l/ml)
0,0	3,48	0,50	4,19	0,25
1,0	3,44	0,57	3,85	0,30
2,0	3,56	0,85	3,15	0,30
3,0	3,47	1,95	3,59	0,25
4,0	3,54	2,13	3,99	0,30
5,0	3,57	3,12	1,71	0,75
6,0	3,57	3,83	1,17	3,15
9,12	3,71	4,97	1,30	7,20
23,0	4,02	7,23	1,96	10,00
24,30	4,07	7,38	2,12	11,15
26,00	4,08	7,52	2,08	10,80
27,30	4,08	7,52	2,13	11,00
29,00	4,17	7,52	2,19	10,90
31,00	4,53	7,94	2,28	10,85
35,15	4,55	10,78	2,51	11,95
48,30	4,68	10,35	2,13	12,15

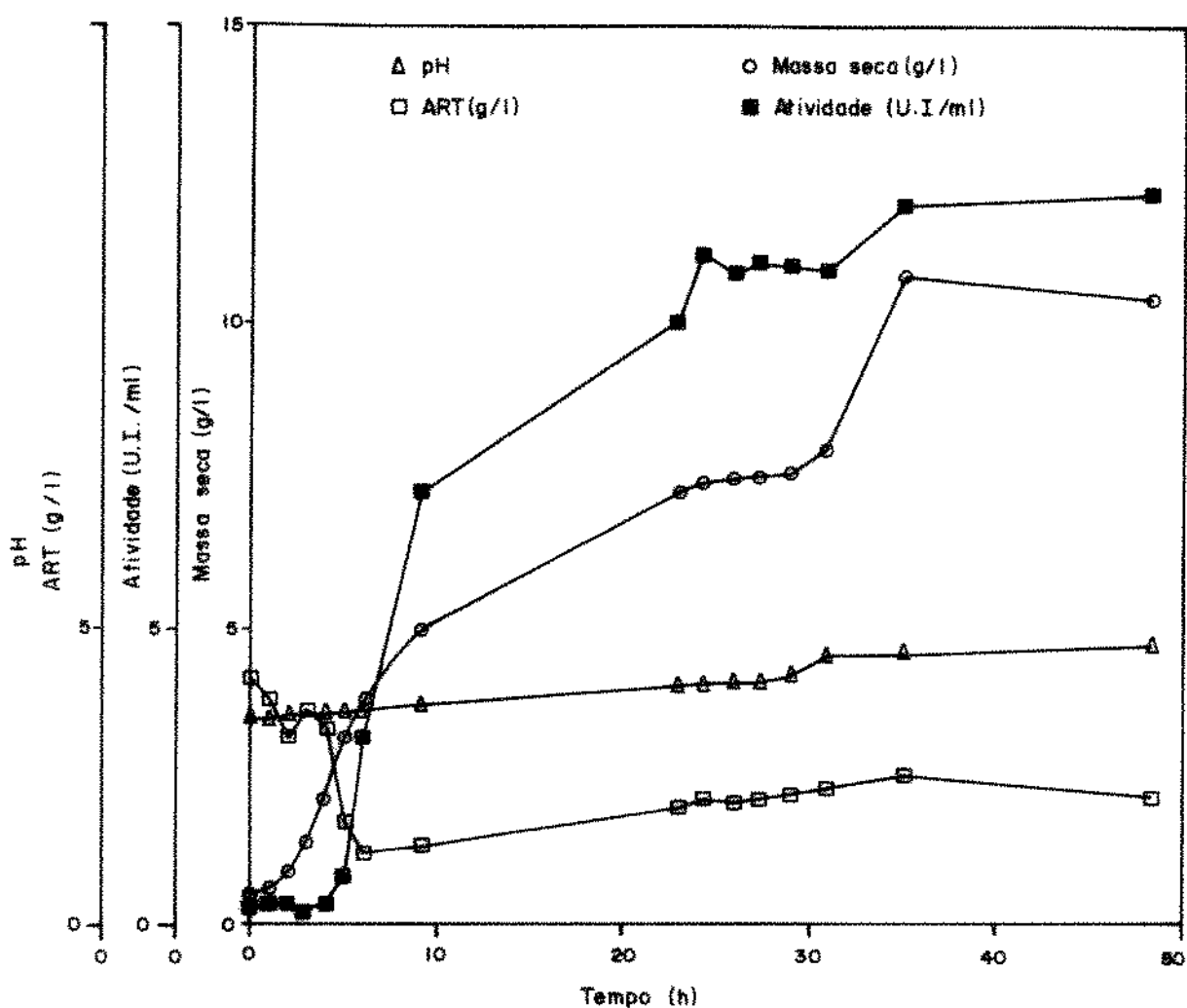


FIGURA 4.7 Fermentação em batelada alimentada, concentração de melaço 350,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora e término na vigésima sexta hora.

Da TABELA 4.8 e FIGURA 4.7, verifica-se um pequeno acréscimo na atividade enzimática, se comparada com a fermentação anterior, (12 U.I/ml neste caso contra 10 U.I/ml no caso anterior). As outras variáveis não sofreram alterações significativas.

Numa etapa seguinte aumentou-se a concentração de melaço em 25 %, visto que com a concentração anterior (350,0 g/l) os níveis de açúcares redutores mantiveram-se baixos, indicando o total consumo destes, e talvez uma limitação por falta de substrato

TABELA 4.9 Fermentação em batelada alimentada, concentração de melaço 440,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação na segunda hora até final do experimento.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	Atv(U.I/ml)
0,0	3,54	0,71	5,17	0,70
1,0	3,52	0,85	4,70	0,75
2,0	3,55	1,13	4,24	0,80
3,0	3,57	1,69	4,10	0,80
4,30	3,59	3,05	2,09	1,85
6,00	3,67	4,11	1,69	7,95
8,10	3,89	5,39	1,78	11,00
23,00	4,21	8,51	2,59	12,90
24,00	4,18	8,65	2,60	13,85
26,00	4,17	8,65	2,70	12,45
27,00	4,18	8,65	2,81	12,05
29,00	4,17	8,72	2,78	13,85
30,00	4,19	8,79	2,96	13,65
31,00	4,16	8,79	3,01	13,75

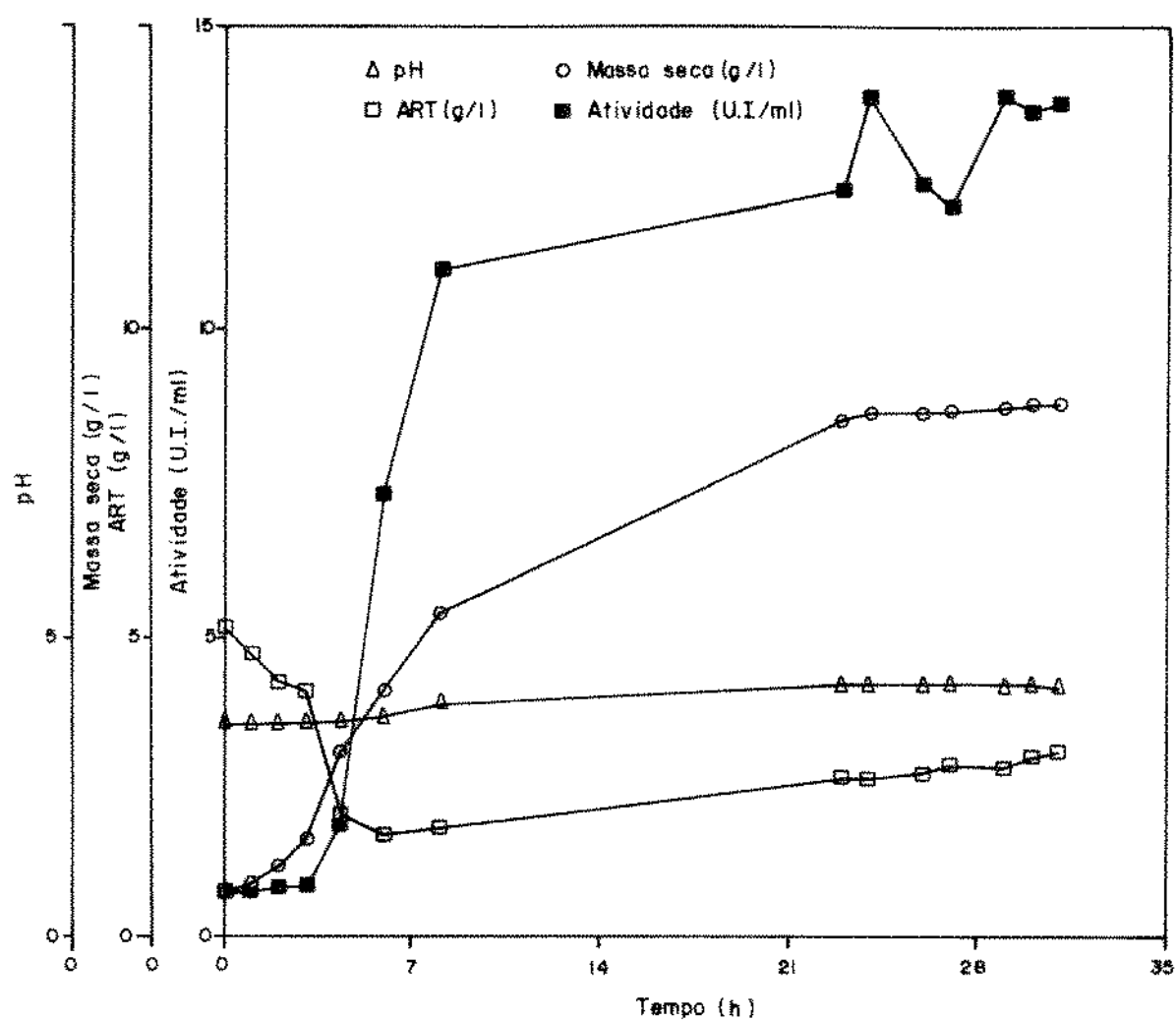


FIGURA 4.8 Experimento em batelada alimentada, concentração de melão 440,0 g/l, vazão = 3,0 ml/h, início da alimentação da segunda hora até final da fermentação.

Observa-se na FIGURA 4.8 que a atividade cresceu rapidamente até a oitava hora, atingindo 11,0 U.I./ml, e a partir de então houve pequeno acréscimo até o final da fermentação. Embora tenha ocorrido uma melhora em relação ao experimento anterior, esta não foi muito significativa.

Pode-se notar, por outro lado, que a maior produção da enzima se dá na fase de crescimento rápido do microrganismo.

A fase exponencial de crescimento mostrou-se portanto a fase principal de produção da enzima. Assim sendo, prolongando-se ao máximo esta fase é possível obter-se maior produção de enzima. Neste sentido, idealizou-se a experiência, onde o substrato é alimentado em forma exponencial, acompanhando o crescimento, não permitindo no entanto o acúmulo indesejável do substrato.

Para se obter alimentação exponencial, calculamos o consumo aproximado de substrato através dos dados da fermentação em batelada simples (TABELA 4.2).

Das equações:

$$q_s = 1/x \, dS/dt \quad (4.1)$$

$$\mu = 1/x \, dx/dt \quad (4.2)$$

$$dS/dt = 1/y_{x/s} \, dx/dt \quad (4.3)$$

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (4.4)$$

tira-se

$$q_s = \mu/y_{x/s} \quad \text{ou seja} \quad (4.5)$$

$$dS/dt = q_s x = \mu/y_{x/s} x = \mu/y_{x/s} x_0 e^{\mu t} \quad (4.6)$$

como o crescimento esta na fase exponencial

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \quad (4.7)$$

tem-se então

$$dS/dt = 1/y_{x/s} \mu_{\text{máx}} e^{\mu_{\text{máx}} t} \quad (4.8)$$

e a vazão no tempo genérico t será

$$Q_t = dS/dt \big|_t V_t \quad (4.9)$$

onde $V_t = V_{t-1} + Q_{t-1} \Delta t$ é o volume do reator no tempo t e $\Delta t = 1$ hora

Da fermentação em batelada simples, temos:

$$\mu_{\text{máx}} = 0.38 \text{ h}^{-1}$$

$$x_0 = 1.0 \text{ g/l (massa seca inicial)}$$

$$y_{x/s} \cong 0.50 \quad (\text{rendimento em massa celular do processo})$$

t = tempo de fermentação (horas)

Como o início da alimentação se dará na segunda hora de experimento, temos $t = 0$ para as duas primeiras horas. Considerando um tempo de fermentação de 13 horas, a alimentação será reduzida a partir de 11 horas.

Com o auxílio de uma bomba peristáltica, varia-se a vazão de alimentação com melaço, de acordo com a TABELA 4.10.

TABELA 4.10 Vazão de alimentação de melaço em função do tempo, na alimentação.

Tempo(h)	Vazão(ml/h)
0,0	-----
1,0	-----
2,0	1,1
3,0	1,6
4,0	2,4
5,0	3,5
6,0	5,1
7,0	7,4
8,0	10,9
9,0	15,9
10,0	23,30
11,0	2,4
12,0	-----
13,0	-----

Os resultados obtidos se encontram na TABELA 4.11

e FIGURA 4.9.

TABELA 4.11 Fermentação com alimentação exponencial, com concentração de melaço 440,0 g/l, início da alimentação na segunda hora e término na décima segunda hora.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	At(U.I/ml)
0,0	3,61	1,06	1,97	0,55
1,0	3,64	1,06	1,86	0,59
2,0	3,69	1,21	1,60	0,59
3,0	3,64	1,56	1,44	0,69
4,0	3,63	2,27	1,78	0,59
5,0	3,63	2,55	1,76	2,40
6,0	3,67	4,04	1,48	3,00
7,0	3,74	5,25	1,48	6,71
8,0	3,85	6,45	1,80	8,96
9,0	3,96	7,66	2,09	10,17
10,0	4,03	8,51	2,43	10,58
11,0	4,01	9,64	2,97	10,70
12,0	4,05	10,50	2,68	10,76
13,0	4,18	10,64	2,66	10,82

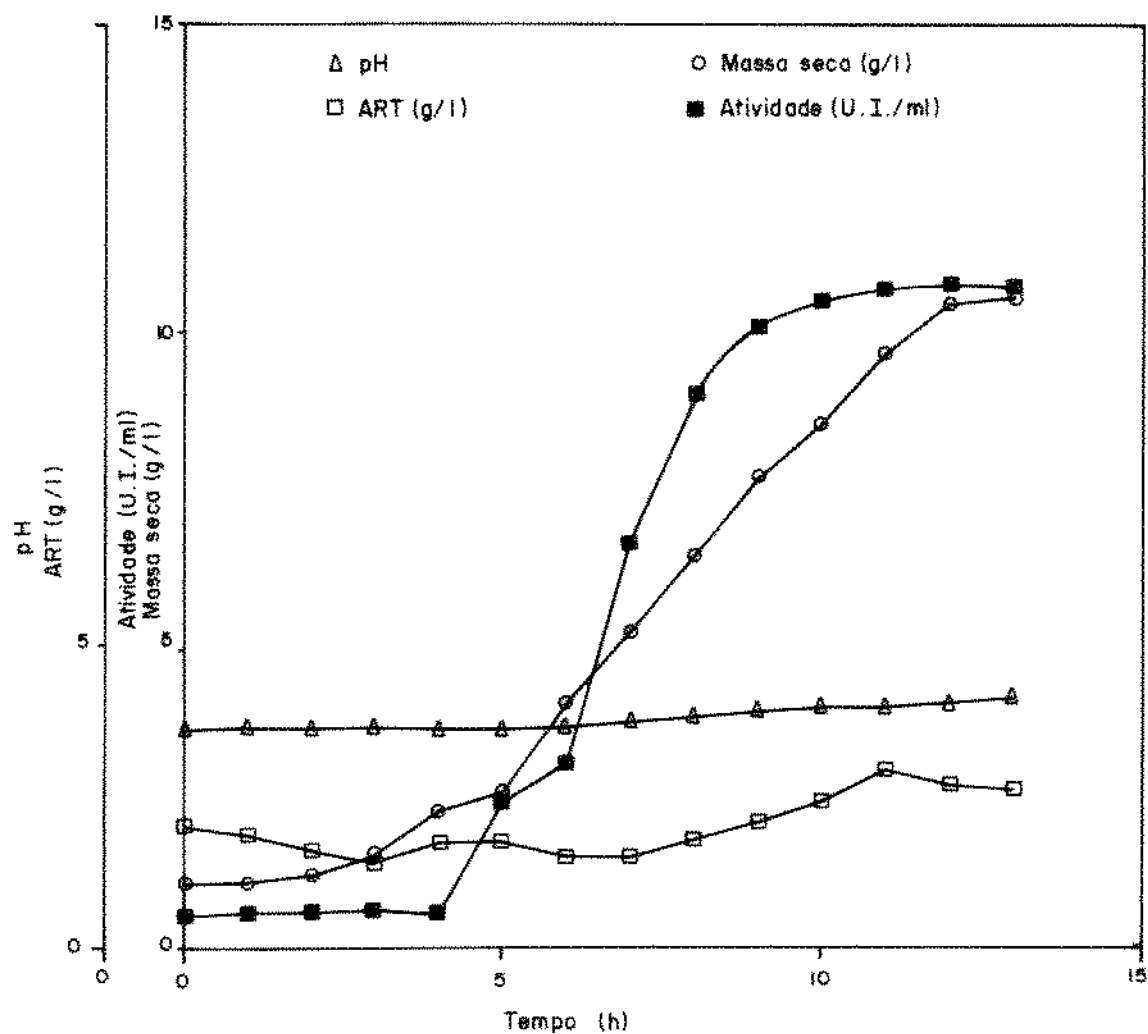


FIGURA 4.9 Experimento com alimentação exponencial, com concentração de melaço 440,0 g/l, início na segunda hora e término na décima segunda hora.

Verifica-se que houve efetivamente um crescimento constante da biomassa até o final do processo, acompanhada do aumento da atividade enzimática até aproximadamente 10 horas de fermentação, quando então esta se estabilizou. A concentração de substrato flutuou levemente mantendo-se a níveis baixos, mostrando que não houve excesso de alimentação. No entanto não observou-se uma melhora significativa na produção da enzima.

4.3 - Estudo da produção da enzima invertase em reator contínuo duplo estágio.

Embora tenha se conseguido uma melhora considerável na produção de enzima, nos experimentos em batelada, assumiu-se que esta ainda não era satisfatória. Julgou-se então conveniente partir para um novo procedimento de fermentação. Decidiu-se então pela fermentação contínua, onde é muito mais fácil manter o substrato em baixas concentrações sem limitar a produtividade e/ou rendimento como ocorre na fermentação em batelada. Adicionalmente decidiu-se trabalhar com reator duplo estágio (descrito no item 3.1.10 e FIGURA 3.4), com dupla alimentação de substrato, que é um tipo de reator que favorece a produtividade quando fenômenos de inibição estão presentes.

Nestes experimentos variou-se a concentração do substrato (30,0, 60,0, 90,0 e 140, g/l) e a taxa de diluição.

4.3.1 - Experimento utilizando concentração de melaço 30, g/l.

Analizando-se os dados da TABELA 4.13 e FIGURA 4.10 pode-se verificar que ocorre um aumento da atividade enzimática, assim como da concentração celular, para taxas de diluição (D) crescente até $D_1 = 0,168 \text{ h}^{-1}$ e $D_2 = 0,325 \text{ h}^{-1}$, sendo que para valores maiores que estas taxas verifica-se um decréscimo tanto da atividade enzimática, como da massa celular.

A evolução do açúcar redutor total no meio pode ser verificado através da FIGURA 4.11, onde nota-se que para baixas taxas de diluição este praticamente permanece inalterado; tendendo a um ligeiro acréscimo em taxa de diluição maior, quando a atividade e massa seca sofrem decréscimo.

A produtividade mostrada na FIGURA 4.11, manteve um crescimento constante, tendendo a atingir um valor máximo de 5,30 U.I./ml.h, para D_2 próximo a $0,325 \text{ h}^{-1}$.

Analizando o rendimento na FIGURA 4.12, verifica-se que este aumenta até $D_2 = 0,279 \text{ h}^{-1}$, decrescendo em seguida a medida que a taxa de diluição aumenta.

TABELA 4.12 Fermentação em reator duplo estágio utilizando concentração de melaço 30,0 g/l.

Reator	Vazao(ml/h)	D(1/h)	M.S.(g/l)	ARI(h/l)	Atv(UI/ml)	Fr(UI/mlh)	Y(U,I/gARI)
1	56,14	0,093	0,273	0,88	27,3		
2	112,28	0,181	3,27	0,84	28,3	2,60	1854,52
1	86,66	0,144	2,66	0,88	28,2		
2	173,32	0,279	3,17	0,85	30,4	4,42	2013,24
1	100,84	0,168	3,84	0,85	29,1		
2	201,68	0,325	4,35	0,81	32,0	5,30	1749,6
1	125,80	0,209	3,55	0,85	28,6		
2	251,60	0,405	3,49	0,90	22,5	4,64	1257,0
1	143,00	0,238	3,11	0,92	15,3		
2	286,00	0,461	3,96	0,91	16,2	3,80	905,6

$V_{\text{reator1}} = 600 \text{ ml}$

$V_{\text{reator2}} = 620 \text{ ml}$

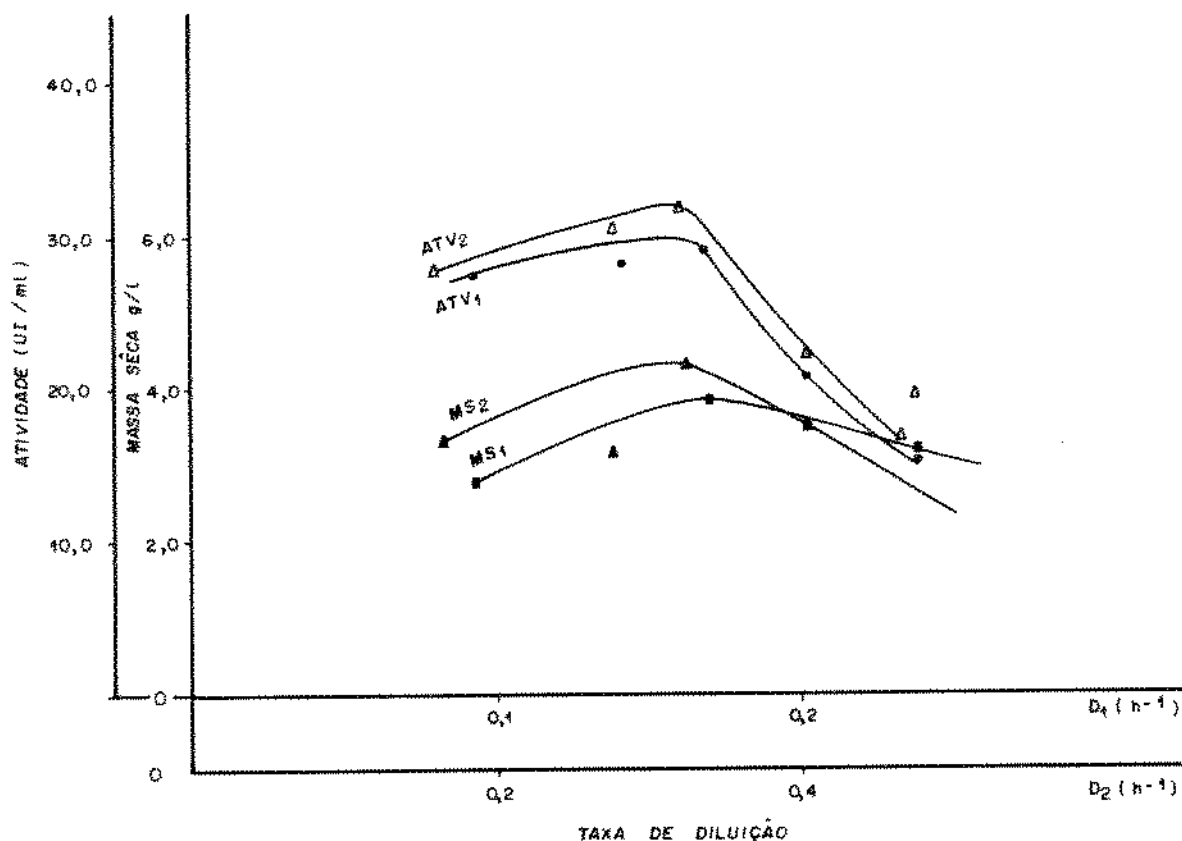


FIGURA 4.10 Atividade enzimática e massa seca em função da taxa de diluição.

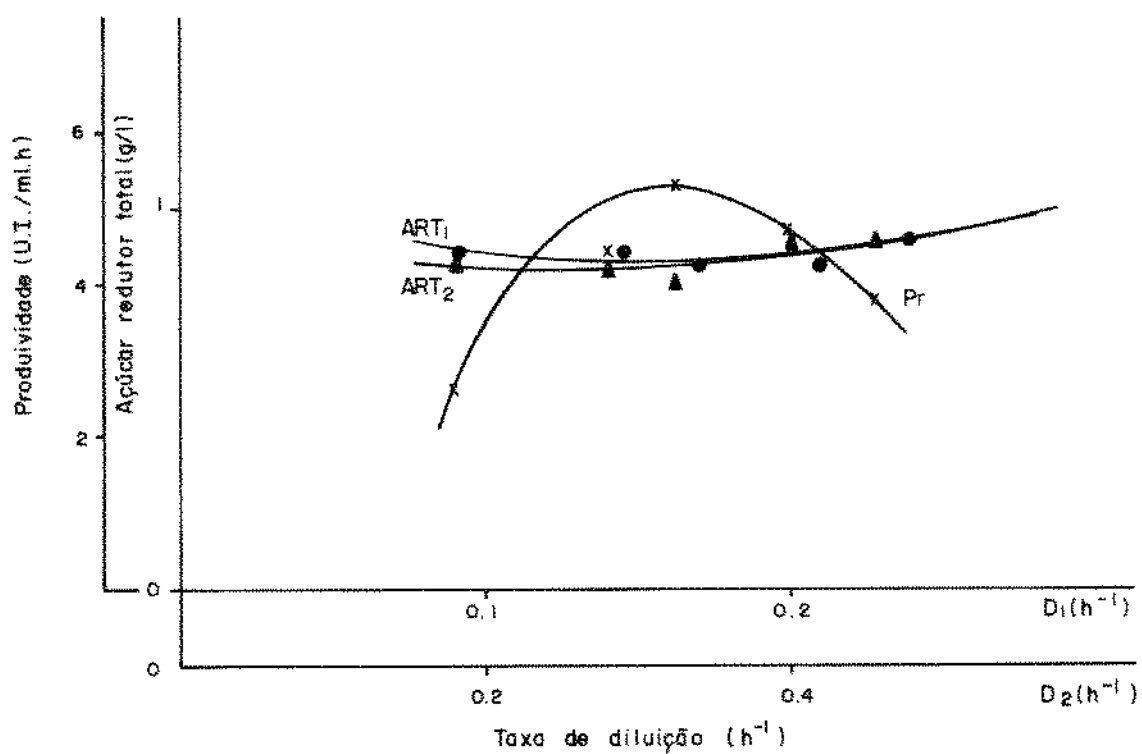


FIGURA 4.11 Produtividade e açúcar redutor total em função da taxa de diluição.

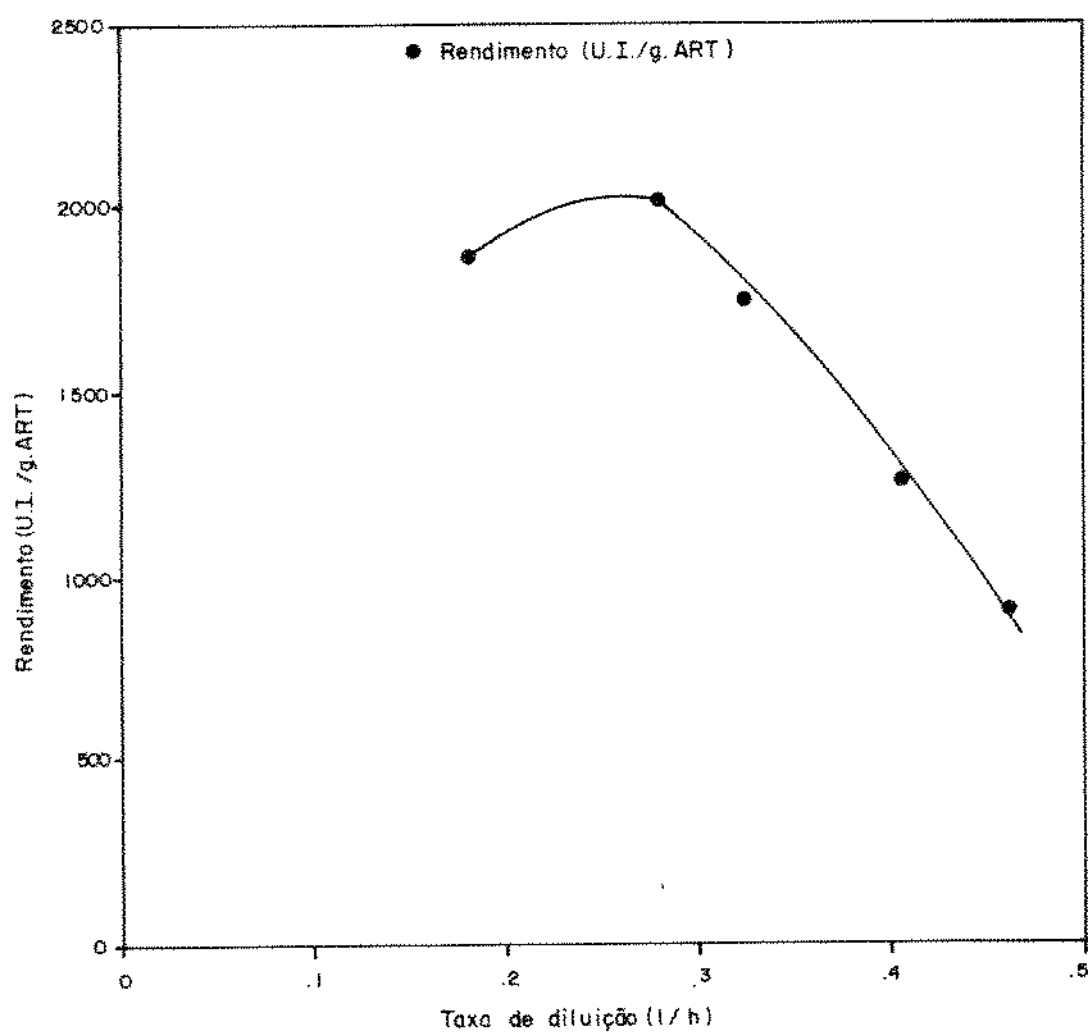


FIGURA 4.12 Rendimento em função da taxa de diluição.

4.3.2 - Experimento utilizando concentração de melaço 60,0 g/l.

Os resultados apresentados na TABELA 4.14 e FIGURA 4.13, indicam que para valores de $D_1 = 0,13$ e $D_2 = 0,23 \text{ h}^{-1}$ temos alta atividade enzimática (41,08 e 42,0 U.I./ml), maior em relação ao experimento com concentração de melaço 30,0 g/l, e quatro vezes maior em relação ao processo em batelada alimentada. A concentração celular tem um pequeno aumento para taxas de diluição baixas, caindo em seguida, à medida que se aumenta a vazão.

Pode-se observar ainda que à medida que se aumenta a taxa de diluição, verifica-se uma queda acentuada em relação a atividade, o que indica ocorrência de algum tipo de inibição na produção da enzima pelo excesso de substrato (FIGURA 14), sendo que isto não é observado a nível de crescimento do microrganismo, pois a diminuição na massa seca não é significativa.

A produtividade analisada através da TABELA 4.14 e FIGURA 4.14, alcança um valor de 5,21 U.I./ml.h e mantém-se neste valor ($D_2 = 0,4 \text{ h}^{-1}$) para em seguida ter um decréscimo muito rápido com o aumento da taxa de diluição.

O rendimento visto através da FIGURA 4.15, mostra um declínio rápido à medida que a vazão de alimentação aumenta, sendo que o valor mais alto de rendimento é alcançado para a mais baixa vazão (121,30 ml/h).

TABELA 4.14 Fermentação utilizando concentração de melaço 60,0 g/l.

Reator	Vazao(ml/h)	D(1/h)	M.S.(g/l)	ART(h/l)	Atv(UI/ml)	Pr(UI/mlh)	Y(U.l/gART)
1	60,65	0,13	3,87	1,85	41,08		
2	121,30	0,23	4,00	1,79	42,40	5,19	1530,13
1	90,56	0,196	4,50	1,89	27,60		
2	181,02	0,34	4,20	1,68	28,50	5,21	1024,44
1	116,65	0,25	4,50	1,37	20,20		
2	233,30	0,44	3,80	1,37	21,00	4,95	746,53
1	122,50	0,26	3,70	1,49	16,80		
2	245,00	0,46	3,60	2,03	18,70	4,63	680,74
1	147,50	0,32	3,40	3,65	0,85		
2	295,00	0,55	3,40	7,78	1,71	0,51	73,96

$V_{\text{reator1}} = 460 \text{ ml}$

$V_{\text{reator2}} = 530 \text{ ml}$

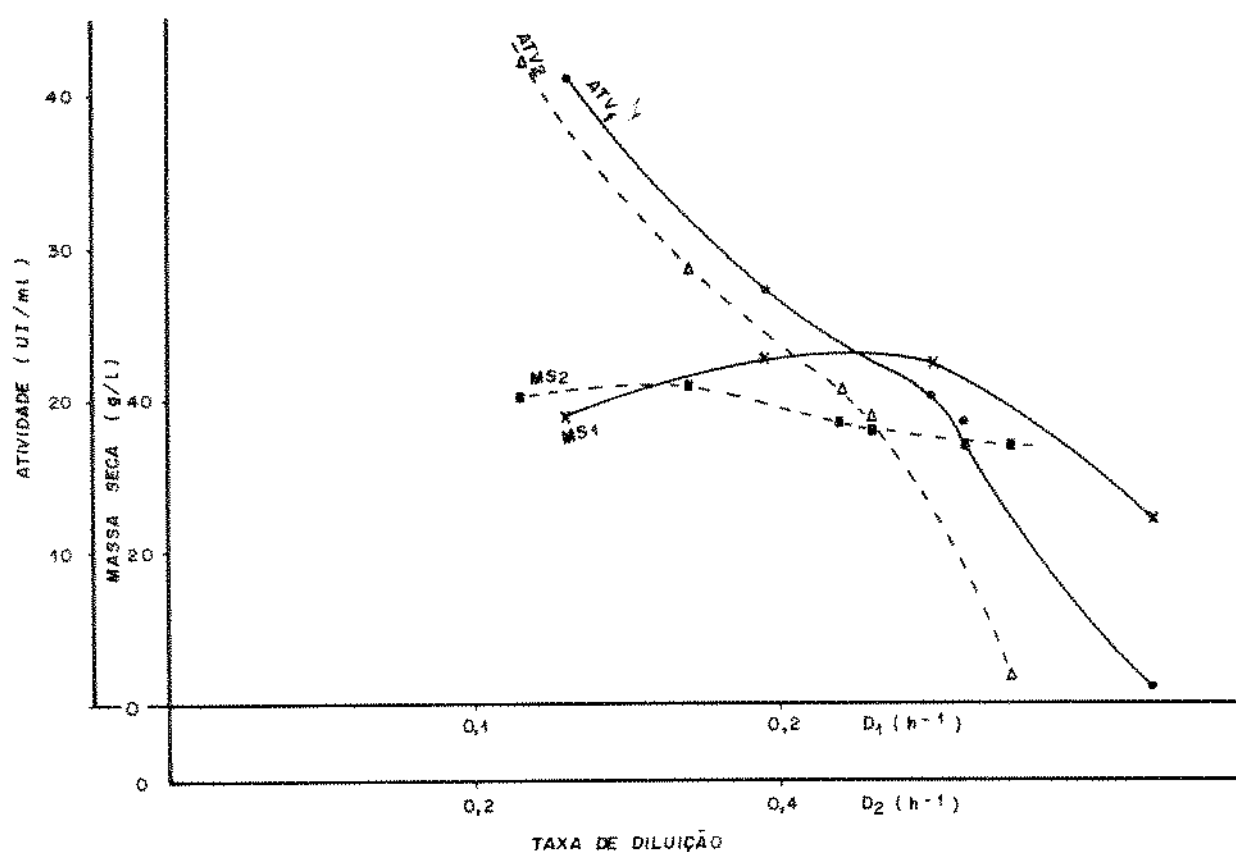


FIGURA 4.13 Atividade enzimática e massa seca em função da taxa de diluição.

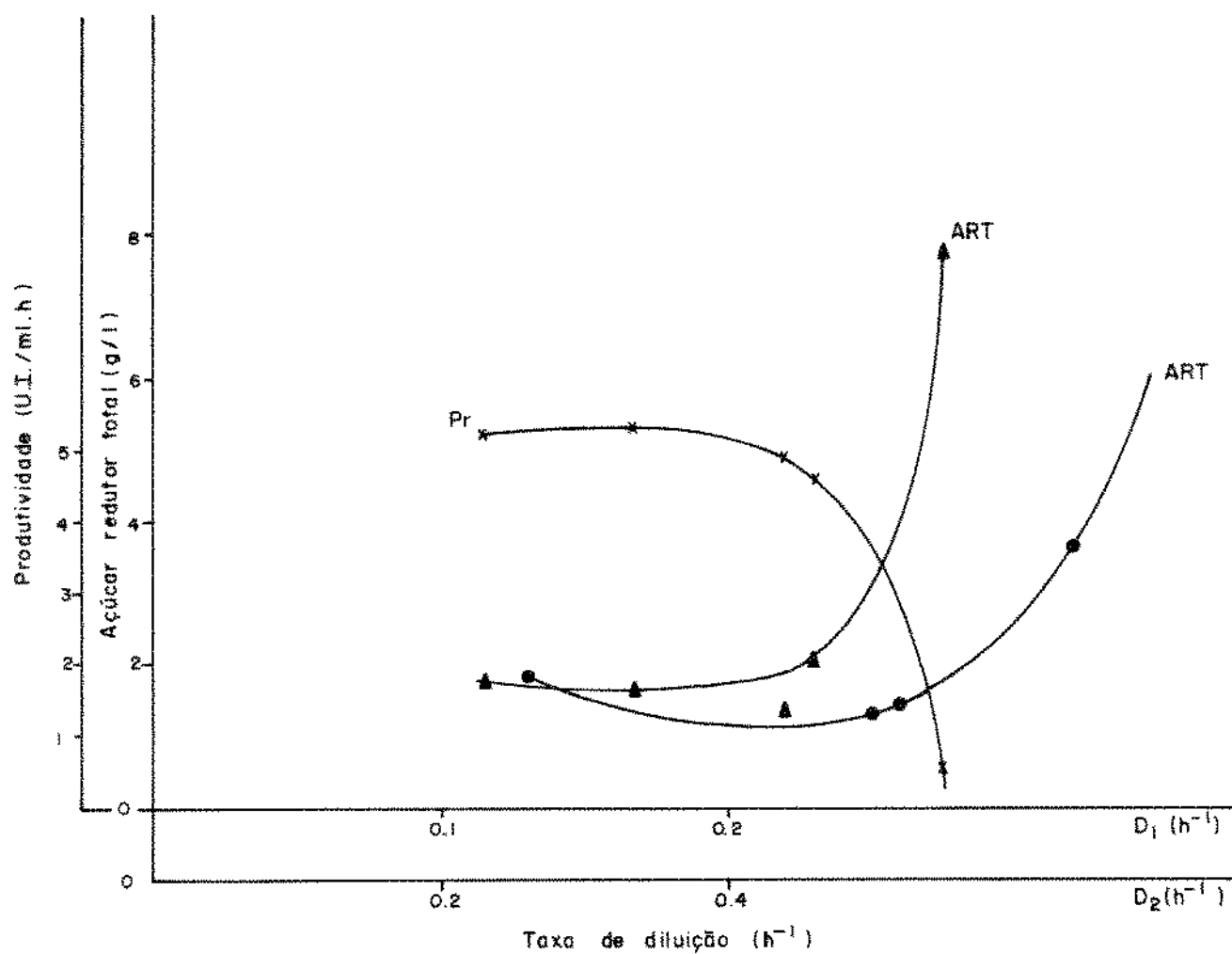


FIGURA 4.14 Produtividade e açúcar redutor total em função da taxa de diluição.

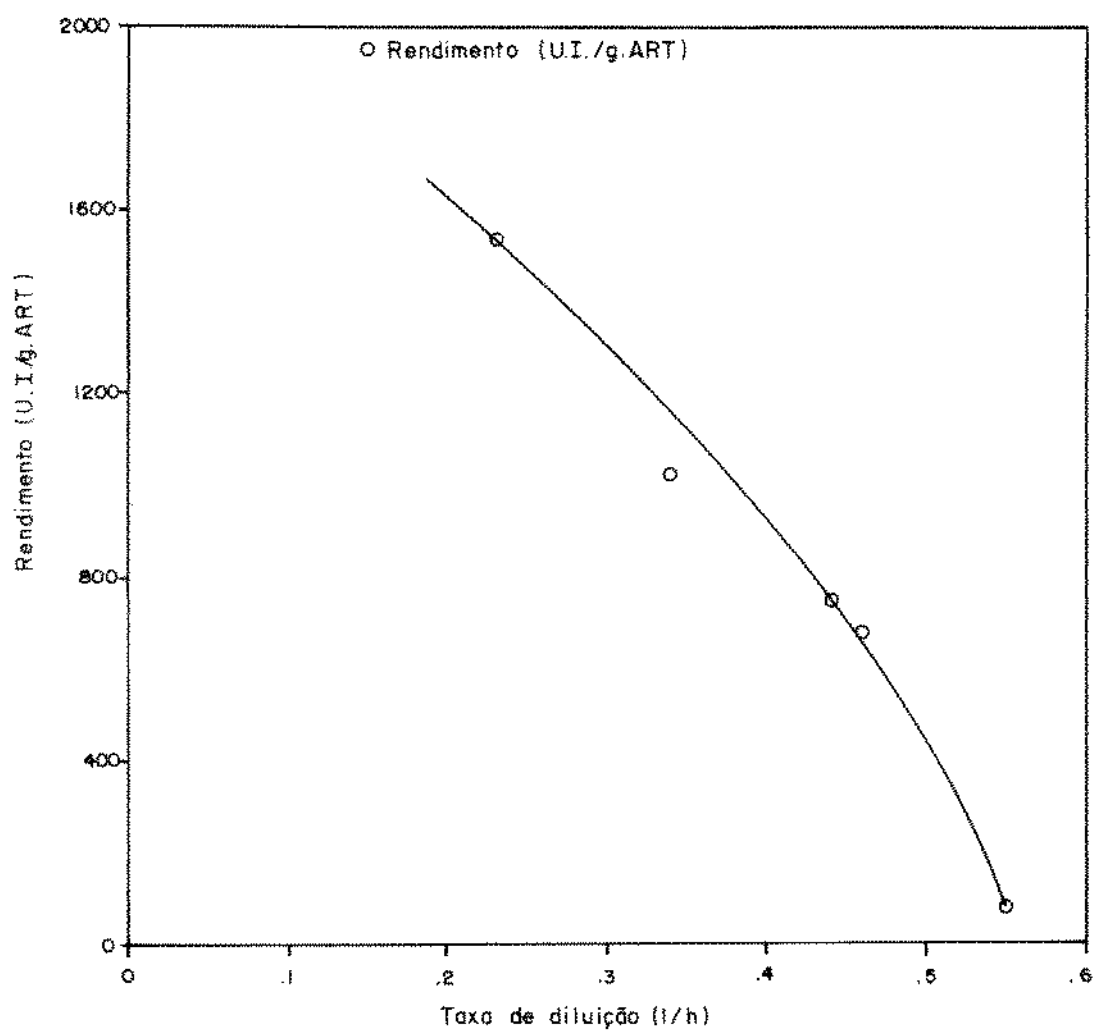


FIGURA 4.15 Rendimento em função da taxa de diluição.

4.3.3 - Experimento utilizando concentração de melaço 90,0 g/l.

Para essa concentração pode-se verificar que a atividade é máxima (39,87 e 35,66 U.I./ml), para taxas de diluição baixas ($D_2=0,13$ e $D_1=0,23 \text{ h}^{-1}$), declinando à medida que se aumenta a vazão de alimentação.

A concentração celular tem um ligeiro aumento até $D_1=0,19 \text{ h}^{-1}$ e $D_2=0,33 \text{ h}^{-1}$ para em seguida sofrer um decréscimo (TABELA 4.15 e FIGURA 4.16). O açúcar redutor total mantém-se praticamente constante até $D_1=0,25 \text{ h}^{-1}$ e $D_2=0,43 \text{ h}^{-1}$ para em seguida sofrer um rápido acúmulo no meio (FIGURA 4.17).

A produtividade vista na FIGURA 4.17 é alta (4,9 U.I./ml.h) para vazões baixas e o rendimento mostrado na FIGURA 4.18 alcança valor alto (616,32 U.I./gART), para vazões baixas, sendo que ambos caem rapidamente, à medida que se aumenta a vazão de alimentação.

TABELA 4.15 Fermentação utilizando concentração de melaço 90,0 g/l.

Reator	Vazao(ml/h)	D(1/h)	M.S. (g/l)	ART(h/l)	Atv(UI/ml)	Pr(UI/mlh)	Y(U.I./gART)
1	61	0,13	7,0	1,89	35,66		
2	122	0,23	9,2	1,81	39,87	4,9	616,32
1	87	0,19	8,5	2,00	18,63		
2	174	0,33	5,0	2,10	21,55	3,8	334,62
1	115	0,25	4,8	2,36	11,23		
2	230	0,43	3,7	2,23	14,90	3,46	231,8
1	120	0,26	3,5	20,12	4,2		
2	240	0,45	3,4	17,04	7,9	1,9	159,72
1	140	0,30	3,4	17,87	2,5		
2	280	0,53	3,4	18,14	4,9	1,4	101,32

$V_{\text{reator1}} = 460 \text{ ml}$

$V_{\text{reator2}} = 530 \text{ ml}$

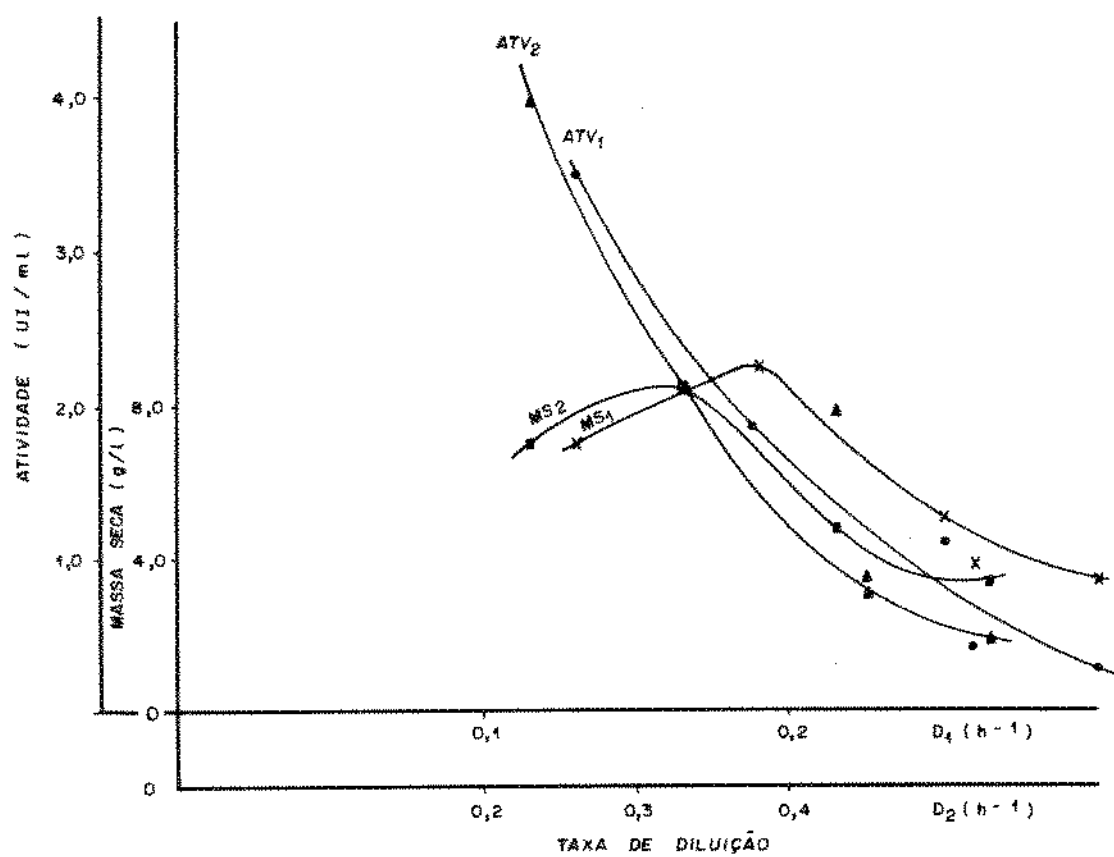


FIGURA 4.16 Atividade enzimática e massa seca em função da taxa de diluição.

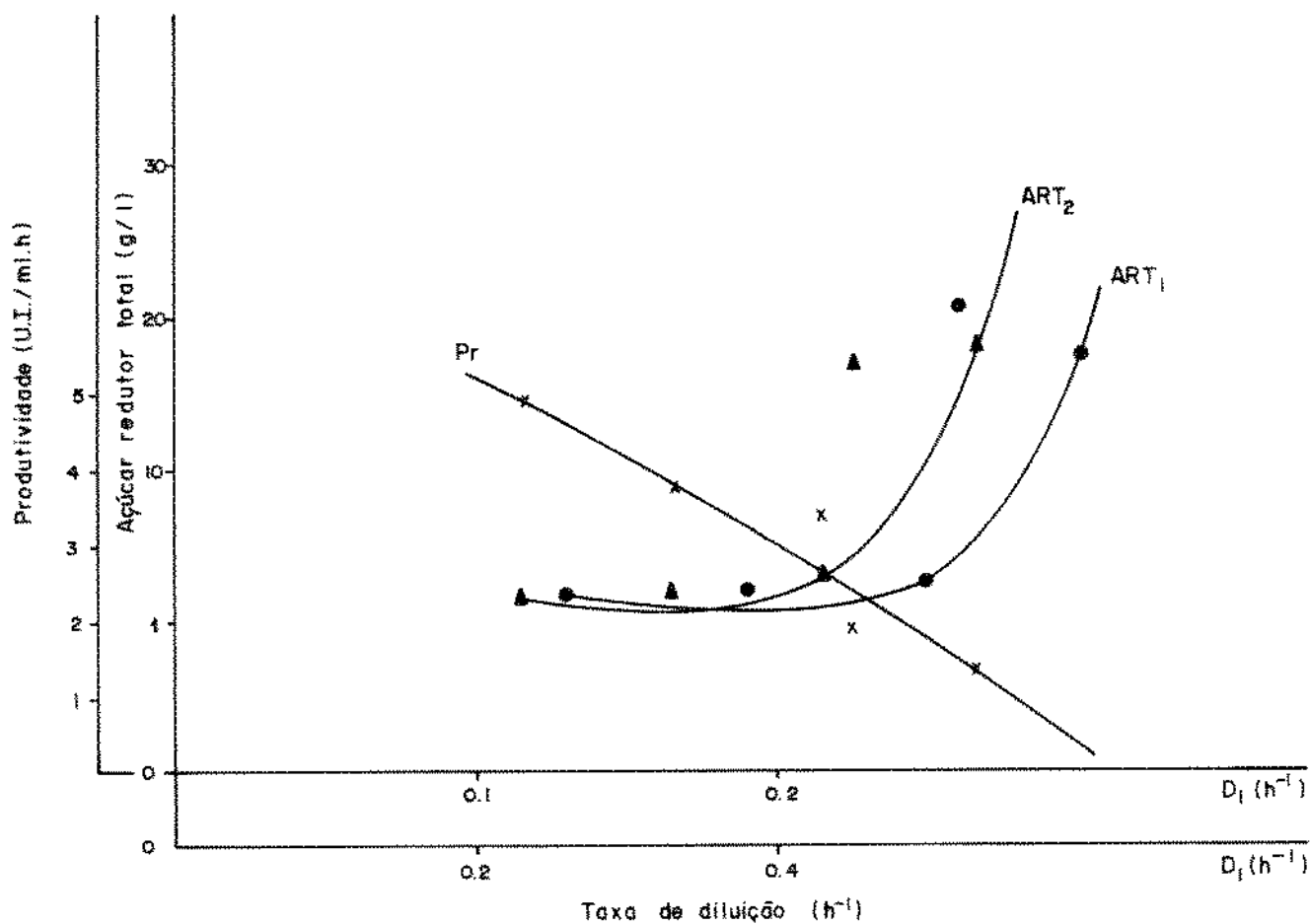


FIGURA 4.17 Produtividade e açúcar redutor total em função da taxa de diluição.

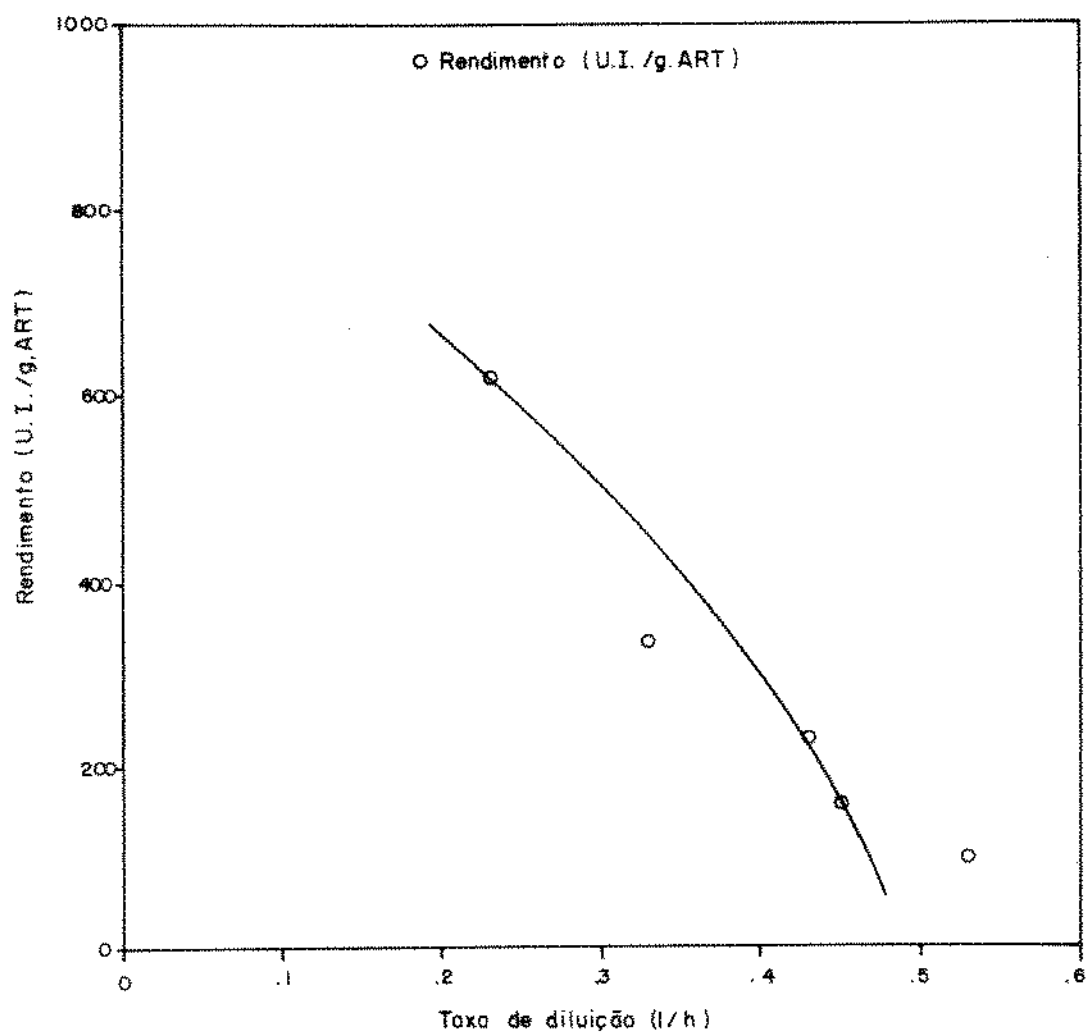


FIGURA 4.18 Rendimento em função da taxa de diluição.

4.3.4 - Experimento utilizando concentração de melaço 140,0 g/l.

Nessa concentração de substrato, nota-se que a atividade enzimática é alta em vazões baixas, decrescendo à medida que se aumenta a vazão (TABELA 4.16 e FIGURA 4.19).

Verifica-se também que à medida que a atividade enzimática decresce, ocorre um acúmulo de açúcar no meio (TABELA 4.16 e FIGURA 4.20).

A produtividade alcança um valor de 3,98 UI/ml.h, para uma taxa de diluição de $0,193 \text{ h}^{-1}$, decrescendo em seguida, à medida que o acúmulo de açúcar no meio aumenta (FIGURA 4.20).

Observa-se através da FIGURA 4.21, que o maior rendimento obtido nesse experimento foi para uma taxa de diluição de $0,193 \text{ h}^{-1}$.

Após análises das figuras e tabelas, pode-se observar que a concentração onde se obteve maior produtividade e melhor rendimento foi de 30,0 g/l.

TABELA 4.15 Fermentação utilizando concentração de melaço 140,0 g/l

Reator	Vazao(ml/h)	D(1/h)	M.S.(g/l)	ART(h/l)	At(U,l/ml)	Pr(Ul/mlh)	Y(U,l/gART)
1	59,96	0,099	11,14	1,84	30,67		
2	119,90	0,193	10,85	1,83	32,87	3,98	362,24
1	101,10	0,168	9,62	18,48	14,81		
2	202,20	0,326	10,70	22,43	16,46	3,36	231,54
1	104,85	0,174	9,27	30,08	12,51		
2	209,70	0,338	10,60	26,16	14,16	3,0	210,21
1	125,00	0,208	8,30	31,46	9,06		
2	250,00	0,403	9,20	30,52	9,16	2,31	145,87

$$V_{\text{reator1}} = 400 \text{ ml}$$

$$V_{\text{reator2}} = 530 \text{ ml}$$

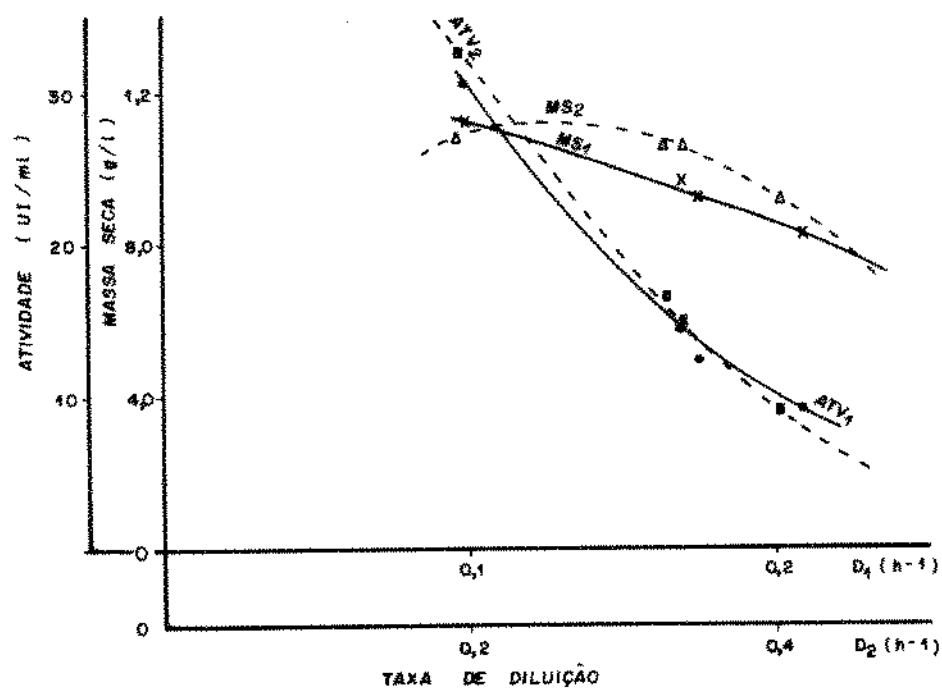


FIGURA 4.19 Atividade enzimática e massa seca em função da taxa de diluição.

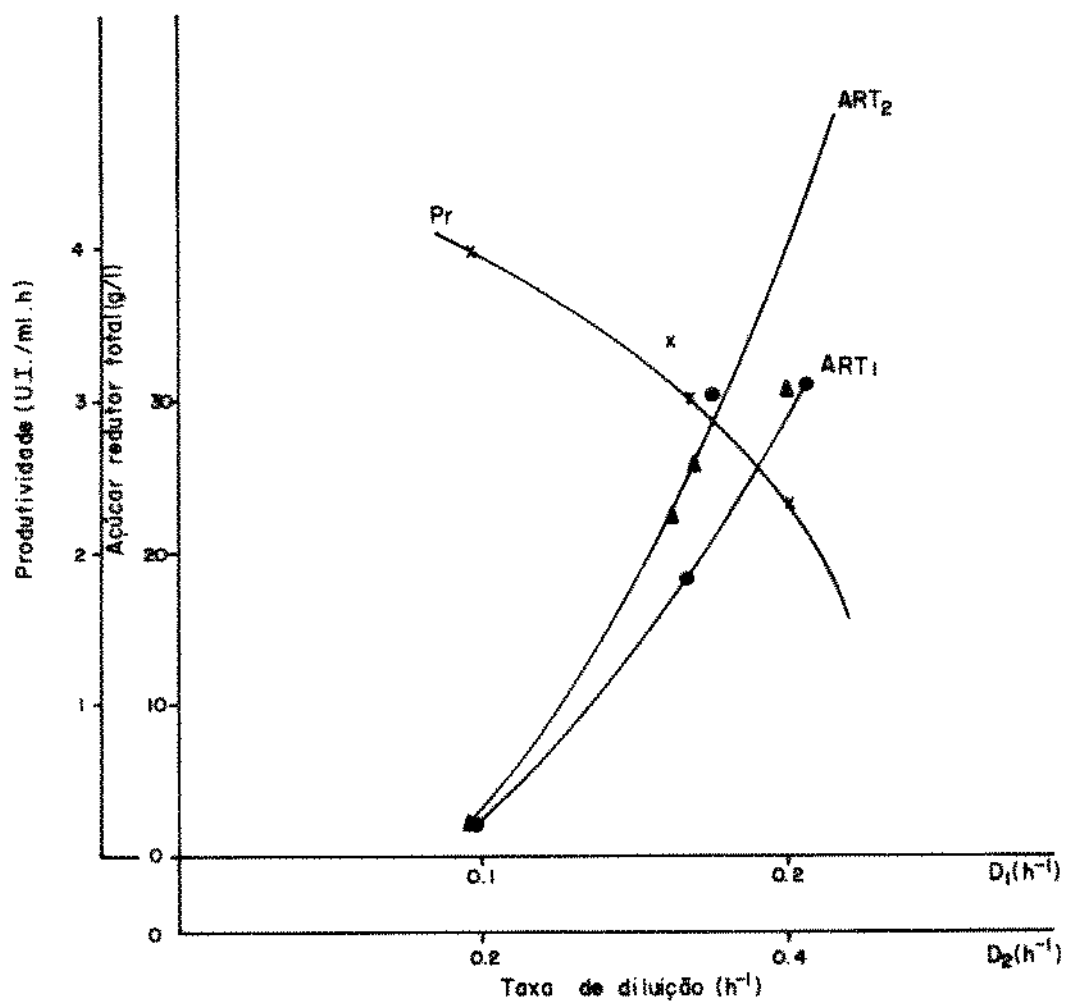


FIGURA 4.20 Produtividade e açúcar redutor total em função da taxa de diluição.

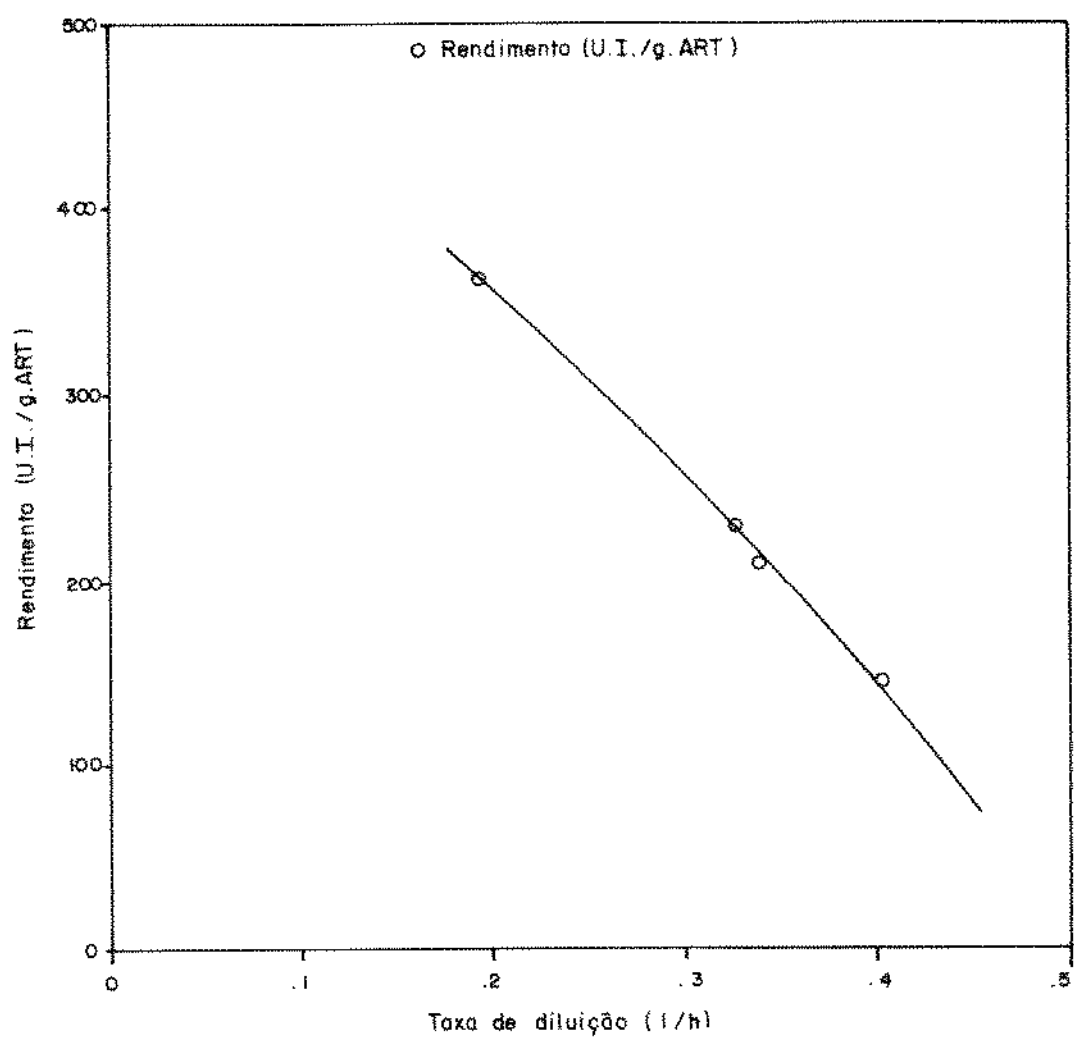


FIGURA 4.21 Rendimento em função da taxa de diluição.

4.3.5 - Comparação do efeito da concentração do substrato na produção da enzima.

Com objetivo de se analisar o efeito da concentração do substrato na produção da enzima, em reator contínuo duplo estágio, reuniu-se em gráficos, a atividade enzimática, a produtividade e o rendimento em função da taxa de diluição.

Analisando-se as FIGURAS 4.22, 4.23 e 4.24 pode-se observar que à medida que se aumenta a concentração do substrato, tem-se um decréscimo na atividade e rendimento, e que estes decrescem à medida que se aumenta a taxa de diluição, para uma mesma concentração de substrato.

Em termos de rendimento e produtividade o processo é mais favorecido para a concentração de 30,0 g/l, entre todos estudados. Obteve-se um rendimento máximo de 1749,6 UI/g Art e uma produtividade máxima de 5,30 UI/ml.h para uma taxa de diluição de aproximadamente $0,3 \text{ h}^{-1}$.

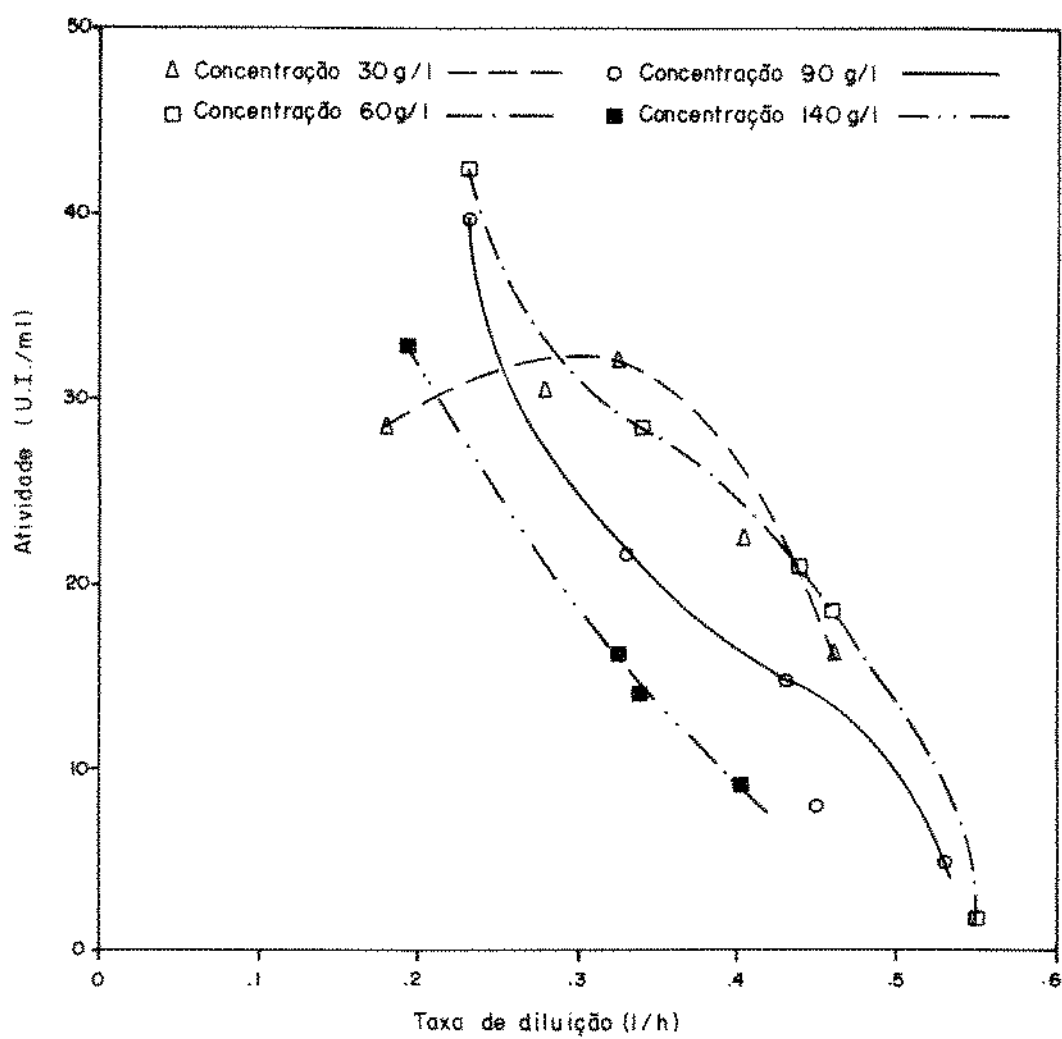


FIGURA 4.22 Fermentação em reator contínuo duplo estágio, atividade em função da taxa de diluição.

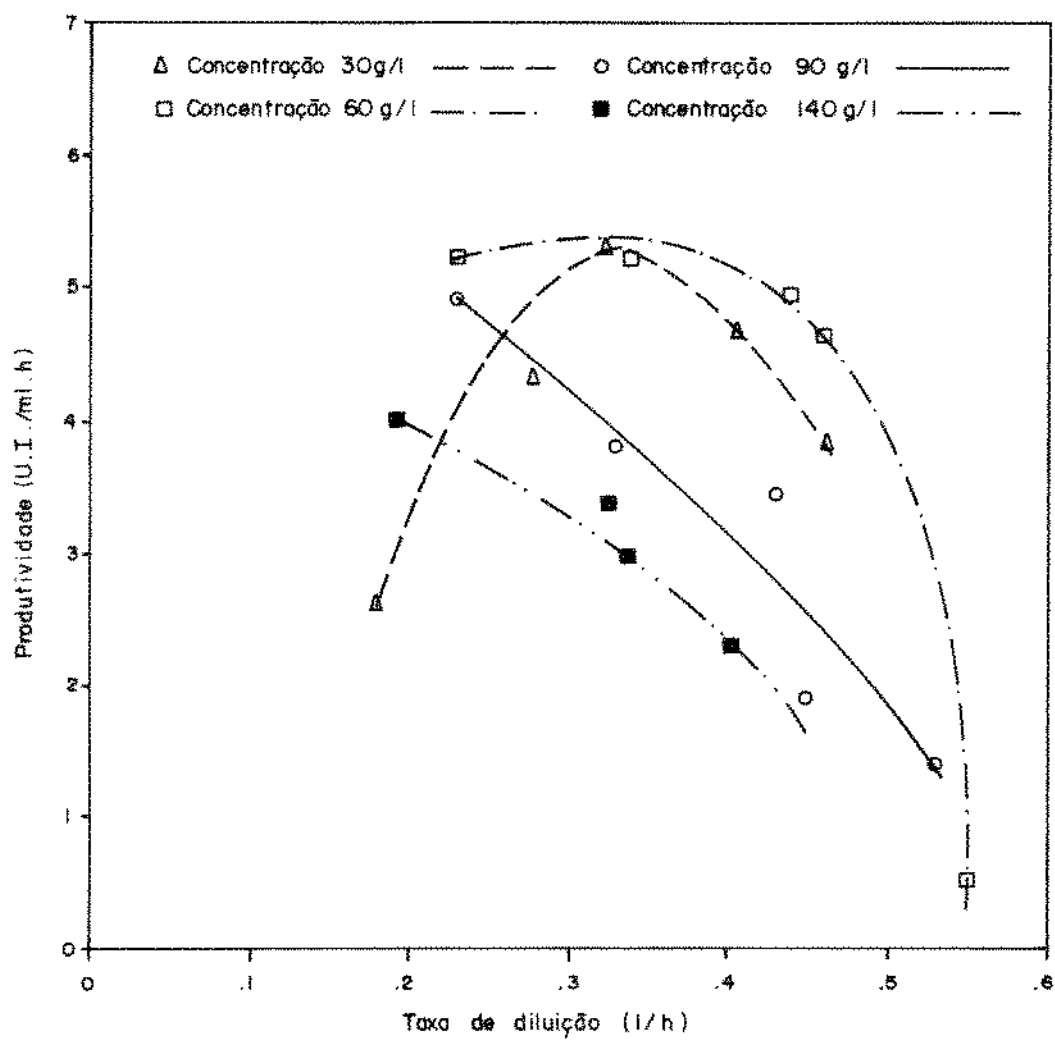


FIGURA 4.23 Fermentação em reator contínuo duplo estágio, produtividade em função da taxa de diluição.

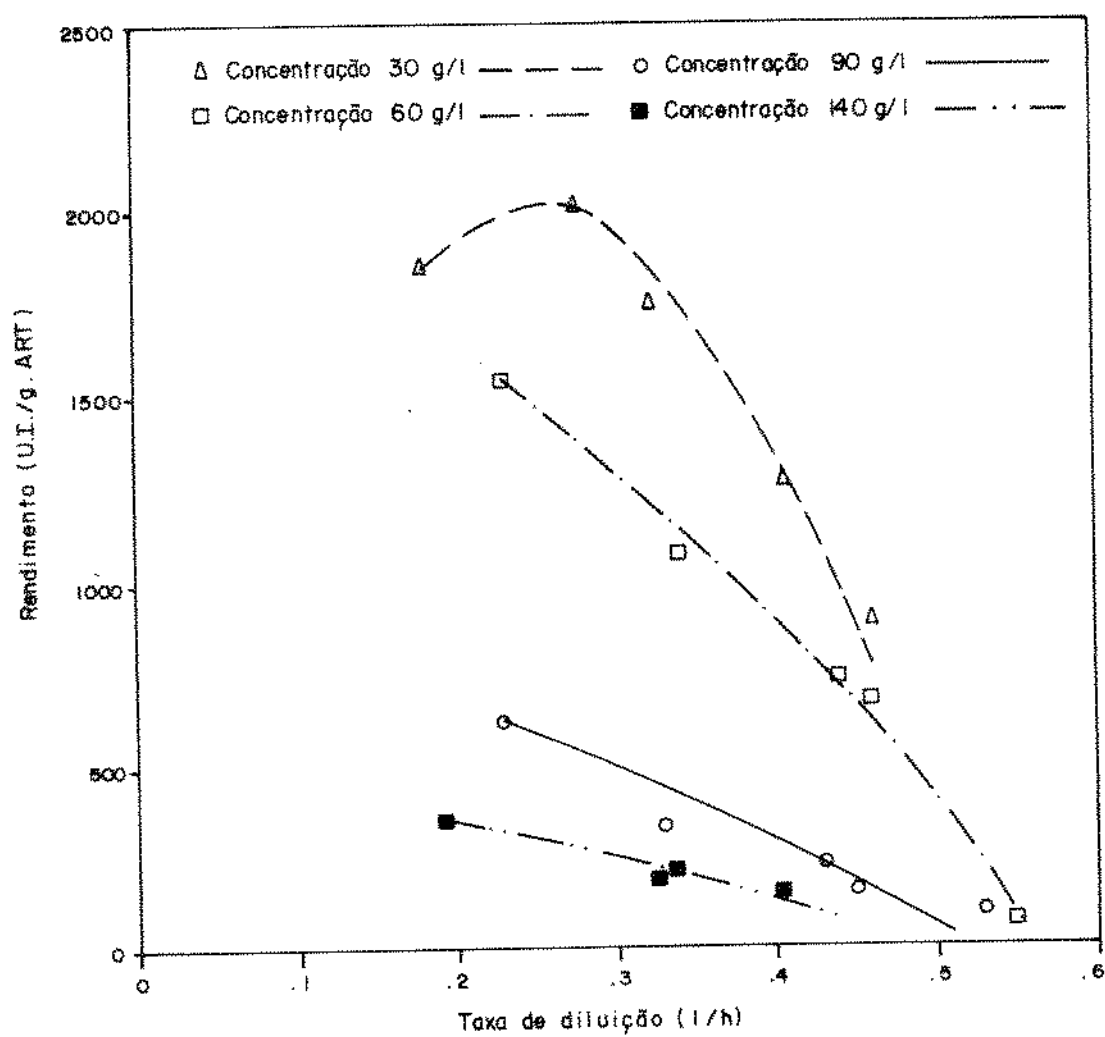


FIGURA 4.24 Fermentação em reator contínuo duplo estágio, rendimento em função da taxa de diluição.

4.4 - Fermentação em reator contínuo com células imobilizadas.

4.4.1 - Estudo do comportamento do reator.

Após a montagem do reator, conforme FIGURA 3.5, procurou-se verificar se o sistema se comportava como um reator de mistura. Para tal, usou-se o procedimento de passar um traçador no sistema, em forma de degrau, conforme item 3.1.15, que consistia de uma solução de sacarose 10 % .

Os resultados de análise do produto são apresentados na TABELA 4.16.

TABELA 4.16 Concentração de sacarose na saída do reator, em função do tempo.

Tempo (min.)	Concentração (°Brix)	$\ln \frac{S_0 - S}{S_0}$
5	0.4	-0.04984
10	1.0	-0.11247
15	1.8	-0.21256
20	2.3	-0.28061
25	2.9	-0.36891
30	3.4	-0.44895
35	4.0	-0.55491
40	4.4	-0.63127
45	4.9	-0.73669
50	5.2	-0.80562
55	5.6	-0.90570
60	5.7	-0.93297
65	5.9	-0.98794
70	6.3	-1.10991
75	6.6	-1.21109
80	7.0	-1.36524
85	7.1	-1.40780

Foi obtido o valor de 57,8 min., para o tempo de residência experimental, a partir da inclinação da reta mostrada na FIGURA 4.25. Por outro lado, o tempo de residência teórico,

através da relação volume do reator/vazão de alimentação, foi igual a 58,7 min. Verificou-se, portanto, que os tempos de residência são muito semelhantes, com um desvio de 1,56 % . Desta forma pode-se considerar que o reator utilizado se comporta como um reator de mistura.

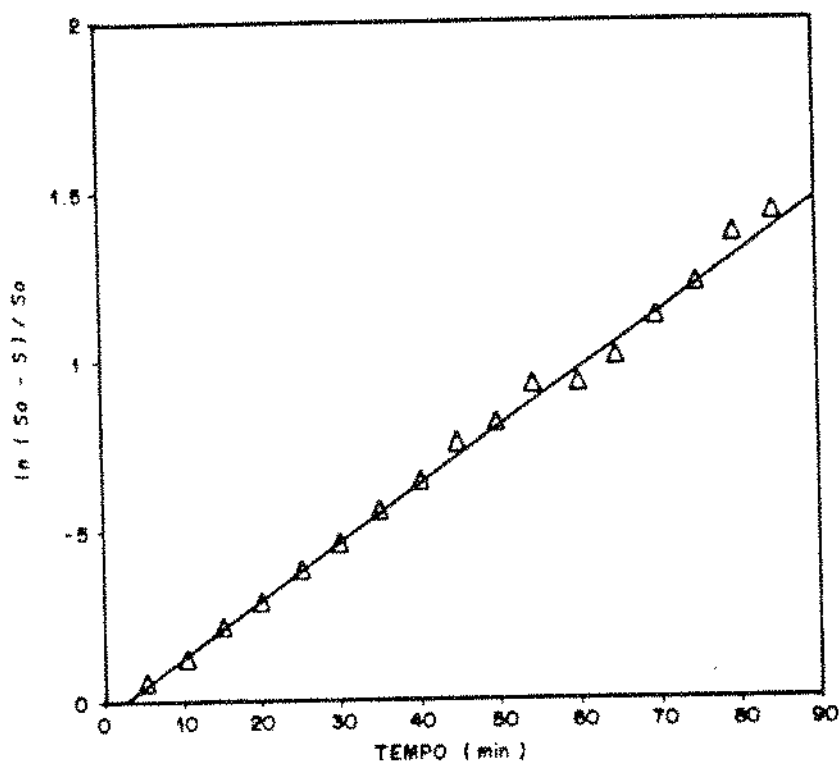


FIGURA 4.25 Tempo de residência experimental

4.4.2 - Quantidade de células imobilizadas no suporte.

Dos métodos existentes para se obter uma alta concentração celular, verifica-se que a imobilização celular, vem obtendo vantagens em relação aos demais métodos.

Entre os métodos de imobilização, o uso de "B.S.P." (Biomass Support Particles), traz vantagens em relação aos demais, por permitir que a célula se imobilize no suporte, como consequência de crescimento. Verifica-se em sistemas "B.S.Ps", que um pequeno período de cultura em batelada, é precedido por uma operação contínua, sendo que nenhuma preparação de células ou partículas é necessário.

O procedimento aqui praticado, não sofre os problemas que a técnica de imobilização "ativa" permite aparecer, tais como: toxicidade de reagentes químicos, vulnerabilidade durante a manipulação, além de permitir que gases que passem a ser produzidos no interior do suporte escapem livres, sem comprometer a estrutura do mesmo.

Também deve-se ressaltar, o baixo custo, quando comparada com algumas técnicas de imobilização "ativa", além do suporte possuir um alto grau de interconecção entre os poros e de possuir uma gama de tamanhos de poros, que vai de 10 ppi (poros por polegada linear) a 80 ppi.

No presente trabalho, a determinação de massa seca foi efetuada após a retirada do meio de cultura do reator. Os cubos de poliuretano foram então retirados e lavados, para a retirada da massa celular imobilizada. A massa celular foi seca

em estufa à vácuo a 60°C. Sabendo-se inicialmente o peso do suporte, verificou-se a quantidade de células imobilizadas. Neste caso conseguiu-se imobilizar 19,05 g de levedura em 10,72 g de suporte, ou seja, 1,77 g de levedura / g de suporte. Por outro lado sendo o volume útil do reator de 376,99 cm³, conseguiu-se obter uma concentração celular de 50,53 g/l. Verifica-se que outros autores, trabalhando com o mesmo tipo de suporte, mas utilizando microrganismo *Zymomonas mobilis* para a produção de etanol conseguiram obter uma concentração celular de 56 g/l (4), portanto próxima a concentração conseguida neste trabalho.

Nakashima e colaboradores (92), estudando a produção de lipase intracelular por *Rhizopus chinensis* imobilizado em cubos de poliuretano, verificaram que a quantidade de cubos necessários para a completa imobilização vai depender do tamanho dos poros. A concentração celular obtida pelos autores foi de 3 a 7 mg de célula para cada cubo de 6 mm.

Neste trabalho foram utilizados cubos de 5 mm cuja densidade era de 37,5 ± 1,5 Kg/m³ e cuja porosidade variava entre 14 a 18 ppi, sendo que outros autores (8, 16), utilizaram cubos de poliuretano de 6 mm, com 30, 45, e 60 ppi, obtendo uma concentração celular de levedura maior à medida que crescia o número de poros por polegada linear.

4.4.3 - Fermentação

Os experimentos foram realizados no reator descrito no item 3.1.14, cujo esquema se encontra na FIGURA 4.26.

4.4.3.1 - Fermentação utilizando concentração de melaço 20,0 g/l.

Operou-se inicialmente o fermentador com um meio de cultura (item 3.1.6), contendo 20,0 g/l de melaço. A vazão de alimentação inicial foi de 21 ml/h, com uma taxa de diluição de $0,035 \text{ h}^{-1}$. Deixou-se o fermentador operar nessa vazão por sete dias ; quando começou-se então a retirada de amostras. A cada mudança da vazão, esperava-se três tempo de residência para retirada de amostra. No total foram utilizadas cinco vazões diferentes, chegando-se a vazão máxima de 88,68 ml/h, correspondendo a uma taxa de diluição de $0,148 \text{ h}^{-1}$.

Observando-se a TABELA 4.17 e FIGURA 4.26, verifica-se que a máxima atividade foi atingida para uma taxa de diluição de $0,038 \text{ h}^{-1}$. O aumento da vazão entretanto provoca um decréscimo na atividade assim como na massa seca.

Através da FIGURA 4.27, pode-se notar que à medida que a atividade enzimática e a massa seca decrescem ocorre um aumento de açúcar total, e que o mínimo de açúcar no meio coincide com o máximo de atividade.

A FIGURA 4.28, mostra que tanto a produtividade como o rendimento atingem um máximo por volta de $0,038 \text{ h}^{-1}$, para em seguida decrescerem rapidamente à medida que se aumenta a vazão de alimentação.

TABELA 4.17 Fermentação utilizando concentração de melaço 20,0 g/l.

Vazão(ml/h)	D(1/h)	N.S.(g/l)	ART(g/l)	Atv(UI/ml)	Pr(UI/mlh)	Y(U.I/gART)
21,00	0,035	15,50	1,23	47,10	2,62	3226,03
23,00	0,038	12,22	0,92	55,46	3,38	3719,65
57,14	0,095	3,17	1,58	8,37	1,27	587,37
77,74	0,129	1,97	3,28	4,96	1,02	395,22
88,68	0,148	0,63	4,33	1,80	0,42	156,52

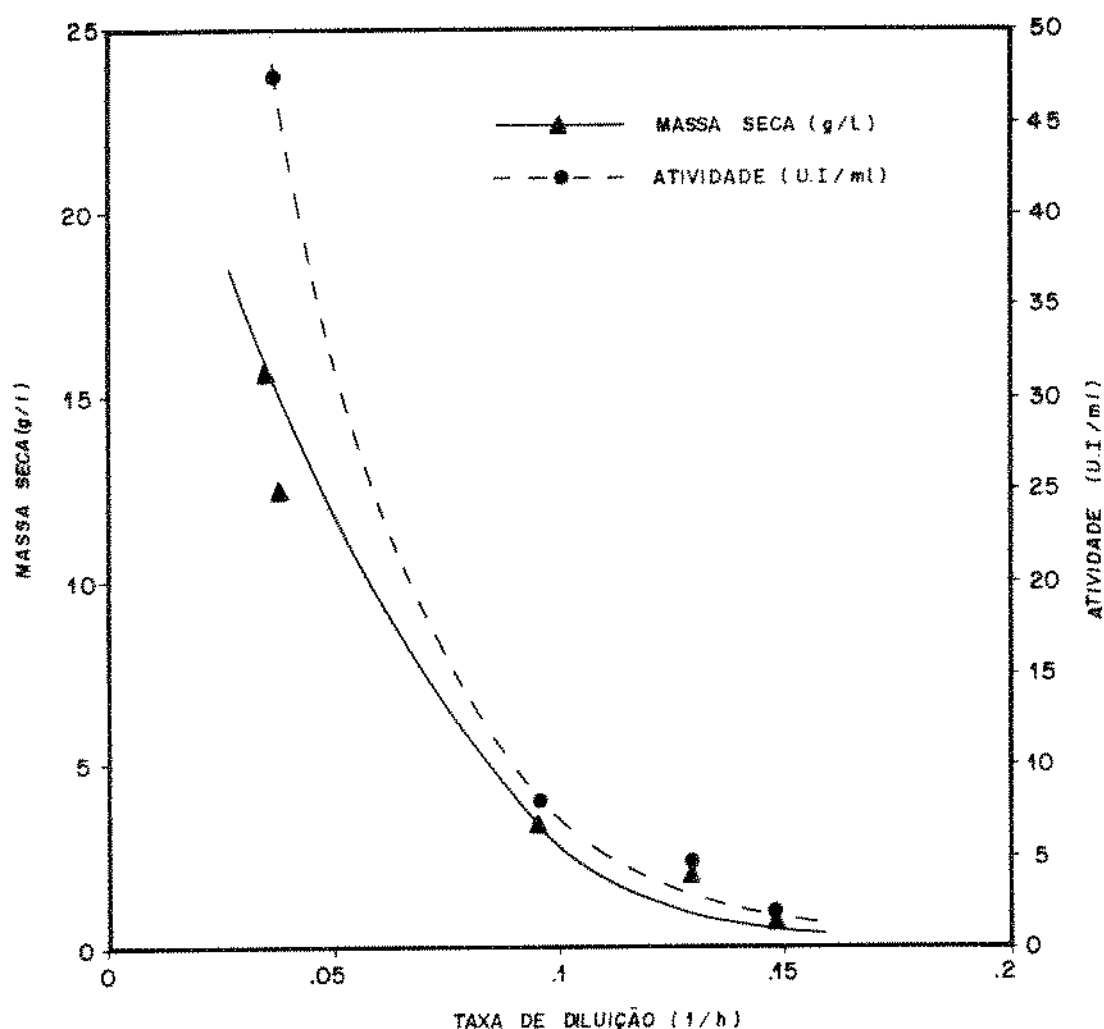


FIGURA 4.26 Fermentação utilizando concentração de melaço 20,0 g/l, massa seca e atividade em função da taxa de diluição.

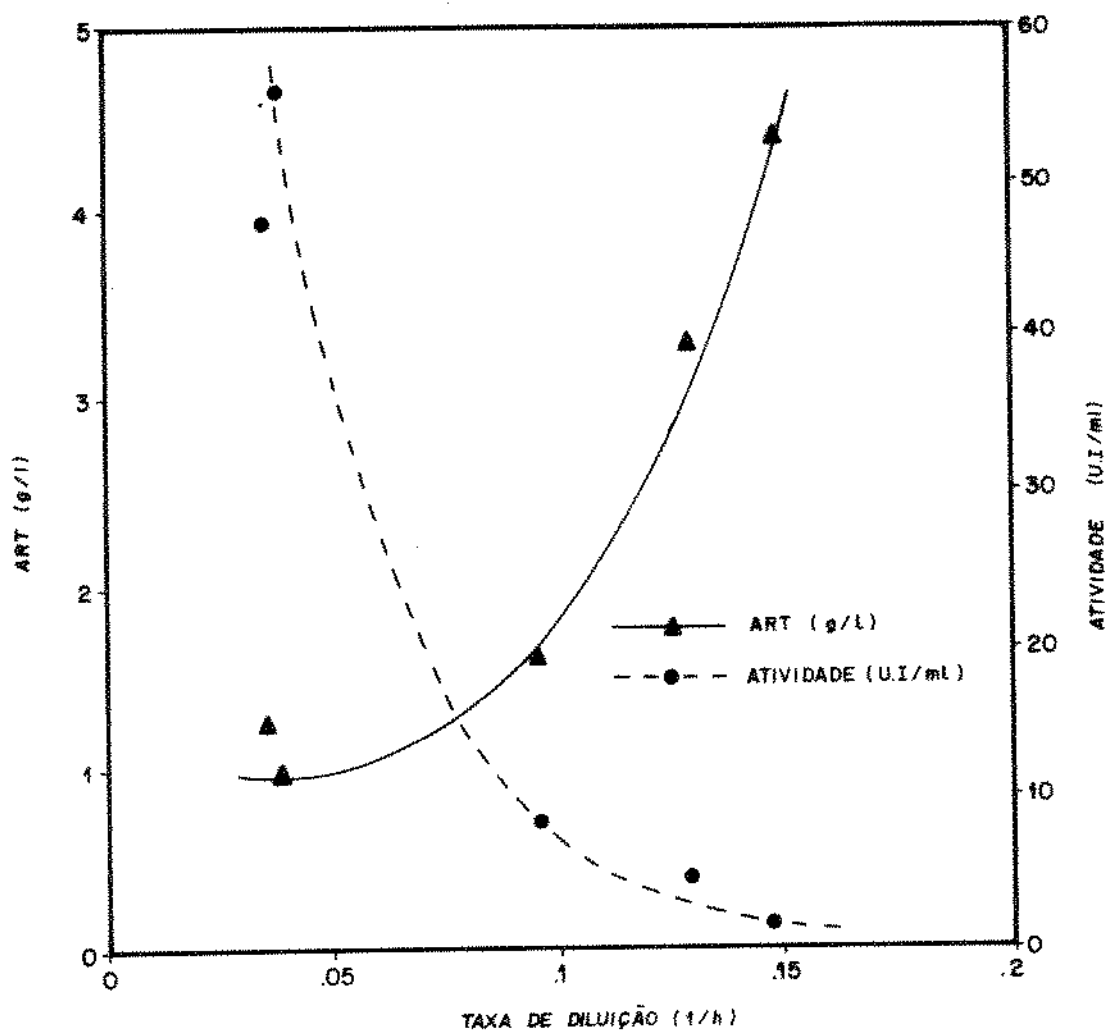


FIGURA 4.27 Fermentação utilizando concentração de melaço 20,0 g/l, açúcar total e atividade em função da taxa de diluição.

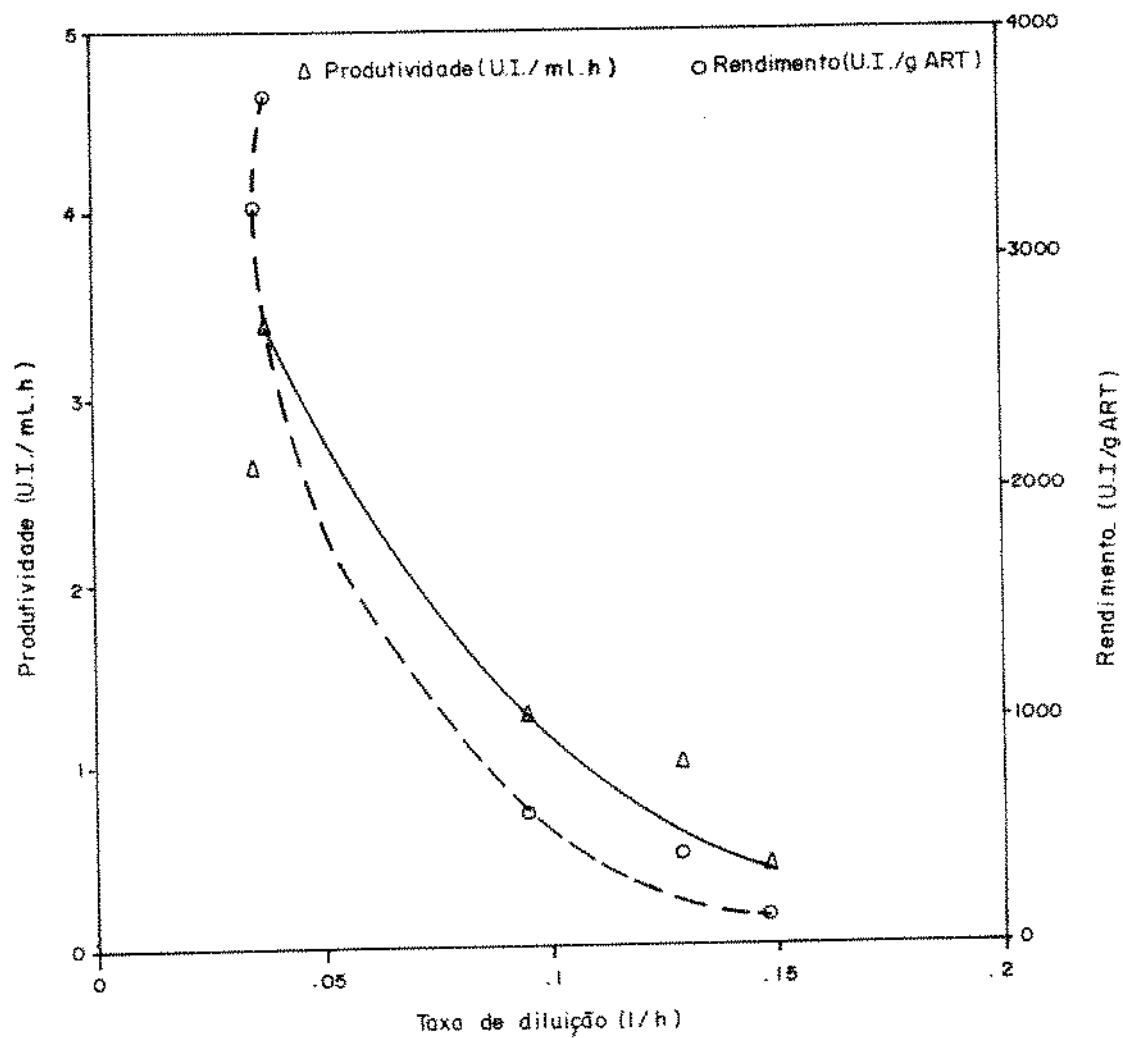


FIGURA 4.28 Fermentação utilizando concentração de melaço 20,0 g/l, produtividade e rendimento em função da taxa de diluição.

4.4.3.2 - Experimento utilizando concentração de melaço 30,0 g/l.

Para esse experimento variou-se a vazão de alimentação de 22,26 ml/h até 139,0 ml/h, estudando-se a influência de diferentes vazões no reator de células imobilizadas.

Como pode-se verificar através da TABELA 4.19 e da FIGURA 4.29, conseguiu-se obter uma alta atividade enzimática (97,27 U.I/ml) para uma taxa de diluição de $0,045 \text{ h}^{-1}$ e que à medida que se aumenta a vazão de alimentação, tanto a atividade enzimática, quanto a concentração celular decrescem.

Analisando a FIGURA 4.30, pode-se notar que para essa concentração de substrato, o açúcar total sofre no início um pequeno aumento, à medida que a atividade decresce, para depois praticamente permanecer constante.

A FIGURA 4.31 nos mostra que tanto o rendimento como a produtividade decrescem na medida em que se aumenta a vazão de alimentação.

TABELA 4.19 Fermentação utilizando concentração de melaço 30,0 g/l.

Vazão(ml/h)	D(1/h)	M.S.(g/l)	ART(g/l)	Atv(UI/ml)	Pr(UI/mlh)	Y(U.I/gART)
22,26	0,045	17,80	0,235	97,27	5,74	5322,57
36,05	0,064	14,54	0,82	58,66	5,61	3315,99
56,37	0,100	8,25	0,85	30,16	4,51	1707,81
93,40	0,18	6,82	1,06	14,98	3,95	858,45
127,80	0,23	6,35	0,76	8,9	3,02	501,41
139,00	0,25	4,19	0,85	8,1	2,98	458,66

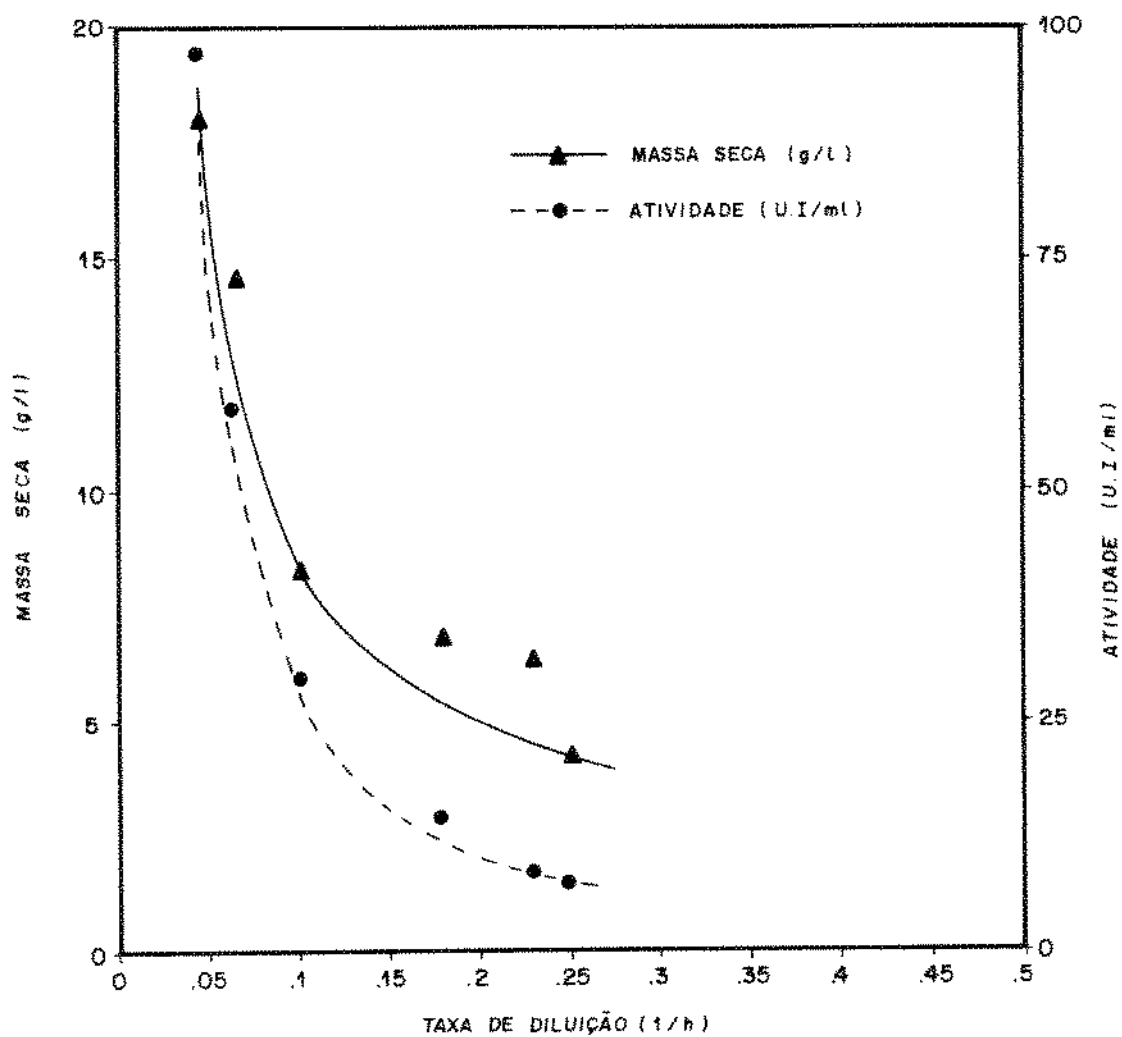


FIGURA 4.29 Fermentação utilizando concentração de melaço 30,0 g/l, massa seca e atividade em função da taxa de diluição.

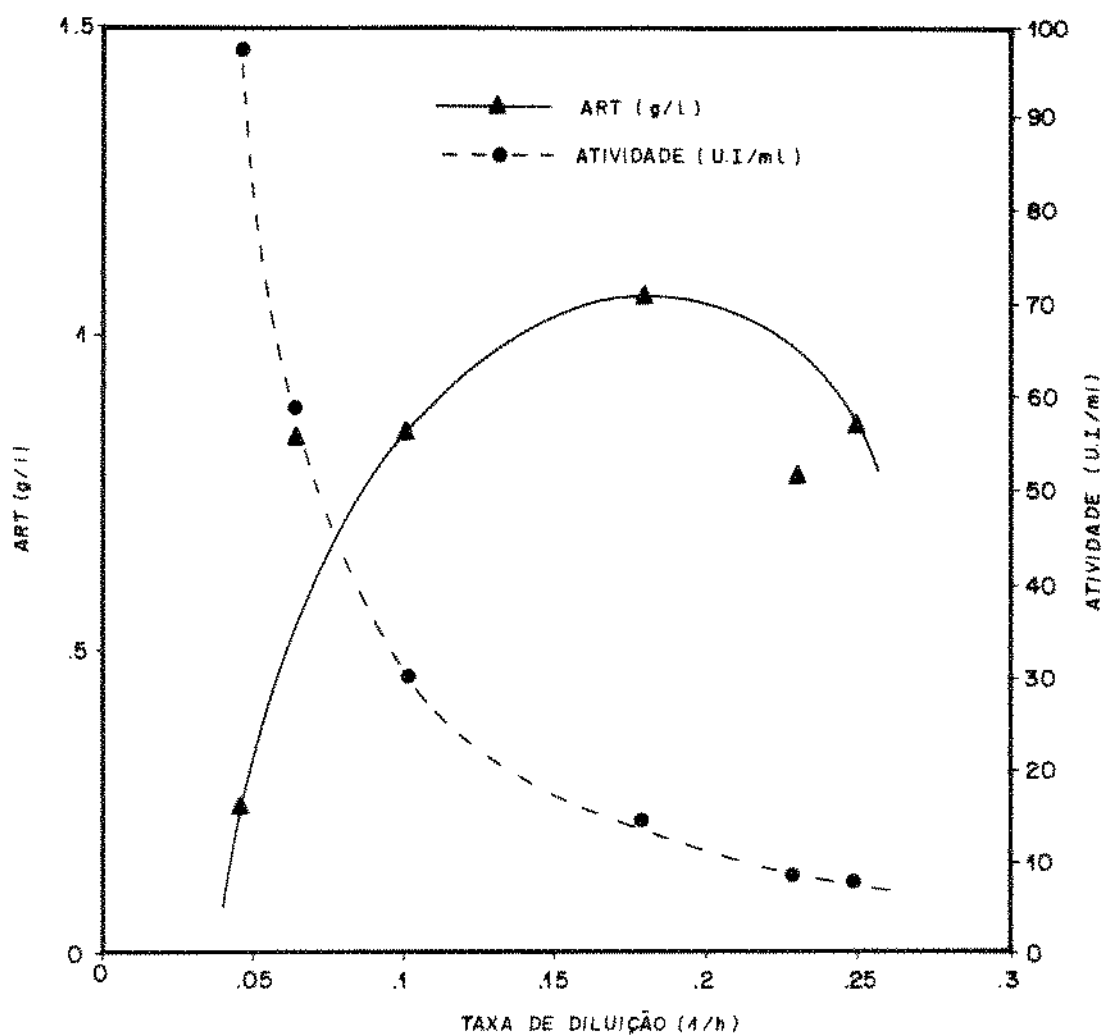


FIGURA 4.30 Fermentação utilizando concentração de melaço 30,0 g/l, açúcar total e atividade em função da taxa de diluição.

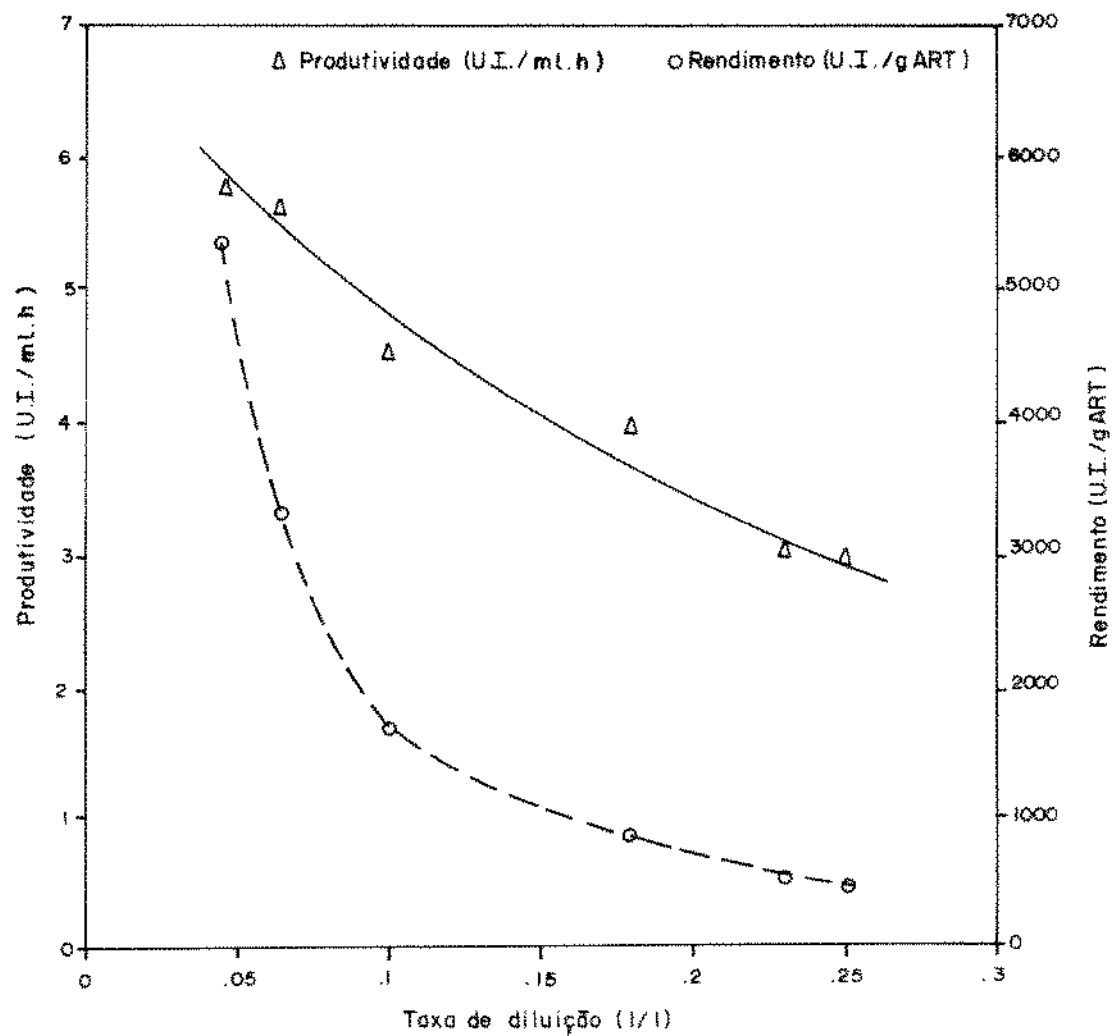


FIGURA 4.31 Fermentação utilizando concentração de melaço 30,0 g/l, produtividade e rendimento em função da taxa de diluição.

Observando a TABELA 4.20 e FIGURA 4.32, nota-se que altas atividades enzimáticas (45,65, 41,52 U.I./ml) são obtidas para as mais baixas taxas de diluição, verificando-se um decréscimo à medida que a vazão de alimentação aumenta.

A FIGURA 4.33 mostra que o açúcar total é mínimo quando a atividade é alta, para acumular no meio de fermentação à medida que a atividade e massa seca decrescem.

Analisando a FIGURA 4.34 verifica-se o comportamento da produtividade e rendimento em relação a taxa de diluição, observando que ambos decrescem quando ocorre aumento na vazão de alimentação.

TABELA 4.20 Fermentação utilizando concentração de melaço 60,0 g/l.

Vazao(ml/h)	D(1/h)	M. S. (g/l)	ART(g/l)	Atv(UI/ml)	Pr(UI/mlh)	Y(U. l/gART)
19,30	0,04	12,44	0,789	45,65	2,34	1197,8
25,00	0,052	11,94	0,902	41,52	2,75	1092,75
40,00	0,083	8,41	1,50	29,05	3,08	776,73
93,00	0,193	4,19	1,79	12,88	3,20	347,07
110,27	0,23	4,63	2,76	7,26	2,12	206,60
132,00	0,27	4,39	5,41	6,50	2,27	194,08
140,60	0,29	4,04	5,73	6,09	2,6	103,6

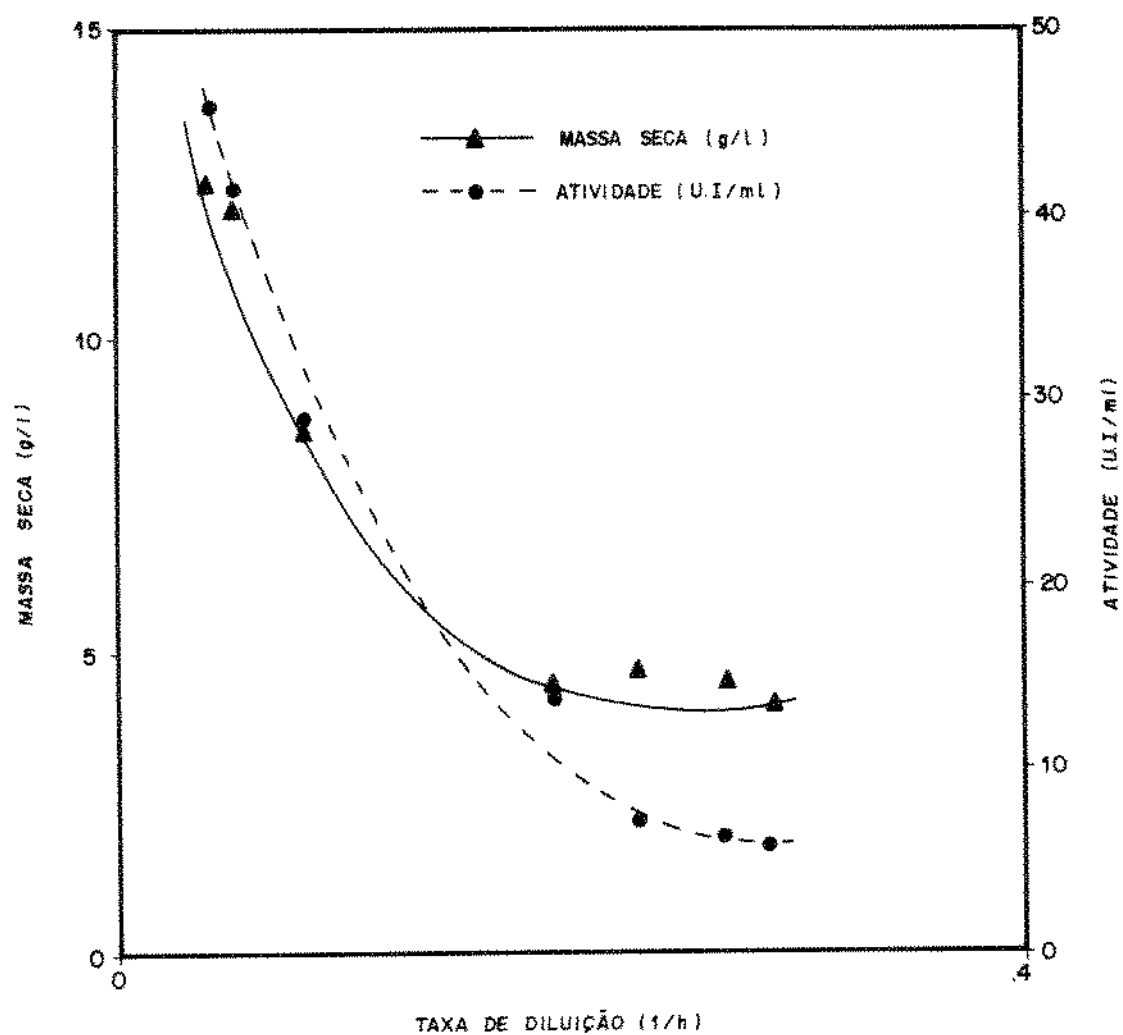


FIGURA 4.32 Fermentação utilizando concentração de melaço 60,0 g/l, massa seca e atividade em função da taxa de diluição.

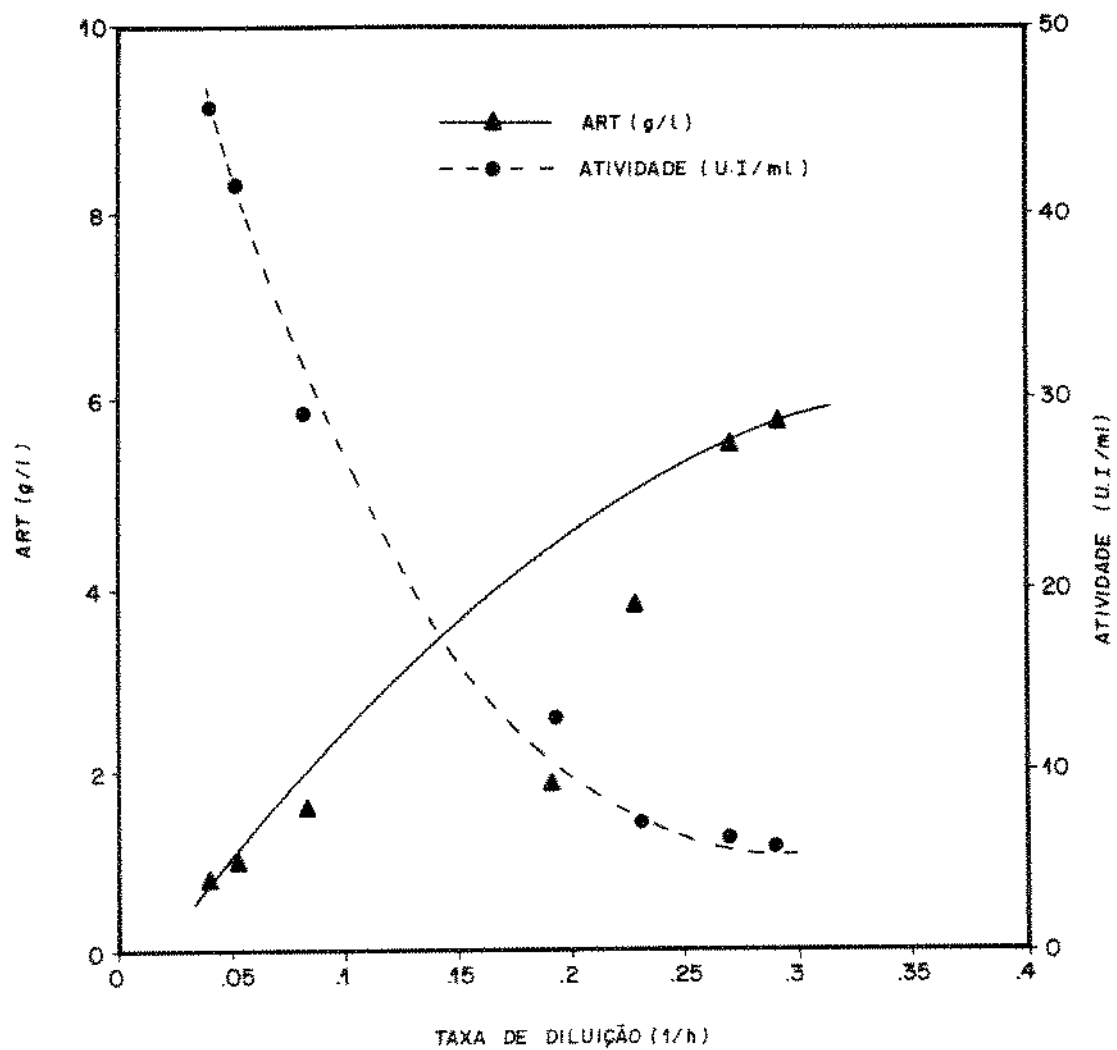


FIGURA 4.33 Fermentação utilizando concentração de melaço 60,0 g/l , açúcar total e atividade em função da taxa de diluição.

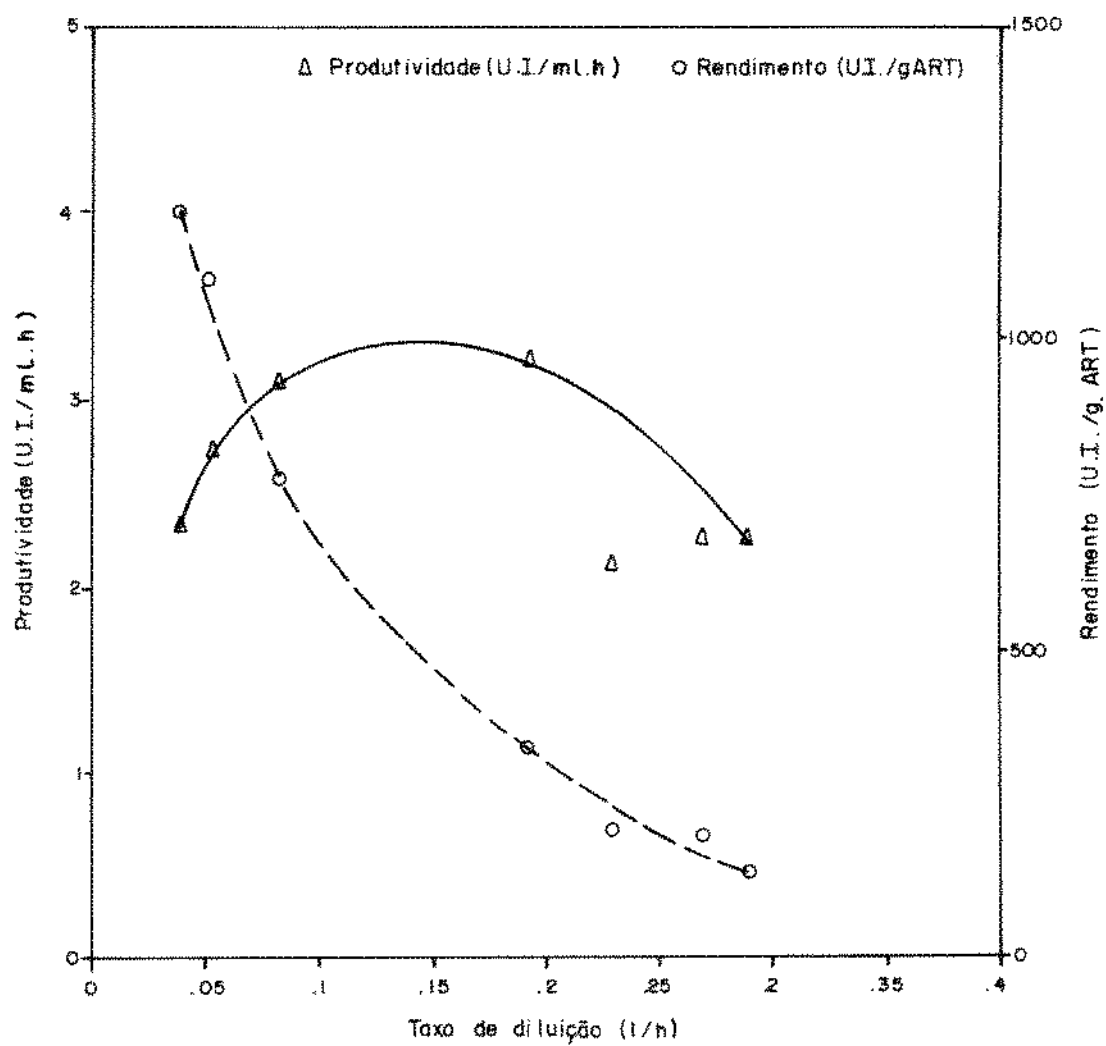


FIGURA 4.34 Fermentação utilizando concentração de melaço 60,0 g/l, produtividade e rendimento em função da taxa de diluição.

4.4.3.4 - Fermentação utilizando concentração de melaço 90,0 g/l.

Nesse experimento foram utilizados apenas quatro diferentes vazões, variando-se de 19,3 até 77,89 ml/h.

Através da TABELA 4.21 e da FIGURA 4.35 verifica-se que para taxa de diluição baixa ($0,04 \text{ h}^{-1}$) obtém-se alta atividade (47,78 U.I./ml) e alta concentração celular (24,35 g/l). No entanto uma pequena variação na vazão de alimentação, provoca um grande decréscimo tanto na atividade, como na concentração celular.

Também verifica-se através da FIGURA 4.36, que a concentração de açúcar no meio aumenta à medida que a atividade e massa seca decrescem.

O rendimento e a produtividade caem acentuadamente em relação ao aumento da taxa de diluição.

TABELA 4.21 Fermentação utilizando concentração de melaço 90,0 g/l.

Vazão(ml/h)	D(1/h)	M.S.(g/l)	ART(g/l)	Atv(UI/ml)	Pr(UI/mlh)	Y(U.I/gART)
19,00	0,04	24,35	0,563	47,78	2,40	724,63
38,25	0,079	2,12	39,97	7,80	0,79	294,00
51,66	0,10	0,63	49,69	2,09	0,29	124,33
77,89	0,16	0,60	56,68	1,41	0,29	143,21

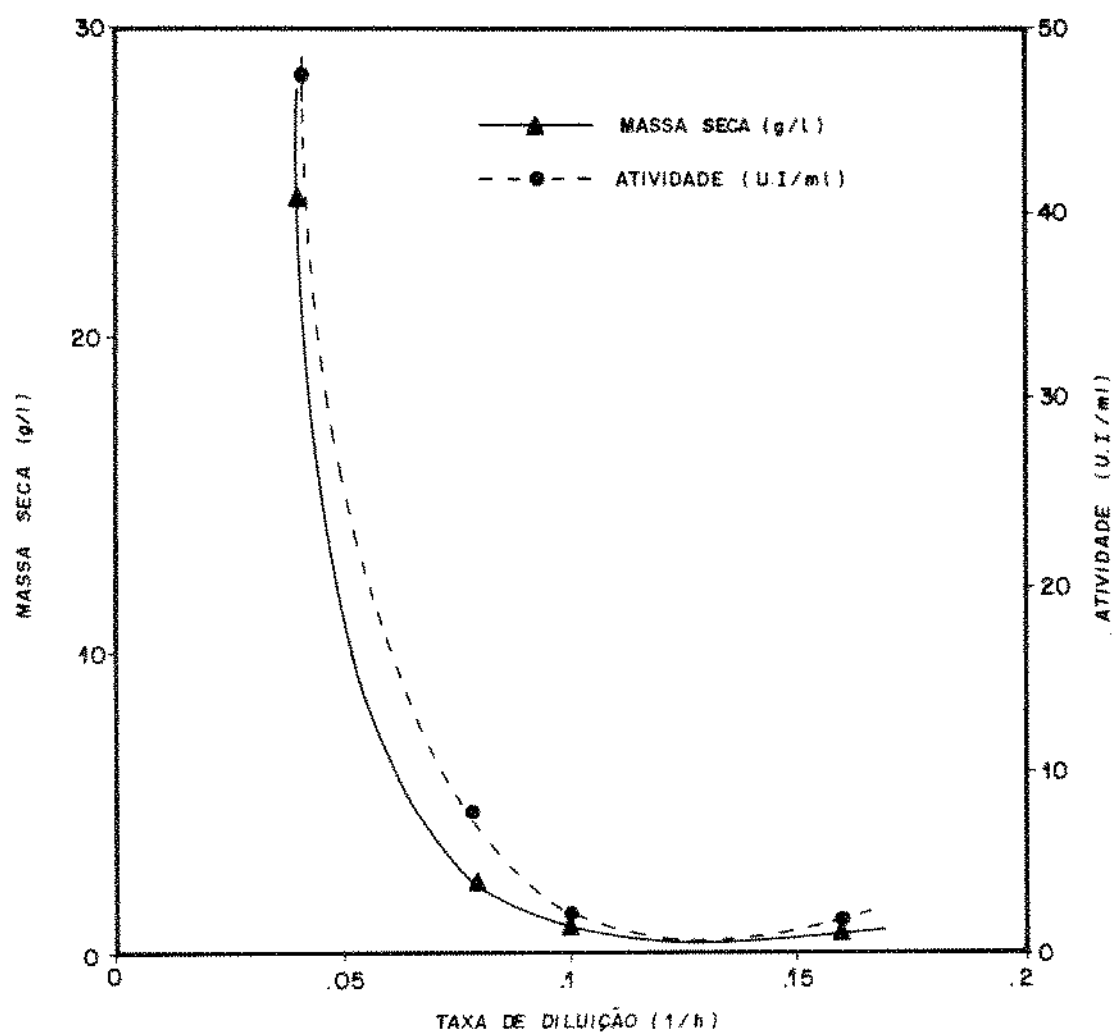


FIGURA 4.35 Fermentação utilizando concentração de melão 90,0 g/l, atividade e massa seca em função da taxa de diluição.

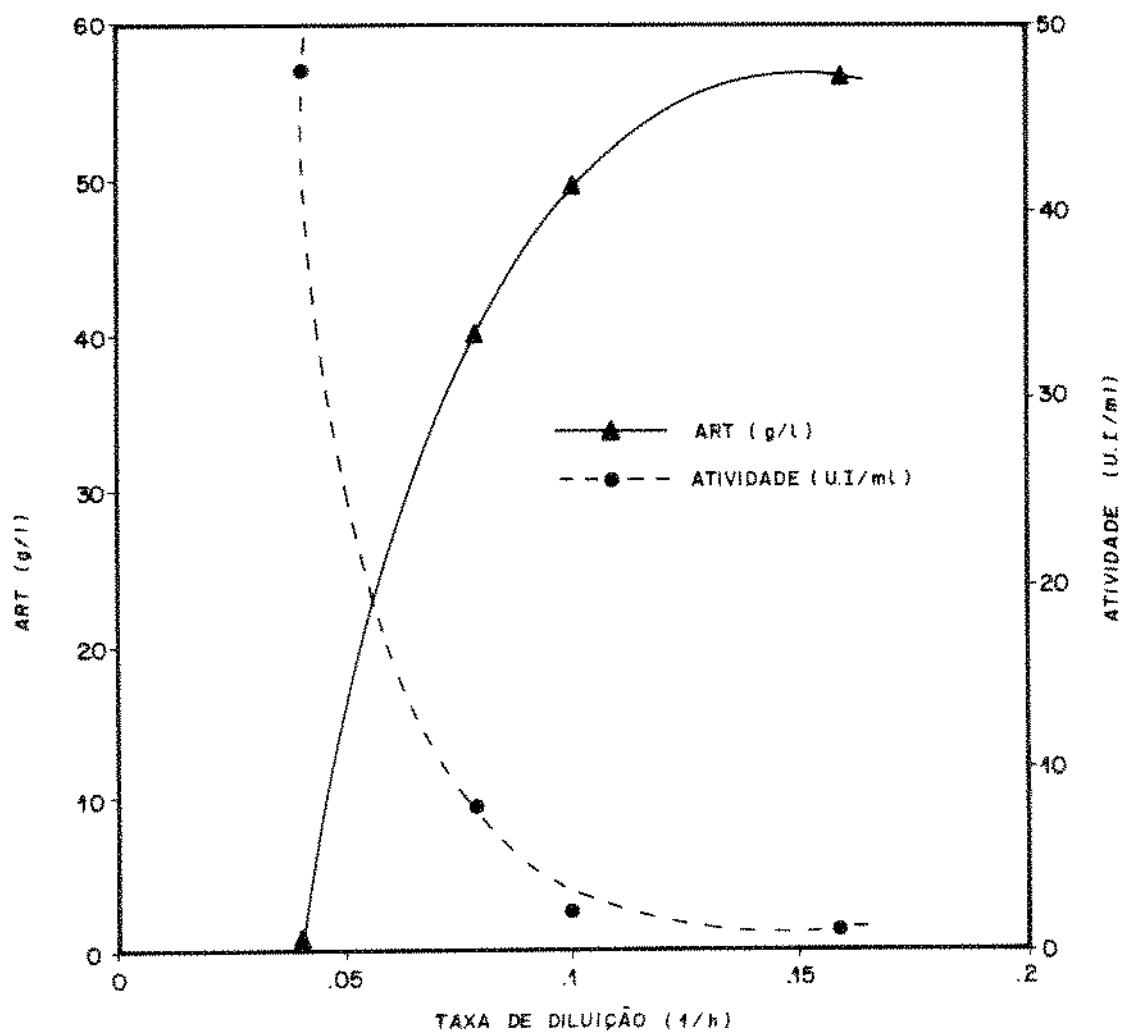


FIGURA 4.36 Fermentação utilizando concentração de melaço 90,0 g/l, açúcar total e atividade em função taxa de diluição.

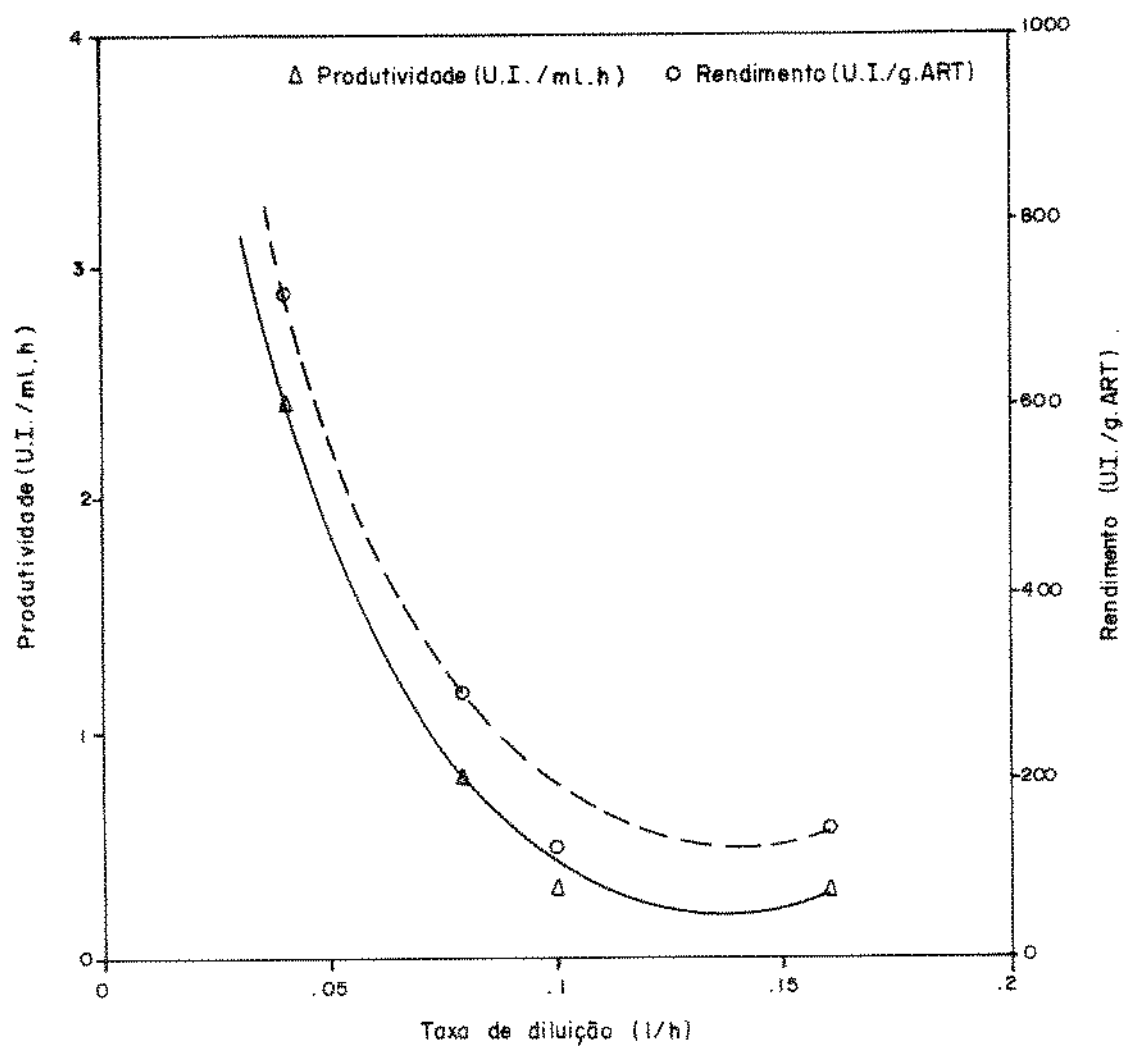


FIGURA 4.37 Fermentação utilizando concentração de melaço 90,0 g/l, produtividade e rendimento em função da taxa de diluição.

4.4.3.5 - Comparação do efeito da variação da concentração do substrato na produção da enzima.

Para melhor visualizar a influência da concentração do substrato na produção da enzima em reator contínuo com células imobilizadas, foram reunidos os dados, atividade, produtividade e rendimento nas concentrações estudadas, e graficou-se contra a taxa de diluição.

Os resultados são apresentados nas FIGURAS 4.38 , 4.39 e 4.40.

Das concentrações de melaço utilizadas, pode-se verificar que a de 30,0 g/l apresenta resultados melhores em relação as outras. Nota-se que para a taxa de diluição $0,045 \text{ h}^{-1}$ foi obtido uma atividade enzimática de 97,27 U.I/ml, permitindo uma produtividade de 5,74 U.I/ml.h e um rendimento de 5322,57 U.I/h, superando assim outros processos estudados.

As figuras mostram ainda, que ao aumentar-se a concentração de melaço e taxa de diluição, tem-se um declínio nos parâmetros estudados.

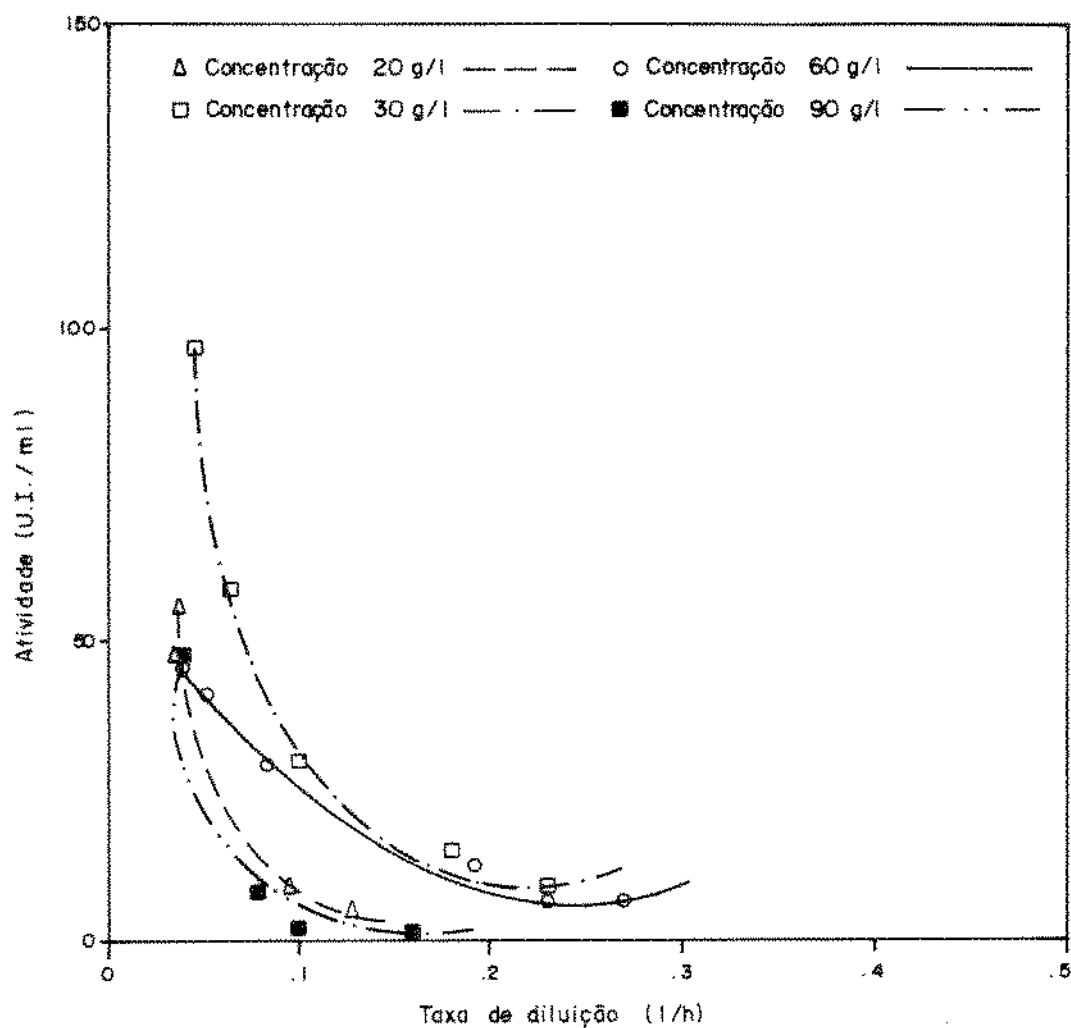


FIGURA 4.38 Fermentação contínua com células imobilizadas, atividade em função da taxa de diluição.

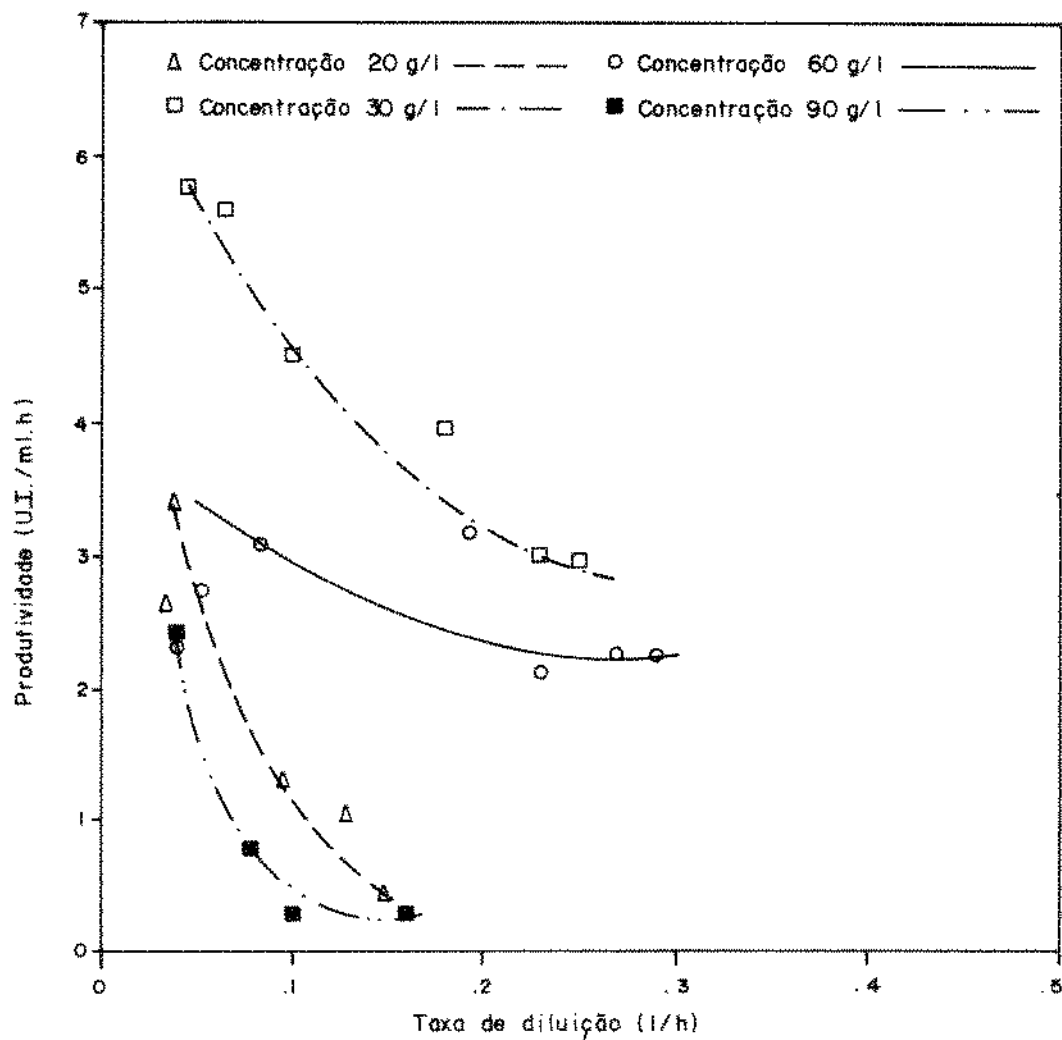


FIGURA 4.39 Fermentação contínua com células imobilizadas, produtividade em função da taxa de diluição.

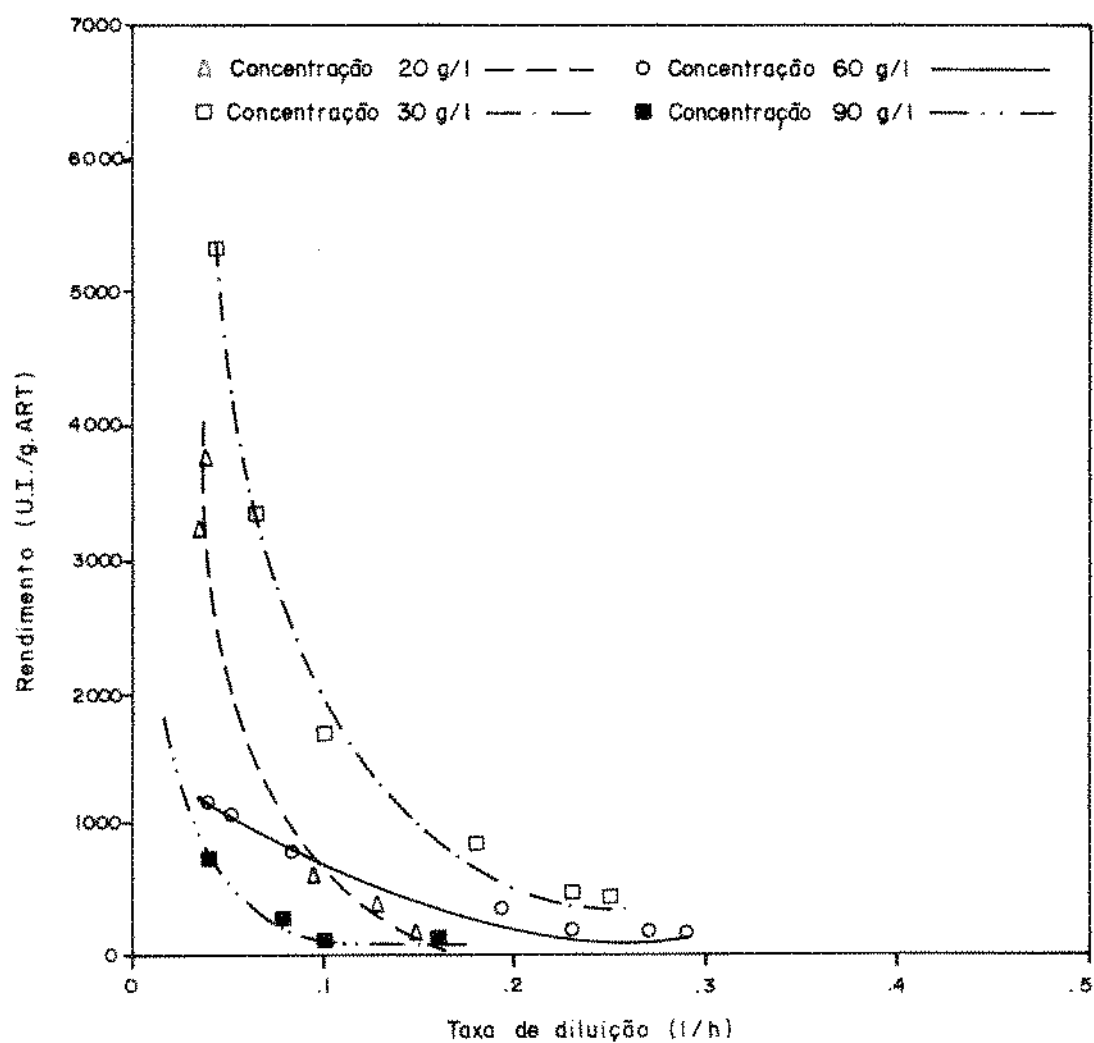


FIGURA 4.40 Fermentação contínua com células imobilizadas, rendimento em função da taxa diluição.

4.4.3.6 Comparação geral dos processos de fermentação utilizados.

A TABELA 4.21 reúne os melhores resultados obtidos para cada procedimento de fermentação executado, e já explorado em detalhes nas páginas precedentes.

Os dados mostram a vantagem inegável do processo com células imobilizadas sobre os demais, fornecendo uma maior produtividade (5,74 U.I./ml.h) e um rendimento muito superior aos demais (5322,57 U.I./g ART) .

Este resultado é sem dúvida muito encorajador e pode significar uma diminuição drástica nos custos de produção desta enzima, se comparado com o processo tradicional utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

TABELA 4.21 Valores máximos obtidos nos processos

Processo	Atividade (U.I./ml)	Produtividade (U.I./ml.h)	Rendimento (U.I./gART)
Batelada simples	9,17	0,19	424,54
Batelada alimentada	11,00	1,3	883,66
Contínuo em reator duplo estágio	32,00	5,90	1749,6
Contínuo com células imobilizadas	97,90	5,74	5322,57

4.5 - Influência do substrato na produção da enzima invertase.

Nos capítulos precedentes falou-se repetidas vezes sobre o problema de inibição da produção da invertase por *Kluyveromyces bulgaricus* em presença de excesso de substrato. Para melhor se aprofundar neste fenômeno, passou-se a estudar a

influência da concentração do substrato na cinética de crescimento do microrganismo e de produção da enzima.

4.5.1 - Influência da sacarose e glicose na produção da enzima invertase em fermentação batelada.

A fim de verificar a influência da sacarose e glicose na produção da enzima invertase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, realizou-se ensaios em batelada, variando-se as concentrações destes açúcares.

Nas FIGURAS 4.41, 4.42, 4.43 e 4.44, os resultados de cada fermentação estão reunidos em gráficos separados, de forma que se possa visualizar o andamento das fermentações. É interessante notar que, em todos os casos, o ponto de menor pH, que ocorre em torno da quinta hora de fermentação, coincide com o esgotamento total do açúcar, com a mudança da taxa de crescimento e com uma inflexão na curva da atividade enzimática. Portanto, pode-se afirmar que a enzima só começa a ser produzida em escala maior quando não existe açúcar no meio e/ou a partir de um dado valor de pH. Por outro lado, é claro tratar-se de uma enzima constitutiva, pois é produzida mesmo na ausência de açúcar.

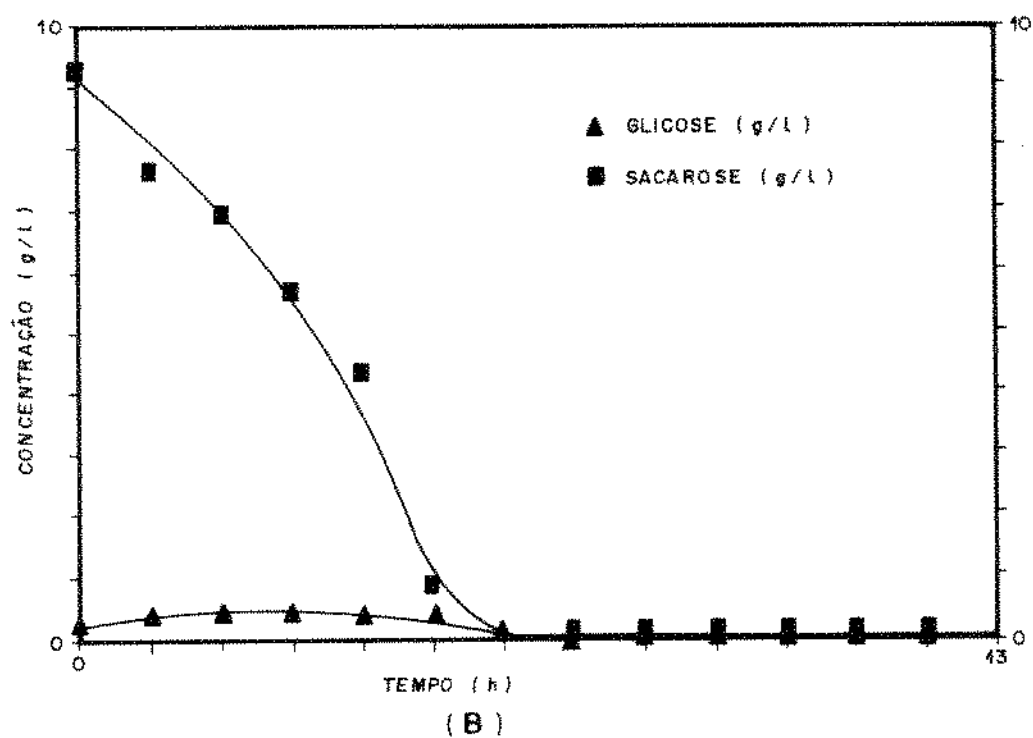
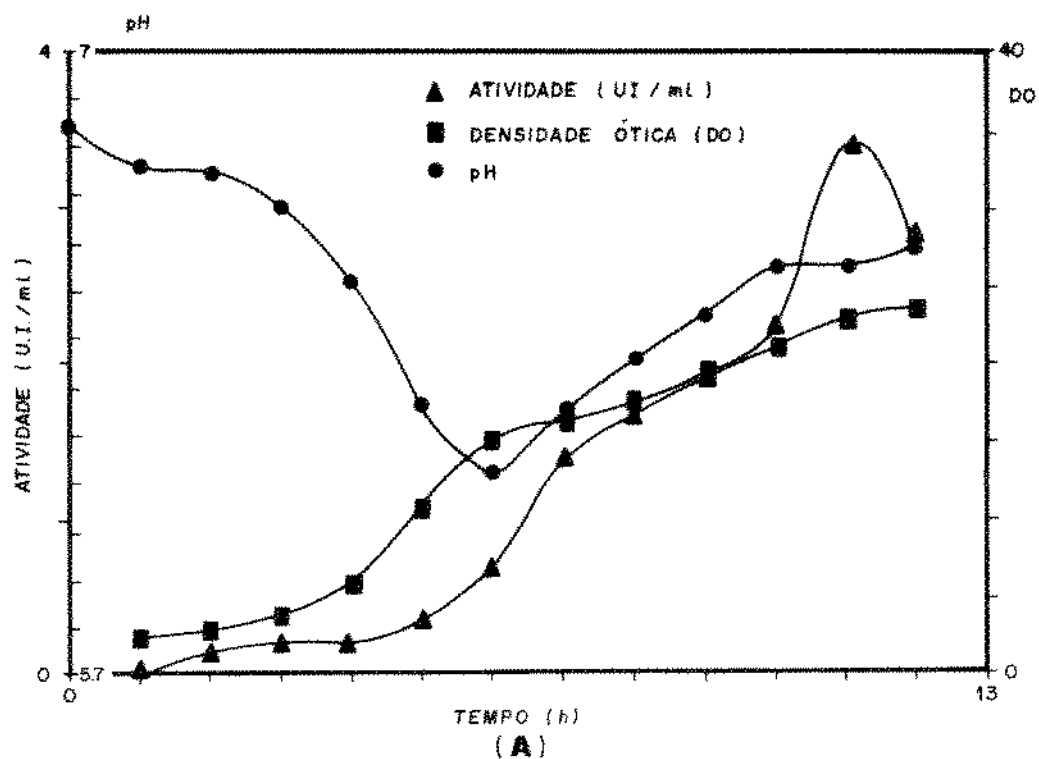


FIGURA 4.41 Evolução da concentração celular, do pH, da atividade enzimática (A) e do substrato (glicose 0 g/l e sacarose 10 g/l) (B) durante a fermentação em batelada (fermentação 1).

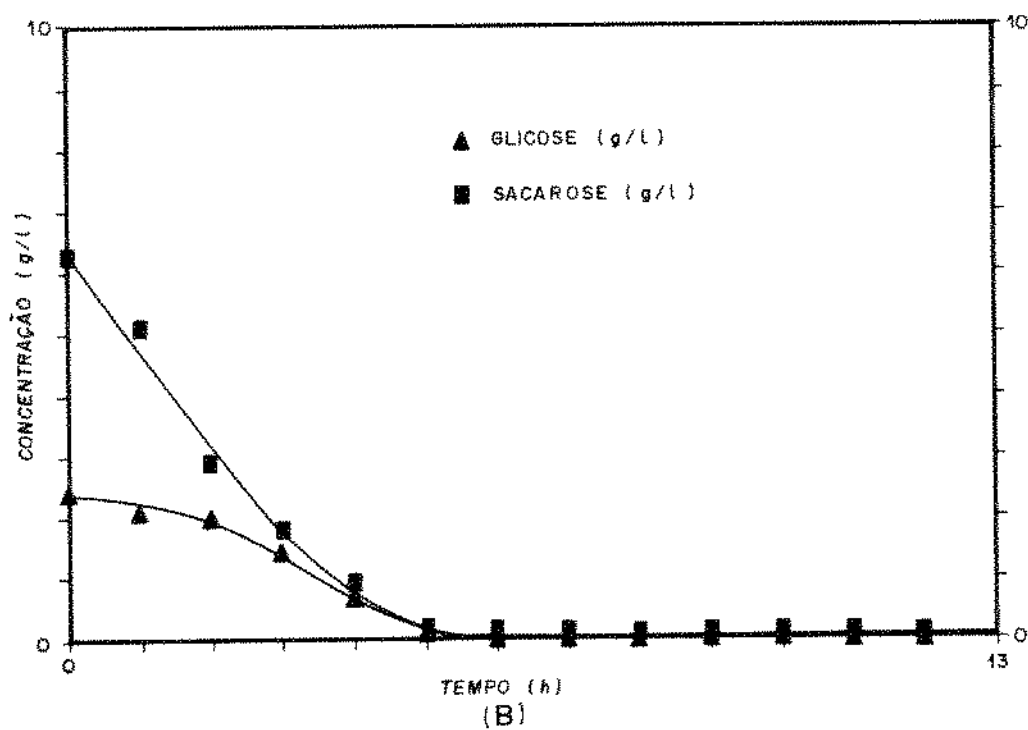
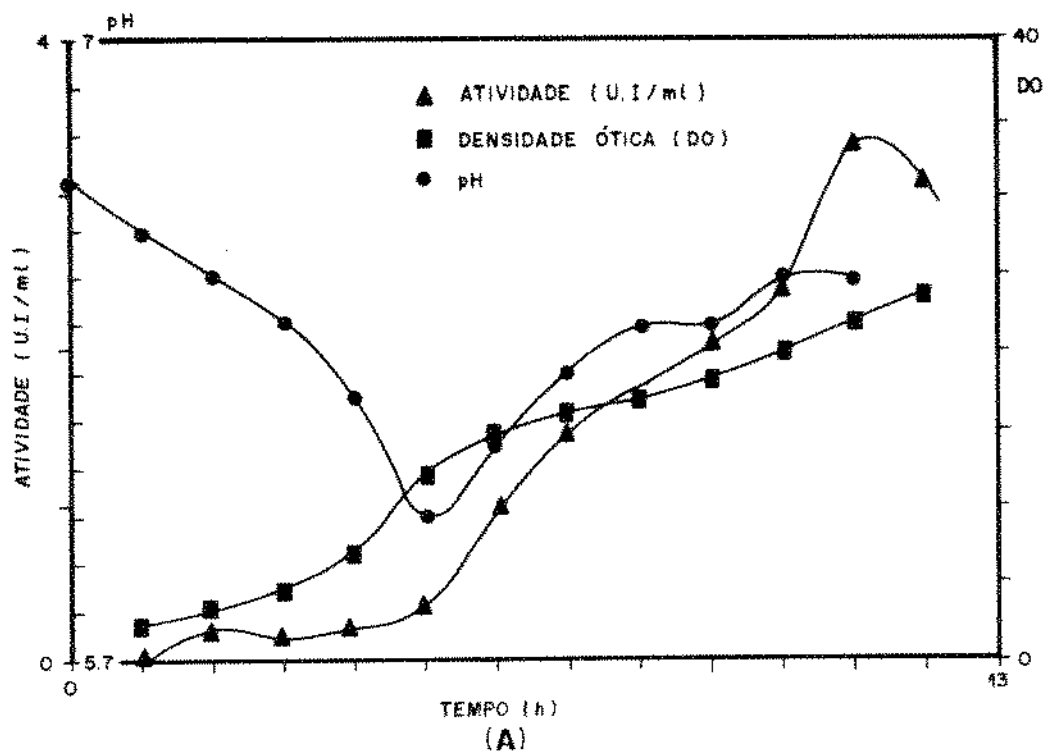


FIGURA 4.42 Evolução da concentração celular, do pH, da atividade enzimática (A) e do substrato (glicose 3,5 g/l e sacarose 6,5 g/l) (B) durante fermentação em batelada (fermentação 2).

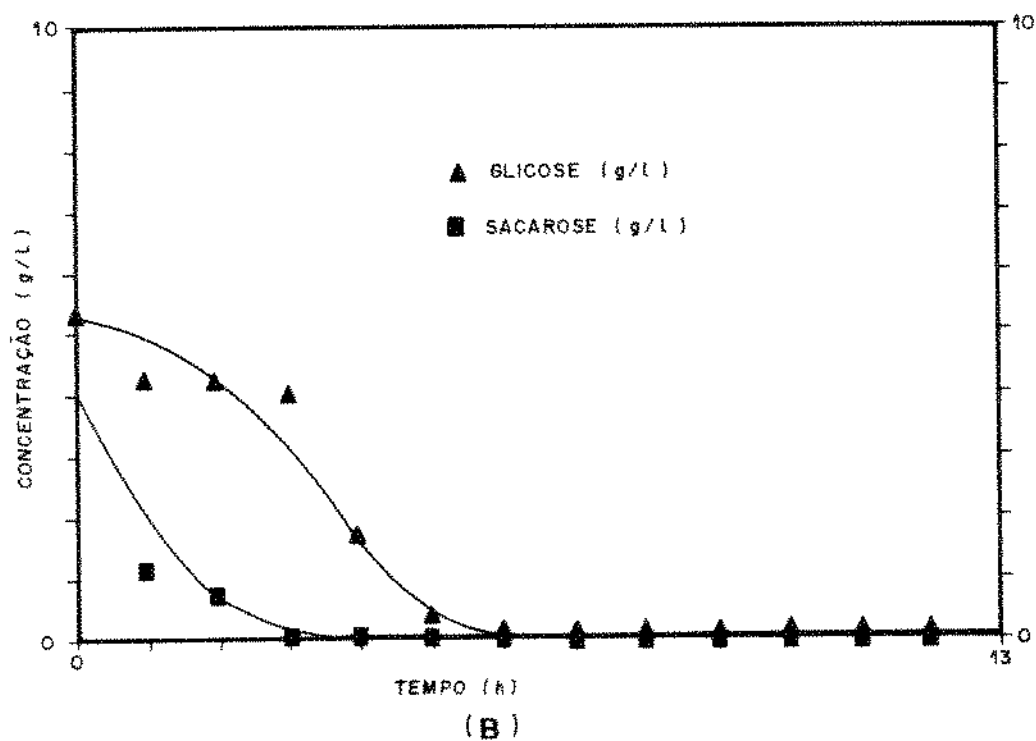
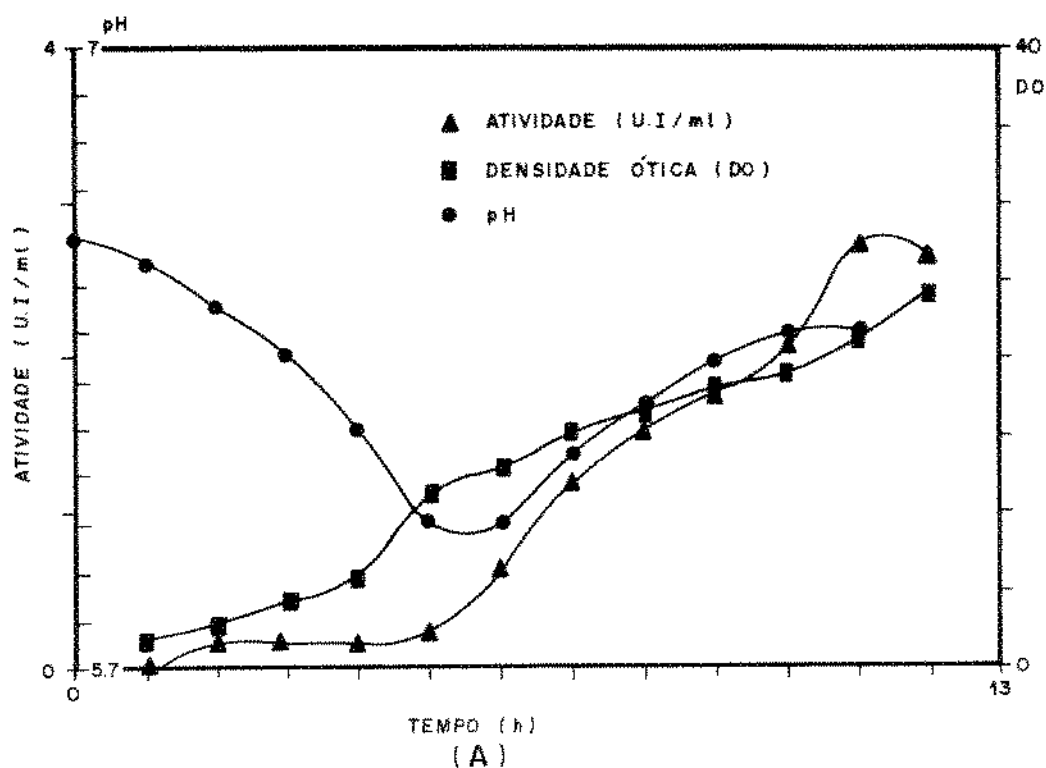


FIGURA 4.43 Evolução da concentração celular, do pH, da atividade (A) e do substrato (glicose 6,5 g/l e sacarose 3,5 g/l) (B) durante a fermentação em batelada (fermentação 3).

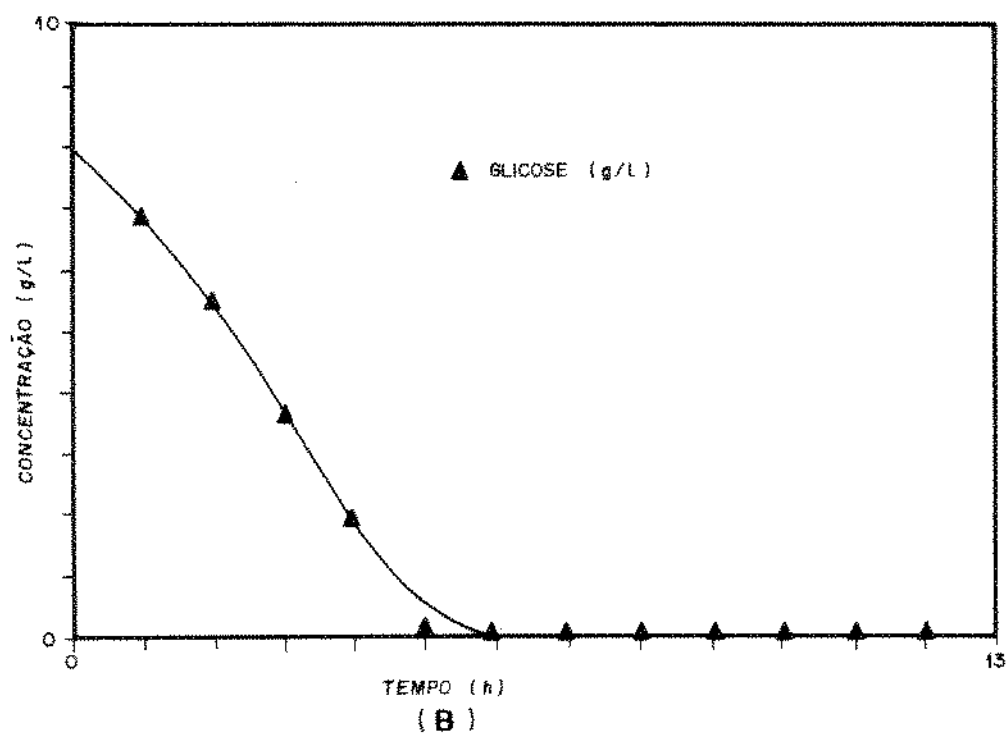
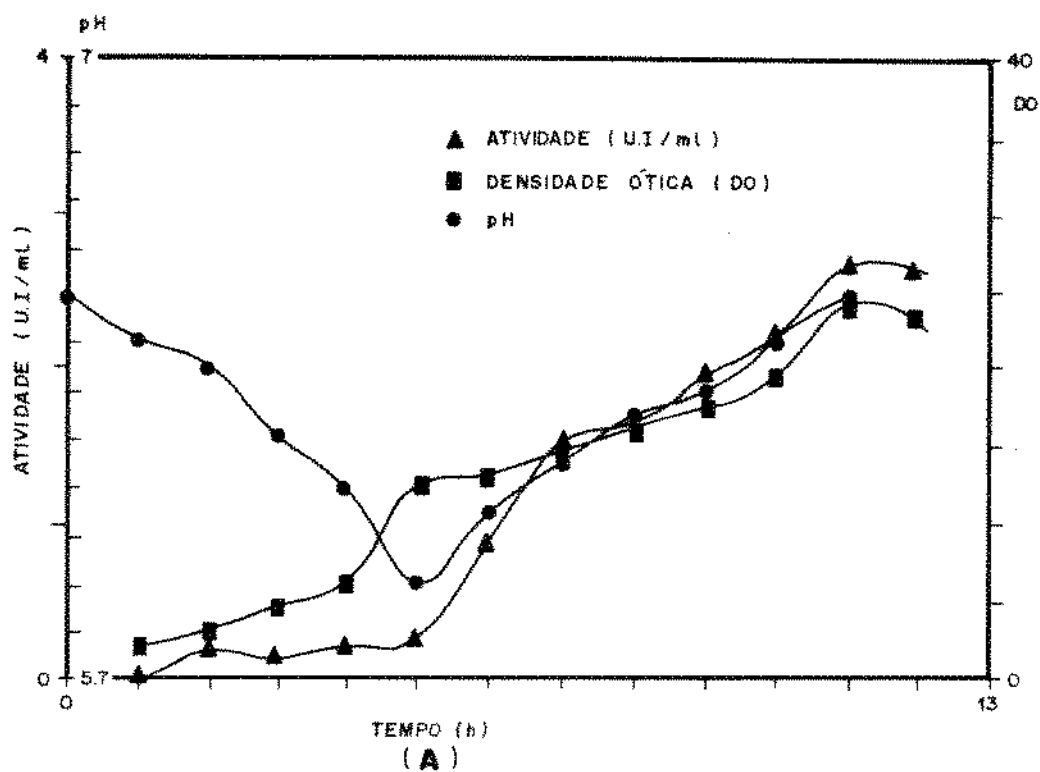


FIGURA 4.44 Evolução da concentração celular, do pH, da atividade enzimática (A) e do substrato (glicose 10 g/l e sacarose 0 g/l) (B) durante fermentação em batelada (fermentação 4).

Na TABELA 4.22 e FIGURA 4.45 estão reunidos os resultados obtidos nas fermentações onde variou-se as concentrações de sacarose e glicose, como descrito no item 3.2.1.

Pode-se observar que o valor do pH foi diminuindo progressivamente para as quatro fermentações, atingindo seu valor mínimo na quarta hora para os experimentos 2, 3 e 4 e na sexta hora, para o experimento 1. Este fato pode ser explicado pela produção de metabólitos ácidos pelo próprio microrganismo. Por volta da quinta hora e sexta hora, o pH começou a subir novamente, chegando no final da fermentação a valores próximos do inicial.

TABELA 4.22 Valores de pH em função do tempo de fermentação.

Tempo(h)	Ferm. 1	Ferm. 2	Ferm. 3	Ferm. 4
0	6,85	6,70	6,60	6,50
1	6,76	6,60	6,55	6,40
2	6,70	6,50	6,45	6,35
3	6,60	6,40	6,35	6,20
4	6,50	6,25	6,20	6,10
5	6,20	6,00	6,00	5,90
6	6,10	6,15	6,00	6,05
7	6,25	6,25	6,15	6,15
8	6,35	6,30	6,25	6,25
9	6,45	6,40	6,34	6,30
10	6,55	6,50	6,40	6,40
11	6,55	6,50	6,40	6,50
12	6,60	6,60	6,50	6,50

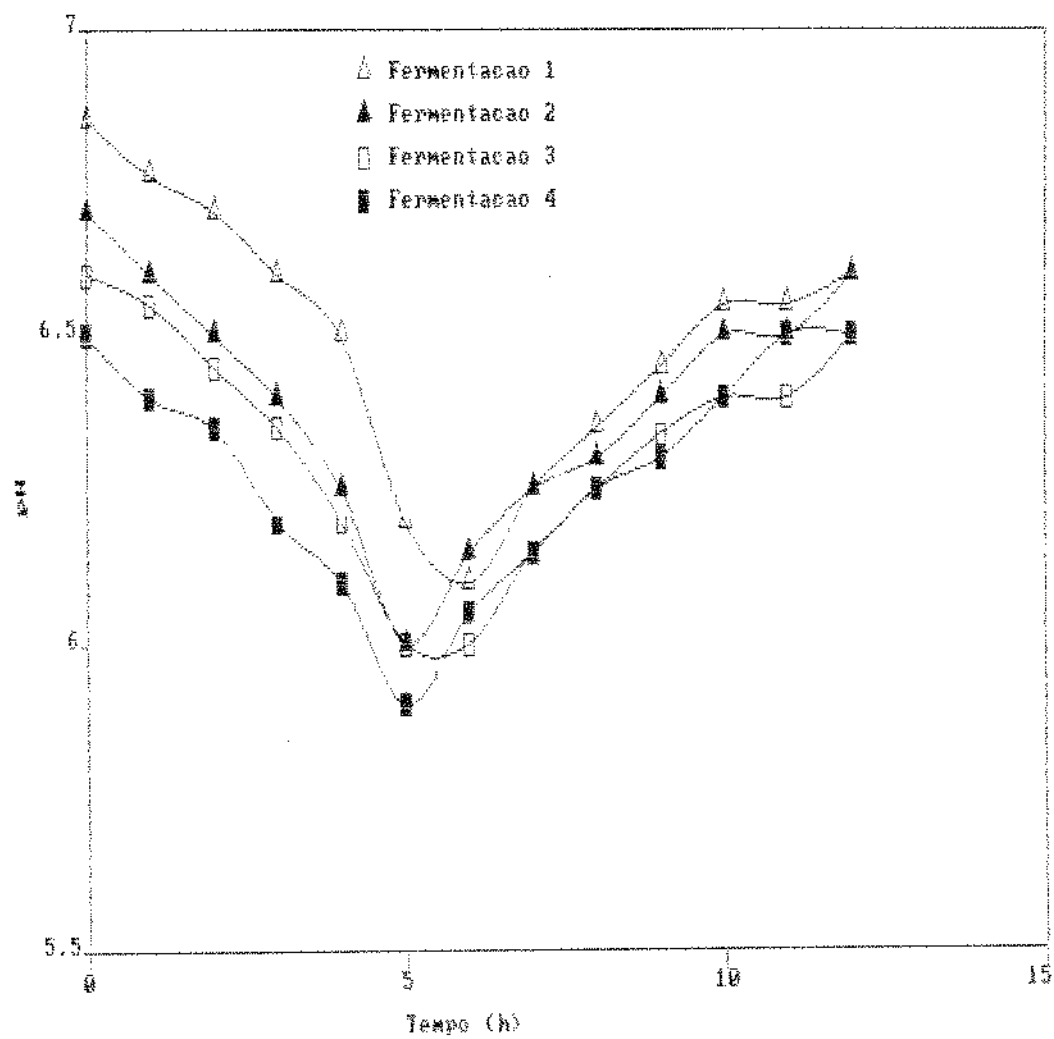


FIGURA 4.45 Valores de pH em função do tempo.

Analisando a TABELA 4.23 e FIGURA 4.46, verifica-se que a atividade enzimática foi baixa nas primeiras cinco horas para todas as fermentações, tendo um aumento gradativo no final do experimento. Os maiores valores foram obtidos para as fermentações 1 e 2, sendo 3,41 e 3,35 U.I./ml, respectivamente, que correspondem aos meios preparados com as maiores concentrações de sacarose. As fermentações 3 e 4 apresentaram valores máximos de 2,73 e 2,66 U.I./ml, respectivamente, e foram preparadas com as menores concentrações de sacarose.

TABELA 4.23 Valores da atividade enzimática em função do tempo.

Tempo(h)	Ferm.1	Ferm.2	Ferm.3	Ferm.4
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0,158	0,200	0,176	0,188
3	0,193	0,199	0,160	0,120
4	0,198	0,198	0,157	0,208
5	0,355	0,341	0,217	0,250
6	0,671	0,959	0,610	0,889
7	1,372	1,467	1,170	1,518
8	1,655	1,786	1,525	1,641
9	1,896	2,015	1,760	1,948
10	2,200	2,390	2,064	2,180
11	3,410	3,347	2,727	2,659
12	2,740	3,071	2,638	2,640

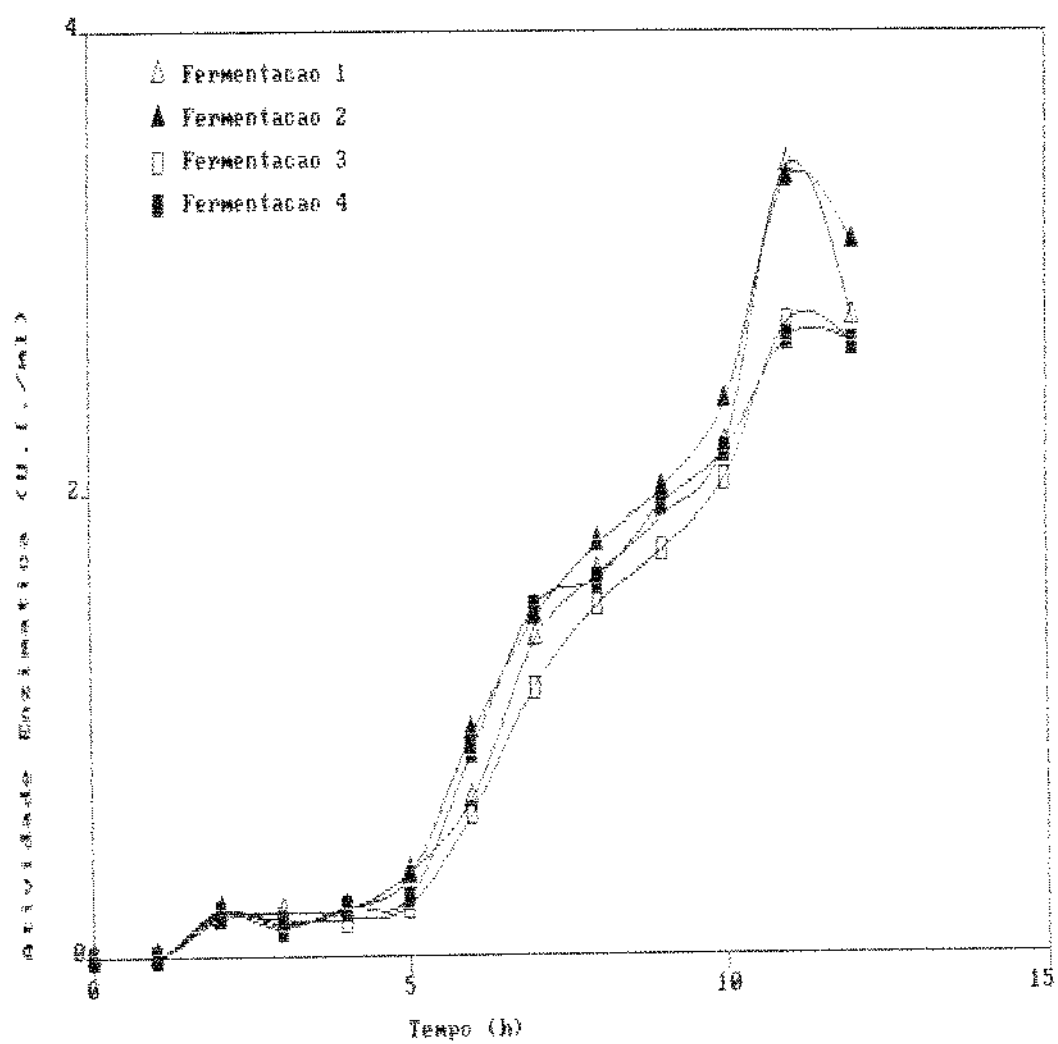


FIGURA 4.46 Valores de atividade enzimática em função do tempo.

O crescimento celular expresso em valores de logaritmo natural da densidade ótica (D.O), apresentado na TABELA 4.24 e FIGURA 4.47 aumenta rapidamente até a quinta hora. Verifica-se claramente a existência de duas fases distintas de crescimento. A primeira corresponde a degradação do substrato e abaixamento do pH, e a segunda fase, corresponde provavelmente a utilização de metabólitos presentes no meio, com aumento do pH. As taxas máximas de crescimento foram similares em todos os experimentos, sendo em média $0,42 \text{ h}^{-1}$ na primeira fase e $0,058 \text{ h}^{-1}$ na segunda.

TABELA 4.24 Valores de $\ln (D.O)$ em função do tempo.

Tempo(h)	Ferm.1	Ferm.2	Ferm.3	Ferm.4
1	0,89	0,79	0,69	0,75
2	1,02	1,16	1,06	1,15
3	1,39	1,54	1,45	1,55
4	1,78	1,95	1,78	1,85
5	2,38	2,50	2,42	2,53
6	2,71	2,68	2,56	2,57
7	2,78	2,76	2,72	2,68
8	2,85	2,82	2,80	2,77
9	2,95	2,90	2,90	2,86
10	3,04	2,99	2,94	2,96
11	3,13	3,08	3,05	3,10
12	3,16	3,16	3,19	3,19

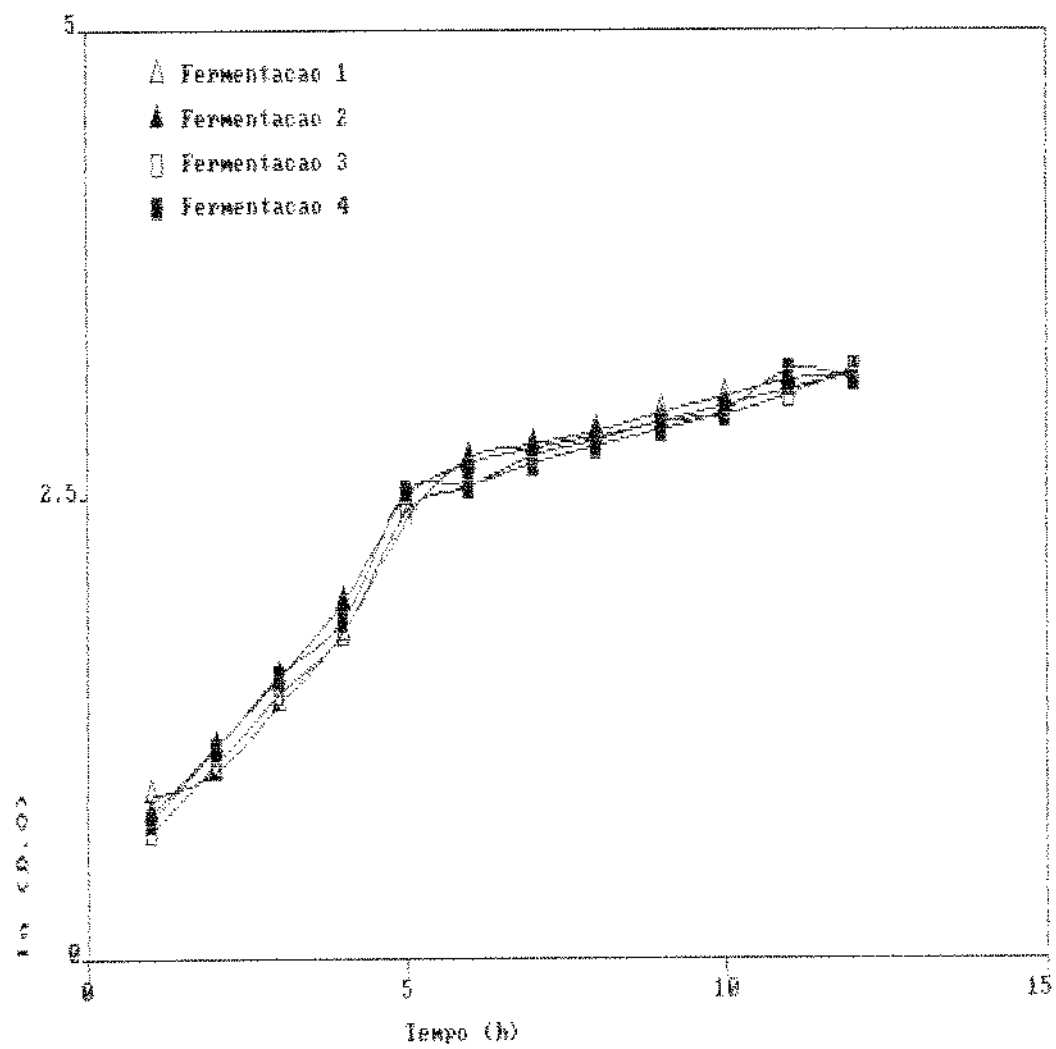


FIGURA 4.47 Logarítmo natural da densidade ótica em função do tempo.

4.5.2 - Verificação da influência do substrato glicose, frutose e sacarose na produção da enzima invertase através da técnica de injeção de pulso em fermentação contínua.

Para uma melhor verificação do problema de inibição, a fermentação contínua é um instrumento muito mais eficaz, visto poder se trabalhar em boas condições de aeração e com possibilidade de se variar a concentração do açúcar no meio, pela variação do fluxo de alimentação, mantendo o pH constante.

4.5.2.1 - Pulso de glicose.

De acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2, foi aplicado um pulso de uma solução de glicose para verificar a influência deste substrato na produção da enzima.

Ao se analisar a TABELA 4.25 e a FIGURA 4.48, pode-se verificar que ocorre uma certa inibição da produção da enzima, quando o nível de substrato é alto no meio de cultivo. Percebe-se que a queda na produção enzimática é acompanhada do consumo de substrato, sendo que o mínimo da atividade enzimática coincide com o mínimo de substrato no meio. Após atingir esse mínimo, o microrganismo passa a aumentar gradativamente a produção da enzima. Pode-se verificar que não há inibição no crescimento celular, pois a massa seca permanece constante durante a perturbação provocada no fermentador.

Observa-se também que o substrato glicose é rapidamente assimilado, sendo no entanto evidente o efeito de inibição na produção da enzima.

TABELA 4.25 Influência do substrato glicose na fermentação contínua.

Tempo(h)	pH	massa seca(g/l)	ART(g/l)	GLIC(g/l)	Atv(U.l/ml)
antes	3,50	2,33	0,297	0,01	17,12
0,0	3,40	2,29	14,36	20,98	16,78
0,5	3,40	2,91	13,15	14,22	15,89
1,0	3,40	3,18	11,35	12,64	15,54
1,5	3,40	3,22	9,55	11,44	14,92
2,0	3,40	3,42	7,74	10,83	14,34
2,5	3,35	3,38	6,16	4,78	13,13
3,0	3,35	3,75	4,57	2,39	10,63
3,5	3,35	3,37	3,27	1,28	10,98
4,0	3,35	3,61	1,50	0,144	9,58
4,5	3,35	3,66	0,48	0,028	8,36
5,0	3,35	4,41	0,35	0,028	8,33
5,5	3,35	3,66	0,21	0,025	7,64
6,0	3,35	3,64	0,29	0,014	9,14
6,5	3,35	3,70	0,26	0,014	10,24
7,0	3,35	3,66	0,25	0,021	11,79
7,5	3,35	3,60	0,28	0,021	13,43
8,0	3,35	3,60	0,25	0,020	14,43
8,5	3,35	3,42	0,29	0,010	14,53
9,0	3,35	3,42	0,29	0,025	16,10
9,5	3,35	3,60	0,30	0,017	16,15
10,0	3,40	3,46	0,29	0,023	23,36
10,5	3,40	3,46	0,28	0,010	23,40
11,0	3,40	3,42	0,34	0,025	24,42
11,5	3,40	3,33	0,36	0,010	24,50
12,0	3,40	3,18	0,36	0,007	24,65
12,5	3,40	3,26	0,36	0,010	24,90
13,0	3,40	3,30	0,35	0,017	25,07
13,5	3,40	3,28	0,37	0,021	28,00
14,0	3,40	3,28	0,44	0,021	28,21

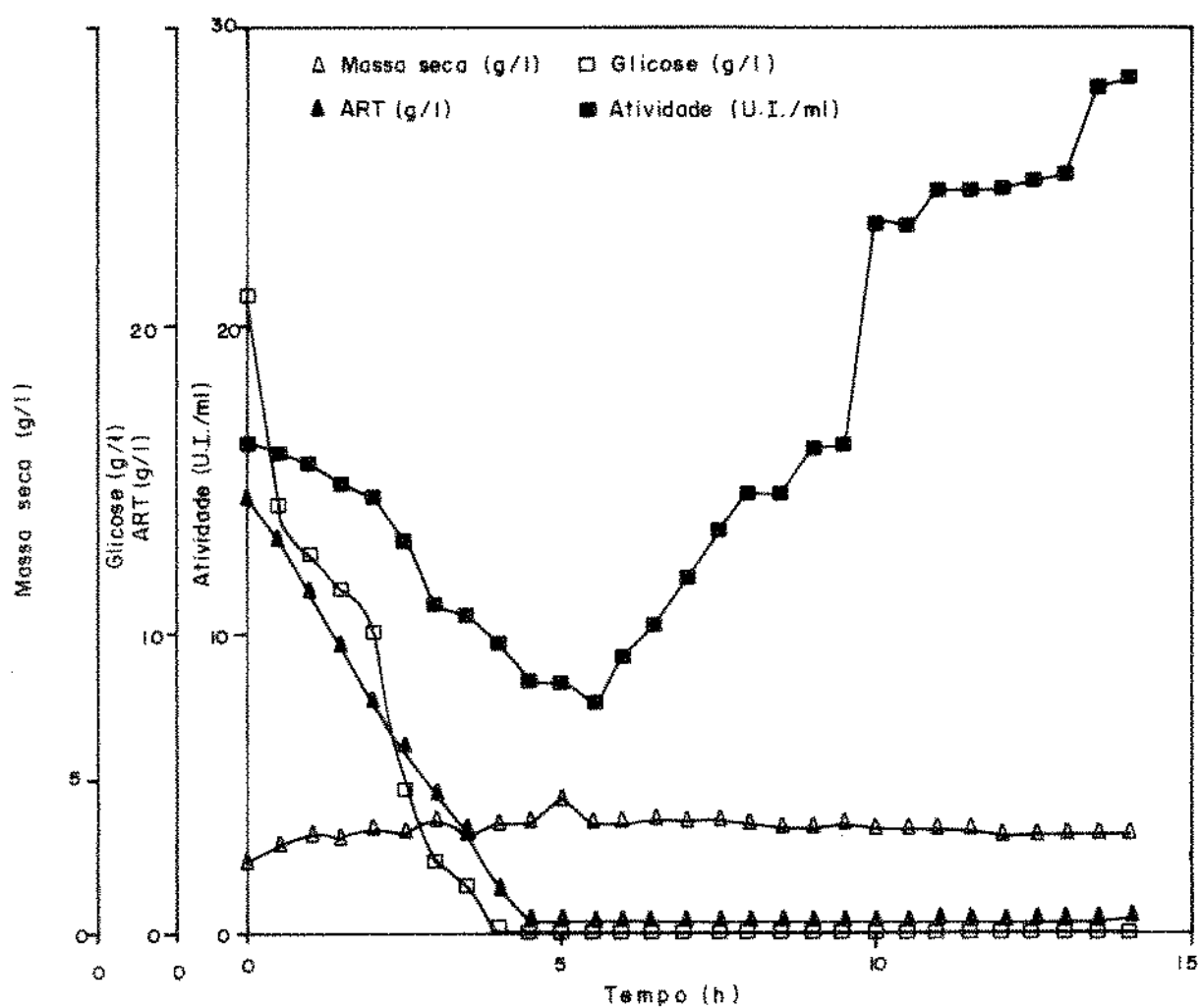


Figura 4.48 Influência do substrato glicose na fermentação contínua - técnica de pulso.

4.5.2.2 - Pulso de frutose.

Através da TABELA 4.26 e da FIGURA 4.49, pode-se verificar o efeito inibitório provocado pela frutose na produção enzimática, quando se encontra em alta concentração no meio de cultura. De uma forma geral, o comportamento é semelhante ao ocorrido com o pulso de glicose, ou seja, existe inibição da produção da enzima, porém não há inibição no crescimento. É importante salientar que a enzima é produzida na presença tanto de glicose ou frutose, sem a presença do substrato sacarose.

TABELA 4.26 Influência do substrato frutose na fermentação contínua.

Tempo(h)	pH	massa seca(g/l)	ARI(g/l)	AR(g/l)	Atv(U,l/ml)
antes	3,40	3,28	0,44	0,045	30,27
0,0	3,40	3,26	15,52	13,17	29,66
0,5	3,35	3,14	13,98	12,53	28,21
1,0	3,35	3,26	12,44	11,35	26,84
1,5	3,35	3,38	10,40	9,20	24,88
2,0	3,35	3,35	8,23	7,67	24,00
2,5	3,35	3,51	6,84	6,44	21,34
3,0	3,35	3,71	4,96	4,62	16,87
3,5	3,35	3,63	2,97	3,03	15,58
4,0	3,35	3,93	1,84	1,93	14,05
4,5	3,35	4,08	0,84	0,071	11,58
5,0	3,35	4,00	0,85	0,066	13,33
5,5	3,35	3,86	0,63	0,075	14,17
6,0	3,35	3,53	0,66	0,065	15,15
6,5	3,35	3,61	0,57	0,068	18,52
7,0	3,35	3,45	0,59	0,065	19,66
7,5	3,35	3,49	0,55	0,058	22,84
8,0	3,35	3,61	0,54	0,061	26,10
8,5	3,35	3,36	0,58	0,061	26,76
9,0	3,40	3,38	0,55	0,042	22,30
9,5	3,40	3,38	0,51	0,050	25,13
10,0	3,40	3,43	0,48	0,058	25,60
10,5	3,40	3,38	0,43	0,052	29,24
11,0	3,40	3,14	0,42	0,047	26,75

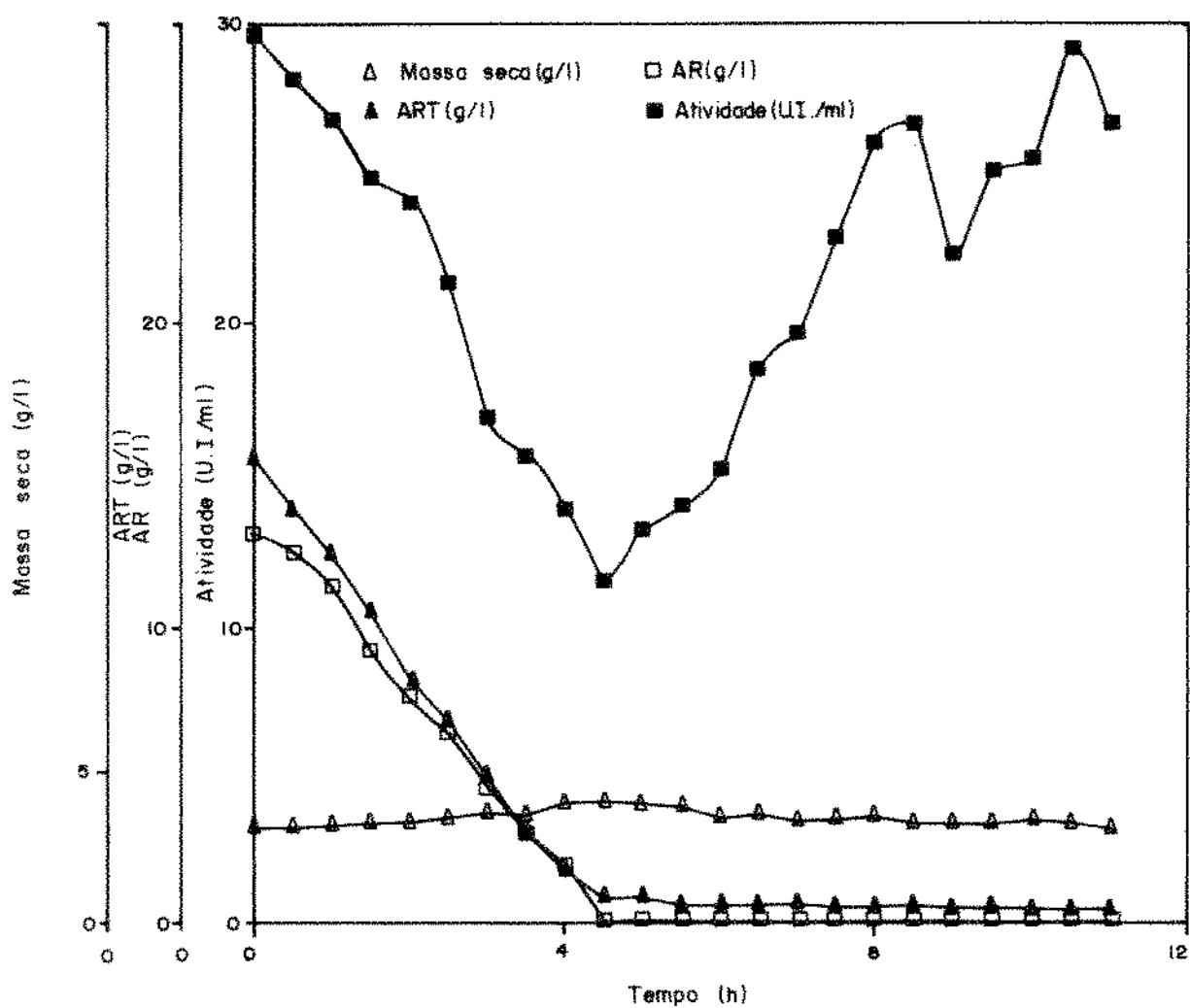


Figura 4.49 Influência do substrato frutose na fermentação contínua - técnica de pulso.

4.5.2.3 - Pulso de sacarose.

O pulso de sacarose é acompanhado dos mesmos fenômenos ocorridos com glicose e frutose. É notório, portanto, que qualquer um desses açúcares presentes em excesso no meio provocarão uma inibição drástica na produção da enzima sem no entanto inibir o crescimento. Seria, portanto, interessante tentar quantificar essa inibição em termos de parâmetros cinéticos de crescimento e produto. A TABELA 4.27 e a FIGURA 4.50 trazem os resultados obtidos com o pulso de sacarose.

TABELA 4.27 Influência do substrato sacarose na fermentação contínua.

Tempo(h)	pH	Massa seca(g/l)	ART(g/l)	AR(g/l)	Atv(U,l/ml)
antes	3,5	3,16	0,372	0,075	27,48
0,0	3,45	3,37	15,48	0,162	25,74
0,5	3,45	3,10	14,77	0,160	25,69
1,0	3,45	3,25	12,93	0,130	24,93
1,5	3,45	3,35	11,05	0,100	23,78
2,0	3,45	3,42	8,53	0,080	21,59
2,5	3,45	3,42	6,65	0,044	17,88
3,0	3,45	3,44	4,43	0,063	16,73
3,5	3,45	3,51	2,70	0,063	14,34
4,0	3,42	3,60	0,86	0,040	11,63
4,5	3,42	3,70	0,49	0,031	12,03
5,0	3,42	3,94	0,51	0,038	13,56
5,5	3,45	3,94	0,51	0,033	13,87
6,0	3,45	4,00	0,59	0,028	14,47
6,5	3,45	3,70	0,44	0,024	16,79
7,0	3,45	3,56	0,51	0,036	19,59
7,5	3,45	3,37	0,60	0,035	22,50
8,0	3,45	3,49	0,48	0,038	23,61
8,5	3,45	3,41	0,40	0,029	27,47
9,0	3,45	3,29	0,35	0,028	25,61

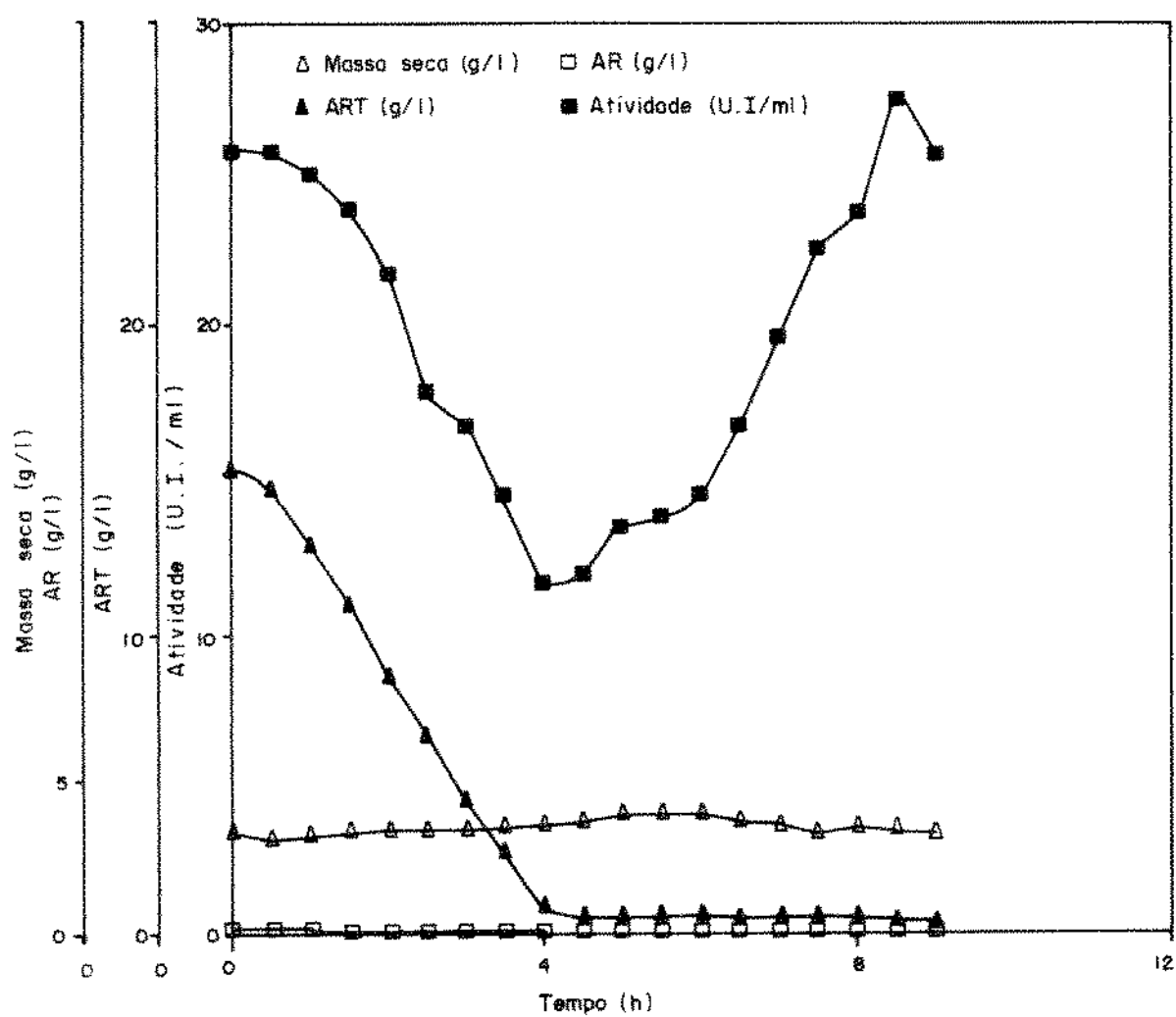


FIGURA 4.50 Influência do substrato sacarose na fermentação contínua - técnica de pulso.

Fazendo balanço de P (atividade enzimática) no reator após o pulso tem-se:

$$q_p x - DP = dP/dt \quad (4.10)$$

ou seja

$$q_p = (dP/dt + DP) 1/x \quad (4.11)$$

Traçando-se uma reta média partindo do tempo zero (instante do pulso) até o ponto mínimo de atividade no reator, acha-se o acúmulo médio de enzima no reator, durante a fase de excesso de substrato no meio.

Analizando a equação 4.11, tomando-se dP/dt constante e a concentração celular sendo praticamente constante, verifica-se que q_p só varia com P, já que D mantém-se o mesmo durante todo o ensaio. Assim, pode-se dizer que q_p será mínimo para o menor valor da atividade no reator, momento este que coincide com a exaustão do substrato. Como termo comparativo e quantitativo do efeito de inibição, pode-se comparar q_p antes do pulso e no instante em que este atinge seu mínimo após o pulso. Estes valores estão na TABELA 4.28.

TABELA 4.28 Efeito do pulso na produção específica de enzima(q_p)

Substrato	q_p antes do pulso	q_p mínimo após o pulso
Sacarose	1739	619
Glicose	1469	290
Frutose	1846	590

Portanto a perda de eficiência do microrganismo atingiu 65% com o pulso de sacarose, 69% com o pulso de glicose e 81% com o pulso de frutose.

4.5.3-Verificação da influência desacarose, glicose e frutose no crescimento do microrganismo e produção invertase através da técnica de perturbação por degrau, em fermentação contínua.

4.5.3.1 - Estudo da influência de sacarose.

Analisando o gráfico da FIGURA 4.51 e TABELA 4.29, verifica-se que a massa celular no meio de fermentação permanece constante e que a atividade enzimática decresce quando começa a se acumular açúcar no meio de fermentação, sendo que esse acúmulo começa ocorrer com a taxa de diluição de $0,21 \text{ h}^{-1}$. Para a concentração de $30,0 \text{ g/l}$ de sacarose, FIGURA 4.52 e TABELA 4.30, percebe-se um acréscimo na massa celular enquanto que a atividade enzimática tem uma queda brusca, à medida que o açúcar se acumula no meio. Nas concentrações de $50,0 \text{ g/l}$ e $70,0 \text{ g/l}$, nota-se que a atividade enzimática sofre forte decréscimo pelo acúmulo de açúcar, sendo possível trabalhar com essas concentrações só em taxas de diluição bem baixas. Esse fato pode ser constatado pelas FIGURAS 4.53 e 4.54 e TABELAS 4.31 e 4.32.

TABELA 4.29 Influência do substrato sacarose, concentração 10,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	Sac(g/l)
0,046	0,40	8,95	0,032
0,10	0,50	15,87	0,036
0,16	0,51	17,64	0,101
0,21	0,50	11,80	5,02
0,27	0,50	4,80	6,85

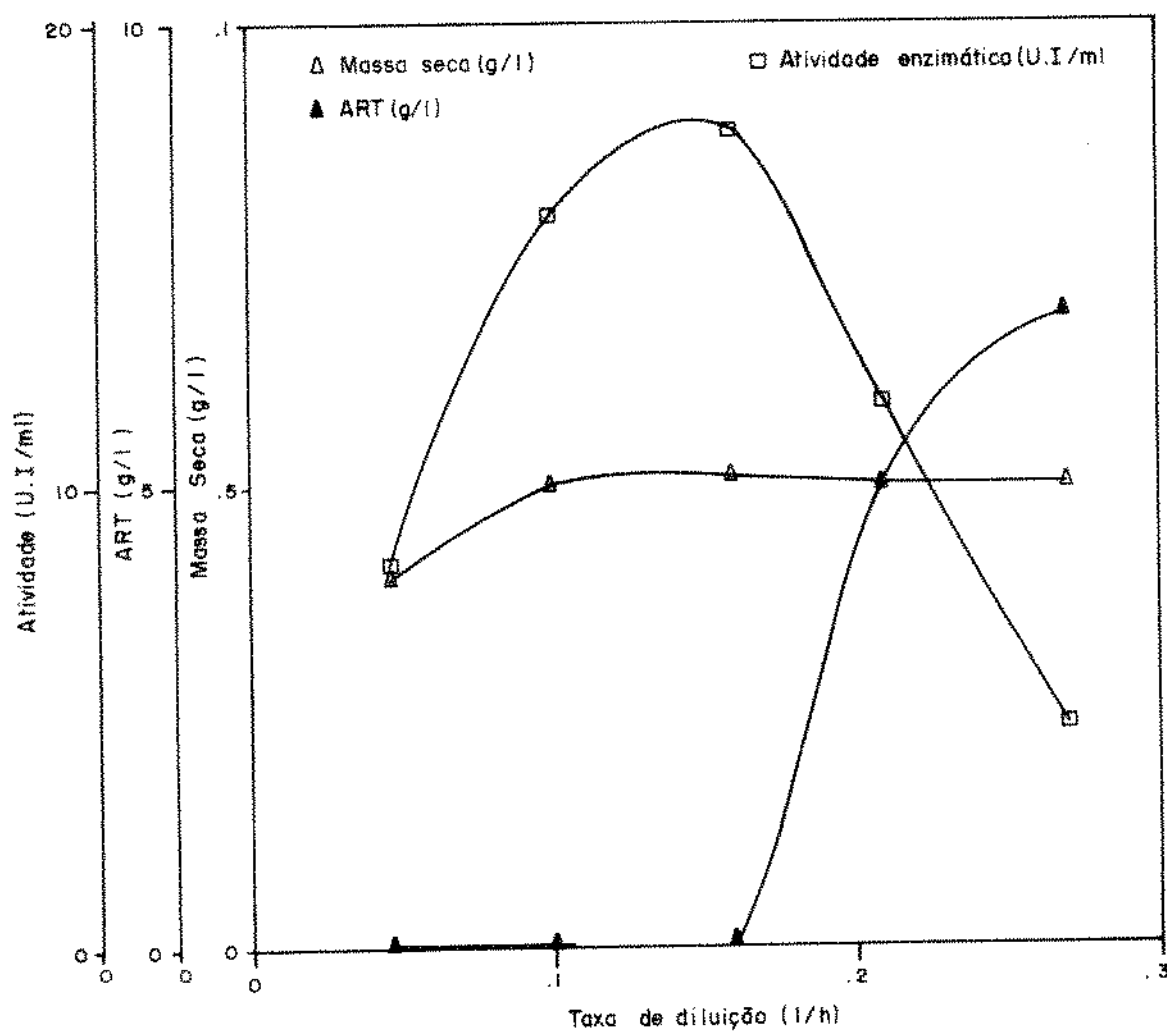


FIGURA 4.51 Influência do substrato sacarose, concentração 10,0 g/l.

TABELA 4.30 Influência do substrato sacarose, concentração 30,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	Sac(g/l)
0,046	0,98	19,9	0,034
0,10	1,0	23,34	0,034
0,16	1,3	25,96	0,047
0,21	1,48	4,50	9,61
0,27	1,36	1,15	17,92

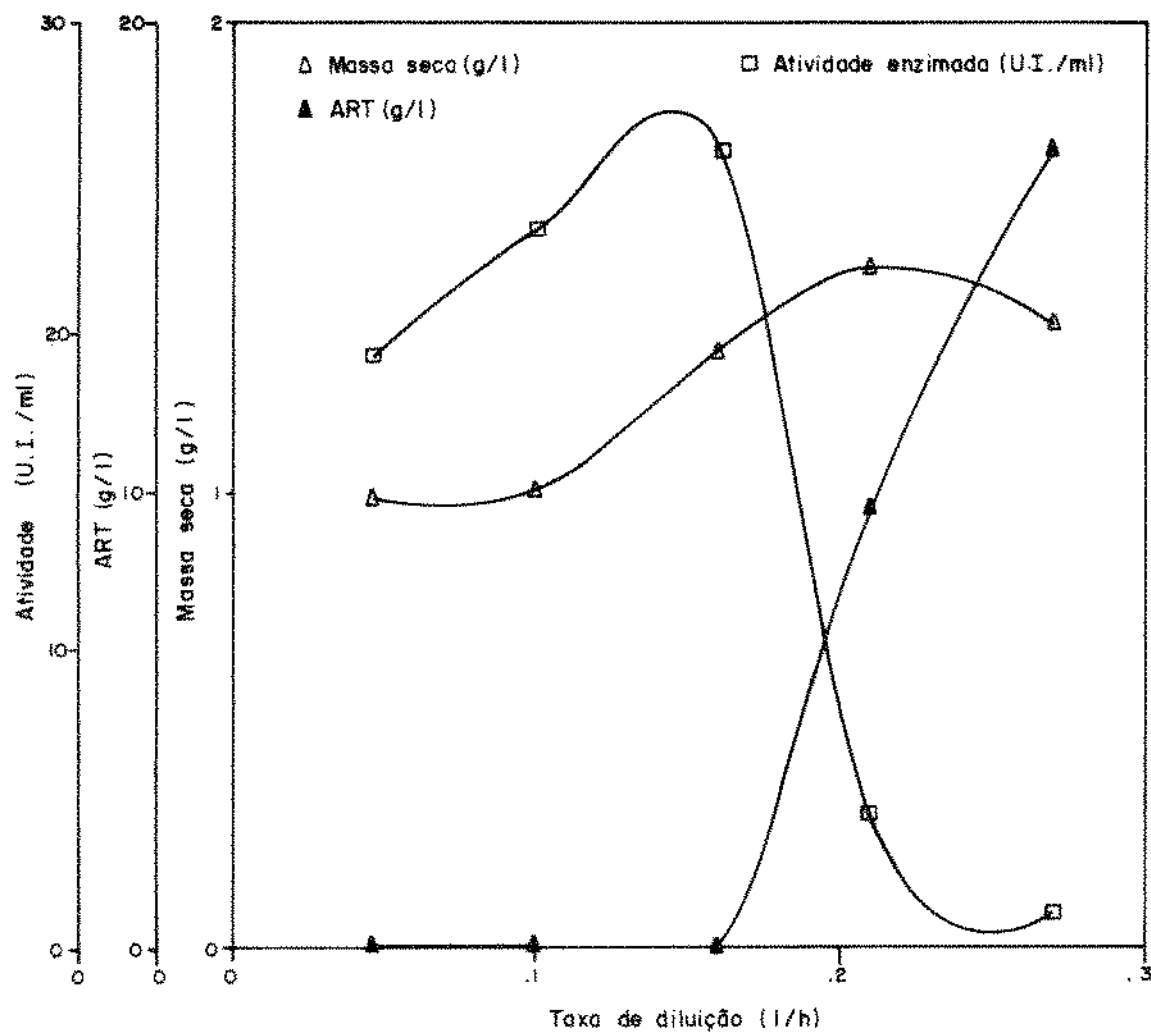


FIGURA 4.52 Influência do substrato sacarose, concentração 30,0 g/l.

TABELA 4.31 Influência do substrato sacarose, concentração 50,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	Sac(g/l)
0,046	1,40	16,94	0,119
0,10	1,56	13,37	0,12
0,16	1,67	6,62	0,123
0,21	0,96	1,70	14,78
0,27	0,85	0,82	20,66

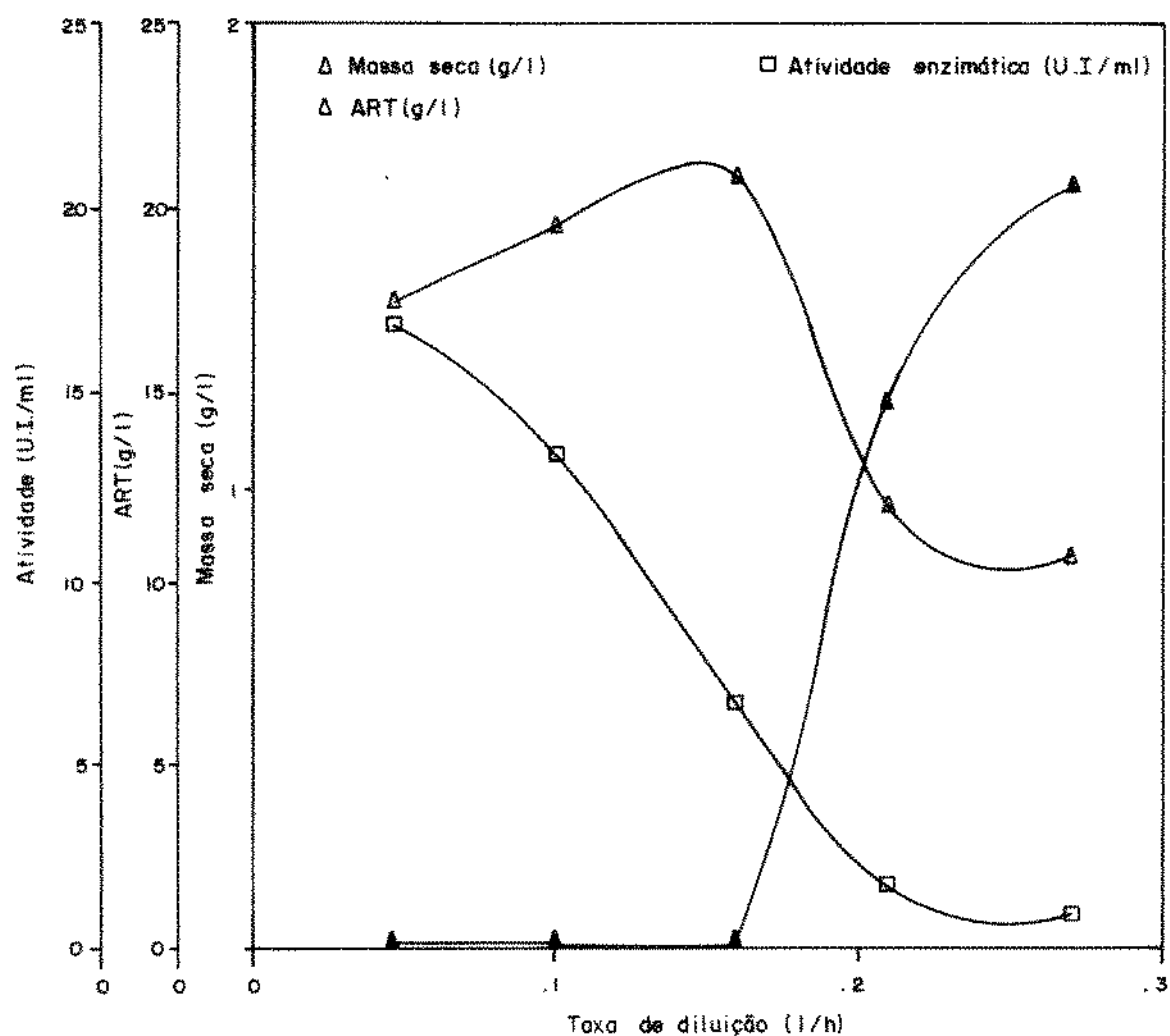


FIGURA 4.53 Influência do substrato sacarose, concentração 50,0 g/l.

TABELA 4.32 Influência do substrato sacarose, concentração 70,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	Sac(g/l)
0,046	1,85	9,52	0,055
0,10	2,00	5,87	2,110
0,16	1,52	3,27	13,880
0,21	1,12	1,06	24,280

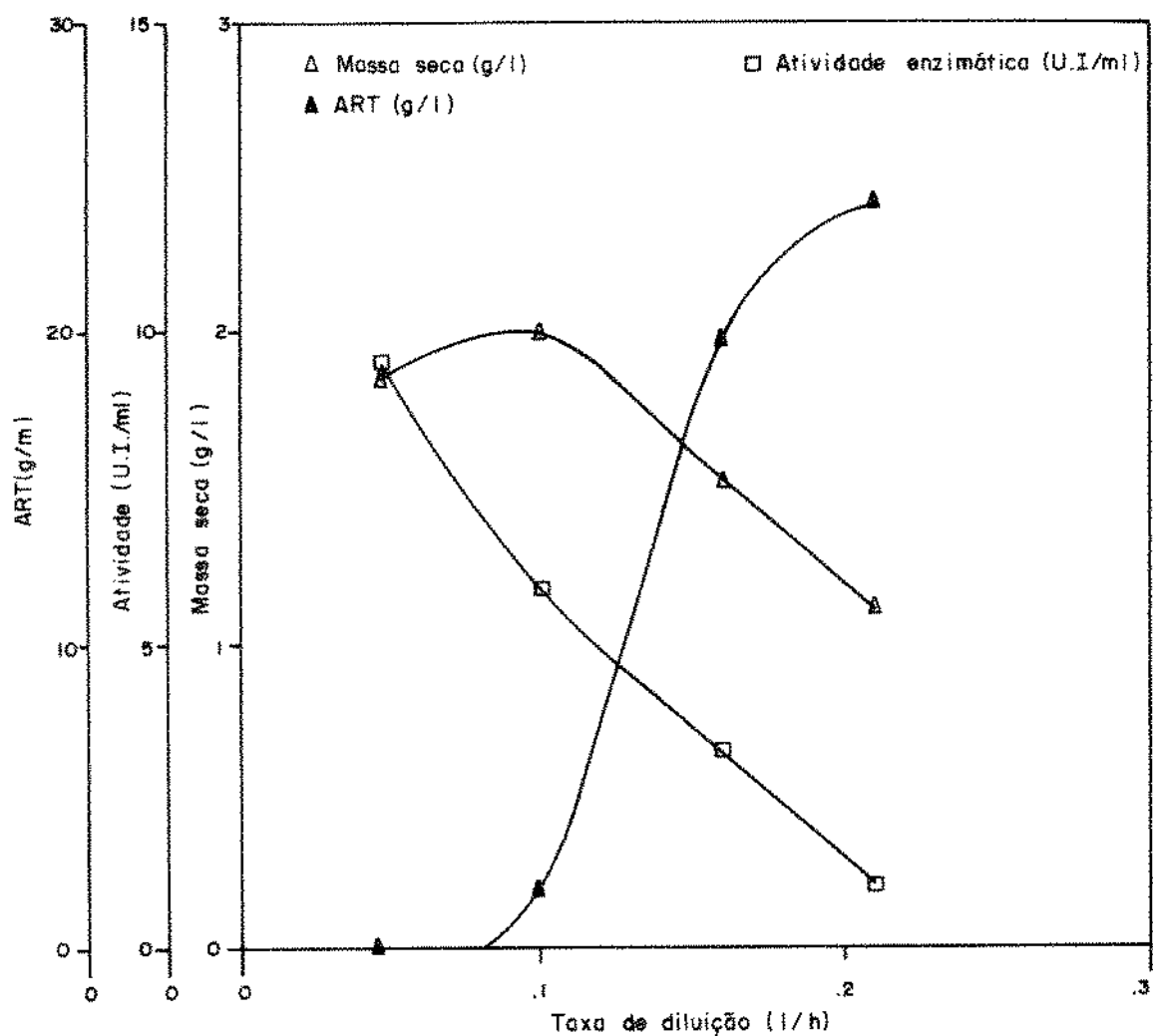


FIGURA 4.54 Influência do substrato sacarose, concentração 70,0 g/l.

4.5.3.2 - Estudo da influência do substrato glicose através da técnica de degrau.

Através da FIGURA 4.55 e TABELA 4.33, verifica-se que o poder inibidor da glicose aparenta ser maior que o da sacarose, pois mesmo para baixas concentrações de açúcar no meio, a atividade enzimática sofre um decréscimo. Esse fato pode ser mais evidenciado para a concentração de 30,0 g/l de glicose, onde um pequeno aumento de açúcar no meio provoca uma grande inibição na produção da enzima, sendo que a massa celular praticamente permanece constante (FIGURA 4.56 e TABELA 4.34).

Para as concentrações de 50,0 g/l e 70,0 g/l, verifica-se pelas FIGURAS 4.57 e 4.58 e TABELAS 4.35 e 4.36, que o acúmulo de açúcar no meio inibe igualmente a produção de enzima.

TABELA 4.33 Influência do substrato glicose, concentração 10,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	ART(g/l)
0,040	0,04	8,14	0,078
0,10	0,48	13,94	0,104
0,16	0,46	10,98	0,135
0,21	0,46	6,06	2,630
0,27	0,46	0,00	4,840

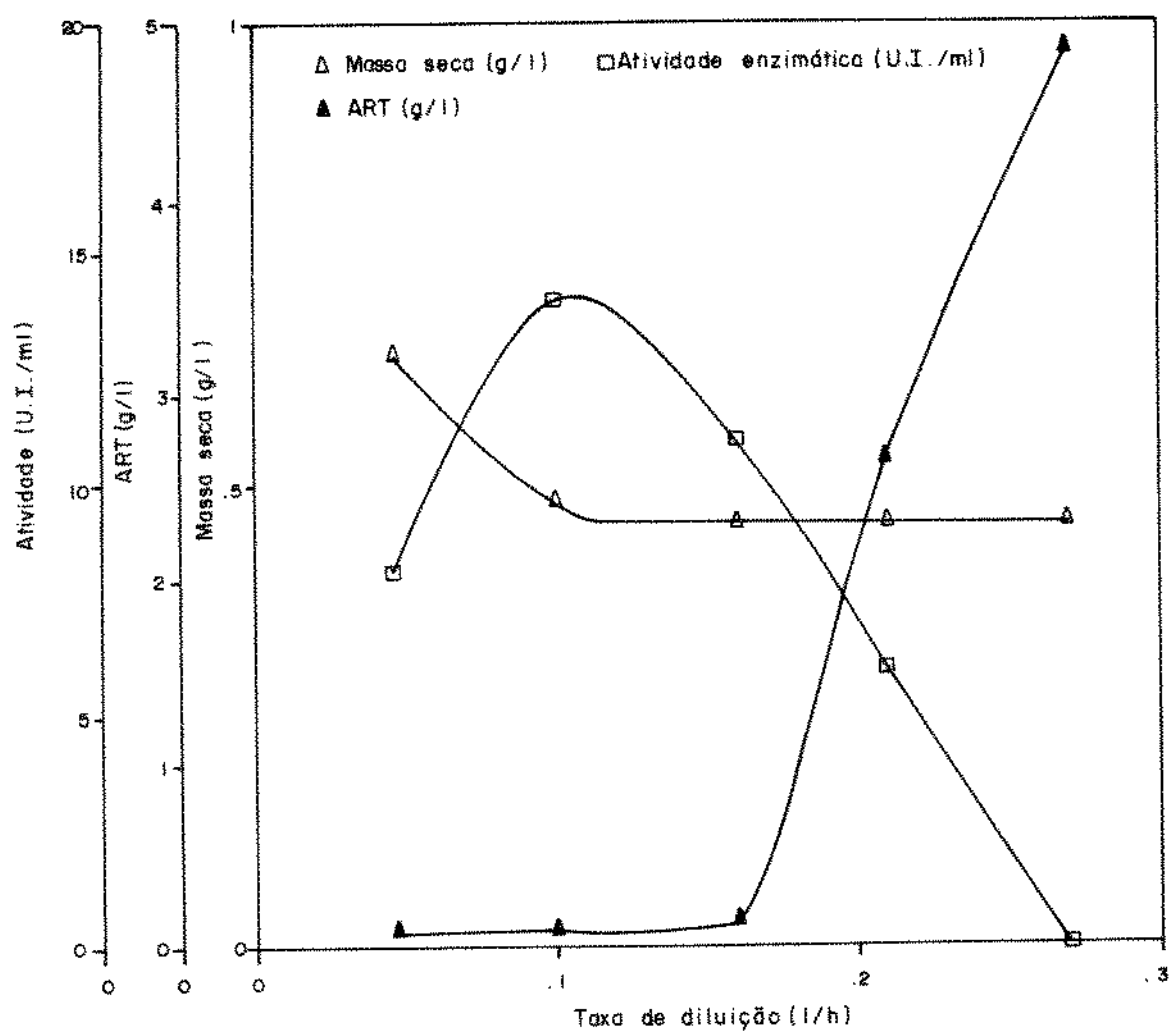


FIGURA 4.55 Influência do substrato glicose, concentração 10,0 g/l.

TABELA 4.34 Influência do substrato glicose, concentração 30,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	ART(g/l)
0,046	0,85	14,05	0,119
0,10	1,079	29,84	0,119
0,16	1,14	22,29	0,208
0,21	1,16	1,0	1,38

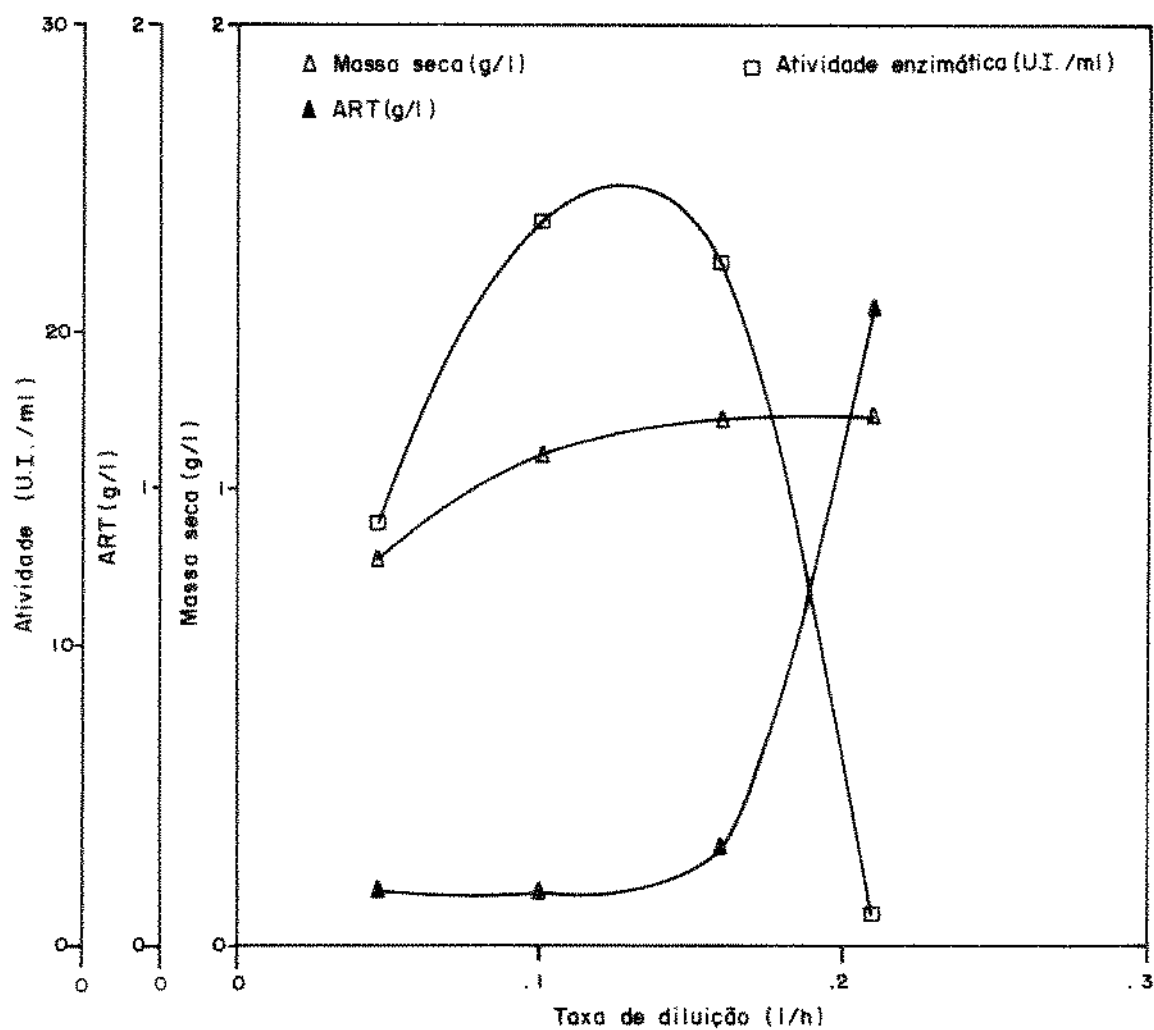


FIGURA 4.56 Influência do substrato glicose, concentração 30,0g/l.

TABELA 4.35 Influência do substrato glicose, concentração 50,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	ART(g/l)
0,046	1,13	29,68	0,067
0,10	1,69	17,60	0,280
0,16	1,76	2,84	0,611
0,21	1,40	1,25	2,280

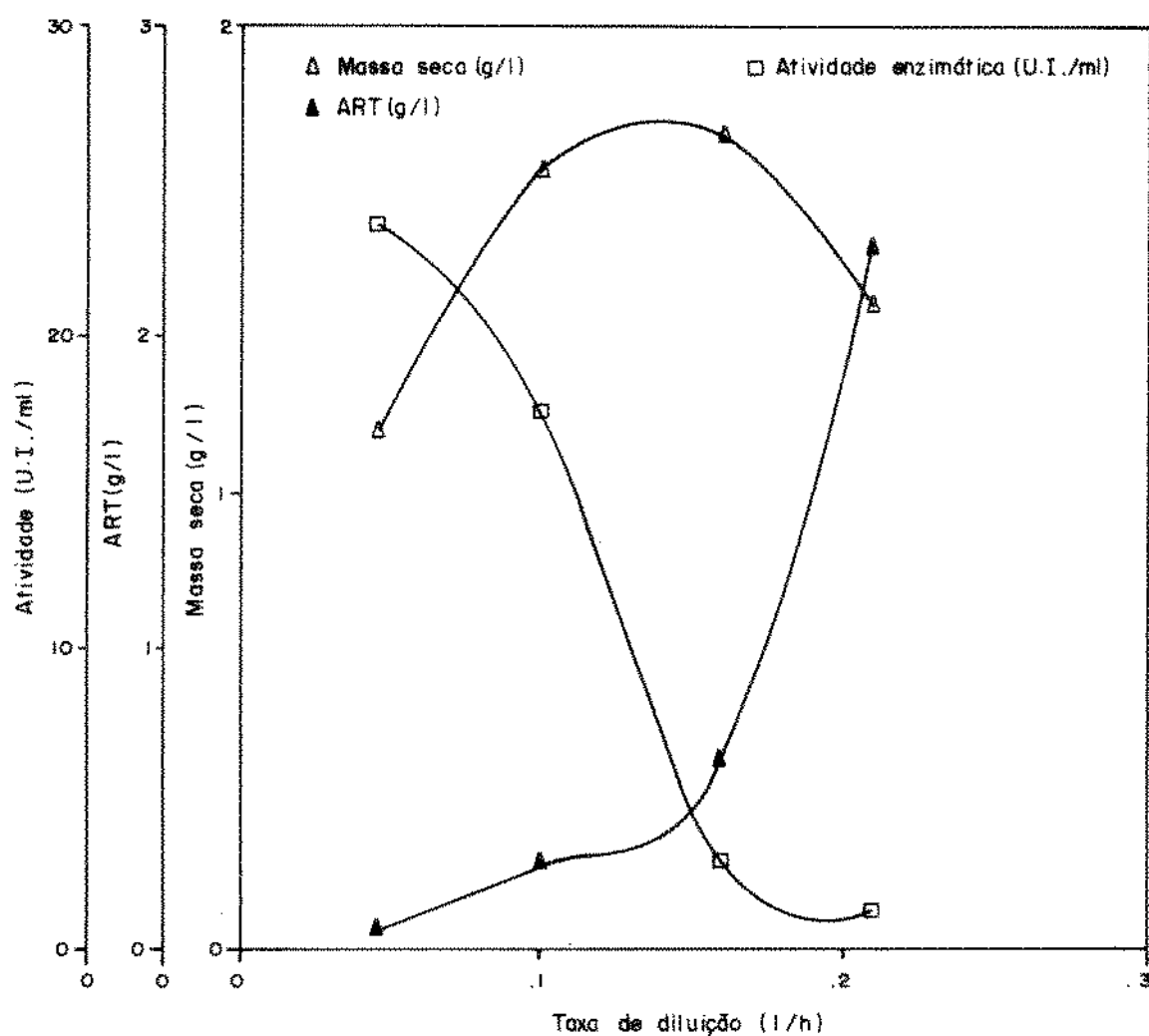


FIGURA 4.57 Influência do substrato glicose, concentração 50,0 g/l.

TABELA 4.36 Influência do substrato glicose, concentração 70,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	ART(g/l)
0,046	1,40	18,22	0,088
0,10	1,70	1,8	2,51

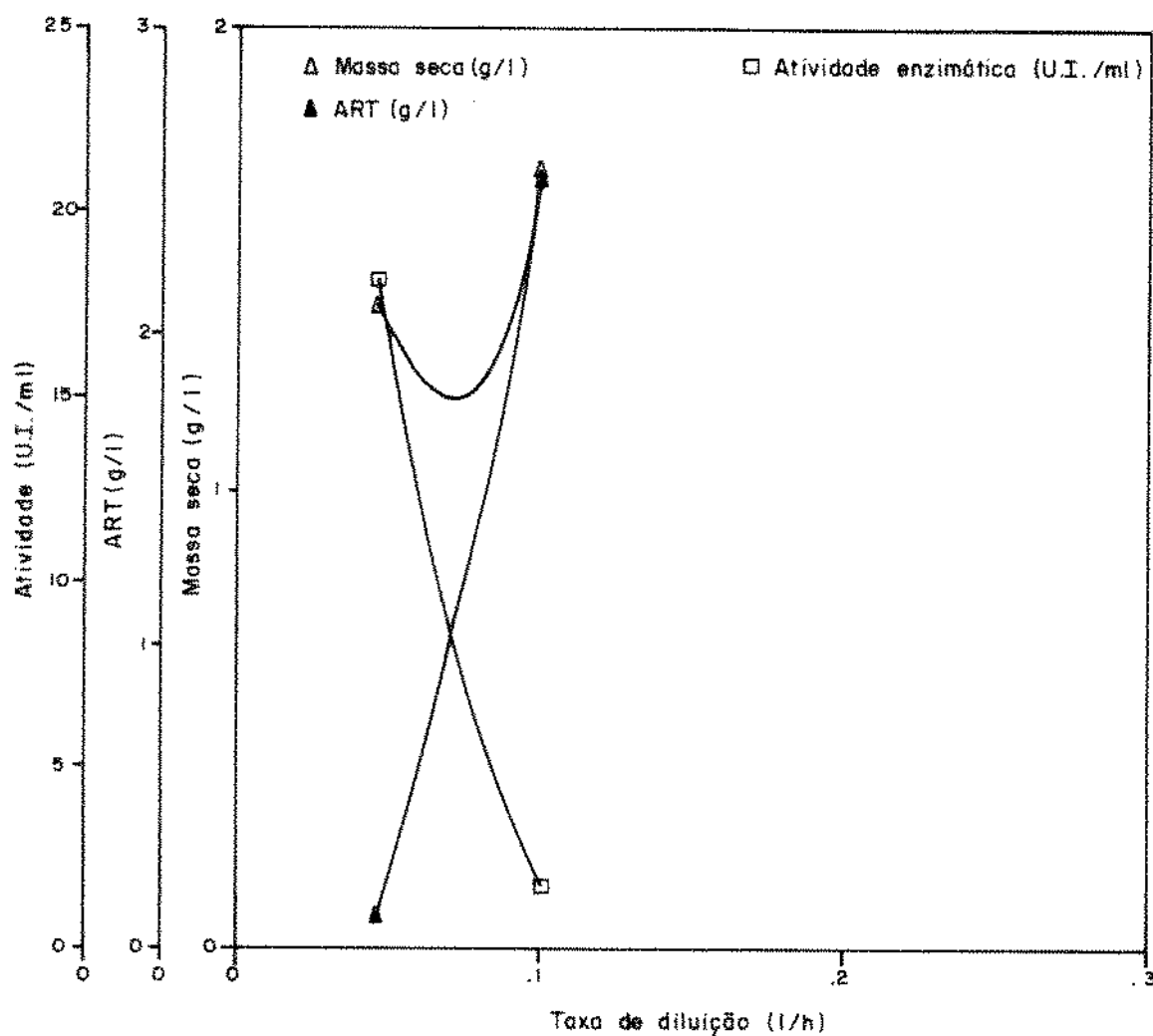


FIGURA 4.58 Influência do substrato glicose, concentração 70,0 g/l.

4.5.3.3 - Estudo da influência do substrato frutose através da técnica de degrau.

Ao analisarmos a FIGURA 4.59 e TABELA 4.37, verifica-se que no caso da concentração 10,0 g/l de frutose, a massa seca, o açúcar redutor total e atividade enzimática, praticamente não mostram variações até a taxa de diluição de 0,21 h⁻¹, sendo que a partir desse ponto, em que o acúmulo de açúcar no meio começa a ser mais efetivo, ocorre uma ligeira queda da atividade.

No caso de 30,0 g/l de frutose, a FIGURA 4.60 e TABELA 4.38, nota-se uma pequena variação na massa celular e que um pequeno acúmulo de açúcar provoca uma forte inibição na produção da enzima.

Para as concentrações de 50,0 g/l e 70,0 g/l, as FIGURAS 4.61 e 4.62 e TABELAS 4.39 e 4.40, mostram que para baixas taxas de diluição a atividade enzimática sofre queda brusca.

TABELA 4.37 Influência do substrato frutose, concentração 10,0g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	ART(g/l)
0,046	0,95	13,96	0,139
0,10	0,48	14,12	0,149
0,16	0,59	14,26	0,166
0,21	0,54	14,21	1,760
0,27	0,51	11,21	3,310

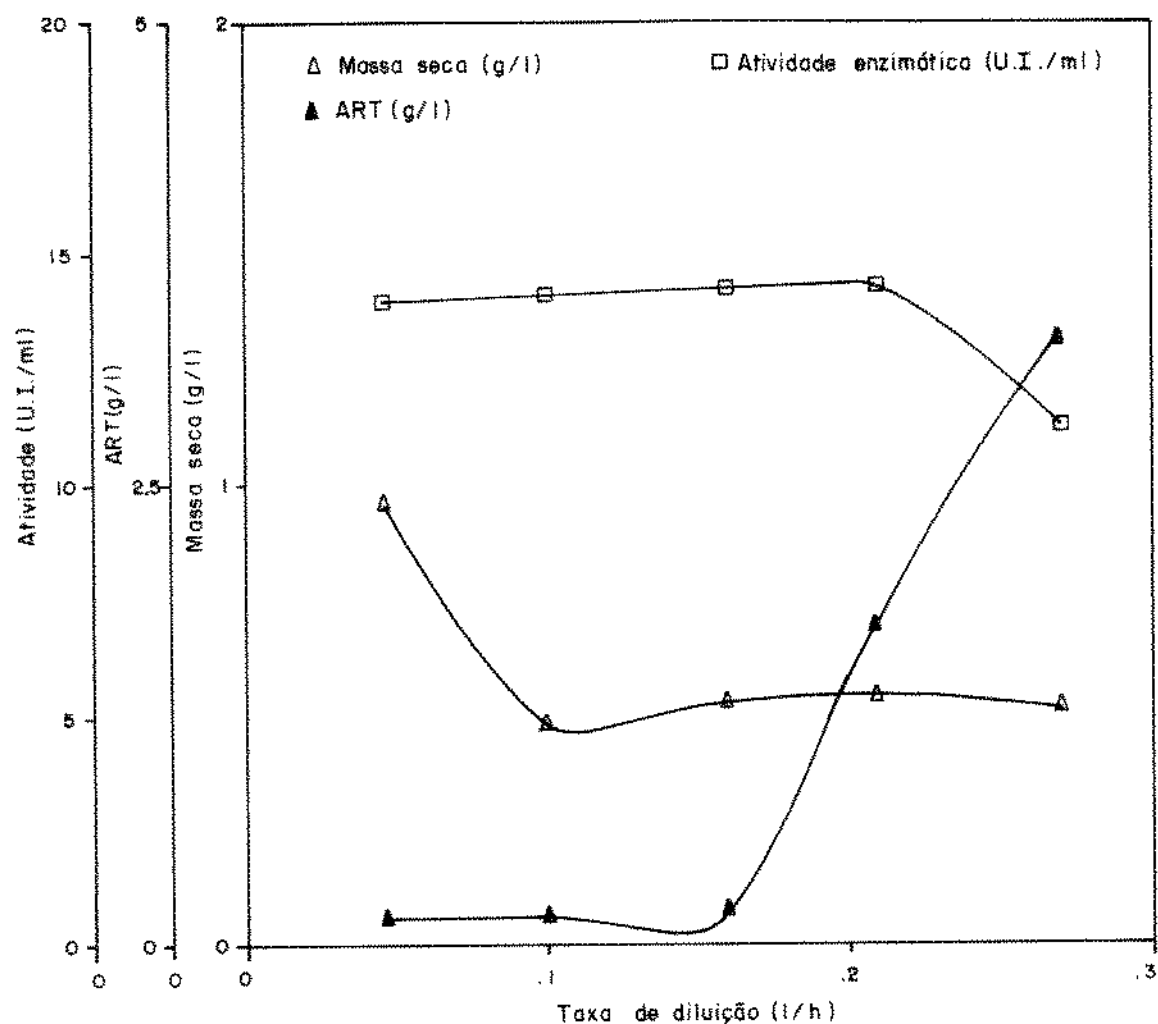


FIGURA 4.59 Influência do substrato frutose, concentração 10,0 g/l.

TABELA 4.38 Influência do substrato frutose, concentração 30,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	ART(g/l)
0,046	1,28	29,00	0,259
0,10	1,36	26,00	0,357
0,16	1,29	29,54	0,228
0,21	1,42	6,84	1,260
0,27	1,44	2,77	3,470

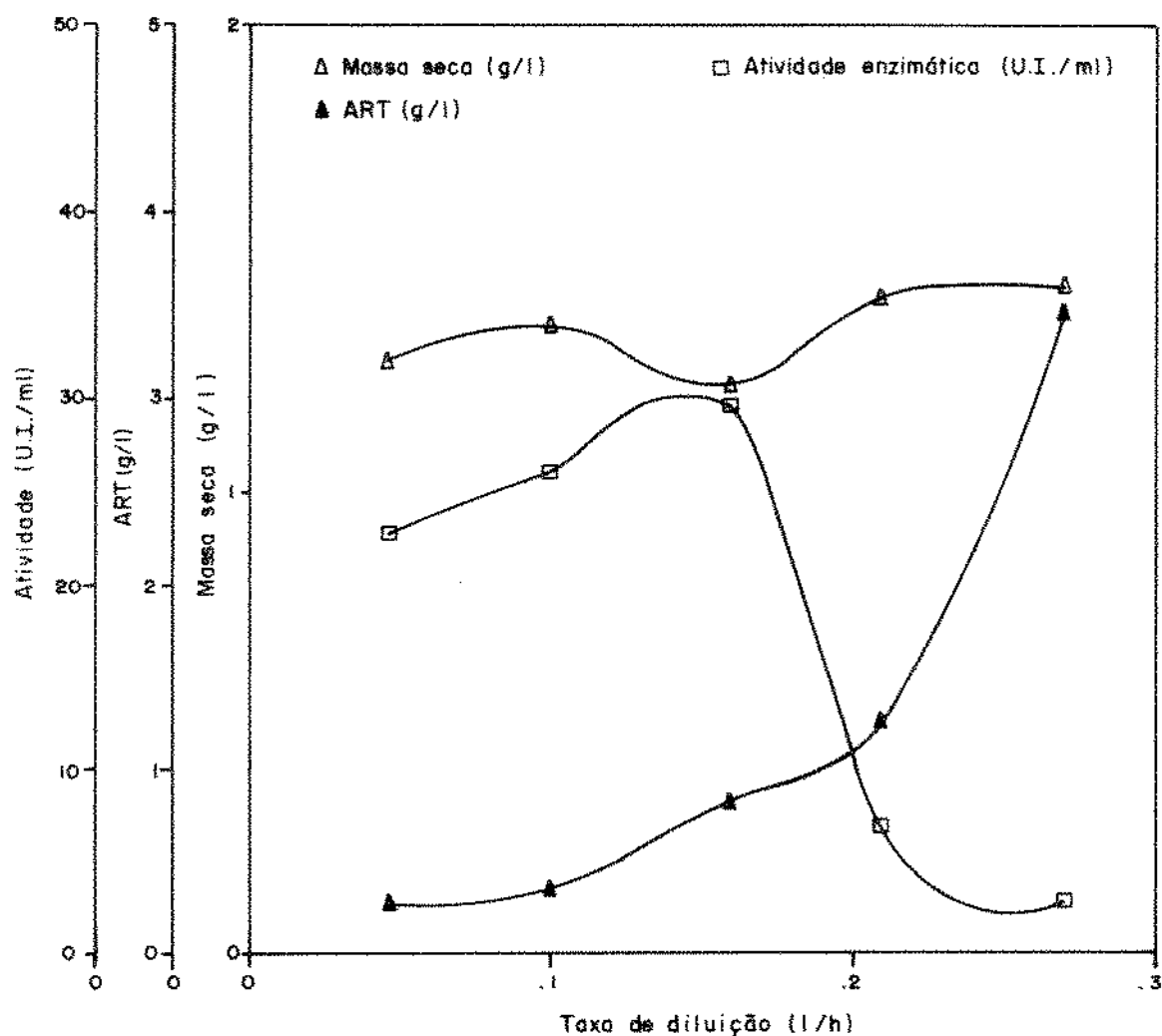


FIGURA 4.60 Influência do substrato frutose, concentração 30,0 g/l.

TABELA 4.39 Influência do substrato frutose, concentração 50,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	ART(g/l)
0,040	1,07	14,70	0,383
0,10	1,45	36,52	0,445
0,16	1,37	5,69	1,496
0,21	1,12	0,0	17,630

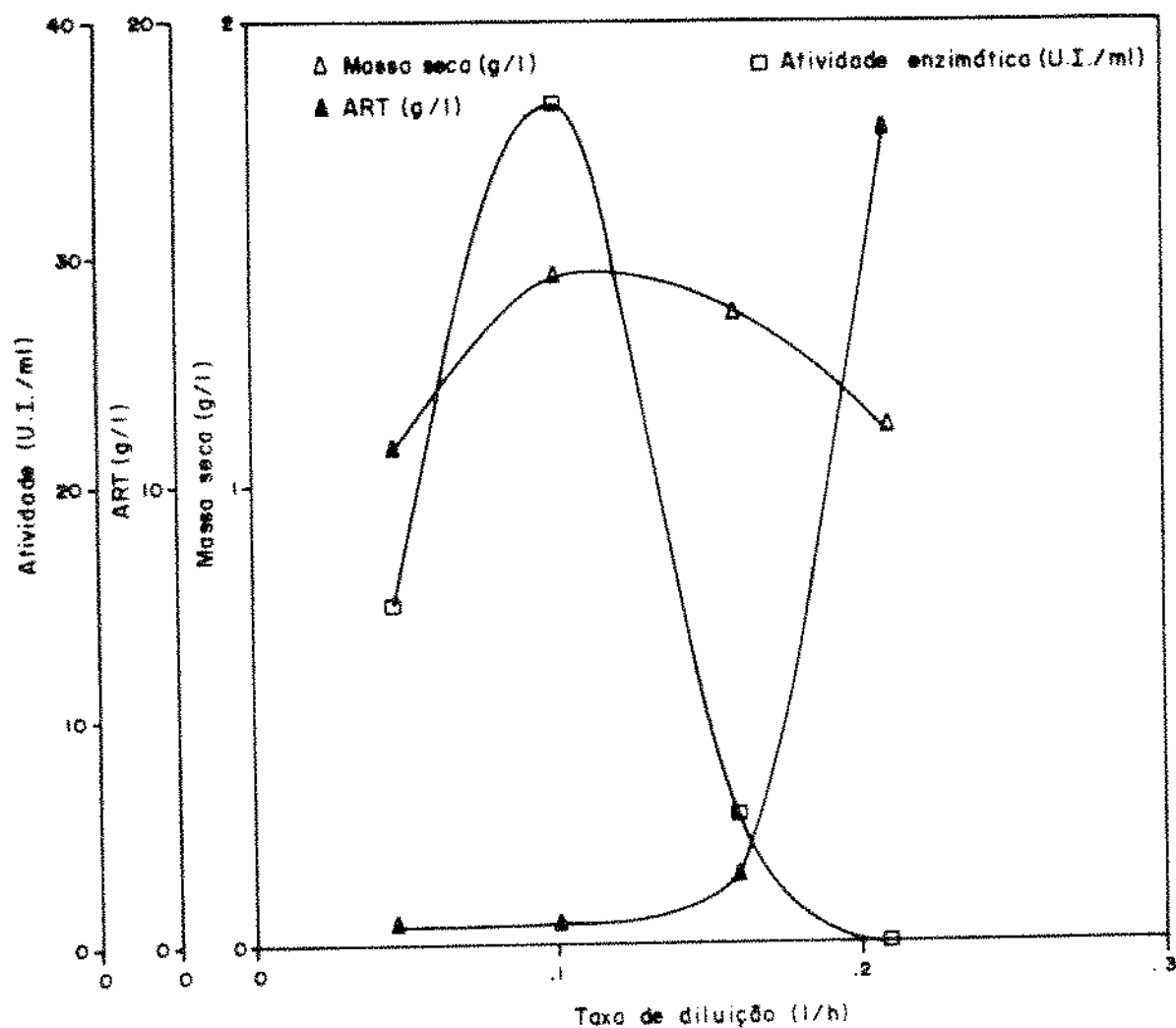


FIGURA 4.61 Influência do substrato frutose, concentração 50,0 g/l.

TABELA 4.40 Influência do substrato frutose, concentração 70,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I./ml)	ART(g/l)
0,046	1,22	0,14	0,051
0,10	2,26	19,68	0,910
0,16	1,72	0,0	0,875

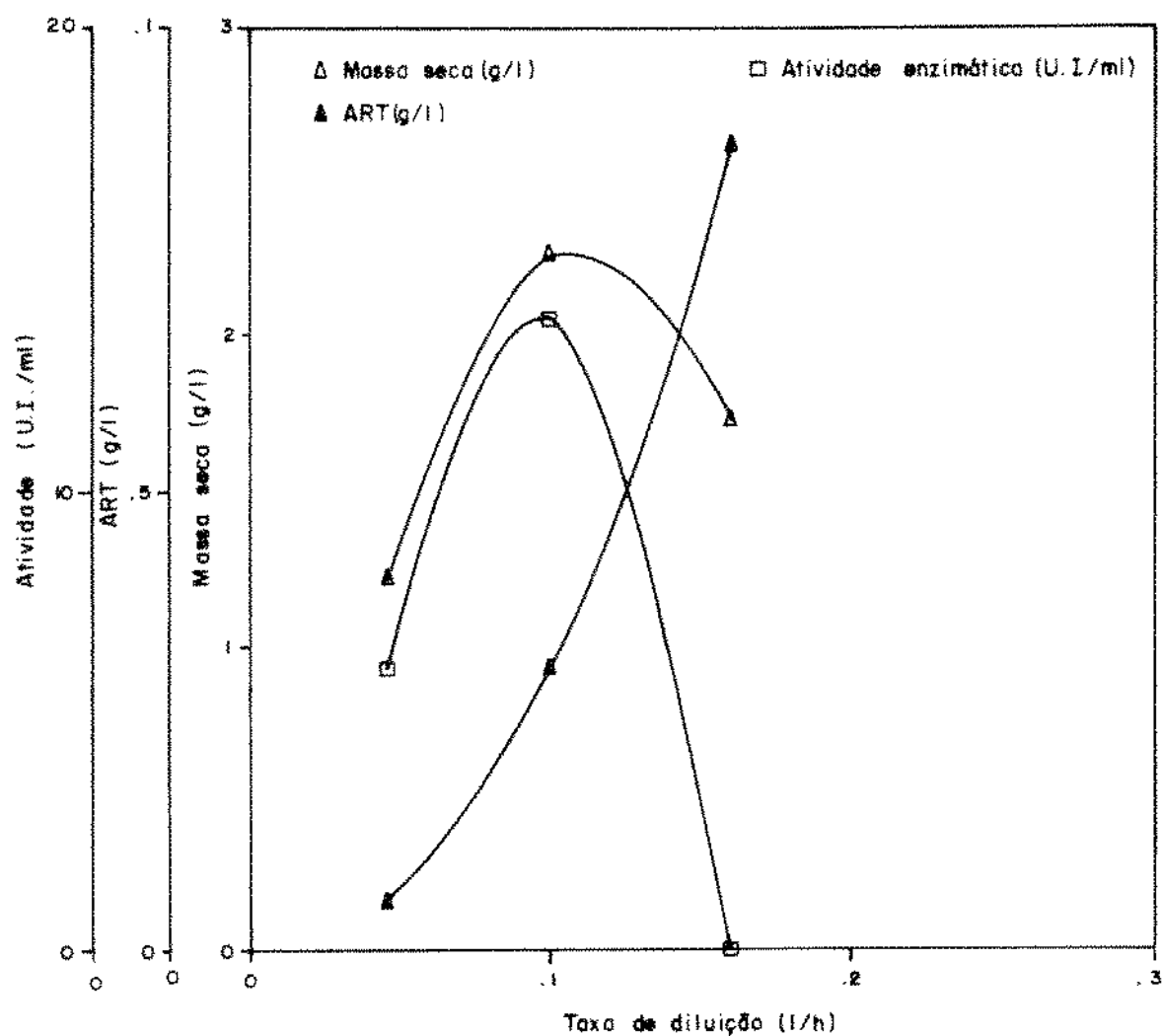


FIGURA 4.62 Influência do substrato frutose, concentração 70,0 g/l.

4.6 - Modelagem do crescimento celular e da produção da enzima invertase por *Kluyveromyces fragilis*.

4.6.1 - Determinação dos parâmetros $\mu_{\text{máx.}}$ e K_s para o substrato sacarose.

Para a concentração 10,0 g/l de sacarose, os valores obtidos estão relacionados na tabela abaixo.

TABELA 4.41 Experimento utilizando concentração de sacarose 10,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Sac(mol/l)
0,046	0,40	8,95	$8,9 \cdot 10^{-5}$
0,10	0,50	15,87	$1,0 \cdot 10^{-4}$
0,16	0,51	17,64	$2,8 \cdot 10^{-4}$
0,21	0,50	11,80	$1,4 \cdot 10^{-2}$
0,27	0,50	4,80	$1,9 \cdot 10^{-2}$

Sabendo-se que no regime estacionário $\mu = D$, pode-se então traçar uma curva de μ em função do substrato (S) (FIGURA 4.63), ou então, traçar $1/\mu$ em função de $1/S$, como descrito pelo método de linearização de LINEWEAVER-BURK (FIGURA 4.64).

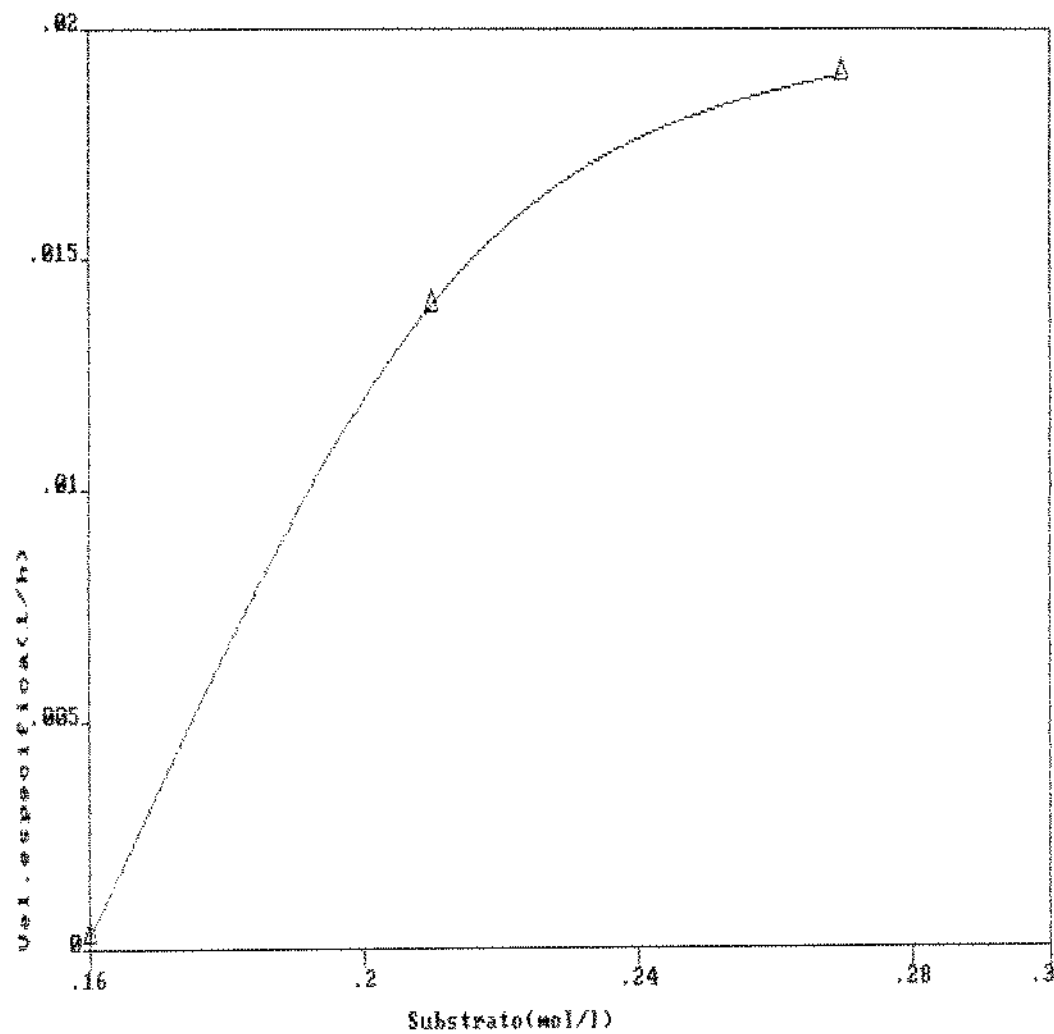


FIGURA 4.63 Velocidade específica de crescimento em função da concentração do substrato.

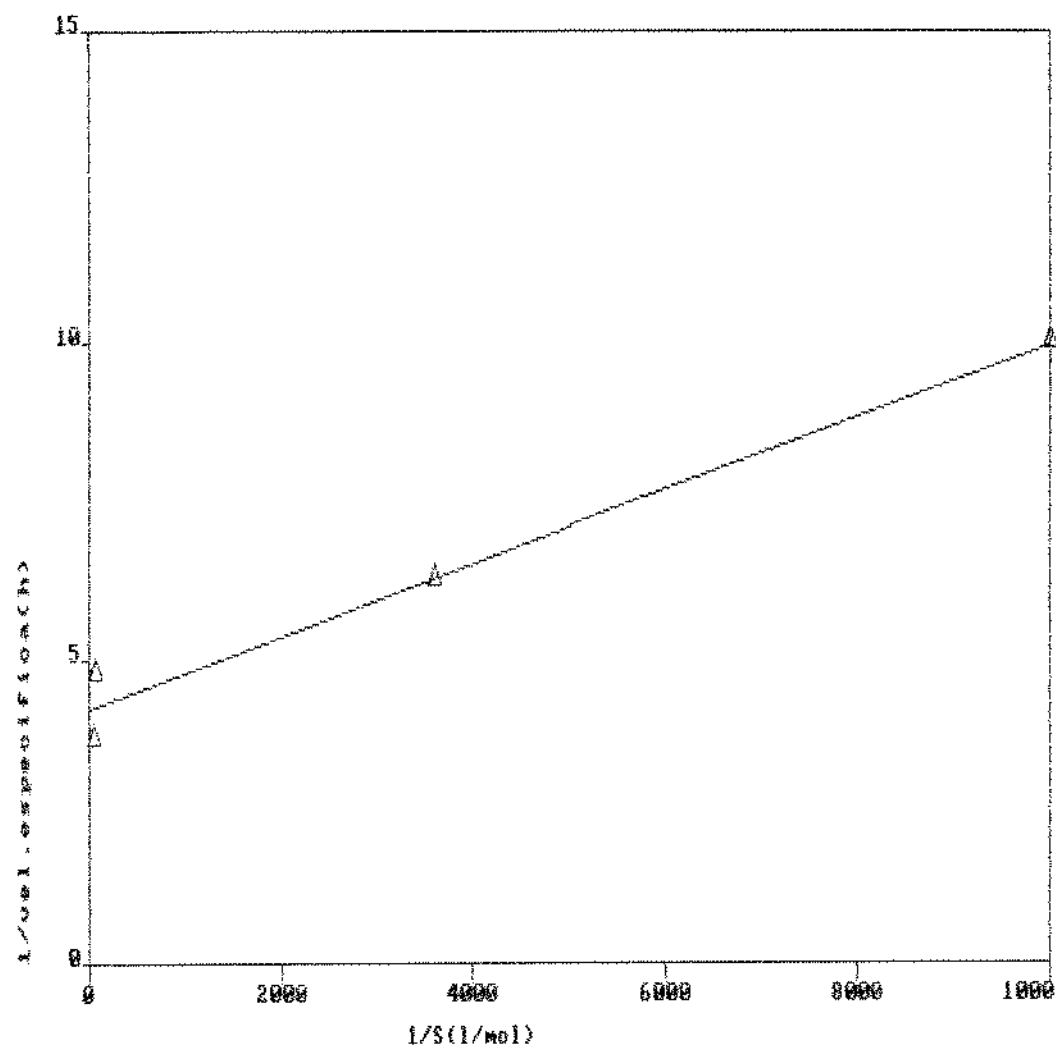


FIGURA 4.64 Gráfico de $1/\mu$ em função de $1/S$ para substrato sacarose, concentração 10,0 g/l.

Da análise da FIGURA 4.64, e fazendo-se uma regressão linear, obtém-se para $\mu_{\text{máx}}$ o valor de $0,239 \text{ h}^{-1}$ e para K_s o valor de $1,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$, para um fator de correlação de 0,988.

Para a concentração de sacarose de 30,0 g/l, os resultados encontram-se reunidos na TABELA 4.42.

TABELA 4.42 Experimento utilizando concentração de sacarose 30,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Sac(mol/l)
0,046	0,98	19,3	$9,4 \cdot 10^{-5}$
0,10	1,0	29,34	$9,5 \cdot 10^{-5}$
0,16	1,3	25,96	$1,3 \cdot 10^{-4}$
0,21	1,48	4,50	$2,7 \cdot 10^{-2}$
0,27	1,36	1,15	$4,8 \cdot 10^{-2}$

Utilizando-se dos mesmos procedimentos feitos anteriormente, determinamos para essa concentração os valores de $0,247 h^{-1}$ e $1,18 \cdot 10^{-4} mol/l$, para $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_s respectivamente, sendo o coeficiente de correlação igual a 0,90.

Para a concentração de sacarose de 50,0 g/l, os resultados estão reunidos na TABELA 4.43.

TABELA 4.43 Experimento utilizando concentração de sacarose 50,0 g/l.

$D(h^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Sac(mol/l)
0,046	1,40	16,94	$3,3 \cdot 10^{-4}$
0,10	1,56	13,37	$3,3 \cdot 10^{-4}$
0,16	1,67	6,62	$3,4 \cdot 10^{-4}$
0,21	0,96	1,7	$4,1 \cdot 10^{-2}$
0,27	0,85	0,82	$5,7 \cdot 10^{-2}$

Usando-se dos mesmos procedimentos anteriores, chega-se aos valores de $0,238 h^{-1}$ e $1,64 \cdot 10^{-4}$ para $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_s , respectivamente, para um coeficiente de correlação igual a 0,91.

Verifica-se através dos resultados obtidos, que os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_s para as concentrações estudadas não tiveram uma variação muito grande, sendo que calcula-se então os valores médios tanto para $\mu_{m\acute{a}x}$ como para K_s . Os valores médios

encontrados foram : $\mu_{m\acute{a}x} = 0,241 \text{ h}^{-1}$ e $K_s = 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$.

Para a concentração de 70,0 g/l de sacarose, assim como para glicose e frutose, percebe-se um forte desvio da tendência anterior, fazendo com que os valores se distanciem dos valores médios calculados, provavelmente devido a fatores que vão além da simples influência da concentração do substrato na cinética de crescimento. Optou-se por não se aprofundar mais neste problema, atendo-se somente aos dados anteriores.

4.6.2 - Determinação dos parâmetros $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_s para o substrato glicose.

No caso do substrato glicose foram utilizadas as concentrações de 30,0 g/l e 50,0 g/l para cálculo das constantes cinéticas. Os valores utilizados encontram-se reunidos nas TABELAS 4.44 , 4.45 e 4.46.

TABELA 4.44 Experimento utilizando substrato glicose, concentração 10,0 g/l.

$D(\text{h}^{-1})$	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Glic(mol/l)
0,046	0,64	8,14	$4,3 \cdot 10^{-4}$
0,10	0,48	19,94	$5,8 \cdot 10^{-4}$
0,16	0,46	10,98	$7,5 \cdot 10^{-4}$
0,21	0,46	6,06	$1,4 \cdot 10^{-2}$
0,27	0,46	0,00	$2,7 \cdot 10^{-2}$

TABELA 4.45 Experimento utilizando substrato glicose, concentração 30,0 g/l.

D(h ⁻¹)	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Glic(mol/l)
0,046	0,85	14,05	6,6*10 ⁻⁴
0,10	1,07	23,84	6,6*10 ⁻⁴
0,16	1,14	22,29	1,15*10 ⁻³
0,21	1,16	1,0	7,7*10 ⁻³

TABELA 4.46 Experimento utilizando substrato glicose, concentração 50,0 g/l.

D(h ⁻¹)	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Glic(mol/l)
0,046	1,13	23,68	3,7*10 ⁻⁴
0,10	1,69	17,60	1,5*10 ⁻³
0,16	1,76	2,84	3,4*10 ⁻³
0,21	1,40	1,25	1,27*10 ⁻²

Usando o mesmo procedimento anterior, chega-se aos seguintes valores de $\mu_{\text{máx}}$ e K_s nas concentrações estudadas. Para concentração de 10,0 g/l, determinou-se $\mu_{\text{máx}} = 0,256 \text{ h}^{-1}$ e $K_s = 7,014*10^{-4} \text{ mol/l}$, para um coeficiente de correlação de 0,91. Para concentração de 30,0 g/l os valores determinados foram $0,259 \text{ h}^{-1}$ e $9,84*10^{-4} \text{ mol/l}$ para $\mu_{\text{máx}}$ e K_s , respectivamente, para um coeficiente de correlação de 0,96. Para a concentração de 50,0 g/l encontrou-se os valores de $0,231 \text{ h}^{-1}$ e $1,76*10^{-3} \text{ mol/l}$ para $\mu_{\text{máx}}$ e K_s , respectivamente, para um coeficiente de correlação de 0,998.

Os valores médios obtidos para os parâmetros $\mu_{\text{máx}}$ e K_s foram, respectivamente, $0,248 \text{ h}^{-1}$ e $1,15*10^{-3} \text{ mol/l}$.

4.6.3 - Determinação dos parâmetros $\mu_{\text{máx}}$ e K_s para o substrato frutose.

As concentrações de 10,0 g/l, 30,0 g/l e 50,0 g/l apresentaram os melhores dados para obtenção dos parâmetros estudados, sendo que os mesmos encontram-se reunidos nas TABELAS 4.47, 4.48 e 4.49.

TABELA 4.47 Experimento utilizando substrato frutose, concentração 10,0 g/l.

D(h ⁻¹)	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Frut(mol/l)
0,046	0,95	13,96	7,7*10 ⁻⁴
0,10	0,48	14,12	8,9*10 ⁻⁴
0,16	0,53	14,26	9,2*10 ⁻⁴
0,21	0,54	14,21	9,7*10 ⁻³
0,27	0,51	11,21	1,8*10 ⁻²

TABELA 4.48 Experimento utilizando substrato frutose, concentração 30,0 g/l.

D(h ⁻¹)	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Frut(mol/l)
0,046	1,28	29,00	1,44*10 ⁻³
0,10	1,36	26,00	1,98*10 ⁻³
0,16	1,29	39,54	2,40*10 ⁻³
0,21	1,42	6,84	7,00*10 ⁻³
0,27	1,44	2,77	1,99*10 ⁻²

TABELA 4.49 Experimento utilizando substrato frutose, concentração de 50,0 g/l.

D(h ⁻¹)	Massa seca(g/l)	Atv(U.I/ml)	Frut(mol/l)
0,046	1,07	14,79	2,1*10 ⁻³
0,10	1,45	36,52	2,5*10 ⁻³
0,16	1,37	5,69	8,9*10 ⁻³
0,21	1,12	0,0	9,8*10 ⁻²

Os valores obtidos para as concentrações foram:

- Para a concentração de 10,0 g/l o valor obtido para $\mu_{\text{máx}}$ foi de $0,246 \text{ h}^{-1}$ e o do K_s de $5,01 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$.

- Para a concentração de 30,0 g/l os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e K_s encontrados foram, respectivamente, $0,282 \text{ h}^{-1}$ e $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$.

- Para a concentração de 50,0 g/l os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e K_s encontrados foram, respectivamente, $0,216 \text{ h}^{-1}$ e $2,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. O valor médio de $\mu_{\text{máx}}$ para o substrato frutose foi de $0,248 \text{ h}^{-1}$ e o K_s foi de $1,77 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$.

A TABELA 4.50 traz os valores de parâmetros cinéticos ($\mu_{\text{máx}}$ e K_s) para os diferentes substratos estudados.

TABELA 4.50 Valores de parâmetros cinéticos obtidos.

	Sacarose	Glicose	Frutose
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	0,241	0,248	0,248
$K_s (\text{mol/l})$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,15 \cdot 10^{-3}$	$1,77 \cdot 10^{-3}$

Partindo da consideração de que se está cultivando *Kluyveromyces bulgaricus* a partir de sacarose e que a presença da enzima invertase extracelular irá produzir glicose e frutose, o resultado será então um substrato misto formado por sacarose, glicose e frutose. Assim sendo, o modelo de crescimento deverá englobar estes três açúcares. Pode-se então prever que a equação será a do tipo :

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{G}{K_G + G} \cdot \frac{F}{K_F + F} \quad (4.12)$$

onde as constantes $\mu_{\text{máx}}$, K_S , K_G e K_F serão as da TABELA 4.50. No caso de $\mu_{\text{máx}}$, ela será única e próxima de $0,24 \text{ h}^{-1}$.

Com vistas a uma simplificação pode-se tomar G e F desprezíveis quando o substrato é sacarose, pois estão sendo consumidos à medida que estão sendo produzido. Desta forma a equação (4.12) torna-se a equação de Monod.

$$D = \mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_S + S} \quad (4.13)$$

4.6.4 - Modelo de produção da enzima invertase.

Para expressar matematicamente a cinética de produção de um metabólito deve-se levar em conta que a produção e o crescimento e/ou concentração do microrganismo são interrelacionados segundo a classificação de Gaden, citado por Aiba (3). Luedking e Piret, citado por Moser (87), associaram os parâmetros da seguinte forma:

$$1/X \, dP/dt = \alpha \, dX/dt \cdot 1/X + \beta X \cdot 1/X \quad (4.14)$$

$$1/X \, dP/dt = \alpha \mu + \beta \quad (4.15)$$

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (4.16)$$

Os valores de q_p calculados experimentalmente para os açúcares sacarose, glicose e frutose encontram-se reunidos nas TABELAS 4.51, 4.52 e 4.53.

TABELA 4.51 Valores de q_p calculados para sacarose (30,0 g/l).

$D(h^{-1})$	Sacarose(mol/l)	$q_p (U.I/g_{cél} \cdot h) \cdot 10^{-3}$
0,046	$9,4 * 10^{-5}$	0,90
0,10	$9,5 * 10^{-5}$	2,99
0,16	$1,9 * 10^{-4}$	9,20
0,21	$2,7 * 10^{-2}$	0,64
0,27	$4,8 * 10^{-2}$	0,29

TABELA 4.52 Valores de q_p calculados para glicose (30,0 g/l)

$D(h^{-1})$	Glicose(mol/l)	$q_p (U.I/g_{cél} \cdot h) \cdot 10^{-3}$
0,046	$6,6 * 10^{-4}$	0,76
0,10	$6,6 * 10^{-4}$	2,22
0,16	$1,1 * 10^{-3}$	9,18
0,21	$7,7 * 10^{-3}$	0,18

TABELA 4.53 Valores de q_p calculados para frutose (30,0 g/l)

$D(h^{-1})$	Frutose(mol/l)	$q_p (U.I/g_{cél} \cdot h) \cdot 10^{-3}$
0,046	$1,44 * 10^{-3}$	0,89
0,10	$2,40 * 10^{-3}$	1,91
0,16	$2,40 * 10^{-3}$	9,66
0,21	$7,00 * 10^{-3}$	1,00
0,27	$1,99 * 10^{-3}$	0,52

Graficando-se os valores de q_p em função da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ), obtem-se as FIGURAS 4.65 , 4.66 e 4.67.

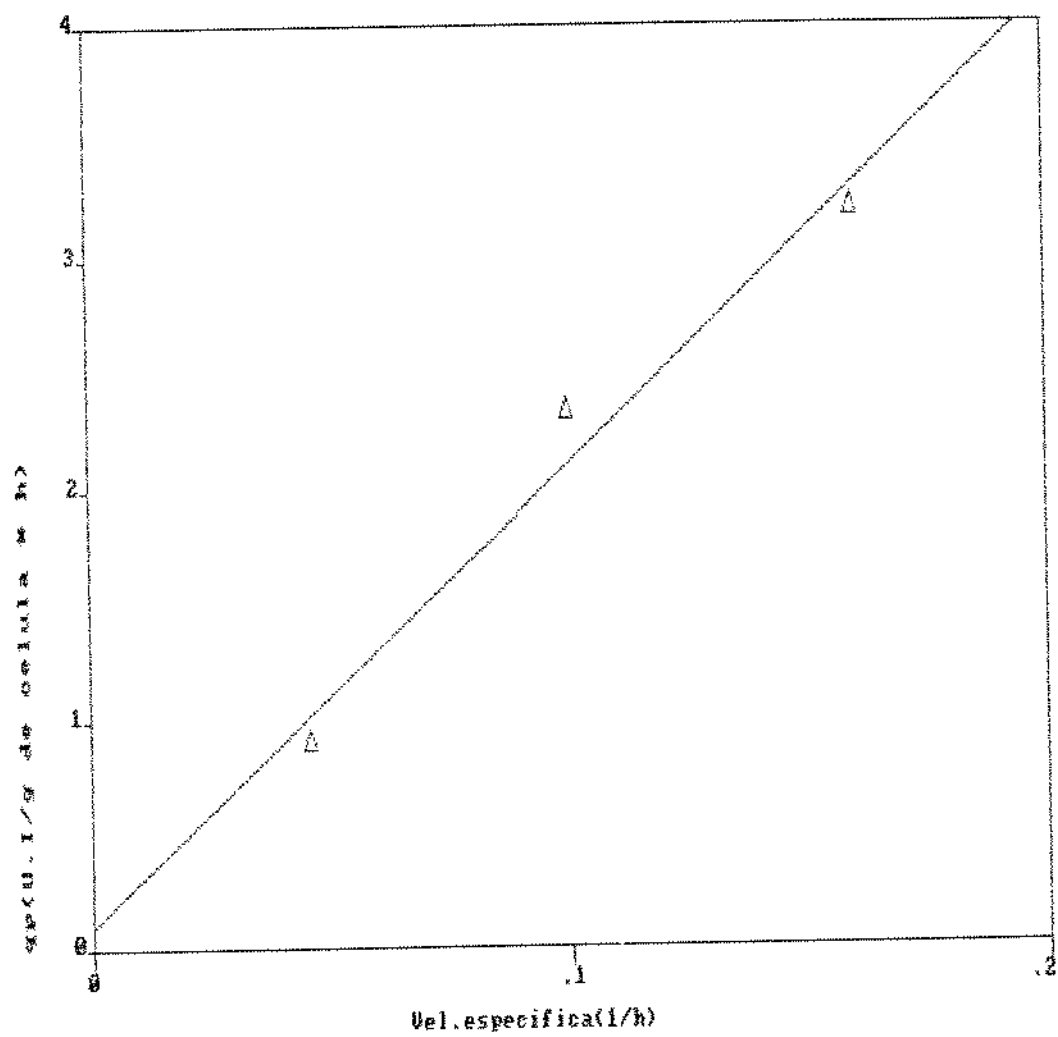


FIGURA 4.65 Valores de q_p em função de μ para substrato sacarose, concentração 30,0 g/l.

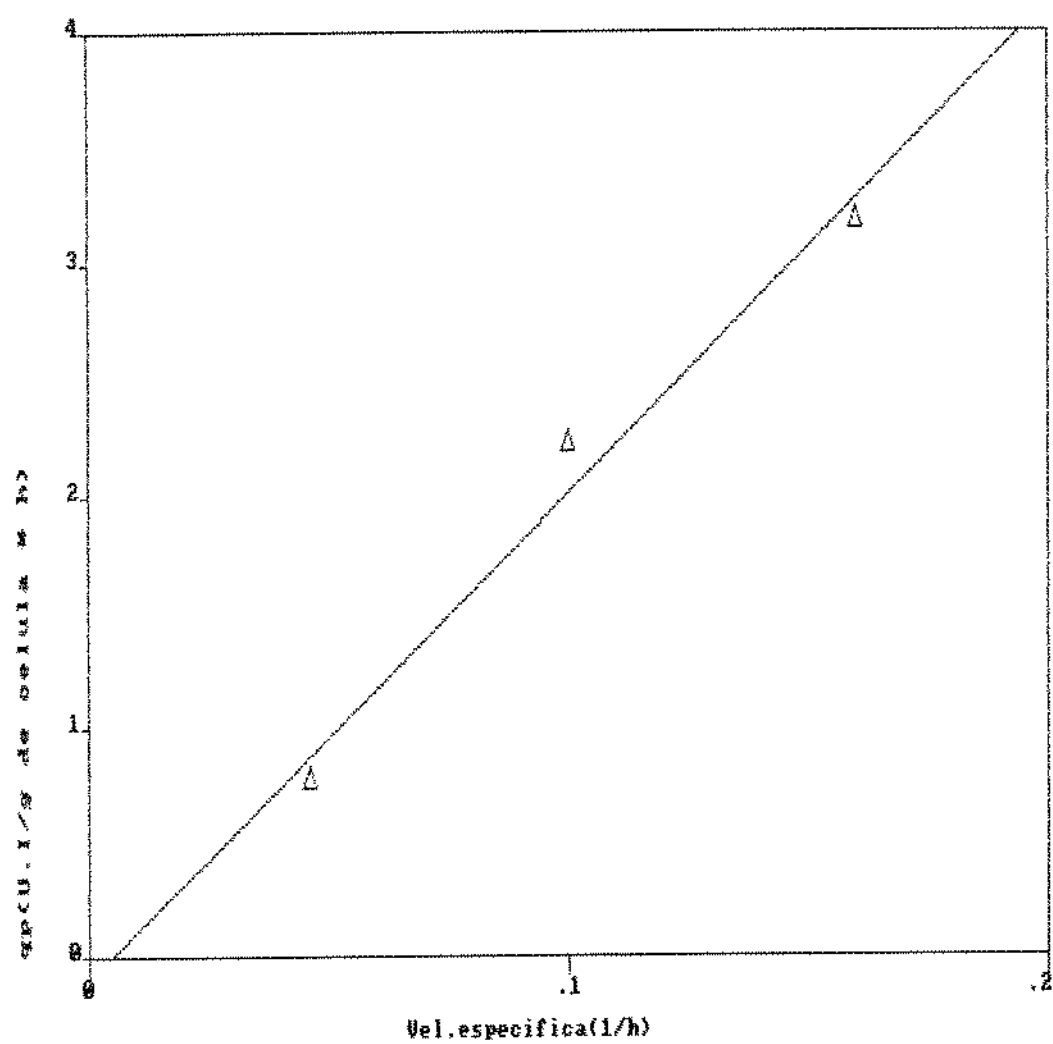


FIGURA 4.66 Valores de q_p em função de μ para substrato glicose, concentração 30,0 g/l.

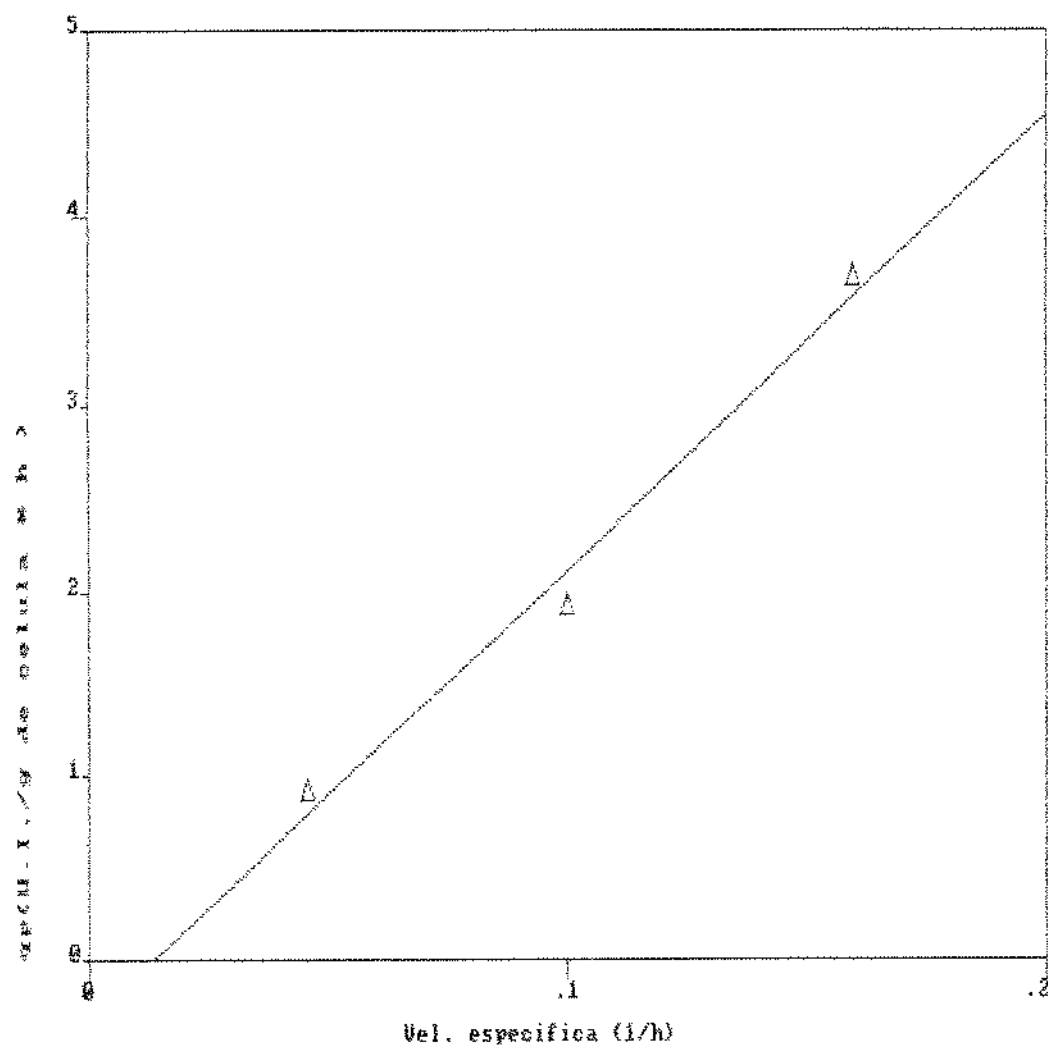


FIGURA 4.67 Valores de q_p em função de μ para substrato frutose, concentração 30,0 g/l.

Das FIGURAS 4.65, 4.66 e 4.67, pode-se tirar os valores de α e β para a parte da curva onde não ocorre inibição

pelo substrato. Os valores de α e β encontrados para sacarose, glicose e frutose foram respectivamente 20070, 21131 e 24388 U.I./ $\xi_{cél}$. Os valores de α calculados são bem próximos, de forma que se pode tomar um valor médio ($\alpha \cong 21000$), enquanto que β foi desprezível, ou seja, $\alpha \gg \beta$ indica que a produção da enzima está diretamente associada ao crescimento do microrganismo e pode ser representada como:

$$q_p = \alpha \mu \quad (4.17)$$

ou ainda

$$q_p = q_{p\max} \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{G}{K_G + G} \cdot \frac{F}{K_F + F} \quad (4.18)$$

$$\text{onde } q_{p\max} = \alpha \mu_{\max}$$

No entanto, existe uma parte das curvas onde se observou inibição da produção de enzima, muito embora não tenha sido observado inibição do crescimento. Trabalhando-se nesta parte das curvas, ou seja, numa concentração do substrato na qual o fenômeno de inibição é predominante, nota-se um ajuste de q_p a um modelo exponencial do tipo:

$$q_p = q_{p\max} e^{-S/K_i} \quad (4.19)$$

onde K_i é a constante de inibição

Os valores de K_{Si} (constante de inibição para sacarose), K_{Gi} (constante de inibição para glicose) e K_{Fi} (constante de inibição para frutose) são:

$$K_{Si} = 0,0181 \text{ mol/l}$$

$$K_{Gi} = 0,0023 \text{ mol/l}$$

$$K_{Fi} = 0,0097 \text{ mol/l}$$

Assim a equação final que representa a produtividade específica será:

$$q_p = q_{p\max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{G}{K_o + G} \cdot \frac{F}{K_F + F} e^{-(S/K_{Si} + G/K_{Gi} + F/K_{Fi})} \quad (4.20)$$

4.7 - Caracterização da enzima invertase produzida
por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045.

4.7.1 - Purificação com etanol.

A atividade inicial do caldo fermentado isento de células era de 8,85 U.I./ml, sendo que foram utilizados volumes de 10 ml para verificar qual a porcentagem ideal de álcool para precipitar a proteína. A TABELA 4.54 fornece os resultados obtidos.

TABELA 4.54 Porcentagem de etanol utilizado para precipitação da enzima e rendimento correspondente.

Alcool(%)	Atividade final(U.I./ml)	Rendimento(%)
20	8,35	97,74
30	8,45	98,20
40	8,35	97,74
50	8,60	98,87
60	9,05	91,81
70	8,90	80,45

Obteve-se maior rendimento com a concentração de etanol a 60%, concordando com os valores da atividade enzimática. O resultado obtido nesta concentração é maior que os obtidos em trabalhos anteriores, significando um maior rendimento com menor concentração de etanol.

Conhecendo-se a melhor concentração de etanol para precipitação da proteína, partiu-se para a obtenção de um maior volume de proteína precipitada. Obteve-se um caldo fermentado, cuja atividade enzimática era de 10,43 U.I./ml, totalizando 720 ml. Após a precipitação, foi obtido uma atividade enzimática

igual a 32,4 U.I./ml e o volume final após ressuspensão em tampão, igual a 200 ml. O rendimento para essa etapa foi de 86,30%. Em seguida secou-se o precipitado em estufa à vácuo, obtendo-se um composto seco cuja atividade foi de 3115 U.I./g de composto.

Foi calculado então o rendimento de secagem, partindo de um peso inicial igual a 1,040 g, obtendo um rendimento de 92 % . O rendimento total do processo acima pode ser calculado através do produto dos rendimentos nas duas etapas, atingindo um valor de 79,4 % .

4.7.2 - Purificação em coluna de troca iônica.

A FIGURA 4.68 apresenta a atividade enzimática e proteína em função do número de amostras, após eluição da enzima com solução de NaCl, para a coluna de 1.5 cm de diâmetro e 20 cm de altura.

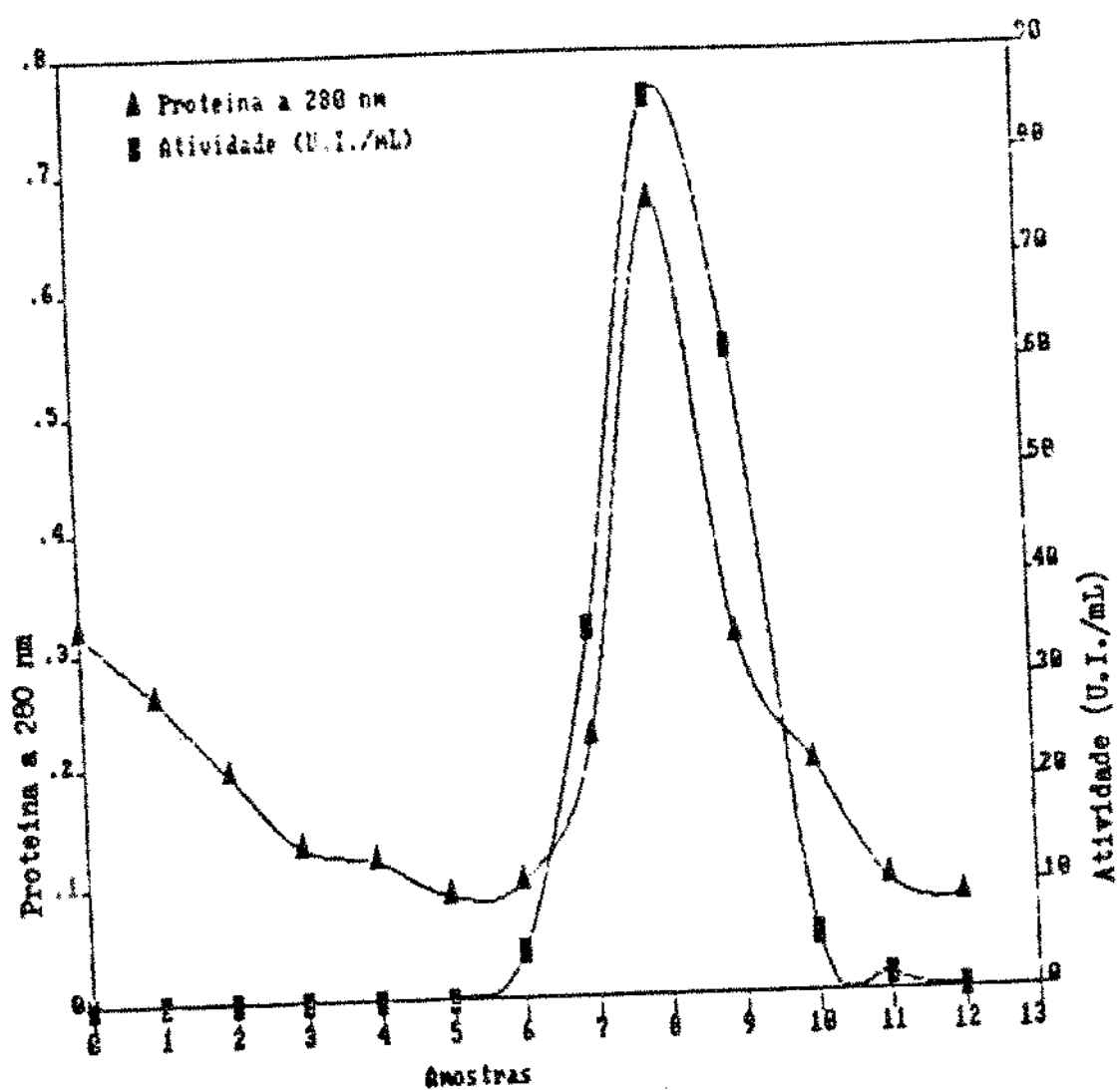


FIGURA 4.68 Purificação da enzima invertase em coluna DEAE-celulose.

Para a coluna de diâmetro 2 cm e altura 27 cm, foram colocados 4 ml da solução enzimática com atividade igual a 181 U.I./ml. totalizando 724 U.I./ml. Após passagem da amostra através da coluna, a enzima que ficou retida, foi retirada da coluna com gradiente salino de NaCl (1.2 M). As frações que apresentavam atividade foram agrupadas, formando um volume de 17,5 ml com uma atividade de 37,71 U.I./ml, totalizando 660 U.I, permitindo obter um rendimento de 91,16 % .

Em seguida precipitou-se com etanol, obtendo-se uma solução enzimática de 4 ml com 137,2 U.I./ml, totalizando 549 U.I. Em relação a etapa anterior obtivemos um rendimento de 83,18 %. Os resultados das etapas de purificação da enzima encontram-se reunidos na TABELA 4.55.

TABELA 4.55 Etapas de purificação da enzima.

Etapa	Vol(ml)	Atv(U.I./ml)	Prot(mg/ml)	Atvesp(U.I./mgprot)	Purif
1	480	31,14	8,54	3,65	1
2	20	181,00	3,48	52,00	14,25
3	17,50	37,71	1,07	35,24	9,65
4	4	137,20	0,20	686,00	187,90

Como pode-se observar através da TABELA 4.55, a atividade específica na etapa de número 3 sofreu uma queda em relação a anterior, demonstrando com isso, a necessidade de se melhorar o processo de purificação.

4.7.3 - Estabilidade térmica da enzima após precipitação com etanol e após coluna DEAE-celulose seguida de precipitação com etanol.

Realizou-se estudos da estabilidade térmica da enzima invertase com intuito de acompanhar a purificação. Os resultados obtidos encontram-se reunidos nas TABELAS 4.56, 4.57, 4.58 e 4.59.

TABELA 4.56 Estabilidade a temperatura de 56°C.

Tempo(h)	Atividade(U.I/ml)	ln (A/Ao)
0,0	7,71	0,000
0,50	4,75	-0,486
1,00	2,51	-1,124
1,50	1,43	-1,684
1,75	1,06	-1,986
2,00	0,70	-2,400
2,25	0,60	-2,549
2,50	0,34	-3,125

TABELA 4.57 Estabilidade a temperatura de 58°C.

Tempo(min)	Atividade(U.I/ml)	ln (A/Ao)
0,00	8,46	0,000
10,0	6,49	-0,265
30,0	2,52	-1,211
50,0	1,04	-2,096
60,0	0,60	-2,646
70,0	0,38	-3,103
80,0	0,20	-3,745
90,0	0,09	-4,500
100,0	0,05	-5,214

TABELA 4.58. Estabilidade a temperatura de 60°C.

Tempo(min)	Atividade(U.I/ml)	ln (A/Ao)
0,0	3,60	0,000
10,0	1,50	-0,693
20,0	0,50	-1,974
30,0	0,05	-4,310
40,0	0,02	-5,481

TABELA 4.59 Estabilidade a temperatura de 62°C.

Tempo(min)	Atividade(U.I/ml)	ln (A/Ao)
0,0	4,06	0,000
1,0	3,69	-0,096
2,0	3,24	-0,226
3,0	2,79	-0,375
4,0	2,66	-0,423
5,0	2,32	-0,526

As tabelas acima mostram o decaimento com o tempo da atividade enzimática a diferentes temperaturas de incubação.

Considerando cinética de primeira ordem para a inativação térmica, os dados obtidos experimentalmente foram normalizados através da equação :

$$\ln(A/A_0) = K t. \quad (4.21)$$

Obteve-se assim as constantes de desativação K_d pelos coeficientes angulares das retas, como mostrado na TABELA 4.60.

TABELA 4.60 Valores de K_d em função da temperatura.

Temp(°C)	$K_d(1/min)$	$\ln K_d$	$1/T (1/h)$
56	0,0203	-3,897	3,04E-3
58	0,0515	-2,966	3,02E-3
60	0,1460	-1,924	3,00E-3
62	0,1120	-2,189	2,98E-3

Para o cálculo da energia de desativação da enzima, colocou-se os dados na forma da equação de Arrhenius e graficou-se em função da temperatura (FIGURA 4.69).

$$K_d = K \cdot \exp(-E_d/RT) \quad \text{ou} \quad (4.22)$$

$$\ln K_d = \ln K - E_d/RT \quad (4.23)$$

onde:

K_d = constante de desativação da enzima

K = constante de proporcionalidade

E_d = energia de desativação enzimática

R = constante dos gases ideais (1.98 cal/g mol °K)

T = temperatura absoluta (°K)

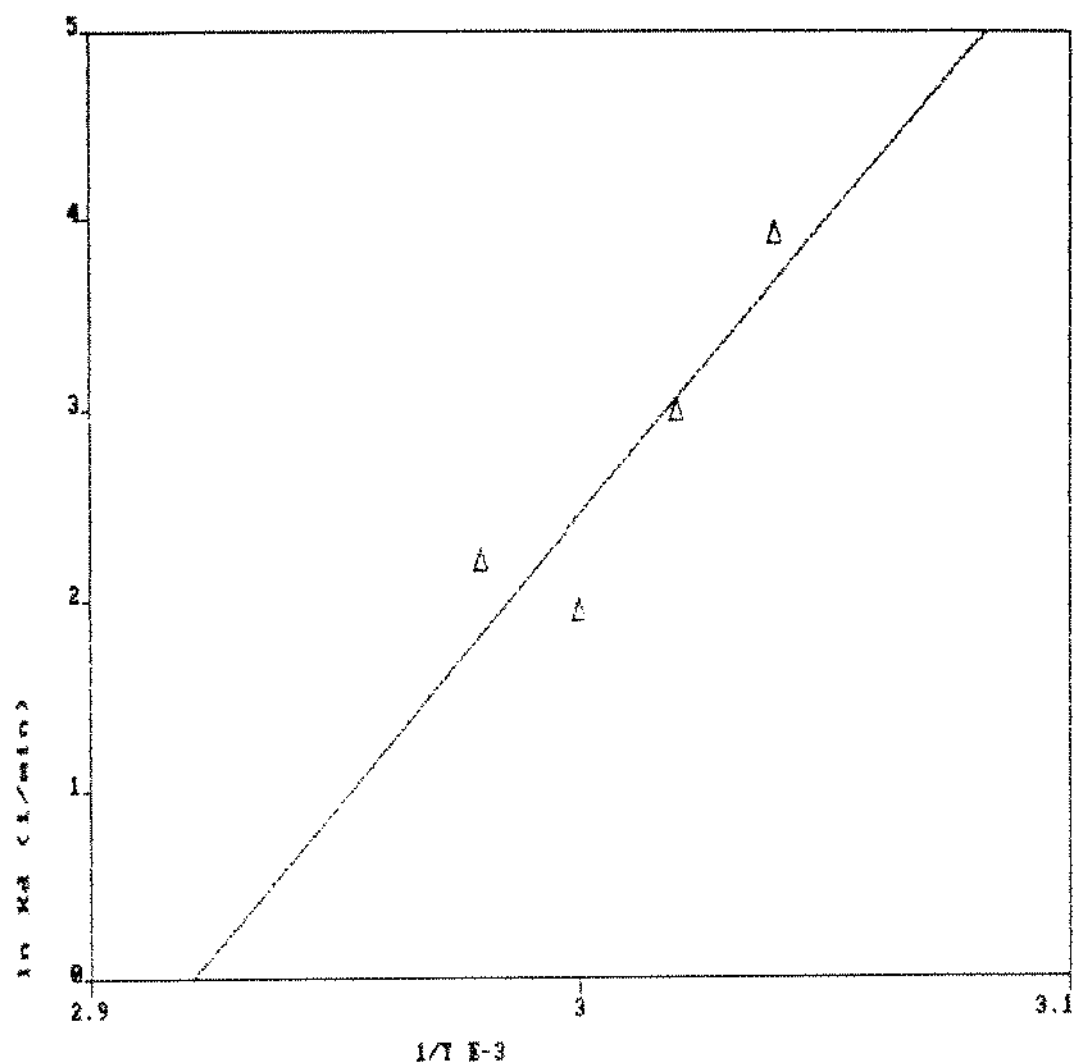


FIGURA 4.69 Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação K_d em função da temperatura.

Obteve-se o valor de $E_d = 61043$ cal/gmol e a expressão para determinar valores de K_d , dada através da seguinte equação:

$$K_d = 1,22 \cdot 10^{90} \exp(-30830/T)$$

Para a enzima após coluna DEAE-celulose, seguida de precipitação por etanol, os resultados encontram-se reunidos nas tabelas a seguir.

TABELA 4.61 Estabilidade da enzima purificada, temperatura de 56°C

Tempo(min)	Atividade(U.I/ml)	ln (A/Ao)
0,0	175,42	0,000
0,50	137,82	-0,241
1,00	114,61	-0,426
1,50	91,04	-0,656
2,00	78,09	-0,809
2,50	69,45	-0,927

TABELA 4.62 Estabilidade da enzima purificada, temperatura de 58°C

Tempo(min)	Atividade(U.I/ml)	ln (A/Ao)
0,00	160,49	0,000
10,0	106,15	-0,413
30,0	62,43	-0,944
60,0	23,75	-1,911

TABELA 4.63 Estabilidade da enzima purificada, temperatura de 60°C.

Tempo(min)	Atividade(U.I/ml)	ln (A/Ao)
0,0	184,96	0,000
10,0	91,04	-0,709
20,0	42,84	-1,311
30,0	32,56	-1,737
40,0	21,23	-2,165
50,0	15,29	-2,493

TABELA 4.64 Estabilidade da enzima purificada, temperatura de 62°C.

Tempo(min)	Atividade(U.I/ml)	ln (A/Ao)
0,0	181,18	0,000
1,0	171,28	-0,056
2,0	153,83	-0,164
3,0	133,14	-0,308
4,0	112,09	-0,408
5,0	99,50	-0,599

Também nesse caso, os dados obtidos foram normalizados através da equação 4.22, obtendo-se assim as constantes de desativação K_d pelos coeficientes angulares das retas, como mostrado na TABELA 4.65.

TABELA 4.65 Valores de K_d em função da temperatura.

Temp(°C)	$K_d(1/min)$	ln K_d	1/T (1/h)
56	0,006	-5,075	3,04E-3
58	0,031	-3,469	3,02E-3
60	0,049	-3,010	3,00E-3
62	0,126	-2,071	2,98E-3

Para o cálculo da energia de desativação da enzima, colocou-se os dados na forma da equação de Arrhenius e graficou-se em função da temperatura, como mostrado na FIGURA 4.70.

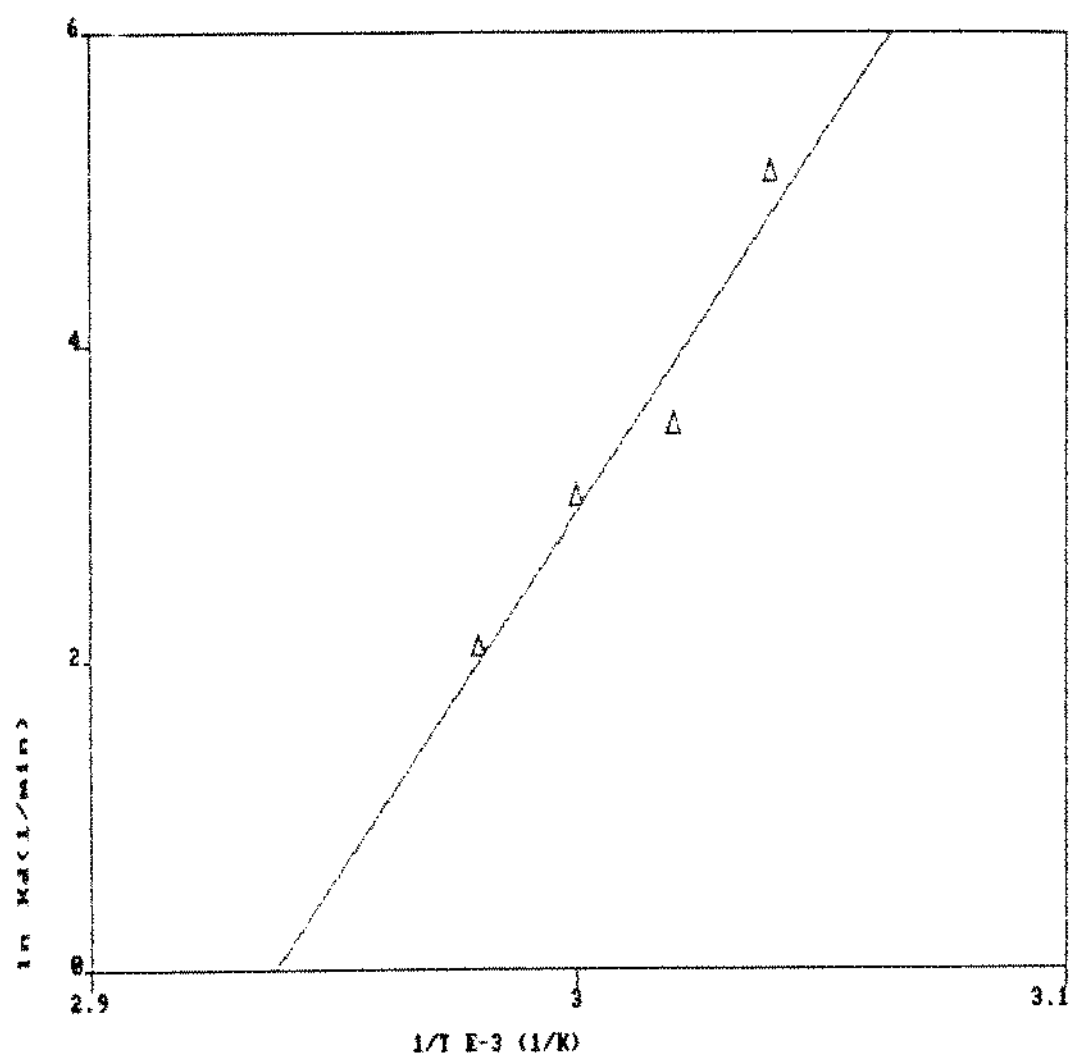


FIGURA 4.70 Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação K_d em função da temperatura.

O valor de E_d obtido foi de 93861,9 cal/gmol e a expressão para determinar valores de k_d era :

$$k_d = 3,1 \cdot 10^{60} \exp(-47405/T)$$

Pode-se agora relacionar o tempo de meia vida da enzima após precipitação com etanol e após DEAE-celulose seguida de precipitação com etanol (TABELA 4.66)

TABELA 4.66 Tempos de meia vida ($t_{1/2}$) estimados para as duas etapas de purificação.

T(°C)	Etapa I	Etapa II
60	9,17 min	14,97 min
58	16,00 min	35,38 min
56	28,00 min	1,41 horas
54	50,14 min	3,40 horas
52	1,49 horas	8,30 horas
50	3,08 horas	20,47 horas
45	12,05 horas	8,57 dias
40	2,36 dias	92,76 dias
35	11,69 dias	2,97 anos
30	60,97 dias	37,66 anos

Etapa I - após precipitação com etanol

Etapa II - após coluna DEAE-celulose seguida de precipitação com etanol.

Como pode-se observar, à medida que se purifica a enzima, tem-se um aumento na estabilidade. Quando comparado com dados da literatura (19) verifica-se o mesmo comportamento para baixas temperaturas, sendo que ocorre um grande aumento na estabilidade da enzima para essas temperaturas.

4.7.4 - Caracterização cinética da enzima após precipitação com etanol.

A TABELA 4.67 mostra dados de taxas iniciais de reação obtidos para enzima na forma livre a 40°C ,pH 5.2.

TABELA 4.67 Taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato.

Substrato(mg/ml)	V(U.I/ml)
7,5	409,8
10,0	541,1
15,0	796,19
20,0	958,52
25,0	1120,84
50,0	1391,40
100,0	1692,86
200,0	1816,54

Considerando-se o modelo cinético de inibição pelo substrato e colocando-se os dados na forma de Lineweaver-Burk, obteve-se o gráfico como mostrado na FIGURA 4.71.

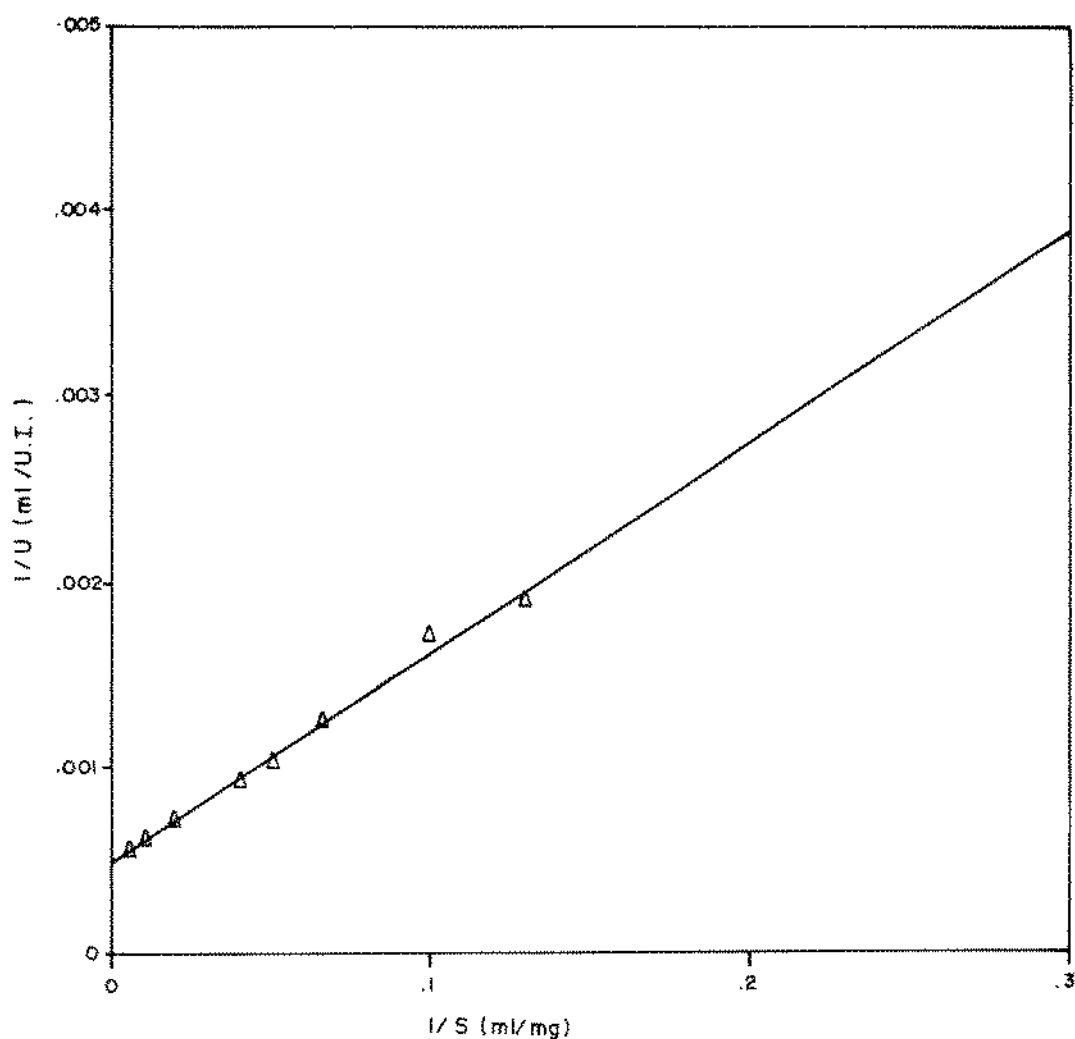


FIGURA 4.71 Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para a enzima precipitada com etanol.

Da curva tirou-se o valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) e $V_{m\acute{a}x}$.

Verifica-se que há uma linearidade entre $1/v$ e $1/s$, para baixas concentrações de substrato, permitindo nesta fase obter um valor de K_m igual a 0,662 mol/l e um $V_{m\acute{a}x}$ igual a 2037 U.I./ml.

V - CONCLUSÕES.

5.1. - Nos estudos realizados com vistas a melhora da produtividade e rendimento de obtenção de invertase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, quatro formas diferentes de processo fermentativo (batelada simples, batelada alimentada, contínuo em reator duplo estágio e contínuo com células imobilizadas) foram efetuados. Destes estudos conclui-se que:

O processo com batelada alimentada introduziu uma pequena melhora em relação a batelada simples, aumentando no caso a produtividade em 684 % e o rendimento 208 %.

O processo contínuo de fermentação mostrou ser muito mais apropriado quer seja com células livres ou com células imobilizadas. Isso se deveu certamente pela possibilidade de se operar os reatores com limitações de substrato, o que minimizou o efeito de inibição. No caso de células livres houve um acréscimo de 2789 % na produtividade e 412 % no rendimento, enquanto que o processo com células imobilizadas, o mais eficiente de todos, resultou num acréscimo de 3021 % na produtividade e 1254 % no rendimento, se comparados com batelada simples.

5.2. No estudo cinético de crescimento do microrganismo e produção de enzima, foram realizados ensaios em fermentação em batelada e fermentação contínua, utilizando-se das técnicas de perturbação dos tipos pulso em degrau, com três diferentes substratos (sacarose, glicose e frutose). As conclusões que podem ser extraídas desta etapa são as seguintes:

As experiências de fermentação em batelada com sacarose, glicose e frutose mostraram que existem duas fases

distintas no processo; a primeira de degradação intensa do substrato com rápido crescimento da massa celular ($\mu = 0,42 \text{ h}^{-1}$) porém com baixa produção de enzima ($dP/dt = 0,050 \text{ U.I./ml.h}$), a segunda, que se inicia após a exaustão do substrato inicial, com lento crescimento do microrganismo ($\mu = 0,058 \text{ h}^{-1}$) e aceleração da produção da enzima ($dP/dt = 0,399 \text{ U.I./ml.h}$). Por outro lado, evidenciou-se o caráter constitutivo da enzima, sendo esta produzida mesmo na ausência do substrato sacarose, no caso quando a fonte de carbono para o microrganismo era glicose ou frutose, com atividades finais praticamente idênticas em todos os ensaios efetuados.

As experiências de fermentação contínua com perturbação tipo pulso colocaram em evidência o efeito inibitório do excesso de substrato na produção da enzima. A taxa específica de produção da enzima (q_p) para os substratos sacarose, glicose e frutose, diminuíram após o pulso, respectivamente, de 1739 U.I./g.h para 613 U.I./g.h, 1469 U.I./g.h para 290 U.I./g.h, 1846 U.I./g.h para 590 U.I./g.h.

As experiências de fermentação contínua com perturbação tipo degrau foram um instrumento valioso para a caracterização cinética do processo de crescimento do microrganismo e obtenção da enzima, e foram realizados igualmente com os três substratos, sacarose, glicose e frutose, em diferentes concentrações. Foi evidenciado que o microrganismo não sofre inibição para o substrato nas faixas de concentração utilizadas e que segue, portanto, o modelo clássico de Monod para o crescimento microbiano. Neste sentido observou-se que o μ_{max} é praticamente o mesmo qualquer que seja o substrato e

aproximadamente igual $0,24 \text{ h}^{-1}$. As constantes de saturação já diferem entre si e são para sacarose, glicose e frutose, respectivamente, $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$, $1,15 \cdot 10^{-3}$ e $1,77 \cdot 10^{-3}$.

A tentativa de modelagem da produção da enzima levou a constatação de que a taxa específica de produção q_p é diretamente proporcional a taxa específica de crescimento ($q_p = \alpha \mu$), onde $\alpha \cong 21000 \text{ UI./g}_{\text{cel}}$, para baixos valores de concentração de sacarose, glicose e frutose (reator operando sob limitação do substrato), e que sofre uma drástica inibição com um pequeno acúmulo de substrato. Esta inibição foi do tipo exponencial ($q_p = q_{p\text{max}} e^{-S/K_{is}} e^{-G/K_{io}} e^{-F/K_{iF}}$) onde as constantes de inibição foram para sacarose, glicose e frutose respectivamente 0,0181, 0,0023 e 0,0097 mol/l. Desta forma o modelo final para crescimento e produção pode ser dado pelas equações:

$$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{G}{K_g + G} \cdot \frac{F}{K_f + F}$$

$$q_p = \alpha \mu e^{-(S/K_{is} + G/K_{io} + F/K_{iF})}$$

5.3. Os ensaios para caracterização da enzima levaram às seguintes conclusões:

Quanto maior a pureza da enzima maior é sua estabilidade. Após purificação em coluna de troca iônica, o tempo de meia vida é superior a 37 anos, numa temperatura de 30°C

Considerando, a partir de dados de Costa e Naugard (27) que esta enzima tem atividade máxima a 50°C mas que a 40°C esta atividade ainda mantém 60 % da atividade máxima, é possível prever que um reator poderá operar nestas condições por mais de três meses que ainda manterá 50 % da atividade existente no

início da operação. Industrialmente, este é um dado de grande relevância pois indica que a enzima é suficientemente estável para tornar sua aplicação industrial economicamente viável. Além disso, alguns autores (20, 102) verificaram que a invertase quando imobilizada pode melhorar sua estabilidade em determinadas condições de operação, aumentando ainda mais seu tempo de meia vida.

O estudo de cinética enzimática mostra que a enzima segue o modelo de Michaelis-Menten. O valor de $V_{max} = 2037$ U.I./ml e $K_m = 0,0662$ mol/l está próximo de valores obtidos por Cabral (20) e Ribeiro (102) para invertase comercial da Novo Industri.

VI - Referências Bibliográficas

1. ABRANS, B. B.; HACKEL, R.; MIZUHAGA, T. & LAMPEN, J. O. Relationship of large and small invertases in *Saccharomyces* mutant selectively deficient in small invertase. J. Bacteriol. 135: 347-353, 1978.
2. AIBA, S.; HUMPLEY, A. E. & MILLIS, N. F. Biochemical Engineering, Academic Press, 1973.
3. AIBA, S.; SHODA, M. & NAGATANI, M. Kinetic of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng. 10: 845-864, 1968.
4. AMIN, G.; DOELLE, H. W. & GREENFIELD, P. F. Ethanol production from sucrose by immobilized *Zymomonas mobilis* cells in polyurethane foam. Biotechnology Letters. 9(3): 225-228, 1987.
5. ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. Biotechnol. Bioeng. 10: 707-723, 1968.
6. ARNOLD, W. N. Heat inactivation kinetics of yeast β -fructofuranosidase a polydisperse system. Biochim. Biophys. Acta. 128: 347-353, 1969.
7. AUZANS, S. Effect of cultivation conditions on the invertase activity of the *Saccharomyces cerevisiae* 14. Latv. P.S.R. Zinat Akad. Vestis. 5: 48-54, 1975.
8. ATKINSON, B.; BLACK, G. M.; LEWIS, P. J. & PINCHES, A. Biological particles of given size, shape density for use in biological reactors. Biotechnol. Bioeng. 21: 193-200, 1979.

9. BABEZINSKI, P. & TANNER, W. A membrane-associated isozyme of invertase in yeast precursor of the external glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 538: 426-434, 1978.
10. BARNETT, J. A. The nutritional tests in yeast systematics. *Journal of General Microbiology.* 99: 183-190, 1977.
11. BAZUA, C. D. & WILKE, C. R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng. Symp.* 7: 105-118, 1977.
12. BECHER, J. C.; MITCHEL, R. L. & PIERSON, W. G. Invertase containing month care agente. Gen. Offen. 12.044.534 (Cl. A. GLK) Apr. 15-1971 VG Appl. oct, 1969, Apud. Chem. Abstr. Columbus. 7 :105-118, 1977.
13. BEEFFINK, H. H.; DILLEN, VAN. M. & DENHEVUEL, VAN. J. C. Formation of bacterial aggregates in a continuous flow reactor: influence of carrier availability. *Biotechnol. Letters.* 10(3): 171-176, 1968.
14. BERTHELOT, M. Sur la fermentation glucosique du sucre de canne. *C. R. Acad. Sci. Paris* 50: 980-986, 1860.
15. BETETA, P. and GLASCON, S. Localization of invertase in yeast vacuoles. *Febs. Letters.* 13(5): 297-300, 1971.
16. BLACK, G.M.; WEBB, C.; MATTHEWS, T.M. and ATKINSON, B. Pratical reactor system for yeast cell immobilization using Biomass Support Particles. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 134-141, 1984.
17. BORZANI, W.; LIMA, U.A. e AQUARONE, E. Engenharia Bioquimica. Ed. Edgard Blücher Ltda, 1975.

18. BOON, B. & LAUDOLOUT, H. Kinetics of nitrite oxidation by *Nitrobacter winogradskyi*. *Biochem. J.*, 85: 440-447, 1962.
19. BROOWN, ANNE. Feed-Batch and continuous culture. In: *Fermentation a pratical approach*. edited by Meneil, B & Harvey, L. M. Oxford Unversity Press, 220 p, 1990.
20. CABRAL, F. A. Estudo cinético da invertase livre e imobilizada. Campinas. 1989, (Tese de mestrado, FEA, UNICAMP).
21. CAHIB, E. Paper chromatography of some enzymes and the plasma proteins. *Biochem. Biophy. Acta.* 8: 607-614, 1952.
22. CAVIN, I. F.; SAINT, C. & DIVIES, C. Continuous production of emmental cheese flavours and propionic acid starters by immobilized cells of a propionic acid bacterium. *Biotechnology Letters.* 7(11): 821-826, 1985.
23. CHAN, E.; CHEN, S. C.; GONG, C. S. & CHEN, L. F. Production, separation and purification of yeast invertase as a by-product of continuous ethanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotech.* 36: 44-47, 1991.
24. CIZINSKA, S.; VOJTISEK, V.; MAIXNER, J.; BARTA, J. & KRUMPHANZL, V. Cell aggregates exhibiting dentrifying activity. *Biotechnology Letters.* 7(10): 737-742, 1985.
25. COLONNA, W.J.; CANO, F.R. & LAMPEN, J.O. Microheterogeneity in yeast invertase. *J. Chromatography.* 386: 293-300, 1975.
26. COSTA, F.A.A. Contribuição ao estudo da produção de invertase extracelular por leveduras. *Dissertação de Mestrado.* 95 p., 1986.

27. COSTA, F.A.A. & MAUGERI FILHO, F. Caracterização da enzima invertase produzida por *Kluyveromyces bulgaricus*. Alimentação. Número 84, março/abril, 1988.
28. CHIBATA, I.; TOSA, T. & SATO, T. Immobilized aspartase containing microbial cells: preparation and enzymatic properties. Applied Microbiology. 27(5): 878-885, 1974.
29. CHIBATA, I. Immobilized enzymes - Research and development. Tokyo, Kadansha Ltda, 1978.
30. CHIBATA, I.; TOSA, T. & SATO, T. Use of immobilized cell systems to prepare fine chemicals. Microbial Technology, vol.2, 1979.
31. DAVIES, R. Enzyme formation in *Saccharomyces fragilis*. 1. Invertase and Raffinose. Biochem. J. 55: 484-497, 1953.
32. DELBORGHI, M.; CONVERTI, A. & PARISI, F. Continuous alcohol fermentation in an immobilized cell-rotating disk reactor. Biotechnol.Bioeng.. 27: 761-768, 1985.
33. DEVERELL, K. F. & CLARK, T. A. Induced flocculation of *Pachysolen tannophilus* using the tower fermentor. Biotechnol. Bioeng. 27: 1608-1611, 1985.
34. DIXON, M.; WEBB, E. C.; THORNE, C. J. R. & TIPTON, K. F. Enzymes. 3rd ed., London, Longman Group Limited, 1979.
35. DODYK, F. & ROTHSTEIN, A. Factors influencing the appearance of invertase in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 104: 478-486, 1964.
36. DUCROO, P. Utilization industrielle des enzymes. Ind. Aliment. Agr. 99(6): 401-416, 1982.

37. DRAETA, I. S. Invertase solúvel e insolúvel: suas propriedades e cinética. Dissertação de Mestrado. Número 71, FEA, UNICAMP, 1973.
38. DWORSCHACK, R. G. & WICKERHAM, L. J. Production of extracellular invertase by the yeast *Saccharomyces uvarum* y-972. Arch. Biochem. Biophys. 76: 449-456, 1958.
39. DWORSCHACK, R. G. & WICKERHAM, L.J. Yeast Enzymes. In: Microbial enzyme production. GUTCHO, S.J.(ed.). Noyes data Corporation, New Jersey, London, England, 1974.
40. EDWARDS, V. H. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. Biotechnol. Bioeng. 12: 679-712, 1970.
41. EDWARDS, D. G. & WISEMAN, A. Novel shock-tube cell disruptor. Proc. Biochem. 6: 32-34, 1971.
42. EGAMBERDIEV, N. B. & IERUSALIMSKY, N. D. Effect of ethanol concentration on rate of growth of *Saccharomyces vini* (race Pr-1). Mikrobiologiya. 37(4): 686-690, 1968.
43. FOLLOW, M.; HETHERINGTON, P. J.; DUNNIL, P & LILLY, M. D. Release of enzymes from baker's yeast by disruption in an industrial homogenizer. Biotechnol. Bioeng. 13: 549-560, 1971.
44. GASCON, S. & OTTOLENGNI, P. Invertase asozymes and their localization in yeast. Comp. Rend. Trav. Lab. Calsberg. 36: 85-93, 1967.
45. GASCON, S. & LAMPEN, J. O. Purification of the internal invertase of yeast. J. Biol. Chem. 243: 1567-1572, 1968.

46. GODFREY, T. Comparison of the type and source. In: Industrial enzymology. The application of enzymes in industry. GODFREY, T & RERCHLT, J. (eds), The Nature Press, N. Y., 1983.
47. GOLDSTEIN, H.; BARRY, P. W.; RIZZOTO, A. B.; VENKATASUBRAMANIAN, K. & VIETH, W. R. Continuous enzymatic production of invert sugar. J. Ferment. Technol. 55: 516-524, 1977. 977.
48. GHOMMIDH, C.; CUTAYAR, J. M. & NAVARRO, J. M. Continuous production of vinegar. I-Research strategy. Biotechnology Letters. 8(1): 13-18, 1986.
49. GHOSE, T. K. & TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. Biotechnol. Bioeng. 21: 1401-1420, 1979.
50. HAHN-HAGERDAD, B.; LARSON, M. & MATTIASSON, B. O. Shift in metabolism towards ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* using alterations of the physical chemical microenvironment. Biotechnol. Bioeng. 12: 199-202, 1982.
51. HALDANE, J. B. S. Enzymes - LONGMANS, GREEN, New York, 1930, and Mit Press, Cambridge, M. A., 1965.
52. HAMER, G. Recycle in fermentation processes. Biotechnol. Bioeng. 24: 511-537, 1982.
53. HANG, Y. D.; SPLITTSTOESSER, D. F. & LANDSCHOOT, R. L. Production of yeast invertase from sauerkraut waste. Applied Microbiology. 25(3): 501-502, 1973.

54. HANNOUN, B. J. M. & STEPHANOPOULOS, G. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell free and cell occupied calcium alginate membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 829-835, 1986.
55. HARTMEIER, W. Immobilized biocatalysts - An introduction (Trans.by J. Wieser), Berlin, Springer - Verlag, 212 pg, 1988.
56. HENLEY, J. & SADANA, A. Series type enzyme deactivations influence of intermediate activity on deactivation kinetics. *Enz. Microb. Technol.* 6: 35-41, 1984.
57. HILL, G. G. An introduction to chemical engineering kinetics & reactor design. New York, J. Wiley, 1977.
58. HINSHELWOOD, C. N. The chemical kinetics of the bacterial cell. Oxford university Press, London, 1946.
59. HOLZBERG, I.; FINN, R. K. & STEINKRAUS, K. H. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. *Biotechnol. Bioeng.* 9: 413-427, 1967.
60. HUDSON, C. S. & HARDING, T. S. Preparation of raffinose. *J. Am. Chem. Soc.* 36: 2110-2114, 1914.
61. HUDSON, C. S. & SHERWOOD, S. F. Occurrence of melezitose in honey. *J. Am. Chem. Soc.* 42: 116-125, 1920.
62. IGLESIAS, G. F.; MORENO, F. & GASCON, S. Light and intermediate molecular forms of yeasts invertase as precursors of the heavy enzyme. *Febs Letters.* 114: 57-60, 1980.

63. INLOES, D. S.; SMITH, W. J.; TAYLOR, D. P.; COHEN, S. N.; MICHAELS, A. S. & ROBERTSON, C. R. Hollow - fiber membrane biorreactors using immobilized *E.coli* for protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 2: 2653-2681, 1983.
64. IZUKA, M. & YAMAMOTO, I. Studies on invertase of *Candida utilis*. Parte I. A comparative study on isolation methods of the enzyme. *Agr. Biol. Chem.* 36: 349-358, 1972.
65. JAIN, V. K.; TORAN-DIAZ, I. & BARATTI, J. Preparation and characterization of immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 273-279, 1985.
66. JONES, S. T.; KORUS, R. A.; ADMASSU, W. & HEIMSCH, R. C. Ethanol fermentation in a continuous tower fermentor. *Biotech. Bioeng.* 26: 742-747, 1984.
67. JONES, R. P.; PAMMENT, N. & GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeast - the effect of environmental and others variables. *Process. Biochem.* 16: 42-49, 1981.
68. KLEIN, J.; STOCK, J. & VORLOP, D. K. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.* 18(2): 86-91, 1983.
69. KURIYAMA, H.; SEIKO, Y.; MURAKAMI, T.; KOBAYASHI, H. & SONODA, Y. Continuous ethanol fermentation with cell recycling using flocculating yeast. *J. Ferment. Technol.* 63(2): 159-165, 1985.
70. LAMPEN, J. O. External enzymes of yeast - their nature and formation. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 34: 1-18, 1968.

71. LAMPEN, J. O.; KUO, S. C.; LIRAS, P. Synthesis of external glycoprotein enzymes by yeast. In: SNOMALAINEN, H.; WALLES, C. (eds). Metabolism and regulation of cellular processes. Proceedings of the third international specialized symposium on yeast. Parte 2 Helsinki Otoniemi, 1983.
72. LEHNINGER, A. L. Proteínas: Purificação e caracterização. In : Bioquímica, LEHNINGER, A. L. Editora Edgard Blücher Ltda, 1976.
73. LESKOVAC, V.; TRIVIC, S.; PAVKOV-PERICIN, D. & PRODANOV, V. External yeast β -fructosidase. The role of tryptophyl residues in catalysis. Biochem. Biophys. Acta. 405: 482-491, 1975.
74. LEVENSPIEL, O. The monod equation. A revisit and a generalization to product inhibition situations. Biotechnol. Bioeng. 22: 1671-1687, 1980.
75. LEWIN, R. Microbial adhesion. Is a sick problem. Science. 24: 375-377, 1984.
76. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAAR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
77. LUONG, J. H. T. Generalization of monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibitions. Biotechnol. Bioeng. 29: 242-248, 1987
78. MADYASTHA, K. M.; GANGULI, A. R.; KUBAN, U. G.; KOWSU, N. & VIDYA, D. Extracellular invertase from *Aspergillus athecus*. Isolation and immobilization. Biotechnology Letters. 9(8): 555-560, 1987.

79. MAEDA, H. & SUZUKI, H. Preparation of immobilized invertase. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 403-412, 1973.
80. MARC, A. Cinétique et modélisation de réacteurs à glucoamylase soluble et immobilisée. Thèse de Doctorat, Inst. Nat. Polytechnique de Lorraine, France, 1985.
81. MARQUEZ, C. D. & ACOSTA, E. M. Estudio de la producción y actividad de la enzima invertasa. *Politécnica.* 10(4): 167-183, 1985.
82. MICHAELIS, L. & MENTEN, M. L. Die kinetik der inverturwirrug. *Biochem. Z.* 49: 333-369, 1913.
83. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* 31: 426-428, 1959.
84. MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Thèse, 1942.
85. MONSAN, P. & DURAND, G. Les enzymes: Production et utilisations industrielles. 352 pg, 1982.
86. MORENO, F.; OCHOA, A. G.; GASCON, S. & VILLANUEVA, J. R. Molecular forms of yeast invertase. *Eur. J. Biochem.* 50: 571-579, 1975.
87. MOSER, A. Continuous cultivation. In: *Biotechnology Fundamentals of Biochemical Engineering.* ed REHM, H. J. & REED, G., 1983.
88. MULCHANDANI, A. & LUONG, J. N. T. Microbial inhibition kinetics. Revisited. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11: 66-73, 1989.

89. MYRBACK, K. Studies on yeast invertase. Arch. Biochem. Biophys. 69: 138-148, 1957.
90. MYRBACK, K. Invertases. In: The enzymes. BOYER, P. D.; LARDY, H.; MYRBACK, K. eds Academic Press N.Y., 1960.
91. NAGATAMI, M.; SHODA, M. & AIBA, S. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. J. Ferment. Technol. 46(3): 241-248, 1968.
92. NAKASHIMA, T.; FUKUDA, H.; KYOTANI, S. & MORIKAWA, H. Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within Biomass Support Particles. J. Ferment. Technol. 66(4): 441-448, 1988.
93. NETO, C. B.; DESTRUHAI, A. & GOMA, G. Ethanol fermentation by flocculating yeast. Performance and stability dependence on a critical fermentation rate. Biotechnol. Letters. 7: 355-360, 1985.
94. NEUMANN, N. P. & LAMPEN, J. O. Purification and properties of yeast invertase. Biochemistry. 6: 468-475, 1967.
95. NEUMANN, N. P. & LAMPEN, J. O. The glycoprotein structure of yeast invertase. Biochemistry. 8(9): 3552-3556, 1969.
96. NIXON, P. F. & BLAKLEY, R. L. Invertase secretion and sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. J. Biol. Chem. 243: 4722-4731, 1968.
97. OOSHIMA, H.; SAKIMOTO, M. & HARANO, Y. Kinetics study on thermal stability of immobilized invertase. Biotechnol. Bioeng. 22: 2169-2178, 1980.

98. OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I. Factors affecting the type of metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 16: 1197-1212, 1974.
99. PARKER, K. J. Invertase. In: *Enzymes and food processing.* BIRCH, G. G. & BLAKLBROUGH, N. eds Applied Science Publishers Ltda, London, 1981.
100. PERUTZ, M. F. Subcellular distribution of yeast invertase isoenzymes. *Proc. Roy. Soc. Ser. B* 167: 349-355, 1967.
101. REED, G. Invertase. In: *Enzymes in food processing.* REED, G. ed Academic Press, N. Y., 1975.
102. RIBEIRO, E. J. Estudo cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada. Campinas, 1989 (Tese de Doutorado, FEA, Unicamp)
103. RODRIGUES, L.; RUIZ, I.; VILLANUEVA, J. R. & SENTANDREU, R. Yeast invertase : subcellular distribution and possible relationship between the isoenzymes. *Current Microbiol.* 1: 41-44, 1978.
104. ROYSTON, M. G. Tower fermentation of beer. *Process Biochemistry.* 1: 215-221, 1966.
105. SAMEJIMA, H.; KIMURA, K.; ADO, Y. Recent development and future directions of enzyme technology in Japan. *Biochimie.* 62: 299-315, 1980.
106. SCOTT, C. D. Immobilized cells: A review of recent literature. *Enzyme Microbiol. Technol.* 9: 66-73, 1987.
107. SCRIBAN, R. *Biotecnologia.* Editora Manolo Ltda, 448 p, 1985.

108. SHEPPARD, G. The production and uses of microbial enzymes in food processing. In: Microorganisms in the production of food. Progress in Industrial Microbiology. 23: 237-283, 1986.
109. SMITH, W. L. & BALLOW, C. E. Immunochemical characterization of the manan component of the external invertase (β fructofuranosidase) of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry. 13: 355-367, 1974.
110. SUTTON, D. D. & LAMPEN, J. O. Localization of sucrose and maltose fermenting systems in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Acta. 56: 303-312, 1962.
111. SUZUKI, H.; OZAWA, Y. & MAED, H. Studies on the water-insoluble enzyme hydrolysis of sucrose by insoluble yeast invertase. Agr. Biol. Chem. 30: 807-812, 1966.
112. TANAKA, H.; MATSUMURA, M. & VELIKY, I.A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. Biotechnol. Bioeng. 26: 53-58, 1984.
113. TASHIRO, Y. & TREVITHICK, J.R. The role of carbohydrate in the glycoenzyme invertase of *Neurospora crassa*. Canadian Journal of Biochemistry. 55: 249-256, 1977.
114. ISENG, M.C. & WAYMAN, M. Kinetics of yeast growth: Inhibition-Threshold substrate concentrations. Can. J. Microbiol. 21: 994-1003, 1975.
115. VEGA, M. G.; CEJUDO, F. J. & PANEQUE, A. Purification and properties of an extracellular invertase from *Azotobacter chroococcum*. Enzyme Microb. Technol. 13: 267-271, 1991.

116. VENKATSUBRAMANIAN, K. Immobilized microbial cells. A.C.S. Symposium Series. American Chemical Society. Washington, D. C. 257 p., 1979.
117. VIETH, W. R.; VENKATASUBRAMANIAN, K.; CUNSTANTINIDES, A. & DAVIDSON, N. Design and analysis of immobilized enzyme flow reactors. In Applied Biochemistry and Bioengineering. Vol. 1. Ed. WINGARD, L.B.; KATCHALSKI, E. & GOLDSTEIN, L., Academic Press, N.Y. 221-327, 1976.
118. VITOLO, M. Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*S. cerevisiae*). São Paulo, FCF-USP. Dissertação de Mestrado, 1979.
119. WANG, D. I. C.; COONEY, Ch. L.; DEMAIN, A. L.; DUNNIL, P. HUMPHREY, A. E. & LILLY, M. D. Fermentation and enzyme technology. N. Y. John Wiley, 1979.
120. WICKERHAN, L. J. Evidence of the production of extracellular invertase by certain strains of yeasts. Arch. Biochem. Biophys. 76: 439-448, 1958.
121. WILLIAMS, N. J. & WISEMAN, A. Ease of invertase (β fructofuranosidase), solubilization in disruption of brewer's yeast by vibro-mill. Biochem. Soc. Trans. 4: 1299-1301, 1976.
122. WISEMAN, A. Enzymes for breakage of microorganisms. Process Biochem. 4: 63-65, 1967.
123. WISEMAN, A. & WOODWARD, J. Industrial yeast invertase stabilization. Proc. Biochem., 1975.

124. WISEMAN, A. New and modified invertases and their applications. In: Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. WISEMAN, A. (ed). Ellis Harwood House, England, 1979.
125. WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food sciences. 637 p., 1972.
126. WHITAKER, J. R. The glycoside hydrolases. In: Principles of enzymology for the food sciences. 637 p., 1972.
127. WOODWARD, J. & WISEMAN, A. Folding pathway selection or cross-linking as the cause of thermal stabilization of yeast invertase conformation by its manan. Bioch. Soc. Trans. 1: 80-82, 1973.