

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos**

Estudo da Produção de Vitamina B12 por Bactérias dos Gêneros *Propionibacterium* e *Pseudomonas*

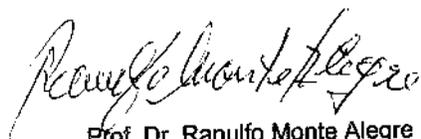
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Romildo Martins Sampaio, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de novembro de 1999.

**Romildo Martins Sampaio
Mestre em Engenharia de Alimentos**

Campinas, 30 de novembro de 1999.

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador**



**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Presidente da Banca**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

Campinas – SP
Novembro de 1999



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Unicamp
	Sa 47e
V.	Ex
TOMBO BC/	40132
PROC.	278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/01/00
N.º CPD	

CM-00133177-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Sa47e

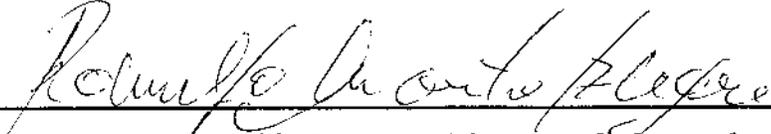
Sampaio, Romildo Martins

Estudo da produção de vitamina B12 por bactérias dos gêneros propionibacterium e pseudomonas / Romildo Martins Sampaio. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Vitamina B12. 2.Fermentação. 3.Pseudomonas.
4.Propionibacterium. I.Alegre, Ranulfo Monte.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

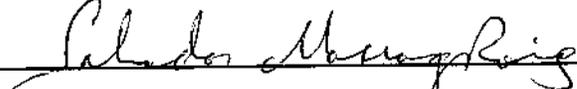

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre - Orientador


Prof. Dra. Eleni Gomes - Membro


Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi - Membro

Prof. Dra. Iracema de Oliveira Moraes - Membro


Prof. Dra. Lucia Regina Durrant - Membro


Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig - Membro

Prof. Dr. Vanildo Luiz del Bianchi- Membro

“ Uma verdade científica não se impõe por convencer os que a ela se opõem e por levá-los a verem com clareza, mas sim, porque os opositores acabam morrendo e surge uma nova geração que aceita a verdade nova”.

Max Planck

“Qualquer caminho é apenas um caminho e não constitui insulto algum – para ti mesmo ou para os outros – abandoná-lo quando assim ordena o seu coração (...). Olhe cada caminho com cuidado e atenção. Tente-o tantas vezes quanto julgar necessárias... Então, faça a si mesmo e apenas a si mesmo uma pergunta: possui este caminho um coração? Em caso afirmativo, o caminho é bom. Caso contrário, esse caminho não possui importância alguma”.

Carlos Castañeda

Dedico este trabalho aos meus pais Romildo e Dorzinha e a minha esposa Bianca, a quem tudo devo. Eles sempre foram o meu “porto seguro”. Durante toda esta jornada souberam compreender e apoiar, amar e incentivar, sem restrições. Com muito carinho, fica aqui minha singela homenagem. A eles minha eterna gratidão!

Agradecimentos

A DEUS, razão de tudo e de todos, pela oportunidade da vida;

Ao Professor Ranulfo Monte Alegre, pela orientação e amizade, que pude usufruir desde o Mestrado. Nele, as qualidades de um profissional sério, competente e acessível convivem em harmonia com um humanismo extraordinário. Admiro-o pela sua confiança, pelo seu apoio e incentivo nas horas difíceis e sobretudo pela sua simplicidade. Continuo minha trajetória, com imensa satisfação e grande felicidade por ter com ele trabalhado, convivido e compartilhado inúmeros momentos. A você Ranulfo, meus sinceros agradecimentos!

Aos meus queridos irmãos Marco, Guilherme e Lauro;

A toda minha família; avó, tios, tias, primos e sobrinha, pelas pessoas maravilhosas que são. Peço a Deus que possa continuar usufruindo do convívio de vocês;

A João e Lili, que mesmo de longe sempre torceram por mim. A vocês meu carinho sincero;

A todos os amigos que fiz ao longo desta jornada. O apoio, ajuda e incentivo foram fundamentais para alcançar o meu objetivo. Vocês tornaram mais fácil a jornada;

Aos amigos do laboratório pela troca de idéias, pelos momentos alegres e descontraídos em meio aos problemas da vida e sobretudo, pelo gratificante convívio;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de estudos;

Aos amigos “sergipanos” Carlos e Helenice, Pedro Leite, Roberto e Ronaldo. A distância nunca nos afastou. Obrigado pela ajuda, pela troca de idéias, pelos questionamentos, pela descontração, e, sobretudo pela amizade.

A Newton e Abgail, pelos quais nutro grande admiração e carinho;

A Ana Leonor, Esamir, Neuza e Sissi, pela compreensão e incentivo;

Aos Professores Bruns e Maria Isabel, pelas preciosas dicas sobre planejamento experimental;

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Foram muitos, com certeza.

Conteúdo

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	vii
Nomenclatura	xi
Resumo	xv
Abstract	xvii
1 Introdução	1
2 Objetivos	5
3 Revisão Bibliográfica	6
3.1 – Vitaminas.....	6
3.1.1 – Histórico	6
3.1.2 – Nomenclatura.....	7
3.1.3 – Funções Fisiológicas	10
3.1.4 – Produção e Aplicação.....	13
3.2 – Vitamina B12.....	14

3.2.1 – Histórico	14
3.2.2 – Estrutura	15
3.2.3 – Propriedades Físico-Químicas	18
3.2.4 – Biosíntese	20
3.2.5 – Microrganismos Produtores.....	23
3.2.6 – Fermentação	27
3.2.7 – Vitamina B12 na Medicina e Bioquímica	33
3.2.7.1 – Mecanismos Bioquímicos	33
3.2.7.2 – Absorção, Transporte, Metabolismo e Excreção.....	35
3.2.7.3 – Importância da B12 nos Animais	36
3.3 – Planejamento Experimental.....	37
3.3.1 – Planejamento Fatorial.....	38
3.3.2 – Planejamento Fatorial Fracionário	38
3.3.3 – Método de Superfície Resposta	39
3.3.4 – Caminho de Ascendência Máxima	43
4 Materiais e Métodos	45
4.1 - Microrganismo	45
4.2 – Obtenção de Mutantes Espontâneos	45
4.3 – Substrato.....	46
4.4 – Meios de Cultura.....	47
4.5 – Fermentação	49
4.6 – Determinação da Concentração Celular.....	50
4.7 – Determinação dos Açúcares Redutores.....	50
4.8 – Extração e Determinação da Vitamina B12	50

4.9 – Determinação do pH	54
4.10 – Determinação do K_La	55
4.11 – Planejamento Experimental.....	57
4.12 – Análise Estatística.....	58
5 Resultados e Discussão	59
5.1 – Obtenção dos Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	59
5.2 – Seleção dos Microrganismos, Meios de Cultura e Substratos.....	61
5.3 – Planejamento Fatorial Fracionário	65
5.4 – Primeiro Planejamento com Composto Central	69
5.4.1 – Modelos para o Rendimento de Vitamina B12.....	72
5.5 – Caminho de Ascendência Máxima	82
5.6 – Segundo Planejamento com Composto Central	85
5.6.1 – Modelos para o Rendimento de Vitamina B12.....	87
5.7 – Experimentos em Fermentador de Bancada	95
5.7.1 – Influência do Tempo de Adição de 5,6 DMI no Rendimento da Vitamina B12.....	96
5.7.2 – Influência do Controle de pH no Rendimento de Vitamina B12.....	98
5.7.3 – Influência do K_La sobre o Rendimento de Vitamina B12.....	101
6 Conclusões.....	104
7 Sugestões para Trabalhos Futuros	107
8 Bibliografia	108

9	Apêndice A.....	117
10	Apêndice B.....	137

Lista de Tabelas

3.1	Vitaminas e Fatores de Crescimento	9
3.2	Vitaminas Hidrossolúveis e suas Coenzimas Correspondentes.....	11
3.3	Processos Bioquímicos Importantes das Vitaminas Lipossolúveis e Vitamina C..	12
3.4	Principais Compostos Derivados e Análogos da Vitamina B12.....	18
3.5	Principais Microrganismos Produtores de Vitamina B12	27
3.6	Necessidades Diárias Estimadas de Vitamina B12 para Animais e Homem	37
4.1	Níveis Experimentais das Variáveis Estudadas no Planejamento Experimental ...	58
5.1	Produção de Vitamina B12, Concentração Celular e Consumo de Substrato para Fermentação usando <i>Pseudomonas P3</i> e seus Mutantes	60
5.2	Produção de Vitamina B12, Concentração Celular e Consumo de Substrato para Fermentação de <i>Pseudomonas P3</i> com Diferentes Substratos e Composições de Meios de Cultura.....	62
5.3	Produção de Vitamina B12, Concentração Celular e Consumo de Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i> e <i>P. shermanii</i>	63

5.4	Comparação dos Rendimentos $Y_{X/S}$ e B12/X para as Maiores Produções de Vitamina B12 Obtidas para <i>Pseudomonas P3</i> , <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	64
5.5	Níveis Experimentais Utilizados no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}	66
5.6	Valores Codificados para cada Variáveis Descritas no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}	66
5.7	Valores Reais e Rendimento de Vitamina B12 Durante o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}	67
5.8	Efeitos Principais e Erros Padrões para o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} .	69
5.9	Valores Codificados e Valores Reais das Variáveis Usadas no Primeiro Planejamento com Composto Central	71
5.10	Valores Codificados para o Primeiro Planejamento com Composto Central.....	71
5.11	Variáveis Reais e Valores para o Rendimento de Vitamina B12 Durante o Primeiro Planejamento com Composto Central	72
5.12	Análise de Variância para o Modelo Linear Obtido para o Rendimento de Vitamina B12 no Primeiro Planejamento com Composto Central.....	74
5.13	Análise de Variância para o Modelo Quadrático Obtido para o Rendimento de Vitamina B12 no Primeiro Planejamento com Composto Central	75
5.14	Valores Codificados para a Temperatura, pH e Concentração de 5,6 DMI para os Experimentos do Caminho de Ascendência Máxima.....	84
5.15	Valores Codificados para a Temperatura, pH, Concentração de 5,6 DMI e Rendimento de Vitamina B12 para os Experimentos do Caminho de Ascendência Máxima	85

5.16	Valores Codificados e Níveis Experimentais para o Segundo Planejamento com Composto Central.....	86
5.17	Valores Reais e Rendimento de Vitamina B12 Obtidos no Segundo Planejamento com Composto Central.....	86
5.18	Análise de Variância para o Modelo Linear Obtido para o Rendimento de Vitamina B12 no Segundo Planejamento com Composto Central.....	88
5.19	Análise de Variância para o Modelo Quadrático Obtido para o Rendimento de Vitamina B12 no Segundo Planejamento com Composto Central.....	88
5.20	Rendimento de Vitamina B12, Concentração Celular e Consumo de Substrato para Diferentes Tempos de Adição de 5,6 DMI.....	97
5.21	Rendimento de Vitamina B12, Concentração Celular e Velocidade Específica de Crescimento (μ_{MAX}) para Fermentações Com e Sem Controle de pH.....	101
5.22	Rendimento de Vitamina B12, Concentração Celular e Rendimento $Y_{X/S}$ para Diferentes Valores de K_La	103
A1	Seleção de Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	117
A2	Seleção de Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	117
A3	Seleção de Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	118
A4	Seleção de Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	118
A5	Seleção de Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	118
A6	Seleção de Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	119
A7	Seleção de Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	119
A8	Seleção de Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	119

A9	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	120
A10	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	120
A11	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	120
A12	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para Mutantes de <i>Pseudomonas sp.</i>	121
A13	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	121
A14	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	121
A15	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	122
A16	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	122
A17	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	122
A18	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	123
A19	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	123
A20	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	123
A21	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	124
A22	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	124

A23	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	124
A24	Seleção de Meio de Cultura e Substrato para <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Propionibacterium shermanii</i>	125
A25	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	125
A26	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	125
A27	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	126
A28	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	126
A29	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	126
A30	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	127
A31	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	127
A32	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	127
A33	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	128
A34	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	128
A35	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	128
A36	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	129
A37	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	129
A38	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	129
A39	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	130
A40	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} para <i>Pseudomonas P3</i>	130
A41	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	130

A42	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	131
A43	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	131
A44	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	131
A45	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	132
A46	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	132
A47	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	132
A48	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	133
A49	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	133
A50	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	133
A51	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	134
A52	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	134
A53	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	134
A54	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	135
A55	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	135
A56	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	135
A57	Planejamento Fatorial Completo 2^3 para <i>Pseudomonas P3</i>	136

Lista de Figuras

3.1	Estrutura Geral de Cobaltocorrinóides	17
3.2	Biossíntese da Vitamina B12	22
3.3	Efeito da Betaina e Colina na Produção de Vitamina B12 por <i>Pseudomonas denitrificans</i>	33
3.4	Representação do Caminho de Ascendência Máxima, Partindo de um Ponto Central de um Planejamento 2^2	44
4.1	Esquema dos Frascos Agitados Usados na Fermentação	50
4.2	Espectro de Absorção para Vitamina B12	53
4.3	Mudanças na Concentração de Oxigênio Dissolvido para o Cálculo do K_La	55
4.4	Cálculo do K_La para Fermentação de <i>Pseudomonas P3</i>	56
5.1	Valores Preditos versus Valores Experimentais para o Modelo Quadrático do Primeiro Planejamento com Composto Central	77
5.2	Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e pH, para Concentração de 5,6 DMI = 62,5 mg/l	79

5.3	Curvas de Nível para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e pH, para Concentração de 5,6 DMI = 62,5 mg/l.....	80
5.4	Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Concentração de 5,6 DMI e pH, para Temperatura = 34 °C.....	80
5.5	Curvas de Nível para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Concentração de 5,6 DMI e pH, para Temperatura = 34 °C.....	81
5.6	Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e Concentração de 5,6 DMI, para pH = 7,0	81
5.7	Curvas de Nível para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e Concentração de 5,6 DMI, para pH = 7,0	82
5.8	Valores Preditos versus Valores Experimentais para o Modelo Quadrático do Segundo Planejamento com Composto Central.....	89
5.9	Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e pH, para Concentração de 5,6 DMI = 98,8 mg/l.....	92
5.10	Curvas de Nível para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e pH, para Concentração de 5,6 DMI = 98,8 mg/l.....	92
5.11	Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Concentração de 5,6 DMI e pH, para Temperatura = 34,6 °C.....	93
5.12	Curvas de Nível para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Concentração de 5,6 DMI e pH, para Temperatura = 34,6 °C.....	93
5.13	Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e Concentração de 5,6 DMI, para pH = 7,14.....	94

5.14	Curvas de Nível para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e Concentração de 5,6 DMI, para pH = 7,14.....	94
5.15	Comportamento do pH Durante a Fermentação de <i>Pseudomonas P3</i>	98
5.15	Curvas de Concentração Celular para Experimentos Com e Sem Controle de pH.....	100
B1	Concentração Celular versus Absorbância para <i>Pseudomonas sp.</i>	137
B2	Concentração Celular versus Absorbância para <i>Pseudomonas P3</i>	138
B3	Concentração Celular versus Absorbância para <i>Pseudomonas P2</i>	139
B4	Concentração Celular versus Absorbância para <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	140
B5	Concentração Celular versus Absorbância para <i>Propionibacterium jensenii</i>	141
B6	Concentração Celular versus Absorbância para <i>Propionibacterium shermanii</i> . ..	142
B7	Concentração de Vitamina B12 versus Absorbância para Determinação de Vitamina pelo Método Microbiológico Utilizando <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis</i> ATCC 7830.....	143
B8	Concentração de Oxigênio versus Tempo para Obtenção do Coeficiente de Respiração ($q_{O_2 \cdot X}$) na Determinação do $K_L a$ com $pO_2 = 20\%$...	144
B9	Concentração de Oxigênio versus Tempo para Obtenção da Equação para Concentração de Oxigênio na Determinação do $K_L a$ com $pO_2 = 20\%$	145
B10	Concentração de Oxigênio versus Tempo para Obtenção do Coeficiente de Respiração ($q_{O_2 \cdot X}$) na Determinação do $K_L a$ com $pO_2 = 80\%$...	146
B11	Concentração de Oxigênio versus Tempo para Obtenção da Equação para Concentração de Oxigênio na Determinação do $K_L a$ com $pO_2 = 80\%$	147

B12 Concentração Celular versus Absorbância para *Pseudomonas P1*. 148

Nomenclatura

b_i	coeficiente dos termos de 1 ^o grau a serem estimados para as variáveis independentes na forma codificada;
b_{ii}	coeficiente dos termos de 2 ^o grau a serem estimados para as variáveis independentes na forma codificada;
B12/X	rendimento de produção de vitamina B12/produção celular (mg B12/g célula seca);
C_L	concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mg/l);
c	concentração de oxigênio dissolvido (mg/l);
C	concentração de cobalto (mg/l);
dC_I/dt	taxa de consumo de oxigênio;
D	concentração de 5,6 dimetilbenzimidazola (mg/l);
5,6 DMI	5,6 dimetilbenzimidazola;
e	coeficiente de extração;
f	fator de extração;
g	número de variáveis independentes ou fatores;

I	função geradora do fatorial fracionário;
I	idade do inóculo (h);
K	número de variáveis de um planejamento experimental;
$K_L a$	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1});
N	número de variáveis – 1;
p	número de parâmetros do modelo completo;
PC	ponto central do planejamento com composto central;
q_{O_2x}	velocidade específica de utilização do oxigênio pelo microrganismo;
r	diferença entre p e o número de termos do modelo reduzido;
rpm	rotações por minuto (min^{-1});
S	concentração de substrato (g/l ou %);
SQE	soma dos quadrados devidos ao erro;
SQR	soma dos quadrados devido à regressão;
SSE	soma dos quadrados dos desvios do modelo;
t	tempo de fermentação (h);
T	temperatura ($^{\circ}C$);
UI	unidades internacionais;
V	volume;
VVM	volume de oxigênio/volume de meio de cultura. Minuto (min^{-1});
X	concentração celular (g/l);

X_1	variável codificada para T no 1 ^o planejamento com composto central;
X_2	variável codificada para pH no 1 ^o planejamento com composto central;
X_3	variável codificada para 5,6 DMI no 1 ^o planejamento com composto central;
X_4	variável codificada para T no 2 ^o planejamento com composto central;
X_5	variável codificada para pH no 2 ^o planejamento com composto central;
X_6	variável codificada para 5,6 DMI no 2 ^o planejamento com composto central;
$Y_{X/S}$	rendimento de crescimento (g célula seca/g substrato);
Z	valor da variável no ponto central;
Z_i	valor real da variável ou variável independente;

Letras Gregas

α	nível de confiança;
α_d	distância até o ponto central;
β_i	coeficiente a ser estimado para as variáveis independentes em valores reais;
ΔA	variação da absorvância lida;
Δ_i	troca incremental = $X_i(\Delta Z_i/2)$;
ΔZ_i	intervalo de variação de Z_i ;
μ	velocidade específica de crescimento do microrganismo (h^{-1});
$\mu_{m\acute{a}x}$	velocidade máxima específica de crescimento do microrganismo (h^{-1});

v multiplicador de Lagrange.

Resumo

O presente trabalho trata do estudo da produção de vitamina B₁₂, consistindo das seguintes etapas: seleção do melhor microrganismo produtor; seleção da melhor fonte de substrato e do meio de cultura; avaliação, modelagem e otimização das variáveis experimentais e fermentação em reator de bancada, para a obtenção das condições de operação e parâmetros cinéticos que influenciam no rendimento da produção da vitamina.

A primeira fase consistiu da seleção do melhor microrganismo produtor a ser utilizado nos estudos posteriores. Partiu-se das seguintes culturas, tidas como boas produtoras de B₁₂: *Propionibacterium jensenii* DSM 20274, *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 9614, *Propionibacterium shermanii* ATCC 6207, *Pseudomonas sp.* ATCC 13867 e mais três mutantes isolados. Aqui como nas duas próximas etapas, os ensaios foram realizados em frascos agitados. Com Base nos resultados obtidos, decidiu-se pela seleção do mutante *Pseudomonas P3*, que chegou a uma produção máxima de 3,86 mg B₁₂/l.

A escolha da melhor fonte de substrato e do meio de cultura com composição mais indicada ocorreu paralelamente à escolha do microrganismo. Foram testadas lactose e sacarose e mais três composições de meio: meio 1, meio 2 e meio 3. A sacarose e o meio 1, associados ao mutante selecionado, proporcionaram os melhores rendimentos de B₁₂, produção de biomassa e consumo de substrato. As culturas de *Propionibacterium* mostraram maior um maior consumo de lactose do que as *Pseudomonas*.

Na terceira etapa, estudou-se a influência de sete variáveis experimentais, previamente pesquisadas e selecionadas, na produção de B12. Foram elas: idade do inóculo, tempo de fermentação, temperatura, pH, concentração de substrato, de 5,6 DMI e de cobalto. Até a etapa de otimização, foram efetuados um planejamento fracionário, dois planejamentos com composto central e um caminho de ascendência máxima. As variáveis com seus respectivos níveis otimizados, que mais influenciaram a resposta, foram: concentração de 5,6 DMI (98,8 mg/l), temperatura (34,6 °C) e pH (7,14). O planejamento experimental permitiu um aumento de quase 100% na produção de vitamina, alcançando um máximo de 7,57 mg B12/l.

Os ensaios no fermentador de bancada objetivaram verificar a influência do tempo de adição de 5,6 DMI, K_{La} e controle de pH no rendimento da vitamina. Concluiu-se que o tempo ótimo de adição do precursor e o nível de K_{La} mais indicado, foram respectivamente, 48 h e $36,8 \text{ h}^{-1}$. Por outro lado, percebeu-se que o controle do pH não melhorou a produção de vitamina nem aumentou a velocidade de crescimento do microrganismo.

Abstract

The present deals with the study of the production of vitamin B₁₂, consisting of the following stages: selection of the best producing microorganism; selection of the best substrate source and the more suitable medium of culture; evaluation, modelling and optimization of the experimental variables and; fermentation in a bench-fermentor for the obtaining of the operation conditions and kinetic parameters that influence the yield of the vitamin.

The first phase consisted of the selection of the best producer microorganism to be used during the work. The following strains were used: *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 9614, *Propionibacterium jensenii* DSM 20274, *Propionibacterium shermanii* ATCC 6207, *Pseudomonas sp.* ATCC 13867 and more three mutants isolated. Here as in the next two stages, the experiments were conducted in shake-flasks. Based on the obtained results, the mutant *Pseudomonas P3* was selected, producing a maximum of 3.86 mg B₁₂/L.

The selection of the best substrate source and medium composition was done parallelly to the microorganism selection. Were tested sucrose, lactose and three compositions of medium: medium 1, medium 2 and medium 3. The sucrose and medium 1, associated to the mutant *P. P3*, provided the best yields of B₁₂, biomass production and substrate consumption. The strains of *Propionibacterium* showed larger ability in the lactose degradation than *Pseudomonas* and its mutants.

In the third stage, it was studied the influence of seven experimental variables in the production of vitamin B12: age of inoculum, time of fermentation, temperature, pH, substrate concentration, 5,6 Dimethylbenzimidazole (DMI) concentration and cobalt concentration. Up to the optimization step were realized a fractional factorial design, a steepest ascent path and two central composite design. The most significant parameters, with respective optimized levels, were: 5,6 DMI (98.8 mg/L), temperature (34.6 °C) and pH (7.14). The experimental design allowed an increase of almost 100% in the vitamin production, reaching a maximum of 7.57 mg B12/L.

The experiments in the bench-fermentor were done to verify the influence of the time of addition of 5,6 DMI, K_{La} and pH control in the yield of vitamin B12. The better time of addition and level of K_{La} , were respectively 48 hr and 36.8 hr⁻¹. The control of pH did not improve the vitamin production.

1 – Introdução

As vitaminas são definidas como substâncias orgânicas extremamente necessárias para o funcionamento de muitas formas de vida, incluindo a humana. Grande parte dos organismos vivos não podem sintetizá-las, e devem desta maneira, obtê-las de fontes externas, como os alimentos. A obtenção se dá na forma completa ou de pró-vitaminas, que são posteriormente convertidas em vitaminas por fatores como atividade enzimática, luz ultravioleta, metabolismo, entre outros. Em se tratando do homem, as bactérias intestinais conseguem sintetizar algumas vitaminas, porém em quantidades insuficientes para as necessidades diárias (vitamina K, PP, Biotina), ou sob condições nas quais a vitamina não consegue atravessar a parede do intestino em direção à circulação (FLORENT, 1986).

O termo vitamina foi primeiro usado em 1911 pelo químico polonês Casimur Funk, quando trabalhava na pesquisa de um fator anti-beriberi. Ele mostrou que o mesmo tratava-se de uma amina essencial à vida (vita-amina). Depois o termo foi estendido para todas as substâncias orgânicas que preenchessem as seguintes características biológicas: essenciais para o crescimento e funcionamento normal do metabolismo de um organismo, ativas em pequenas doses, sem valor energético inerente, e não ser biossintetizada pelo organismo. Deste modo, ao mesmo tempo que se caracterizava as vitaminas, evitava-se possíveis confusões com outras substâncias também ativas em pequenas quantidades, como as enzimas e os hormônios (VANDAMME, 1992, FLORENT, 1986).

A alimentação diária do homem constitui sua fonte básica de vitaminas e fatores de crescimento. Uma nutrição adequada deve desta maneira, suprir suas necessidades diárias, que entretanto crescem com a gravidez, lactação, crescimento, convalescência, "stress", situações patológicas como doenças do fígado e biliar, problemas com a flora intestinal, deficiência de enzimas e tratamentos com drogas, hormônios e antibióticos. Por outro lado, os hábitos correntes de alimentação e métodos de processamento e preservação de alimentos, nem sempre asseguram uma suficiente provisão diária de vitaminas, até mesmo em se tratando de pessoas saudáveis. A desnutrição em muitos países do mundo, também requer atenção médica direta, combinada com dieta e ajuste de vitaminas. Embora a sociedade moderna seja raramente confrontada com as conhecidas avitaminoses do passado, elas ainda ocorrem em países pobres e superpopulosos (VANDAMME, 1989).

Apesar da alimentação básica do homem ser rica em vitaminas, os concentrados ou derivados destes produtos alimentícios, encontram relativamente pouco uso na indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos. Algumas das razões para este procedimento são:

- A ingestão média diária de vitaminas parece não ser suprida somente com produtos naturais;
- O nível de vitaminas em fontes naturais as vezes é relativamente baixo e varia bastante;
- A apresentação organoléptica e a vida de prateleira ("shelf-life") é frequentemente longe do ponto ótimo;
- As vitaminas são muito sensíveis a pH, calor, luz e oxigênio.

Essas constatações indicam que há uma necessidade extra de produção de vitaminas, além daquelas fornecidas por fontes naturais de alimentos e plantas. Compostos vitamínicos estão agora crescentemente sendo introduzidos como aditivos de alimentos e agentes terapêuticos. Hoje muitos alimentos processados, fármacos, cosméticos e químicos, contém adição extra de vitaminas ou compostos vitamínicos (VANDAMME, 1989).

Embora todas vitaminas possam ser extraídas de fontes naturais, do ponto de vista econômico é melhor obtê-las por síntese ou biossíntese. Atualmente, as vitaminas podem ser obtidas por via química (A, B₁, D₃, E, H e K), via fermentativa (B₂, B₆, B₁₂, D₂ e F), cultura de microalgas (β -Caróteno e F) ou combinação de métodos químicos e microbiológicos (vitamina C) (VANDAMME, 1989, FLORENT, 1986, MACHLIN, 1984).

As vendas mundiais de vitaminas alcançaram 1,5 bilhão de dólares em 1988, valor atualmente muito superior, por se tratar de um setor em franca expansão (VANDAMME, 1989). Segundo ALCÂNTARA (1996), o mercado gerado pelas vendas de vitaminas e suplementos alimentares enriquecidos com as mesmas, atinge facilmente os 5,0 bilhões de dólares/ano. A vitamina B₁₂, apesar da pequena produção – 5 a 10 toneladas/ano, é responsável por cerca de 3,5% do total das vendas, devido ao alto preço alcançado (cerca de US\$ 5,000.00/Kg), o que a torna uma das mais caras vitaminas produzidas (VANDAMME, 1989). O Brasil, com o crescimento da indústria alimentícia e farmacêutica, tem se tornado um tradicional mercado importador. Segundo dados do “Trade Point de Campinas”, no ano de 1994, somente os gastos com importação de vitamina B₁₂ pura (cianocobalamina), atingiram cerca de US\$ 5,0 milhões.

A vitamina B₁₂ foi descoberta como resultado de pesquisas sobre anemia megaloblástica ou anemia perniciosa. Seu isolamento deu-se em 1948, mas sua síntese química completa só foi obtida em 1973. Porém, devido ao grande número de estágios necessários - mais de 70, o procedimento não alcançou interesse comercial (VANDAMME, 1989, HARRIS, 1968). Hoje, a vitamina B₁₂ é produzida exclusivamente por via fermentativa. Segundo SPALLA et al. (1989), devido a suas implicações em reações bioquímicas importantes como síntese de proteínas e ácidos nucleicos e metabolismo de carboidratos, a B₁₂ originou grande interesse e aplicações úteis na saúde e alimentação dos homens e animais. Para eles, como outras vitaminas, a B₁₂ encontrou seu “nicho” e do ponto de vista econômico pode ser considerada um “produto maduro”. Para VANDAMME (1992), a fermentação de vitamina B₁₂ pode ser considerada um processo industrial relativamente bem estabelecido, mas ainda possível de melhorias

Segundo COSTA (1996) e BOX et al. (1978), o planejamento de experimentos tem se tornado uma ferramenta de uso efetivo nos diversos estágios de um trabalho experimental e de otimização, permitindo o estudo empírico das relações entre as variáveis experimentais e as respostas envolvidas e a modelagem dos resultados. A utilização desta técnica, segundo KHURI e CORNELL (1987), possibilita:

- Escolher uma série de experimentos que produza medidas confiáveis e adequadas da resposta de interesse;
- Determinar um modelo matemático que melhor se adapte aos dados coletados;
- Determinar as condições ótimas para que as variáveis produzam um valor máximo ou mínimo na resposta.

Deste modo, o planejamento experimental, associado à metodologia de superfície resposta, pode ser útil e importante em trabalhos que envolvam o estudo, seleção e otimização de variáveis experimentais, visando a maximização das respostas desejadas.

2 - Objetivos

A importância da vitamina B12, associada à possibilidade de se estudar alternativas aos seus processos de produção e otimização dos mesmos, contrastando, com a pouca pesquisa desenvolvida nesta área no país, motivaram a elaboração deste trabalho, que tem como objetivos principais:

- Selecionar o melhor microrganismo produtor de vitamina B12, para ser utilizado ao longo do trabalho, partindo das seguintes culturas: *Propionibacterium jensenii* DSM 20274, *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 9614, *Propionibacterium shermanii* ATCC 6207 e *Pseudomonas sp.* ATCC 13867 e seus mutantes;
- Selecionar o melhor substrato e a melhor composição do meio de cultura, a serem utilizados nas fermentações;
- Avaliar, modelar e otimizar, pelo método de superfície resposta, o efeito das seguintes variáveis sobre o rendimento de vitamina B12: idade do inóculo, tempo de fermentação, temperatura, pH, concentração de substrato, concentração de 5,6 - dimetilbenzimidazola (DMI) e concentração de cobalto;
- Verificar, a partir das condições experimentais otimizadas, a influência das seguintes condições de operação e parâmetros cinéticos no rendimento de vitamina: constante volumétrica de transferência de oxigênio (K_{La}), tempo de adição de precursor (5,6 DMI) e controle de pH.

3 – Revisão Bibliográfica

3.1 - Vitaminas

3.1.1 - Histórico

O início da história das vitaminas remonta ao ano de 400 a.C., quando Hipócrates acreditava que a ingestão de fígado teria efeitos terapêuticos sobre a cegueira noturna. Muito tempo depois, já no século XVI, os efeitos do suco de limão contra escorbuto, tornam-se conhecidos. Em 1762, o médico italiano Francesco Frapoli, deu o nome de pelagra a uma doença causada por deficiência nutricional. No século XIX no Japão, um tipo de doença infantil que causava a retração da conjuntiva por deficiência de vitamina A foi tratada com sucesso empregando-se dietas ricas em óleo de fígado de bacalhau e/ou galinha. Ainda no século XIX, descobriu-se os efeitos curativos do óleo de fígado de bacalhau e da luz do sol, sobre o raquitismo. Em 1901, descobriu-se que a beriberi estava ligada a deficiência de um fator de proteção. Hoje já se sabe, que todas estas doenças são resultado de deficiências nutricionais de vitaminas (VANDAMME, 1989, MACHLIN,1984).

A pesquisa moderna sobre vitaminas foi iniciada por volta de 1910 com Hopkins na Inglaterra e Osborne & Mendel nos Estados Unidos, que sustentavam que doenças como escorbuto, pelagra, raquitismo e beriberi, eram resultados de deficiências de certos

componentes essenciais presentes nos alimentos. Pouco depois, em 1912, o químico polonês Casimur Funk isolou, a partir do farelo de arroz, um componente que prevenia a bériberi e exibia as propriedades químicas de uma amina. A este tipo de composto, ele deu nome de vitamina (VANDAMME,1989).

Em 1913, McCollins & Davis demonstraram a existência de um fator A lipossolúvel em gordura de manteiga e gema de ovo. Em 1915, encontrou-se no germe de trigo, uma substância hidrossolúvel nomeada de fator B, e em 1920, o fator A recebeu o nome de vitamina A; o fator B de vitamina B; e um fator C, também hidrossolúvel mas com propriedades anti-escorbuto, de vitamina C. Em 1925, designou-se como vitamina D, um fator anti-raquitismo solúvel em gordura. A partir daí, a descoberta e o isolamento de outras vitaminas continuou rapidamente, facilitando o detalhamento de suas estruturas, propriedades químicas e nutricionais e síntese (VANDAMME,1989, FRIENDRICH, 1989).

3.1.2 - Nomenclatura

A nomenclatura das vitaminas foi inicialmente baseada na utilização de letras-símbolo, respeitando a ordem alfabética das descobertas. Logo, descobriu-se que uma letra dava nome a vitaminas que possuíam propriedades e princípios semelhantes, levando à inclusão de um índice para letras originais (B1, B2, B12, etc.). Uma outra forma distinta de nomenclatura baseou-se nas funções conhecidas da vitamina. Assim, o nome da vitamina K tem origem na palavra alemã “Koagulation”. Outros nomes refletiam deficiências causadas pela ausência da vitamina em questão como aneurina (B1) para vitamina anti-polineurites, anti-pelagra para a vitamina PP (“Pelagra-Preventing”), etc. Atualmente, os nomes baseados em letras e os nomes triviais, são mais usados que aqueles propostos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (VANDAMME, 1989, DIPLOCK, 1985).

Na Tabela 3.1, tem-se um quadro geral contendo os grupos das vitaminas, seus precursores, fontes naturais de obtenção e necessidades diárias recomendadas pela FAO/ONU.

Do ponto de vista químico, as vitaminas são como misturas heterogêneas de compostos orgânicos essenciais à saúde dos homens e animais e necessitam estar presente em suas alimentações, visto que eles não estão aptos a produzi-los ou o fazem em quantidades insuficientes. Segundo VANDAMME (1989), as vitaminas podem ser formadas parcial ou indiretamente no corpo, através de:

- a) Compostos frequentemente chamados de provitaminas, que não possuem nenhuma atividade vitamínica aparente, mas podem ser convertidos dentro do corpo em vitaminas.

Exemplo:

β -caróteno (de frutas e vegetais) → vitamina A

Triptofano (de alimentos ricos em proteínas) → Ácido Nicotínico (niacina)

7-Dihidrocolesterol (da pele) → vitamina D₃;

- b) Bactérias da flora intestinal.

Exemplo: vitamina K.

Porém, muitos compostos vitamínicos têm que ser supridos via ingestão diária de alimentos.

O conteúdo de vitaminas é frequentemente expresso em termos de Unidades Internacionais (UI), e relata a atividade biológica de uma certa quantidade de vitamina pura, com um animal teste específico.

Tabela 3.1 - Vitaminas e Fatores de Crescimento

Grupo-Vitamina	Exemplos	Fontes Naturais	Unidades Internac. (UI)	Ingestão Diária
Grupo Pró-vitamina A	α, β, γ - Caróteno Criptoxantina	Frutas e vegetais	1 UI = 0,6 μg de Caróteno	2-4 μg de β - caróteno
Grupo Vitamina A	Retinol (Vit. A1) 3-Dihidroretinol (A2) Retinol (Vit. A1-aldeído)	óleo de peixe, fígado, leite e ovos	1 UI = 0,3 μg de Retinol	0,75 μg de Retinol
Vitamina B1	Tiamina	Cereais, fígado, carne e vegetais	1 UI = 3 μg de Tiamina	0,8-1,6 mg
Vitamina B2 (Vitamina G)	Riboflavina	Fígado, vegetais, ovo, carne e flora bacteriana		1,2-1,3 mg
Vitamina B3 (Vitamina PP)	Nicotinamida Ác. Nicotínico (Niacina)	Cereais, fígado, carne, vegetais, batata e levedura		10-15 mg
Vitamina B5 (Ác. Pantotênico)	Ác. Pantotênico Coenzima A	Cereais, fígado, ovo, melão e vegetais		10-20 mg
Vitamina B6	Piridoxina (Piridoxol) Piridoxal Piridoxamina	Fígado, batata, carne, vegetal e levedura		2,0 mg
Vitamina B8 (Vitamina H, Biotina)	Biotina	Fígado, gema de ovo, melão e cana		0,3 mg
Grupo B9 (Vitamina M, Ác. Fólico)	Ác. Pteroilglutâmico Ác. Pteroidilglutâmico	Cereais, fígado, carne, leite e vegetais		400 μg
Grupo B12	Cianocobalamina (B12) Hidroxocobalamina Nitrosocobalamina	Carne, fígado, leite, flora bacteriana		2 μg
Vitamina B13	Ác. Orótico			
Grupo Vitamina C	Ác. Ascórbico e Ác. Dihidroxoascórbico	Frutas cítricas, vegetais e batata	1 UI = 50 μg de Ác. Ascórbico	50 μg
Provitamina D	7-Dihidrocolesterol Ergosterol	Levedura		
Grupo Vitamina D	Ergocalciferol (D2) Colecalciferol (D3)	óleo de peixe, fígado, leite	1 UI = 0,025 μg de Vitamina D ₃	2-5 μg
Grupo Vitamina E	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$ - Tocoferol	Óleos, plantas, vegetais, fígado	1 UI = 1,0 mg de tocoferol	30 mg

Tabela 3.1 - Continuação

Grupo Vitamina F (Ác. Graxos Polinsaturados – PUFA) Ác. Lipóico	Ác. Linólico Ác. γ -Linolênico Ác. Eicoso-pentanóico (EPA) e DHA	Oleo, peixe, algas e fungos carne e levedura	
Grupo Vitamina K	Filoquinona (K1) Famoquinona (K2) Mecrodiona (K3) Menodiol (K4)	Fígado, vegetais, óleo de plantas e flora bacteriana	0,1 mg
Ácido- Paraminobenzóico (PABA)		Levedura	
Cálcio (Vitamina. B7, J)		Gema de ovo e carne	50-600 mg

Fonte: VANDAMME, (1989).

3.1.3 - Funções Fisiológicas

As vitaminas desempenham uma função catalítica no corpo, permitindo a síntese, conversão e degradação de macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. As vitaminas podem ser divididas em dois grandes grupos: hidrossolúveis e lipossolúveis (VANDAMME, 1989).

As funções bioquímicas de muitas vitaminas hidrossolúveis são bem conhecidas, pois elas são parte de coenzimas e portanto co-responsáveis por reações bioquímicas específicas (MACHLIN, 1984). A Tabela 3.2 apresenta as coenzimas das vitaminas hidrossolúveis.

Já as funções das vitaminas lipossolúveis e da vitamina C, ainda provocam muitas controvérsias. Sabe-se que elas estão envolvidas em processos bioquímicos específicos

(Tabela 3.3), embora não se conheça em alguns casos suas exatas funções (DIPLOCK,1985). Muito debate também existe sobre os possíveis efeitos de altas doses de certas vitaminas na fisiologia dos homens e animais. Os efeitos maléficos de algumas hipervitaminoses (A, D, K) são bem conhecidos. No caso da vitamina C, as altas doses dificultam ou inibem a absorção de vitamina do complexo B e nutrientes como cobre, além de acelerar o acúmulo de ferro, causando um efeito perturbador no metabolismo.

Tabela 3.2 - Vitaminas Hidrossolúveis e suas Coenzimas Correspondentes

Vitamina	Coenzima	Grupo Transferência
Tiamina (B1)	Tiaminopirofosfato (TPP)	C ₂ -Aldeído, Descarboxilação
Riboflavina (B2)	Flavina Adenina Mononucleotídeo (FMN) Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD)	Hidrogênio
Nicotinamida (B3 ou PP)	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD ⁺)	Hidrogênio
Ác. Pantotênico (B5)	Coenzima A	Acil
Piridoxina (B6)	Piridoxolfosfato (PLP)	Grupo Amina, Descarboxilação
Ác. Fólico (B9)	Ác. Tetrahidrofólico	Formil
Cianocobalamina (B12)	Coenzima B ₁₂	Carboxil
Biotina (H)	Biotina (Biotina, E-N- Biotinil Lisina)	Carboxil

Fonte: VANDAMME, (1989).

Certas vitaminas mostram diferentes atividades nos organismos humano e animal. A vitamina D2 (ergocalciferol) por exemplo, é pouco ativo em aves, enquanto em outros animais e no homem, mostra alta atividade. Outras são essenciais somente para o homem,

como a vitamina C, que é sintetizada por outros animais. Esta constatação tem uma grande utilidade prática na formulação de alimentos (VANDAMME, 1992).

Tabela 3.3 - Processos Bioquímicos Importantes das Vitaminas Lipossolúveis e

Vitamina C	
Vitamina	Funções Fisiológicas
Vitamina A (11-cis Retinol)	É parte da Rodopsina, a molécula sensível da luz nos olhos
Vitamina B3 (Colecalciferol) Forma ativa: 1,25-DiOHColecalciferol	Regulação de Ca^{++} e metabolismo do Fósforo
Vitamina E (α -Tocoferol)	Ação antioxidante sobre compostos insaturados (ácidos graxos) e integridade da membrana
Vitamina K1 (Filoquinona)	Essencial para formação de Protrombina (fator de coagulação do sangue), cofator para carboxilação de resíduos de glutamatos para formar γ -carboxiglutamatos
Vitamina C	Co-substrato da monooxigenase, desempenha papel importante em reações de redução e de hidroxilação de aminoácidos e amina (conversão de prolina para hidroxiprolina no colágeno), síntese de hormônio, absorção do Ferro, etc.

Fonte: VANDAMME (1989).

Alguns compostos possuem propriedades específicas de neutralizar o funcionamento das vitaminas. A eles é dado o nome de antivitaminas ou vitaminas antagônicas (MACHLIN, 1984). Suas ações negativas podem ser baseadas na degradação da vitamina (tiaminase, ascorbase) ou na complexação da mesma em um complexo não-reabsorvível (avidina + biotina). O N-5-hidroxi-L-arginina é o mais conhecido antagônico de vitamina B12. A dicumarina exclui a vitamina K da síntese da protrombina e a

ametopterina é antagonista do ácido fólico. As antivitaminas presentes em nossa alimentação diária são usualmente destruídas durante o processamento ou cozimento (MACHLIN, 1984).

3.1.4 - Produção e Aplicação

Todas as vitaminas podem ser extraídas de fontes naturais, as quais algumas vezes, possuem quantidades relativamente elevadas das mesmas. Porém, do ponto de vista econômico é melhor obtê-las por síntese ou biossíntese (FLORENT,1986).

Atualmente, algumas vitaminas são produzidas somente ou principalmente por via química (vitaminas A, D3, E, K1, B1, H), outras exclusivamente por via fermentativa (B2, B6, B12, D2 e F) ou cultura de microalgas (β -caróteno e F), enquanto que a vitamina C é a única produzida via combinação de métodos químicos e microbiológicos (VANDAMME,1989, FLORENT,1986).

Em função de seu valor terapêutico e do seu interesse como fator de crescimento, as vitaminas e correlatos têm tido, ao longo dos anos, uma grande aplicação em alimentos, rações, cosméticos, preparações técnicas e fármacos. Essas aplicações podem ser por:

- Revitaminação - Reconstituição do nível original de vitaminas em um produto alimentício;
- Padronização - Adição de vitamina(s) para compensar as flutuações naturais;
- Enriquecimento Vitamínico ou Vitaminação - Adição extra de vitamina(s) para produtos cujo nível é insuficiente (rações, alimentos e cosméticos);

- Adição Técnica (em rações alimentos e cosméticos) - β -caróteno como pigmento, vitamina C como antioxidante e acidulante;
- Aplicações Médicas - No tratamento de hipovitaminoses e avitaminoses.

Excetuando-se a produção de vitamina via natural, com a qual a síntese química e a biotecnologia não podem competir, a fermentação e as reações de bioconversão apresentam vantagens, já que rendem os enantiômeros desejados dos compostos vitamínicos, enquanto que os produtos de síntese orgânica frequentemente produzem misturas racêmicas com diferentes atividades biológicas. Do mesmo modo, o rendimento de vitaminas em caldo de fermentação são frequentemente altos, especialmente quando se usam microrganismos específicos ou melhorados geneticamente (VANDAMME, 1989).

3.2 - Vitamina B12

3.2.1 - Histórico

A vitamina B12 foi isolada, em 1948, por Smith, E. L. da Glaxo Laboratories, Rickes, E. L. da Merck & Co. e Stockstod, E. L. R. do Lederle Laboratories. Os dois primeiros pesquisadores encontraram este composto em extratos de fígado e identificaram-no como fator anti-anemia perniciosa. O terceiro, relatou a produção de um promotor de crescimento em culturas de *Flavobacterium solare*, ativo como fator de proteína animal em galinhas e efetivo no tratamento de anemia perniciosa humana (SPALLA et al., 1989).

A elucidação da estrutura química da vitamina B12 deu-se em 1955 por D. Hodgkin, através de cristalografia de raios X. Porém, sua síntese química completa só foi obtida em 1973, envolvendo mais de 100 pesquisadores da Inglaterra e da Suíça. A síntese requer

aproximadamente 70 passos e não tem nenhum valor do ponto de vista industrial devido a sua complexidade (FLORENT,1986).

3.2.2 - Estrutura

A vitamina B12 pertence a um grupo de moléculas orgânicas grandes e complexas, chamadas cobaltocorrinóides, conforme estrutura geral mostrada na Figura 3.1. As moléculas de cobalaminas que são os cobaltocorrinóides de maior interesse, são formadas por um macrociclo em posição planar, constituído por 4 anéis pirrol reduzidos, ligados através de átomos de nitrogênio a um íon cobalto III na posição central, dando origem ao anel corrino e mostrando 6 cadeias laterais: 3 acetamidas e 3 resíduos de propionamidas. O mesmo átomo de cobalto, possui mais duas ligações:

1 - Com um grupo nucleotídeo (ligante axial inferior), consistindo de uma base X ligada por um N- α -glicosil, que por sua vez, é ligada ao grupo D-ribose-3'-fosfato, que finalmente é ligado por um radical propionil a um aminopropanol do anel pirrol D;

2 - Com um radical Y (ligante axial superior).

Todos os cobaltocorrinóides cuja base X é o 5,6 dimetilbenzimidazola (DMI), são conhecidos como cobalaminas. Da mesma maneira, se a base Y é substituída por um radical ciano (CN), tem-se a cianocobalamina ou verdadeira vitamina B12 (SPALLA et al., 1989, FLORENT,1986).

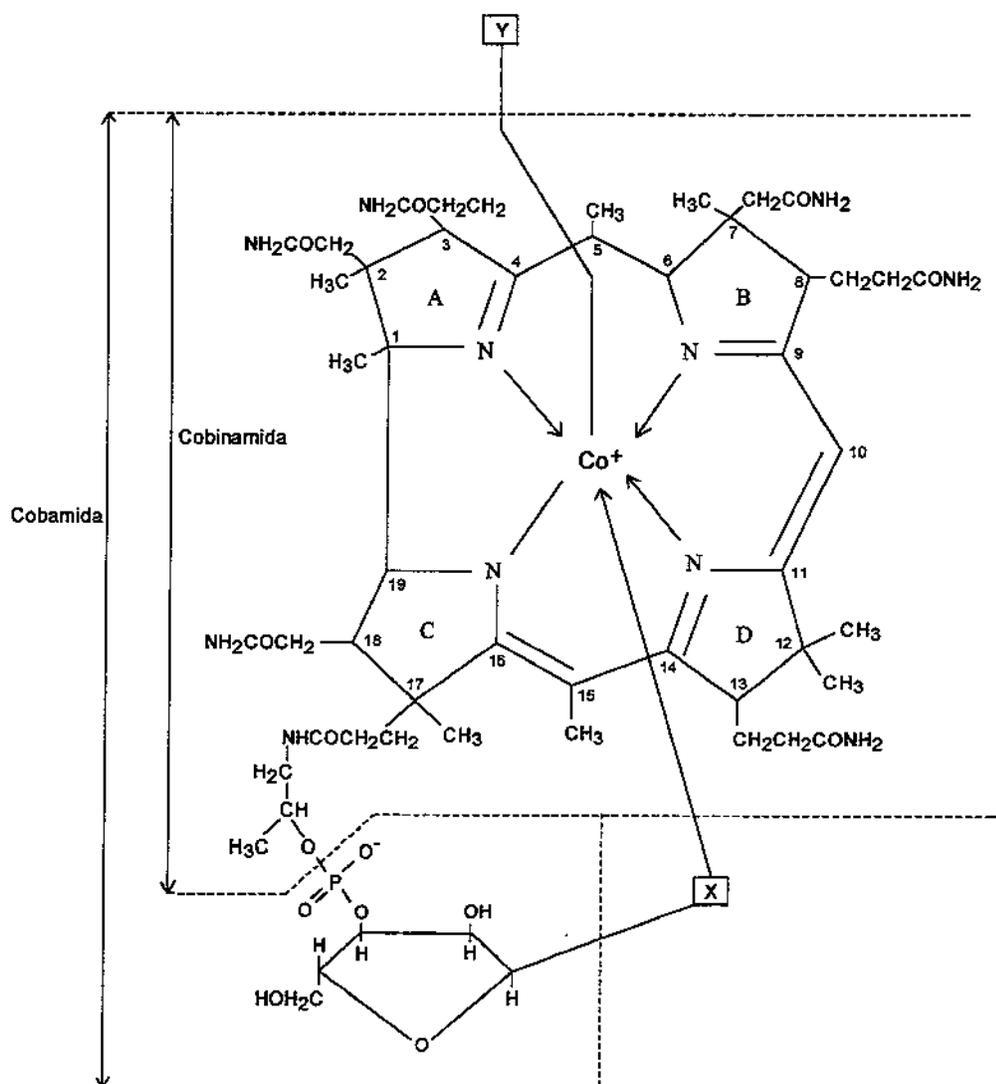
O grupo das cobalaminas incluem, além da cianocobalamina, a hidroxicobalamina ou vitamina B12a, metilcobalamina ou mecobalamina, e 5'-dexosiadenosilcobalamina ou

cobamida ou coenzima B12 de Barker, caracterizados respectivamente, pelos radicais ciano, hidróxi, metil e 5-dexosiadenosil (SPALLA et al., 1989).

Outros cobaltocorrinóides que apresentam diferentes bases heterocíclicas (como purina ou benzimidazolas substituídas) têm sido produzidos por vários microrganismos. Pseudovitamina B12 e fator III, cujas bases são adenosina e 5-hidroxibenzimidazola respectivamente, estão entre os mais frequentemente encontrados. Eles podem ser considerados análogos da vitamina B12. Todos os análogos conhecidos mostram baixa atividade como fator de crescimento de vertebrados e nenhum efeito terapêutico, mas são muito potentes como fator de crescimento para microrganismos. Cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina e vitamina B12-coenzima são os únicos compostos de interesse comercial (SPALLA et al., 1989, FLORENT, 1986, HARRIS, 1968).

Na Tabela 3.4 são descritos os principais compostos e análogos da vitamina B12.

Em relação à nomenclatura utilizada, a molécula dos corrinóides sem o nucleotídeo é chamada de cobinamida ou Fator B. Quando somente a base está ausente, o composto é chamado de cobinamida, e finalmente, a forma completa, com o 5,6-dimetilbenzimidazola ligado, recebe o nome de cobalamina.



X	Y	Nome
	-CN	Cianocobalamina (Vitamina B ₁₂)
	-OH	Hidroxicobalamina (Vitamina B _{12a})
	-CH ₃	Metilcobalamina
		Coenzima B ₁₂

Figura 3.1 - Estrutura Geral dos Cobaltocorrinóides

Fonte: FLORENT (1986).

Tabela 3.4 - Principais Compostos Derivados e Análogos da Vitamina B12

Nome Usual	Nome Químico
Vitamina B12 verdadeira	Cianocobalamina [α -(5,6-dimetilbenzimidazolil) Cobamida Cianeto]
Vitamina B12a	Hidroxicobalamina ou Aquacobalamina
Vitamina B12c	Nitritocobalamina ou Nitrocobalamina
Vitamina B12r	Cianocobalamina II
Vitamina B12s	Cianocobalamina I, Metilcobalamina ou Mecobalamina
Coenzima B12	5'-Dexosiadenosilcobalamina ou Cobamida
Pseudovitamina B12	α -(adenil)-Co-5'-Dexosiadenosilcobamida
Fator III	α -(5-Hidroxibenzimidazolil)cobamida Cianeto
Vitamina B12 - Coenzima	5,6 dimetilbenzimidazolil-5'-Desoxiadenosilcobalamina
Fator B	Cobinamida

Fonte: SPALLA et al. (1989), FLORENT (1986), PRATT (1972) e HARRIS (1968).

3.2.3 - Propriedades Físico - Químicas

A vitamina B12 ou cianocobalamina possui fórmula molecular $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ e Peso Molecular de aproximadamente 1355,42. Tem a forma de cristais vermelho-escuros, facilmente solúveis em água, álcool e fenóis, e insolúvel em acetona, clorofórmio, éter e solventes orgânicos. As cobalaminas estão presentes na natureza na forma de coenzima. A coenzima-vitamina B12 é muito instável na presença de luz e estável, somente em solução aquosa, à baixa temperatura ($-10^{\circ}C$). À temperatura ambiente, ela é facilmente transformada em hidroxicobalamina. Este composto também é instável, mas na presença de cianeto origina a cianocobalamina que é bastante estável (SPALLA et al., 1989, FLORENT,1986, PRATT,1972).

Os B12-corrinóides mostram melhor estabilidade a pH 4,0 - 6,0. Eles são sensíveis ao ácido ascórbico, tióis e raios gama. São produtos intracelulares, extraídos por tratamento com calor, água, solução tampão neutra, ácidos, alcoóis ou acetona aquosa. Quando corrinóides como vitamina B12-coenzima, hidroxicobalamina ou metilcobalamina são obtidos, a extração deve ser feita na ausência de luz. Porém, a adição de cianeto ao material celular, transforma as coenzimas instáveis em formas ciano-estáveis. Segundo SPALLA et al. (1989), este procedimento é usualmente aplicado na indústria.

Segundo FLORENT (1986), a vitamina B12 e seus compostos passam pelas seguintes reações:

1 - Reações envolvendo redução e oxidação do cobalto, que pode existir em três diferentes estados de oxidação. Estas reações mudam o estado de oxidação do cobalto sem afetar a parte orgânica da molécula. Reações de oxidação-redução são um excelente meio de descomplexação das cobalaminas;

2 - Reações envolvendo a substituição do radical Y-ligante que permite a obtenção de algum tipo de cobalamina. Procedimentos industriais para a preparação química de coenzima B12 e de metilcobalamina são baseados nestas reações. A ligação cobalto-carbono, considerada chave nas cobalaminas, é o sítio catalítico de reações enzimáticas envolvendo coenzima B12 e esta ligação está também envolvida na transferência do radical metil, do qual a metilcobalamina participa;

3 - Reações de troca envolvendo o ligante X, levando à formação de outros cobaltocorrinóides;

4 - Reações envolvendo a estrutura do anel corrino ou da cadeia lateral.

Estima-se que sejam conhecidas cerca de 15 reações enzimáticas envolvendo o anel corrino (SCHRAUZER,1977 citado por FLORENT,1986). Muitas têm sido observadas em microrganismos e podem ser classificadas em duas categorias:

a-) Reações envolvendo a transferência de um grupo metil, as quais não requerem a presença de corrinóides na forma de coenzima (5'-dexosiadenosil), mas de corrinóides simples como a hidroxicobalamina, envolvendo a formação intermediária dos metilcorrinóides;

b-) Reações que envolvem a transferência de hidrogênio, tais como isomerização ou redução. Estas requerem a presença de coenzima B12 e têm um mecanismo complexo.

Nos microrganismos, há numerosas enzimas dependentes da coenzima B12. As principais são: dioldihidratase, gliceroldihidratase, etanolamina-diaminase, glutamato-mutase e metilmalonil-CoA-mutase. Em mamíferos, somente as reações governadas por esta última enzima têm sido observadas (FLORENT, 1986).

3.2.4 - Biossíntese

As recentes pesquisas da biossíntese da molécula de vitamina B12 têm como objetivo principal elucidar o caminho biossintético que leva ao macrociclo tetrapirrol, e à incorporação do nucleotídeo na formação de vitamina B12 (SPALLA et al., 1989). Segundo FLORENT (1986), a sequência geral para a formação de cobalamina mostrada na Figura 3.2, é amplamente aceita. A glicina se junta ao succil-CoA para formar o ácido δ -aminolevulínico (ALA). Duas moléculas de ALA se condensam para formar o porfobilinogênio, que é a unidade básica do macrociclo. Daí, ocorre a formação sequencial de hidroximetilbilano e de uroporfirinogênio III (urogênio III), ponto onde a biossíntese da vitamina B12 e das porfirinas (hemoglobina, clorofila e heme) divergem. No urogênio III, a S-adenosilmetionina (SAM), um doador de radicais metil, age e leva à formação de C₂-monometilcorrifirina ou Fator I. Novamente por ação de moléculas de SAM, há a formação de dois intermediários: o C_{2,7}-dimetilcorrifirina (Fator II ou sirohidroclorina ou

hidroisobacterioclorina) e o C_{2,7,20}-trimetilcorrifirina (Fator III). Consegue-se então a descarboxilação do C₁₂; cinco metilações via SAM, provavelmente nos carbonos C₁₇, C_{12α}, C₁, C₅ e C₁₅; perda do carbono C₂₀-metil; incorporação do íon Co²⁺ e formação do ácido cobirínico. A sequência do urogênio III até o ácido cobirínico não é completamente compreendida. A formação de cobalaminas, a partir do ácido cobirínico, envolve as reações seguintes:

- 1 - Amidação de 6 a 7 grupos ácido-carboxílicos do anel corrino dando ácido cobírico, e inserção do ligante axial superior 5'-desoxiadenosil (ADO) dando ácido 5'-ADOCobírico;
- 2 - Incorporação de resíduos de isopropilamina, provavelmente produzidos por descarboxilação da treonina incorporada, para dar 5'-ADOCobinamida;
- 3 - Ativação da cobinamida por ATP (adenosina trifosfato), liberando ADP (adenosina difosfato) e formando 5'-ADOCobinamida-fosfato;
- 4 - Incorporação do GTP (guanosina trifosfato) formando 5'-ADOCobinamida-GDP liberando PP (pirofosfato);
- 5 - Incorporação do 5,6-dimetilbenzimidazola (5,6 DMI) via riboflavina, na forma de nucleotídeo (α-ribazola-5'-fosfato). O nucleotídeo ribose é esterificado em C₃ com cobinamida-GDP-fosfato para formar vitamina B12-fosfato. O fosfato é então eliminado por uma fosfatase específica, formando a vitamina B12.

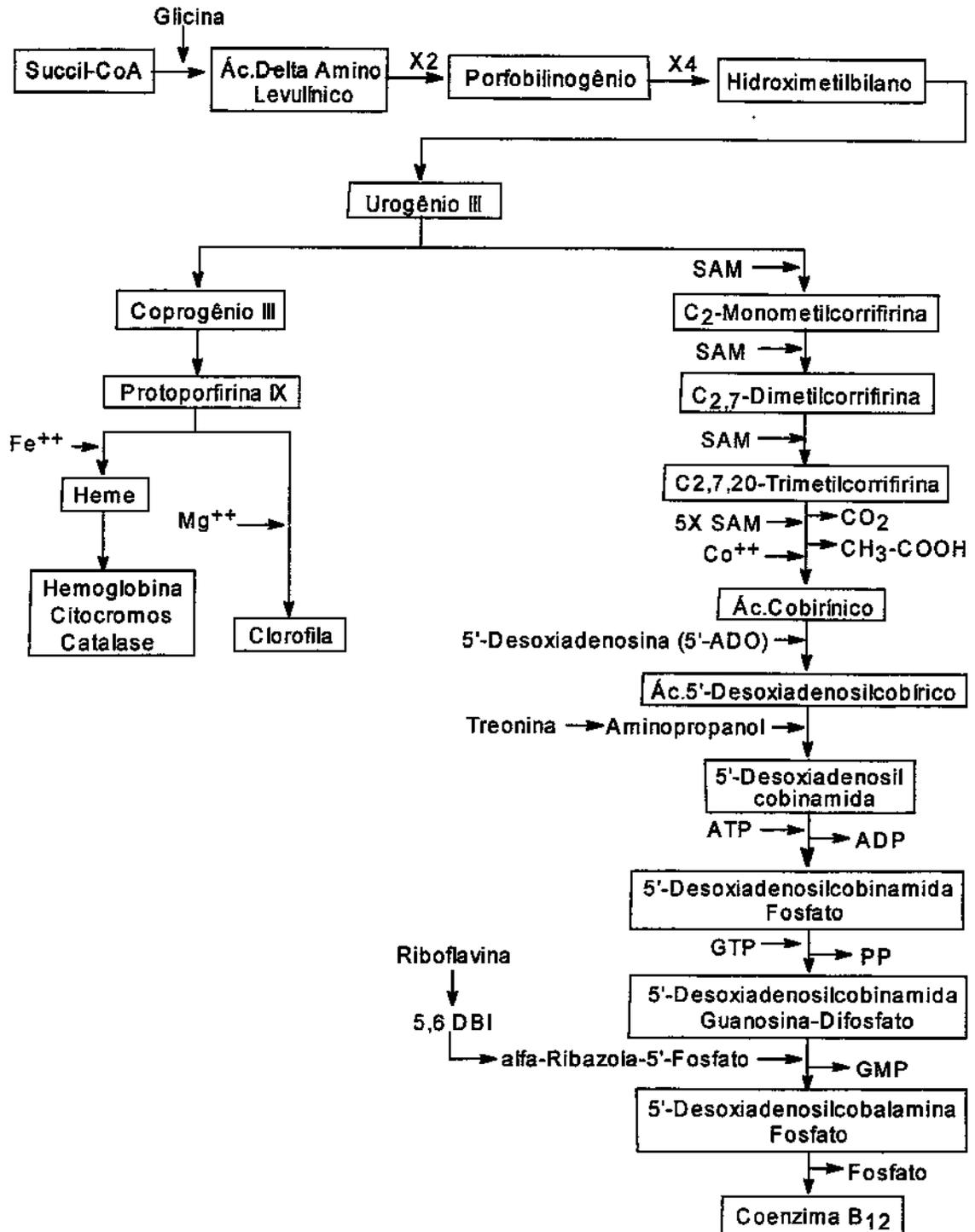


Figura 3.2 - Biossíntese da Vitamina B12

Fonte: FLORENT (1979).

Bactérias aeróbicas e aerotolerantes sintetizam as frações de 5,6 dimetilbenzimidazola da riboflavina, via flavina mononucleotídeo. Esta via requer a presença de oxigênio. Alguns microrganismos não conseguem sintetizar o 5,6 DMI, necessitando da presença do mesmo no meio de crescimento (FLORENT, 1986).

3.2.5 - Microrganismos Produtores

Com a evolução da pesquisa sobre a vitamina B12, tornou-se claro que a melhor fonte produtora na natureza é representada pelos microrganismos. Atualmente, ela é sintetizada industrialmente por uma grande variedade de bactérias e actinomicetes, enquanto sua produção por leveduras, fungos e tecidos de plantas e animais superiores, não é muito utilizada (SPALLA et al., 1989).

Segundo PERLMAN (1959), entre os microrganismos produtores de vitamina B12, destacam-se os gêneros de bactérias: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Methanobacillus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptococcus* e *Xantomonas*. Entre actinomicetes, quantidades razoáveis são produzidas por *Nocardia rugosa*, *N. gordueri*, *Streptomyces albidoflovis*, *S. antibioticus*, *S. aureofaciens*, *S. aureus*, *S. farinosus*, *S. fradial*, *S. griseus*, *S. olivaceus*, *S. roseochromogenes* e *S. vinaceus*.

Numerosos autores têm utilizado bactérias do gênero *Propionibacterium* e *Pseudomonas* como microrganismos produtores de B12. As principais vantagens por eles enumeradas são a alta produtividade e rápido crescimento (QUESADA-CHANTO et al., 1998, KEUTH e BISPING, 1993, BYKHOVSKII et al., 1991, CROW, 1988, FA et al., 1984 e MARWUAHA et al., 1983-a). Para YE et al. (1996), a principal vantagem em se utilizar essas culturas, reside no alto potencial para acumular vitamina B12 intracelularmente.

Segundo BROCK et al. (1994), as *Pseudomonas* têm como características gerais: são bastonetes compridos ou curvos, não esporulados, Gram-negativas, flagelo simples ou múltiplos e apresenta metabolismo respiratório nunca fermentativo, embora possa produzir pequenas quantidades de ácido, aerobicamente a partir da glicose; usa compostos orgânicos não poliméricos e de baixo peso molecular. Algumas espécies podem usar H₂ como doador de elétrons e nitrato como acceptor de elétrons, anaerobicamente. Arginina pode ser usada como fonte de energia, também anaerobicamente. As *Pseudomonas* têm em muitos casos, necessidades nutricionais muito simples e crescem a pH neutro, no intervalo de temperatura dos microrganismos mesofílicos. Uma das principais características desse gênero, é a grande variedade de compostos orgânicos usados como fontes de carbono e como doadores de elétrons para geração de energia. Algumas espécies podem utilizar mais de 100 diferentes compostos. Essa versatilidade nutricional deve-se em parte, à ação de diferentes enzimas. As *Pseudomonas* são microrganismos ecologicamente importantes no solo e na água, sendo provavelmente responsáveis pela degradação aeróbica de muitos compostos solúveis derivados de plantas e animais mortos, bem como de compostos recalcitrantes do solo.

As bactérias ácido propiônicas (gênero *Propionibacterium*) foram descobertas a partir do queijo suíço, onde sua produção fermentativa de CO₂ provocava o aparecimento dos “olhos” (buracos) e sabor característicos. Tais bactérias são Gram-positivas e anaeróbicas, apresentando-se na forma de bastões não-esporulados, sem mobilidade. Fermentam ácido láctico, carboidratos e polihidroxi-alcoóis produzindo ácido propiônico, ácido succínico, ácido acético e CO₂. Suas necessidades nutricionais são complexas e elas usualmente crescem vagarosamente (BROCK et al., 1994).

MARWUAHA et al. (1983-a) utilizaram três linhagens de *Propionibacterium shermanii* para produzir vitamina B12 a partir de soro de queijo. Eles conseguiram rendimentos de até 5,12 mg B12/l de meio cultura, após 168 h de fermentação.

QUESADA-CHANTO et al. (1994-b) utilizaram *Propionibacterium* para produzir B12 a partir de sacarose. Efetuaram um “screening” a partir de 14 espécies de

Propionibacterium, concluindo que *P. acidipropionici*, *P. jensenii* e *P. freudenreichii*, foram as espécies mais efetivas, permitindo a obtenção de até 5,0 mg B12/l.

KEUTH e BISPING (1994) obtiveram 30 mg B12/g peso seco de substrato, utilizando o fungo *Rhizopus oligosporus*, e as bactérias *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*, em fermentação semi-sólida para produção de “tempeh” - alimento fermentado de soja, muito consumido em alguns países orientais.

KOJIMA et al. (1993) isolaram aproximadamente 500 bactérias que assimilam isopropanol, das quais 23 mostraram produção de vitamina B12. Após uma seleção, foi possível obter rendimentos de até 2 mg B12/l meio de cultura, empregando *Arthrobacter hyalinus*.

BAINOTTI et al. (1996) estudaram a utilização de *Acetobacterium sp* para produção de vitamina B12 a partir de metanol. Segundo esses autores, a cultura utilizada tem grande versatilidade no metabolismo, podendo degradar um grande número de substratos e sintetizar cobalaminas em uma quantidade superior ao *Propionibacterium shermanii*. Após otimização do meio de cultura, eles conseguiram obter 4,84 mg B12/l meio de cultura, porém com um baixo rendimento celular (1,24 g célula/l).

LAGO e DEMAIN (1969) concluíram que a *Pseudomonas denitrificans*, considerada uma boa produtora de vitamina B12, utiliza a biossíntese da vitamina exclusivamente para a síntese da metionina. O maior rendimento por eles obtidos – quando utilizaram um mutante -, foi de 14,7 mg B12/l.

NOPARATNARAPORN et al. (1986) conseguiram obter 38 µg B12/g célula seca, com *Rhodopseudomonas gelatinosa*, conduzindo a fermentação em dois estágios: aeróbico e microaeróbico. Para eles, essa conversão pode aumentar o conteúdo do ácido aminolevulínico sintetase (ALAS), que catalisa a reação de condensação da glicina e

succinato para o ácido aminolevulínico (ALA), que desempenha um papel importante na síntese de vitamina B12 via porfirinas.

FA et al. (1984) relataram a influência da betaína na produção de vitamina B12 por *Pseudomonas denitrificans* em presença de sacarose. Um rendimento máximo de 3,0 mg B12/l foi obtido. Os autores acreditam que a betaína exerce um efeito positivo na produção de B12, por aumentar o conteúdo intracelular específico do ALAS.

PÉREZ-MENDOZA e GARCÍA-HERNÁNDEZ (1983), também utilizaram *Propionibacterium shermanii* e *P. freudenreichii* para produzir vitamina B12 a partir de resíduos de destilação de processamento industrial de lima. O rendimento chegou a 6,35 mg de vitamina B12 / l meio de cultura, após 192 h de fermentação.

A produção industrial de vitamina B12, da mesma forma que outros metabólitos microbianos, é conduzida utilizando microrganismos resultantes de um intenso trabalho de modificação e seleção genética, que consiste principalmente do tratamento dos microrganismos produtores com agentes mutagênicos e seleção de mutantes que levam a vantagens práticas, como: alta produtividade, boa estabilidade genética, resistência a altas concentrações de substâncias presentes no meio, alta taxa de crescimento, etc (SPALLA et al., 1989). Algumas técnicas têm sido descritas para a obtenção de mutantes de *Pseudomonas sp.* e *Propionibacterium*, que apresentam boas produções de vitamina B12. Segundo SPALLA et al. (1989), as mais utilizadas são: tratamento com agentes mutagênicos (ultravioleta, etilenoimina, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, etc), com precursores (5,6 dimetilbenzimidazola) e com substâncias que influenciam a biossíntese (porfirina, catalase e ácido aminolevulínico).

A Tabela 3.5 mostra uma relação dos principais microrganismos produtores de vitamina B12.

Tabela 3.5 – Principais Microrganismos Produtores de Vitamina B12

Microrganismo	Substrato	Rendimento	Referência
<i>Eubacterium limosum</i>	Metanol e CO ₂	8,5 mg/g cél.	LEBLOAS et al. (1994)
<i>Citrobacter freundii</i>	Tempeh	200 ng/g cél.	KEUTH e BISPING (1993)
<i>Propionibacterium shermanii</i>	permeado de soro resíduo de lima	5,12 µg/ml 6,35 mg/l	MARWUAHA et al (1983-b) PÉREZ-MENDOZA e GARCÍA-HERNANDEZ (1983)
<i>P. freudenreichii</i>	Glicose	370 µg/g cél.	KRÁLOVÁ e RAUCH (1985)
<i>P. acidipropionici</i>	Sacarose	3,3 mg/l	QUESADA-CHANTO et al.(1994-a)
<i>Acetobacterium sp.</i>	Metanol	23 mg/g cél.	INOUE et al. (1992)
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Sacarose	3,0 µg/ml	FA et al. (1984)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Metanol	4 mg/l	MAZUMDER et al. (1987)
<i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i>	amido amido	38 µg/g cél. 33µg/g cél.	NOPARATNARAPORN et al. (1986) SASAKI e NAGAI (1986)

3.2.6 - Fermentação

Algumas bactérias microaerofílicas produzem cobaltocorrinóides em meios com carboidratos utilizando um suplemento de cobalto apropriado. Contudo, a produção de cobalaminas depende ainda da formação interna ou suplementação externa de 5,6 DMI. Alguns microrganismos como as propionibacterias e seus mutantes, estão aptos a sintetizar seu próprio 5,6 DMI, enquanto outros, como as *Pseudomonas*, necessitam de adição desse composto (FLORENT,1986).

Segundo BYKHOVSKII (1979) (citado por FLORENT, 1986), para se obter um alto rendimento, com algumas culturas específicas, parte do processo deve ser conduzido sob condições anaeróbicas ou microaeróbicas. Embora a aeração promova a formação de

DMI, e portanto de vitamina B12, em alguns tipos de bactérias como as Propionibactérias, ela reprime um dos estágios da biossíntese. Logo, é recomendável conduzir o primeiro estágio da fermentação sob baixas taxas de aeração até que a maior parte do substrato tenha sido consumido, a fim de promover o crescimento do microrganismo. O ar deve então ser introduzido para induzir a biossíntese do DMI e converter a cobinamida em cobalamina.

Há uma concordância entre os autores, que quando se trabalha com propionibacterias, a fermentação deve ser conduzida primeiro sob condições anaeróbicas e depois aeróbicas. A duração de cada uma dessas etapas varia de 48 a 96 horas. A anaerobiose é geralmente conseguida com nitrogênio a baixa pressão ou frascos completamente selados (QUESADA-CHANTO et al. 1994-a, SILVEIRA et al., 1990, NOPARATNARAPORN et al., 1986, YONGSMITH e APIRAKTIVONGSE., 1983, MARWUAHA et al., 1983-a).

A faixa de temperatura usada em fermentações para produção de vitamina B12 varia de 28 a 37 °C. Porém, muitos autores elegeram a faixa de 28-32 °C, como a mais apropriada quando se trabalha com a maior parte das bactérias e fungos (QUESADA-CHANTO et al., 1994-a, KOJIMA et al., 1993, INOUE et al., 1992, MARWUAHA et al., 1983-a, SASAKI et al., 1981, RO et al., 1979).

KEUTH e BISPING (1994) produziram vitamina B12 por fermentação de “tempeh” utilizando *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*. Eles observaram que a produção de cianocobalamina foi máxima na faixa de temperatura de 30 a 32 °C, e mínima em 24 a 28 °C. Da mesma forma, o tempo necessário para se alcançar o rendimento máximo de vitamina B12, passou de 34 horas a 32 °C para 67 horas a 24 °C.

Os níveis de pH mais comumente utilizados na produção de cianocobalaminas vão de 6,2 a 7,2 para bactérias e de 5,0 a 6,0 para fungos (KOJIMA et al., 1993, KEUTH e BISPING, 1993, NOPARATNARAPORN et al., 1986, SASAKI e NAGAI, 1986, SASAKI et al., 1981). Nos experimentos em que se empregam bactérias do gênero *Propionibacterium* e *Pseudomonas*, há uma queda acentuada do pH durante a fermentação,

devido a produção de substâncias como ácido propiônico e ácido acético (QUESADA-CHANTO et al., 1997, YONGFU et al., 1995).

Segundo HSU e YANG (1991), muitas propionibacterias são fortemente dependentes do pH. QUESADA-CHANTO et al. (1994-a) também observaram essa dependência, quando utilizaram *Propionibacterium acidipropionici* para produzir vitamina B12 a partir de sacarose. Eles mostraram que o nível ideal de pH é de 6,5 a 6,8.

PÉREZ-MENDONZA e GARCÍA-HERNANDEZ (1983) por sua vez, utilizaram pH 7,0 na fermentação de rejeitos de lima por *Propionibacterium shermanii* e *P. freudenreichii*, visando a produção de vitamina B12. Esse pH também foi utilizado por NISHIO et al. (1977), para fermentação de uma mistura de metanol-amônia por *Pseudomonas* AM-1.

Em fermentação para produção de vitamina B12, independentemente do tipo de bactéria e das condições de crescimento utilizados, uma mistura de cobalaminas (principalmente 5'-desoxiadenosil- e metil-, mas algumas vezes também hidroxil- e ciano-) e de certos análogos são sempre obtidos (FLORENT, 1986). Do ponto de vista industrial, estas misturas não são separadas, embora a separação possa ser feita através de HPLC.

Segundo FLORENT (1986) e SPALLA et al. (1989), a extração da vitamina B12 do caldo de fermentação é feita depois da conversão da cobalamina em cianocobalamina (forma estável), por tratamento com cianeto. Com algumas variações, o procedimento geral consiste de dois estágios:

- 1 - Solubilização das cobalaminas e conversão para cianocobalamina. Todo o caldo de fermentação ou então uma suspensão aquosa de células isoladas é aquecida de 80 a 120 °C, a pH 6,5 - 8,5 ou abaixo de 3,0, por 10 a 30 minutos. As células são rompidas liberando as várias cobalaminas. Estas são então convertidas em cianocobalaminas por tratamento com KCN, usualmente na presença de nitrito de sódio;

2 - Extração de um produto impuro a 80% (que pode ser usado em alimentação animal), seguido de uma purificação a 95-98% (para uso farmacêutico).

Algumas substâncias possuem um grande efeito estimulatório na produção de vitamina B12. Elas são conhecidas como elementos essenciais à biossíntese e precursores. No primeiro grupo destacam-se os íons cobalto e o 5,6 dimetilbenzimidazola. Dentre os precursores, tem-se a betaína, colina, glicina, treonina, ácido δ -aminolevulínico, aminopropanol, 5,6 dimetilbenzimidazola e o-fenilenodiamina (KRÁLOVÁ e RAUCH, 1985, FA et al., 1984 e DEMAÏN et al., 1968).

Muitas são as referências da literatura acerca do efeito estimulante na produção de B12 que estas substâncias provocam. KRÁLOVÁ e RAUCH (1985) conseguiram aumentar a produção de vitamina B12 por *Propionibacterium freudenreichii* e *P. shermanii*, quando adicionaram antimetabólitos e precursores à fermentação. Além disso, observaram que na concentração de indutores que estimulou a produção de B12, somente a verdadeira vitamina B12 e não análogos foram produzidos.

NARITOMI et al. (1993) reportaram que a adição de glutamato levou ao aumento do conteúdo extracelular de corrinoídes em fermentação de *Methanosarcina sp.*, provavelmente pela estimulação do ácido aminolevulínico sintetase (ALAS).

MAGDOUB et al. (1992) observaram que o cloreto de colina, numa concentração ótima de 0,25%, permitiu o aumento da produção de vitamina B12 por *Propionibacterium freudenreichii* utilizando permeado de soro de leite como substrato.

FA et al. (1984) também descreveram a influência de estimulantes na produção de vitamina. Eles concluíram que a adição de 5,6 DMI e betaína foram essenciais para o aumento do rendimento de vitamina B12 por *Pseudomonas denitrificans*, em presença de sacarose.

As bactérias do gênero *propionibacterium* estão aptas a produzir o próprio 5,6 DMI sob aeração. Para outros microrganismos, o 5,6 DMI deve ser suplementado durante a fermentação. Em relação aos íons de cobalto, sabe-se que os mesmos devem ser adicionados ao meio de cultivo sob a forma de sais (cloreto de cobalto, nitrato de cobalto, etc) (QUESADA-CHANTO, 1994-a, MAZUMDER et al., 1987, FLORENT, 1986).

KRÁLOVÁ e RAUCH (1985) estudaram a influência de o-fenilenodiamina e 5,6 DMI (antimetabólito e precursor, respectivamente) em fermentação de glicose por *Propionibacterium shermanii* e *P. freudenreichii*, visando a produção de vitamina B12. Esses autores concluíram que o efeito estimulatório de tais substâncias depende principalmente da concentração e do tempo de adição. A o-fenilenodiamina em baixas concentrações (50 µg/100 ml) aumentou a biossíntese de vitamina B12 em até 150%, enquanto que em concentrações de até 200 µg / 100 ml, exerceu um efeito fortemente inibitório. Quando uma alta concentração de 5,6 DMI (1 µg/100 ml) foi aplicada no início da fermentação, o rendimento de vitamina teve um considerável decréscimo. Quando esta mesma concentração foi usada depois da fase logarítmica de crescimento do microrganismo (após 48 horas), a produção de B12 teve um acréscimo de 143%. É importante salientar que, nas concentrações que estimularam a produção, somente a biossíntese da cianocobalamina teve lugar, enquanto a biossíntese de análogos com pesos moleculares mais altos, foram inibidos. Outros autores, como QUESADA-CHANTO et al. (1994-a), MAZUMDER et al. (1987) e MARWUAHA et al. (1983-b), também mostraram a importância da adição do 5,6 DMI após a fase logarítmica de crescimento, após o microrganismo ter consumido a maior parte do substrato.

Segundo MERVYN e SMITH (citado por DEMAIN et al., 1968), doadores de grupos metil, como a betaína e colina, são conhecidos por estimular a produção de vitamina B12 por certos microrganismos. STERN e FRIEDMAN (citados por SPALLA et al., 1986), relataram que esses dois compostos estimularam a formação de vitamina B12 por *Rhizobium trifolii*, *R. meliloti*, *Agrobacterium sp.* e *Bacillus megaterium*, obtendo de 5 a 6 vezes mais produto. O efeito da adição de betaína e colina na produção de B12 por

Pseudomonas denitrificans crescendo em meio quimicamente definido é mostrado na Figura 3.3.

Tem sido demonstrado que o mecanismo de estimulação da produção de vitamina B12 por betaína e colina não é devido à doação de grupos metil para o anel corrino. Já se sabe que a metionina é o único precursor desses grupos (WHITE e DEMAIN citado por SPALLA et al., 1989, DEMAIN et al., 1968). FA et al. (1984) mostraram que a presença de betaína promove o crescimento do conteúdo intracelular específico da primeira enzima da biossíntese do anel corrino e da porfirina (ácido δ -aminolevulínico sintetase - ALAS). Na presença de betaína, há um aumento na atividade da enzima. Segundo eles, a mais simples interpretação do papel da betaína na produção de vitamina B12, é que ela estimula a síntese de ALAS.

Segundo FLORENT e NINET (1979), os principais objetivos em pesquisa de fermentação de vitamina B12 e seus derivados são:

- Adquirir um melhor conhecimento da biossíntese dessa vitamina de modo a favorecer os estudos bioquímicos e genéticos;
- Melhorar os microrganismos que possuem boa capacidade de produção (*Propionibactérias*, *Pseudomonas*, etc);
- Melhorar as técnicas de extração e purificação;
- Trocar os substratos tradicionais por nutrientes mais econômicos, como rejeitos ou subprodutos.

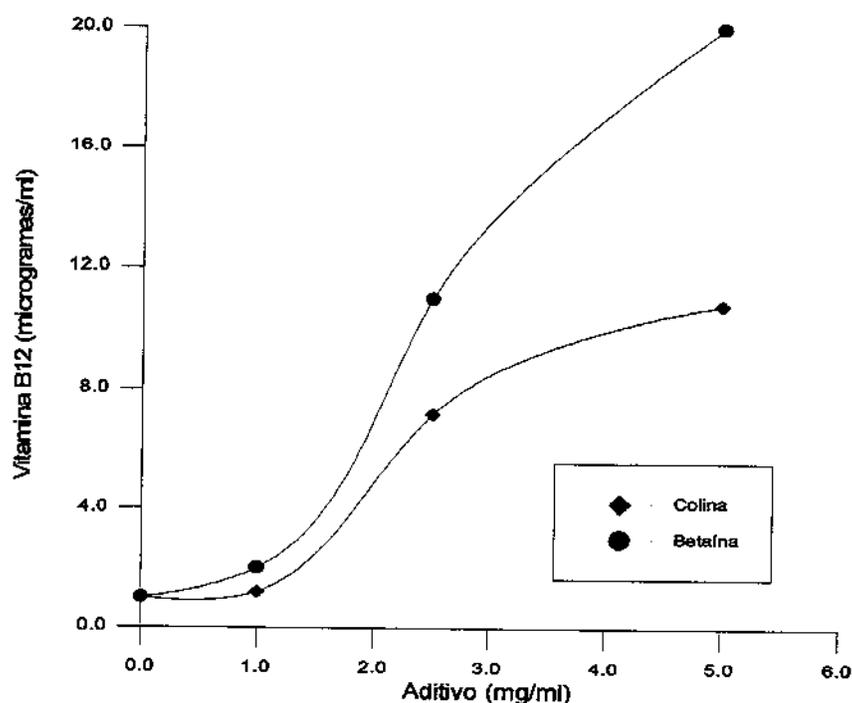


FIGURA 3.3 - Efeito da Betaína e Colina na Produção de Vitamina B12 por *Pseudomonas denitrificans*

Fonte: DEMAIN et al., (1968).

3.2.7 - Vitamina B12 na Medicina e Bioquímica

3.2.7.1 - Mecanismos Bioquímicos

As propriedades biológicas da vitamina B12 são muitas. No homem, ela desperta interesses do ponto de vista bioquímico, hematológico e neurológico. Esta versatilidade fisiológica pode ser explicada pelo fato de que a B12 está envolvida no funcionamento de numerosas enzimas, que têm papel vital no metabolismo (SPALLA et al., 1989). Sabe-se que as cobalaminas são essenciais para o crescimento e reprodução celular, hematopoiese, síntese de nucleoproteínas e reações de metilação. Alguns análogos da cianocobalamina

também apresentam importância bioquímica. A coenzima adenosilcobalamina está envolvida em numerosas reações de rearranjo mediadas pela mutase e desidrase; a metilcobalamina é essencial para a enzima metiltransferase, que catalisa a regeneração do tetraidrofolato e; a hidroxilcobalamina é usada em associação com o nitroprussiato de sódio, no tratamento de intoxicações por cianeto (TYLER et al., 1988).

Historicamente, entre as reações enzimáticas presentes na vitamina B12, a isomerização de ácido L-glutâmico para ácido β -metil aspártico, é a mais importante porque seu estudo levou ao isolamento da vitamina B12-coenzima (BARKER et al. citado por SPALLA et al., 1989). Do ponto de vista bioquímico, a B12 e seus análogos estão envolvidos em importantes mecanismos e reações:

- Sua deficiência no homem diminui a biossíntese do poliglutamato (REED et al. citado por SPALLA et al., 1989);
- A presença de adenosilcobalamina é necessária para o funcionamento da metil-malonil-CoA-mutase (FRIEDRICH, 1988);
- A degradação da metil-malonil-CoA, através do succil-CoA, é importante para evitar a metilmalonilacidemia (causada pela toxicidade do ácido metilmalônico) (CARDINALE et al., 1969).

Na medicina, a importância da vitamina B12 está relacionada com a sua atividade anti-anêmica, baseado numa inter-relação entre a vitamina, o ácido fólico e a metionina; síntese de ácidos nucleicos e proteínas; metabolismo dos carboidratos e lipídios, e síntese da mielina (BOUKHZER, 1992, SPALLA et al., 1989).

3.2.7.2 - Absorção, Transporte, Metabolismo e Excreção

A vitamina B12 é estocada no fígado e apresenta uma meia-vida estimada em 400 dias. Pode ser absorvida pelo organismo através de dois mecanismos distintos: o primeiro, denominado de mecanismo tipo difusão, acontece quando a quantidade disponível de B12 é alta. O segundo, muito mais importante, é conhecido como processo de absorção ativa (TYLER et al., 1988).

Segundo HARRIS (1968), a vitamina B12 é um dos únicos entre todos os nutrientes essenciais, a ter um mecanismo altamente especializado para sua absorção. Embora as necessidades diárias para o homem sejam medidas em microgramas, a habilidade para transportar essas pequenas quantidades através da parede do intestino depende da presença de uma enzima transferase, secretada pelas células parietais da mucosa gástrica, e denominada Fator Intrínseco (IF). O Fator Intrínseco liga-se firmemente à vitamina B12, formando o complexo IF-B12. Neste, a vitamina é protegida da ação dos microrganismos e da perda pelas fezes. O complexo é transportado através do trato gastrointestinal até alcançar o íleo-distal (porção inferior do intestino delgado), onde é reabsorvido pela mucosa intestinal. Neste ponto, segundo SPALLA et al.(1989) e HARRIS (1968), acontece um mecanismo muito interessante: o IF, aparentemente não possui aptidão para atravessar a parede intestinal em direção à corrente sanguínea. Entra então em ação, o Fator Extrínseco (EF), que “quebra” a forma termodinamicamente estável do complexo B12-IF, permitindo assim que a vitamina alcance a circulação sanguínea. Acredita-se que o íon cálcio também esteja envolvido no rompimento do complexo IF-B12 (TYLER et al., 1988).

O IF é uma glicoproteína de peso molecular entre 55000 e 60000, mostrando quantidade variável de açúcares, de acordo com a espécie de origem. Possui 2 sítios receptores: um para a vitamina e outro para as células epiteliais do íleo. A absorção acontece em pH neutro e na presença de íons de cobalto ou magnésio. Na formação do complexo B12-IF, acredita-se que o 5,6 dimetilbenzimidazola tenha papel importante. Há outras proteínas que se ligam à vitamina B12, auxiliando no transporte da mesma até o

plasma sanguíneo. São conhecidas como transcobalaminas (TC), das quais as mais importantes são a TCI e TCII (TYLER et al., 1988).

Embora o processo de excreção normal da B12 seja por via biliar, quantidades excessivas de cobalaminas são excretadas pelos rins (TYLER et al., 1988).

3.2.7.3 - Importância da Vitamina B12 nos Animais

Segundo COATES (1968), embora seja geralmente aceito que todos os animais necessitem de vitamina B12, é praticamente impossível calcular a quantidade exata que cada espécie precisa. Na Tabela 3.6 é apresentada uma estimativa das necessidades diárias dos animais em comparação com o homem. Além da suplementação através de rações, os animais podem obter a vitamina B12 por outras fontes como: síntese por microrganismos do trato gastrointestinal, reservas existentes nos próprios tecidos, solo e água contaminada, e coprofagia. Logo, a quantidade requerida na dieta, depende da extensão da contribuição dessas fontes (PRATT, 1972 e COATES, 1968).

Para ROCHE (1972), os porcos, cachorros, ratos, raposas, frangos e demais aves domésticas estão entre os animais que mais sofrem com a deficiência de vitamina B12. Neles, este tipo de hipovitaminose pode levar à inibição do crescimento, anemia e problemas na pele, sistema nervoso, trato digestivo e sistema reprodutor.

Tabela 3.6 - Necessidades Diárias Estimadas de Vitamina B12 para Animais e Homem

Espécie	Necessidades
Galinha	8,8-20 µg/Kg
Galinha para criação	2 µg/Kg
Peru	4 µg/Kg
Porco	20 µg/Kg
Porco em Crescimento	
10 lb. peso vivo	22 µg/Kg
25 lb. peso vivo	15,4 µg/Kg
50 lb. peso vivo	11 µg/Kg
Bezerro	10-40 µg/Kg
Cachorro	10 µg/Kg
Rato	0,5 µg/100 g
Macaco	2,5 µg/100 g
Homem	1-2 µg

Fonte: ROCHE (1972), COATES (1968), HARRIS (1968).

3.3 - Planejamento Experimental

Segundo CORNELL (1990), um programa de planejamento experimental deve ser concebido tendo em mente duas propostas principais: quantificar a relação entre os valores das respostas de algumas variáveis medidas e o conjunto de fatores experimentais que podem afetá-las e, encontrar o valor dos fatores que produzem a(s) melhor(es) resposta(s).

Para NETO et al. (1995), a primeira coisa a se fazer no planejamento de um experimento é determinar quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. Os fatores podem ser quantitativos ou qualitativos. Em seguida, é preciso

definir claramente que objetivo se pretende alcançar com os experimentos, porque isso determinará que tipo de planejamento experimental deve ser utilizado. A seguir, são descritos dois tipos particulares de planejamento experimentais bastante úteis.

3.3.1 - Planejamento Fatorial

Planejamentos desse tipo são de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta. São planejamentos muito simples de executar e podem ser ampliados para formar um planejamento mais sofisticado e assim se conhecer melhor a relação funcional existente entre a resposta e os fatores (NETO et al., 1995).

Um planejamento fatorial requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores, ou seja, se houver n_1 níveis do fator 1, n_2 níveis do fator 2, ..., e n_k do fator k , o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. O número mínimo de experimentos é $n_1 \times \dots \times n_k$. O tipo de planejamento fatorial mais simples é aquele em que se estuda apenas dois níveis (superior e inferior) para cada um dos k fatores. Logo, teremos $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes (NETO et al., 1995).

3.3.2 - Planejamento Fatorial Fracionário

A medida que o número de fatores k aumenta, o número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial 2^k completo, aumenta rapidamente. Porém, a informação desejada, em muitos casos, pode ser obtida fazendo-se um número de ensaios bem menor, correspondente a uma fração do número de ensaios do planejamento completo.

Na prática, isto é possível devido ao planejamento fatorial fracionário. Neste tipo de planejamento, observa-se que os efeitos das interações de ordem mais alta, muitas vezes têm valores pequenos e são destituídos de qualquer importância prática. Além disso, quando o número de variáveis aumenta, crescem as chances de que uma ou mais variáveis não afetem significadamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, seja por meio de efeitos de interação (NETO et al., 1995 e BOX et al., 1978). Um fatorial fracionário costuma ser representado por 2^{k-m} , que é uma fração correspondente a $(1/2)^m$ do fatorial completo 2^k , onde “m” é um número inteiro não negativo tal que $2^{k-m} \geq k+1$. Por exemplo, um planejamento do tipo 2^{4-1} é uma meia fração do fatorial completo 2^4 , indicando que existem quatro variáveis com dois níveis, mas são realizados apenas 8 ensaios (NETO et al., 1995 e KHURI & CORNELL, 1987).

Em um planejamento fatorial fracionário, as respostas obtidas não são valores dos efeitos isolados, mas sim uma “mistura ou confundimento” entre eles. A análise desses efeitos é feita através da resolução do planejamento. Em geral, um planejamento de resolução R é aquele no qual nenhum efeito do fator de ordem “p” está confundido com algum de ordem menor que R-p. Deste modo, num planejamento com resolução cinco (R = V), os efeitos principais estão misturados somente com as interações de quatro fatores, enquanto as interações de dois fatores se misturam com as de três. Quem determina a resolução de um fatorial são as suas relações geradoras (NETO et al., 1995, BOX et al., 1978).

3.3.3 - Método de Superfície Resposta

Segundo NETO et al. (1995), a metodologia de superfície resposta (RSM) é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais e constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou

mínima) da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos, a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

BOX et al. (1978) descreve que a técnica de MSR pode responder a questões do tipo:

- 1 - Como uma resposta particular é afetada por um dado conjunto de variáveis de entrada, sobre uma região específica de interesse?
- 2 - Quais variáveis de entrada levarão a um produto que satisfaça as especificações desejadas?
- 3 - Quais valores de entrada renderão o máximo para a resposta específica? Como é a superfície de resposta neste máximo?

Como a modelagem de superfície resposta é feita ajustando-se modelos, é importante decidir que tipo de modelo melhor expressa a resposta como função das variáveis independentes. Modelos de 1ª e 2ª ordem são geralmente utilizados. Normalmente, como não se conhece nem o formato da superfície e nem a localização, começa-se admitindo que a superfície resposta obtida é uma função linear dos fatores, e portanto, a resposta pode ser estimada por um modelo do tipo:

$$Y = b_0 + \sum_i^k b_i X_i \quad (3.1)$$

onde:

Y = função resposta;

b_i = coeficiente das variáveis independentes;

X_i = variável codificada.

A codificação das variáveis é dada por:

$$X = \frac{Z - \bar{Z}}{\Delta Z / 2} \quad (3.2)$$

onde:

Z = valor real da variável;

\bar{Z} = valor médio da variável (ponto central);

X_i = intervalo de variação de Z .

Para se calcular os coeficientes da Equação 3.1, os dados são obtidos pela construção de um planejamento fatorial completo 2^k , com todas as combinações possíveis das k variáveis no nível superior (+1) e inferior (-1). A estimativa do erro experimental pode ser obtida através da realização de ensaios no ponto central (nível 0).

Se o modelo linear não for adequado, deve-se então partir para um modelo quadrático do tipo:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1}^k b_{ij} X_i X_j \quad (3.3)$$

onde:

b_{ii} e b_{ij} são os coeficientes dos termos quadráticos das variáveis independentes

Segundo COSTA (1996), diversos são os planejamentos que podem ser usados para montar a série de experimentos adicionais que possibilitem o cálculo dos coeficientes da Equação 3.3. BOX e WILSON (citados por KHURI e CORNELL, 1987), criaram o chamado planejamento com composto central, também conhecido como configuração “estrela”, consistindo de um fatorial completo 2^k , replicatas no ponto central e dois pontos sobre o eixo de cada variável a uma distância $\pm \alpha$ do ponto central.

Segundo NETO et al. (1995), a avaliação estatística, com relação ao grau de ajuste dos modelos aos dados experimentais, pode ser efetuada utilizando-se o coeficiente de correlação e o teste F de significância.

O teste F baseia-se na verificação se os modelos propostos explicam quantidade significativa da variação dos dados experimentais, realizado através da comparação do valor F estimado a partir dos resultados da análise de variância (ANOVA), aplicados a Equação 3.4, com o valor tabelado para uma distribuição de referência $F_{\alpha, p-1, N-p}$. Para o modelo ser considerado válido, o valor de F calculado deve ser superior ao tabelado (RODRIGUES, 1993).

$$F = [SQR / (p - 1)]/[SQE / (N - p)] \quad (3.4)$$

onde:

SQR = soma dos quadrados devido à regressão;

SQE = soma dos quadrados devido ao erro;

$P - 1$ = graus de liberdade associado a SQR;

$N - p$ = graus de liberdade associados a SQE.

3.3.4 – Caminho de Ascendência Máxima

Segundo KHURI e CORNELL (1987), o procedimento denominado caminho de ascendência máxima consiste em projetar uma sequência de experimentos ao longo do caminho de máximo aumento da resposta, de acordo com a Figura 3.4. A direção desta sequência depende da escala adotada para as variáveis codificadas, sendo perpendicular às linhas de contorno (BOX et al., 1978). A análise do resultado obtido nesta etapa fornecerá o novo ponto central para estudo.

Os autores descrevem no trabalho uma metodologia matemática para o método. Assumem inicialmente como verdadeira, a hipótese que a superfície de resposta pode ser aproximada, localmente, pela equação de um hiperplano, representada por:

$$\eta = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (3.5)$$

Tal aproximação é feita usando-se o modelo de 1ª ordem, obtido a partir dos dados experimentais, conforme a Equação 3.1.

CORNELL (1990) e KHURI e CORNELL (1987), apontam que os experimentos adicionais a serem realizados ao longo do caminho de ascendência máxima, deverão corresponder a incrementos de $1,0.\Delta_i$, $1,5.\Delta_i$, $2,0.\Delta_i$..., nos valores do ponto central das variáveis dependentes, ou seja:

$$\Delta_i = X_i \cdot (\Delta Z_i / 2) \quad (3.6)$$

$$X_i = b_i / 2 \cdot v \quad (3.7)$$

onde:

Δ_i = troca incremental;

v = multiplicador de Lagrange.

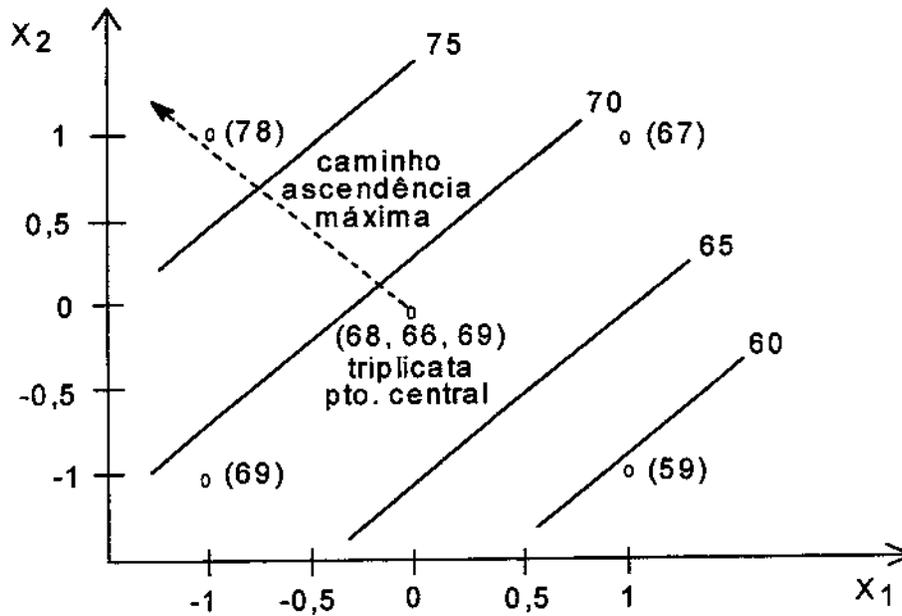


Figura 3.4 - Representação para o Caminho de Ascensão Máxima, Partindo de um Ponto Central de um Planejamento 2^2

Fonte: NETO et al. (1995).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Microrganismo

Foi feito um “screening” visando selecionar o microrganismo que produzisse os maiores rendimentos em termos de vitamina de B12, para a continuidade dos trabalhos. Partiu-se de quatro bactérias, descritas na literatura como boas produtoras de B12: *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 9614, *Propionibacterium jensenii* DSM 20274, *Propionibacterium shermanii* ATCC 6207 e *Pseudomonas sp.* ATCC 13867. A partir da *Pseudomonas sp.* foram obtidos ainda, três mutantes nomeados P1, P2 e P3. As culturas pertencentes ao gênero *Propionibacterium*, foram mantidas em meio líquido a 4 °C, enquanto as *Pseudomonas* foram estocadas em tubos inclinados, com ágar, a 4 °C. Todas as culturas foram repicadas em intervalos de quatro meses. A composição dos meios de manutenção estão descritas no item 4.4.

4.2 – Obtenção de Mutantes Espontâneos

Para a obtenção de mutantes espontâneos capazes de produzir maiores quantidades de vitamina B12, a bactéria *Pseudomonas sp.* foi submetida a um tratamento químico, utilizando concentrações crescentes de 5,6-dimetilbenzimidazola (DMI), durante 120 horas

de fermentação a uma temperatura de 29 °C. Segundo GAROFANO e MERLI (citado por SPALLA et al., 1989), como somente aqueles microrganismos que sintetizam a B12 podem metabolizar o 5,6 DMI, é possível obter mutantes resistentes a altas concentrações do mesmo.

Foram feitos experimentos usando concentrações de 5,6 DMI variando de 25,0 mg/l até 1,0 g/l. Em cada experimento foram observadas mudanças em relação ao crescimento e morfologia do microrganismo e produção de vitamina B12. Os mutantes foram isolados em Placas de Petri, e conservados no meio de manutenção apropriado. Nesta etapa, as fermentações foram feitas utilizando sacarose e lactose e o meio de composição 1, descrito no item 4.4. As condições operacionais são similares às daquelas do item 4.5. Para efeito de controle e comparação, foram feitas lâminas da cultura original e dos mutantes espontâneos obtidos.

4.3 – Substrato

Para cada gênero de microrganismo foram testados dois açúcares como principal fonte de carbono: sacarose e lactose. A sacarose foi proveniente de um açúcar comercial, marca “União”, contendo segundo o fabricante, um teor mínimo de 99,8% do mesmo. A lactose foi obtida através de ultrafiltração de soro de queijo em pó reconstituído. O permeado obtido foi diluído até se conseguir as concentrações desejadas de lactose, para o uso nas fermentações. O processo de ultrafiltração foi efetuado em uma unidade do tipo “ALFA-LAVAL UFS-1”, com membrana do tipo “Romicom-Polissulfona”. Foi utilizado um cartucho de abertura de Peso Molecular de 10000 Daltons, temperatura de 55 °C, pressão de entrada de 1,7 Kgf/cm² e pressão de saída de 0,7 Kgf/cm².

4.4 – Meio de Cultura

Meios de Manutenção dos Microrganismos

Propionibacterias - Descrito por MARWUAHA et al. (1983-a), continha a seguinte composição em g/l: extrato de levedura = 16,0; água de maceração de milho = 10,0; pH 6,0;

Pseudomonas – Descrito por FLORENT e NINET (1979), possuía a seguinte composição em g/l: substrato = 60,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ = 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 1,0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = 0,2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,02; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 0,005; ágar = 25,0; pH 7,0.

Meios de Culturas

Foram testados três meios de cultura, sendo um específico para *Propionibacterium*, outro para *Pseudomonas* e o terceiro comum a ambos, conforme descrição abaixo. Cada composição foi empregada usando-se sacarose e lactose como substrato.

Meio 1 – Descrito por FLORENT (1986), foi utilizado para experimentos com *Pseudomonas sp.* e seus mutantes, cuja composição em g/l foi: substrato = 100,0; extrato de levedura = 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ = 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 3,0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = 0,2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,02; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 0,005, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ = 0,02; 5,6 DMI = 0,025 e Betaina = 10,0. As condições operacionais empregadas foram: pH 7,4, temperatura = 29 °C, agitação = 300 rpm e aeração de 1,0 VVM.

Meio 2 – Descrito por QUESADA-CHANTO et al. (1994-b), foi usado nos experimentos com *Propionibacterias*. A composição em g/l era: substrato = 90,0; extrato de levedura = 10,0; KH_2PO_4 = 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,2; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ = 0,02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,005; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ = 4,0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = 0,005; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 0,02; 5,6 DMI = 0,025 e Tween 80 = 1,0. As condições experimentais foram: pH 6,8, temperatura = 29 °C, agitação = 300 rpm e aeração de 0,5 VVM;

Meio 3 – Descrito por FLORENT e NINET (1979), foi empregado tanto para *Pseudomonas* quanto para *Propionibacterias*, tendo a seguinte composição em g/l: substrato = 100,0; água de maceração de milho = 40,0; $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 0,02 e 5,6 DMI = 0,025. As condições operacionais foram as seguintes: pH 7,5, temperatura = 29 °C, agitação = 300 rpm e aeração de 0,5 VVM para *Propionibacterias* e 1,0 VVM para *Pseudomonas*.

Meio MRS

Composição em g/l: Peptona = 10,0; extrato de carne = 10,0; extrato de levedura = 5,0; glicose = 20,0; tween 80 = 1,0; citrato de amônio = 2,0; acetato de sódio = 5,0; sulfato de magnésio = 0,1; sulfato de manganês = 0,05; fosfato de sódio = 0,02 e pH 7,0;

Meio Padrão para Determinação de B12 pelo Método Microbiológico

Meio padrão para B12 em g/l: glicose = 40,0; asparagina = 0,2; acetato de sódio = 20,0; casaminoácidos para análise de vitaminas = 15,0; ácido ascórbico = 4,0; L-cistina = 0,4; DL-triptófano = 0,4; sulfato de adenina = 0,02; hidrocloreto de guanina = 0,02; uracila = 0,02; xantana = 0,02; riboflavina = 0,001; hidrocloreto de tiamina = 0,001; biotina = 1×10^{-5} ; niacina = 0,002; ácido P-aminobenzóico = 0,002; pantotenato de cálcio = 0,001; hidrocloreto de piridoxina = 0,004; hidrocloreto de piridoxal = 0,004; hidrocloreto de piridoxamina = $0,8 \times 10^{-3}$; ácido fólico = $0,2 \times 10^{-3}$; fosfato monobásico de potássio = 1,0; sulfato de magnésio = 0,4; fosfato bibásico de potássio = 1,0; cloreto de sódio = 0,02; sulfato ferroso = 0,02; sulfato de manganês = 0,01; mono oleato complexo de sorbitano = 2,0 e pH 6,0;

4.5 – Fermentação

Para as três primeiras etapas do trabalho (“screening”, seleção do meio de cultura e substrato e otimização das variáveis experimentais), as fermentações foram conduzidas em rascos agitados (erlenmeyers de 1000 ml), adaptados para permitir aeração e retirada de amostras (Figura 4.1).

A última etapa, que compreendeu o estudo dos parâmetros cinéticos, foi realizada em um fermentador de bancada, tipo “New Brunswick – Bioflow III”, com capacidade para 5 litros e controle de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, agitação e aeração. Foram utilizadas as melhores condições operacionais, obtidas nas etapas anteriores. O volume de inóculo usado em todas as fermentações foi sempre constante e igual a 10% (v/v). O mesmo foi obtido a partir de pré-fermentações em frascos agitados, de acordo com o microrganismo, substrato, meio de cultura e condições operacionais selecionados nas etapas anteriores.

Nos experimentos envolvendo *Propionibacterias*, que mostraram ser microaerofílicas, os erlenmeyers foram preenchidos com 700 ml de meio de cultura, e a fermentação foi conduzida sem aeração nas primeiras 84 horas, e aerobicamente nas 84 horas posteriores, perfazendo 168 horas de fermentação (QUESADA-CHANTO et al., 1994-a, PEREZ-MENDONZA e GARCIA-HERNANDEZ, 1983). Nos experimentos com *Pseudomonas*, o frasco teve seu volume mantido em 500 ml, com aeração e agitação durante as 120 horas de fermentação (FLORENT, 1986).

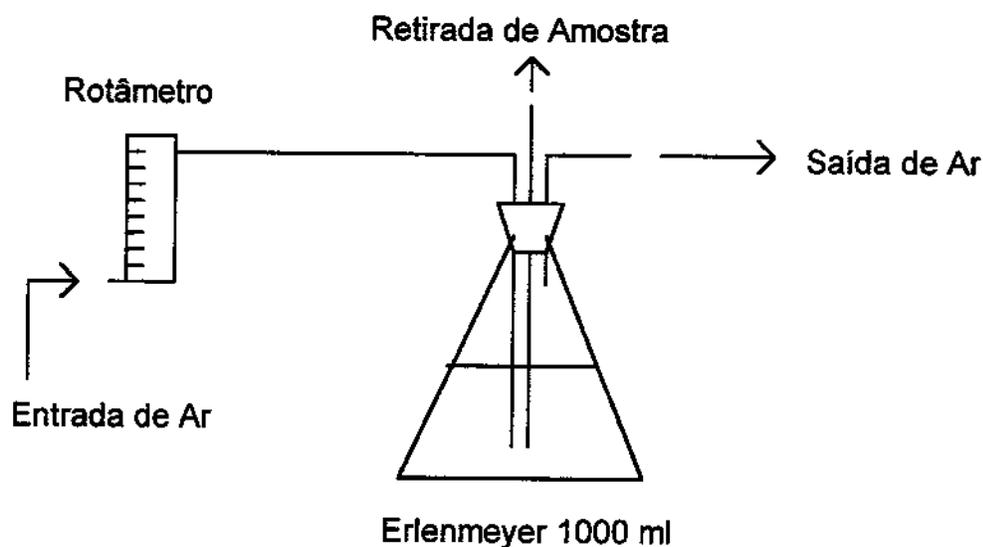


Figura 4.1 – Esquema dos Frascos Agitados Usados na Fermentação

4.6 – Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi determinada através da medida da densidade ótica, seguindo procedimento descrito por QUESADA-CHANTO et al. (1994-a) e SASAKI e NAGAI (1986). Para relacionar concentração celular em função da absorbância, duas alíquotas com o mesmo volume foram extraídas do meio de fermentação, e em seguida centrifugadas a 7000 rpm por 15 minutos e lavadas. Após descarte do sobrenadante, uma das alíquotas foi seca em estufa a vácuo a 70 °C por 24 horas e teve sua massa celular pesada. A outra amostra foi submetida a diluições conhecidas. A correlação entre a densidade ótica de cada diluição e a concentração celular contida na mesma, permitiu a construção de um gráfico de concentração celular (g/l) x absorbância. Utilizou-se um comprimento de onda de 660 nm para as *Propionibacterias* e 578 nm para as *Pseudomonas*. A curva obtida para cada microrganismo é apresentada no Apêndice B.

4.7 – Determinação dos Açúcares Redutores

A determinação do teor de lactose e sacarose foi feito através do Método de Fehling em triplicata. A determinação da sacarose foi precedida por uma hidrólise com HCl 2N e posterior neutralização com NaOH 10%.

Algumas determinações de sacarose nos mutantes de *Pseudomonas sp.* forneceram valores irreais. A fim de se obter resultados confiáveis, a concentração de substrato dessas amostras foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em equipamento modelo “Waters”, com coluna do tipo “Carbohydrate Analysis + Bondesil NH₂” (5 µm, 4,6 x 250 mm), utilizando padrão de sacarose. As análises foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp.

4.8 – Extração e Determinação da Vitamina B12

A determinação da concentração de vitamina B12 a partir do caldo de fermentação foi feita por um método químico e por um método microbiológico. Para efeito de controle, os resultados da determinação química foram periodicamente comparados com aqueles obtidos via microbiológica. Na comparação de amostras escolhidas aleatoriamente, a diferença máxima observada entre os dois métodos foi de 16,8% e na média 9,6%. Os resultados obtidos pelo método químico foram sempre maiores que os do método microbiológico.

Como a maior parte da vitamina B12 é produzida intracelularmente, ambos os métodos foram precedidos por um procedimento de extração, descrito por MARWAHA et al. (1983-b) e JANICKI e PEDZIWIŁK (1966): retirou-se uma alíquota do caldo de fermentação e ajustou-se o pH para 3,0 utilizando H₂SO₄ concentrado. A seguir, a mesma

foi colocada em um banho com temperatura de 100 °C por 30 minutos e centrifugada. O sobrenadante obtido foi então utilizado para a determinação da vitamina.

O método químico, descrito por RUDKIN e TAYLOR (1952) e FISHER (1953), possibilita, segundo os autores, a determinação de B12 em caldos de fermentação. A sua sensibilidade é próxima a do método microbiológica, porém a precisão e velocidade são superiores. Esta metodologia é baseada na complexação e conversão da cobalamina em cianocobalamina.

Adicionou-se NaCN ao sobrenadante obtido na extração até que a concentração de 1% fosse alcançada; corrigiu-se o pH para 9,5 – 10,0 com NaOH 10% e esperou-se 5 horas, à temperatura ambiente, para conversão completa das variantes da vitamina B12 para o complexo dicianeto; adicionou-se 20% (p/v) de sulfato de sódio sólido e ajustou-se novamente o pH para 11,0 – 11,5, com NaOH 10%. A solução resultante foi submetida a três extrações com álcool benzílico; ao extrato formado, adicionou-se clorofórmio na proporção de 50% do volume total. A fase solvente foi extraída três vezes com volumes de 8, 7 e 7 ml de água, e a solução resultante teve então seu volume completado para 25 ml. Para uma alíquota de 10 ml do extrato aquoso, adicionou-se 2 ml de solução de NaCN 10%, para elevar o pH a 11,0 ou mais; para outra alíquota de 10 ml, 2 ml de KH₂PO₄ 12,5% foi adicionado, para que o pH atingisse entre 5,0 e 6,0; Após 30 minutos de reação, a absorbância de cada uma das soluções foi medida a 582,5 nm, contra uma solução de 100 µg/ml de cianocobalamina, usada como branco. O comprimento de onda escolhido (582,5 nm), foi o que, no espectro de absorção da cianocobalamina (entre 450 nm e 650 nm), apresentou a maior variação de absorbância entre as curvas do complexo B12-dicianeto e da vitamina B12 cristalina (Figura 4.2).

A concentração de vitamina B12 contida na amostra foi calculada pela Equação 4.1:

$$B12 = [(\Delta A).6/5.V.f] / E \quad (4.1)$$

Antes do início dos trabalhos, foram feitos testes para verificar a eficácia do método químico. O mesmo foi empregado na determinação do teor de vitamina B12 em um medicamento, em um caldo de fermentação com adição de uma concentração de B12 conhecida e em um caldo que não continha vitamina. Os resultados mostraram-se satisfatórios, com desvios de, no máximo, 10% do valor real.

O método microbiológico, descrito por AOAC (1990), é baseado no crescimento de um microrganismo teste – *Lactobacillus delbruecki subsp. Lactis* ATCC 7830. O microrganismo foi ativado em meio MRS, com temperatura de 37 °C durante 24 horas, em tubos contendo 5 ml de meio padrão para determinação de B12 e 1 ml de solução de B12 (cianocobalamina) com diferentes concentrações. Esses tubos tiveram suas absorvâncias lidas a 600 nm, possibilitando a obtenção de uma curva de calibração de concentração de vitamina B12 em função da absorvância (Apêndice B). Para a análise do teor de vitamina no meio de fermentação, utilizou-se o mesmo procedimento anterior, substituindo-se 1 ml de solução de cianocobalamina por 1 ml do sobrenadante obtido no processo de extração.

4.9 – Determinação do pH

A determinação do pH foi feita com pHmetro digital do tipo “Digimed – DM20”. Para correção e manutenção do pH durante os experimentos realizados no fermentador de bancada, foram utilizados H₂SO₄ 0,1 N e NaOH 5,0%.

4.10 – Determinação do K_La

A determinação do K_La foi efetuada pelo método dinâmico (“Gass-Out”), de acordo com descrição de MANZONI e CAVAZZONI (1998) e PIRT (1985). Segundo os autores, essa metodologia possui boa precisão para cálculo do K_La em cinética de estado não-estacionário de culturas em batelada. A taxa de consumo de oxigênio, é dada por:

$$dC_L/dt = K_La.(C_L - C) - q_{O_2}.X \quad (4.2)$$

onde C_L e C , são respectivamente, a concentração de oxigênio dissolvido na saturação e em um tempo qualquer, X é a concentração celular, t é o tempo e q_{O_2} é a velocidade específica de utilização de oxigênio.

Durante a fermentação, cessando a aeração, o termo $K_La (C_L - C)$ na Equação 4.2, torna-se zero, de modo que $dC_L/dt = q_{O_2}.X$. Logo, a inclinação de um gráfico de C_L versus t , fornece o valor de $q_{O_2}.X$. Quando a aeração é restabelecida, a concentração de oxigênio dissolvido cresce, e as tangentes obtidas para diversos intervalos de tempo, permitem obter dC_L/dt de acordo com a Figura 4.3.

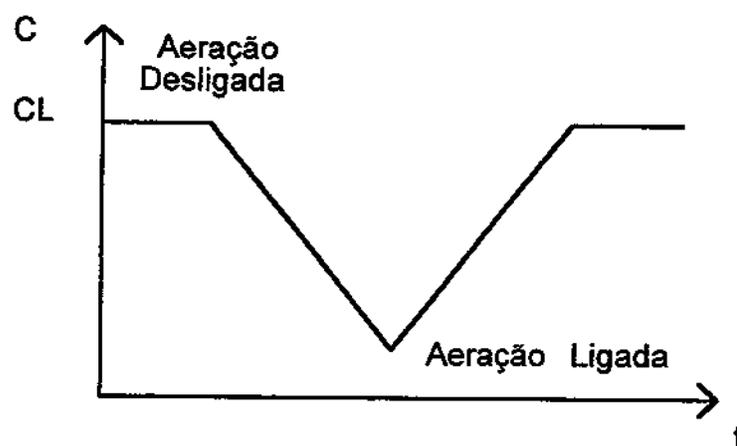


Figura 4.3 – Mudanças na Concentração de Oxigênio Dissolvido para o Cálculo do K_La

Rearranjando a Equação 4.2, tem-se:

$$C = (-1/K_L a) \cdot (dC_L/dt + q_{O_2} X) + C_L \quad (4.3)$$

Desta correlação, nota-se que, para $K_L a$ constante, um gráfico de C versus $(dC_L/dt + q_{O_2} X)$, terá como inclinação $-1/K_L a$ (Figura 4.4).

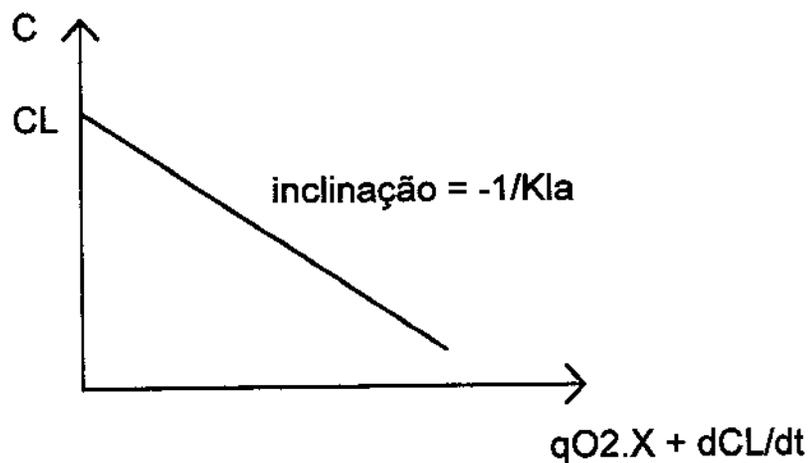


Figura 4.4 – Cálculo do $K_L a$ para Fermentação de *Pseudomonas P3*

4.11 – Planejamento Experimental

Para o estudo da avaliação, modelagem e otimização das variáveis experimentais, foi empregado a Metodologia de Superfície Resposta (RSM). O planejamento experimental foi composto das seguintes etapas (NETO et al., 1995, BOX et al., 1978):

- Planejamento Completo – Compreendeu a seleção do microrganismo, do meio de cultura e do substrato, totalizando 20 experimentos;
- Planejamento Fatorial Fracionário – Planejamento do tipo 2^{7-3} com resolução IV, envolvendo o estudo de 7 variáveis, perfazendo um total de 16 experimentos. Neste tipo de planejamento, os efeitos principais estão confundidos com os efeitos de terceira ordem;
- Planejamento Fatorial Completo com Composto Central – Planejamento com triplicata no ponto central mais configuração do tipo “estrela”, totalizando 17 experimentos;
- Caminho de Ascendência Máxima – Composto de 6 experimentos;
- Segundo Planejamento Fatorial Completo com Composto Central – Composto de 17 experimentos, sendo triplicata no ponto central mais uma configuração do tipo “estrela”.

As variáveis inicialmente avaliadas foram: idade do inóculo (I), tempo de fermentação (t), temperatura (T), pH (pH), concentração de substrato (S), concentração de 5,6 DMI (D) e concentração de cobalto (C). A resposta estudada foi o rendimento de vitamina B12. A Tabela 4.1, mostra o resumo dos níveis experimentais das variáveis estudadas no planejamento experimental.

Tabela 4.1 – Níveis Experimentais das Variáveis Estudadas no Planejamento Experimental

I (h)	t(h)	T (h)	pH	S (g/l)	D (mg/l)	C (mg/l)
48	96	29	6,6	90,0	25,0	10,0
72	120	32	6,8	100,0	50,0	20,0
		33	6,9		55,0	
		33,5	7,0		62,5	
		34	7,1		70,0	
		34,6	7,14		73,2	
		35	7,2		75,0	
		35,5	7,3		80,0	
		36	7,4		82,5	
		36,5			90,0	
					92,5	
					98,8	
					100,0	
					102,5	
					116,8	

OBS: Os números em negrito referem-se aos níveis otimizados.

4.12 – Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados obtidos durante o planejamento experimental foram feitas por Análise de Variância (ANOVA).

5 – Resultados e Discussão

Conforme descrição apresentada no item “Fermentação” do capítulo “Materiais e Métodos”, as etapas de seleção do microrganismo, do meio de cultura e do substrato e otimização das variáveis, foram realizadas em frascos agitados, enquanto que os parâmetros cinéticos da fermentação foram obtidos em fermentador de bancada.

5.1 – Obtenção dos Mutantes Espontâneos de *Pseudomonas sp.*

A bactéria *Pseudomonas sp.* foi submetida a um tratamento químico, com concentrações crescentes de 5,6 dimetilbenzimidazola (DMI), com o objetivo de obter mutantes espontâneos que possibilitassem a melhoria dos rendimentos de vitamina B12. Segundo SPALLA et al. (1989), como o 5,6 DMI é um nucleotídeo importante na biossíntese da B12, pois é responsável pela conversão das cobinamidas em cobalaminas, e somente aqueles microrganismos que produzem esta vitamina são capazes de metabolizá-lo, é possível obter mutantes de microrganismos que necessitam do nucleotídeo mas não estão aptos a sintetizá-los, como é o caso da *Pseudomonas sp.*

Utilizando concentrações de 5,6 DMI variando de 25,0 mg/l até 1000,0 mg/l, foram isolados três mutantes, nomeados *Pseudomonas P1*, *Pseudomonas P2* e *Pseudomonas P3*, que mostraram características morfológicas diferentes da cultura original. Os três mutantes

foram obtidos quando a concentração de 5,6 DMI alcançou 800,0 mg/l. Na concentração de 1000,0 mg/l não houve crescimento da cultura. Deste modo, os três foram isolados em placas de Petri e transferidos para um meio de manutenção. Durante as fermentações, todos mostraram melhores rendimentos de vitamina, consumo de substrato e concentração celular do que a cultura original.

De acordo com a Tabela 5.1, observa-se que, entre os mutantes, a *Pseudomonas P3* exibiu os melhores rendimentos de B12, e que os mesmos, quando comparados aos resultados obtidos com a cultura original, foram cerca de 6 vezes maior quando se utilizou sacarose como substrato e 1,5 vezes maior com lactose. Além disso, houve um maior consumo de substrato permitindo maiores produções de biomassa, principalmente nas fermentações com sacarose.

Tabela 5.1 – Produção de Vitamina B12, Concentração Celular e Consumo de Substrato para Fermentação de *Pseudomonas sp* e seus Mutantes, em Meio de Composição 1

Microrganismo	Substrato	Rendimento B12 (mg/l)	Concentração Celular (g/l)	Consumo Substrato (g/l)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Sacarose	0,68	3,2	20,1
<i>Pseudomonas P1</i>	Sacarose	2,50	4,8	58,7
<i>Pseudomonas P2</i>	Sacarose	2,85	3,7	34,2
<i>Pseudomonas P3</i>	Sacarose	3,86	6,1	61,4
<i>Pseudomonas sp.</i>	Lactose	Não Detectável	1,8	9,2
<i>Pseudomonas P1</i>	Lactose	Não Detectável	1,9	9,5
<i>Pseudomonas P2</i>	Lactose	0,95	1,7	10,3
<i>Pseudomonas P3</i>	Lactose	1,40	1,5	19,2

5.2 – Seleção do Microrganismo, Meio de Cultura e Substrato

Para esta etapa, além do mutante *Pseudomonas P3* selecionado, foram utilizados mais três microrganismos: *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium jensenii* e *Propionibacterium shermanii*. Cada um foi testado em duas composições de meio de cultura e dois tipos de substrato.

A Tabela 5.2 mostra os resultados obtidos para a *Pseudomonas P3*. Nota-se que as melhores produções de vitamina foram conseguidas com o meio de composição 1 e sacarose. Segundo SPALLA et al. (1989), a *Pseudomonas* requer durante a fermentação, além de nutrientes tradicionais e sais minerais, algumas outras substâncias específicas que funcionam como ativadores bioquímicos na biossíntese da vitamina B12. Portanto, por ter o meio 1 uma composição mais específica e balanceada, em termos das necessidades nutricionais do microrganismo, os melhores resultados apresentados são justificados. Além disso, o mesmo foi suplementado com betaína, que aumenta o conteúdo específico intracelular da enzima ácido δ -aminolevulinico sintetase (ALAS), importante na biossíntese da B12 (FA et al., 1984, DEMAINE et al., 1968).

Em relação ao tipo de substrato mais indicado, de acordo com a Tabela 5.2, os valores do rendimento de vitamina, da concentração celular e do consumo de substrato, foram maiores com a sacarose do que com a lactose. Tal comportamento é similar àqueles verificados nas fermentações para obtenção dos mutantes.

Segundo BUCHANANS e GIBBONS (1983), os microrganismos pertencentes ao gênero das *Pseudomonas* podem acumular polissacarídeos como reserva de material, podendo vir a excretá-lo no meio de fermentação. Portanto, estes polissacarídeos podem ter influenciado a quantificação do teor de sacarose através do Método de Fehling, conforme descrição apresentada no item 4.7, do Capítulo de Materiais e Métodos.

Tabela 5.2 – Produção de Vitamina B12, Concentração Celular e Consumo de Substrato, por *Pseudomonas P3* em Diferentes Substratos e Meios de Cultura a 29 °C e 120 horas de Fermentação

Meio de Cultura	Substrato	Rendimento B12 (mg/l)	Concentração Celular (g/l)	Consumo Substrato (g/l)
Meio 1	Sacarose	3,86	6,1	61,4
Meio 3	Sacarose	2,90	3,9	32,8
Meio 1	Lactose	1,40	1,5	19,2
Meio 3	Lactose	1,03	1,1	13,7

Os resultados obtidos com *Propionibacterium freudenreichii*, *P. jensenii* e *P. shermanii* são apresentados na Tabela 5.3. Verifica-se que, entre as culturas utilizadas, o *P. jensenii*, cultivado no meio de composição 2 em presença de sacarose, exibiu o maior rendimento de vitamina, enquanto o *P. freudenreichii*, em meio 3 com lactose, apresentou a mais alta concentração celular e consumo de substrato, mostrando também boa produção de B12. Tais resultados estão em consonância com aqueles obtidos por QUESADA-CHANTO et al. (1994-b) que, ao efetuar um “screening” com 14 linhagens de *Propionibacterium*, utilizando sacarose como substrato, elegeu o *P. jensenii* como um dos microrganismos mais aptos à produção de vitamina B12.

O meio de composição 2 mostrou-se o mais indicado para as três culturas, em termos de rendimento de vitamina. Em relação à fonte de substrato, o *P. jensenii* exibiu uma maior afinidade no consumo de sacarose, enquanto que o *P. freudenreichii* e o *P. shermanii* tiveram seus melhores resultados associados a lactose.

Tabela 5.3 – Produção de Vitamina B12, Concentração Celular e Consumo de Substrato para *P. freudenreichii*, *P. jensenii* e *P. shermanii*, a 29 °C e 168 horas de Fermentação

Microrganismo	Meio/ Substrato	Rendimento B12 (mg/l)	Concentração Celular (g/l)	Consumo Substrato (g/l)
<i>P. freudenreichii</i>	2 – Sacarose	1,70	1,1	3,0
<i>P. jensenii</i>	2 – Sacarose	2,93	4,3	26,8
<i>P. shermanii</i>	2 – Sacarose	0,83	0,6	1,3
<i>P. freudenreichii</i>	2 – Lactose	2,08	4,5	33,6
<i>P. jensenii</i>	2 – Lactose	2,02	1,7	25,5
<i>P. shermanii</i>	2 – Lactose	1,73	0,8	16,9
<i>P. freudenreichii</i>	2 – Sacarose	1,29	1,6	3,8
<i>P. jensenii</i>	2 – Sacarose	1,98	1,8	10,2
<i>P. shermanii</i>	2 – Sacarose	0,97	0,8	2,1
<i>P. freudenreichii</i>	2 – Lactose	2,14	5,6	36,3
<i>P. jensenii</i>	2 – Lactose	1,72	1,3	14,5
<i>P. shermanii</i>	2 – Lactose	1,38	1,0	10,2

No geral pode-se afirmar que o *P. jensenii* e o *P. freudenreichii* foram responsáveis pelas maiores produções de vitamina, ainda que os resultados fossem inferiores àqueles obtidos pela *Pseudomonas P3*. Entretanto, ao contrário desta, eles mostraram maior habilidade para consumir lactose.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados do rendimento $Y_{X/S}$ (concentração celular / concentração substrato) e $B12/X$ (concentração de vitamina B12 / concentração celular), para as fermentações que possibilitaram os maiores rendimentos de B12 para cada um dos microrganismos. Verifica-se que a *Pseudomonas sp.* possui baixo rendimento de crescimento ($Y_{X/S} = 0,10$), porém apresenta a melhor produção de B12 por massa de célula ($B12/X = 0,64$), o que pode significar um alto acúmulo intracelular de vitamina. As espécies de *Propionibacterium* por sua vez, pareceram ser mais efetivos no consumo de substrato, mostrando maiores relações de biomassa produzida por substrato consumido.

Na média, os valores de $Y_{X/S}$ obtidos (0,10 a 0,25) situaram-se um pouco abaixo daqueles descritos na literatura. QUESADA-CHANTO et al. (1994-a), obtiveram rendimentos de crescimento de 0,3 g célula seca/g substrato, para produção de B12 por *Propionibacteria*. Os valores de B12/X, porém, foram similares àqueles que a literatura faz referência. QUESADA-CHANTO et al. (1997), utilizando *Propionibacterium freudenreichii*, obtiveram no máximo 0,3 mg vitamina B12/ g célula seca; YE et al. (1996), para as melhores condições, alcançaram rendimentos de 0,63 mg vitamina B12/ g célula seca, para fermentação de *Propionibacterium freudenreichii*; por fim, FA et al. (1984), conseguiram valores de B12/X de 0,32 mg vitamina B12/ g célula seca, na produção de vitamina B12 por *Pseudomonas denitrificans*.

Tabela 5.4 – Comparação dos Rendimentos $Y_{X/S}$ e B12/X para as Maiores Produções de Vitamina B12 Obtidos para *Pseudomonas sp.*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium freudenreichii* e *Propionibacterium shermanii*.

Microrganismo	Meio/ Substrato	B12 (mg/l)	$Y_{X/S}$ (g cél./g subst.)	B12/X (mg B12/g cél.)
<i>Pseudomonas sp.</i>	1 – Sacarose	3,86	0,10	0,64
<i>Prop. jensenii</i>	2 – Sacarose	2,93	0,25	0,61
<i>Prop. freudenreichii</i>	3 – Lactose	2,14	0,17	0,38
<i>Prop. shermanii</i>	2 – Lactose	1,43	0,14	0,60

Com base nos resultados apresentados, a *Pseudomonas P3*, o meio de composição 1 e a sacarose, foram escolhidos para as etapas posteriores do trabalho.

5.3 – Planejamento Fatorial Fracionário

A avaliação dos efeitos das variáveis escolhidas e a influência de cada uma na produção de vitamina B12 foram feitos através de um planejamento fatorial fracionário. Após uma análise da literatura, chegou-se a um número de variáveis que demonstraram ter influência na produção de vitamina B12. Quase todas já foram estudadas anteriormente, porém, ou foram examinadas individualmente ou em pequenos grupos, e com seus respectivos efeitos analisados em separado.

O planejamento fatorial fracionário utilizado foi do tipo 2^{7-3} , conforme descrição de BOX et al. (1978) e NETO et al. (1995). Dos 128 experimentos necessários para investigar a influência das 7 variáveis em um planejamento fatorial completo, foram realizados apenas 16 experimentos. Empregou-se uma resolução IV para o planejamento fracionário utilizado. Deste modo, os efeitos principais não vão estar misturados com as interações de dois fatores e sim com as de três, que em princípio devem ser menos significativas (NETO et al., 1995). As variáveis estudadas nesta etapa foram:

- Idade do Inóculo (I);
- Tempo de Fermentação (t);
- Temperatura (T);
- pH inicial (pH);
- Concentração de Substrato;
- Concentração de 5,6 DMI (D);
- Concentração de Cobalto (C).

Os níveis experimentais utilizados e a codificação dos mesmos são mostrados na Tabela 5.5. A Tabela 5.6 por sua vez, traz as condições experimentais com seus valores

codificados utilizados em cada ensaio. As relações geradoras usadas para a construção do planejamento fatorial fracionário foram: $5 = 123$, $6 = 234$ e $7 = 134$ (BOX et al., 1978).

Tabela 5.5 – Níveis Experimentais Utilizados no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}

Níveis	I (h)	t (h)	T (°C)	pH*	S (g/l)	D (mg/l)	C (mg/l)
-	48	96	29	7,0	90,0	25,0	10,0
+	72	120	32	7,4	100,0	50,0	20,0

* pH inicial

Tabela 5.6 – Valores Codificados para cada Variável no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

OBS: X₁ = variável codificada para idade do inóculo;
 X₂ = variável codificada para tempo de fermentação;
 X₃ = variável codificada para temperatura;
 X₄ = variável codificada para pH inicial;
 X₅ = variável codificada para concentração de substrato;
 X₆ = variável codificada concentração de 5,6 DMI;
 X₇ = variável codificada para concentração de cobalto.

A Tabela 5.7 apresenta os valores reais para cada variável, utilizados em cada um dos 16 experimentos, bem como o rendimento de vitamina B12 obtido em cada ensaio. Os resultados completos, contendo a concentração celular e o consumo de substrato de cada experimento, são mostrados no Apêndice A. De acordo com a Tabela 5.7, as condições experimentais utilizadas nos experimentos 5 e 6 permitiram obter os maiores rendimentos de B12, alcançando respectivamente 5,97 e 5,71 mg B12/l.

Tabela 5.7 – Valores Reais e Rendimento de Vitamina B12 Durante o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}

Experimento	I (h)	T (h)	T (°C)	PH*	S (g/l)	D (mg/l)	C (mg/l)	B12 (mg/l)
1	48	96	29	7,0	90,0	25,0	10,0	2,95
2	72	96	29	7,0	100,0	25,0	20,0	3,48
3	48	120	29	7,0	100,0	50,0	10,0	3,63
4	72	120	29	7,0	90,0	50,0	20,0	4,17
5	48	96	32	7,0	100,0	50,0	20,0	5,97
6	72	96	32	7,0	90,0	50,0	10,0	5,71
7	48	120	32	7,0	90,0	25,0	20,0	4,27
8	72	120	32	7,0	100,0	25,0	10,0	4,67
9	48	96	29	7,4	90,0	50,0	20,0	3,77
10	72	96	29	7,4	100,0	50,0	10,0	3,81
11	48	120	29	7,4	100,0	25,0	20,0	2,89
12	72	120	29	7,4	90,0	25,0	10,0	2,73
13	48	96	32	7,4	100,0	25,0	10,0	3,21
14	72	96	32	7,4	90,0	25,0	20,0	3,07
15	48	120	32	7,4	90,0	50,0	10,0	4,44
16	72	120	32	7,4	100,0	50,0	20,0	4,37

* pH inicial

Para se ter condições de medir estatisticamente a influência de cada variável no rendimento da vitamina B12, a Tabela 5.8 mostra o efeito principal de cada variável e os erros padrões associados aos mesmos. Os efeitos foram calculados através do software “Statistica for Windows”, e são baseados na metodologia que emprega a “Tabela dos Coeficientes de Contraste”, conforme descrição de BOX et al. (1978). Os erros, por sua vez, foram calculados pela estimativa das variâncias, também descrito pelos mesmos autores.

De acordo com BOX et al. (1978), através da comparação dos valores dos efeitos estimados para cada variável com o erro padrão associado, é possível prever a influência de cada um na resposta estudada. Assim, de acordo com a Tabela 5.8, nota-se que os sete parâmetros afetaram o rendimento de B12, porém a intensidade dos mesmos são diferentes. Logo, para escolher quais dos parâmetros seriam selecionados para a Análise por Superfície Resposta, comparou-se a intensidade dos valores dos efeitos principais, uma vez que, em um planejamento saturado deste nível, torna-se difícil uma análise precisa dos valores e interações de 2^o ordem ou superior. Os efeitos grafados com asterisco, na Tabela 5.8, são aqueles considerados significativos.

As variáveis que exerceram o maior efeito sobre o rendimento de B12 foram a concentração de 5,6 DMI (D), temperatura (T) e pH. Um aumento na concentração de 5,6 DMI de 25,0 mg/l para 50,0 mg/l e na temperatura de 29 °C para 32 °C provocou, respectivamente, um acréscimo de 108% e 104% na produção de vitamina. O pH também mostrou um efeito significativo, porém negativo. A passagem do nível 7,0 para 7,4, reduziu em 82% o rendimento de B12. As outras variáveis, ao contrário, afetaram a resposta menos intensamente.

Ainda analisando os resultados da Tabela 5.8, pode-se observar que D, T e pH exerceram em ordem decrescente as maiores influências sobre a resposta. Como D e T apresentaram efeito positivo na passagem do nível experimental (-) para (+), a continuidade dos experimentos foi realizada a partir dos valores máximos (D=50,0 mg/l e T=32 °C) para estas variáveis. De outro modo, para o pH que produziu um efeito negativo, o nível

escolhido para a próxima etapa foi 7,0. Em função do exposto, os parâmetros selecionados para a otimização do processo fermentativo foram: concentração de 5,6 DMI, temperatura e pH. As demais variáveis, que apresentaram efeitos poucos significativos, tiveram seus níveis experimentais mantidos constantes, de acordo com o efeito positivo ou negativo produzido.

Tabela 5.8 - Efeitos Principais e Erros Padrões para o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3}

Efeito	Resposta (Vitamina B12)
Média	3,95 ± 0,12
Idade do Inóculo (I)	0,11 ± 0,12
Tempo de Fermentação (t)	-0,10 ± 0,12
Temperatura (T)*	1,04 ± 0,12
pH*	-0,82 ± 0,12
Concentração de Substrato (S)	0,12 ± 0,12
Concentração de 5,6 DMI (D)*	1,08 ± 0,12
Concentração de Cobalto (C)	0,11 ± 0,12

5.4 – Primeiro Planejamento com Composto Central

Para a obtenção dos modelos matemáticos empíricos que descrevessem o comportamento do rendimento de vitamina B12 em função da concentração de 5,6 DMI, temperatura e pH, foi utilizado um planejamento com composto central aplicável à Metodologia de Análise por Superfície Resposta, de acordo com descrição de CORNELL (1990), KHURI e CORNELL (1987) e BOX et al. (1978). O planejamento consistiu de um fatorial 2^3 , uma configuração “estrela” e uma triplicata no ponto central, totalizando 17

experimentos. Cada ponto da configuração “estrela” foi colocado a uma distância α da condição do ponto central, definido por:

$$\alpha = (2^g)^{1/4} \quad (5.1)$$

onde g é o número de variáveis independentes ou fatores (KALIL, 1997). Para o planejamento em questão tem-se $g = 3$ e $\alpha = 1,682$.

Para o ponto central, em torno do qual foi projetado esta fase, escolheu-se os seguintes valores: $D = 62,5$ mg/l, $T = 34$ °C e $\text{pH} = 7,0$.

As variáveis foram estudadas, nesta fase, nos seguintes níveis codificados: -1,682; -1; 0; +1; +1,682. A aplicação da Equação 3.2 no planejamento atual resulta na seguinte codificação para as variáveis:

$$X_1 = (T-34)/1,2 \quad (5.2)$$

$$X_2 = (\text{pH} - 7,0)/0,24 \quad (5.3)$$

$$X_3 = (D - 62,5)/7,5 \quad (5.4)$$

onde:

X_1 = variável codificada para T;

X_2 = variável codificada para pH;

X_3 = variável codificada para D;

A Tabela 5.9 apresenta os valores reais e codificados das variáveis estudadas nesta parte fase do trabalho. A partir deste ponto, de acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário, foram mantidos constantes: $I = 72$ h, $t = 96$ h, $S = 100,0$

g/l e C = 20,0 mg/l. As condições experimentais utilizadas para cada ensaio, com seus valores codificados, são mostrados na Tabela 5.10, enquanto que a Tabela 5.11, traz essas variáveis em sua forma real, bem como os respectivos rendimentos de B12.

Tabela 5.9 – Valores Codificados e Valores Reais das Variáveis Usadas no Primeiro Planejamento com Composto Central

Níveis	Temperatura (°C)	pH*	5,6 DMI (mg/l)
-1,682	32	6,6	50,0
-1	33	6,8	55,0
0	34	7,0	62,5
+1	35	7,2	70,0
+1,682	36	7,4	75,0

*pH inicial

Tabela 5.10 – Valores Codificados para o Primeiro Planejamento com Composto Central

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1,682	0	0
13	+1,682	0	0
14	0	-1,682	0
15	0	+1,682	0
16	0	0	-1,682
17	0	0	+1,682

OBS: X₁ = variável codificada para temperatura;
 X₂ = variável codificada para pH;
 X₃ = variável codificada concentração de 5,6 DMI.

Tabela 5.11 – Variáveis Reais e Valores para o Rendimento de Vitamina B12 Durante o Primeiro Planejamento com Composto Central

Experimento	Temperatura (°C)	pH*	5,6 DMI (mg/l)	B12 (mg/l)
1	33	6,8	55,0	2,89
2	35	6,8	55,0	3,82
3	33	7,2	55,0	3,64
4	35	7,2	55,0	3,78
5	33	6,8	70,0	4,75
6	35	6,8	70,0	6,20
7	33	7,2	70,0	5,84
8	35	7,2	70,0	7,18
9	34	7,0	62,5	6,22
10	34	7,0	62,5	5,71
11	34	7,0	62,5	5,88
12	32	7,0	62,5	3,30
13	36	7,0	62,5	4,75
14	34	6,6	62,5	5,32
15	34	7,4	62,5	5,95
16	34	7,0	50,0	3,68
17	34	7,0	75,0	7,55

* pH inicial

5.4.1 – Modelos para o Rendimento da Vitamina B12

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5.11, utilizando o pacote computacional “Statistica for Windows”, foi possível obter os modelos matemáticos, que relacionam o rendimento de vitamina B12 com as variáveis estudadas; as tabelas de análise de variância, que auxiliam na escolha do modelo mais adequado e os gráficos tridimensionais que permitem estudar as interações entre as variáveis.

A seguir é mostrado o modelo de 1ª ordem, relacionando o rendimento de B12 com a temperatura (X_1), pH (X_2) e concentração de 5,6 DMI (X_3):

$$B12 = 5,086 + 0,461X_1 + 0,281X_2 + 1,197X_3 \quad (5.5)$$

Segundo KALIL (1997), a utilização do Teste F permite verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação nos dados experimentais. O fundamento do teste consiste em verificar se as modificações introduzidas nas condições experimentais não tiveram nenhum efeito nos resultados obtidos, e as variações destes foram devidos exclusivamente à fatores aleatórios. O Teste F pode ser expresso segundo a equação a seguir:

$$\text{Teste F} = \text{Média Quadrada Modelo/Média Quadrada dos Desvios} \quad (5.6)$$

O valor do F, calculado na Equação 5.6, é comparado com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência (F Nível de Significância; Graus de Liberdade do Modelo; Graus de Liberdade do Desvio).

Na Tabela 5.12, é apresentada a Análise de Variância para o modelo de 1ª ordem. Como o valor tabelado de F para 99% de confiança, foi de 5,74, bem inferior aos 13,734 obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é maior que a variação não explicada, e o modelo é considerado válido. Desta forma, é possível dizer que o modelo ajustado explica 87,2% das variações das respostas encontradas.

Tabela 5.12 – Análise de Variância para o Modelo Linear Obtido para o Rendimento de Vitamina B12 no Primeiro Planejamento com Composto Central

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	23,555	3	7,852	13,734
Desvios	7,432	13	0,572	-
Total	30,987	16	-	-

Coefficiente de Correlação = 0,872

Valor F tabelado ($F_{0,99; 3; 13}$) = 5,74

Para o conjunto de resultados obtidos no primeiro planejamento com composto central, é possível também gerar um modelo quadrático, mostrado a seguir, que pode relacionar melhor que o linear, o rendimento da vitamina em função das variáveis codificadas:

$$\begin{aligned}
 B12 = & 5,955 + 0,461X_1 + 0,281X_2 + 1,197X_3 - 0,738X_1^2 - 0,168X_2^2 \\
 & - 0,175X_3^2 - 0,113X_1X_2 + 0,215X_1X_3 + 0,170X_2X_3
 \end{aligned} \quad (5.7)$$

A Tabela 5.13 mostra a Análise de Variância para o modelo de 2ª ordem gerado. A comparação do valor F, calculado com o valor tabelado, mostra que o modelo ajustado para explicar a variação do rendimento de vitamina no nível de confiança de 99%, também é significativo, explicando 99,1% da variação das respostas encontradas.

Assim, os modelos linear e quadrático são estatisticamente representativos para explicar a variação do rendimento da vitamina B12 nas condições experimentais utilizadas, ressaltando apenas que o modelo quadrático apresentou um coeficiente de correlação superior.

Tabela 5.13 – Análise de Variância para o Modelo Quadrático Obtido para o Rendimento de Vitamina B12 no Primeiro Planejamento com Composto Central

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	31,057	9	3,451	43,636
Desvios	0,554	7	0,079	-
Total	31,611	16	-	-

Coefficiente de Correlação = 0,991

Valor F tabelado ($F_{0,99; 9; 7}$) = 6,72

A escolha do modelo que melhor descreva a variação da resposta não deve ser realizado pela simples comparação dos valores do F ou dos coeficientes de correlação, já que os graus de liberdade associados a cada modelo são diferentes. Optou-se então pela utilização do “Teste de Preferência entre Modelos”, utilizado por COSTA (1996) segundo descrição de CORNELL (1981), baseado na comparação do F calculado pela Equação 5.8 com o valor tabelado de $F(\alpha; r; N-p)$:

$$F = [(SQ_{RED} - SQ_{COM}) \cdot (N-p)] / (SQ_{COM} \cdot r) \quad (5.8)$$

onde:

SQ_{RED} = Soma dos Quadrados dos Desvios do Modelo Reduzido (Linear);

SQ_{COM} = Soma dos Quadrados dos Desvios do Modelo Completo (Quadrático);

N = Número de Ensaios – 1;

p = Número de Parâmetros do Modelo Completo;

r = Diferença entre o Número de Parâmetros do Modelo Completo e do Modelo Reduzido;

α = Nível de Confiança Utilizado.

Pela substituição dos valores descritos nas Tabelas 5.12 e 5.13, tem-se:

$$F = [(7,432 - 0,554) \cdot (16 - 10)] / (0,554) \cdot (10 - 4) = 12,425$$

O valor tabelado encontrado é o seguinte:

$$F_{(0,99; 6; 6)} = 8,47$$

Logo, comparando-se os dois valores, nota-se que o F tabelado é menor que o calculado, concluindo que, de acordo com o “Teste de Preferência entre Modelos”, a um nível de confiança de 99%, o modelo quadrático é o que melhor explica a variação do rendimento de B12 em função da temperatura, pH e concentração de 5,6 DMI.

A previsão adequada do modelo quadrático pode ser melhor visualizada na Figura 5.1. Nela é apresentada uma comparação entre os rendimentos de vitamina B12 obtidos experimentalmente e aqueles preditos pelo uso do modelo.

A substituição das Equações 5.2 a 5.4 na Equação 5.7, permite a obtenção da seguinte expressão para o rendimento de B12 em função das variáveis experimentais com valores reais:

$$\begin{aligned} \text{B12 (mg/l)} = & -711,589 + 52,764T - 45,456\text{pH} - 1,219D - 0,738T^2 + 4,208\text{pH}^2 \\ & - 3,118 \times 10^{-3}D^2 - 0,563T \cdot \text{pH} + 2,867 \times 10^{-2}T \cdot D + 0,113\text{pH} \cdot D \end{aligned} \quad (5.9)$$

Fazendo-se uma observação mais detalhada na Equação 5.7, percebe-se o alto valor do coeficiente X_3 , que mostra a grande influência da concentração de 5,6 dimetilbenzimidazola na produção de B12. Alguns autores (SPALLA et al., 1989, FLORENT, 1986, MARWUAHA et al., 1983-b) têm demonstrado a importância da adição deste precursor em fermentações para produção de vitamina B12. Tal composto forma

junto com o fosfato e a ribose, o macrociclo da molécula de vitamina B12, permitindo ainda a conversão da cobinamida em cobalamina. Segundo os autores, alguns microrganismos podem sintetizar seu próprio DMI, enquanto que outros, como as *Pseudomonas*, são fortemente dependentes de adição externa. Isto, aliado ao fato que o mutante utilizado nesta etapa foi isolado a partir de altas concentrações do precursor, explica a forte influência da variável no processo. O coeficiente de X_1 também indica um aumento sensível no rendimento de B12 com o aumento da temperatura, enquanto que em relação a X_2 , há um decréscimo na produção de B12 com o aumento do pH. Também fica claro na Equação 5.7, a existência de interações negativas (efeitos antagônicos), entre X_1 e X_2 (T e pH).

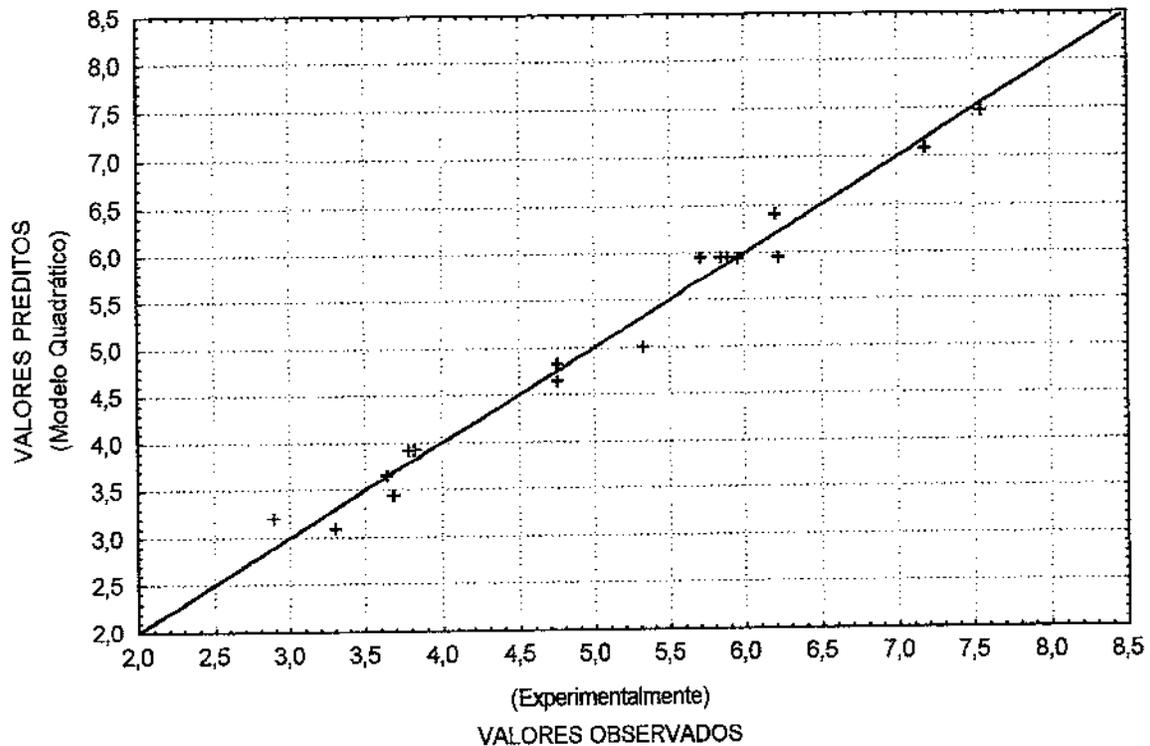


Figura 5.1 – Valores Preditos versus Valores Experimentais para o Modelo Quadrático do Primeiro Planejamento com Composto Central

Considerando-se o modelo quadrático válido, para efetuar uma análise mais detalhada do comportamento de cada variável construiu-se gráficos tridimensionais de superfície resposta para todas as combinações possíveis de variáveis. Em todas as figuras, a variável que não está representada teve o seu valor mantido constante no nível utilizado no ponto central.

A Figura 5.2 mostra a variação no rendimento de B12 em função da temperatura e pH inicial, mantendo-se fixa a concentração de 5,6 DMI, enquanto a Figura 5.3 apresenta, para as mesmas condições, a curva de nível correspondente. Verifica-se que a temperatura exerce uma maior influência na resposta que o pH. A produção de vitamina é máxima para temperaturas entre 33,0 °C e 36,0 °C e valores de pH acima de 7,2 e abaixo de 6,2, apesar que níveis de pH inicial inferiores a este último não são desejáveis para fermentação de *Pseudomonas*. Fica claro, também, que a resposta é mais sensível a variações de temperatura para valores limites de pH (abaixo de 6,5 e acima de 7,2), e que a associação de níveis extremos de pH e temperatura provoca uma diminuição acentuada no rendimento.

As Figuras 5.4 e 5.5 descrevem a influência da concentração de 5,6 DMI e do pH inicial na produção de vitamina, para valores de temperatura constante. Percebe-se que a resposta é fortemente dependente da concentração de 5,6 dimetilbenzimidazola. Este comportamento faz com que os mais altos coeficientes dos modelos descritos nas Equações 5.5 e 5.7 estivessem relacionados a esta variável. Por outro lado, os piores rendimentos estão associados a baixas concentrações de 5,6 DMI. Teoricamente, seria difícil precisar os níveis ótimos das variáveis estudadas, mas concentrações de 5,6 DMI superiores a 70 mg/l e pH maior que 7,3 permitiram que a região de máxima produção fosse alcançada.

O comportamento da temperatura e da concentração de 5,6 DMI na produção de vitamina, para condições restritivas de pH inicial, é mostrado nas Figuras 5.6 e 5.7. Nota-se que ambas variáveis exercem forte influência na resposta. Os melhores rendimentos foram conseguidos para altas concentrações de 5,6 DMI (acima de 70,0 mg/l) e temperatura em torno do ponto central (34,0 °C). Por outro lado, a redução na concentração de 5,6 DMI diminuiu acentuadamente a produção de B12. Os resultados indicam que pode existir uma

região de máximo, envolvendo valores de temperatura e 5,6 DMI maiores, com a ressalva que altas temperaturas podem inibir o crescimento do microrganismo.

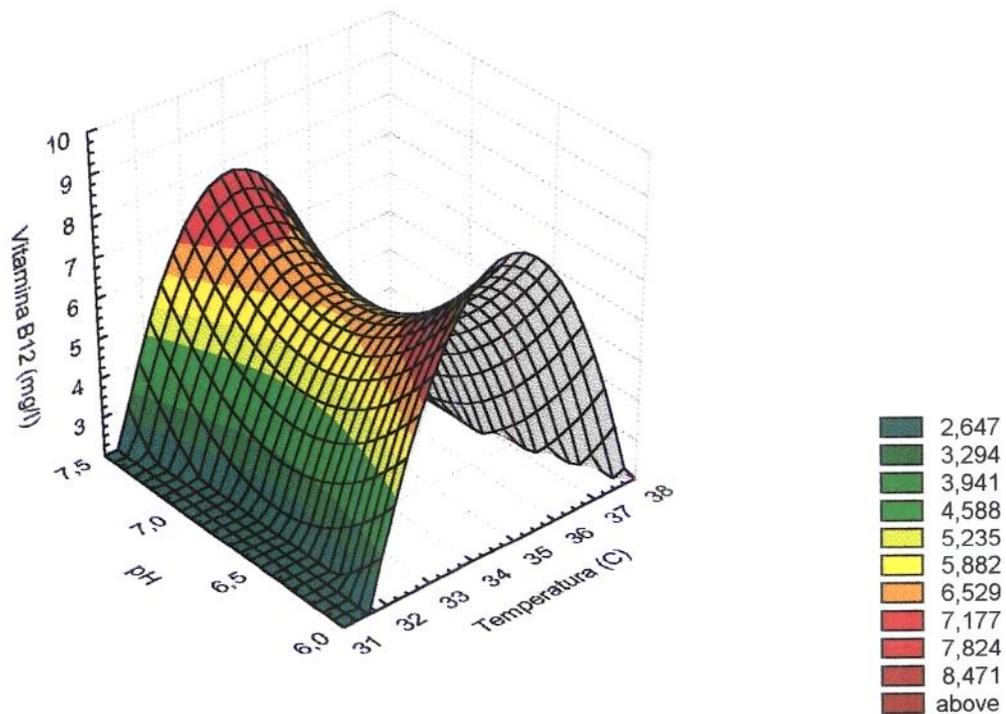


Figura 5.2 – Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e pH, para Concentração de 5,6 DMI = 62,5 mg/l

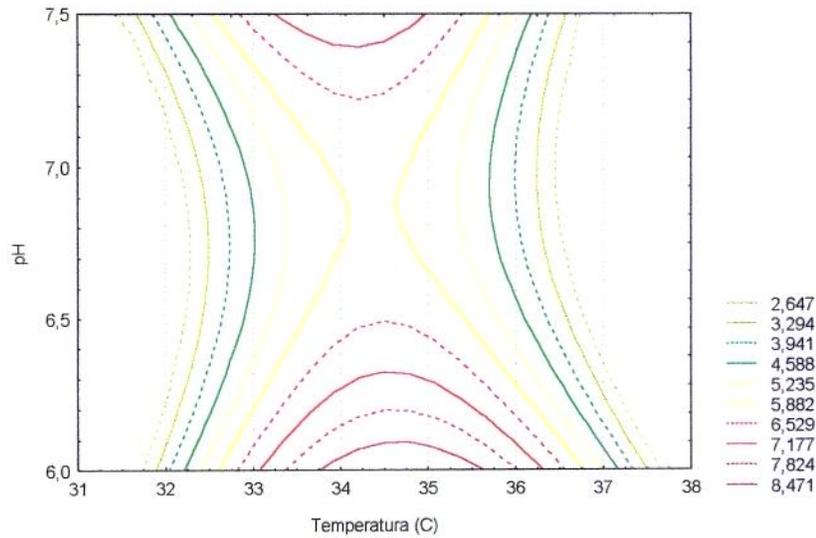


Figura 5.3 – Curvas de Nível para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e pH, para Concentração de 5,6 DMI = 62,5 mg/l

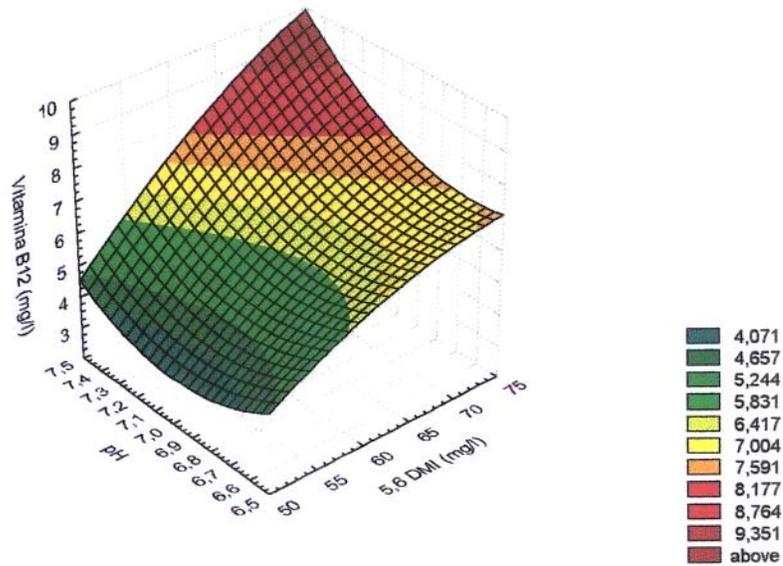


Figura 5.4 – Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Concentração de 5,6 DMI e pH, para Temperatura = 34,0 °C

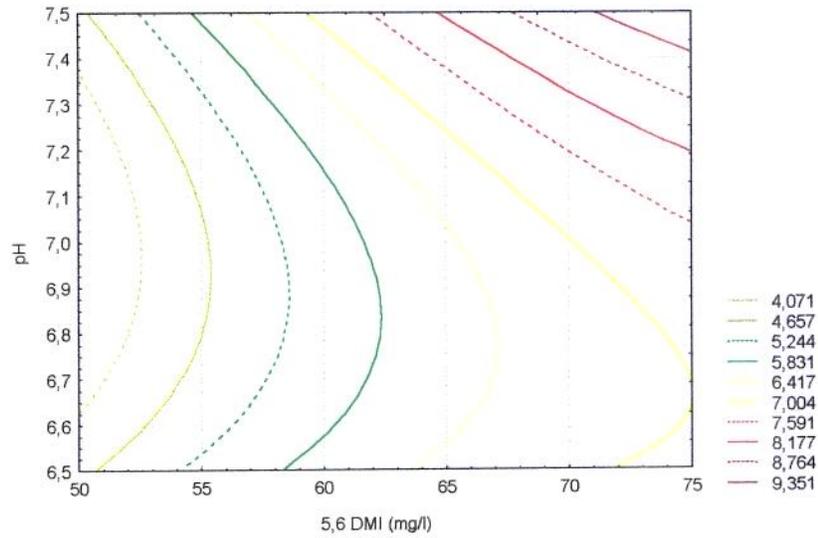


Figura 5.5 – Curvas de Nível para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Concentração de 5,6 DMI e pH, para Temperatura = 34,0 °C

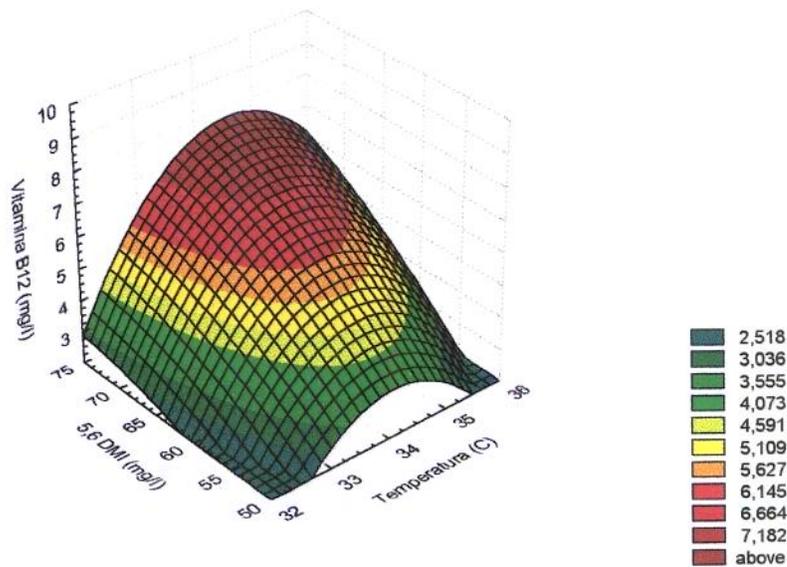


Figura 5.6 – Superfície Resposta para a Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e Concentração de 5,6 DMI, para pH = 7,0

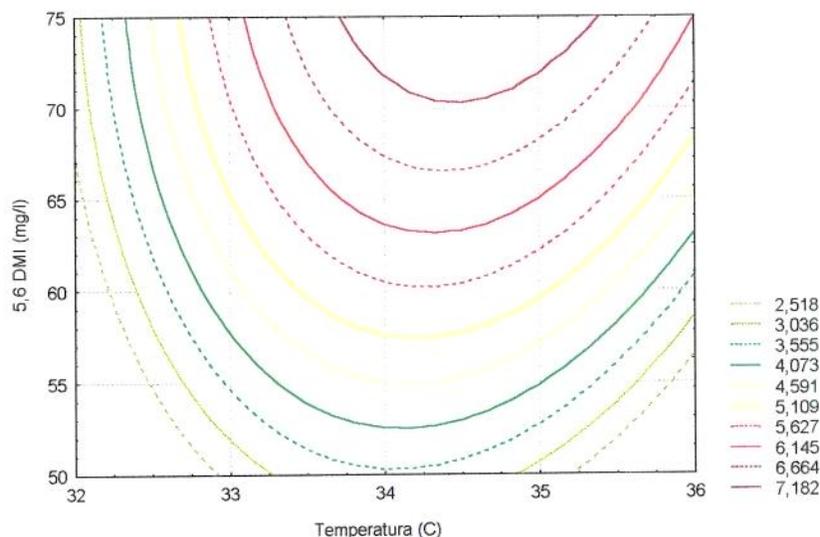


Figura 5.7 – Curvas de Nível para Variação do Rendimento de Vitamina B12 em Função da Temperatura e Concentração de 5,6 DMI, para pH = 7,0

Novos experimentos foram necessários para determinar valores mais precisos para as variáveis envolvidas, especialmente para temperatura, que não deve alcançar níveis inibitórios para o crescimento do microrganismo, e para a concentração de 5,6 DMI, que demonstrou ser a variável de maior influência no rendimento de vitamina B12.

5.5 – Caminho de Ascendência Máxima

Conforme os resultados apresentados no item anterior, o ponto de maximização da resposta não tinha sido alcançado. Para estabelecer um novo ponto central e uma nova região de estudo, utilizou-se a metodologia denominada “Caminho de Ascendência

Máxima”, descrita por NETO et al. (1995), CORNELL (1990) e KHURI e CORNELL (1987).

Para a determinação dos novos valores de T, pH e 5,6 DMI, utilizou-se a Equação 5.5, que descreve o modelo linear para o rendimento, associado às Equações 3.2, 3.6 e 3.7. Arbitrando como troca incremental $\Delta_3 = 20,0$ mg/l, tem-se:

$$X_3 = \Delta_3 / (\Delta Z_3 / 2) = 20 / (15 / 2) = 2,67 \quad (5.10)$$

$$v = b_3 / (2 \cdot X_3) = 1,197 / 2 \cdot 2,67 = 0,22 \quad (5.11)$$

$$X_1 = b_1 / (2 \cdot v) = 0,4612 / 2 \cdot 0,22 = 1,03 \quad (5.12)$$

$$\Delta_1 = X_1 \cdot (\Delta Z_1 / 2) = 1,03 \cdot (2 / 1) = 0,63 \quad (5.13)$$

$$X_2 = b_2 / (2 \cdot v) = 0,2811 / 2 \cdot 0,22 = 0,63 \quad (5.14)$$

$$\Delta_2 = X_2 \cdot (\Delta Z_2 / 2) = 0,63 \cdot (0,4 / 2) = 0,13 \quad (5.15)$$

A partir dos valores determinados nas Equações 5.10 a 5.15, construiu-se o planejamento para o caminho de ascendência máxima, cujos níveis codificados são apresentados na Tabela 5.14.

Devido a dificuldade de se manter níveis experimentais de temperatura com grande precisão, a troca incremental para a concentração de 5,6 DMI (Δ_3), foi aumentada de 15,0 mg/l para 20,0 mg/l. Da mesma forma, estabeleceu-se que o nível máximo de temperatura a ser estudado seria de 36,0 °C. Segundo BUCHANANS e GIBBONS (1983), a maior parte das espécies de *Pseudomonas* não apresentam crescimento a temperaturas superiores a 36,0 °C.

Tabela 5.14 – Valores Codificados para Temperatura, pH e Concentração de 5,6 DMI para os Experimentos do Caminho de Ascendência Máxima

Experimento	Parâmetro	X ₁	X ₂	X ₃
	Ponto Central – PC	0,0	0,0	0,0
1	PC + 1,0 Δ _i	1,03	0,63	2,67
2	PC + 1,5 Δ _i	1,54	0,95	4,00
3	PC + 2,0 Δ _i	2,06	1,26	5,34
4	PC + 1,0 Δ _i	1,03	0,63	2,67
5	PC + 1,5 Δ _i	1,54	0,95	4,00
6	PC + 2,0 Δ _i	2,06	1,26	5,34

A Tabela 5.15 traz os valores das variáveis na forma real com os respectivos rendimentos. Percebe-se que a vitamina B12 produzida alcança o maior rendimento no experimento de número 5. Porém, o valor médio é maior para os experimentos em duplicata 1 e 4. A partir destes ensaios, os valores médios decrescem, provavelmente, pelas altas temperaturas empregadas. De posse destes resultados, a região dos experimentos 1 e 4, revela a possibilidade de existência de um máximo de rendimento em relação a T e/ou pH e/ou 5,6 DMI.

Analisando os resultados obtidos no caminho de ascendência máxima, apresentados na Tabela 5.15, e tendo claro a impossibilidade de se utilizar níveis mais elevados de temperatura, decidiu-se escolher para a continuidade dos experimentos, o seguinte ponto central: T = 35,0 °C, pH = 7,1 e concentração de 5,6 DMI = 90,0 mg/l.

Tabela 5.15 – Valores Reais para Temperatura, pH e Concentração de 5,6 DMI, e Rendimento de Vitamina B12 para os Experimentos do Caminho de Ascendência Máxima.

Experimento	Parâmetro	T (°C)	pH*	5,6 DMI (mg/l)	B12 (mg/l)
-	Pto. Central - PC	34,0	7,0	62,5	-
-	Δ_i	1,03	0,13	20,0	-
1	PC + 1,0 Δ_i	35,0	7,1	82,5	5,99
2	PC + 1,5 Δ_i	35,5	7,2	92,5	5,49
3	PC + 2,0 Δ_i	36,0	7,3	102,5	3,90
4	PC + 1,0 Δ_i	35,0	7,1	82,5	6,28
5	PC + 1,5 Δ_i	35,5	7,2	92,5	6,43
6	PC + 2,0 Δ_i	36,0	7,3	102,5	4,22

* pH inicial

5.6 – Segundo Planejamento com Composto Central

Com o objetivo de avaliar e modelar o comportamento do rendimento da vitamina B12 em função da temperatura, pH inicial e concentração de 5,6 DMI, utilizou-se um novo planejamento, constituído de um fatorial completo 2^3 associado a uma configuração “estrela”, com triplicata no ponto central, totalizando mais 17 ensaios. As relações utilizadas para a codificação das variáveis foram as seguintes:

$$X_4 = (T - 35) / 1 \quad (5.16)$$

$$X_5 = (\text{pH} - 7,1) / 0,2 \quad (5.17)$$

$$X_5 = (\text{DMI} - 90) / 10 \quad (5.18)$$

onde:

X_4 = variável codificada para T;

X_5 = variável codificada para pH;

X_6 = variável codificada para 5,6 DMI.

A Tabela 5.16 mostra a codificação utilizada, com os respectivos níveis experimentais. A Tabela 5.17 por sua vez, traz os valores reais de cada variável juntamente com os rendimentos de vitamina B12.

Tabela 5.16 – Valores Codificados e Níveis Experimentais para o Segundo Planejamento com Composto Central

Níveis	T (°C)	pH*	5,6 DMI (mg/l)
-1,682	33,5	6,8	73,2
-1	34,0	6,9	80,0
0	35,0	7,0	90,0
1	36,0	7,1	100,0
1,682	36,5	7,2	116,8

* pH inicial

Tabela 5.17 – Valores Reais e Rendimento de Vitamina B12 Obtidos no Segundo Planejamento com Composto Central

Experimento	T (°C)	pH*	5,6 DMI (mg/l)	B12 (mg/l)
1	34,0	6,9	80,0	6,55
2	36,0	6,9	80,0	6,26
3	34,0	7,3	80,0	6,48
4	36,0	7,3	80,0	6,12
5	34,0	6,9	100,0	7,41
6	36,0	6,9	100,0	7,09
7	34,0	7,3	100,0	7,29
8	36,0	7,3	100,0	6,94
9	35,0	7,1	90,0	7,41
10	35,0	7,1	90,0	7,57
11	35,0	7,1	90,0	7,39
12	33,5	7,1	90,0	7,13
13	36,5	7,1	90,0	6,55
14	35,0	6,8	90,0	6,90
15	35,0	7,4	90,0	6,78
16	35,0	7,1	73,2	6,05
17	35,0	7,1	116,8	7,19

* pH inicial

A análise dos resultados apresentados na Tabela 5.17 mostra, para o conjunto de experimentos realizados, um aumento sensível nos rendimentos obtidos, quando comparado com aqueles do primeiro planejamento. Esse comportamento pode ser devido ao fato que, a partir dos resultados do primeiro planejamento com composto central e seleção dos novos pontos centrais no caminho de ascendência máxima, os novos pontos experimentais devem estar situados em uma região de máximo rendimento.

5.6.1 – Modelos Matemáticos para o Rendimento da Vitamina B12

Com a regressão e análise estatística dos rendimentos apresentados na Tabela 5.17, obteve-se o seguinte modelo linear, relacionando a produção de B12 com a temperatura (X_4), pH (X_5) e concentração de 5,6 DMI (X_6):

$$B12 = 6,889 - 0,168X_4 - 0,050X_5 + 0,383X_6 \quad (5.19)$$

A seguir, na Tabela 5.18, é apresentada a Análise de Variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem, descrito na Equação 5.19. A comparação entre o valor do F calculado e do F tabelado mostra que o modelo ajustado é significativo para um nível de confiança de 99%, explicando 80,9% das variações das respostas encontradas.

Tabela 5.18 – Análise de Variância para o Modelo Linear Obtido para o Rendimento de Vitamina B12 no Segundo Planejamento com Composto Central

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	2,428	3	0,809	8,207
Desvios	1,282	13	0,099	-
Total	3,710	16	-	-

Coefficiente de Correlação = 0,809

Valor F tabelado ($F_{0,99; 3; 13}$) = 5,74

O modelo quadrático ou de 2ª ordem, gerado a partir do mesmo conjunto de dados, é mostrado na Equação 5.20:

$$\begin{aligned}
 B12 = & 7,454 - 0,168X_4 - 0,050X_5 + 0,383X_6 - 0,209X_4^2 - 0,209X_5^2 \\
 & - 0,286X_6^2 - 0,013X_4X_5 - 0,003X_4X_6 - 0,008X_5X_6
 \end{aligned}
 \quad (5.20)$$

Da mesma forma, a Análise de Variância para o modelo descrito na Equação 5.20 é apresentada na Tabela 5.19. Os resultados permitem afirmar que o modelo é significativo para um nível de confiança de 99%, explicando 99,4% da variação das respostas para o rendimento de vitamina B12.

Tabela 5.19 – Análise de Variância para o Modelo Quadrático Obtido para o Rendimento de Vitamina B12 no 2º Planejamento com Composto Central

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	4,335	9	0,482	68,857
Desvios	0,047	7	0,007	-
Total	4,382	16	-	-

Coefficiente de Correlação = 0,994

Valor F tabelado ($F_{0,99; 9; 7}$) = 6,72

O modelo quadrático permitiu a obtenção de um melhor coeficiente de correlação. Porém, a exemplo do que ocorreu no primeiro planejamento, ambos os modelos são estatisticamente significativos para explicar a variação da resposta nas condições experimentais utilizadas. Devido aos diferentes graus de liberdade associados, a escolha do melhor modelo deve ser baseada na comparação entre o F calculado pela Equação 5.8 e o F tabelado, ou seja:

$$F = [(1,282 - 0,047).(16 - 10)] / [0,047.(10 - 4)] = 26,277 \quad (5.8)$$

$$F \text{ tabelado} = 8,47$$

Pelo critério adotado, o modelo quadrático é o que melhor explica a variação do rendimento de vitamina em função da temperatura, pH e concentração de 5,6 DMI. A Figura 5.8 compara os rendimentos de vitamina B12 preditos pelo modelo quadrático com aqueles obtidos experimentalmente.

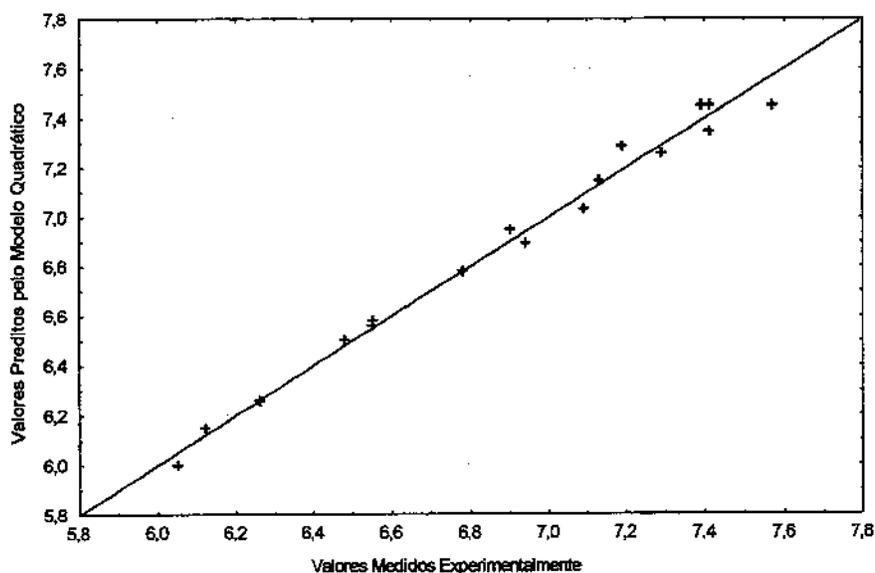


Figura 5.8 – Valores Preditos versus Valores Experimentais para o Modelo Quadrático do Segundo Planejamento com Composto Central

O modelo quadrático escrito em função das variáveis reais, pela substituição das Equações 5.16 a 5.18 em 5.20, permite a obtenção da seguinte expressão para o rendimento de vitamina B12:

$$\begin{aligned} \text{B12 (mg/l)} = & -535,641 + 14,541T + 74,560\text{pH} + 0,584\text{DMI} - 0,209T^2 - 5,214\text{pH}^2 \\ & - 0,0025\text{DMI}^2 - 0,013T.\text{pH} - 0,0003T.\text{DMI} - 0,0038\text{pH}.\text{DMI} \end{aligned} \quad (5.21)$$

A observação dos coeficientes das Equações 5.20 e 5.21, mostra novamente, para a nova região de estudo, que as variáveis X_4 (T) e X_6 (5,6 DMI) exercem a maior influência sobre a produção de B12.

Derivando a Equação 5.21 em função de cada uma das variáveis presentes, é possível obter o valor máximo ou mínimo local para T, pH inicial e 5,6 DMI, na região otimizada:

$$\partial^2\text{B12} / \partial T^2 = -0,4171 \quad \text{Valor máximo local} \quad (5.22)$$

$$\partial^2\text{B12} / \partial \text{pH}^2 = -10,4274 \quad \text{Valor máximo local} \quad (5.23)$$

$$\partial^2\text{B12} / \partial \text{DMI}^2 = -0,0057 \quad \text{Valor máximo local} \quad (5.24)$$

Por fim, a resolução do sistema de três equações formado, a partir das derivadas da Equação 5.21, permite escrever os valores otimizados para temperatura, pH inicial e concentração de 5,6 DMI:

$$T = 34 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 7,14$$

$$\text{Concentração de 5,6 DMI} = 98,8 \text{ mg/l}$$

Os níveis experimentais otimizados, estão inseridos dentro da faixa de valores descritos na literatura. Uma análise dos artigos que descrevem a produção de B12 por

bactérias (principalmente do gênero *Pseudomonas* e *Propionibacterium*), mostram que os valores mais comumente utilizados são: temperatura de 28 °C a 37 °C, pH 6,8 a 7,2 e concentração de 5,6 DMI de até 2500 mg/l (YE et al., 1996, KOJIMA et al., 1993, QUESADA-CHANTO et al., 1994-b, INOUE et al., 1992, SILVEIRA et al., 1990, HATANAKA et al., 1988, NOPARATNARAPORN et al., 1986, MARWUAHA et al., 1983-a e 1983-b, e LAGO e DEMAÏN, 1969).

A partir das Figuras 5.9 a 5.14, obtidas pelo uso da Equação 5.21, é possível identificar com clareza a região espacial na qual se localizam os valores ótimos de T, pH inicial e 5,6 DMI. A boa definição espacial da região otimizada, justifica-se principalmente pelo fato que, no primeiro planejamento com composto central, o conjunto de valores de T, pH e 5,6 DMI estudados, acenavam com uma possibilidade clara de existência de uma região em que as respostas obtidas poderiam ser maximizadas. Nas Figuras 5.9 e 5.10 são apresentados o comportamento do rendimento de vitamina B12 em função da temperatura e pH, mantendo-se a concentração de 5,6 DMI constante e igual ao valor otimizado (98,8 mg/l). Percebe-se a existência de uma região de rendimentos elevados, situada nas temperaturas compreendidas entre 33,0 °C e 36,0 °C e pH 6,8 e 7,3.

Nas Figuras 5.11 e 5.12, a temperatura foi mantida no nível otimizado (34,6 °C). Observa-se a forte influência que a variável 5,6 DMI exerce na resposta. Os melhores rendimentos de vitamina estão localizados para pH inicial variando de 6,8 a 7,3 e concentração de 5,6 dimetilbenzimidazola de 85,0 mg/l até 105,0 mg/l.

Por fim, as Figuras 5.13 e 5.14 mostram a variação da produção de B12 em função da temperatura e concentração de 5,6 DMI, para pH inicial igual a 7,14. O rendimento de vitamina foi máximo na região de temperaturas entre 33,5 °C e 36,0 °C e 85,0 a 105,0 mg/l de 5,6 DMI. De acordo com os resultados obtidos, a escolha das condições ótimas de operação, teria como fatores mais importantes a forte influência da concentração do precursor 5,6 DMI e os níveis experimentais limitantes do pH e temperatura, no crescimento do microrganismo.

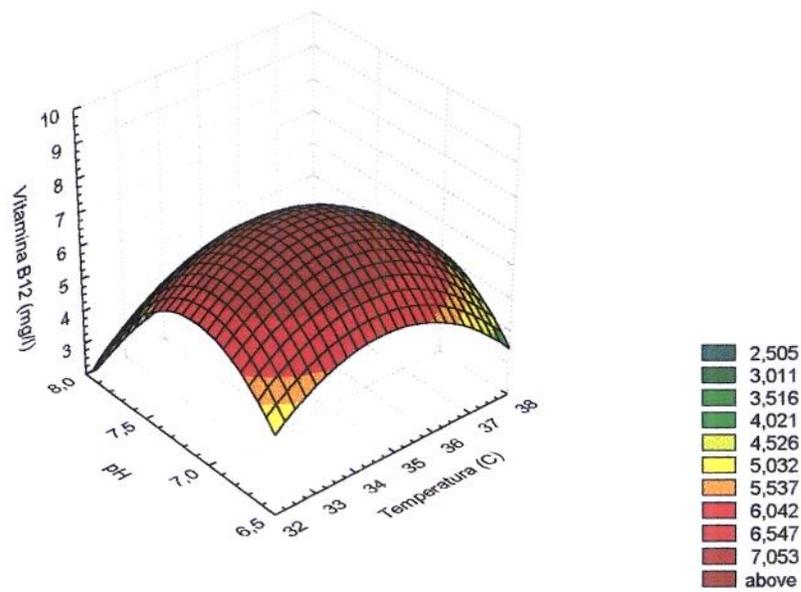


Figura 5.9 – Superfície Resposta para Variação do Rendimento de Vitamina B12 em função da Temperatura e pH, para Concentração de 5,6 DMI = 98,8 mg/l

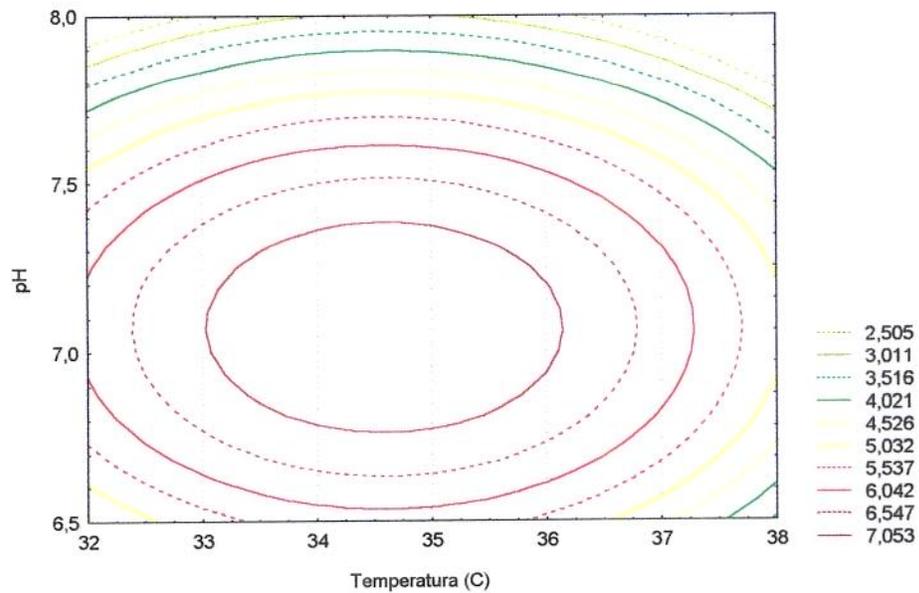


Figura 5.10 – Curvas de Nível para Variação do Rendimento de Vitamina B12 em função da Temperatura e pH, para Concentração de 5,6 DMI = 98,8 mg/l

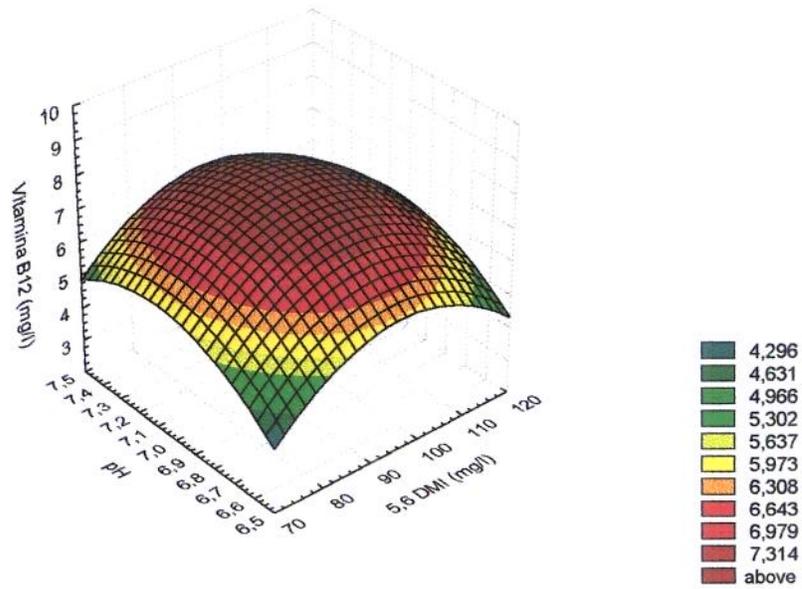


Figura 5.11 – Superfície Resposta para Variação do Rendimento de Vitamina B12 em função da Concentração de 5,6 DMI e pH, para Temperatura = $34,6^{\circ}\text{C}$

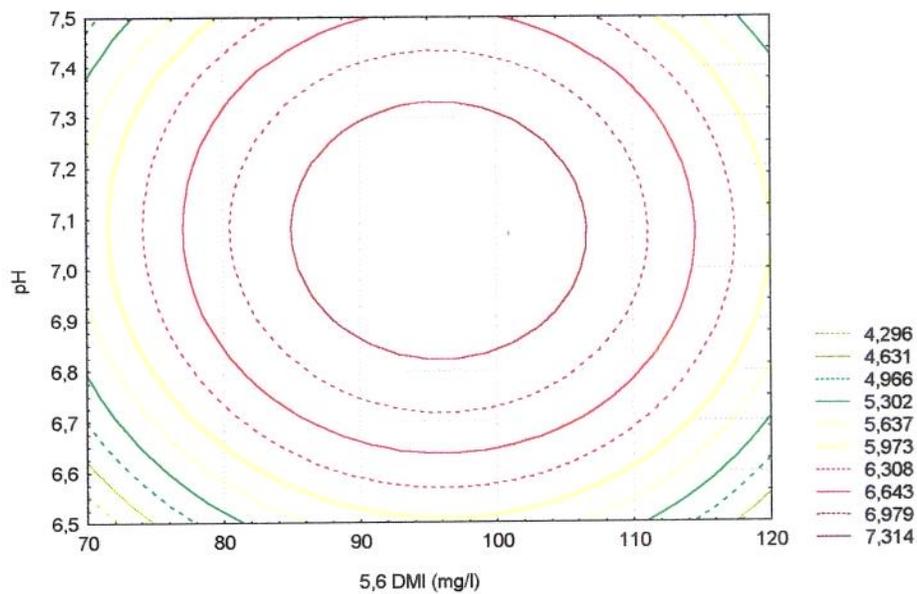


Figura 5.12 – Curvas de Nível para Variação do Rendimento de Vitamina B12 em função da Concentração de 5,6 DMI e pH, para Temperatura = $34,6^{\circ}\text{C}$

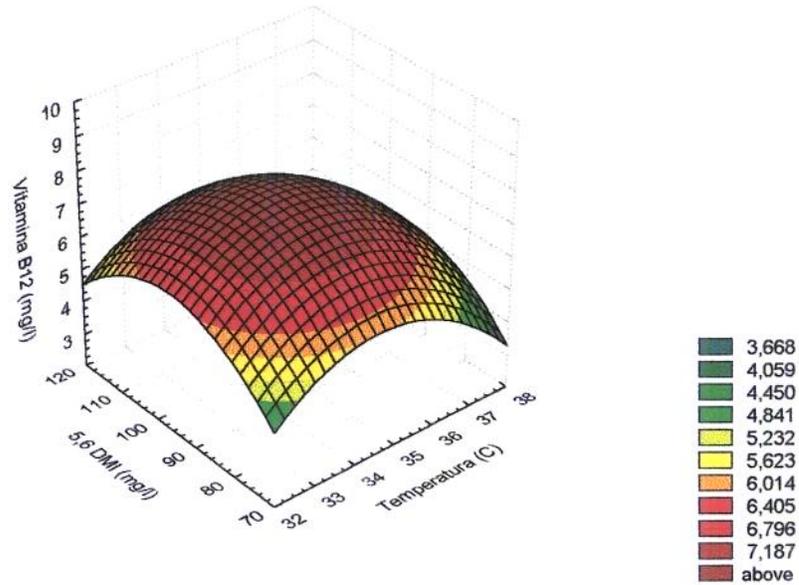


Figura 5.13 – Superfície Resposta para Variação do Rendimento de Vitamina B12 em função da Temperatura e Concentração de 5,6 DMI, para pH = 7,14

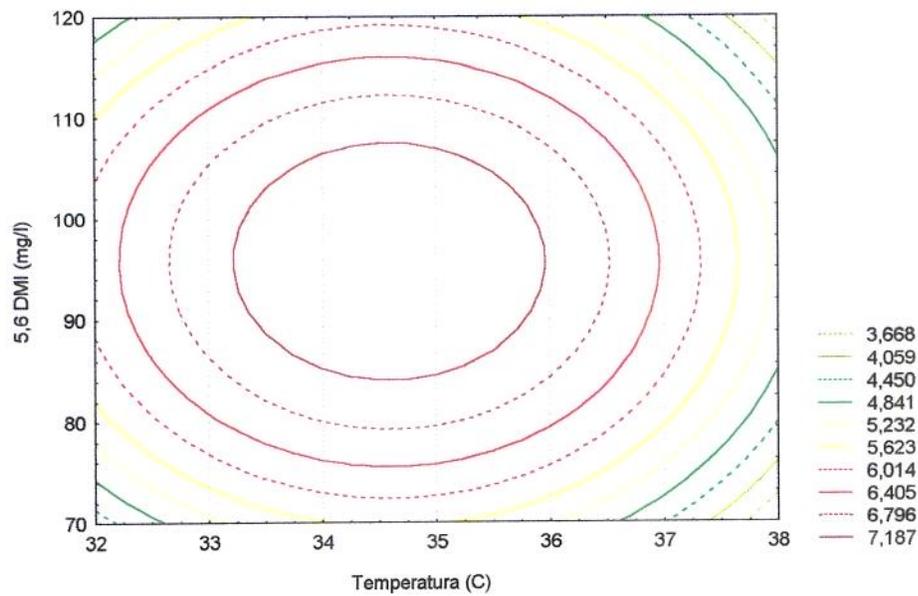


Figura 5.14 – Curvas de Nível para Variação do Rendimento de Vitamina B12 em função da Temperatura e Concentração de 5,6 DMI, para pH = 7,14

O planejamento experimental empregado mostrou ser uma ferramenta útil para analisar, modelar e otimizar o efeito das variáveis experimentais empregadas na resposta estudada. Em comparação com os experimentos anteriores a esta etapa, houve uma melhoria significativa no rendimento de vitamina, além de maiores consumos de substrato e concentração celular, conforme resultados completos, listados nas Tabelas A1 a A57, do Apêndice A1. A produção média de vitamina B12, para o segundo planejamento com composto central, oscilou em torno de 7,00 mg/l, chegando a um máximo de 7,57 mg/l, valor muito superior aos 3,86 mg/l, que foi o maior rendimento obtido antes do planejamento experimental. O consumo de substrato e o rendimento celular máximo também mostraram níveis superiores aos anteriores, alcançando respectivamente, 94,5 g/l e 7,9 g/l.

5.7 – Experimentos em Fermentador de Bancada

Ao final da avaliação, modelagem e otimização das variáveis experimentais, passou-se a próxima etapa do trabalho, que consistiu em investigar a influência de alguns parâmetros importantes no rendimento de B12. Esse estágio foi conduzido em um fermentador de bancada com capacidade de 5,0 litros e controle automático de temperatura, pH, aeração, agitação e concentração de oxigênio dissolvido. As condições experimentais empregadas, de acordo com a etapa anterior, foram:

Temperatura = 34,6 °C;

pH = 7,14;

Concentração de 5,6 DMI = 98,8 mg/l;

Tempo de Fermentação = 96 h;

Idade do Inóculo = 72 h;

Concentração de Substrato = 100,0 g/l;

Concentração de Cobalto = 20,0 mg/l.

5.7.1 – Influência do Tempo de Adição de 5,6 DMI no Rendimento da Vitamina B12

A presença de 5,6 DMI tem sido repetidamente descrita na literatura como importante na formação da Vitamina B12, por permitir a conversão da cobinamida em cobalamina, através da formação do 5'-Dexosiadenosilcobalamina Fosfato (QUESADA-CHANTO et al., 1994-b, KRALOVÁ e RAUCH, 1985, FA et al., 1984, MARWUAHA et al., 1983-b). Além disso, acredita-se que como outros precursores, ele aumenta a permeabilidade celular durante o período de intensa produção de vitamina (FLORENT e NINET, 1979).

Ao contrário de outras bactérias, como as do gênero *Propionibacterium*, que possuem a habilidade de sintetizar seu próprio dimetilbenzimidazola, a *Pseudomonas* necessita da adição externa do mesmo (SPALLA et al., 1989). Porém, conforme observação feita por KRALOVÁ e RAUCH (1985), o efeito estimulante do 5,6 DMI depende, não somente de sua concentração, mas também do tempo em que ele é adicionado à fermentação.

A fim de se determinar a influência que os diferentes tempos de adição de 5,6 DMI exercem sobre o rendimento da vitamina B12, foram testados 4 diferentes níveis: 0 h, 24 h, 48 h e 72 h de fermentação. A concentração utilizada – 98,8 mg/l, foi aquela otimizada na etapa anterior. Na Tabela 5.20 são mostrados os resultados obtidos.

Tabela 5.20 – Rendimento de Vitamina B12, Concentração Celular e Consumo de Substrato para Diferentes Tempos de Adição de 5,6 DMI

Tempo Adição 5,6 DMI (h)	Rendimento B12 (mg/l)	Conc. Celular (g/l)	Cons. Substrato (g/l)
0	4,25	3,56	58,9
24	7,31	3,86	71,2
48	7,91	5,05	83,5
72	5,83	4,31	89,1

Os resultados apresentados sugerem existência de um tempo ótimo de adição em torno de 48 h. Essa fermentação mostrou os maiores rendimentos de vitamina e concentração celular, associados também a um alto consumo de substrato. Por outro lado, quando o precursor foi adicionado no início da fermentação (0 h), houve uma queda acentuada na produção de vitamina B12. MARWUAHA et al. (1983-b), utilizando *Propionibacterium shermanii* para produção de B12, também observaram um efeito inibitório do 5,6 DMI, quando adicionado nos estágios iniciais da fermentação. Segundo eles, a produção de vitamina B12 acaba sendo prejudicada pela inibição do crescimento do microrganismo.

Não foram encontradas, na literatura, referências a tempo ótimo de adição de 5,6 DMI em fermentação com *Pseudomonas*. Os trabalhos encontrados sempre se referiam a Propionibactérias (QUESADA-CHANTO et al., 1994-b, KRALOVÁ e RAUCH, 1985, PÉREZ-MENDONZA e GARCIA-HERNANDEZ, 1983, MARWUAHA et al., 1983-b), e os resultados apresentados mostravam que os melhores rendimentos de vitamina B12 eram conseguidos na segunda metade da fermentação, que correspondia a tempos de adição de 5,6 DMI variando de 48 h até 182 h.

5.7.2 – Influência do Controle de pH no Rendimento da Vitamina B12

Muitos autores têm reportado a forte influência que o pH exerce sobre microrganismos produtores de vitamina B12, sobretudo bactérias (QUESADA-CHANTO et al., 1998, BAINOTTI et al., 1996, YONGFU et al., 1995, QUESADA-CHANTO et al., 1994-b). Porém, a grande maioria dos trabalhos tratam de investigar a relação entre o nível inicial de pH empregado e a produção de B12. Com o objetivo de melhor determinar esta relação, foram realizados experimentos para estabelecer a influência que o controle do pH tem no rendimento da vitamina e no crescimento celular. Para a manutenção do pH no nível desejado, NaOH 5% e H₂SO₄ 0,1N foram utilizados. A Figura 5.15 mostra o comportamento do pH durante a fermentação, quando nenhum controle foi empregado.

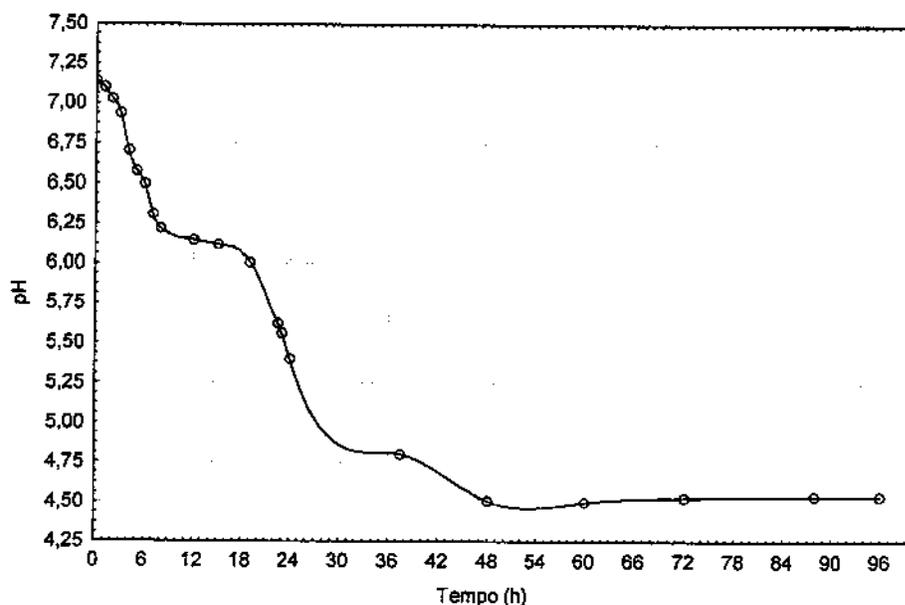


Figura 5.15 – Comportamento do pH durante a Fermentação de *Pseudomonas P3*

Observa-se que o pH decresce continuamente até 48 horas de fermentação, quando então, torna-se relativamente constante. A queda mostra-se mais acentuada nas primeiras 24 horas, onde a produção de ácido pelo microrganismo deve ser mais intensa. Segundo YONGFU et al. (1995), há evidências, que em fermentação de *Pseudomonas* para produção de vitamina B12, o microrganismo excrete ácido acético durante o crescimento, provocando uma redução considerável do pH. Durante os experimentos, apesar de não se ter realizado qualquer caracterização ou identificação, notou-se um odor característico que lembrava o ácido acético. QUESADA-CHANTO et al. (1994-b) não fazem nenhuma referência à relação entre o tempo de fermentação e a produção de ácido propiônico e acético, durante a fermentação de várias culturas de *Propionibacterium*. Entretanto, eles notaram que a máxima produção dos ácidos ocorria entre pH inicial 6,5 e 7,0.

A Figura 5.16 compara o rendimento celular obtido com e sem controle de pH. No experimento em que o pH é controlado, a máxima produção celular (6,31 g célula seca / l meio cultura), é alcançado após 49 horas de fermentação, enquanto que sem controle, o maior rendimento (7,94 g/l) tem lugar após 58 horas. Ao final da fermentação (96 horas), verificou-se também que o maior rendimento celular ocorreu quando o pH não foi controlado (4,85 g/l contra 3,86 g/l).

Mesmo com a queda acentuada do pH nas primeiras 48 horas de experimento na corrida sem controle, o maior rendimento atingido sugere que não houve diminuição do crescimento celular. Verificou-se apenas que a máxima produção celular foi alcançada em 58 horas de fermentação, superior portanto às 49 horas da corrida com controle de pH.

BAINOTTI et al. (1996), também estudaram a influência do pH no crescimento microbiano e na produção de vitamina B12 por *Acetobacterium sp.* Eles concluíram que um aumento na concentração inicial de ácido acético no meio de cultura, não interferiu no rendimento celular, porém, provocou uma diminuição na velocidade específica de crescimento (μ). O trabalho contudo, não abordou a relação entre o controle do pH e o crescimento do microrganismo.

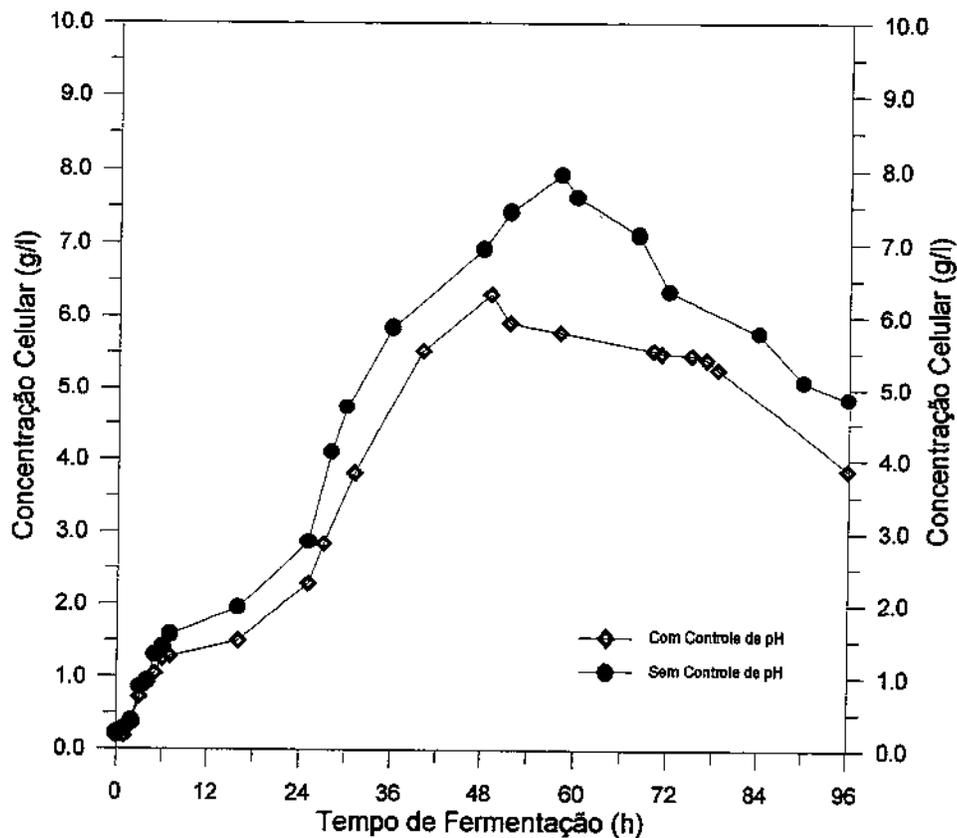


Figura 5.16 – Curvas de Concentração Celular para Experimentos Com e Sem Controle de pH.

A Tabela 5.21 apresenta os resultados completos das corridas com e sem controle de pH. Os valores da velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) mostram que, no experimento sem controle do pH, não houve inibição do crescimento celular. Além disso, a produção de vitamina B12 foi superior, permitindo que se conclua que a substância ácida excretada pelo microrganismo durante a fermentação não interfere negativamente na produção da vitamina. Vale ressaltar apenas que, possivelmente, o controle do pH tenha promovido um aumento do conteúdo intracelular da vitamina pelo mutante de *Pseudomonas*, já que nesta corrida, uma maior concentração de B12 por massa de célula seca, foi conseguida.

Tabela 5.21 – Produção de Vitamina B12, Concentração Celular e Velocidade Máxima Específica de Crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para Fermentações Com e Sem Controle de pH

Experimento	Conc. Celular (g/l)	Rendimento B12		$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)
		(mg/l)	(mg/g célula)	
com controle pH	3,86	7,16	1,85	0,175
sem controle pH	4,85	7,53	1,55	0,179

5.7.3 – Influência do K_L sobre o Rendimento da Vitamina B12

As bactérias do gênero *Pseudomonas*, produtoras de vitamina B12, são conhecidas por serem estritamente aeróbicas e, portanto, dependentes de oxigênio. Contudo, o efeito da concentração de oxigênio durante a fermentação é ainda objeto de controvérsias. SPALLA et al. (1989) relataram que o nível de oxigênio dissolvido é um importante parâmetro na produção de vitamina B12. Para eles, no início do processo, a concentração de oxigênio deve ser suficientemente alta, de modo a evitar a inibição do crescimento ($pO_2 > 0$). Durante a fermentação, ao contrário, o oxigênio torna-se o fator limitante do crescimento e isto de algum modo induz o início da produção de B12. Por essa razão, é necessário fornecer oxigênio em quantidades limitadas.

FLORENT (1986), ao contrário, defende que a fermentação de *Pseudomonas* para produção de vitamina deve se processar com concentrações de oxigênio dissolvido altas e constantes. Ele defende que, como a conversão da cobinamida em cobalamina por ação do 5,6 DMI se processa em presença de oxigênio, a segunda parte da fermentação não deve se realizar com concentrações limitantes. Esses trabalhos são contraditórios, dificultando uma interpretação mais apurada da influência da concentração de oxigênio na produção de B12, por *Pseudomonas*.

Segundo PIRT (1975) e MOLWITZ et al. (1996), o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio – K_{La} é uma ferramenta útil para avaliar o efeito do oxigênio nos processos fermentativos. Portanto, esta etapa do trabalho objetivou estudar o efeito de diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio, no crescimento e produção de vitamina B12 por *Pseudomonas P3*.

O K_{La} foi calculado a partir do teor de oxigênio dissolvido, que foi mantido constante durante a fermentação. Foram empregados os seguintes níveis: 20%, 50% e 80% de oxigênio que, de acordo com a metodologia descrita (item 4.10), forneceram respectivamente os seguintes valores de K_{La} : $9,72 \text{ h}^{-1}$, $36,8 \text{ h}^{-1}$ e $93,2 \text{ h}^{-1}$.

A Tabela 5.22 apresenta os resultados obtidos. Observa-se que a *Pseudomonas P3* foi capaz de crescer e produzir vitamina B12 sob concentrações constantes de oxigênio, já que a pressão de oxigênio (pO_2) foi mantida inalterada ao longo da fermentação. A produção de vitamina foi particularmente afetada pelo K_{La} . Um aumento de $9,72 \text{ h}^{-1}$ para $36,8 \text{ h}^{-1}$, permitiu que a concentração de B12 aumentasse quase 50%. A produção de biomassa e o consumo de substrato também foram maiores. Quando o nível do K_{La} alcançou $93,2 \text{ h}^{-1}$, equivalente a $pO_2 = 80\%$, houve um decréscimo no rendimento de vitamina B12. Aqui, provavelmente, a alta concentração de oxigênio durante toda a fermentação tenha inibido um pouco a produção de vitamina, principalmente no estágio de produção intensa que, segundo SPALLA et al. (1989), deveria ser conduzido com baixas concentrações. Com este nível de K_{La} , houve também uma redução no rendimento celular e na degradação do substrato. Os valores de Y_{XS} mostraram um comportamento similar e, a exemplo dos resultados obtidos nos experimentos em frascos agitados, foram reduzidos.

YE et al. (1996) concluíram que o oxigênio é um parâmetro chave na fermentação de *Propionibacterium freudenreichii* para produção de vitamina B12. Apesar da dificuldade de comparação, por se tratar de microrganismos diferentes e do *Propionibacterium freudenreichii* não ser estritamente aeróbio como a *Pseudomonas P3*, é interessante relatar que eles observaram que a concentração de oxigênio no meio de fermentação é diretamente

responsável por mudanças no metabolismo celular e ajustes na distribuição dos produtos finais e outros metabólitos da fermentação.

Tabela 5.22 – Rendimento de Vitamina B12, Concentração Celular e Rendimento $Y_{X/S}$ para Diferentes Valores de K_{La}

Pressão Oxigênio pO_2 (%)	K_{La} (h^{-1})	Rendimento B12 (mg/l)	Concentração Celular (g/l)	Consumo Substrato (g/l)	Rendimento $Y_{X/S}$ (g cél./g subst.)
20	9,72	4,96	3,12	65,7	0,047
50	36,8	7,41	5,17	81,3	0,064
80	93,2	5,74	4,65	72,8	0,065

Com os resultados apresentados, pode-se afirmar que o K_{La} influencia a produção de vitamina B12 e de biomassa, porém, para se chegar a uma definição sobre o nível ideal desta variável a ser usada durante a fermentação, mais experimentos, em torno do ponto $K_{La} = 36,8 h^{-1}$, seriam desejáveis.

6 – Conclusões

O uso do 5,6 Dimetilbenzimidazola, como agente químico (precursor), possibilitou a obtenção de três mutantes espontâneos de *Pseudomonas sp.* Todos mostraram maiores rendimentos de vitamina B12 do que a cultura original, e o mutante selecionado para a continuidade dos trabalhos – *Pseudomonas P3*, produziu 3,86 mg B12/l, valor cerca de 6 vezes superior àquele obtido com a *Pseudomonas sp.*

Na etapa de “screening”, o microrganismo mais efetivo para produção de vitamina B12 e consumo de substrato foi o mutante *Pseudomonas P3*. Na comparação dos melhores rendimentos, a cultura produziu 3,86 mg B12/l contra 2,93 mg B12/l do *Propionibacterium jensenii*, 2,14 mg B12/l do *Propionibacterium freudenreichii* e 1,43 mg B12/l do *Propionibacterium shermanii*;

Ao contrário do que comumente é descrito na literatura, os microrganismos do gênero *Propionibacterium*, utilizados no trabalho, apresentaram melhores condições de crescimento em baixas taxas de aeração (microaerobiose) do que em atmosfera inerte com Nitrogênio (anaerobiose);

Para as condições experimentais descritas e para o microrganismo selecionado – *Pseudomonas P3*, o meio de cultura 1 e sacarose foram respectivamente o meio de composição mais indicado e a melhor fonte de substrato;

Dentre as sete variáveis experimentais estudadas, a concentração de 5,6 DMI, a temperatura e o pH foram as que mais influenciaram o rendimento de vitamina B12. Os níveis otimizados no planejamento experimental foram: concentração de 5,6 DMI = 98,8 mg/l, temperatura = 34,6 °C e pH = 7,14. As demais variáveis foram fixadas nos níveis que proporcionaram as melhores produções de B12: tempo de fermentação = 96 h, idade do inóculo = 72 h, concentração de substrato = 100 g/l e concentração de cobalto = 20,0 mg/l;

O planejamento experimental empregado mostrou-se importante para a avaliação e seleção das variáveis, bem como para a maximização da resposta estudada, permitindo a obtenção de valores crescentes para o rendimento de vitamina B12. A comparação entre os melhores rendimentos conseguidos antes do planejamento dos experimentos (3,86 mg B12/l) e depois da otimização (7,57 mg B12/l), permite concluir que a produção de B12 foi melhorada em quase 100%;

Para expressar a relação entre o rendimento de vitamina B12 e as variáveis experimentais mais importantes, nas condições empregadas durante o trabalho, obteve-se o seguinte modelo matemático:

$$\begin{aligned} \text{B12 (mg/l)} = & -533,61 + 14,541T + 74,56\text{pH} + 0,584\text{DMI} - 0,209T^2 - 5,214\text{pH}^2 \\ & -0,0025\text{DMI}^2 - 0,0013T.\text{pH} - 0,0003T.\text{DMI} - 0,0038\text{pH}.\text{DMI} \end{aligned}$$

Durante os experimentos realizados em fermentador de bancada, foi possível observar que o tempo de adição do 5,6 dimetilbenzimidazola exerce uma forte influência sobre a produção de vitamina. A introdução do 5,6 DMI após 48 horas de fermentação permitiu que se conseguisse os melhores rendimentos de B12 entre todas as condições testadas;

A queda do pH durante a fermentação não inibiu o crescimento celular nem afetou o rendimento da vitamina. O experimento sem controle de pH permitiu a obtenção de uma

maior produção de B12, rendimento celular e velocidade máxima específica de crescimento do microrganismo;

Os resultados obtidos mostraram que a constante volumétrica de transferência de oxigênio (K_{La}) influenciou a produção de vitamina e de biomassa. Dos níveis testados, $K_{La} = 36,8 \text{ h}^{-1}$ e concentração de oxigênio de 50%, foi o que permitiu a obtenção dos melhores resultados.

7 – Sugestões para Trabalhos Futuros

Testar outras variações dos componentes do meio de cultura, a fim de se estabelecer a composição mais ideal para o mutante empregado;

Testar mais níveis de K_{La} a fim de se estabelecer com mais precisão, qual a concentração de oxigênio e taxa de aeração que maximiza a produção de B12;

Observar a influência que a redução da concentração de oxigênio dissolvido, na segunda metade da fermentação, poderia ter no rendimento de vitamina B12;

Caracterizar a substância ácida excretada pela *Pseudomonas*, e determinar qual a concentração máxima que não inibe o crescimento do microrganismo e a produção de vitamina B12;

Verificar a influência da adição de substrato durante a fermentação;

Determinar as condições ótimas para uma escala de produção maior que a efetuada;

Investigar o processo de purificação mais adequado para a obtenção de um produto puro.

8 – BIBLIOGRAFIA

AOAC - Official Methods of Analysis, p. 1080-1084, 1990.

ALCÂNTARA, E. Vitaminas em perigo. Revista Veja, São Paulo, v. 9, p. 72-81, 1996.

BAINOTTI, A.E., SETOGAICHI, M., NISHIO, N. Kinetic studies and medium improvement of growth and vitamin B12 production by *Acetobacterium sp.* in batch culture. J. Ferment. Bioeng., v.81, n.4, p. 324-328, 1996.

BOUKHZER, E. Cyanocobalamin: Chemistry properties Biochem.Biophys.Acta, p.1175, 128, 1992.

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. Statistics for experiments- an introduction to design, data analysis and model building, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1978. p. 406-416.

BROCK, T. D., MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. Biology of Microorganisms, Ed. Prentice Hall, New Jersey, 7 Ed, 1994. p. 774-809.

BYKHOVSKII, V. Y., ZAITSEVA, N. I., ELISEEV, A. A. Employment of anaerobic process in biosynthesis of vitamin B12 and its analogs (a review). Appl.Biochem.Microbiol., v.27, n.4, p.351-363, 1991.

- BUCHANANS, R. E. e GIBBONS, N. E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: The Willians & Wilkins Co., 8 ed., 1983. p. 923-976.
- CARDINALE, G. J., DREYFUS, P. M., AULD, P., ABELES, R. H. Experimental vitamin B₁₂ deficiency: its effect on tissue vitamin B₁₂-coenzyme levels and on the metabolism of methylmalonyl-CoA. Archs.Biochem.Biophys., v.131, p.92-99, 1969.
- COATES, M. E. Requirements of animals and microbes. In: SEBRELL, W. H. & HARRIS, R. S. (ed.) The vitamins: chemistry, physiology, pathology assay, 2.ed., New York: Academic Press 1968. p.243-257.
- CORNELL, J. A. How to apply response surface methodology. In: SHAPIRO, S. S. & MYKYTKA, E. F. (ed.) Statistical techniques, Miami: ASQC, v.8, 1990. p. 22-27.
- CORNELL, J. A. Experiments with mixture-design models and analysis of mixture data. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistic, 1981. p. 93-99.
- COSTA, J. A. V. Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. Tese de Doutorado: FEA, Unicamp, 1996.
- CROW, V. L. Polysaccharide production by *Propionibacterium* during lactose fermentation. Appl. Environm. Microbiol., v.54. n.7, p. 1892-1895, 1988.
- CUMMINS, C. S. e JOHNSON, J. L. The genus *Propionibacterium*. In: STARR, M. P., STALP, H., TRÜPPER, H. G., BALLOWS, A, SCHELEGEL, H. G. (eds): The prokaryotes – A handbook on habitat, isolation and identification of bacteria, Berlin: Springer-Verlag, v.II, 1981.
- DEMAIN, A. L., DANIELS, H. J., SCHNABLE, L., WHITE, R. F. Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B₁₂ fermentation. Nature, v.220, p.1324-1325, 1968.

- DIPLOCK, A. T. Fat-soluble vitamins. Their biochemistry and applications, London: Heinemon, 1985. p. 192-199.
- FA, Y., KUSEL, P., DEMAIN, A. L. Dependence of betaine stimulation of vitamin B12 overproduction on protein synthesis. Appl. Environ. Microbiol., v.47, n.5, p.1067-1069, 1984.
- FISHER, R. A. Rapid spectrophotometric determination of vitamin B12 in microbial material. Agic. Food Chem., v.1, n.15, 951-953, 1953.
- FLORENT, J. Vitamins. In: REIHM, H. J. & REED, G. (ed). Biotechnology. Weinheim: VCH, v.4, p.119-158, 1986.
- FLORENT, J. e NINET, L. Vitamin B12. In: PEPPLER, H. J. & PERLMAN, D. (ed.). Microbial Technology. New York: Academic Press, p.457-519, 1979.
- FRIENDRICH, W. Vitamins. New York: Walter de Gruyter, 1988. p. 324-338.
- HARRIS, R. S. Vitamin B12. In: SEBRELL, W. H. & HARRIS, R. S.(ed.). The vitamins-chemistry, physiology, pathology assay, 2.ed., New York: Academic Press, 1968. p.120-259.
- HATANAKA, H., WANG, E., TANIGUSHI, M., IJIMA, S., KOBAYASHI, T. Production of vitamin B12 by a fermentor with hollow-fiber module. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.27, p.470-473, 1998.
- HSU, S. T. e YANG, S. T. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effects of pH. Biotechnol. Bioeng., v.38, p.571-578, 1991.
- INOUE, K., KAGEYAMA, S., MIKI, K., MORINAGA, T., KAMAGATA, Y., NAKAMURA, K., MIKAMI, E. Vitamin B12 production by *Acetobacterium sp.* and its tetrachloromethane-resistant mutants. J. Ferm. Bioeng., v.73, n.1, p.76-78, 1992.

- JANICKI, J. E. e PEDZIWIŁK, F. The biosynthesis of vitamins of the B12 group in mixed cultures of bacteria. Acta Microbiol. Polonica, v.15, p.343-348, 1966.
- KALIL, S. J. Modelagem, simulação e otimização de um processo de fermentação alcoólica contínuo, com reciclo de células em reator., Tese de Mestrado: FEA, Unicamp, 1997.
- KEUTH, S. e BISPING, B. Formation of vitamins by pure cultures of tempeh moulds and bacteria during the tempeh solid substrate fermentation. J.Appl.Bacteriol., v.75, p.427-434, 1993.
- KEUTH, S. e BISPING, B. Vitamin B12 production by *Citrobacter freundii* or *Klebsiella pneumoniae* during tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by PCR. Appl.Environ.Microbiol., v.60, n.5, p.1495-1499, 1994.
- KHURI, A. e CORNELL, J. A. Response surface: designs and analysis, ASQC, 1987.
- KOJIMA, I., SATO, H., FUJIWARA, Y. Vitamin B12 production by isopropanol-assimilating microorganisms. J.Ferm.Bioeng., v.75, n.3, p.182-186, 1993.
- KRÁLOVÁ, K. e RAUCH, M. The effect of antimetabolites on the microbial biosynthesis of vitamin B12 and related compounds. Appl. Microbial Biotechnol., v.21, p.331-335, 1985.
- LAGO, B. D. e DEMAIN, A. L. Alternative requirement for vitamin B12 on methionine in mutants of *Pseudomonas denitrificans*, a vitamin B12 producing bacterium. J. of Bacteriol., v.99, p.347-349, 1969.
- LEBLOAS, P., LOUBIERE, P., DLINDLEY, N. Use of unicarbon substrate mixtures to modify carbon flux improves vitamin B12 production with the acetogenic methylotroph *Eubacterium limosum*. Biotechnol.Lett., v.16, n.2, p.129-132, 1994.

- MACHLIN, L. J. Hanbook of vitamins: nutritional, biochemical and chemical aspects, New York: Marcel Dekker, 1984. p. 265-278.
- MAGDOUB, M. N. I., SUCTAN, N. E., FAYED, E. D., ETTA, O. A. A. Role of choline chloride and sodium lactate in biosynthesis of vitamin B12 by *Propionibacterium* grown in whey permeate. Annals of Agricult. Science, v.37, n.1, p.139-146, 1992.
- MANZONI, M. e CAVAZZONI, V. Elementi di Biotecnologia delle Fermentazioni, Milano: Cooperativa Universitaria Studio e Lavoro, 1998.
- MARWUAHA, S. S., KENNEDY, J. F., SETHI, R. P. Vitamin B12 production from whey and simulation of optimal cultural conditions. Process Biochem., v.18, n.6, p.24-27, 1983-a.
- MARWUAHA, S. S., SETHI, R. P., KENNEDY, J. F. Influence of 5,6 dimethylbenzimidazole (DMB) on vitamin B12 biosynthesis by strains of propionibacterium. Enzyme Microbiol. Technol., v.5, p.361-364, 1983-b.
- MARWUAHA, S. S., SETHI, R. P., KENNEDY, J. F., KUMAR, R. Simulation of fermentation conditions for vitamin B12 biosynthesis from whey. Enzyme Microbiol. Technol., v.5, p.449-453, 1983-c.
- MAZUMDER, T. K., NISHIO, N., FUKUSANI, S., NAGAI, S. Production of extracellular vitamin B12 compounds from methanol by *Methanosarcina barkeri*. Appl. Environ. Microbiol., v.26, p.511-516, 1987.
- MOLWITZ, M., SILVA, S. S., RIBEIRO, J. D., ROBERTO, I. C., FELIPE, M. G. A., PRATA, A. M., MANCILHA, I. M. Aspects of the cell growth of *Candida guilliermondii* in sugar cane bagasse hydrolysate. Zeitschrift fur Naturforschung, v.51c, p.404-408, 1996.

- NARITOMI, T., TANIMOTO, Y., YAMAGUSHI, M., OKAMURA, K., MINAMI, K. Effect of glutamate on an extracellular cobalamin production by a thermophilic, methanol-utilizing methanogen *Methanosarcina* sp. CHTI 55. J. Ferment. Bioeng., v.75, n.1, p.73-75, 1993.
- NETO, B. B., SCARMÍNIO, I. S., BRUNS, R. E., Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.
- NISHIO, N., TSUCHIYA, Y., HAYASHI, M., NAGAI, S. A. Fed-batch culture of methanol-utilizing bacteria with pH stat. J.Fement.Technol., v.55, n.2, p.151-155. 1977.
- NOPARATNARAPORN, N., SASAKI, K., NISHIZAWA, Y., NAGAI, S. Stimulation of vitamin B12 formation in aerobically-grown *Rhodospseudomonas gelatinosa* under microaerobic conditions. Biotechnol.Lett., v.8, n.7, p.491-496, 1986.
- PÉRES-MENDOZA, J. L. e GARCÍA-HERNANDEZ, F. Fermentation of a waste-product from the industrial processing of the lime (*Citrus aurantifolia* swingle) for vitamin B12 production. Biotechnol.Lett., v.5, n.4, p.259-264, 1983.
- PERLMAN, D. Microbial synthesis of cobamides. Adv.ApplMicrobiol., v.1, p.87-122, 1959.
- PIRT, S. J. Principles of microbe and cell cultivation, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1985.
- PRATT, J. M. Inorganic chemistry of vitamin B12, London, New York: Academic Press, 1972.
- QUESADA-CHANTO, A., AFSHAR, A. S., WAGNER, F. Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar. Appl.Environ.Biotechnol., v.41, p.378-383, 1994-a.

- QUESADA-CHANTO, A., AFSHAR, A. S., WAGNER, F. Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. Appl.Microbiol.Biotechnol., v.42, p.16-21, 1994-b.
- QUESADA-CHANTO, A., SCHROEDER, A., SCHIMIDT-MEYER, A., LÓPEZ, J. A., LÓPEZ, J. A., SILVEIRA, M., JONAS. S. Organics acids production by *Propionibacterium shermanii*: Effect of pH, temperature and vitamin-nitrogen source. Z. Naturforsch., v.42c, p.193-196, 1997.
- QUESADA-CHANTO, A, DA COSTA, J. P. L. C., SILVEIRA, M. M., SCHROEDER, A. G., SCHIMID-MEYER, A. C., JONAS, R. Influence of different vitamin-nitrogen sources on cell growth and propionic acid production from sucrose by *Propionibacterium shermanii*. Acta Biotechnol., v.3, p.267-274, 1998.
- RO, S. L., WOODBURN, M., SANDINE, W. E. Vitamin B12 and ascorbic acid in kinchi inoculated with *Propionibacterium freudenreichii* ss. *shermanii*. J.Food Science, v.44, p.873-877, 1979.
- ROCHE. Vitamina B12. Compendio de Vitaminas, Suíça, p.110-115, 1972.
- RODRIGUES, M. I., Modelagem simulação e controle de um processo contínuo de purificação de enzimas, Tese de Doutorado: FEA, Unicamp, 1993.
- RUDKIN, G. O. e TAYLOR, R. J. Chemical method for determining vitamin B12. Anal.Chem., v.24, p.1155-1156, 1952.
- SASAKI, K. e NAGAI, S. The optimum pH and temperature for the aerobic growth of *Rhodospseudomonas gelatinosa*, and vitamin B12 and ubiquinon formation on astarch medium. J.Ferment.Technol., v.57, n.5, p.383-386, 1986.

- SASAKI, K., NOPARATNARAPORN, N., HAYASHI, M., NISHIZAWA, Y., NAGAI, S. Single-cell protein production by treatment of soybean wastes with *Rhodopseudomonas gelatinosai*. J.Ferment.Technol., v.59, n.6, p.471-477, 1981.
- SILVEIRA, R. G., NISHIDA, Y., NISHIO, N., NAGAI, S. Corrinoid production by *Methanosarcina barkeri* in a repeated fed-batch reactor with membrana module. Biotechnol. Lett., v.21, n.10, p.721-726, 1990.
- SPALLA, C., GREIN, A., GAROFANO, L., FERNI, G. Vitamin B12. In: VANDAMME, E. J. (ed.). Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, London and New York: Elsevier Applied Science, p.257-284, 1989.
- TYLER, V. E., BRADY, L. R., ROBBERS, J. E. Pharmacognosy, Lea & Febiger, Philadelphia, 9 Ed., 1988.
- VANDAMME, E. J. Vitamins and related compounds via microorganisms: a biotechnological view. In: VANDAMME,E.J. (ed.). Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, London and New York: Elsevier Applied Science, p.1-11, 1989.
- VANDAMME, E. J. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnology process. J.Chem.Technol.Biotechnol., n.53, p.313-327, 1992.
- YE, K., SHIJO, M., JIN, S., SHIMIZU, K. Efficient production of vitamin B12 from Propionic Acid Bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration. J. Ferm. Bioeng., v.82, n.5, p.484-491, 1996.
- YONGFU, L. A., STAMFORD, N. P. J., BATTERSBY, A. R. Proof that acetic acid is extruded during biosynthesis of vitamin B12 in *Pseudomonas denitrificans*. J. Chem. Society, v.1, n.4, p.283-284, 1995.

YONGSMITH, B. e APIRAKTIVONGSE, P., Vitamin B12 production from soybean and whey with *Propionibacterium freudenreichii*. J. Ferment. Technol., v.61, n.1, p.105-107, 1983.

Apêndice A

Experimentos em Frascos Agitados

Tabela A1 – Seleção de Mutantes

Microrganismo: *Pseudomonas sp* (microrganismo original)

Fermentação: 1 **Substrato:** sacarose

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
0,68		3,2		20,1		

Tabela A2 – Seleção de Mutantes

Microrganismo: *PseudomonasPI* (Mutante)

Fermentação: 2 **Substrato:** sacarose

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
2,50		4,8		58,7		

Tabela A3 – Seleção de Mutantes

Microorganismo: *Pseudomonas P2* (Mutante)

Fermentação: 3 Substrato: sacarose

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
2,85		3,7		34,2		

Tabela A4 – Seleção de Mutantes

Microorganismo: *Pseudomonas P3* (Mutante)

Fermentação: 4 Substrato: sacarose

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,86		6,1		61,4		

Tabela A5 – Seleção de Mutantes

Microorganismo: *Pseudomonas sp*

Fermentação: 5 Substrato: lactose

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
Não Detectável		1,8		9,2		

Tabela A6 – Seleção de Mutantes**Microrganismo:** *Pseudomonas P1***Fermentação:** 6 **Substrato:** lactose

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
Não Detectável		1,9		9,5		

Tabela A7 – Seleção de Mutantes**Microrganismo:** *Pseudomonas P2***Fermentação:** 7 **Substrato:** lactose

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
0,95		1,7		10,3		

Tabela A8 – Seleção de Mutantes**Microrganismo:** *Pseudomonas P3***Fermentação:** 8 **Substrato:** lactose

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,40		1,5		19,2		

Tabela A9 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato**Microrganismo:** *Pseudomonas P3***Fermentação:** 9**Substrato e Meio:** sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,86		6,1		81,4		

Tabela A10 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato**Microrganismo:** *Pseudomonas P3***Fermentação:** 10**Substrato e Meio:** lactose – meio 4

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,40		1,5		19,2		

Tabela A11 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato**Microrganismo:** *Pseudomonas P3***Fermentação:** 11**Substrato e Meio:** sacarose – meio 3

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
2,90		3,9		32,8		

Tabela A12 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 12

Substrato e Meio: lactose – meio 3

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,03		1,1		13,7		

Tabela A13 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Propionibacterium freudenreichii*

Fermentação: 13

Substrato: sacarose – meio 2

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,70		1,08		3,0		

Tabela A14 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Propionibacterium jensenii*

Fermentação: 14

Substrato: sacarose – meio 2

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
2,93		4,28		26,8		

Tabela A15 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Propionibacterium shermanii*

Fermentação: 15 Substrato: sacarose – meio 2

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
0,83		0,56		1,3		

Tabela A16 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Propionibacterium freudenreichii*

Fermentação: 16 Substrato: lactose – meio 2

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
2,08		4,51		33,6		

Tabela A17 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Propionibacterium jensenii*

Fermentação: 17 Substrato: lactose – meio 2

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
2,02		1,72		25,5		

Tabela A18 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Propionibacterium shermanii*

Fermentação: 18

Substrato: lactose – meio 2

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,73		0,80		16,9		

Tabela A19 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Propionibacterium freudenreichii*

Fermentação: 19

Substrato: sacarose – meio 3

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,29		1,60		3,8		

Tabela A20 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microorganismo: *Propionibacterium jensenii*

Fermentação: 20

Substrato: sacarose – meio 3

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,98		1,84		10,2		

Tabela A21 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microrganismo: *Propionibacterium shermanii*

Fermentação: 21 **Substrato:** sacarose – meio 3

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
0,97		0,79		2,1		

Tabela A22 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microrganismo: *Propionibacterium freudenreichii*

Fermentação: 22 **Substrato:** lactose – meio 3

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
2,14		5,57		36,3		

Tabela A23 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato

Microrganismo: *Propionibacterium jensenii*

Fermentação: 23 **Substrato:** lactose – meio 3

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,72		1,30		14,5		

Tabela A24 – Seleção de Meio de Cultura e Substrato**Microrganismo:** *Propionibacterium shermanii***Fermentação:** 24**Substrato:** lactose – meio 3

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,5	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
1,38		0,99		10,2		

Tabela A25 – Planejamento Fatorial Fracionário 2⁷⁻³**Microrganismo:** *Pseudomonas P3***Fermentação:** 25**Substrato e Meio:** sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
48	96	29	7,0	9	25,0	10,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,22		4,1		39,7		

Tabela A26 – Planejamento Fatorial Fracionário 2⁷⁻³**Microrganismo:** *Pseudomonas P3***Fermentação:** 26**Substrato e Meio:** sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	29	7,0	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,75		2,9		28,9		

Tabela A27 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 27

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
48	120	29	7,0	10	50,0	10,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,95		4,0		32,6		

Tabela A28 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 28

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,0	9	50,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,92		3,1		15,7		

Tabela A29 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 29

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
48	96	32	7,0	10	50,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
6,84		6,4		73,5		

Tabela A30 – Planejamento Fatorial Fracionário 2⁷⁻³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 30

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	32	7,0	9	50,0	10,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
6,59		6,6		55,7		

Tabela A31 – Planejamento Fatorial Fracionário 2⁷⁻³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 31

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
48	120	32	7,0	9	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
4,67		4,4		58,3		

Tabela A32 – Planejamento Fatorial Fracionário 2⁷⁻³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 32

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	32	7,0	10	25,0	10,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
4,69		5,6		53,9		

Tabela A33 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 33

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
48	96	29	7,4	9	50,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,88		4,0		37,8		

Tabela A34 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 34

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	29	7,4	10	50,0	10,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,85		4,1		23,1		

Tabela A35 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 35

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
48	120	29	7,4	10	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,28		4,5		32,9		

Tabela A36 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 36

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	29	7,4	9	25,0	10,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,49		2,7		11,2		

Tabela A37 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 37

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
48	96	32	7,4	10	25,0	10,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
2,96		2,2		28,3		

Tabela A38 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 38

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	32	7,4	9	25,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,12		2,0		23,7		

Tabela A39 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 39

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
48	120	32	7,4	9	50,0	10,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
4,64		3,3		41,3		

Tabela A40 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{7-3} Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 40

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	120	32	7,4	10	50,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
4,83		4,1		33,7		

Tabela A41 – Planejamento Fatorial Completo 2^3 Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 41

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	33	6,8	10	55,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,12		5,0		59,2		

Tabela A42 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 42

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	35	6,8	10	55,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
4,12		6,8		94,5		

Tabela A43 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 43

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	33	7,3	10	55,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,94		4,7		43,9		

Tabela A44 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 44

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	35	7,3	10	55,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
4,18		5,3		52,3		

Tabela A45 – Planejamento Fatorial Completo 2³

Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 45 **Substrato e Meio:** sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	33	6,8	10	70,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
5,05		5,8		92,0		

Tabela A46 – Planejamento Fatorial Completo 2³

Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 46 **Substrato e Meio:** sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	35	6,8	10	70,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
6,50		5,5		72,0		

Tabela A47 – Planejamento Fatorial Completo 2³

Microrganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 47 **Substrato e Meio:** sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	33	7,2	10	70,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
6,14		4,8		94,2		

Tabela A48 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 48

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	35	7,2	10	70,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
7,48		5,0		85,7		

Tabela A49 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 49

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	34	7,0	10	62,5	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
6,52		3,0		71,2		

Tabela A50 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 50

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	34	7,0	10	62,5	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
6,01		4,5		55,2		

Tabela A51 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 51

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	34	7,0	10	62,5	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
6,18		5,5		83,5		

Tabela A52 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 52

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	32	7,0	10	62,5	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,60		6,5		46,3		

Tabela A53 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 53

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	36	7,0	10	62,5	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
5,15		5,7		58,2		

Tabela A54 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 54

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	34	6,6	10	62,5	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
5,62		4,9		84,7		

Tabela A55 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 55

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	34	7,4	10	62,5	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
6,25		4,2		77,7		

Tabela A56 – Planejamento Fatorial Completo 2³Microorganismo: *Pseudomonas P3*

Fermentação: 56

Substrato e Meio: sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	pH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg/l)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	34	7,0	10	50,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
3,98		2,8		78,8		

Tabela A57 – Planejamento Fatorial Completo 2³**Microrganismo:** *Pseudomonas p3***Fermentação:** 57**Substrato e Meio:** sacarose – meio 1

Condições Experimentais						
Idade do Inóculo (h)	Tempo de Fermentação (h)	Temperatura (°C)	PH	Conc. de Substrato (%)	Conc. de 5,6 DMI (mg)	Conc. de Cobalto (mg/l)
72	96	34	7,0	10	75,0	20,0
Resultados Obtidos						
Rendimento Vit. B12 (mg/l)		Concent. Celular (g/l)		Consumo Substrato (g/l)		
7,85		7,9		87,5		

Apêndice B

$$\text{Conc. Cel. (g/l)} = 0,739568387 \cdot (\text{Abs}) - 0,018889612$$
$$R = 0,998$$

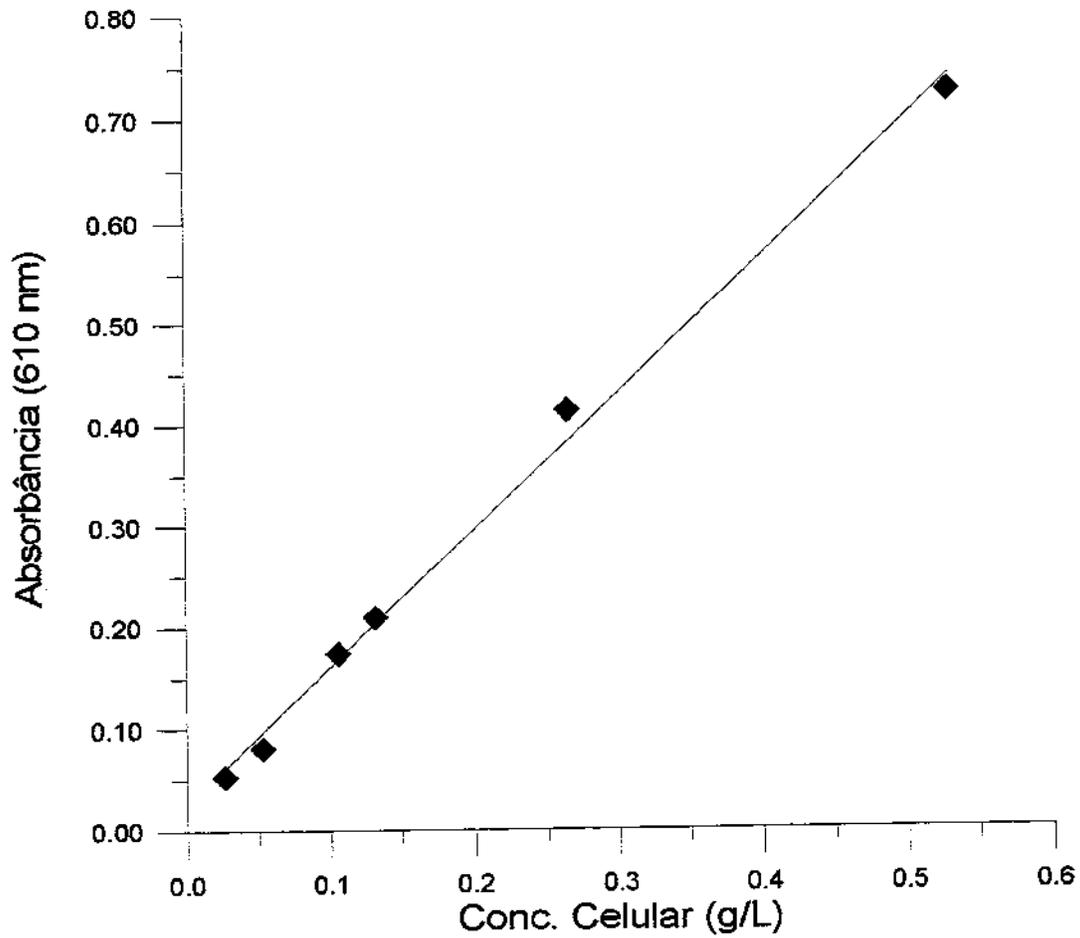


Figura B1 – Concentração Celular versus Absorbância para *Pseudomonas sp.*

$$\text{Conc. Cel. (g/l)} = 0,954663051(\text{Abs}) - 0,000989584$$
$$R = 0,993$$

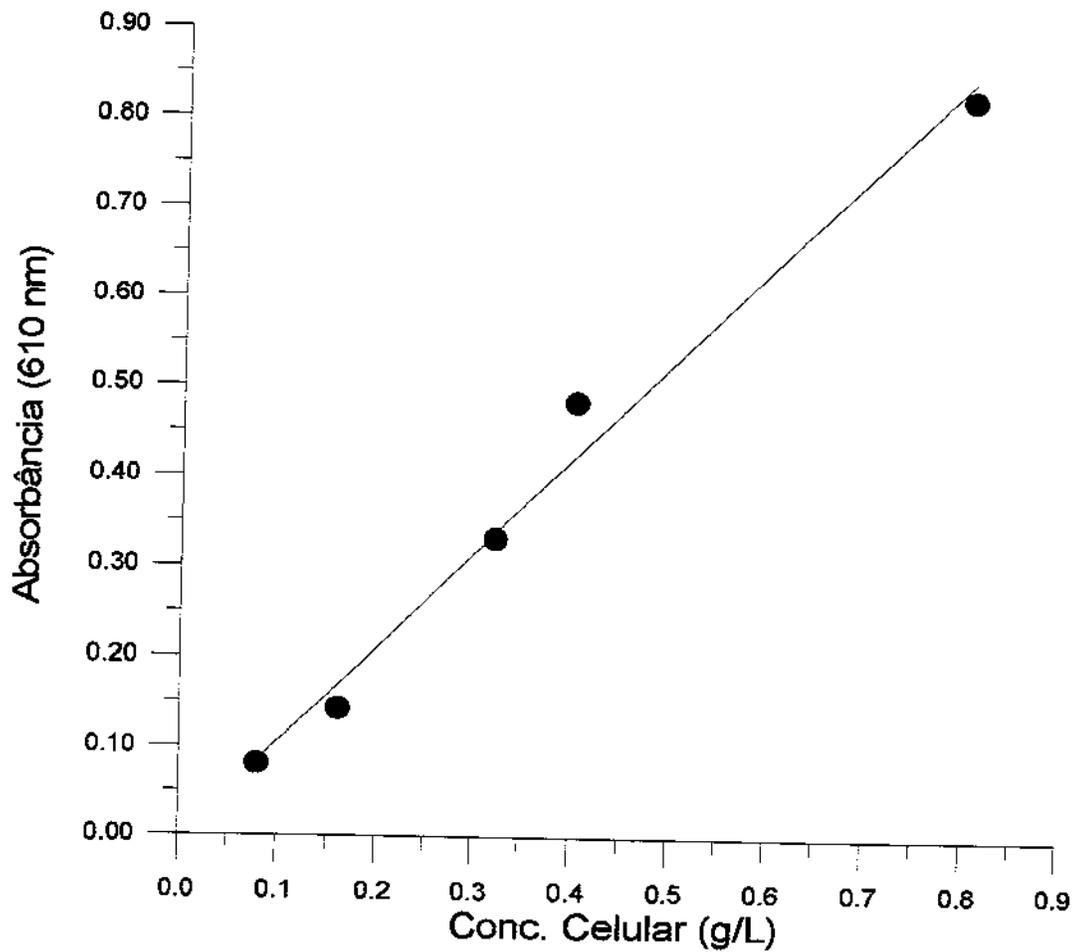


Figura B2 – Concentração Celular versus Absorbância para Mutante *Pseudomonas P3*.

$$\text{Conc. Cel. (g/l)} = 1.39391084 \cdot (\text{Abs}) - 0,069420662$$

$$R = 0,989$$

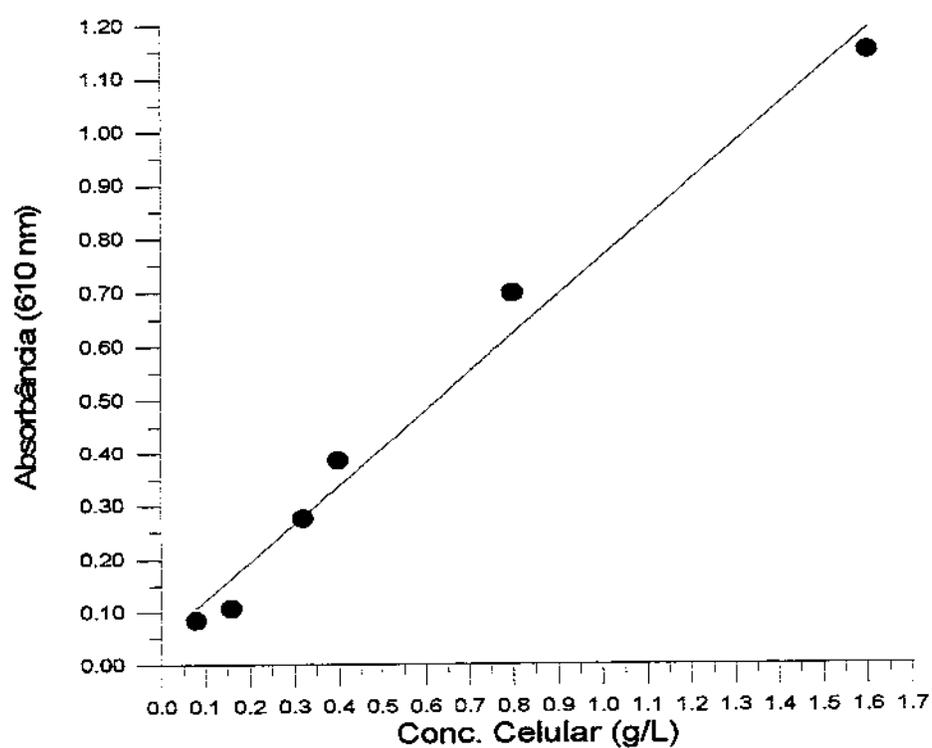


Figura B3 – Concentração Celular versus Absorbância para Mutante *Pseudomonas P2*.

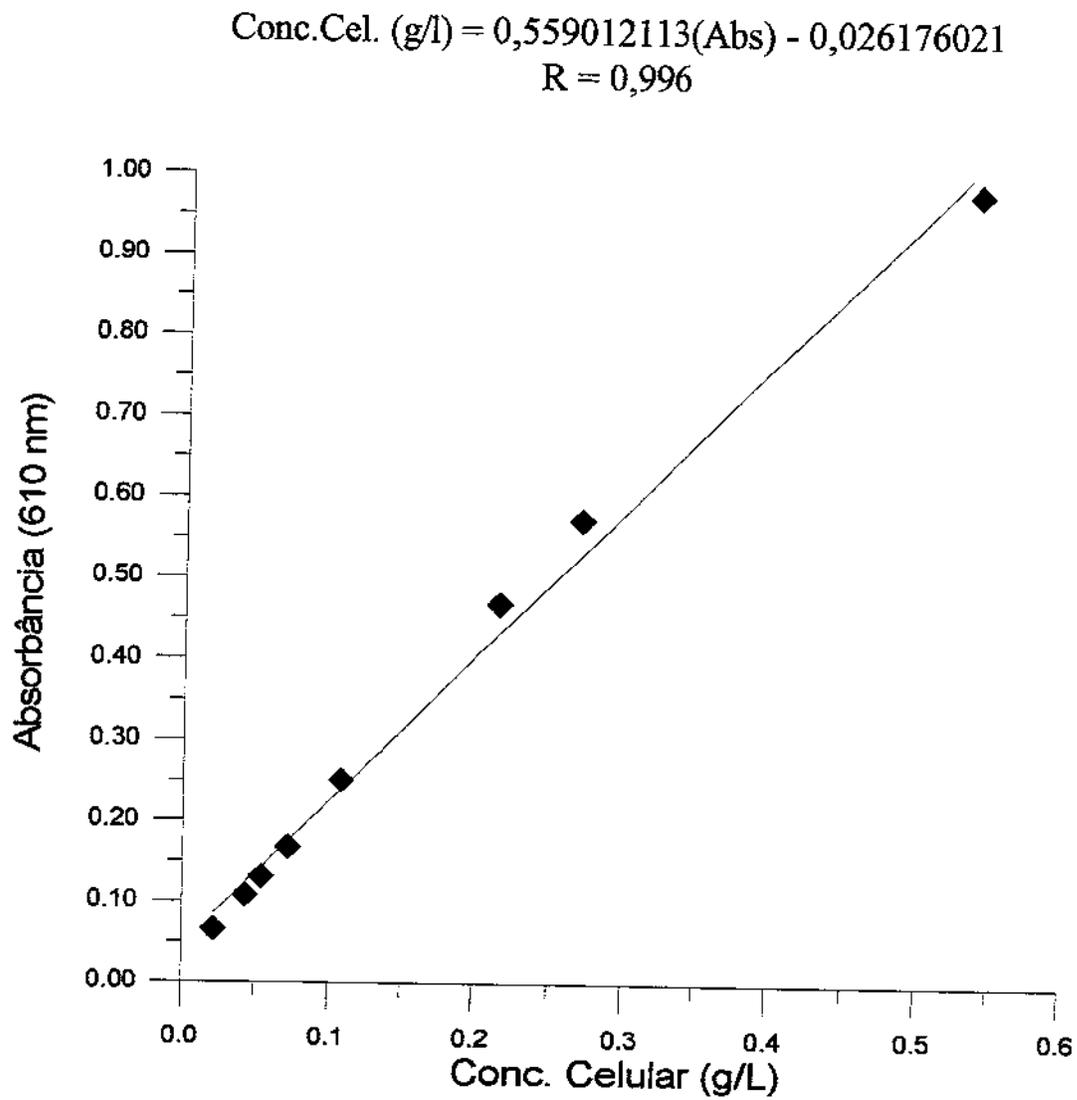


Figura B4 – Concentração Celular versus Absorbância para *Propionibacterium freudenreichii*

$$\text{Conc. Cel. (g/l)} = 1,391151442(\text{Abs}) - 0,015820452$$

$$R = 0,999$$

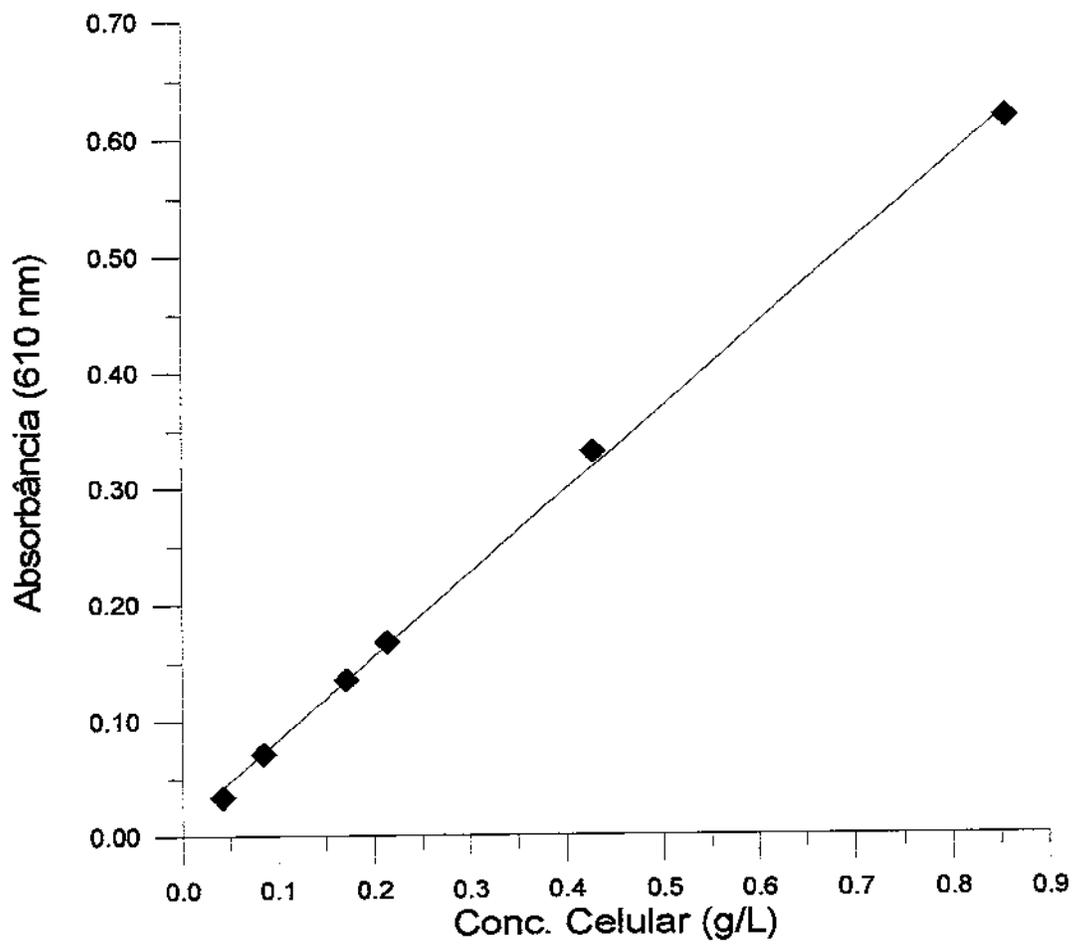


Figura B5 – Concentração Celular versus Absorbância para *Propionibacterium jensenii*

$$\text{Conc. Cel. (g/l)} = 0,470692341(\text{Abs}) - 0,008465401$$

$$R = 0,998$$

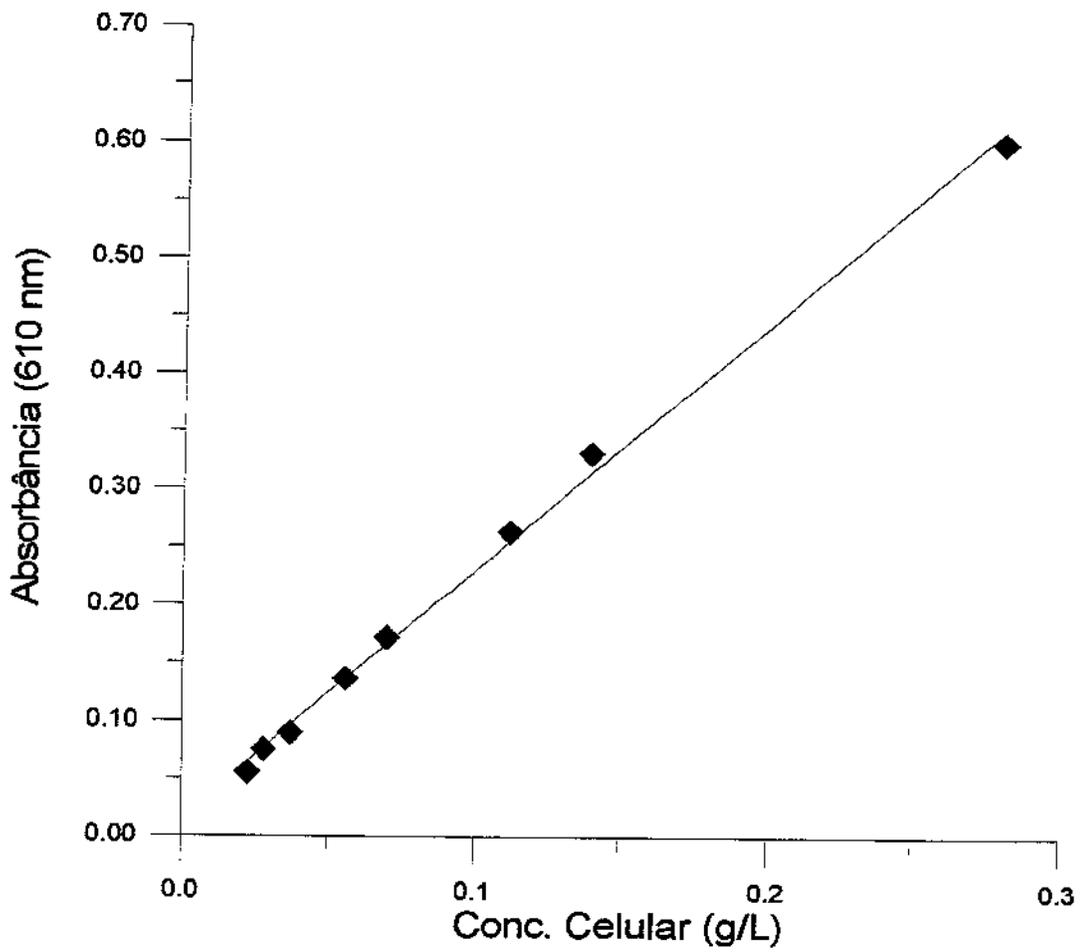


Figura B6 – Concentração Celular versus Absorbância para *Propionibacterium shermanii*

$$\text{Vitamina B12 (mg/l)} = 0,52165 \cdot (\text{Abs}) - 0,0219936$$
$$R = 0.981$$

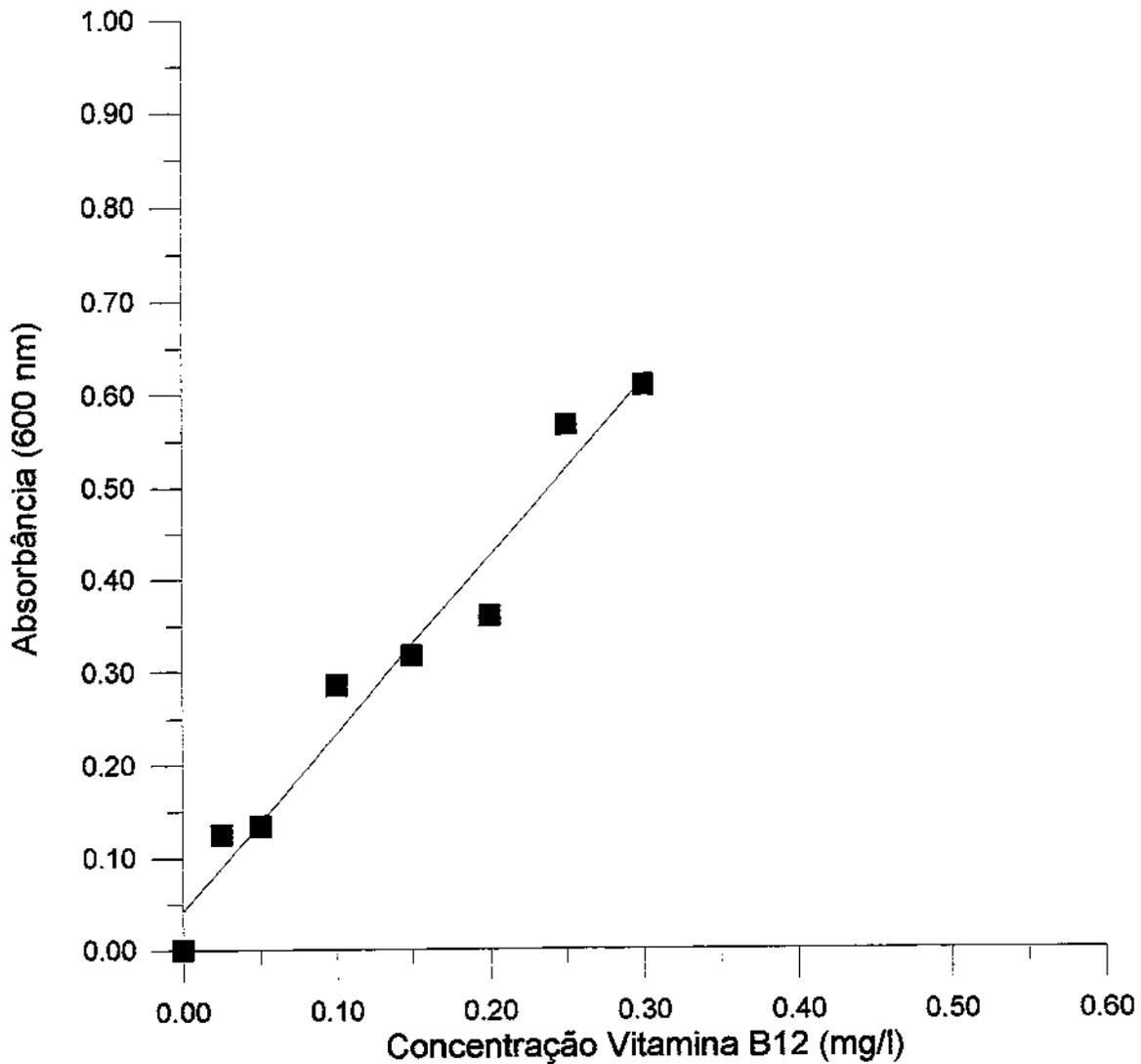


Figura B7 – Concentração Vitamina B12 versus Absorbância para Determinação de Vitamina pelo Método Microbiológico Utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* ATCC 7830

$$Y = -34,4748.X + 54,2703$$

$$R = 0,975$$

$$qO_2.X = 34,4748$$

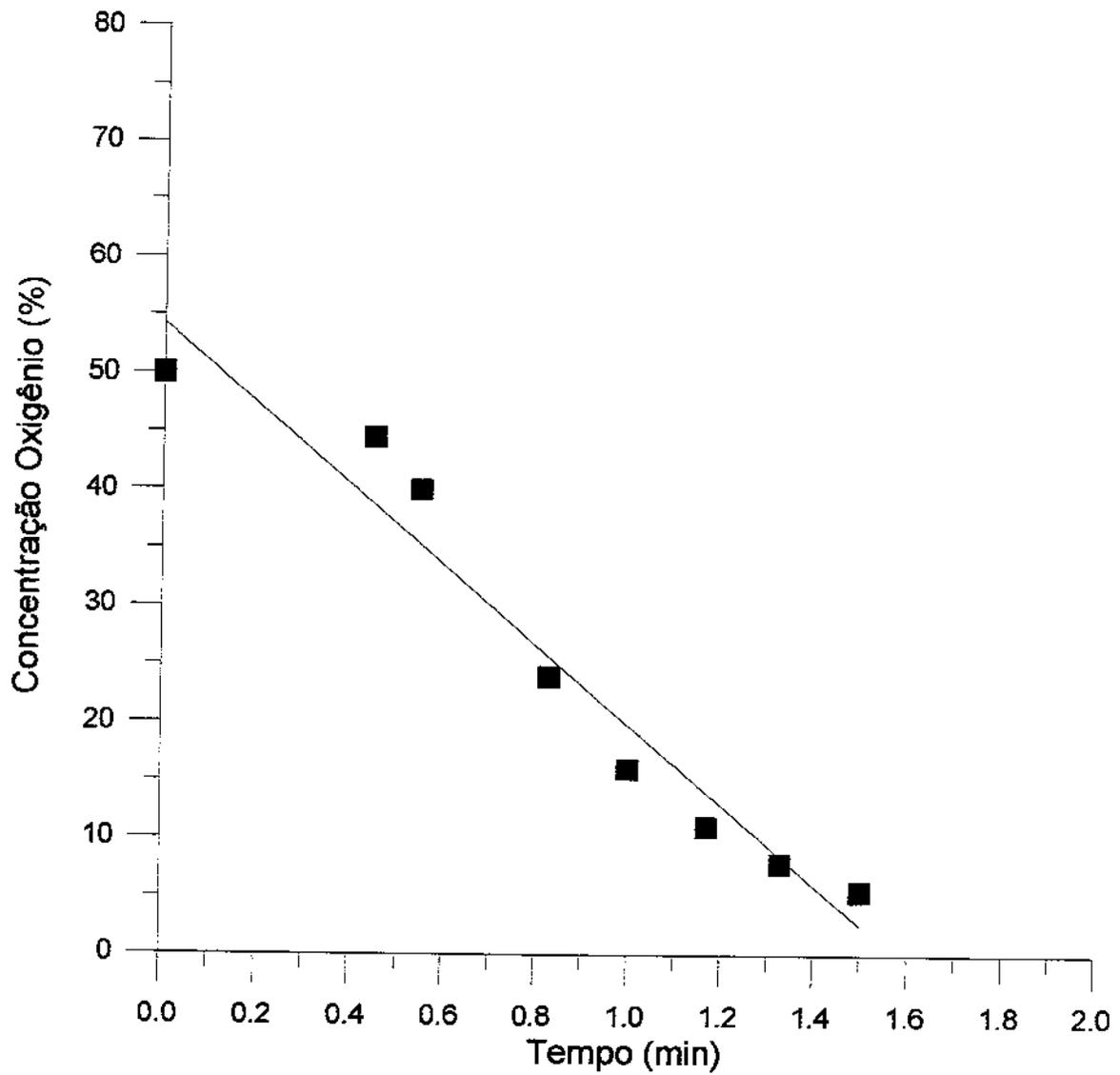


Figura B8 – Concentração Oxigênio versus Tempo para Obtenção do Coeficiente de Respiração ($qO_2.X$) na Determinação do K_La com $pO_2 = 20\%$

$$C_L = -3,44021 + 8,04255.t - 0,515045.t^2 + 0,0147779.t^3 - 0,000153541.t^4$$

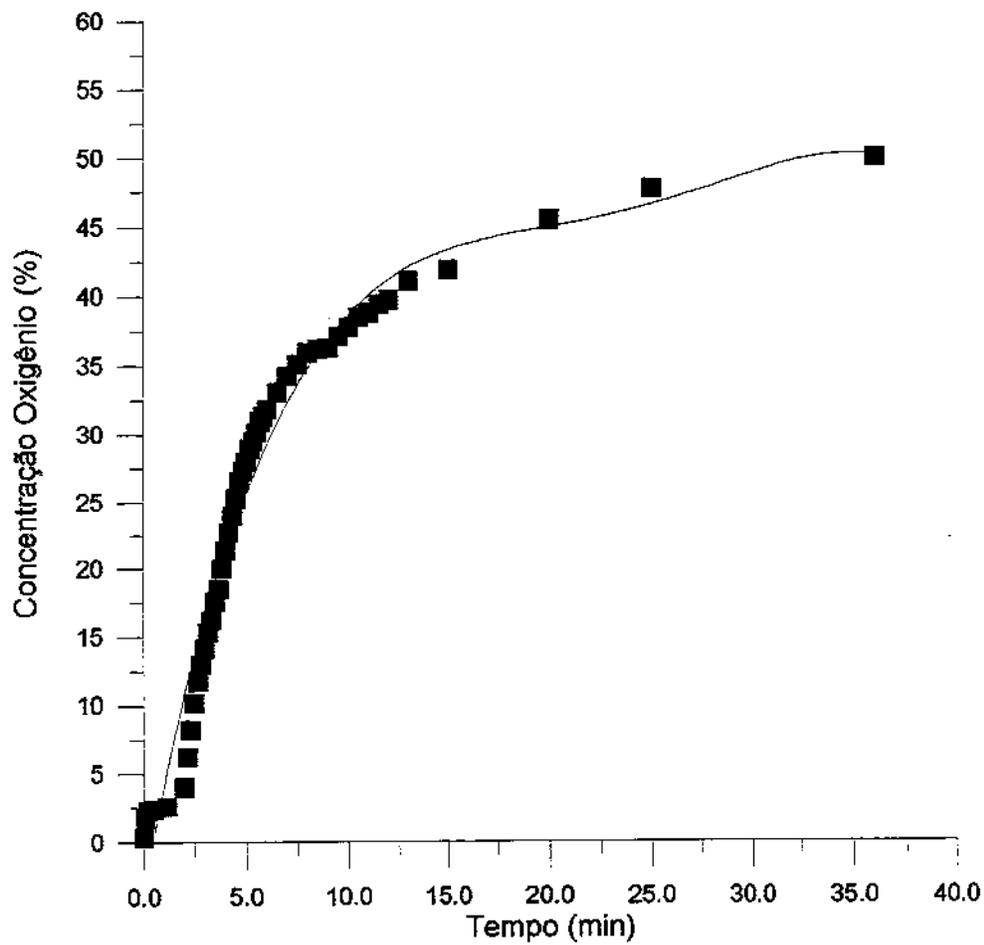


Figura B9 – Concentração Oxigênio versus Tempo para Obtenção da Equação para Concentração de Oxigênio na Determinação do $K_L a$ com $pO_2 = 20\%$

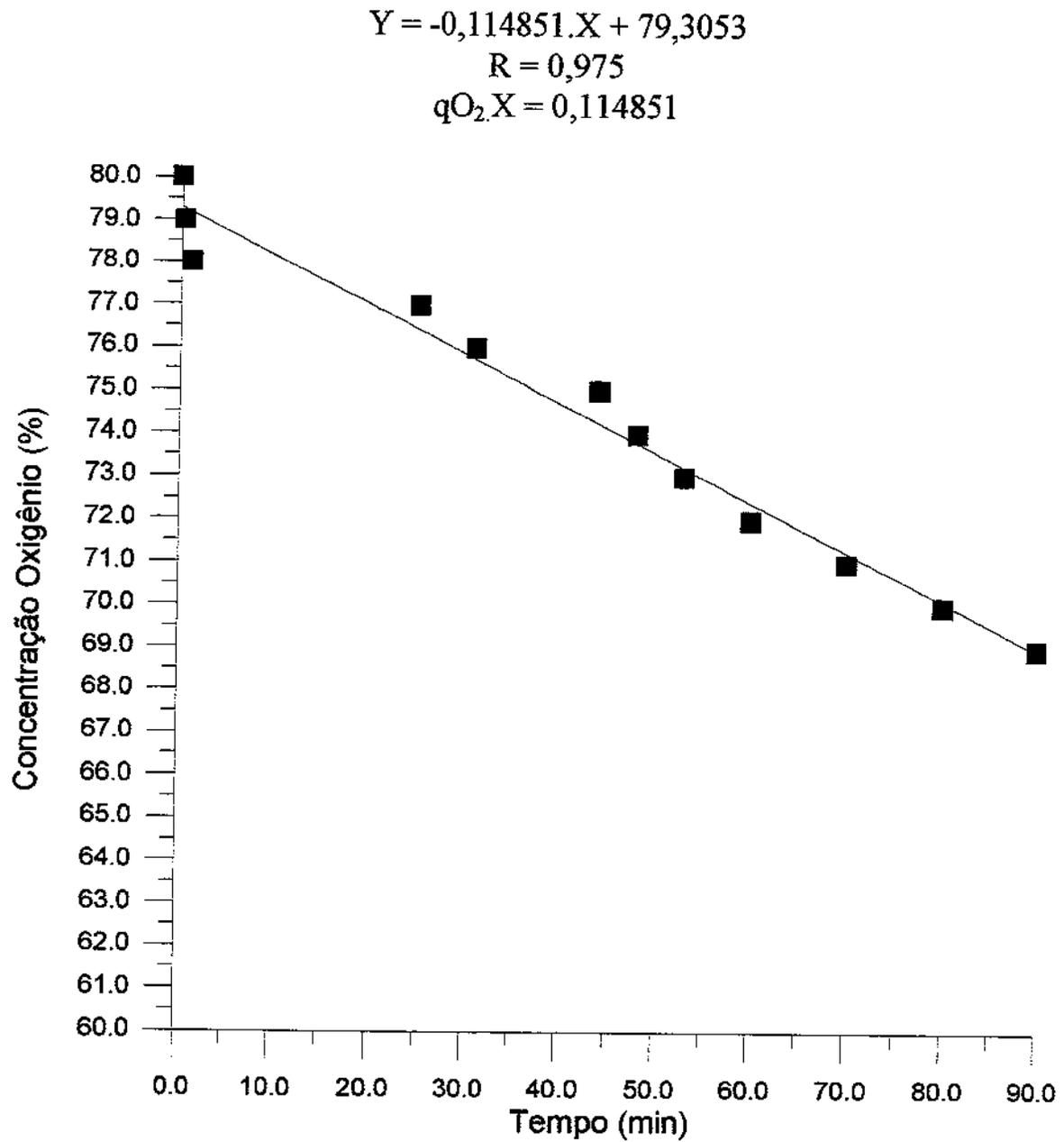


Figura B10 – Concentração Oxigênio versus Tempo para Obtenção do Coeficiente de Respiração ($qO_2.X$) na Determinação do K_La com $pO_2 = 80\%$

$$C_L = 69,026 + 0,273668.t - 0,00264.t^2 + 0,000008927.t^3$$

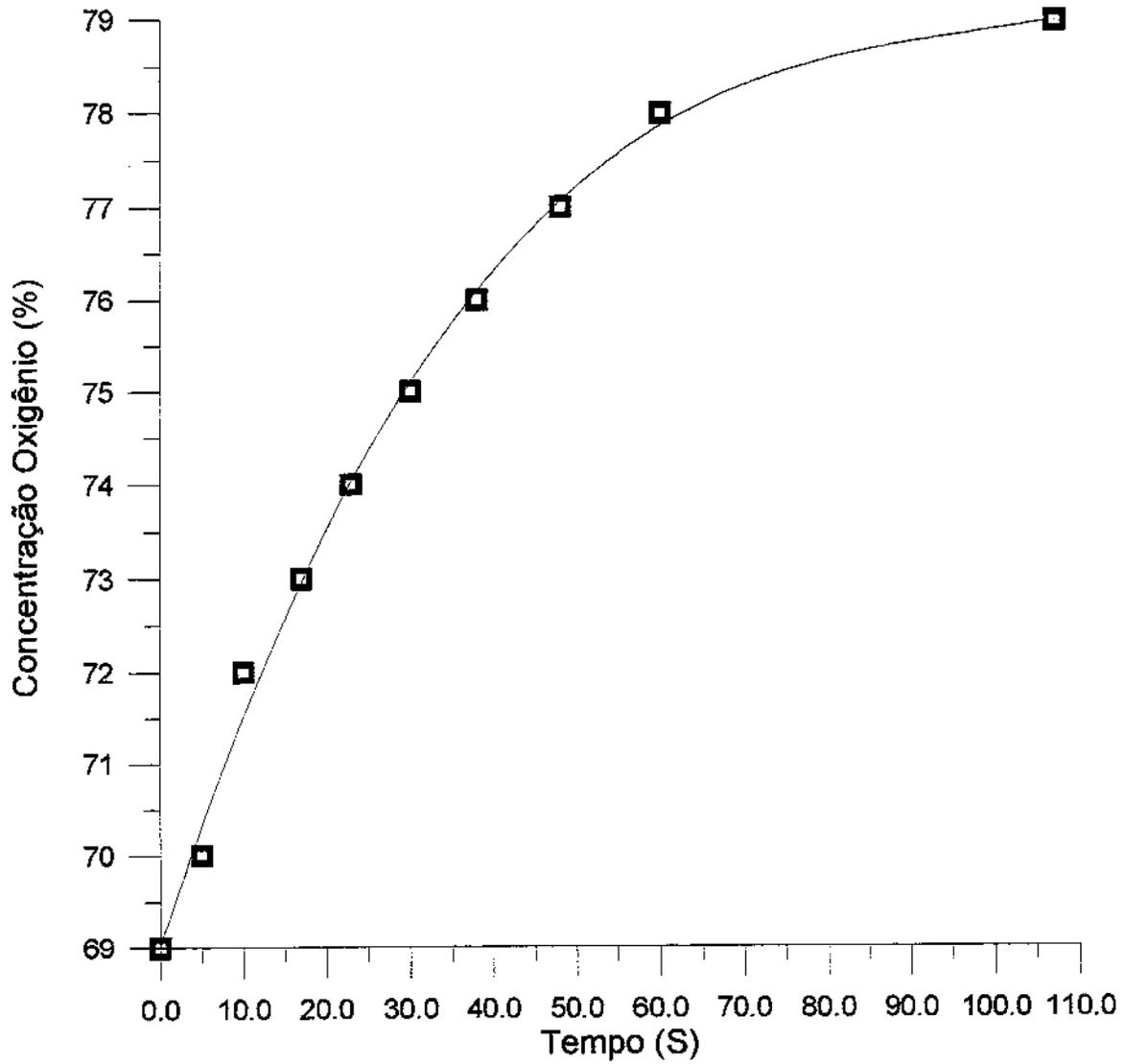


Figura B11 – Concentração Oxigênio versus Tempo para Obtenção da Equação para Concentração de Oxigênio na Determinação do $K_L a$ com $pO_2 = 80\%$

$$\text{Conc. Celular (g/l)} = 1,02682 (\text{ABS}) + 0,01152$$
$$R = 0,997$$

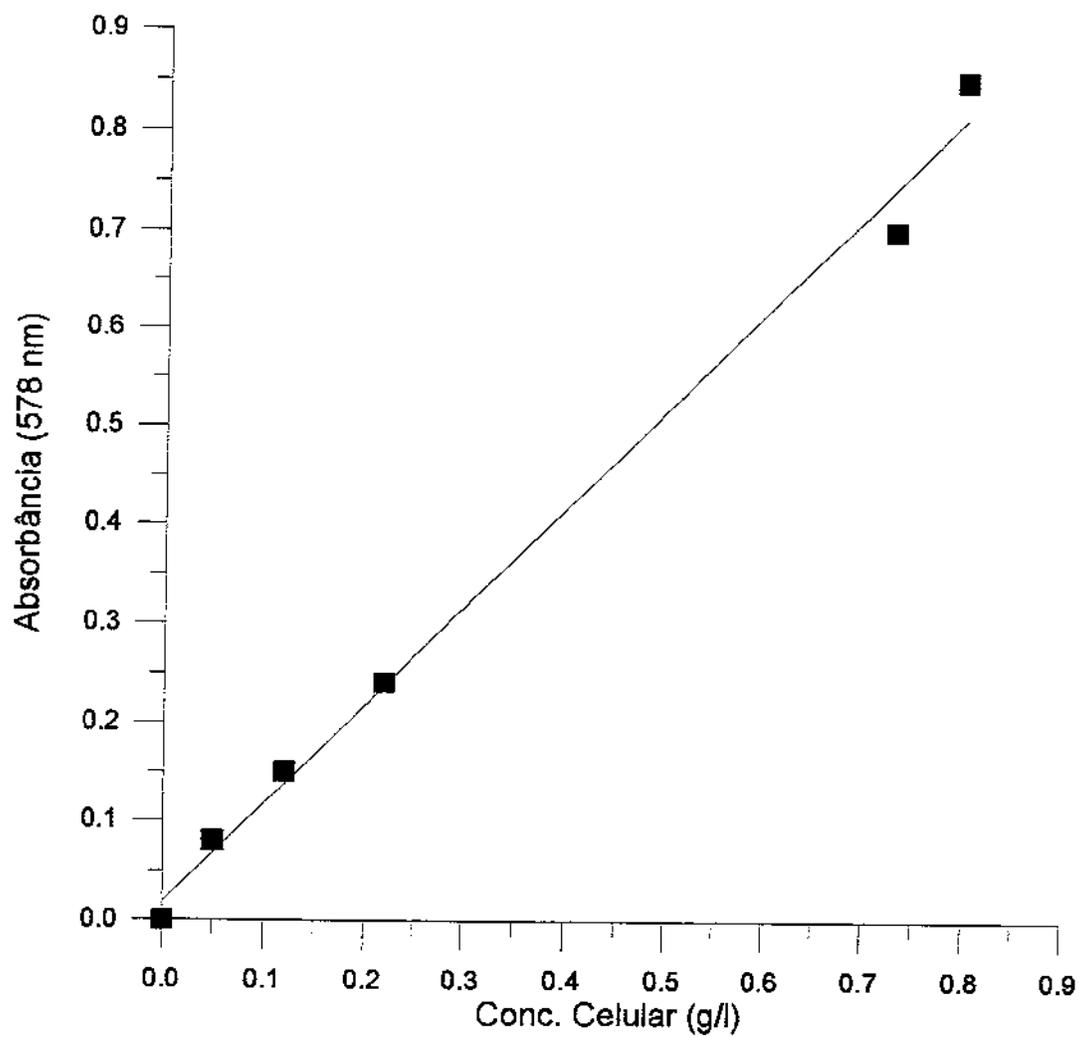


Figura B12 – Concentração Celular versus Absorbância para *Pseudomonas P1*.