

SÍNTESE BIOCATALÍTICA DO SORBITOL E ÁCIDO LACTOBIONI
COM SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA POR ELETRODIÁLISE

João Baptista Severo Júnior

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D. Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D. Sc.

Prof^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Prof. Márcio Nele de Souza, D. Sc.

Dr. Ronaldo Nobrega, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2008

SEVERO JÚNIOR, JOÃO BAPTISTA

Síntese biocatalítica do sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea por eletrodialise [Rio de Janeiro] 2008

XXIII, 133 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M. Sc., Engenharia Química, 2008)

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Separação de Ácido Lactobiônico por Eletrodialise
2. Sorbitol
3. *Zymomonas mobilis*
4. Células imobilizadas

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

A minha mãe

“Há momentos em que a maior sabedoria é parecer não saber nada”

(Sun Tzu)

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, Deus, pela vida, saúde física e mental.

Agradeço ao meu orientador Tito Lívio, por ter me recebido de braços abertos em Aracaju durante o meu estágio no ITP/UNIT, e por me ajudar a tornar realidade o meu sonho de vir estudar aqui no PEQ. Muito obrigado por ter tido paciência comigo ao longo da tese e também por não termos tido apenas uma relação de aluno e orientador e sim de amigos.

Agradeço a minha orientadora Helen Ferraz pela orientação recebida, bem como pela confiança depositada em mim ao longo da tese. Não poderia deixar de esquecer as injeções de ânimo que recebia quando as coisas davam errado no laboratório, e agradecer também por você sempre me ouvir e me aconselhar nos momentos que em que eu ficava chateado. Agradeço a Luisa também por ter compartilhado a atenção da sua mãe comigo durante as correções da tese.

A todos os meus familiares, especialmente meu primo Cleber por ter sido um grande irmão para mim e me ajudado bastante quando cheguei ao Rio de Janeiro.

Aos meus irmãos, Gabriel e Valério, e especialmente a minha mãe, sei que para ela não foi fácil a minha vinda para o Rio, mas mesmo assim ela sempre me deu apoio para continuar os meus estudos. Agradeço a ela também por ter sido não só para mim, como também para os meus irmãos, um alicerce nas nossas vidas, nos criando, educando e sendo pai e mãe ao mesmo tempo, e um exemplo de mulher batalhadora. Já passamos muitas dificuldades, mas graças a garra dessa super mãe nós conseguimos superar todos os obstáculos. Mãe, tudo que consegui até hoje eu devo à senhora.

Ao Grande Pinto, Prof. José Carlos, por ter me ajudado bastante no decorrer da minha dissertação e por me ensinar uma nova forma pensar e refletir sobre os nossos erros experimentais.

A Candinha, pelo seu jeito de ser, por pegar no meu pé toda hora que fazia alguma coisa errada, além de ser essa pessoa sensata que você é. Ao grande Tigre Herval, pela sua

amizade e por me fazer companhia nos fins de semana e nas madrugadas no laboratório, vocês dois foram os meus “co-orientadores”. Não poderia deixar de esquecer dos sábios conselhos da Indira e pelo jeito tosco de ser da Haryana, que nos fazia rir com a história do “Y”.

A Marcela por todo seu amor e companheirismo, bem como por ter lido toda a minha dissertação, revisando-a e retirando todos os “sendo que”.

A Ana Karla pela sua amizade e pelas nossas conversas no “msn” que vieram a contribuir bastante para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos ensinamentos recebidos ao longo da minha iniciação científica na UFS por Simão, Chico e especialmente ao Prof. Roberto, que sempre esteve presente mesmo distante em todas as etapas deste trabalho, através das nossas conversas pelo “msn” durante os finais de semana.

Aos meus dois grandes amigos aqui do PEQ, Paulo (criador da suzy) e Fabrício (biscate), companheiros de finais de semana e feriados aqui no PEQ.

A Pam Membranas pelo fornecimento das membranas usadas neste trabalho.

Aos demais colegas do PEQ, todo o pessoal do PAM, especialmente a Kátia, Beth, Bob e Luzia, aos colegas do LECC, em especial a Romi, a galera do lar dos Trogloditas, Diego Prata, Marcio Schwab e Kese, ao Zé da Paixão por toda a sua ajuda desde a minha chegada aqui no PEQ.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M. Sc.)

SÍNTESE BIOCATALÍTICA DE SORBITOL E ÁCIDO LACTOBIÔNICO COM SEPARAÇÃO SIMULTÂNEA POR ELETRODIÁLISE

João Baptista Severo Júnior

Março/2008

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Tito Lívio Moitinho Alves

Programa: Engenharia Química

Este trabalho objetivou estudar a produção de sorbitol e ácido lactobiônico utilizando células permeabilizadas e imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, contendo a enzima glicose frutose oxidorreductase, com a separação simultânea do ácido lactobiônico por eletrodiálise.

No presente trabalho, foram avaliados vários meios de cultivo com o objetivo de verificar a influência das células produzidas sobre a taxa específica de reação enzimática de síntese do ácido lactobiônico. Após a escolha do melhor meio, foi feito um planejamento experimental para verificar a influência do pH, da temperatura e das concentrações de células e açúcares sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico. Definidas as melhores condições, foram avaliadas a melhor forma de confinar as células no módulo de fibras ocas e a influência da vazão de circulação dos substratos sobre a taxa de reação específica. As taxas específicas obtidas ficaram entre 0,14 e 2,87 mmol.g_{cél}⁻¹.h⁻¹. Em seguida, foi realizado um planejamento experimental no sistema de eletrodiálise visando definir a melhor condição para a remoção do ácido. Em todos os experimentos, ocorreu uma remoção acima de 95 % do ácido.

O processo integrado, com reação e separação simultânea, apresentou uma taxa de reação 10 vezes maior do que os sistemas que não utilizam a eletrodiálise para a remoção do ácido durante a reação.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

BIOCATALYTICAL SYNTHESIS OF SORBITOL AND LACTOBIONIC ACID
WITH SIMULTANEOUS SEPARATION BY ELECTRODIALYSIS

João Baptista Severo Júnior

March/2008

Advisors: Helen Conceição Ferraz

Tito Lívio Moitinho Alves

Department: Chemical Engineering

This work aimed at studying the production of sorbitol and lactobionic acid utilizing permeabilized and immobilized cells from *Zymomonas mobilis*, which contain the enzyme glucose-fructose-oxidoreductase, and the simultaneous separation of lactobionic acid by electro dialysis.

In the present work several cultivation media were evaluated intending to verify the influence of *Z. mobilis* cells on specific rate of lactobionic acid enzymatic synthesis. After choosing of the best medium, experiments following an experimental design were carried out to evaluate the influence of pH, temperature and cells and sugars concentrations on lactobionic acid specific formation rate. Once the best conditions were defined, it were evaluated the best form to confine the cells in the hollow fiber module and the influence of the substrates circulation flow on the specific reaction rate were evaluated. The specific rates obtained were between 0.14 and 2.87 $\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Afterwards, an experimental design was carried out to define the best condition for removal of lactobionic acid in the electro dialysis system. In all the experiments a removal above 95 % of the acid was observed.

The integrated process, with simultaneous reaction and separation, presented a specific reaction rate 10 times larger than other systems that do not utilize the electro dialysis for the removal of acid during the reaction.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xxi
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 – Propriedades e Aplicações do Sorbitol e Ácido Lactobiônico	05
2.2 – Métodos Convencionais de Produção do Sorbitol e Ácido Lactobiônico	07
2.3 – A Bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	09
2.3.1 – Características Gerais	10
2.3.2 – Metabolismo dos açúcares	11
2.4 – Processos Empregando <i>Zymomonas mobilis</i>	15
2.4.1 - As Enzimas Glicose-Frutose Oxidorredutase e Glicono- δ -lactonase de <i>Zymomonas mobilis</i>	15
2.4.2 - Permeabilização Celular	23
2.4.3 – Imobilização Celular	26
2.4.4 – Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico por Células Permeabilizadas e Imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>	28
2.5 – Processos de separação	32
2.5.1 – Eletrodialise	32
2.5.2 – Membranas de Troca Iônica	34
2.5.3 – Aplicações	36
3 – METODOLOGIA	40
3.1 – Microorganismo e Manutenção	40
3.2 – Cultivo	41
3.3 – Permeabilização Celular	43
3.4 – Metodologia Analítica	43
3.4.1 – Concentração Celular	43
3.4.2 – Concentração dos Substratos e Produtos	44
3.5 – Confinamento das Células em Membranas de Fibras Ocas	45

3.6 – Unidade de Eletrodiálise	46
3.7 – Estudos Cinéticos	48
3.7.1 – Células Livres	48
3.7.2 – Células Confinadas no Módulo de Fibras Ocas	49
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 – Quantificação da Lactose	52
4.2 – Avaliação dos Meios de Cultivo	54
4.2.1 – Determinação das Taxas Específicas Médias de Reação	54
4.2.2 – Avaliação da Repetitividade dos Experimentos	61
4.2.3 – Avaliação da Reprodutibilidade dos Experimentos	67
4.2.4 – Análise das Curvas de Crescimento	74
4.3 – Planejamento Experimental – Células Livres	76
4.3.1 – Obtenção do Modelo Empírico	76
4.3.2 – Novos Experimentos para Avaliação do Modelo Empírico	84
4.4 – Confinamento das Células em Membranas de Fibras Ocas	89
4.5 – Separação por Eletrodiálise	93
4.6 – Integração do Processo	106
5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	114
APÊNDICE A	118
APÊNDICE B	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1 – Estrutura do sorbitol e ácido lactobiônico. 06
- Figura 2.2 - Rota metabólica empregada pela *Zymomonas mobilis* no metabolismo da sacarose (FONSECA, 2003). 14
- Figura 2.3 – Digrama de “ribbon” da enzima tetramérica GFOR, onde as partes brancas representam o NADP ligado a GFOR, e cada subunidade está representada por uma cor diferente (KINGSTON *et al.*, 1996). 16
- Figura 2.4 – Influência do pH sobre a atividade enzimática da GFOR tendo como substratos glicose (0,4 M) e frutose (0,8 M) (ZACHARIOU e SCOPES, 1986). 16
- Figura 2.5 – Representação do mecanismo de ação da GFOR sobre os compostos na forma em que eles são metabolizados (HARDMAN e SCOPES, 1988). 18
- Figura 2.6 – Modelo para o processo de inativação da GFOR. N é a enzima ativa, N* é o complexo enzima-lactona, com mudanças conformacionais, N'ox e N'(ox)4 são os intermediários com 1 e 4 resíduos cisteína expostos, respectivamente, que ainda retém atividade enzimática (FURLINGER *et al.*, 1998). 22
- Figura 2.7 – Apresentação esquemática do envelope celular da bactéria Gram-negativa. A – membrana externa; BP – proteína de ligação; C – proteína embutida na membrana citoplasmática; LP – lipoproteína; LPS – lipopolissacarídeo; PP – porina; PPS – espaço periplásmico (SIKKEMA *et al.*, 1995). 23
- Figura 2.8 - Rota empregada pela *Zymomonas mobilis* na produção de sorbitol e ácido glicônico, usando as enzimas GFOR e GL, e a posterior conversão do ácido glicônico a etanol (FERRAZ, 1999). 25
- Figura 2.9 – Microfotografia eletrônica de transmissão da bactéria *Zymomonas*

<i>mobilis</i> antes da permeabilização (a) e depois da permeabilização (b) (WILBERG <i>et al.</i> , 1997).	26
Figura 2.10 – Esquema ilustrando o princípio da eletrodialise.	33
Figura 2.11 – Eletrodialisador utilizando um esquema de célula tipo placa-quadro (STRATHMANN, 1995).	34
Figura 2.12 – Membrana catiônica com grupos carboxílicos fixados na matriz polimérica, sendo permeável a cátions como o sódio e impermeável a ânions como os cloretos (BAKER, 2004).	36
Figura 2.13 - Disposição de uma unidade de eletrodialise contendo uma membrana bipolar para a produção de ácido e base a partir do sal correspondente (FERRAZ, 1999).	38
Figura 3.1 – Esquema de preparo de inóculo e cultivo: (a) procedimento utilizado para os meios contendo 100 g/L de glicose, (b) procedimento utilizado para os meios contendo 150 g/L de glicose.	42
Figura 3.2 – Diagrama para avaliação da reprodutibilidade e repetitividade.	43
Figura 3.3 - Modos de confinamento das células no módulo de fibra oca. (A) células confinadas no interior das fibras, (B) células confinadas no exterior das fibras (FERRAZ, 1999).	45
Figura 3.4 – Representação esquemática da célula de eletrodialise usada nos experimentos. A alimentação (1) é feita nos compartimentos 5, 7 e 9, sendo os compostos não-iônicos retirados na corrente diluída (2), enquanto que o ácido lactobiônico é removido pelos compartimentos 4, 6, 8 e 10, saindo pela corrente concentrada (12) para o tanque (15). A ddp era aplicada aos eletrodos de carbono (13 e 14) que ficam imersos no compartimento da solução eletrolítica (3 e 11).	47

Figura 3.5 – Fotografia da unidade de eletrodialise utilizada nos experimentos onde: 1 – fonte de corrente contínua; 2 – bombas de circulação; 3 – alimentação (corrente diluída); 4 – permeado (corrente concentrada); 5 célula de eletrodialise; 6 – condutivímetro. 47

Figura 3.6 – Arranjo esquemático utilizado nos estudos com células livres, onde: 1 – balança; 2 – solução de NaOH; 3 – bomba; 4 – sistema de controle de pH; 5 – biorreator. 49

Figura 3.7 – Fotografia do sistema utilizado nos estudos com células livres, onde: 1 – balança; 2 – solução de NaOH; 3 – bomba peristáltica; 4 – placa de agitação; 5 – sistema de controle de pH; 6 – banho termostático; 7 – biorreator encamisado. 49

Figura 3.8 – Arranjo esquemático utilizado nos estudos com células confinadas em fibra oca, onde: 1 – balança; 2 – solução de NaOH; 3 – bomba; 4 – sistema de controle de pH; 5 – tanque de alimentação; 6 – biorreator de membrana; 7 – rotâmetro. 50

Figura 3.9 – Fotografia do sistema utilizado nos estudos com células confinadas em fibra oca, onde: 1 – balança; 2 – solução de NaOH; 3 – bomba peristáltica; 4 – sistema de controle de pH; 5 – placa de agitação; 6 – tanque de alimentação; 7 – bomba peristáltica; 8 – banho termostático; 9 – biorreator de membrana; 10 – rotâmetro. 50

Figura 3.10 - Acoplamento das etapas de reação e separação, onde: 1 – tanque de alimentação; 2 – biorreator de membranas; 3 – unidade de eletrodialise; 4 – bomba; 5 – tanque contendo ácido lactobiônico; 6 – rotâmetro. 51

Figura 4.1 – Monitoramento da concentração de lactose pelo consumo de NaOH e kit enzimático. 53

Figura 4.2 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das

células de cada fermentação do MEIO 1, com seus respectivos intervalos de confiança.	55
Figura 4.3 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 2, com seus respectivos intervalos de confiança.	56
Figura 4.4 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 3A, com seus respectivos intervalos de confiança.	56
Figura 4.5 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 3B, com seus respectivos intervalos de confiança.	57
Figura 4.6 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 4A, com seus respectivos intervalos de confiança.	57
Figura 4.7 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 4B, com seus respectivos intervalos de confiança.	58
Figura 4.8 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 5A, com seus respectivos intervalos de confiança.	58
Figura 4.9 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 5B, com seus respectivos intervalos de confiança.	59
Figura 4.10 – Intervalo de confiança para os perfis das taxas específicas para as nove reações de cada meio.	61

Figura 4.11 – Diagrama para avaliação da reprodutibilidade e repetitividade pela análise do teste F. R1, R2 e R3 representam as reações realizadas para cada fermentação e σ_{F1}^2 , σ_{F2}^2 , σ_{F3}^2 e σ_M^2 representam variâncias para as reações de cada fermentação e do meio de cultivo, respectivamente. 62

Figura 4.12 – Análise do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 1 e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 64

Figura 4.13 – Análise do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 2 e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 64

Figura 4.14 – Análise do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 3A e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 65

Figura 4.15 – Análise do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 3B e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 65

Figura 4.16 – Análise do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 4A e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 66

Figura 4.17 – Análise do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 4B e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 66

Figura 4.18 – Análise do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 5A e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 67

Figura 4.19 – Análise do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 5B e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 67

Figura 4.20 – Análise do teste F entre todas as reações do MEIO 1 (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 68

Figura 4.21 – Análise do teste F entre todas as reações do MEIO 2 (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 69

Figura 4.22 – Análise do teste F entre todas as reações do MEIO 3A (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 69

Figura 4.23 – Análise do teste F (a) entre todas as reações do MEIO 3B (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). No detalhe, uma ampliação da região em torno do valor de $F_{0,975}$ (b). 70

Figura 4.24 – Análise do teste F (a) entre todas as reações do MEIO 5B (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). No detalhe, uma ampliação da região em torno do valor de $F_{0,975}$ (b). 71

Figura 4.25 – Análise do teste F (a) entre todas as reações do MEIO 5A (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). No detalhe, uma ampliação da região em torno do valor de $F_{0,975}$ (b). 72

Figura 4.26 – Análise do teste F entre todas as reações do MEIO 4A (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau

de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 73

Figura 4.27 – Análise do teste F entre todas as reações do MEIO 4B (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). 73

Figura 4.28 – Acompanhamento do crescimento celular em cultivo de *Zymomonas mobilis* para os meios com (a) 100 e (b) 150 g/L de glicose. 75

Figura 4.29 – Taxas específicas de formação em função do pH e temperatura. 79

Figura 4.30 – Taxas específicas de formação em função do pH e concentração de açúcares. 79

Figura 4.31 – Taxas específicas de formação em função do pH e concentração de células. 80

Figura 4.32 – Taxas específicas de formação em função da temperatura e concentração de açúcares. 80

Figura 4.33 – Taxas específicas de formação em função da temperatura e concentração de células. 81

Figura 4.34 – Taxas específicas de formação em função da concentração de células e açúcares. 81

Figura 4.35 – Valores observados e preditos pelo modelo (Equação 4.10). 87

Figura 4.36 – Efeito da vazão de circulação sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico com as células imobilizadas no exterior da fibra. As barras representam os intervalos de confiança. 90

Figura 4.37 – Efeito da vazão de circulação sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico com as células imobilizadas no interior da fibra. As barras

representam os intervalos de confiança.	91
Figura 4.38 – Influência da concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos e da voltagem durante a remoção de ácido lactobiônico.	93
Figura 4.39 – Comparação entre as membranas Hidrodex e Ionics na remoção de íons gliconato.	95
Figura 4.40 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico para os experimentos 1 até 4, mostrados na Tabela 5.15.	98
Figura 4.41 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico para os experimentos 5 até 8, mostrados na Tabela 5.15.	99
Figura 4.42 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico para os experimentos 9 até 11 (pontos centrais), mostrados na Tabela 5.15.	99
Figura 4.43 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico para os experimentos 12 até 17 (pontos axiais), mostrados na Tabela 5.15.	100
Figura 4.44 – Gráfico da superfície de resposta tendo como variáveis a concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos e voltagem.	101
Figura 4.45 – Gráfico da superfície de resposta tendo como variáveis a concentração de NaCl na corrente do concentrado e voltagem.	102
Figura 4.46 – Gráfico da superfície de resposta tendo como variáveis a concentração de NaCl na corrente do concentrado e no compartimento dos eletrodos.	102
Figura 4.47 – Resistência elétrica aparente do sistema de eletrodialise.	104
Figura 4.48 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico variando apenas a concentração de NaCl na corrente do concentrado.	106

Figura 4.49 – Monitoramento da condutividade dos ensaios de conversão total.	107
Figura 4.50 – Acompanhamento da conversão dos sistemas empregando células livres e confinadas no exterior das fibras.	108
Figura 4.51 – Acompanhamento da conversão para o sistema acoplado.	109
Figura 4.52 – Acompanhamento da conversão para os sistemas contendo células livres e confinadas, e para o sistema integrado utilizando a unidade de eletrodialise comercial.	110
Figura 4.53 - Cromatogramas obtidos pela análise das amostras de um experimento empregando eletrodialise para a remoção do ácido lactobiônico. Antes de começar a reação têm-se os picos relacionados somente a frutose e lactose (a), após o término da reação observa-se a formação do sorbitol, e uma pequena quantia que não reagiu de lactose e frutose (b), e na corrente do concentrado observa-se o pico relativo ao ácido lactobiônico (c).	112
Figura A.1 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> para o meio 1.	118
Figura A.2 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> para o meio 2.	119
Figura A.3 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> para o meio 3.	119
Figura A.4 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> para o meio 4.	120
Figura A.5 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> para o meio 5.	120
Figura A.6 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria	

<i>Zymomonas mobilis</i> para o meio 6.	121
Figura A.7 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> para o meio 7.	121
Figura A.8 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> para o meio 8.	122
Figura A.9 – Curva de calibração da concentração de lactose.	123
Figura A.10 – Curva de calibração da concentração de ácido lactobiônico por condutividade.	123
Figura A.11 – Cromatograma obtido para o ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol.	124
Figura A.12 – Curva de calibração para o ácido lactobiônico.	125
Figura A.13 – Curva de calibração para a lactose.	125

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades químicas do ácido lactobiônico e sorbitol.	06
Tabela 2.2 – Resultados das reações de oxidação catalisada pela GFOR (50 h, 30 °C, pH 6,2) empregando vários substratos como doadores de elétrons e a frutose a 1 M como acceptor de elétrons (SATORY <i>et al.</i> , 1997)	20
Tabela 2.3 – Resumo de alguns artigos relevantes sobre a produção de sorbitol e ácido glicônico pela enzima GFOR.	29
Tabela 2.3 – Resumo de alguns artigos relevantes sobre a produção de sorbitol e ácido glicônico pela enzima GFOR (continuação).	30
Tabela 2.3 – Resumo de alguns artigos relevantes sobre a produção de sorbitol e ácido glicônico pela enzima GFOR (continuação).	31
Tabela 3.1 – Composição dos meios.	41
Tabela 4.1 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico (mmol/g _{cel} .h) utilizando células permeabilizadas dos diversos meios de cultivos.	60
Tabela 4.2 – Níveis das variáveis utilizadas para o planejamento experimental utilizando células livres.	76
Tabela 4.3 – Matriz de planejamento para experimentos utilizando células permeabilizadas.	78
Tabela 4.4 – Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 4.8).	83
Tabela 4.5 – Comparação entre os valores preditos e experimentais de taxa	

específica de formação do ácido lactobiônico (mmol/g _{cel} .h)	84
Tabela 4.6 – Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 4.9)	85
Tabela 4.7 – Comparação entre os valores preditos e experimentais com base na Equação 4.9.	85
Tabela 4.8 – Taxa específica de formação do ácido lactobiônico (mmol/g _{cel} .h) para os experimentos variando apenas a concentração de células.	86
Tabela 4.9 – Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 4.10).	86
Tabela 4.10 – Matriz de correlação dos parâmetros estimados.	88
Tabela 4.11 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico (mmol/g _{cel} .h) para as células confinadas em membranas de fibras ocas.	92
Tabela 4.12 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico (mmol/g _{cel} .h) para as células confinadas em membranas de fibras ocas.	92
Tabela 4.13 – Testes preliminares para avaliar a remoção de ácido lactobiônico.	94
Tabela 4.14 – Níveis das variáveis utilizadas para o planejamento experimental na unidade de eletrodialise.	96
Tabela 4.15 – Matriz de planejamento para os experimentos realizados na unidade de eletrodialise.	98
Tabela 4.16 – Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 4.14).	103

1 – INTRODUÇÃO

A bactéria *Zymomonas mobilis*, conhecida como eficiente produtora de etanol a partir de glicose via rota metabólica de Entner-Doudoroff, foi originalmente descoberta em fermentações com seivas de plantas ricas em açúcar, como a seiva do agave no México.

Em 1986, ZACHARIOU e SCOPES identificaram um complexo enzimático presente apenas na bactéria *Zymomonas mobilis*, a glicose frutose oxidorreductase (GFOR) (EC 1.1.1.99), capaz de promover simultaneamente a oxidação de várias aldoses aos seus respectivos ácidos aldônicos e a redução de várias cetoses aos seus respectivos polióis. Grande parte dos estudos relacionados à GFOR tratam da produção de sorbitol e ácido glicônico a partir da frutose e glicose, uma vez que estes açúcares são substratos “naturais” da enzima, tendo assim uma alta atividade neste substrato quando comparada aos demais.

O uso de processos biotecnológicos para a produção de grande variedade de compostos tem despertado um crescente interesse, sobretudo nas últimas décadas, quando muitos avanços têm sido alcançados nesta área. Tal interesse pode ser justificado pelas condições de operação mais brandas empregadas na biossíntese, que reduzem o consumo de energia e aumentam a segurança do processo, pela alta especificidade das enzimas, que minimiza a formação de subprodutos, e pelo menor impacto ambiental (FERRAZ, 1999).

Entretanto, a produção de sorbitol e ácido glicônico utilizando células livres de *Zymomonas mobilis*, contendo a enzima GFOR, é um processo inviável devido ao baixo valor agregado do ácido glicônico no mercado. Segundo JONAS e SILVEIRA (2004) para tornar este processo viável é necessário produzir um ácido aldônico que possua um maior valor agregado no mercado, como, por exemplo, o ácido lactobiônico. Este ácido possui um valor no mercado cerca de 70 vezes maior que o ácido glicônico.

Atualmente, o sorbitol e o ácido lactobiônico são produzidos por processos distintos e bastantes dispendiosos e há poucos estudos na literatura relacionados à produção de sorbitol e ácido lactobiônico a partir da bactéria *Zymomonas mobilis*.

O processo de produção do sorbitol é feito através da hidrogenação catalítica da D-glicose com catalisadores a base de níquel. Quando produzido em batelada, a temperatura de operação é em torno de 120 a 150 °C e a pressão é de aproximadamente

70 bar; já o processo contínuo é operado a uma pressão em torno de 180 a 200 bar e a uma temperatura de 140 a 170 °C (JONAS e SILVEIRA, 2004).

O sorbitol apresenta muitas aplicações na indústria alimentícia, de cosméticos, farmacêutica, têxtil e na composição de cremes dentais. Isto se deve às suas propriedades, pelo fato de ser substância não-cariogênica, conferir textura aos alimentos, além de possuir baixa taxa de absorção pelo organismo e ser usado para aumentar a estabilidade de medicamentos (CAZETTA *et al.*, 2005; ERZINGER e VITOLO, 2006; JONAS e SILVEIRA, 2004; FERRAZ, 1999).

O sorbitol é um composto molecular comercialmente importante, com uma produção mundial de aproximadamente 500.000 toneladas por ano, e cerca de 25 % dessa produção é utilizada na síntese do ácido ascórbico (vitamina C) (JONAS e SILVEIRA, 2004).

O processo de produção do ácido lactobiônico através da oxidação eletrolítica da lactose foi patenteada em 1952 por EDWARD e ISLIP. O processo de produção faz uso de uma solução alcalina para manter o pH da solução acima de 5,2, aproximadamente. Durante o processo, emprega-se uma solução aquosa de lactose, contendo um excesso não dissolvido, fazendo com que uma grande quantidade de ácido possa ser obtida com uma célula eletrolítica relativamente pequena. Assim, o ácido lactobiônico é obtido sob a forma de lactobionato de cálcio. Estudos recentes mostram algumas alternativas para a produção de ácido lactobiônico, que abrangem tanto os processos biotecnológicos, como eletroquímicos e de catálise heterogênea (MIYAMOTO *et al.*, 2000; DHARIWAL *et al.*, 2006; MIRESCU e PRÜBE, 2007).

O ácido lactobiônico vem sendo introduzido na formulação de cosméticos. Uma promissora aplicação deste ácido é o seu uso na fabricação de substâncias com propriedades surfactantes, como os detergentes, uma vez que é uma substância biodegradável e não tóxica. No entanto, a sua maior aplicação comercial é devido ao fato de ser o principal constituinte de fluidos para a preservação de órgãos durante os procedimentos de transplantes (DHARIWAL *et al.*, 2006; SPLETCHNA *et al.*, 2001).

A utilização de células imobilizadas em bioprocessos vem se destacando nas últimas décadas e apresenta uma série de vantagens como: possibilidade de utilização de altas concentrações celulares no volume reacional; eliminação de problemáticos ciclos externos de células; melhor controle do processo; redução no custo operacional; melhor uniformidade do produto (FONSECA, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2005).

Nos últimos 10 anos, os reatores de membranas têm recebido grande atenção para a produção de uma variedade de produtos, devido principalmente à possibilidade de usar o catalisador na forma solúvel ou insolúvel. O confinamento de células em membranas de fibras ocas tem sido usado como uma técnica de imobilização alternativa e promissora (TOMOTANI e VITOLO, 2007).

A integração das etapas de produção e separação, visando reduzir o tempo e os custos de processamento, é fundamental para a consolidação dos processos biotecnológicos (SCHÜGERL e HUBBUCH, 2005). Ácidos orgânicos, como, por exemplo, os ácidos láctico, glicônico, succínico e cítrico, são intensamente usados na indústria de alimentos e química. Para se obter estes ácidos com as propriedades requeridas para seu uso final, é necessário utilizar vários estágios de separação. Os processos tradicionais têm sido projetados com um ou vários estágios de precipitação, os quais produzem uma grande quantidade de efluentes com altas concentrações de sais. De modo a reduzir este impacto ambiental, os processos de separação por membranas surgem como uma rota alternativa para a produção destes ácidos. Os processos de separação por membranas vêm despertando um crescente interesse para aplicações industriais em áreas de alta tecnologia como a biotecnologia e nanotecnologia, em vários processos de purificação. Estes processos têm como vantagens o baixo consumo de energia e o fácil escalonamento (NAGARALE *et al.*, 2006).

A eletrodialise é um dos processos de separação por membranas, que tem se mostrando ser uma eficiente tecnologia quando espécies iônicas precisam ser separadas a partir de determinadas soluções. Sua principal utilização é a dessalinização de águas, onde são usadas membranas catiônicas e aniônicas. Nos últimos anos, a eletrodialise tem sido amplamente utilizada para a purificação e recuperação de ácidos orgânicos (NAGARALE *et al.*, 2004, WANG *et al.*, 2006).

No Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos desde 1995 empregando a bactéria *Zymomonas mobilis* na produção de ácido glicônico e sorbitol, a partir de glicose e frutose. Já foi estudada a produção utilizando células livres (WILBERG, 1995), a imobilização em membranas na forma de fibras ocas, com separação simultânea do ácido glicônico por eletrodialise (FERRAZ, 1999) e a imobilização das células em um reator do tipo cesta agitada (FONSECA, 2003).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir o sorbitol e o ácido lactobiónico, um produto de maior valor agregado que o ácido glicônico, a partir da

frutose e da lactose, utilizando-se células de *Zymomonas mobilis* permeabilizadas e imobilizadas em membranas de fibras ocas, com separação simultânea do ácido lactobiônico por eletrodialise.

Este documento está organizado da maneira descrita a seguir. No Capítulo 2, é apresentado uma revisão da literatura sobre a síntese enzimática de sorbitol e ácido lactobiônico utilizando células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* e dos processos de separação de bioprodutos de um modo geral, com ênfase na eletrodialise. O Capítulo 3 apresenta a metodologia empregada nas investigações. No Capítulo 4, são encontrados os resultados dos estudos realizados, sendo dividido basicamente em cinco partes. Na primeira, são apresentados os resultados relativos à avaliação dos meios de cultivo. A segunda parte trata dos estudos cinéticos realizados com células livres. A terceira parte diz respeito aos estudos de imobilização das células no biorreator a membranas. Paralelo a essa etapa, foi feito um planejamento experimental no sistema de eletrodialise para avaliar as melhores condições de remoção do ácido lactobiônico. Por fim, os sistemas de reação e separação foram acoplados, e o desempenho do processo avaliado. O Capítulo 5 contém as conclusões finais sobre o estudo realizado, bem como sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Propriedades e Aplicações do Sorbitol e Ácido Lactobiônico

O sorbitol, ou D-glucitol é um poliol solúvel em água, cristalino e de sabor doce. Algumas propriedades químicas do sorbitol são mostradas na Tabela 2.1 e sua estrutura é ilustrada na Figura 2.1 (a). Ele é naturalmente encontrado em muitas frutas pequenas (exceto as uvas brancas), cereja, ameixas, pêras e maçãs, é aproximadamente 60 % tão doce quanto a sacarose e possui um terço a menos de calorias, em torno de 2,6 calorias por grama (JONAS e SILVEIRA, 2004).

Apresenta muitas aplicações na indústria alimentícia, cosméticos, farmacêutica e têxtil. Na indústria alimentícia é usado para conferir textura aos produtos e, devido a sua baixa taxa de absorção pelo organismo, é empregado como edulcorante em alimentos dietéticos, além de substituir o açúcar em vários alimentos para diabéticos. Os polióis, incluindo o sorbitol, são não cariogênicos, estando presentes na composição de cremes dentais, pois são resistentes ao metabolismo das bactérias orais. Estas quebram as moléculas de açúcar, as quais são hidrolisadas para liberar ácidos que podem conduzir à formação de cavidades ou corroer o esmalte dos dentes. Na indústria farmacêutica, é usado para aumentar a estabilidade de medicamentos, prevenindo a floculação e a coagulação, além de encorpar xaropes e elixires. É empregado na indústria de cosméticos como umectante e plastificante. Na indústria química, é utilizado na síntese de sorbose e propileno glicol (CAZETTA *et al.*, 2005; ERZINGER e VITOLO, 2006; JONAS e SILVEIRA, 2004; FERRAZ, 1999).

O ácido lactobiônico, formado pela oxidação da lactose, é um promissor agente reticulação de proteínas através da reação de Maillard que consiste na condensação entre o grupo aldeído dos açúcares reduzidos e o grupo amina dos resíduos de lisina da proteína, importante para a glicosilação da proteína (WIJK *et al.*, 2006). Algumas propriedades químicas do ácido lactobiônico são mostradas na Tabela 2.1 e sua estrutura é ilustrada na Figura 2.1 (b). ZHOU *et al.* (2006) avaliaram a aplicação do ácido lactobiônico no desenvolvimento de um novo tipo de biosensor para H₂O₂, utilizando a hemoglobina aprisionada em um filme de ácido lactobiônico.

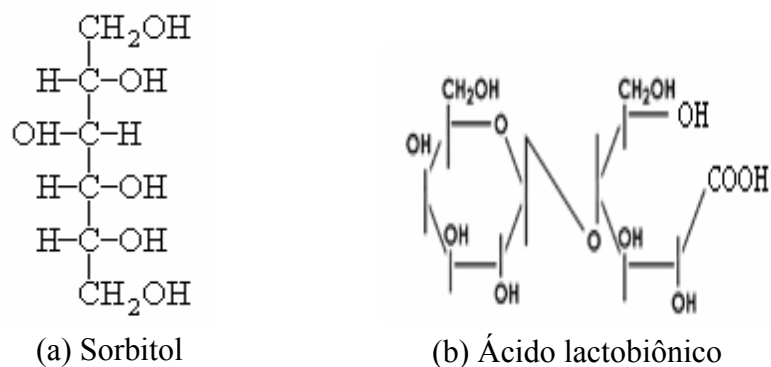


Figura 2.1 – Estrutura do sorbitol e ácido lactobiônico.

Tabela 2.1 – Propriedades químicas do ácido lactobiônico e sorbitol.

Propriedades	Ac. Lactobiônico	Sorbitol
Massa molar	358	182
Composição química	$C_{12}H_{22}O_{12}$	$C_6H_{14}O_6$
pKa	~ 3,8	~ 13,6

Além disso, o ácido lactobiônico vem sendo utilizado na formulação de cosméticos e fabricação de substâncias com propriedades surfactantes como os detergentes, com a vantagem de ser uma substância biodegradável e não tóxica. Porém, a sua maior aplicação comercial é como constituinte de fluidos para a preservação de órgãos durante os procedimentos de transplantes. Isto se deve a sua habilidade de suprimir os danos causados aos tecidos pelos radicais livres de oxigênio durante o armazenamento dos órgãos e a subsequente reperfusão, permitindo que os órgãos sejam preservados fora do corpo até 2 dias. Este efeito benéfico é devido a inibição da produção de radicais hidroxilas pela complexação do Fe^{2+} (GREEN *et al.*, 2007; DHARIWAL *et al.*, 2006; SPLETCHNA *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2006, MURZINA *et al.*, 2008).

Na indústria de alimentos possíveis aplicações do ácido lactobiônico têm sido investigadas, como é o caso da redução da acidez e do tempo de maturação na produção de queijos e iogurtes, promovendo a formação de estruturas de géis estáveis, eliminação do sabor amargo e melhoria do aroma, melhoria na percepção do gosto da acidez e proteção contra a oxidação das gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas (SAARELA *et al.*, 2003).

2.2 – Métodos Convencionais de Produção do Sorbitol e Ácido Lactobiônico

A produção industrial do sorbitol é tradicionalmente realizada pela hidrogenação catalítica do xarope de D-glicose a uma concentração de aproximadamente de 50 % (p/v). A base do atual processo foi fornecida pela IG Farben AG (1925) (JONAS e SILVEIRA, 2004), e a partir disto foram propostos e usados vários processos contínuos e em batelada. Cerca de aproximadamente 80 % da produção mundial de sorbitol é feita em batelada. No sistema em batelada a reação é conduzida utilizando um catalisador de níquel (3-6 % (volume/volume), baseado na quantidade de glicose), o qual é suspenso em uma solução de glicose a um pH entre 5 e 6. A temperatura utilizada é de 120 a 150 °C e a pressão de aproximadamente 70 bar. Quando o sistema é operado abaixo de 50 bar, a concentração de níquel pode ser de até 14 %, com um tempo médio de hidrogenação em torno de 3 horas. Em um processo contínuo, a hidrogenação é feita em um reator de leito fixo contendo catalisadores de níquel na concentração de 2 %, a um pH 6 e uma pressão entre 180 a 200 bar e a uma temperatura de 140 a 170 °C. A solução bruta de sorbitol é resfriada e o catalisador é, então, removido por precipitação ou filtração (JONAS e SILVEIRA, 2004).

A purificação da solução de sorbitol é feita em duas etapas: primeiro através de uma coluna de troca iônica para remover o gliconato e outros íons presentes; depois, por tratamento com um filtro de carvão ativado, para remover traços de impurezas orgânicas. Após concentração por evaporação, obtém-se uma solução a 70 %. É também comercializado na forma sólida, obtido através de posteriores etapas de concentração e cristalização (FERRAZ, 1999; JONAS e SILVEIRA, 2004).

Além do processo de produção descrito anteriormente, diferentes grupos de pesquisas vêm estudando vários processos biotecnológicos de produção de sorbitol, em condições de operações mais brandas. De acordo com JONAS e SILVEIRA (2004), no final de década de 90 Tani e Vongsuvanlert descreveram a produção de sorbitol por uma levedura consumidora de metanol, *Candida boidinii*. Eles obtiveram bons resultados, mas em pequenos volumes, entretanto não houve nenhuma publicação adicional sobre este processo. Os dados apresentados foram insuficientes para tornar este processo satisfatório para a produção em larga escala.

DUVNJAK *et al.* (1991^a) e DUVNJAK *et al.* (1991^b) estudaram a produção do sorbitol junto com o etanol por uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36859) modificada geneticamente, utilizando como fonte de carbono o suco de alcachofra de

Jerusalém. Um ponto crítico deste processo é que esta fonte de carbono possui alto valor agregado. Além disso, a cepa descrita pode consumir sorbitol quando cresce em um meio contendo frutose.

O processo produção do ácido lactobiônico através da oxidação eletrolítica da lactose foi patenteada em 1952 por EDWARD e ISLIP. O processo de produção faz uso de uma solução alcalina para manter o pH da solução acima de 5,2, aproximadamente. Durante o processo, emprega-se uma solução aquosa saturada em lactose, e contendo um excesso não dissolvido, fazendo com que uma grande quantidade de ácido possa ser obtida com uma célula eletrolítica relativamente pequena. Assim o ácido lactobiônico é obtido sob a forma de lactobionato de cálcio

MIYAMOTO *et al.* (2000) utilizaram a bactéria *Pseudomonas* sp LS13-1 para converter lactose a ácido lactobiônico, a partir do soro do queijo, em um meio contendo 207 g/L de soro (equivalente a 150 g/L de lactose) e ao longo do tempo foram realizadas três adições intermitentes de 69 g/L de soro (equivalente a 50 g/L de lactose) em batelada alimentada em um pH 5,5, produzindo 175 g/L de ácido lactobiônico em 180 horas. Os autores realizaram o mesmo experimento descrito anteriormente, mas apenas com uma solução de lactose a 150 g/L, fazendo também três adições de soluções de lactose a 50 g/L obtendo de 240 g/L de ácido lactobiônico.

DHARIWAL *et al.* (2006) desenvolveram um processo eletroquímico para a oxidação da lactose a ácido lactobiônico através da enzima celobiose desidrogenase (CDH). Os autores estudaram a influência dos componentes do meio, o substrato (lactose) a uma faixa de concentração de 40 a 80 mM, e do mediador redox (ABTS – “2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate”), que é um acceptor de elétrons, na faixa de 0,03 e 0,17 mM. Neste caso, a CDH oxida lactose a ácido lactobiônico e se reduz, sendo posteriormente reoxidada pelo mediador. Este trabalho mostrou que os melhores resultados para a produção do lactobiônico foram para os valores centrais das variáveis estudadas, 200 mM de lactose e 0,8 mM de ABTS, tendo uma produtividade de 1,77 g/L.h. Estes resultados são apenas testes preliminares, entretanto, foram considerados satisfatórios pelos autores. De acordo com os autores, mais estudos estão sendo feitos para otimizar este processo.

MIRESCU e PRÜBE (2007) estudaram a influência de catalisadores a base de prata, ouro e paládio sobre oxidação seletiva de aldoses (monossacarídeos e dissacarídeos), incluindo a lactose, que foi oxidada a ácido lactobiônico. Os autores tiveram como objetivo comparar a atividade e a seletividade destes três catalisadores. O

catalisador de Au/Al₂O₃ apresentou uma maior seletividade para o ácido lactobiônico (99,5 %) e foi usado satisfatoriamente durante 10 corridas para a oxidação de lactose sem diminuição notável da atividade específica que ficou em torno de 100 mmol/min.g.

KOKOH e ALONSO-VANTE (2006) produziram o ácido lactobiônico através da oxidação eletrocatalítica da lactose em nanopartículas de ouro, obtendo um rendimento de 91 % em torno de 4 horas de processo para uma solução de lactose a 10,1 mM. Já TOKAREV *et al.* (2007) estudaram a oxidação da lactose a partir de catalisadores de ouro e paládio suportados em Al₂O₃ e observaram que os catalisadores a base de ouro são mais ativos e seletivos para a produção do ácido lactobiônico. Os autores também observaram que as melhores condições foram a um pH 8, temperatura de 60 °C e a uma vazão de oxigênio de 2,5 mL/min. Já os catalisadores a base de paládio são mais propensos à desativação devido ao processo de oxidação.

MURZINA *et al.* (2008) também estudaram a produção de ácido lactobiônico a partir da oxidação da lactose em catalisadores a base ouro, mas em diferentes suportes (Al₂O₃, SiO₂, TiO₂, Fe₂O₃, Fe₃O₄ e ZrO₂), nas condições estabelecidas por TOKAREV *et al.* (2007). Os autores observaram uma grande influência da natureza do suporte sobre a seletividade do ácido lactobiônico, sendo os catalisadores suportados em Al₂O₃ os mais ativos.

ZACHARIOU e SCOPES (1986) que identificaram um complexo enzimático, presente na bactéria *Zymomonas mobilis*, capaz de produzir simultaneamente sorbitol e ácido lactobiônico a partir de soluções frutose e lactose, constituindo, assim, uma alternativa aos processos convencionais, como será detalhado a seguir.

2.3 – A Bactéria *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis provocou muito interesse no início dos anos 30 entre os microbiologistas alemães, que sugeriram um número de aplicações promissoras para esta bactéria devido a duas propriedades da bactéria, que são o rápido consumo de glicose pela fermentação alcoólica e a diminuição do pH do meio. No início dos anos 50, ela adquiriu certa notoriedade entre os bioquímicos devido à descoberta de Gibbs e DeMoss de que o catabolismo anaeróbio seguia o mecanismo da via de Entner Doudoroff utilizado principalmente por bactérias estritamente aeróbias (SWINGS e De LEY, 1977). Isso se deve ao fato de ela apresentar apenas alguns componentes do ciclo do ácido cítrico, como evidenciado por SWINGS e De LEY (1977), que descobriram a

ausência de algumas enzimas que fazem parte deste ciclo, bem como algumas enzimas da via das pentoses.

A bactéria *Zymomonas mobilis*, conhecida como eficiente produtora de etanol a partir de glicose via rota metabólica de Entner-Doudoroff, foi originalmente descoberta em fermentações com seivas de plantas ricas em açúcar, como a seiva do agave no México (SWINGS e De LEY, 1977).

Um das grandes vantagens do uso da *Zymomonas mobilis* para a produção de etanol são: (1) as altas taxas específicas de consumo de glicose para a produção de etanol, (2) rendimento da produção de etanol próximo do valor teórico máximo com formação de biomassa muito baixa, (3) alta tolerância à concentração de etanol. Dentre as desvantagens, destacam-se a baixa tolerância a sais e o fato de ser capaz de metabolizar somente 3 fontes de carbono: glicose, frutose e sacarose (GUNASSEKARAN e RAJ, 1999).

2.3.1 – Características Gerais

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa e não patogênica que possui a forma de bastonetes com 2 a 6 µm de comprimento e de 1 a 1,5 µm de largura, podendo ocorrer isoladamente ou, mais comumente, aos pares. Não forma esporos e, em sua grande maioria, não possui mobilidade. Cerca de 30 % são móveis com 1 a 4 flagelos polares, porém algumas linhagens perderam a mobilidade. Das cepas conhecidas, o crescimento se dá na faixa de pH de 3,5 a 7,5 sendo a faixa ótima entre 5 a 7, e em temperaturas em torno de 30 °C. As colônias formadas são de cor branca ou creme (SWINGS e De LEY, 1977; SCHMIDT *et al.*, 1986; ERZINGER e VITOLO, 2006).

Fenotipicamente as bactérias do gênero *Zymomonas* se assemelham à maioria das bactérias acéticas; elas têm um comportamento mais parecido com as bactérias do gênero *Gluconobacter* do que com as do gênero *Acetobacter*, devido aos flagelos polares, ao incompleto ciclo de krebs e a ocorrência do mecanismo de Entner Doudoroff (o qual é mais difundido entre as bactérias do gênero *Gluconobacter* do que entre as bactérias do gênero *Acetobacter*), e ao rápido consumo de glicose. *Zymomonas* e as bactérias acéticas ocorrem em plantas e preferem crescer em nichos ricos em sucos de plantas, tolerando um pH baixo. Muitas cepas crescem a pH 3,5 e 4, e as bactérias acéticas são hábeis a crescer em um pH entre 4 e 4,5. Esta tolerância a baixos valores

de pH não é comum no mundo das bactérias. Grande parte das cepas de *Zymomonas* possui tolerância ao etanol, sendo hábeis em crescer em meios contendo até 10 % de etanol, assim como as bactérias acéticas, que crescem rapidamente em 10 a 13 % de etanol (SWINGS e De LEY, 1977).

Apesar de se acreditar que o álcool atua na dissolução de sua membrana lipídica, afetando a sua fluidez e aumentando a sua permeabilidade, resultando, por conseguinte, no fluxo de íons, cofatores e coenzimas, as bactérias do gênero *Zymomonas* possui mecanismos de adaptação para crescer em presença de etanol. Esses mecanismos incluem a alteração da composição da sua membrana lipídica, evitando assim a penetração de etanol no interior da célula, aumentando, assim, as propriedades da barreira hidrofóbica e diminuindo a perda de material intracelular (SCHMIDT *et al.*, 1986).

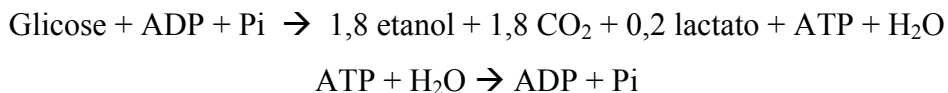
Um das vantagens da bactéria *Zymomonas mobilis* sobre os demais microorganismos, como por exemplo, a *Saccharomyces cerevisiae*, é o seu alto rendimento em etanol (acima de 97 % do rendimento teórico) e alta produtividade, pois o seu balanço de energia resulta na formação de uma molécula de ATP por glicose metabolizada. Isto equivale à metade da quantidade produzida por *Saccharomyces cerevisiae*, durante a fermentação alcoólica, o que leva a uma baixa produção de biomassa durante a fermentação e, conseqüentemente, a um alto rendimento de conversão de açúcar em etanol (VEERAMALLU e AGRAWAL, 1988).

Além disso, as bactérias do gênero *Zymomonas* tem alta tolerância à concentração de glicose. Todas as cepas de *Zymomonas* e a maioria das bactérias acéticas são hábeis em crescer em meio contendo 20 % de glicose. Grande parte destas cepas é hábil em crescer em meio contendo 40 % de glicose, e muitas bactérias acéticas são capazes de crescer rapidamente em um meio contendo 50 % de glicose. Uma pequena parte da glicose é aproveitada para formação de massa celular de *Zymomonas*: 98 % da glicose é fermentada e aproximadamente 2 % é usada como fonte de carbono (SWINGS e De LEY, 1977).

2.3.2 – Metabolismo dos Açúcares

Zymomonas mobilis utiliza como fonte de carbono glicose ou frutose, ou sacarose em seu meio para crescimento. Quando a glicose é utilizada como única fonte de carbono, 98% da glicose é consumida a etanol, CO₂, ATP e outros subprodutos, quando

cultivadas em meio complexo. Somente 2 % é utilizada como fonte de cerca da metade do carbono celular, e o restante é derivado dos componentes do extrato de lêvedo ou da peptona ou de ambos (DOELLE *et al.*, 1993). O consumo de glicose é dado por:



Estudos do metabolismo da sacarose por *Zymomonas mobilis* têm sido realizados com o objetivo de melhorar a produção de etanol a partir deste substrato. Quando a sacarose é utilizada como substrato para a produção de etanol, os rendimentos são significativamente inferiores àqueles obtidos utilizando-se a glicose ou frutose, cerca de 70 % do valor teórico. Este baixo rendimento é uma consequência da formação de levana, sorbitol e fruto-oligômeros como subprodutos (VIIKARI, 1984^a).

Na fermentação de sacarose, a síntese de levana e a produção do sorbitol são competitivas. A síntese da levana é dependente da quantidade de monossacarídeo livre, especialmente frutose, formado após a hidrólise da sacarose. Quando a taxa de hidrólise da sacarose é maior que a taxa de consumo dos açúcares, os monossacarídeos se acumulam no meio. Como a taxa de consumo da glicose é mais rápida que a da frutose, geralmente a frutose se acumula em maiores quantidades, sendo posteriormente reduzida a sorbitol enquanto glicose é oxidada (KANNAN *et al.*, 1997).

O mecanismo utilizado pela bactéria *Zymomonas mobilis*, no qual há formação de um único mol de ATP por mol de açúcar fermentado, faz com que a glicose seja metabolizada a uma taxa extraordinariamente alta, onde, a cada minuto, a bactéria consome uma quantidade de glicose igual a um terço de sua biomassa para compensar esse baixo rendimento energético. Desta forma, a glicose é transportada por um sistema de difusão facilitada de alta velocidade, baixa afinidade e não dependente de energia (PARKER *et al.*, 1997).

Paralelamente à produção de etanol em misturas de glicose e frutose, cerca de 11 % da fonte de carbono é utilizada na produção de sorbitol (VIIKARI, 1984^b), enquanto que não se observa acúmulo de gliconato, uma vez que o ácido glicônico produzido é fosforilado pela gliconatoquinase e posteriormente metabolizado a etanol via rota de Entner Doudoroff (REHR *et al.*, 1991).

Em seu hábitat natural as bactérias do gênero *Zymomonas* estão sujeitas a altas concentrações de açúcares, principalmente na forma de sacarose. LOSS *et al.* (1994)

reportaram que a formação do sorbitol é consequência de um mecanismo de proteção osmótica, quando as células se encontram sob o estresse de altas concentrações de açúcares. A sacarose é metabolizada a glicose e frutose pela ação das enzimas invertase e levanasacarase (como será mostrado posteriormente).

A Figura 2.2 mostra a via metabólica da sacarose em células de *Zymomonas mobilis*.

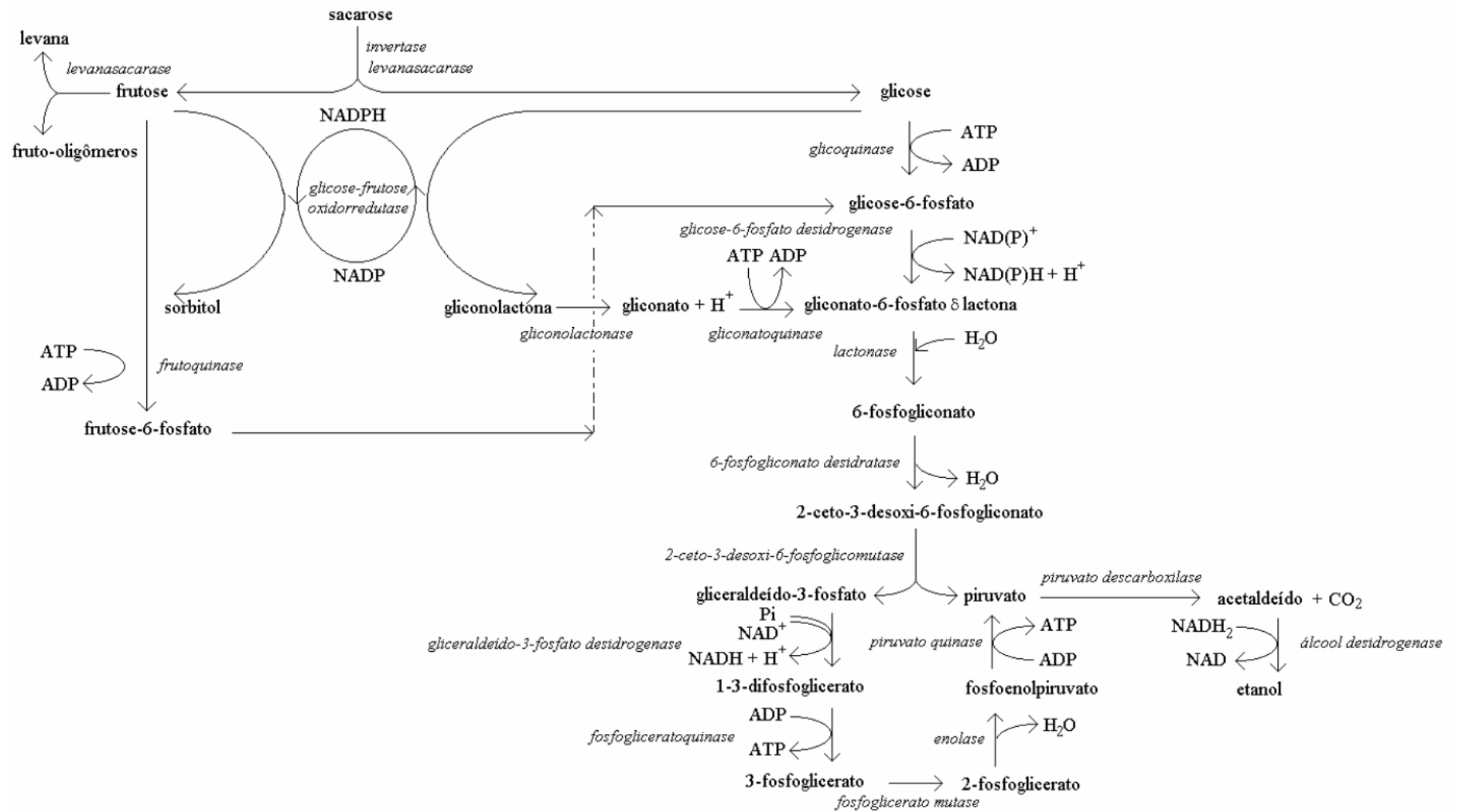


Figura 2.2 – Rota metabólica empregada pela *Zymomonas mobilis* no metabolismo da sacarose (FONSECA, 2003).

VIIKARI (1984^a) observou que quando os substratos utilizados eram a sacarose ou a mistura de glicose e frutose, concentrações relativamente altas de sorbitol eram observadas como subproduto da produção de etanol por via fermentativa da bactéria *Zymomonas mobilis*. ZACHARIOU e SCOPES (1986) demonstraram que a estrutura carbônica do sorbitol deriva exclusivamente da frutose, e postularam que o seu acúmulo neste sistema seria consequência da inibição da frutoquinase pela glicose (VIIKARI, 1984^b).

Investigando a rota de produção de sorbitol, foi identificado um complexo enzimático capaz de, simultaneamente, reduzir a frutose a sorbitol e oxidar glicose a ácido glicônico. Uma das enzimas foi descrita como glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) na presença de um cofator fortemente ligado ao seu sítio ativo. O cofator, identificado como NADP(H) (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato), é o responsável pelo transporte do hidrogênio desta reação, que não requer a adição de nenhum outro cofator. A GFOR em presença do NADP(H), não dialisável, oxida a glicose a gliconolactona e reduz a frutose a sorbitol. O cofator é regenerado pela própria reação enzimática. Em uma reação seqüencial, a gliconolactona, altamente instável, é hidrolisada a ácido glicônico pela ação de enzima glicono- δ -lactonase (GL), também presente nas células de *Zymomonas mobilis* (ZACHARIOU e SCOPES, 1986).

2.4 – Processos Empregando *Zymomonas mobilis*

2.4.1 - As Enzimas Glicose-Frutose Oxidorredutase e Glicono- δ -lactonase de *Zymomonas mobilis*

A enzima glicose frutose oxidoredutase (GFOR) (EC 1.1.1.99) é uma proteína tetramérica com cada subunidade apresentando uma massa molar de 40 kDa e contendo uma molécula do cofator não dialisável NADP firmemente ligado a GFOR, conforme mostra a Figura 2.3, formando um complexo enzima-cofator que se reconstitui pela própria ação enzimática. A GFOR está localizada no periplasma da célula de *Zymomonas mobilis*, sendo responsável pela redução da frutose a sorbitol e pela desidrogenação da glicose a gliconolactona, que é hidrolisada a ácido glicônico pela enzima gliconolactonase (GL) (EC 3.1.1.17) (ZACHARIOU e SCOPES, 1986; LOOS *et al.*, 1991; NIDETZKY *et al.*, 1997; JONAS e SILVEIRA, 2004).

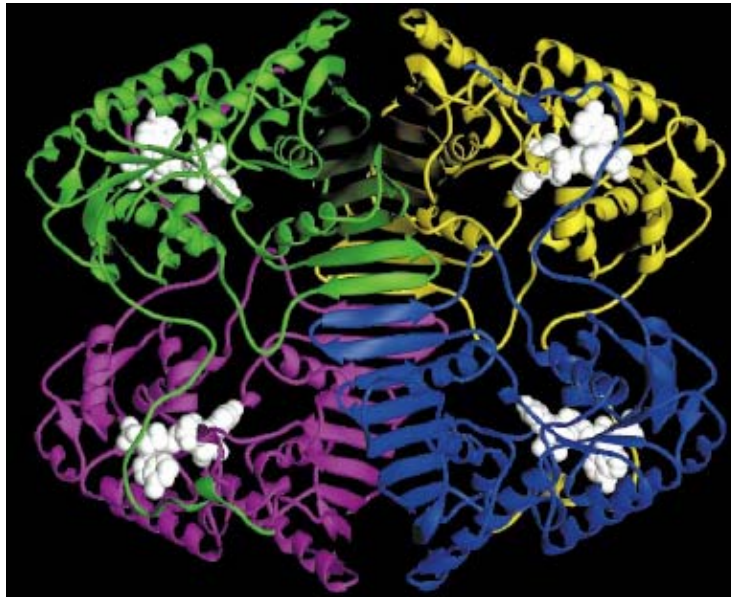


Figura 2.3 – Digrama de “ribbon” da enzima tetramérica GFOR, onde as partes brancas representam o NADP ligado a GFOR, e cada subunidade está representada por uma cor diferente (KINGSTON *et al.*, 1996).

A GFOR constitui cerca de 0,5 % do conteúdo total de proteínas solúveis em *Zymomonas mobilis*. Estudos realizados com concentrações de glicose de 0,4 M e frutose de 0,8 M fazendo uso de GFOR purificada revelaram que a enzima possui um pH ótimo de 6,2, que é próximo ao pH intracelular (6,4 a 6,8), como mostra a Figura 2.4. A temperatura ideal de reação é de 39-40 °C, uma vez que acima de 42 °C a enzima desativa dentro de uma hora (ZACHARIOU e SCOPES, 1986).

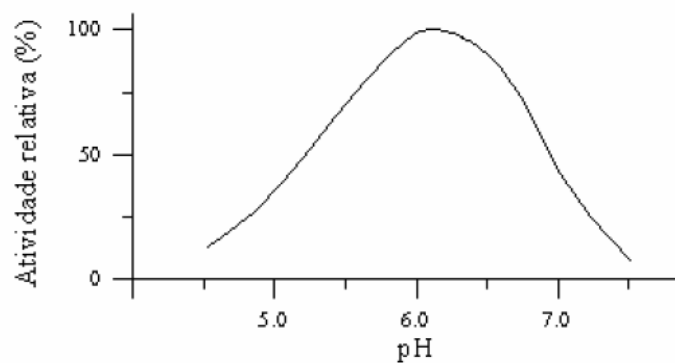


Figura 2.4 – Influência do pH sobre a atividade enzimática da GFOR tendo como substratos glicose (0,4 M) e frutose (0,8 M) (ZACHARIOU e SCOPES, 1986).

Em 1994, LOOS *et al.* (1994) concluíram que a bactéria *Zymomonas mobilis* acumula sorbitol para contrabalançar o estresse osmótico causado por altas concentrações de açúcar. Desta forma, o sorbitol, que é um soluto compatível, isto é, pode ser acumulado na célula sem ser nocivo à mesma, funciona como um osmoprotetor para a bactéria, que o acumula intracelularmente até concentrações de 1 M para compensar os efeitos exercidos pela alta pressão osmótica externa. A localização periplasmática da GFOR deve-se ao acesso simultâneo de ambos os açúcares (glicose e frutose) a esta região, já que altas concentrações dos mesmos não são permitidas no citosol. Assim, a GFOR funciona como um osmosensor que atua somente a altas concentrações de glicose e frutose.

A GFOR opera por um mecanismo cinético clássico, *ping-pong*, pelo qual o consumo dos substratos e a formação dos produtos é equimolar, possuindo um único sítio ativo para os substratos (glicose e frutose) e produtos (gliconolactona e sorbitol), onde cada um se liga por vez, dependendo do estado de oxidação do complexo enzima-cofator, e este é regenerado após cada ciclo reacional (ZACHARIOU e SCOPES, 1986; HARDMAN e SCOPES, 1988). A equação clássica deste mecanismo é mostrada a seguir:

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{k_f}{F} + \frac{k_g}{G}\right)} \quad (2.1)$$

onde: v é a velocidade da reação (mol/L.h), V é a velocidade máxima da reação (mol/L.h), k_g é o parâmetro relativo à glicose (mol/L), k_f é o parâmetro relativo à frutose (mol/L), G é a concentração de glicose (mol/L) e F é a concentração de frutose (mol/L).

Realizando estudos com meias reações de oxidação e redução, HARDMAN e SCOPES (1988) verificaram que a redução do complexo enzima-NADP⁺ pela glicose é inibida pelo sorbitol e a oxidação do complexo enzima-NADPH pela frutose é inibida pela gliconolactona. A etapa limitante é provavelmente a dissociação da gliconolactona do complexo enzima-NADPH-lactona (HARDMAN *et al.*, 1992), que é cerca de 250 vezes mais rápida que a reação inversa. Deste modo, mesmo sem a atividade da gliconolactonase, a reação é fisiologicamente irreversível (HARDMAN e SCOPES, 1988).

Embora a especificidade pela glicose e frutose seja alta, a afinidade por estes substratos é baixa, principalmente pela frutose. Enquanto a glicose liga-se à enzima sob a forma de um anel piranosídico, a frutose é reduzida como uma molécula de cadeia aberta. Uma vez que esta forma de frutose está presente em apenas 0,01 % de frutose total, mostrando a baixa afinidade por este substrato (ZACHARIOU e SCOPES, 1986). Quanto à glicose, a forma β é preferível em relação à α como substrato da GFOR. A Figura 2.5 traz uma representação da ação da GFOR sobre os substratos na forma em que são consumidos. Os valores encontrados para k_f e k_g foram de 400 mM e 10,8 mM, respectivamente, evidenciando, assim, a baixa afinidade pela frutose, cerca de 40 vezes menor que pela glicose (HARDMAN e SCOPES, 1988).

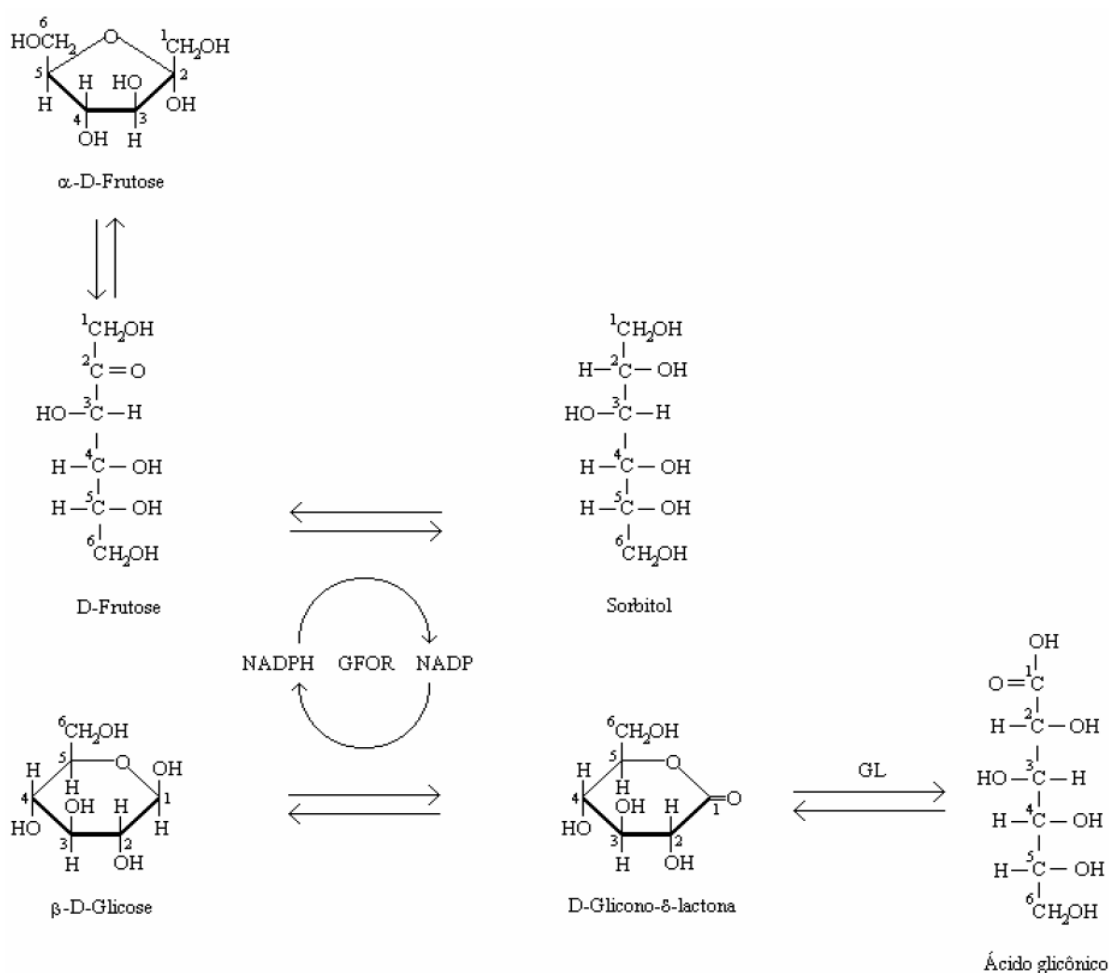


Figura 2.5 – Representação do mecanismo de ação da GFOR sobre os compostos na forma em que eles são metabolizados (HARDMAN e SCOPES, 1988).

As enzimas GFOR e GL de *Zymomonas mobilis* não necessitam de indução por ambos os substratos, glicose e frutose, estando presentes em células cultivadas apenas em glicose ou frutose, indicando que são enzimas constitutivas. Contudo, a atividade da GFOR varia de acordo com as condições de crescimento, sendo maior para os meios contendo apenas glicose como fonte de carbono a uma concentração de 20 % de glicose. A GL não tem a sua atividade alterada por diferentes concentrações de açúcares (ZACHARIOU e SCOPES, 1986).

A atividade enzimática é definida como a quantidade de substrato que é transformado em um tempo determinado. Corresponde à quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato, por minuto, nas condições definidas da reação (temperatura, pH, o sistema tampão utilizado e as concentrações de substratos e co-fatores) (REGULY, 2000). Os trabalhos que serão mostrados ao longo deste capítulo não se referem a atividade enzimática da enzima GFOR e sim a taxas específicas de formação de sorbitol e ácido glicônico

A GFOR catalisa a oxidação de várias aldoses a ácidos aldônicos correspondentes, bem como a redução de várias cetoses aos seus respectivos polióis. SATORY *et al.* (1997) testaram vários substratos alternativos para a reação de oxidação catalisada pela GFOR, onde a frutose foi utilizada como substrato acceptor de elétrons e vários outros substratos (monossacarídeos e dissacarídeos) foram empregados como doadores de elétrons. Os resultados obtidos pelos autores são mostrados na Tabela 2.2. Através destes resultados, pode-se verificar que, apesar de uma grande faixa de substratos pode ser utilizada pela GFOR para a produção dos seus ácidos correspondentes, a afinidade por estes é baixa.

O uso da GFOR para a síntese de sorbitol e ácido glicônico, bem como outros ácidos aldônicos, como por exemplo, o ácido lactobiônico, é muito promissor porque a enzima é capaz de converter prontamente soluções de açúcares extremamente concentradas. O limite destas concentrações é dado pela viscosidade atingida no meio reacional que, se muito alta, dificulta a homogeneização do mesmo. Segundo NIDETZKY *et al.* (1997) concentrações de glicose e frutose a 3 M são convertidas completamente pela enzima, entretanto o uso potencial da GFOR livre é limitado por sua inativação durante a conversão destes substratos.

Tabela 2.2 – Resultados das reações de oxidação catalisada pela GFOR (50 h, 30 °C, pH 6,2) empregando vários substratos como doadores de elétrons e frutose (1 M) como acceptor de elétrons (SATORY *et al.*, 1997).

Monossacarídeos (1 M)	Produtos	Conversão (%)	Dissacarídeos (0,5 M)	Produtos	Conversão (%)
D-glicose	ácido glicônico	84	Maltose	ácido maltobiônico	30
D-xilose	ácido xilônico	42	Celobiose	ácido celobiônico	15
D-galactose	ácido galactônico	35	Lactose	ácido lactobiônico	9
L-arabinose	ácido arabiônico	18			
D-manose	ácido manônico	18			

O processo de inativação, principalmente em proteínas oligoméricas como a GFOR, é geralmente complexo e de difícil interpretação. Inicialmente, sugeriu-se uma correlação cinética entre o consumo dos substratos, ação catalítica e a inativação da GFOR, pois se verificou que a enzima se desativa rápida e irreversivelmente ao longo da reação catalítica e, sob condições idênticas, permanece estável, se a reação não é realizada, por exemplo, quando um dos substratos não se encontra no meio reacional (GOLLHOFER *et al.*, 1995). As diferenças na natureza das reações catalisadas pela GFOR indicam a necessidade de mudanças conformacionais como um requerimento mecanístico (FURLINGER *et al.*, 1998). Enquanto a D-glicose se liga à enzima como um anel piranosídico e é oxidada a um produto também cíclico, a gliconolactona, a frutose se liga como uma molécula de cadeia aberta, conduzindo à formação de um produto acíclico, o sorbitol (ZACHARIOU e SCOPES, 1986). GOLLHOFER *et al.* (1995) já suspeitavam que a gliconolactona desempenhasse um papel importante no processo de inativação da enzima, mas não conseguiram estudar esta influência, pois a gliconolactona formada era rapidamente hidrolisada.

Segundo GOLLHOFER *et al.* (1995), um rápido decréscimo da atividade da GFOR só foi verificado na presença de ambos os substratos, glicose e frutose, e

concomitantemente com formação enzimática dos produtos (sorbitol e gliconolactona). Desta forma, a inativação da enzima está estritamente relacionada à sua ação catalítica. Assim, nenhuma perda de atividade foi detectada após os substratos terem sido consumidos e não foi possível a obtenção de 100 % de conversão em experimentos onde altas concentrações de substratos foram empregados devido à rápida perda de atividade da enzima.

NIDETZKY *et al.* (1997) também acharam crítica a inativação da GFOR. Estudaram a influência da base usada para neutralizar o ácido produzido durante a reação e observaram que quando bases fracas (tris, imidazol, carbonato de sódio) ou bases fortes a baixas concentrações (NaOH, KOH) eram empregadas, observava-se uma maior estabilidade da enzima. Além disso, o efeito causado pelo emprego da base tris ou imidazol sobre a estabilização da atividade enzimática foi muito mais acentuado do que o obtido com a adição do ditiotreitól. Concluíram que o uso da GFOR solúvel é inadequado devido à sua baixa estabilidade. A escolha da base é de menor importância quando células permeabilizadas são empregadas.

SATORY *et al.* (1997) utilizaram a GFOR na produção de sorbitol e ácido lactobiônico a partir da frutose e lactose. Como a afinidade por estes substratos é baixa, para que uma alta conversão seja alcançada, é necessário uma elevada concentração de enzima ou um alto tempo de residência em um modo de operação contínuo. Estes autores usaram a BSA (albumina de soro bovino) com o intuito de prevenir a agregação da GFOR durante a conversão dos substratos, ditiotreitól para prevenir a oxidação dos grupos tiol e a base tris para a neutralização do ácido formado e conseguiram, assim, manter a estabilidade da enzima por mais de 150 horas.

FURLINGER *et al.* (1998) observaram que na ausência de substrato a GFOR purificada era estável. No entanto, ao iniciar a reação através da adição dos ocorria uma rápida e irreversível perda da atividade. Se a adição era feita a 0 °C, enquanto não havia consumo dos substratos, não era observada inibição. Através de medidas de fluorescência, verificaram que as interações da GFOR com as lactonas induziam mudanças conformacionais no sítio ativo da enzima e que, enquanto nenhum resíduo de cisteína estava exposto na enzima livre, estes eram encontrados no complexo enzima-lactona. A exposição do primeiro resíduo e sua posterior desativação leva a exposição dos 3 resíduos restantes (são quatro ao todo, um por subunidade) iniciando um processo de desativação que inclui modificações químicas e mudanças conformacionais. O

processo culmina com a formação de agregados inativos. A seqüência de inativação da GFOR está ilustrada na Figura 2.6.

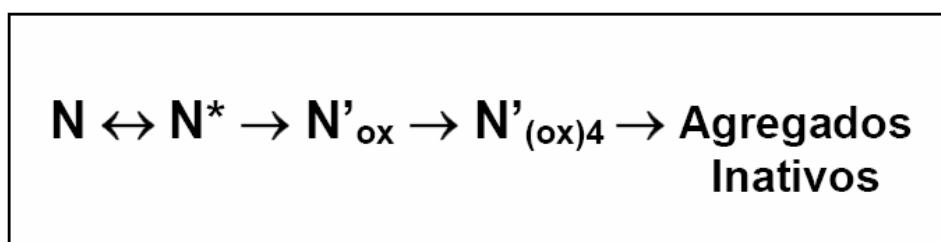


Figura 2.6 – Modelo para o processo de inativação da GFOR. N é a enzima ativa, N* é o complexo enzima-lactona, com mudanças conformacionais, N'ox e N'(ox)4 são os intermediários com 1 e 4 resíduos cisteína expostos, respectivamente, que ainda retém atividade enzimática (FURLINGER *et al.*, 1998).

A Figura 2.6 apresenta o mecanismo proposto por FURLINGER *et al.* (1998) para inativação da GFOR e os compostos estabilizantes empregados na sua estabilização onde N corresponde à conformação da GFOR livre ou ligada a glicose, à frutose ou ao sorbitol e é mais estável que N*. N* é a conformação modificada da proteína no complexo GFOR-gliconolactona. N'ox e N'(ox)4 são os intermediários, o N'ox apresenta 1 resíduo de cisteína desativado e 3 expostos e N'(ox)4 possui 4 resíduos de cisteína desativados, por subunidade de proteína, mas com atividade enzimática. Em N*, a desativação de um resíduo cisteína exposto inicia um processo seqüencial e irreversível e leva à perda de atividade enzimática.

Os resultados obtidos anteriormente por GOLLHOFER *et al.* (1995) e NIDETZKY *et al.* (1997) se encaixam dentro deste mecanismo proposto por FURLINGER *et al.* (1998). Eles empregavam ditiotreitól, tioglicolato ou mercaptoetanol como agentes estabilizantes. Isso pode ser explicado pelo fato de que os grupos tiol (-SH), presentes na cisteína, quando expostos são altamente reativos, formando ligações bissulfeto. A adição de agentes como o ditiotreitól inibem a formação destas ligações (FURLINGER, 1998).

A baixa estabilidade da enzima isolada aliada aos gastos com a sua extração e com os requerimentos para estabilizá-la, que aumentam o custo de produção, favorecem o uso de sistemas empregando células permeabilizadas. A seguir, serão dados detalhes sobre a técnica da permeabilização celular.

2.4.2 - Permeabilização Celular

Duplas camadas de lipídio constituem a base estrutural das membranas biológicas. As interações não covalentes entre os lipídeos da camada tornam a membrana flexível. Estes lipídeos correspondem a 40 % da membrana, enquanto que a fração restante é composta de proteína. A membrana citoplasmática representa uma barreira à passagem de certos compostos e à exclusão de metabólitos para o exterior da célula (HAPALA, 1997).

A bactéria Gram-negativa ilustrada na Figura 2.7 possui, além da membrana citoplasmática, uma membrana externa que consiste de fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS). Entre a membrana externa e a membrana citoplasmática está uma fina camada de peptidoglicano, formando o suporte para o envelope celular. O espaço periplásmico na bactéria Gram-negativa está entre a membrana plasmática e a membrana externa, principalmente entre a membrana externa e a camada de peptidoglicano. De forma a liberar as enzimas e proteínas do espaço periplásmico, a barreira de permeabilidade (membrana externa) deve ser enfraquecida (ABUD, 2005).

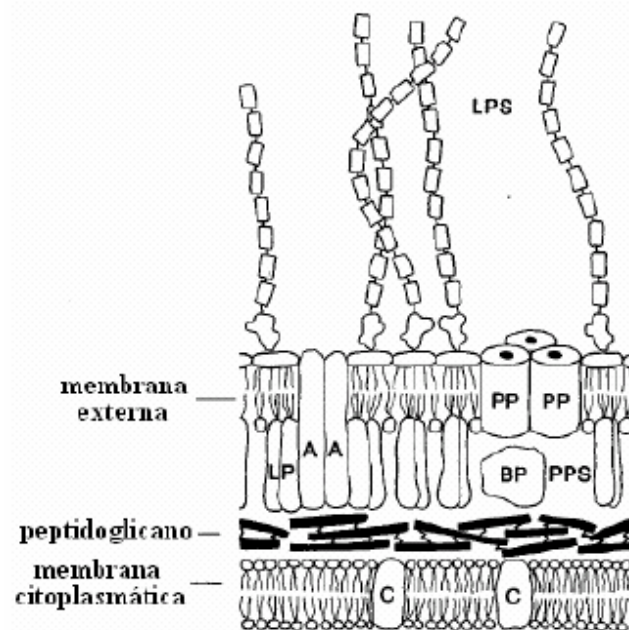


Figura 2.7 – Apresentação esquemática do envelope celular de bactéria Gram-negativa. A – membrana externa; BP – proteína de ligação; C – proteína embutida na membrana citoplasmática; LP – lipoproteína; LPS – lipopolissacarídeo; PP – porina; PPS – espaço periplásmico (SIKKEMA *et al.*, 1995).

Estas diferenças entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas influenciam na técnica de permeabilização a ser empregada, pois, no caso das bactérias Gram-negativas, o agente permeabilizante a ser utilizado deve alcançar a membrana citoplasmática, além da membrana externa, para que os compostos existentes no citoplasma também possam ser liberados (FONSECA, 2003).

A escolha do procedimento de permeabilização depende do organismo e da composição da membrana e da parede celular. O tipo de reação a ser investigada também é importante. O uso de compostos orgânicos, como solventes (hexano, tolueno, xileno, benzeno, éter), detergentes não-iônicos (Triton), catiônicos (CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio) e aniônicos (SDS – dodecil sulfato de sódio) e agentes quelantes (EDTA – ácido etileno diaminotetracético) para a liberação das enzimas periplásmicas pode ser vantajoso no que se refere ao custo do processo, causando permeabilização seletiva das barreiras da parede celular e permitindo preparação em larga escala das enzimas periplásmicas numa forma relativamente pura. No que diz respeito aos solventes orgânicos pouca informação está disponível sobre os efeitos das suas propriedades físico-químicas, como a atividade, durante os processos de permeabilização celular (ABUD, 2005).

Se células intactas de *Zymomonas mobilis* são utilizadas, os substratos glicose e frutose são convertidos a sorbitol, que se acumula no meio, e a ácido glicônico, que é convertido via rota de Entner-Doudoroff a etanol e a outros subprodutos de baixas concentrações, conforme mostra o mecanismo representado na Figura 2.8 (CHUN e ROGERS, 1988). A permeabilização de células de *Zymomonas mobilis* atua na remoção de cofatores solúveis e de compostos de alta energia (ATP) que são necessários para a conversão do ácido glicônico, bloqueando, assim, a ação de outras enzimas envolvidas no metabolismo dos açúcares (CHUN e ROGERS, 1988; PARK e KIM, 1990).

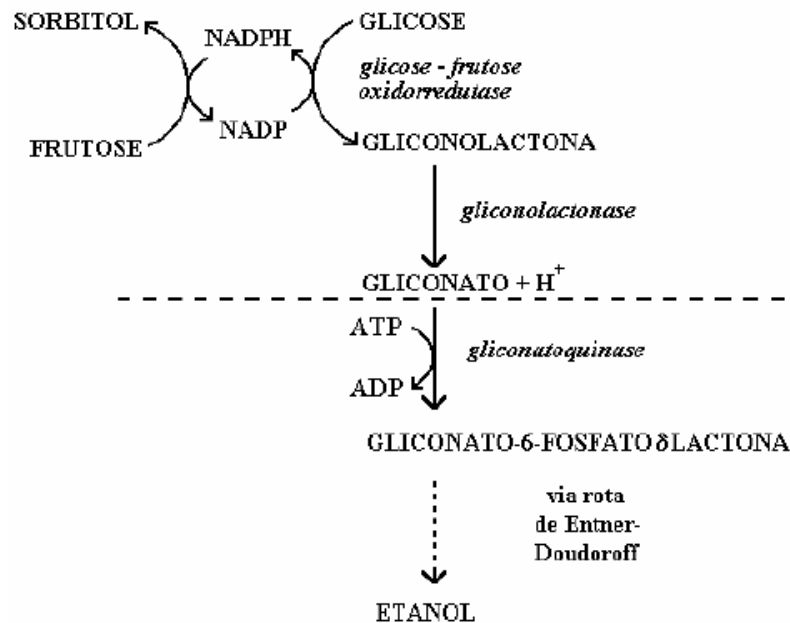


Figura 2.8 - Rota empregada pela *Zymomonas mobilis* na produção de sorbitol e ácido glicônico, usando as enzimas GFOR e GL, e a posterior conversão do ácido glicônico a etanol (FERRAZ, 1999).

O procedimento de permeabilização descrito por REHR *et al.* (1991) para a bactéria *Zymomonas mobilis* com o detergente catiônico CTAB é mais utilizado (WILBERG, 1995; FERRAZ, 1999; FONSECA, 2003; ABUD, 2005; CARRA *et al.*, 2005). As células tratadas com detergentes catiônicos apresentam atividade da GFOR praticamente igual à dos extratos enzimáticos, o que indica completa permeabilização, já que esta é uma enzima intracelular, localizada no periplasma da célula. Dentre os detergentes catiônicos que impedem a formação de etanol, o CTAB (0,1% (m/v) por 10 minutos) é o que apresenta os melhores resultados de permeabilização (REHR *et al.*, 1991).

A Figura 2.9 mostra o efeito sobre as células de *Zymomonas mobilis*. A fotografia das células, feita por microscópio eletrônico de transmissão, antes (a) e depois (b) da permeabilização, mostra a distinção entre o conteúdo citoplasmático causado pela perda de componentes intracelulares (WILBERG *et al.*, 1997).

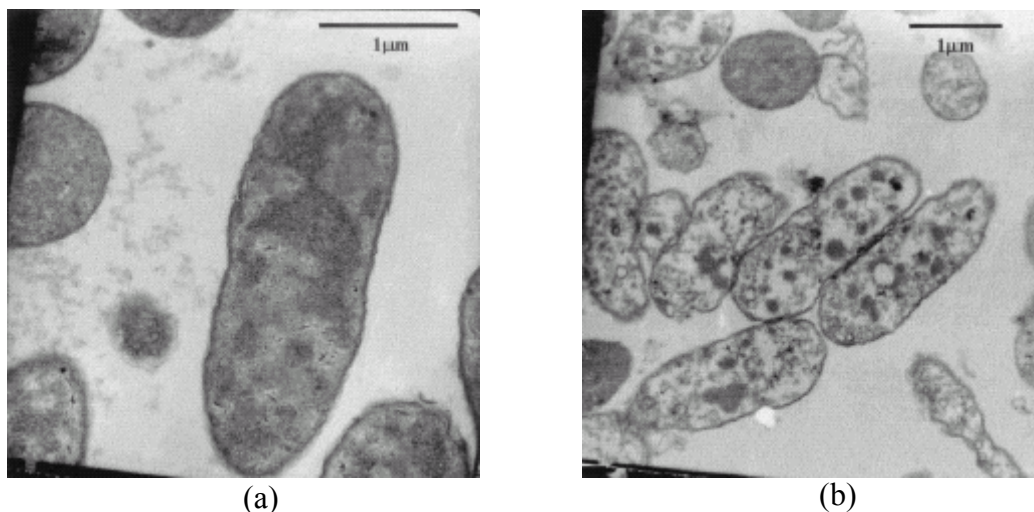


Figura 2.9 – Microfotografia eletrônica de transmissão da bactéria *Zymomonas mobilis* antes da permeabilização (a) e depois da permeabilização (b) (WILBERG *et al.*, 1997).

2.4.3 – Imobilização Celular

Na década de 70 o conceito de enzimas imobilizadas foi estabelecido como sendo enzimas que estão fisicamente confinadas numa certa região ou ligadas a uma matriz, de forma que sua atividade catalítica esteja preservada total ou parcialmente e que possam ser usadas continua e repetidamente (MELO *et al.*, 2005). A utilização de células imobilizadas em bioprocessos é um desenvolvimento relativamente recente e tem apresentado uma série de vantagens como: possibilidade de utilização de altas concentrações celulares no volume reacional; eliminação de ciclos externos de células; provável obtenção de maiores fatores de conversão de substrato ao produto desejado; um melhor controle do processo; redução no custo operacional; uma melhor uniformidade do produto, além de se poder trabalhar com altas taxa de diluição sem que haja arraste da cultura (FONSECA, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2005).

Sistemas com células imobilizadas possuem uma barreira adicional à difusão para muitos substratos que é a membrana celular, quando comparados com sistemas de enzimas imobilizadas. Em processos nos quais a células não viáveis podem ser empregadas, como é o caso da síntese enzimática do sorbitol e ácido glicônico pela GFOR, este problema pode ser contornado através da permeabilização celular, que pode resultar na perda de atividade celular, mas na conservação da atividade enzimática.

Além disso, a permeabilização evita que os produtos formados se acumulem dentro das células permeabilizadas (BRODELIUS e VANDAMME, 1984).

O método de oclusão em gel é o mais amplamente empregado na imobilização celular. Neste utiliza-se frequentemente um agente de reticulação como o glutaraldeído, que melhora a retenção das células e estabiliza o gel formado na presença de células. Cerca de 100 % das células são imobilizadas, entretanto, nem todas estão disponíveis para a reação, devido a limitações difusionais. A depender do tipo de suporte utilizado, o mecanismo envolvido no confinamento pode ser meramente físico, enquanto que com outros polímeros tais como pectina e carragenato são formadas adicionalmente ligações covalentes entre a célula e o suporte. O uso de suportes sintéticos como os géis de poliacrilamida pode resultar na perda de viabilidade celular devido à sua toxicidade. Contudo, a porosidade destes géis pode superar os problemas difusionais (FONSECA, 2003).

Nos últimos 10 anos, os reatores de membranas têm recebido grande atenção para a produção de uma variedade de produtos, devido principalmente à possibilidade de usar o catalisador na forma solúvel ou insolúvel (TOMOTANI e VITOLLO, 2006). O confinamento de células em membranas de fibras ocas tem sido usado como uma técnica de imobilização alternativa e promissora. Obviamente, os poros das membranas tem que ter um tamanho menor que o das células e, além disso, oferecer baixa resistência ao transporte dos produtos e do substrato (FERRAZ *et al.*, 2001). Algumas das vantagens da imobilização de células em membranas de fibras ocas são (FERRAZ, 1999):

- Apresenta uma alta produtividade volumétrica, consequência da grande densidade de empacotamento;
- Possibilita a separação simultânea dos produtos;
- Evita perda das células;
- O módulo é facilmente reaproveitado;
- Menores custos de esterilização, pois muitas fibras são esterilizáveis quimicamente.

Nos biorreatores com membranas, o biocatalisador usualmente está presente em duas formas: imobilizado ou confinado nos da membrana. No primeiro caso, a

imobilização do biocatalisador diretamente na membrana pode ser obtida por ligação química ou adsorção. No último caso, a membrana é usada para reter o biocatalisador solúvel (PRAZERES e CABRAL, 1994). Como exemplo desta aplicação, SATORY *et al.* (1997) avaliaram um sistema para a produção de sorbitol e ácido lactobiônico, em um reator do tipo CSTR acoplado a uma unidade de ultrafiltração, onde o catalisador, a enzima GFOR purificada, é retida e então recirculada.

2.4.4 – Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico por Células Permeabilizadas e Imobilizadas de *Zymomonas mobilis*

As vantagens decorrentes da permeabilização e da imobilização das células de *Zymomonas mobilis* tornaram a produção enzimática do sorbitol e ácido glicônico um processo de grande potencial comercial. Serão mostrados a seguir na Tabela 2.3 o resumo de alguns artigos relevantes relacionados a produção de sorbitol e ácido glicônico por células permeabilizadas e imobilizadas de *Zymomonas mobilis*.

A Tabela 2.3 mostra as diferentes condições empregadas, como por exemplo, estudos relacionados aos diferentes agentes permeabilizantes para as células de *Zymomonas mobilis*, os métodos de imobilização empregados (oclusão em gel e confinamento em membranas de fibras ocas), diferentes concentrações de açúcares, além de reportar os diferentes modos de operação do sistema (batelada ou contínuo), bem como a integração da etapa de reação e separação do ácido glicônico por eletrodiálise.

Tabela 2.3 – Resumo de alguns artigos relevantes sobre a produção de sorbitol e ácido glicônico pela enzima GFOR.

Autor / Produtos	Condições	Resultados	Observações
CHUN e ROGERS (1988)	Células livres (permeabilizadas com tolueno) e imobilizadas em alginato de cálcio. Concentração dos açúcares foram de 300 g/L e pH mantido em 6,2.	células livres 1,41 g _{sorbitol} /g _{célula} .h	Limitações difusionais decorrentes da imobilização. Formação de etanol, devido a permeabilização ineficiente.
		células imobilizadas 1,17 g _{sorbitol} /g _{célula} .h	
Sorbitol e Ácido Glicônico	Realização de cinco bateladas consecutivas, com 100 g/L de açúcares a uma taxa de diluição de 0,085 h ⁻¹ , para avaliar a estabilidade da enzima GFOR em células livres e imobilizadas em alginato de cálcio.	7,6 g _{sorbitol} /L.h 7,2 g _{gliconato} /L.h.	Pequena perda de atividade após 120 h de reação
PATERSON et al. (1988)	Células permeabilizadas com tolueno e imobilizadas em uma membrana de fibra oca, operado continuamente, com uma concentração de 100 g/L de cada substrato.	10-20 g _{sorbitol} /L.h.	Pequena desativação da enzima após 250 h de reação.
REHR <i>et al.</i> (1991)	Células livres (perm. com CTAB) e imobilizadas em κ-carragenato. Concentração dos açúcares foram de 300 g/L e pH mantido em 6,2.	células livres: 1,8 g _{sorbitol} /g _{célula} .h - 2,1 g _{gliconato} /g _{célula} .h células imobilizadas 1,4 g _{sorbitol} /g _{célula} .h - 1,8 g _{gliconato} /g _{célula} .h	Limitações difusionais devido a imobilização. Sem formação de etanol, mostrando que a permeabilização utilizada foi eficiente.

Tabela 2.3 – Resumo de alguns artigos relevantes sobre a produção de sorbitol e ácido glicônico pela enzima GFOR (continuação).

Autor / Produtos	Condições	Resultados	Observações
WILBERG (1995) Sorbitol e Ácido Glicônico	Células livres (perm. com CTAB), com o pH mantido em 6,2, e as concentrações de cada substrato variaram de 100 a 400 g/L	As taxas variaram de 1,50 a 3,54 g _{gliconato} /g _{célula} .h.	Os resultados evidenciaram uma maior afinidade da enzima GFOR pela frutose.
FERRAZ (1999) Sorbitol e Ácido Glicônico	Imobilização das células (permeabilizadas com CTAB) em alginato de cálcio e um módulo de membranas de fibras ocas com o pH mantido 6,2 e os substratos a 100 g/L. Realização do acoplamento do biorreator de membrana a unidade de eletrodialise para a remoção simultânea do ácido glicônico formado durante a reação.	células confinadas no módulo de membranas 33 g _{gliconato} /g _{proteína} .h células imobilizadas em alginato de cálcio 4 g _{gliconato} /g _{proteína} .h	O ácido glicônico foi eficientemente removido ao realizar a acoplamento. Observou-se uma maior estabilidade à enzima, permitindo uma operação por mais de 60 horas sem nenhuma diminuição da atividade enzimática.
SILVEIRA <i>et al.</i> (1999) Sorbitol e Ácido Glicônico	Células livres (permeabilizadas com CTAB), com o pH mantido em 6,2, e as concentrações de cada substrato variando de 100 a 750 g/L em razão equimolar.	Rendimento de máximo de 91 % (8 horas) com produtividades de 1,6 e 1,5 g/g _{cel} .h para o ácido glicônico e sorbitol, para os substratos a 650 g/L.	Para concentrações superiores a 650 g/L não foi observado nenhuma melhora adicional no Rendimento.
FONSECA (2003) Sorbitol e Ácido Glicônico	Células imobilizadas (permeabilizadas com CTAB) em κ-carragenato, em um reator do tipo cesta agitada a 200 rpm e 200 g/L de cada substrato.	0,83 g _{gliconato} /g _{célula} .h.	Este trabalho mostrou o esquema operacional utilizado agrega estabilidade e reprodutibilidade ao sistema enzimático.

Tabela 2.3 – Resumo de alguns artigos relevantes sobre a produção de sorbitol e ácido glicônico pela enzima GFOR (continuação).

Autor / Produtos	Condições	Resultados	Observações
ERZINGER e VITOLLO (2006) Sorbitol e Ácido Glicônico	Foram utilizadas células livres (permeabilizadas com CTAB e intactas) e células imobilizadas em alginato de cálcio, o pH foi mantido em 6,2 com de adição de NaOH, e a concentração dos substratos foram de 100 g/L.	O ácido glicônico e o sorbitol tiveram Produtividades iguais e correspondentes a 177,1 (células livres e não permeabilizadas), 112,7 (células livres e permeabilizadas) e 93,7 g/L.h (células imobilizadas em alginato de cálcio)	
SATORY <i>et al.</i> (1997) Sorbitol e Ácido Lactobiônico	Utilizou sistemas em modo batelada, batelada alimentado e contínuo, utilizando a enzima purificada e os substratos a 0,5 M. O pH foi mantido em 6,2. No modo contínuo o sistema fez uso de uma membrana de UF com massa molecular de corte de 10 kDa e com um tempo de residência de 16,7 horas.	Modo batelada: rendimento maior que 95 % em um tempo de 60 horas. Modo batelada alimentada: a conversão foi mantida a um valor constante de 90 % por mais de 150 horas. No modo contínuo uma conversão estável de 44 % foi obtida, com uma produtividade de 110 g/L.dia durante 3 dias.	
CARRA <i>et al.</i> (2005) Sorbitol e Ácidos Aldônicos	As aldoses utilizadas nos ensaios glicose, maltose, lactose e galactose, contendo 240 mL de solução 0,7 M de frutose/aldose e 25 g/L de células livres (permeabilizadas com CTAB). O pH foi mantido em 6,4.	Rendimentos de 95 e 86 %, respectivamente para os ácidos glucônico e altobiônico, e de 80 % para o lactobiônico e galactônico. A máxima velocidade de formação de produto, medida nas primeiras horas de processo, foi de 0,49 mol/L.h (ácido glucônico), 0,16 mol/L.h (ácido maltobiônico), 0,12 mol/L.h (ácido galactônico) e 0,095 mol/L.h (ácido lactobiônico).	Afinidades decrescentes do complexo enzimático foram observadas com misturas de frutose com glicose, maltose, galactose e lactose.

2.5 – Processo de Separação por Membranas

A integração das etapas de produção e separação, visando reduzir o tempo e os custos de processamento, é fundamental para a consolidação dos processos biotecnológicos (SCHÜGERL e HUBBUCH, 2005). Ácidos orgânicos, como, por exemplo, os ácidos láctico, glicônico, succínico e cítrico, são intensamente usados na indústria de alimentos e química. Para se obter estes ácidos com as propriedades requeridas para seu uso final, é necessário utilizar vários estágios de separação. Os processos tradicionais têm sido projetados com um ou vários estágios de precipitação, os quais produzem uma grande quantidade de efluentes com altas concentrações de sais. De modo a reduzir este impacto ambiental, os processos de separação por membranas surgem como uma rota alternativa para a produção destes ácidos (NAGARALE *et al.*, 2006).

Os processos de separação por membranas vêm despertando um crescente interesse para aplicações industriais em áreas de alta tecnologia como a biotecnologia e nanotecnologia, em vários processos de purificação. Estes processos têm como vantagens o baixo consumo de energia e o fácil escalonamento. Os avanços na tecnologia de membranas, especialmente em novos materiais, podem tornar esta tecnologia mais competitiva do que os processos tradicionais que requerem intensa energia e são ambientalmente desfavoráveis (NAGARALE *et al.*, 2006).

A eletrodialise é um método promissor e com muitas perspectivas de uso devido ao desenvolvimento dos processos de separação por membranas durante as décadas de 80 e 90 (HÁBOVÁ *et al.*, 2004). A eletrodialise, em muitos casos, é um processo de separação bastante eficiente quando componentes carregados precisam ser separados a partir de determinadas soluções. A eletrodialise tem sido utilizada em várias aplicações industriais, como por exemplo, na recuperação de ácidos, recuperação de metais pesados e tratamento de água (NAGARALE *et al.*, 2004, WANG *et al.*, 2006).

2.5.1 – Eletrodialise

Eletrodialise é um processo que se baseia no transporte seletivo de íons através de uma membrana devido ao gradiente de potencial elétrico aplicado entre as membranas contendo grupos iônicos fixos. Na eletrodialise, quando uma diferença de potencial é aplicada em uma solução salina, os íons positivos (cátions) migram para o eletrodo

negativo (o catodo), enquanto que os íons negativos (ânions) migram para o eletrodo positivo (o anodo). Moléculas neutras não são afetadas por essa força motriz e, conseqüentemente, os componentes iônicos podem ser separados. Membranas contendo grupos iônicos fixos em sua estrutura são utilizadas para controlar a migração dos íons. Essas membranas são eletricamente condutoras (BASTOS, 2005).

O princípio do processo de separação por eletrodialise é ilustrado na Figura 2.10, que apresenta o esquema de uma montagem típica de uma célula de eletrodialise, mostrando uma das formas mais comuns de eletrodialise utilizada para dessalinização e deionização. Membranas catiônicas e aniônicas são colocadas alternadamente entre um catodo e um anodo, cada par formando uma célula individual. Os ânions não passam pela membrana carregada negativamente, assim como os cátions não atravessam a membrana carregada positivamente. Fazendo que a concentração de espécies iônicas diminua na alimentação, gerando uma corrente diluída, e ao mesmo tempo uma corrente concentrada em espécies iônicas vai sendo gerada como ilustra a figura (BAKER, 2004).

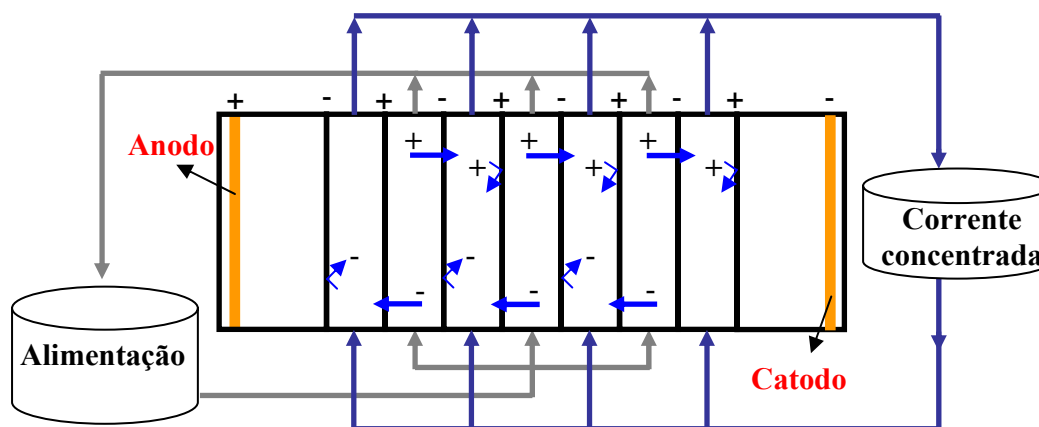


Figura 2.10 – Esquema ilustrando o princípio da eletrodialise.

O desempenho dos processos de eletrodialise em aplicações práticas não está somente relacionado com as propriedades da membrana, mas também com os parâmetros de processo, tais como vazão de de alimentação e projeto da célula e do espaçador. Esses parâmetros afetam diretamente o custo do processo. O principal arranjo utilizado nos eletrodialisadores é denominado de placa-quadro, conforme ilustrado na Figura 2.11. Em geral, um sistema de eletrodialise industrial pode conter de

200 a 1000 membranas de troca aniônicas e catiônicas formando 100 a 500 pares de célula.

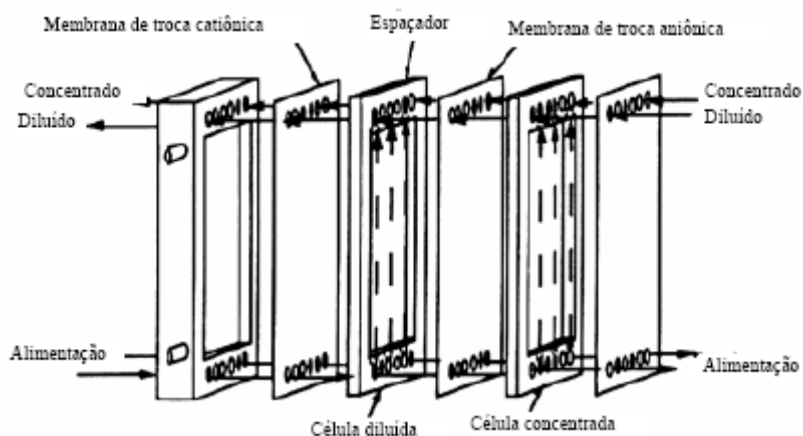


Figura 2.11 – Eletrodializador utilizando um esquema de célula tipo placa-quadro (STRATHMANN, 1995).

Uma das principais dificuldades em um eletrodializador é assegurar uma distribuição uniforme da vazão de alimentação nos vários compartimentos. Essa distribuição é fundamental no controle da polarização da concentração e da formação de incrustações (“fouling”) na membrana. A polarização da concentração conduz a uma diminuição de íons na camada limite próximo à superfície da membrana, na célula contendo a solução diluída, e um aumento de íons na camada limite próximo da superfície da membrana, na célula contendo a solução concentrada. A intensidade do efeito de polarização da concentração é determinada pela densidade da corrente elétrica, pelas características da célula, pelo modelo do espaçador e pela velocidade de escoamento das soluções diluídas e concentradas. Para reduzir a polarização da concentração e os efeitos relacionados à formação de incrustações, a distribuição da vazão de alimentação da solução deve ser uniforme através de cada compartimento. Neste sentido, o espaçador deve promover o máximo de agitação na corrente de alimentação e causar o mínimo de perda de carga (STRATHMANN, 1995).

2.5.2 – Membranas de Troca Iônica

O desenvolvimento dos processos baseados em membranas de troca iônica começaram em 1890 com o trabalho de Ostwald, que estudou as propriedades de

membranas semipermeáveis e descobriu que as membranas podem ser impermeáveis para alguns eletrólitos. Em 1911, Donnan desenvolveu uma equação matemática para descrever a concentração de equilíbrio, que foi denominado de “potencial de exclusão de Donnan”. Em 1930, Söllner apresentou a idéia de membranas anfóteras, ambas contendo grupos iônicos carregados positivamente e negativamente e mostrando distintas propriedades no transporte de íons. Em torno de 1940, interesses na aplicação industrial levaram ao desenvolvimento de uma membrana de troca iônica sintética com base na policondensação do fenol-formaldeído. Ainda na década de 40, Meyer e Strauss propuseram um processo de eletrodialise no qual membranas aniônicas e catiônicas são colocadas de maneira alternadas em séries para formar vários compartimentos paralelos da solução entre os dois eletrodos (XU, 2005).

Juda e McRae da Ionics Inc., em 1950 desenvolveram uma membrana de troca iônica estável, altamente seletiva e com baixa resistência elétrica, e isso fez com que a eletrodialise baseada em membranas de troca iônica fosse rapidamente utilizada em processos industriais para a desmineralização e concentração de soluções eletrolíticas. Desde então as membranas de troca iônica e eletrodialise têm sido melhoradas e amplamente usadas em muitos campos. Por exemplo, em 1960, a primeira produção de sal a partir da água do mar foi realizada pela empresa Asahi Co. utilizando membranas seletivas para íons monovalentes; em 1969, o termo eletrodialise inversa foi introduzido, referindo-se a um modo de operação no qual a unidade trabalha por um grande período sem a precipitação ou deposição de sal sobre as membranas e eletrodos; em 1970, uma membrana trocadora de cátions quimicamente estável baseada em politetrafluoretileno foi desenvolvida pela Dupon, denominada Nafion®, sendo usada em larga escala a produção industrial de álcalis e estocagem de energia ou sistemas de conversão (células combustíveis) (XU, 2005).

Através do desenvolvimento de novas membranas de troca iônica com melhor seletividade, baixa resistência elétrica e melhores propriedades mecânicas, térmicas e químicas, surgiram outras aplicações além da dessalinização da água do mar. Elas vêm ganhando um amplo campo de interesse na indústria de alimentos, medicamentos e processos químicos bem como na biotecnologia e no tratamento de água (XU, 2005).

Uma importante característica das membranas de troca iônica é a sua permeabilidade aos contra íons e a sua impermeabilidade aos co-íons (íons com a mesma carga do grupo fixado na membrana), conforme pode ser observado na Figura 2.12 (NUNES e PEINEMANN, 2001).

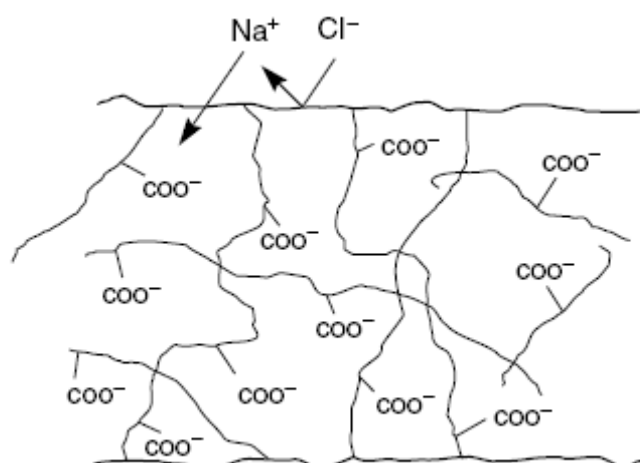


Figura 2.12 – Membrana catiônica com grupos carboxílicos fixados na matriz polimérica, sendo permeável a cátions como o sódio e impermeável a ânions como os cloretos (BAKER, 2004).

Os parâmetros importantes para a caracterização de membranas de troca iônica são as propriedades hidrofóbica e hidrofílica da matriz polimérica, a distribuição de densidade de cargas e a morfologia da própria membrana. Todos esses parâmetros não somente determinam as propriedades mecânicas, como também possuem uma influência considerável na sorção de eletrólitos e não eletrólitos. A dificuldade na otimização das propriedades de membranas de troca iônica ocorre porque, geralmente, os parâmetros que favorecem uma determinada propriedade têm efeitos opostos sobre as demais. Por exemplo, um alto grau de reticulação confere maior resistência mecânica à membrana, mas também aumenta a resistência elétrica. Uma alta concentração de cargas iônicas fixadas na matriz da membrana resulta em uma baixa resistência elétrica, mas, em geral, causa um alto grau de inchamento combinado com redução na estabilidade mecânica (BASTOS, 2005).

2.5.3 – Aplicações

As aplicações da eletrodialise para a indústria de alimentos e biotecnologia incluem a desmineralização do suco da cana de açúcar, dessalinização de soro do queijo usado na formulação de sorvetes, bolos, pães e molhos, desacidificação de suco de frutas e estabilização de vinhos (NAGARALE *et al.*, 2006).

Ácido tartárico, por exemplo, pode ser recuperado a partir de águas residuais da indústria de sucos (ANDRÉS *et al.*, 1997). Os ácidos acético e propiônico, produzidos durante fermentação usando *Propionibacterium* (WEIER *et al.*, 1992) podem ser recuperados do meio fermentativo. O ácido fenilacético, um subproduto indesejável da hidrólise da penicilina G, a qual é matéria-prima na fabricação das penicilinas semi-sintéticas, também pode ser removido do meio reacional (CHEN *et al.*, 1995). Muitos aminoácidos podem ser separados e concentrados usando esta técnica (KIKUCHI *et al.*, 1995).

FERRAZ *et al.* (2001) avaliaram a produção de sorbitol e ácido glicônico por uma unidade de eletrodialise acoplada a um reator com células permeabilizadas e imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. Os resultados apresentados pelos autores mostraram que a unidade de eletrodialise acoplada ao biorreator permitiu uma eficiente remoção do ácido glicônico do meio reacional, bem como uma melhora na estabilidade da enzima, não sendo observada nenhuma redução da taxa de reação, mesmo depois de 60 horas de reação. Por outro lado, quando o NaOH foi aplicado para neutralizar o ácido glicônico produzido, verificou-se uma redução de 80 % da taxa de reação no mesmo período. Com base nos resultados, os autores formularam uma hipótese de que a estabilidade da enzima está associada com o acúmulo de gliconato no meio reacional.

É na produção do ácido láctico, dentre todos os ácidos produzidos por fermentação, que a eletrodialise tem sido mais estudada. BOYAVAL *et al.* (1987) usaram *Lactobacillus helveticus* para produzir ácido láctico, que era convertido em lactato de sódio pela adição de hidróxido de sódio, empregado para manter o pH em 5,5. O lactato formado era, então, removido por eletrodialise. Já HONGO *et al.* (1986) usaram *Lactobacillus delbrueckii* mas, diferentemente, o pH do meio era controlado pela remoção contínua do ácido produzido por eletrodialise, sem necessitar da adição de neutralizante.

A eletrodialise pode ser usada também para converter o lactato produzido em ácido láctico (NARABSKA e KURANTOWICZ, 1998). Neste caso, o uso de membranas bipolares é mais adequado. Membranas bipolares são importantes instrumentos para obtenção de ácidos e bases a partir de seus sais correspondentes (STRATHMANN, 1995). O funcionamento de uma unidade empregando membranas bipolares é ilustrado na Figura 2.13.

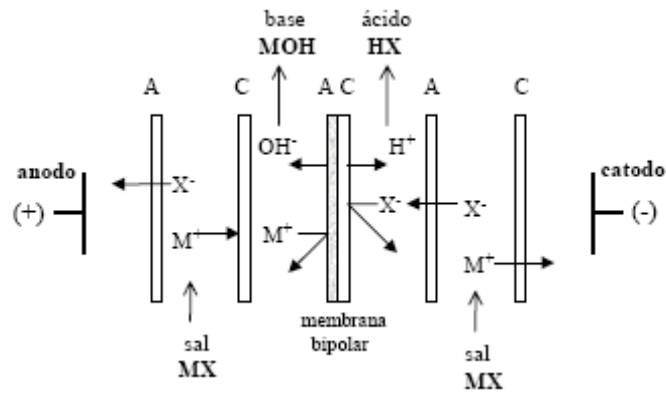


Figura 2.13 - Disposição de uma unidade de eletrodialise contendo uma membrana bipolar para a produção de ácido e base a partir do sal correspondente (FERRAZ, 1999).

HÁBOVÁ *et al.* (2004) utilizaram um método de eletrodialise em dois estágios, sendo no primeiro estágio realizado a concentração do lactato de sódio usando membranas de troca iônica. No segundo estágio foi feita a conversão do lactato de sódio a ácido láctico por eletrodialise com membranas bipolares. O ácido láctico foi recuperado tanto a partir de soluções modelos bem como a partir do caldo fermentado. As tentativas com soluções modelos tiveram como objetivo determinar as condições satisfatórias para os experimentos de eletrodialise e também a investigação do tempo de duração do processo sob diferentes condições. Antes dos experimentos de eletrodialise, o meio fermentado foi pré-tratado por ultrafiltração visando a remoção de cor e de íons metálicos multivalentes. Após o primeiro estágio da eletrodialise, a concentração obtida do lactato foi de 175 g/L e, após o segundo estágio, a concentração final do ácido láctico regenerado foi de 151 g/L.

WANG *et al.* (2006) estudaram a remoção de ácidos orgânicos (ácido adípico e butírico) a partir de efluentes salinos oriundos da manufatura do ciclohexanona utilizando apenas eletrodialise com membranas de troca aniônica. Com base nos resultados obtidos, observou-se que a utilização da eletrodialise para a remoção desses ácidos se mostrou tecnicamente viável quando comparado à destilação, pelo fato de não ocorrer mudança de fase e pelo baixo consumo de energia.

PERETTI (2006) avaliou a utilização de técnica de eletrodialise como uma alternativa para a separação de ácido lactobiônico a partir de soluções contendo frutose, lactose e sorbitol, provenientes do processo biotecnológico catalisado pela enzima GFOR de *Zymomonas mobilis*. Estes experimentos foram feitos em um sistema de eletrodialise contendo três compartimentos. No compartimento intermediário era

adicionada a solução de ácido lactobiônico proveniente da conversão e nos outros compartimentos eram colocadas as soluções de NaCl para os eletrodos. Foram utilizados apenas um par de membranas de troca iônica separados por uma distância de 7 cm. Neste trabalho foram avaliadas diferentes voltagens aplicadas à unidade de eletrodiálise, sendo 15 V a melhor condição, tendo uma recuperação de 38,7 % em 250 min para uma solução sintética de ácido lactobiônico a 20 g/L. Já a recuperação do ácido lactobiônico proveniente de uma solução contendo todos os componentes do ensaio de conversão (lactose, frutose e sorbitol) foi de 14 % no mesmo período.

Neste capítulo foi observado que grande parte dos estudos que empregam a enzima GFOR presente nas células de *Zymomonas mobilis*, estão relacionados à produção sorbitol e ácido glicônico. De acordo com JONAS e SILVEIRA (2004), este bioprocesso é inviável devido ao baixo valor agregado do ácido glicônico, entretanto, é possível tornar viável este bioprocesso produzindo um ácido aldônico de maior valor agregado, como o ácido lactobiônico, que é cerca de 70 vezes mais caro que o ácido glicônico. Diante disso, os objetivos específicos desta pesquisa são:

- Avaliar a influência das células provenientes de diversos meios de cultivo da bactéria *Zymomonas mobilis* sobre a taxa de formação do ácido lactobiônico e sorbitol catalisada pela enzima GFOR, bem como avaliar a reprodutibilidade e repetibilidade dos experimentos;
- Estudar o efeito do pH, temperatura, concentração de células e de açúcares, sobre a taxa de formação do ácido lactobiônico e sorbitol através de um planejamento experimental;
- Estudar a influência da vazão de circulação e o modo de confinamento das células sobre a taxa de formação do ácido lactobiônico e sorbitol catalisada pela enzima GFOR no biorreator à membrana;
- Avaliar alguns parâmetros importantes sobre a taxa de remoção do ácido lactobiônico no sistema de eletrodiálise, através de um planejamento experimental;
- Realizar a integração do processo através do acoplamento do sistema reacional ao sistema de separação.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Microorganismo e Manutenção

O microorganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Zymomonas mobilis* linhagem CP4 (ATCC 31821), fornecida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. A manutenção foi feita em um meio de cultivo contendo 5 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de glicose. Após a inoculação, as células eram incubadas por 24 horas a 30 °C e, então, estocadas a 4 °C.

Neste trabalho foram avaliados 8 meios de crescimento para a realização das fermentações, cuja composição pode ser vista na Tabela 3.1. Como é possível observar, foram utilizados meios ricos e meios com composição definida, variando em alguns a concentração de glicose no meio de cultivo, com objetivo de avaliar a influência deste componente durante as reações enzimáticas. Não foi avaliado nenhum meio com concentração de glicose acima de 150 g/L devido à inibição por substrato (ERZINGER *et al.*, 2003).

As soluções de glicose e a de cada um destes sais apresentados na Tabela 3.1 foram esterilizadas separadamente a 121°C por 20 minutos e misturadas a frio, assepticamente. A solução de sulfato ferroso teve o seu pH ajustado para 3,0 a fim de se evitar a precipitação do mesmo.

Tabela 3.1 – Composição dos meios.

Nutrientes	Meio 1 ¹	Meio 2 ²	Meio 3A	Meio 3B ³	Meio 4A ⁴	Meio 4B	Meio 5A ⁵	Meio 5B
Glicose (g/L)	100,00	100,00	100,00	150,00	100,00	150,00	100,00	150,00
Extrato de Levedura (g/L)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	---	---
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	1,00	1,00	2,00	2,00	---	---	---	---
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,50	1,00	1,00	1,00	---	---	2,00	2,00
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1,00	---	3,50	3,50	---	---	3,50	3,50
Pantotenato de cálcio (g/L)	---	0,01	---	---	---	---	0,005	0,005
FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	---	---	0,01	0,01	---	---	0,005	0,005
Citrato de sódio (g/L)	---	---	0,20	0,20	---	---	---	---
NH ₄ Cl (g/L)	---	---	---	---	---	---	1,00	1,00
K ₂ HPO ₄ (g/L)	---	---	---	---	---	---	1,75	1,75
ZnSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	---	---	---	---	---	---	0,0012	0,0012
MnSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	---	---	---	---	---	---	0,0007	0,0007
KCl (g/L)	---	---	---	---	---	---	0,008	0,008
NaCl (g/L)	---	---	---	---	---	---	0,008	0,008

1 – ERZINGER *et al.*, 2003; 2 – WILBERG *et al.*, 1995; 3 – ERZINGER & VITOLO, 2006; 4 – FERRAZ *et al.*, 2001; 5 – ALVES, 1993; A – meios com 100 g/L de glicose; B – meios com 10 g/L de glicose; mesma composição dos meios 4, 3 e 5, respectivamente, variando apenas a concentração de glicose.

3.2 – Cultivo

Células de *Zymomonas mobilis* foram cultivadas a 30 °C, sem agitação e sem controle de pH. O preparo do inóculo para cada meio foi feito padronizando-se o tempo de cultivo, como mostra a Figura 3.1. A inoculação das células foi feita em 18 h de cultivo para todos os meios de crescimento, utilizando-se um inóculo a 5 e 10 % (v/v) para os meios com 100 e 150 g/L, respectivamente.

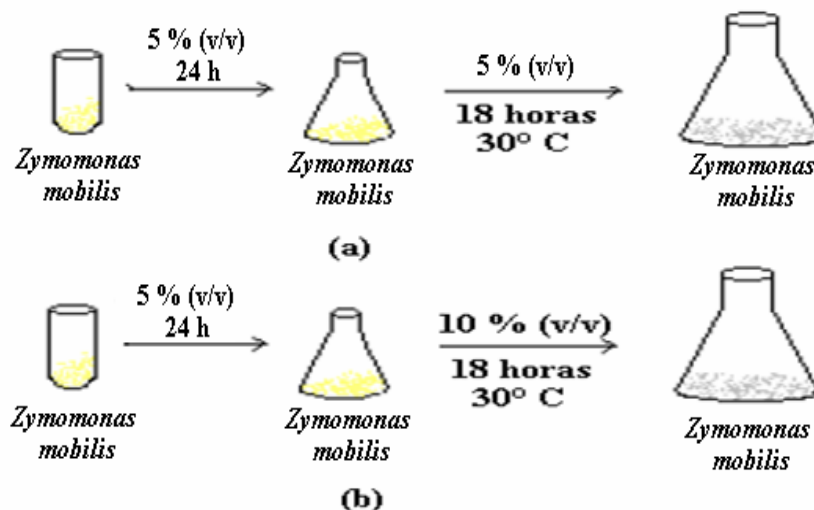


Figura 3.1 – Esquema de preparo de inóculo e cultivo: (a) procedimento utilizado para os meios contendo 100 g/L de glicose, (b) procedimento utilizado para os meios contendo 150 g/L de glicose.

Para avaliar a influência dos diferentes meios de cultivo sobre a taxa enzimática de formação do ácido lactobiônico catalisada por células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*. Os estudos cinéticos foram feitos de acordo com o diagrama da Figura 3.2, avaliando-se a reprodutibilidade e a repetitividade dos experimentos.

A reprodutibilidade de experimentos se refere ao grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando. Desta forma, para cada meio de cultivo, foram feitas três fermentações, avaliando-se a variabilidade induzida por cada fermentação sobre a taxa de reação enzimática.

A repetitividade dos ensaios se refere ao grau de concordância entre os resultados das reações enzimáticas realizadas em triplicata para cada fermentação, sendo efetuadas sob as mesmas condições de medição.

Assim, para a avaliação dos meios de cultivo foram realizadas três fermentações distintas, e com as células provenientes de cada uma das fermentações foram realizadas três reações enzimáticas, totalizando nove reações para cada meio.

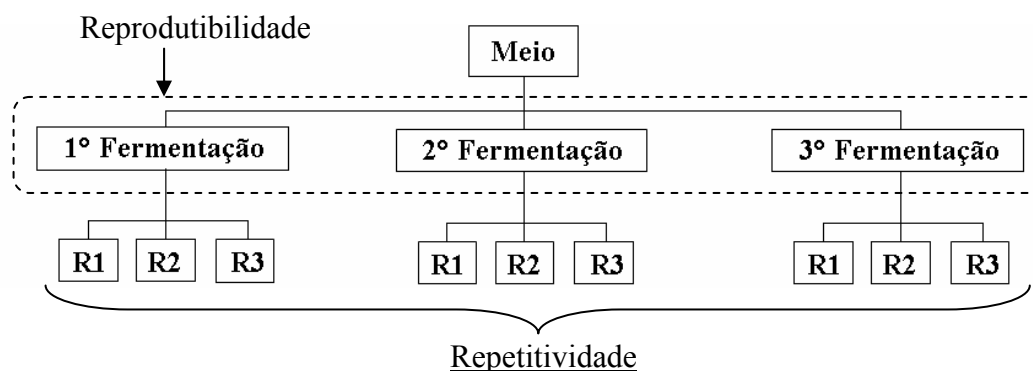


Figura 3.2 – Diagrama para avaliação da reprodutibilidade e repetitividade.

3.3 – Permeabilização Celular

Após a fermentação, as células foram centrifugadas a 11.682 g (10.000 rpm) por 10 min (centrífuga Jouan CR3i), sendo em seguida permeabilizadas com brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB) em uma proporção de 0,04 g_{CTAB}/g_{célula} (REHR *et al.*, 1991). A suspensão foi homogeneizada e mantida sob agitação constante através de um agitador magnético por 30 minutos à temperatura ambiente, em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em água, com pH ajustado para 6,2.

3.4 – Metodologia Analítica

3.4.1 – Concentração Celular

A concentração celular para cada meio estudado foi determinada através da medida de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240), convertida para concentração através de uma curva de calibração obtida por gravimetria (massa seca). Para a análise da massa seca, após a fase exponencial de crescimento, 3 alíquotas de 50 mL de cada meio de cultivo foram retiradas sob agitação constante e centrifugadas por 10 minutos a 11.682 g (10.000 rpm). As células foram ressuspensas com cerca de 4 mL de água e transferidas para recipientes previamente pesados, e sendo submetida à secagem em estufa a 85 °C, durante 24 horas, até a massa ficar constante.

3.4.2 – Concentração dos substratos e produtos

O monitoramento da concentração de lactose durante as reações enzimáticas foi realizado a partir de alíquotas retiradas do meio reacional que foram posteriormente centrifugadas e logo após analisadas por um método enzimático. Para isto foi utilizada a enzima β -Galactosidase (Sigma G5160-25 KU) para promover a quebra de lactose em galactose e glicose, sendo em seguida utilizado o kit de Glicose SL da CELM (Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos). Este kit é composto de reativo tampão fenol/fosfato pH 7,4, de uma solução estabilizada de enzimas glicose-oxidase, peroxidase e 4-aminofenazona e de uma solução padrão de glicose de 100 mg/dL.

A metodologia utilizada por SANCHEZ-MANZANARES *et al.* (1993), para determinar lactose a partir de um método enzimático, foi modificada neste trabalho. Eram adicionados 80 μ L de amostra, 20 μ L de água destilada, 200 μ L de tampão citrato a pH 6,6 e 50 μ L de uma solução contendo a enzima β -Galactosidase com 3000 UA/mL. As amostras permaneciam em agitação constante durante 1 hora em agitador orbital (Certomat *MOII*, B. Braun Biotech International) a 25 °C e 400 rpm; após esse período, adicionava-se a cada tubo 1,0 mL do reativo do kit de Glicose SL, incubando-os a 37 °C por 10 minutos, e procedendo-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm.

As concentrações de produtos e reagentes envolvidos na reação enzimáticas foram determinadas a partir da massa de NaOH adicionada ao reator para fazer o controle do pH. Além dessa metodologia, foi utilizada também a cromatografia líquida de alta performance para determinar estes componentes. Foi utilizado um HPLC da Shimadzu (DGU-20A5), usando uma coluna para ácidos orgânicos SCR 102-H e pré-coluna SCR-N (Shimadzu), dotada de um detector de índice de refração. A fase móvel era água ultrapura (obtida em aparelho Milli-Q) a uma vazão de 0,6 mL/min até 8,7 minutos, após isso a vazão foi diminuída para 0,05 mL/min de 8,7 a 9,1 e mantida a 0,05 mL/min até 11,5 minutos, retornando em seguida para 0,6 mL/min, a temperatura da coluna 80 °C.

Nos experimentos utilizando o sistema de eletrodialise, a concentração de ácido lactobiônico foi também monitorada indiretamente pela condutividade da alimentação (condutivímetro Quimis), por permitir uma medida rápida e em linha.

As curvas de calibração para cada uma das metodologias empregadas, bem como o detalhamento das mesmas, encontram-se no Apêndice A.

3.5 – Confinamento das Células em Membranas de Fibras Ocas

Os módulos de membranas de microfiltração utilizados para o confinamento das células permeabilizadas foram fornecidos pela empresa PAM Membranas Seletivas LTDA (RJ). As dimensões típicas dos módulos eram de 25 cm de comprimento, com diâmetro interno do módulo de 2,2 cm, área de permeação de 0,06 m², 100 fibras. A permeabilidade hidráulica situava-se em torno de 100 L/h.m².bar para um efluente saído do tratamento biológico, a uma pressão de 0,5 bar e vazão de 2,9 L/h (dados fornecidos pela PAM Membranas Seletivas).

Quanto ao confinamento das células, dois tipos de configurações podem ser utilizados. No primeiro tipo (Figura 3.3 (A)), as células são aprisionadas no interior das fibras cujas extremidades são, então, vedadas. O substrato é circulado por fora, juntamente com os produtos formados. Em outro modo (Figura 3.3 (B)), a suspensão concentrada de células é introduzida no espaço externo às fibras e as saídas são obstruídas. A alimentação ocorre por dentro das fibras (Ferraz, 1999). Ambas as configurações são ilustradas na Figura 3.3.

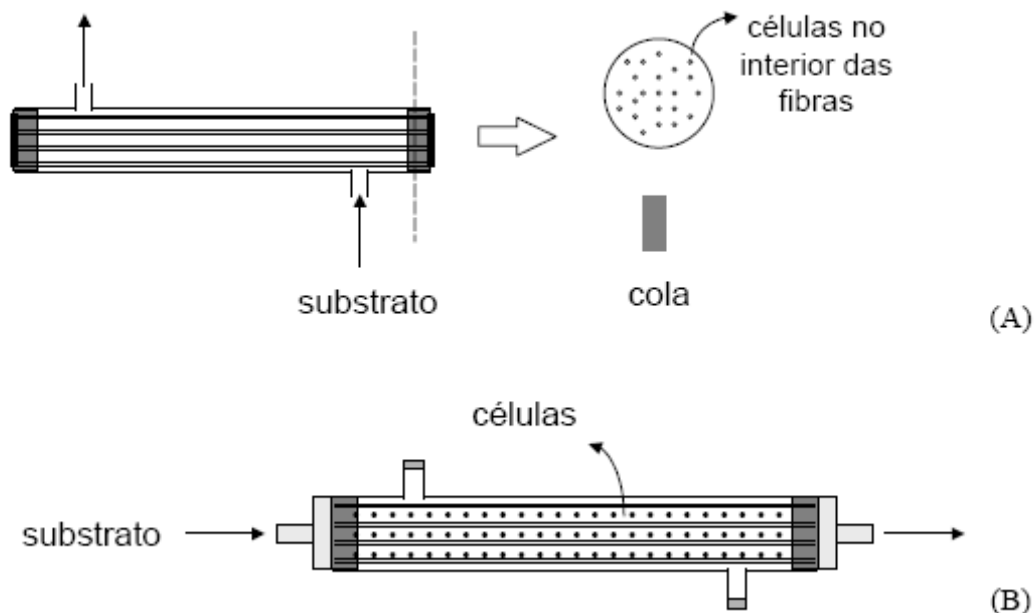


Figura 3.3 - Modos de confinamento das células no módulo de fibra oca. (A) células confinadas no interior das fibras, (B) células confinadas no exterior das fibras (FERRAZ, 1999).

Como o módulo utilizado é de microfiltração, as células possuem um tamanho maior que o dos poros da membrana, ficando retidas na região em que foram confinadas. As moléculas de substrato difundem-se através dos poros da membrana para o compartimento adjacente onde são convertidas pelo biocatalisador, e os produtos difundem-se de volta, recirculando com o substrato não convertido.

3.6 – Unidade de Eletrodiálise

Uma célula de eletrodiálise foi projetada e construída, consistindo de 9 compartimentos feitos de acrílico, separados por membranas de troca iônica, com uma área efetiva total de 226,2 cm², como mostra a Figura 3.4. Entre cada um dos compartimentos, era colocado um anel de vedação, afim de evitar problemas com vazamentos. A unidade de eletrodiálise era composta por 4 membranas de troca catiônica e 4 de troca aniônica, colocadas alternadamente e separadas por um distância de 7 mm cada. Foram empregadas membranas de troca catiônica e aniônica fornecidas pela empresa Hidrodex LTDA e também membranas da Ionics (CR 67 HMR-412 e AR 204 SZRA-412) (GE Waters).

De acordo com a Figura 3.4, nos testes em batelada, a alimentação (1) contendo soluções sintéticas de frutose, lactose, sorbitol e ácido lactobiônico (volume total de 150 mL) era bombeada para os canais 5, 7 e 9. Como a frutose, lactose e sorbitol são moléculas sem cargas, as mesmas não são atraídas pelas membranas de troca iônica, saindo pela corrente diluída (2), enquanto que ácido lactobiônico permeia para os compartimentos 4, 6, 8 e 10, saindo pela corrente concentrada (12), sendo recolhido no tanque (15). A corrente concentrada continha, inicialmente, apenas água destilada. Todo o sistema era mantido em recirculação com o auxílio de duas bombas (Cole Parmer, modelo Gear Pump Console Drive), uma para cada corrente. No compartimento dos eletrodos (3 e 11), que comportavam cerca de 400 mL cada, foram utilizadas soluções de NaCl em diferentes concentrações, como será mostrado no Capítulo IV. Uma diferença de potencial era aplicada aos eletrodos de carbono (13 e 14) usando uma fonte de corrente contínua (Instrutherm, modelo FA-3050), gerando corrente elétrica. A Figura 3.5 mostra a foto da unidade de eletrodiálise utilizada nos experimentos.

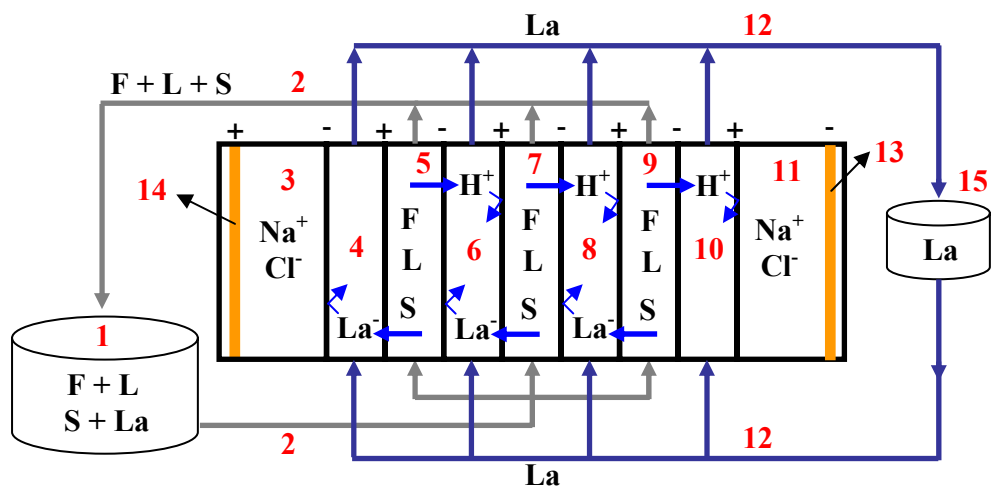


Figura 3.4 – Representação esquemática da célula de eletrodialise usada nos experimentos. A alimentação (1) é feita nos compartimentos 5, 7 e 9, sendo os compostos não-iônicos retirados na corrente diluída (2), enquanto que o ácido lactobiônico é removido pelos compartimentos 4, 6, 8 e 10, saindo pela corrente concentrada (12) para o tanque (15). A voltagem era aplicada aos eletrodos de carbono (13 e 14) que ficam imersos no compartimento da solução eletrolítica (3 e 11).

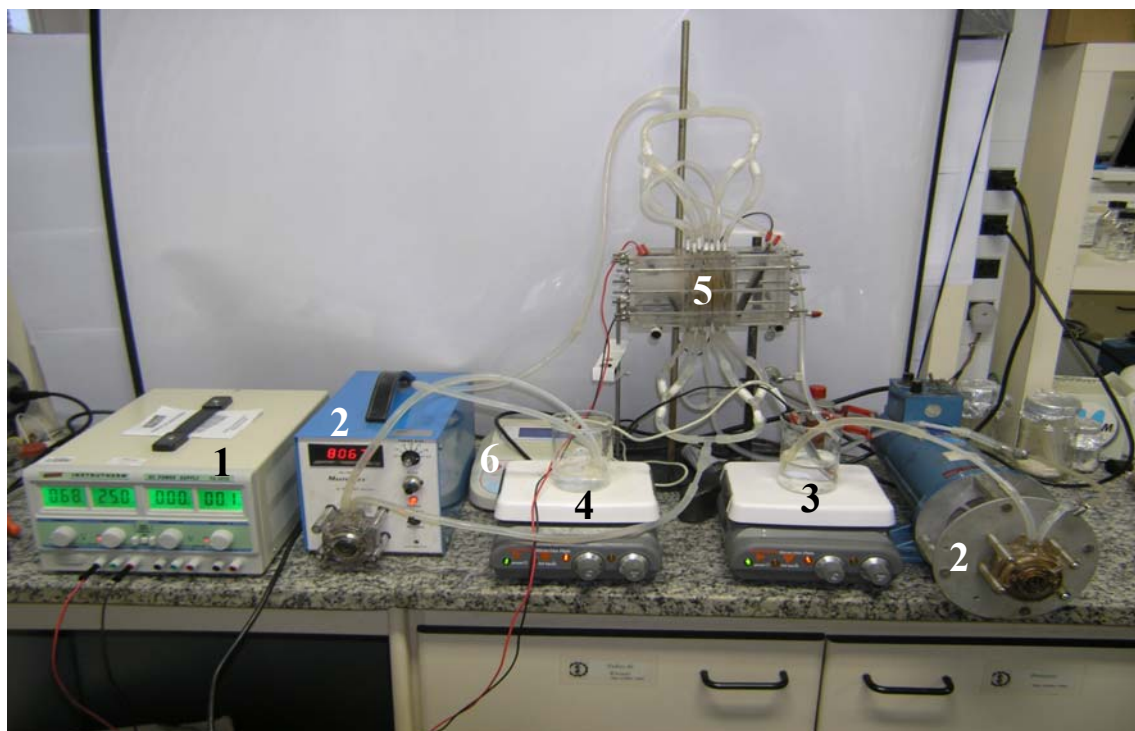


Figura 3.5 – Fotografia da unidade de eletrodialise utilizada nos experimentos onde: 1 – fonte de corrente contínua; 2 – bomba; 3 – alimentação (corrente diluída); 4 – permeado (corrente concentrada); 5 célula de eletrodialise; 6 – condutivímetro

Em alguns estudos do sistema integrado, foi utilizada, também, uma unidade comercial de eletrodialise (PCCell, modelo GmbH ED 64-0-02), contendo 10 pares de membranas com uma área total de 1280 cm², separadas por uma distância de 0,5 mm uma da outra, contendo eletrodos de titânio cobertos com platina.

3.7 – Estudos Cinéticos

3.7.1 – Células Livres

As reações envolvendo células livres foram realizadas com soluções equimolares de lactose (50 g/L) e frutose (25 g/L), que eram introduzidas no reator encamisado mantido à temperatura constante de 39 °C, controlado por um banho termostático (Haake, modelo Fisions DC3). Para iniciar a reação, as células livres eram adicionadas ao meio sob agitação constante, de forma a se obter uma concentração final de células de 10 g/L. O volume do meio reacional foi de 30 mL e valor do pH do meio reacional foi mantido em 6,2 e controlado por um pHmetro (Chemcadet, modelo 565200) acionava uma bomba peristáltica (Masterflex, modelo 77120-50), adicionando uma solução de hidróxido de sódio de concentração conhecida. As adições da solução de NaOH eram registradas por uma por uma balança digital (OHAUS Explorer).

As condições apresentadas anteriormente para os estudos cinéticos com células livres foram adotadas na etapa de avaliação dos meios de cultivo. Após estabelecer qual o melhor meio de cultivo, foi realizado um planejamento experimental, tendo como variáveis: pH, temperatura, concentração de açúcares e de células. As Figuras 3.6 e 3.7 mostram o esquema e uma foto, respectivamente, do sistema utilizado nos estudos com células livres.

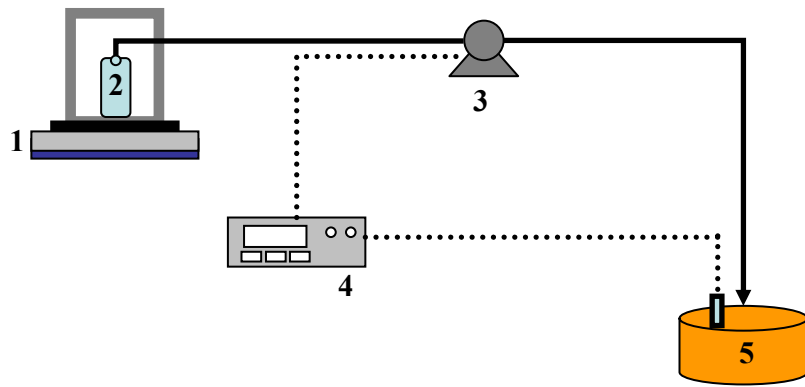


Figura 3.6 – Arranjo esquemático utilizado nos estudos com células livres, onde: 1 – balança; 2 – solução de NaOH; 3 – bomba; 4 – sistema de controle de pH; 5 – biorreator.



Figura 3.7 – Foto do sistema utilizado nos estudos com células livres, onde: 1 – balança; 2 – solução de NaOH; 3 – bomba; 4 – placa de agitação; 5 – sistema de controle de pH; 6 – banho termostático; 7 – biorreator encamisado.

3.7.2 – Células Confinadas no Módulo de Fibras Ocas

Nas reações envolvendo as células confinadas em fibras ocas, como pode ser visto na Figura 3.8 e 3.9, a solução dos substratos era circulada com o auxílio de uma bomba (Cole Parmer, modelo Gear Pump Console Drive) através do módulo de fibras ocas, ligado a um rotâmetro (Conaut, modelo 440), retornando para o tanque de alimentação. O controle de pH era realizado da mesma forma como descrito anteriormente para células livres.

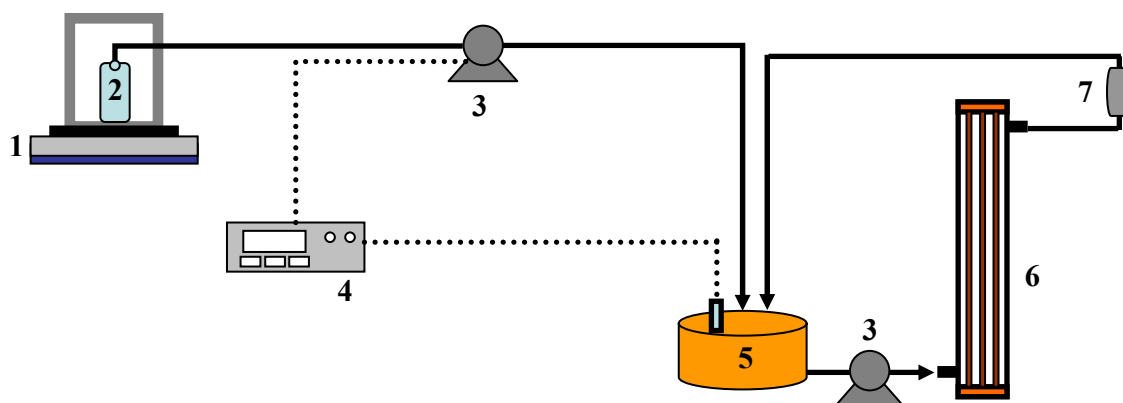


Figura 3.8 – Arranjo esquemático utilizado nos estudos com células confinadas em fibra oca, onde: 1 – balança; 2 – solução de NaOH; 3 – bomba; 4 – sistema de controle de pH; 5 – tanque de alimentação; 6 – biorreator de membrana; 7 – rotâmetro.

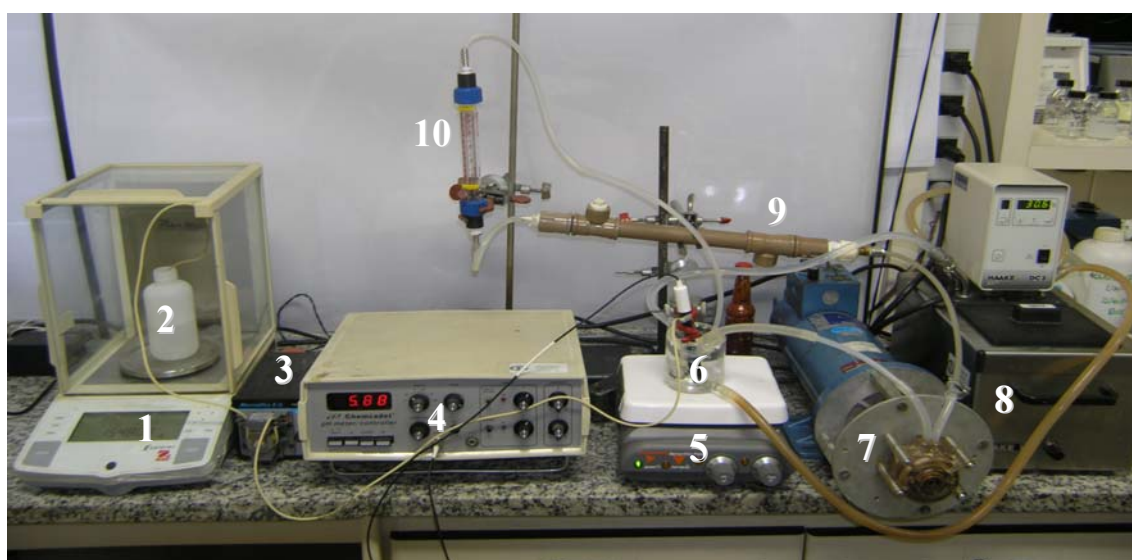


Figura 3.9 – Fotografia sistema utilizado nos estudos com células confinadas em fibras ocas, onde: 1 – balança; 2 – solução de NaOH; 3 – bomba; 4 – sistema de controle de pH; 5 – placa de agitação; 6 – tanque de alimentação; 7 – bomba peristáltica; 8 – banho termostático; 9 – biorreator de membrana; 10 – rotâmetro.

A etapa do sistema de reação e separação acoplado é ilustrado na Figura 3.10. Inicialmente, uma solução de lactose (L) e frutose (F) contida no tanque de alimentação (1) era bombeada para o módulo de membranas (2) produzindo sorbitol (S) e ácido lactobiônico (La), que entravam na unidade de eletrodialise, juntamente com os substratos não reagidos, promovendo a separação do ácido lactobiônico do meio reacional.

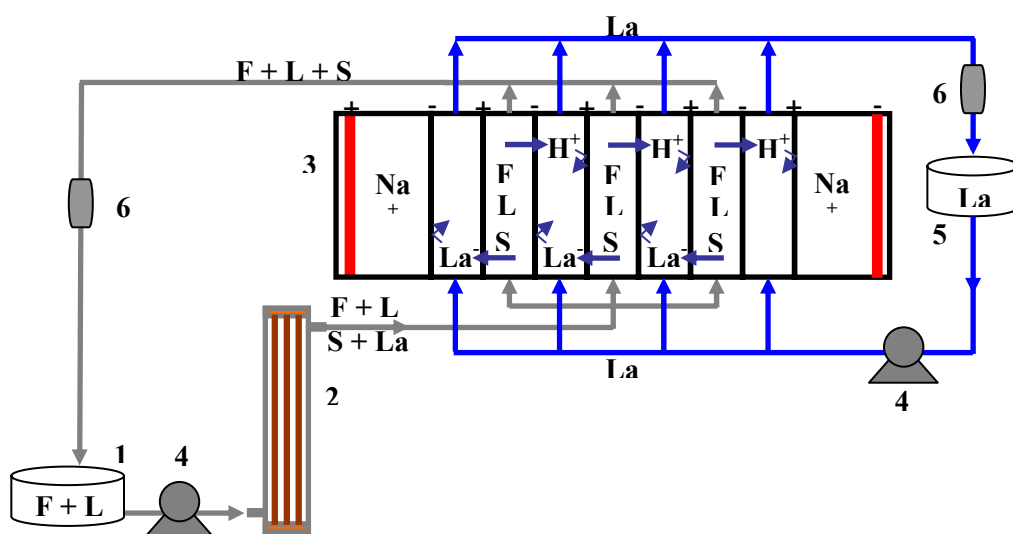


Figura 3.10 - Acoplamento das etapas de reação e separação, onde: 1 – tanque de alimentação; 2 – biorreator de membranas; 3 – unidade de eletrodialise; 4 – bomba; 5 – tanque contendo ácido lactobiônico; 6 – rotâmetro.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, serão mostrados os resultados relativos à avaliação dos meios de cultivo, com o objetivo de selecionar o meio de cultivo que proporciona uma maior produção da enzima GFOR com base na avaliação estatística dos dados obtidos, além de verificar a reprodutibilidade e repetitividade do sistema. Após a escolha do melhor meio de cultivo, foi feito planejamento experimental para as reações enzimáticas utilizando células livres e permeabilizadas de *Zymomonas mobilis* para avaliar quais as melhores condições de pH, temperatura, concentração de células e açúcares. Após estas determinações, os estudos relacionados à imobilização das células no biorreator foram feitos com o intuito de verificar a influência da vazão de circulação, bem como a melhor forma de confinamento das células no módulo de fibras ocas. Posteriormente, foram determinadas as melhores condições de remoção do ácido lactobiônico através de um planejamento experimental no sistema de eletrodialise. Por fim, foi feito o acoplamento dos sistemas de reação e separação.

4.1 – Quantificação da Lactose

De acordo com os trabalhos realizados no Laboratório de Bioprocessos COPPE/UFRJ, bem como alguns outros trabalhos encontrados na literatura que estudaram a produção de sorbitol e ácido glicônico a partir de frutose e glicose utilizando células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*, é possível quantificar os reagentes e produtos envolvidos apenas com o consumo de base adicionada ao meio reacional para fazer o controle do pH (WILBERG, 1995; FERRAZ, 1999; FONSECA, 2003; ERZINGER e VITOLO, 2006). Devido ao fato de se tratar de uma reação equimolar, o número de moles de NaOH consumido para neutralizar o ácido glicônico é idêntico ao de formação de um dos produtos, seja sorbitol ou ácido glicônico. Assim, é possível calcular o consumo de glicose e frutose ao longo do tempo.

A mesma relação entre moles de base consumidos e moles de ácido produzidos tem sido considerada na produção do ácido lactobiônico (CARRA *et al.*, 2005). Com base nisso, foi realizado um estudo para verificar se apenas com o consumo de NaOH é possível calcular a concentração dos produtos e reagentes envolvidos na reação enzimática.

Para tanto, foi realizado um experimento de conversão de sorbitol e ácido lactobiônico a partir de frutose e lactose, respectivamente, utilizando células livres e permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*. Neste experimento, a concentração de lactose foi monitorada através do consumo do NaOH e, paralelamente, foi utilizado um kit enzimático composto das enzimas β -galactosidase, glicose-oxidase e peroxidase, com o objetivo de quantificar a lactose no meio reacional. A Figura 4.1 mostra a variação da concentração de lactose ao longo tempo determinada pelo consumo de NaOH e pelo kit enzimático. Este experimento foi feito a uma temperatura de 39 °C, pH 6,2, concentrações de açúcares de 50 g/L e concentração de células de 10 g/L. Para uma estimativa do erro experimental, as medidas utilizando o kit enzimático foram conduzidas em triplicata.

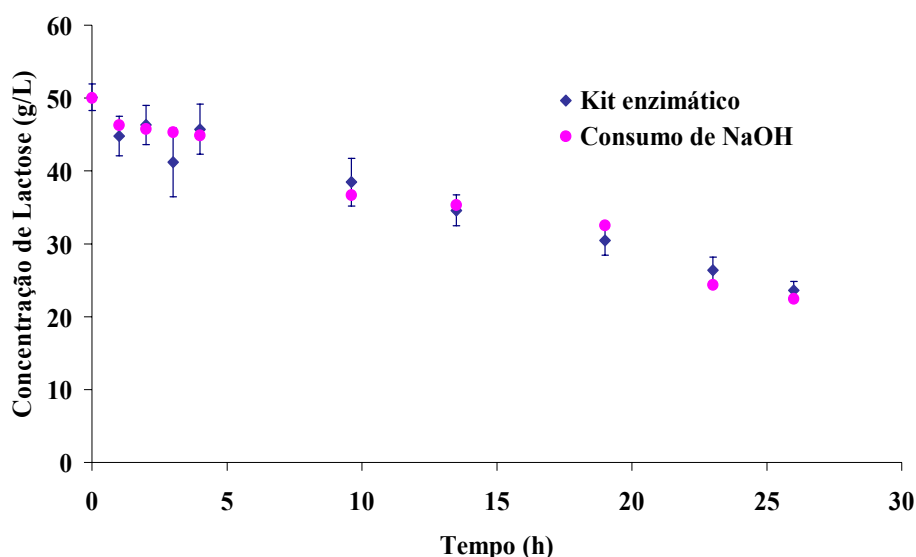


Figura 4.1 – Monitoramento da concentração de lactose pelo consumo de NaOH e através do uso de kit enzimático.

De acordo com a Figura 4.1 é possível observar que apenas com o consumo de NaOH, uma medida direta e rápida, é possível quantificar indiretamente a lactose, e assim inferir sobre a concentração de sorbitol e ácido lactobiônico formado. Assim, os estudos a seguir mostram os resultados relacionados com a avaliação dos meios de cultivo utilizando apenas o consumo de NaOH para se determinar a taxa específica de formação de ácido lactobiônico.

4.2 – Avaliação dos Meios de Cultivo

4.2.1 – Determinação das Taxas Específicas Médias de Reação

Há poucos trabalhos na literatura que falam sobre a produção de sorbitol e ácido lactobiônico utilizando células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*. Entretanto, existe uma grande quantidade de trabalhos que tratam da produção de sorbitol e ácido glicônico por *Zymomonas mobilis*. Um fato que chama a atenção nos trabalhos relacionados á produção de sorbitol e ácido glicônico é a grande variedade de meios de cultivo utilizado pelos autores para o cultivo da mesma bactéria visando à produção da enzima GFOR.

Devido a isso, e ao fato de a produção de sorbitol e ácido lactobiônico por *Zymomonas mobilis* se tratar de um assunto relativamente recente, este trabalho teve como um dos objetivos avaliar a influência dos meios de cultivo de bactéria *Zymomonas mobilis*, comumente utilizados para produção de ácido glicônico e sorbitol, sobre o desempenho catalítico da GFOR em células permeabilizadas. Além disso, foi avaliado se a metodologia de preparação do inóculo padronizado apenas pelo tempo de cultivo (18 h) mostra-se válida, através de testes estatísticos, como a repetitividade e reprodutibilidade.

Os resultados dos experimentos que serão mostrados a seguir, utilizando células permeabilizadas dos diversos meios de cultivo, foram obtidos nas seguintes condições: temperatura de 39 °C, pH 6,2, concentração de lactose 50 g/L e frutose 25 g/L, e concentração de células 10 g/L. O volume total do meio reacional foi de 30 mL.

As Figuras 4.2 a 4.9 mostram o comportamento da taxa específica de formação do ácido lactobiônico ao longo do tempo catalisada pela enzima GFOR proveniente de todos os meios investigados. As barras verticais mostram o intervalo de confiança das reações realizadas para cada fermentação. Estatisticamente, este teste é denominado teste *t*, tendo como objetivo avaliar a existência de um intervalo comum às medições, gerando uma confiabilidade estatística para a média. O intervalo de confiança de cada medida ao longo do tempo das reações com células permeabilizadas de cada fermentação foi calculado através da Equação 4.1.

$$t_{N-1} = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{N}}} \quad (4.1)$$

onde: N é o número de réplicas o experimentos; \bar{x} é a média amostral; s é o desvio padrão obtido; t_{N-1} é o valor da distribuição t com $N-1$ graus de liberdade.

Os resultados apresentados mostram que os perfís de taxa específica obtidos a partir das reações realizadas com as células permeabilizadas de cada fermentação não podem ser considerados estatisticamente diferentes, com 95% de probabilidade. A exceção são as taxas específicas obtidas com as células provenientes dos meios 4A e 4B, conforme mostram as Figuras 4.6 e 4.7, nas quais intervalos de confiança indicam, com 95 % de confiança, que as taxas específicas obtidas são estatisticamente diferentes. Isto pode ser devido a ocorrência de alguma variabilidade induzida, relacionado à padronização do inóculo das células cultivadas nos meios 4A e 4B.

Nota-se que a taxa específica de formação para todos os meios aumenta rapidamente no início e depois diminui ao longo do tempo tendendo a ficar constante. Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que, nos primeiros minutos de reação, ainda não é estabelecido um equilíbrio entre produção do ácido e neutralização do mesmo pela base adicionada. Comportamento semelhante ocorre para o pH da reação, pois quando as células são adicionadas ao reator contendo a solução de açúcares, o pH da reação diminui e, após alguns minutos é atingido o pH estabelecido para a reação (“set point”).

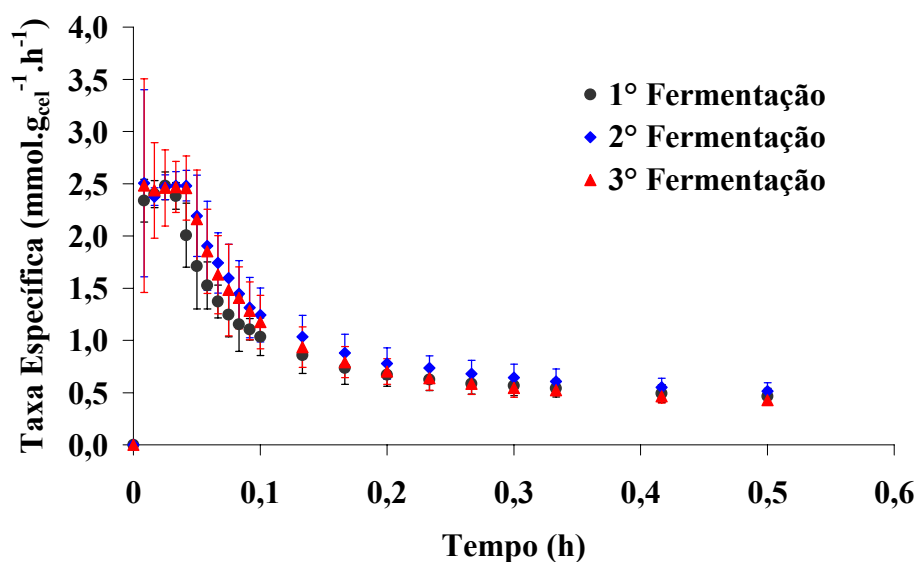


Figura 4.2 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 1, com seus respectivos intervalos de confiança.

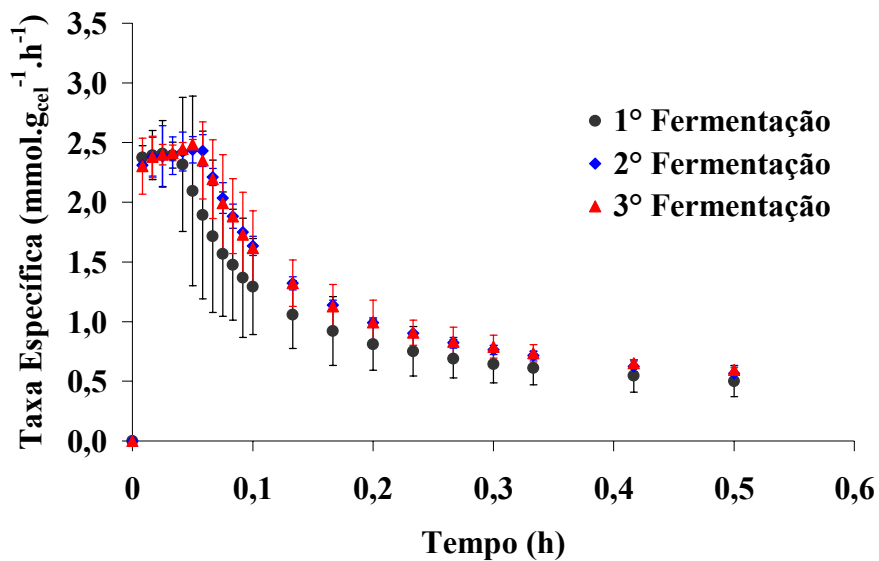


Figura 4.3 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 2, com seus respectivos intervalos de confiança.

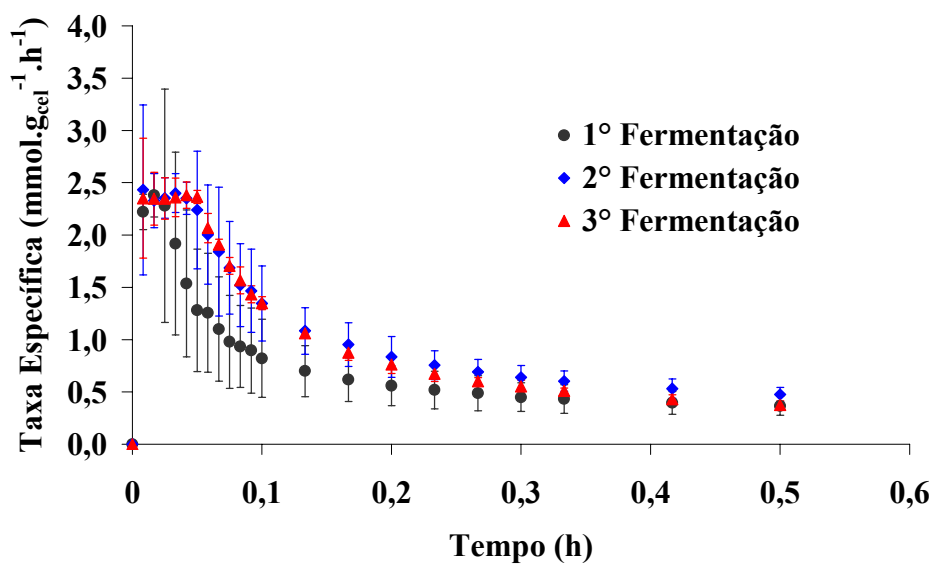


Figura 4.4 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 3A, com seus respectivos intervalos de confiança.

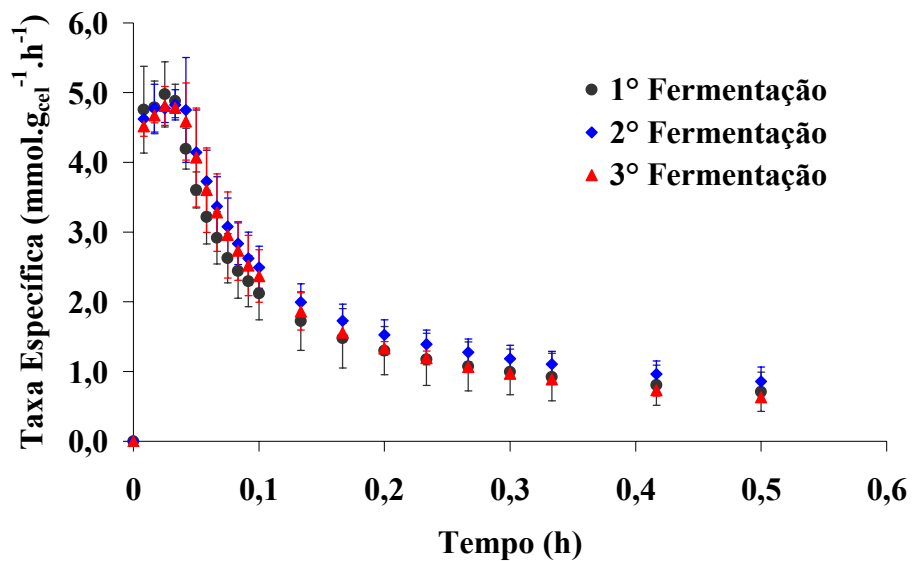


Figura 4.5 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 3B, com seus respectivos intervalos de confiança.

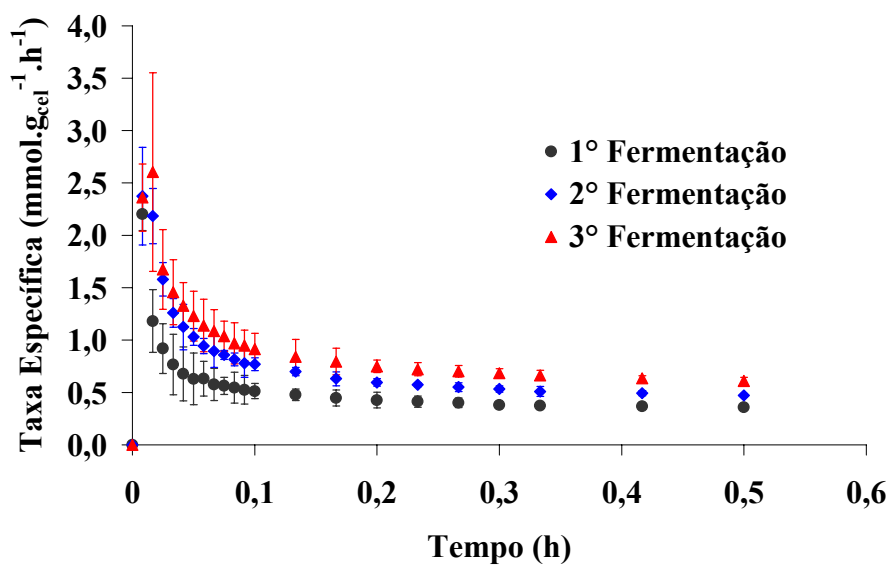


Figura 4.6 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 4A, com seus respectivos intervalos de confiança.

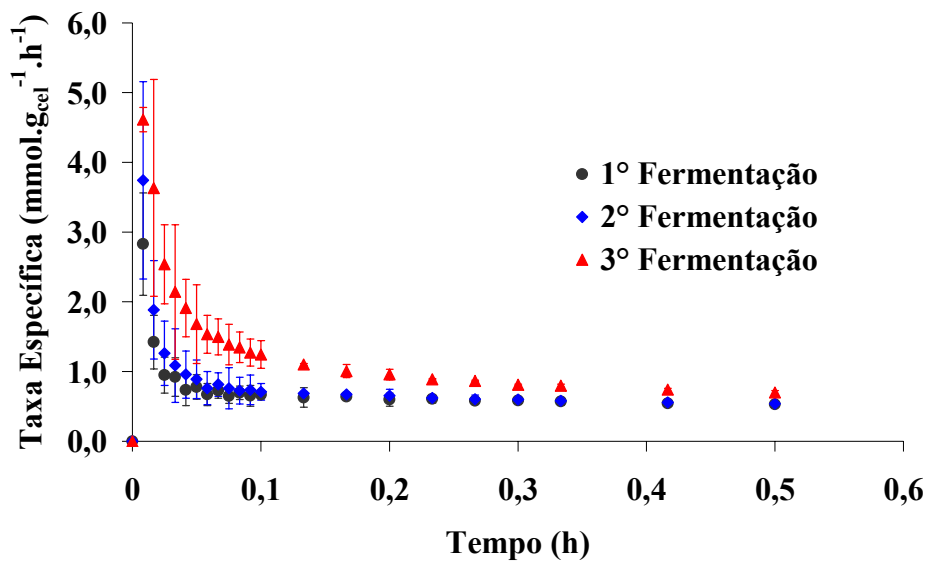


Figura 4.7 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 4B, com seus respectivos intervalos de confiança.

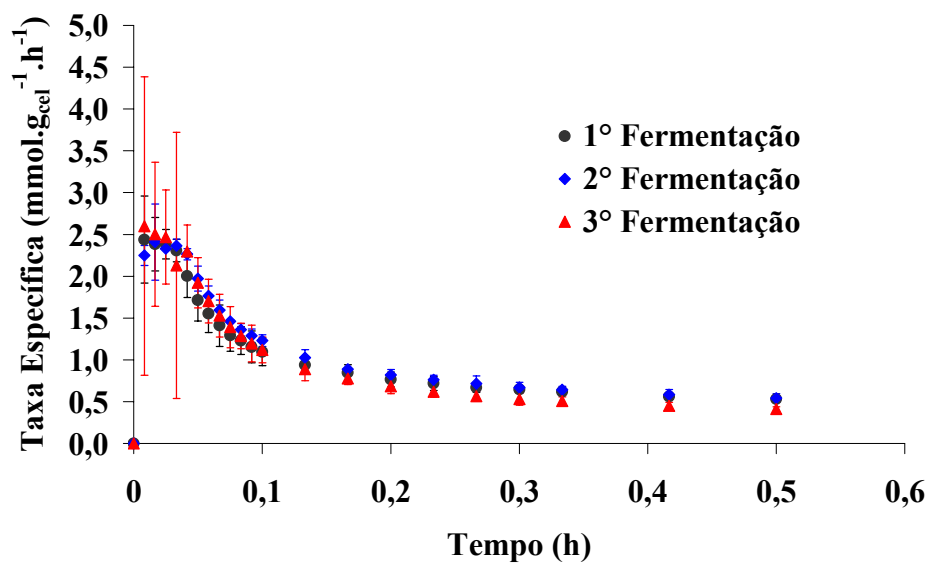


Figura 4.8 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 5A, com seus respectivos intervalos de confiança.

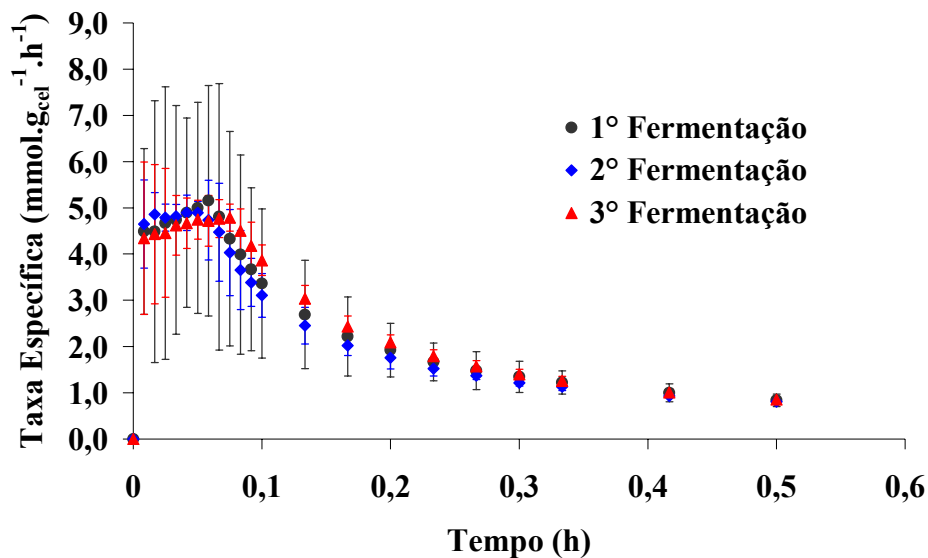


Figura 4.9 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico através das células de cada fermentação do MEIO 5B, com seus respectivos intervalos de confiança.

As Figuras 4.2 a 4.9 mostram que a variabilidade no início das reações é grande, aumentando a incerteza da medida até aproximadamente 0,1 h. Entretanto, ao longo do tempo, as incertezas das medidas das reações enzimáticas com as células provenientes de cada meio vão diminuindo e tornando a medida mais precisa, para todos os experimentos. A Tabela 4.1 mostra as taxas específicas médias calculadas para cada meio a partir de 0,1 até 0,5 h.

Na Tabela 4.1, observa-se que as células cultivadas no meio 5B apresentam as maiores taxas específicas médias quando comparadas as propagadas nos demais meios de cultivo. Este é um meio de composição definida (meio mínimo) com uma concentração inicial de glicose igual a 150 g/L. Comparando-se este resultado com os obtidos para as células cultivadas no meio 5A, que apresenta a mesma composição, mas uma concentração de glicose de 100 g/L, fica evidente a influência da concentração de glicose sobre a expressão da enzima GFOR por unidade de massa de células, aumentando assim a taxa específica de formação do ácido lactobiônico. Esta influência já havia sido relatada anteriormente por ZACHARIOU e SCOPES (1986) ao estudar a produção de ácido glicônico. Nesse estudo, os autores mostraram que uma maior atividade da GFOR é obtida quando é usado um meio contendo glicose como única fonte de carbono e em altas concentrações.

Tabela 4.1 – Taxas específicas médias de formação do ácido lactobiônico ($\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$) utilizando células permeabilizadas dos diversos meios de cultivo.

Meio	Fermentação 1		Fermentação 2		Fermentação 3		Todas as Fermentações	
	Taxa Esp.	Desvio Padrão	Taxa Esp.	Desvio Padrão	Taxa Esp.	Desvio Padrão	Taxa Esp.	Desvio Padrão
1	0,65	0,05	0,77	0,06	0,68	0,04	0,70	0,07
2	0,77	0,08	0,94	0,02	0,95	0,05	0,90	0,10
3A	0,53	0,07	0,78	0,07	0,72	0,02	0,68	0,13
3B	1,23	0,14	1,45	0,08	1,26	0,05	1,32	0,14
4A	0,42	0,02	0,58	0,02	0,73	0,03	0,58	0,13
4B	0,60	0,02	0,62	0,02	0,91	0,02	0,71	0,15
5A	0,73	0,02	0,78	0,03	0,65	0,03	0,73	0,07
5B	1,78	0,23	1,55	0,15	1,95	0,13	1,76	0,23

O mesmo acontece para as células cultivadas nos meios 3A e 3B que contêm, respectivamente, 100 g/L e 150 g/L de glicose. Mais uma vez, as células cultivadas em um meio com maior concentração de glicose proporcionaram uma maior taxa específica de reação. Entretanto, ao comparar-se as células cultivadas nos meios 4A e 4B, não se observa uma diferença muito significativa na taxa específica de reação com o aumento da concentração de glicose. Como estes meios contêm apenas glicose e extrato de levedura em sua composição, pode-se inferir que a atividade da enzima deve estar relacionada não só ao aumento da concentração de glicose, mas também à presença de outros nutrientes que devem estar presentes no meio de cultivo, conferindo uma enzima com maior atividade e, conseqüentemente, proporcionando uma maior taxa de reação.

A Figura 4.10 mostra os perfis das taxas específicas de reação das células provenientes de cada meio. Os perfis estão representados pela média de nove reações e os intervalos de confiança são representados pelas barras verticais. Pode-se dizer que as células cultivadas nos meios 5B e 3B, apresentaram resultados estatisticamente diferentes, com 95 % confiança, entre si e em relação aos demais meios ao longo do tempo de reação. Com relação aos demais meios, pode-se dizer, com 95% de confiança, que as taxas específicas convergem para um mesmo valor após 0,1h de reação.

Comparando-se as reações obtidas com as células oriundas dos meios 3B e 5B, vê-se que a variabilidade dos resultados obtidos com as células cultivados no meio 5B são maiores do que a observada com as células cultivadas em todos os demais meios.

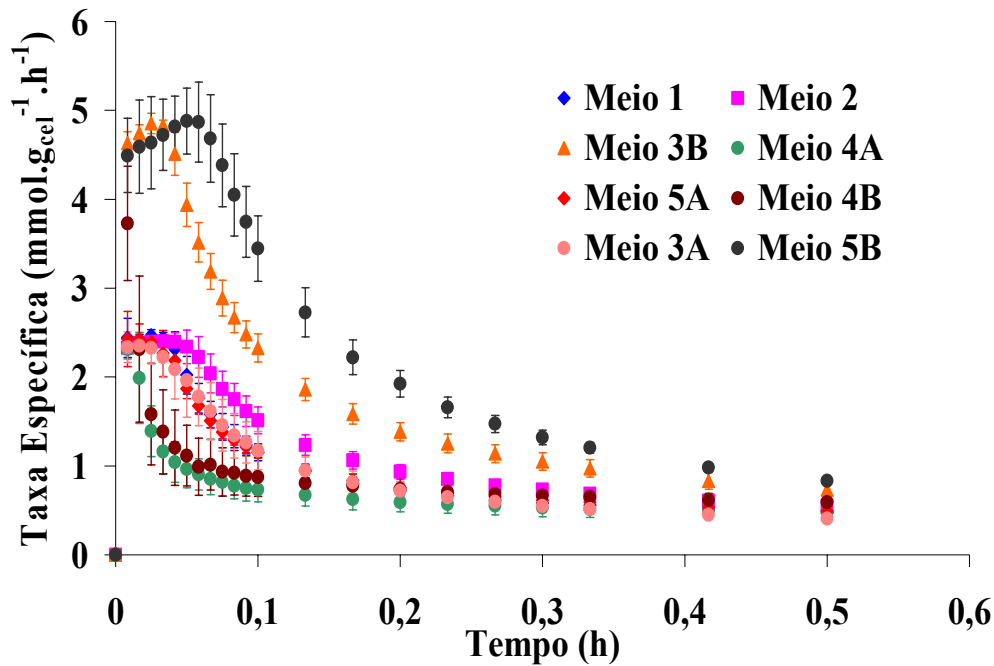


Figura 4.10 – Intervalo de confiança para os perfis das taxas específicas para as nove reações de cada meio.

4.2.2 - Avaliação da Repetitividade dos Experimentos

Diante dos resultados apresentados, ficou constatada a influência das células cultivadas nos diversos meios de cultivo sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico. A fim de identificar o tipo de influência e suas causas, foram realizados testes estatísticos esquematizados na Figura 4.11.

Os testes baseiam-se na análise da variância e visam, fundamentalmente, verificar se existe diferença significativa entre as amostras e se as variáveis independentes exercem influência em alguma variável dependente.

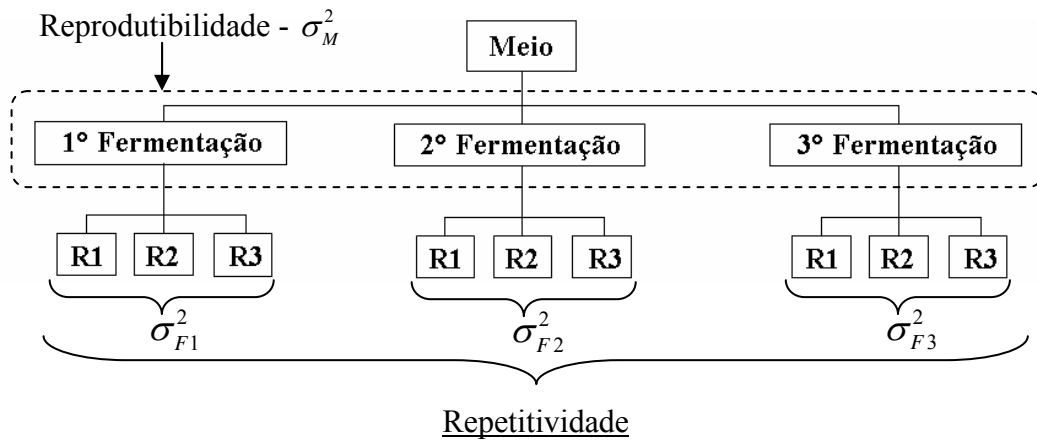


Figura 4.11 – Diagrama esquemático ilustrando a metodologia de avaliação da reprodutibilidade e repetitividade pela análise do teste F. R1, R2 e R3 representam as reações realizadas empregando células obtidas de cada fermentação e σ_{F1}^2 , σ_{F2}^2 , σ_{F3}^2 e σ_M^2 representam as variâncias das taxas específicas de reações de cada fermentação e do meio de cultivo, respectivamente.

Com base nas variâncias das reações realizadas com as células oriundas das fermentações de cada meio, é possível analisar a repetitividade e a reprodutibilidade dos experimentos através do teste F, calculado conforme a Equação 4.2.

$$F_{xy}^* = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_y^2} \quad (4.2)$$

onde: F_{xy}^* é o valor de F calculado; e σ_x^2 e σ_y^2 são as variâncias dos grupos amostrais.

Em seguida, avalia-se se o valor de F_{xy}^* obtido encontra-se dentro dos limites estabelecidos na Equação 4.3.

$$\left(\frac{1}{F_{100-p\%}}, v_2, v_1 \right) < F^* < (F_{p\%}, v_1, v_2) \quad (4.3)$$

onde: v_1 e v_2 representam o grau de liberdade dos conjuntos amostrais analisados e $F_{p\%}$ e $F_{100-p\%}$ são valores tabelados de F para um determinado nível de confiança.

Assim, para 95 % de confiança ($p = 0,025$ %), se o valor do F^* (F calculado) for maior que $F_{0,025}$ ou menor que $\frac{1}{F_{0,975}}$, ou seja, ficar fora do limite tabelado, isto mostra que os erros não são equivalentes. Vale ressaltar que todos os testes estatísticos mostrados admitem implicitamente que as medidas experimentais estão distribuídas de forma normal.

Nos testes de repetitividade, realiza-se o teste F entre as variâncias das taxas específicas de reação obtidas com as células de cada fermentação (σ_{F1}^2 , σ_{F2}^2 e σ_{F3}^2), com o objetivo de comparar se os erros obtidos nas taxas específicas de reações com as células de cada fermentação para um determinado meio são equivalentes, ou seja, se os erros são semelhantes ou não. Já para os testes de reprodutibilidade, realiza-se o teste F entre as variâncias de todas as nove reações de um determinado meio (σ_M^2) e as variâncias de cada uma das três reações realizadas com as células de cada fermentação, com o objetivo de avaliar os erros introduzidos pelas fermentações.

As Figuras 4.12 a 4.19 mostram os valores calculados de F obtidos para as reações entre as células oriundas de cada uma das fermentações para um determinado meio, bem como os intervalos de confiança a 95 % representado pelas linhas horizontais. Observa-se que, para todos os meios, com 95 % de confiança, as variâncias podem ser consideradas equivalentes já que apenas alguns dados observados nos meios 2, 3A, 3B e 4A, ficaram fora do intervalo confiança. Neste caso, o teste F mostra que as variâncias das reações com células provenientes de cada uma das fermentações apresentam variabilidades equivalentes. Entretanto, isto não quer dizer que as taxas específicas também sejam.

De acordo com as Figuras 4.6 e 4.7, que mostram os perfis das taxas específicas das reações utilizando as células dos meios 4A e 4B de cada uma das fermentações, através dos intervalos de confiança (Teste t), observa-se que as taxas específicas com as células provenientes de cada fermentação são diferentes, entretanto, suas variâncias são equivalentes. Isto quer dizer que o Teste F feito mostra que os erros experimentais das reações com células de cada uma das fermentações são equivalentes, entretanto suas taxas específicas são diferentes.

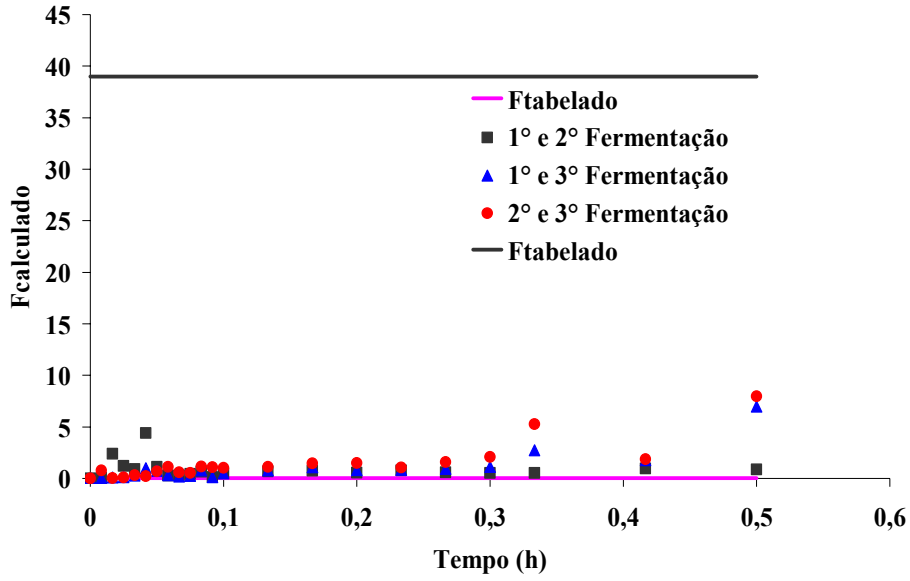


Figura 4.12 – Valores do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 1 e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

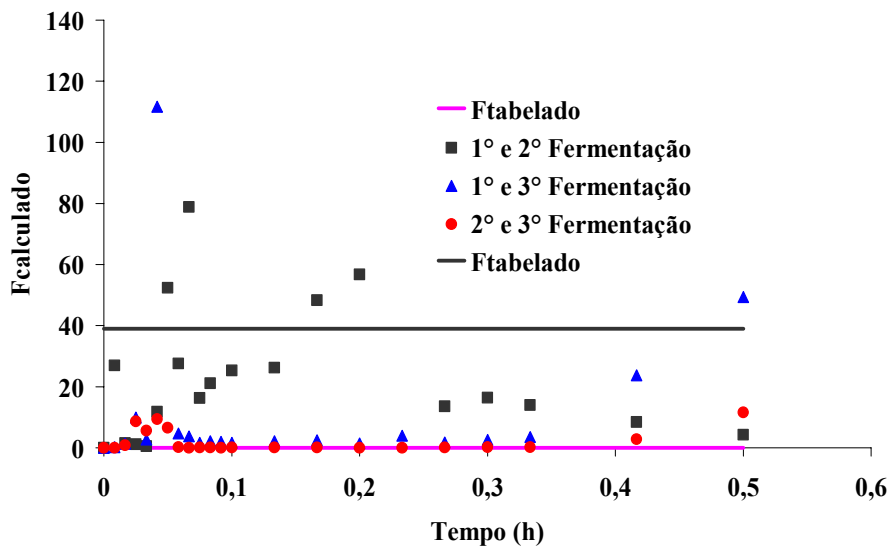


Figura 4.13 – Valores do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 2 e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

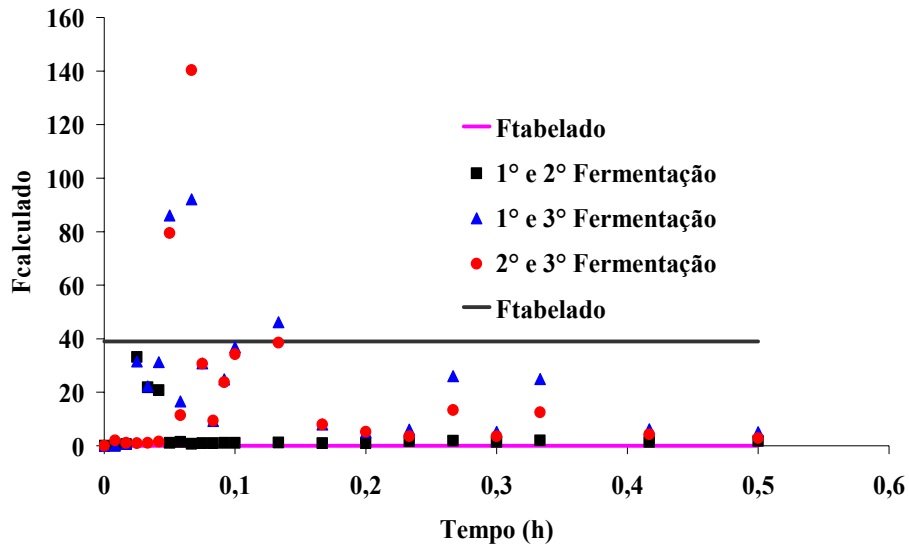


Figura 4.14 – Valores do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 3A e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

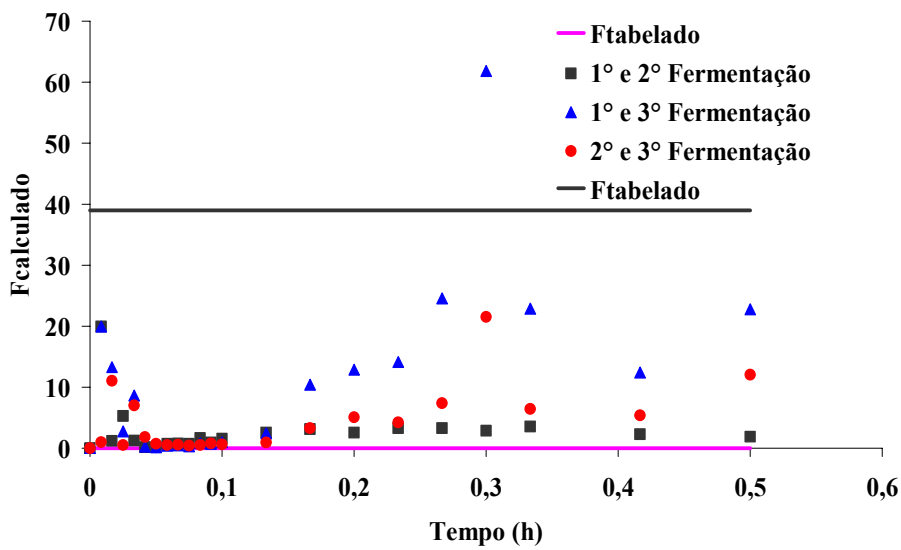


Figura 4.15 – Valores do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 3B e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

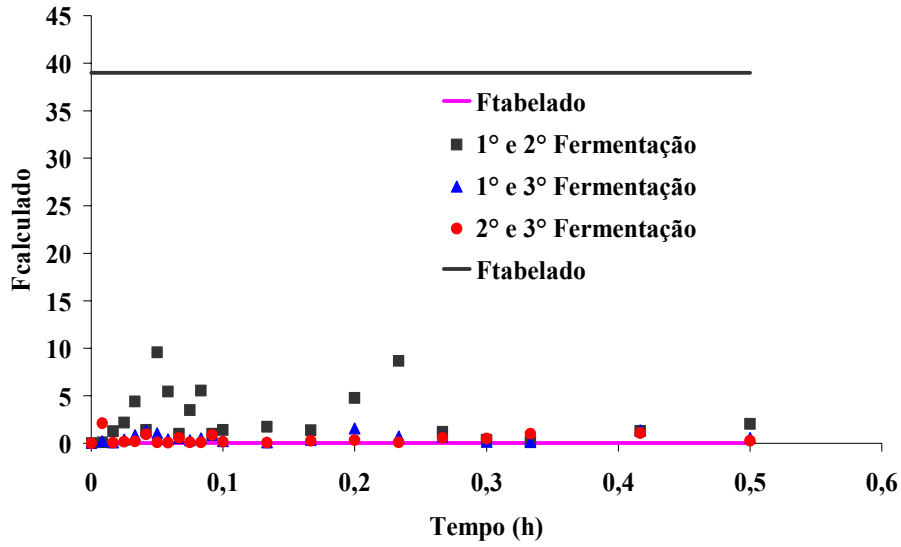


Figura 4.16 – Valores do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 4A e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

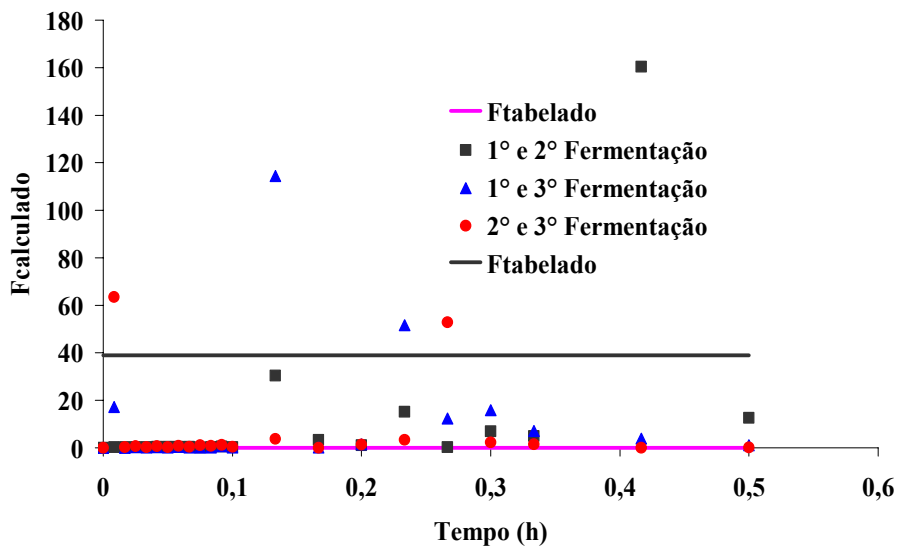


Figura 4.17 – Valores do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 4B e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

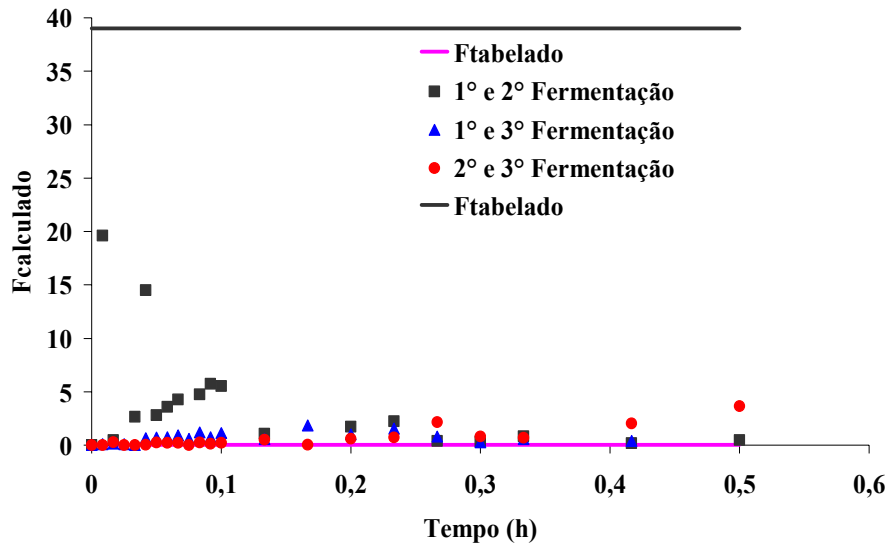


Figura 4.18 – Valores do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 5A e os valores tabelado do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (---)).

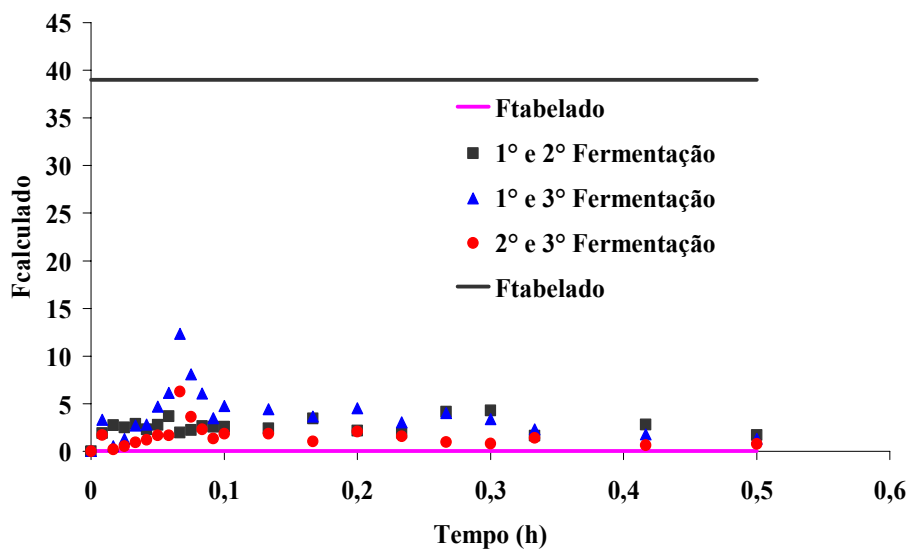


Figura 4.19 – Valores do teste F entre as reações feitas com as células de cada fermentação para o MEIO 5B e os valores tabelado do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (---)).

4.2.3 - Avaliação da Reprodutibilidade dos Experimentos

Nesta seção, o Teste F é empregado com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade. Calcularam-se também se as variâncias das taxas específicas das nove reações realizadas com as células do sistema experimental de um determinado meio para

verificar a equivalência com as variâncias obtidas de cada uma das três reações realizadas com as células de cada fermentação. Esta análise permite avaliar, por exemplo, se a padronização do inóculo adotada neste trabalho, feita apenas pelo tempo de cultivo, foi eficaz.

As Figuras 4.20 a 4.27, mostram os valores do Teste F aplicado para avaliar a reprodutibilidade dos experimentos, e que apenas os resultados obtidos para os meios 4 e 6 (Figuras 4.23 e 4.25) apresentaram F^* fora do intervalo de confiança de $0,025 < F^* < 6,06$, mostrando que suas variâncias não são equivalentes. Isto quer dizer que as taxas específicas de reação obtidas com as células cultivadas nestes meios não apresentam resultados reprodutíveis indicando a existência de alguma fonte de erro que ocasiona grande variabilidade. Já para as células cultivadas nos demais meios os resultados se mostraram reprodutíveis. A ampliação das Figuras 4.25 a 4.27 foi realizada para verificar se os valores de F^* se encontravam dentro do intervalo de confiança.

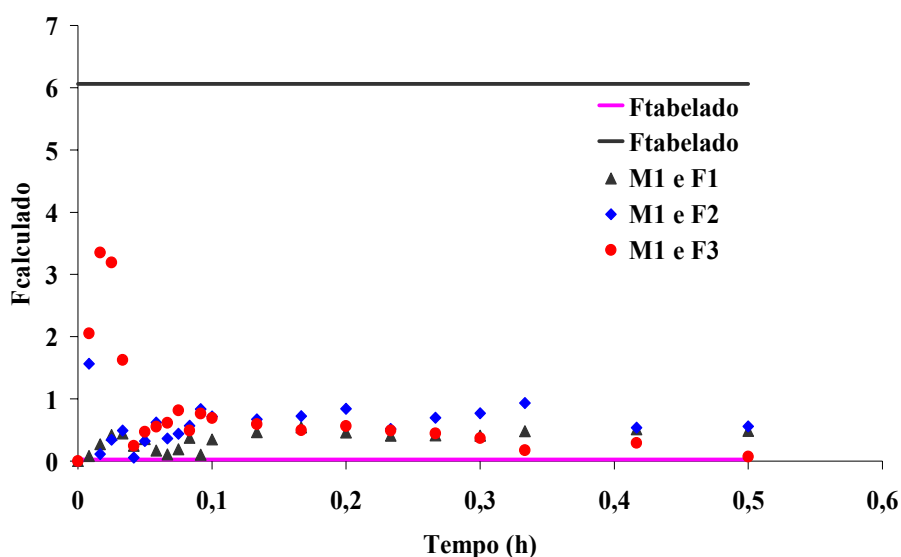


Figura 4.20 – Valores do teste F entre todas as reações do MEIO 1 (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

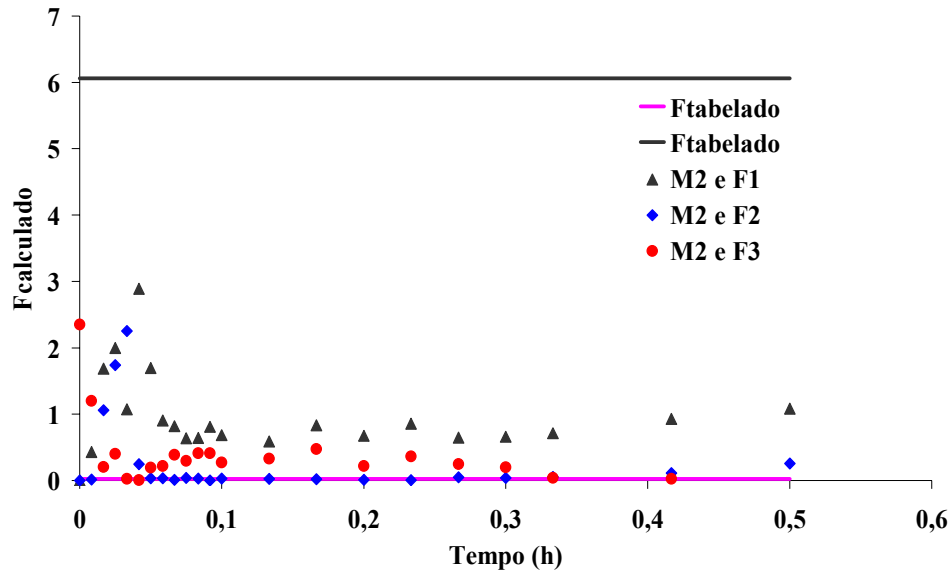


Figura 4.21 – Valores do teste F entre todas as reações do MEIO 2 (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (---)).

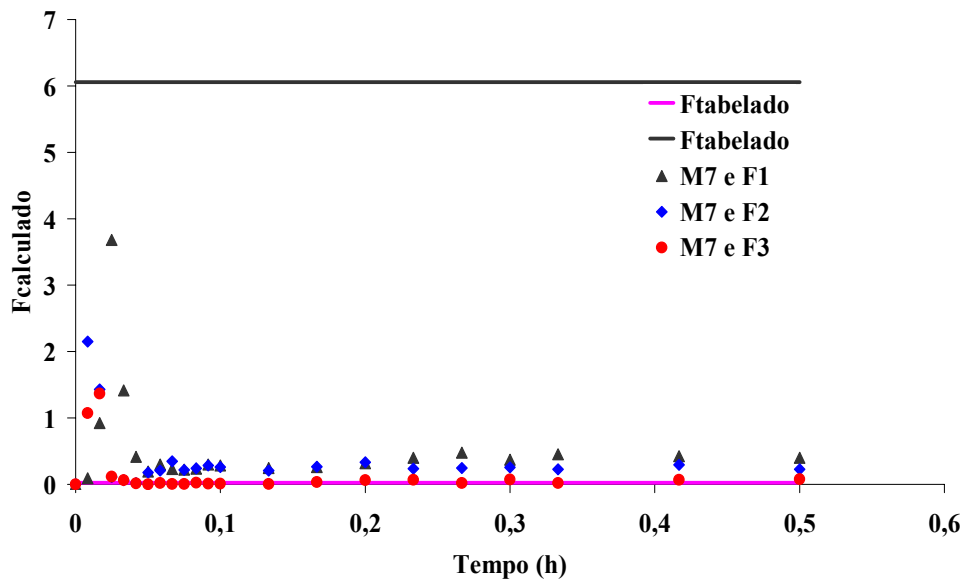


Figura 4.22 – Valores do teste F entre todas as reações do MEIO 3A (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (---)).

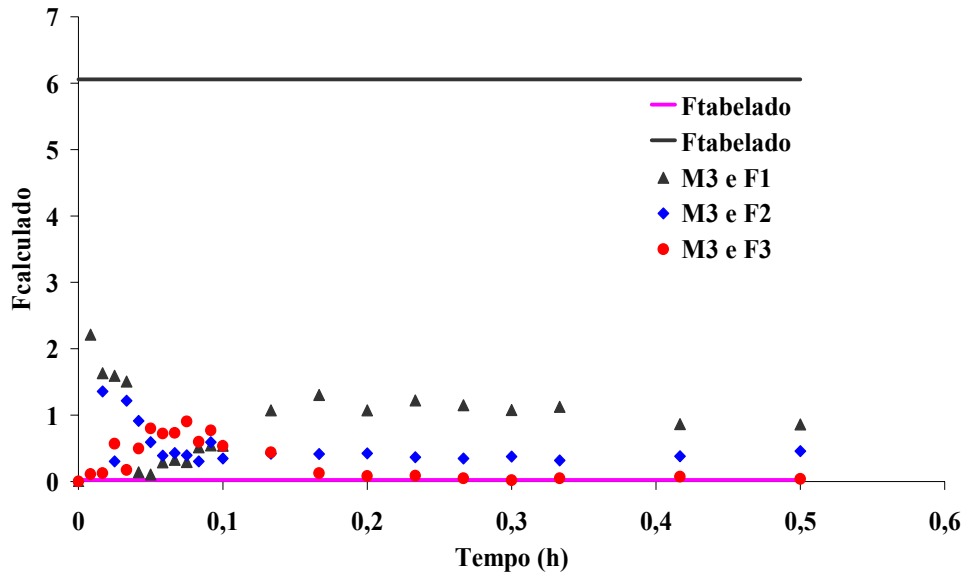


Figura 4.23 – Valores do teste F entre todas as reações do MEIO 3B (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

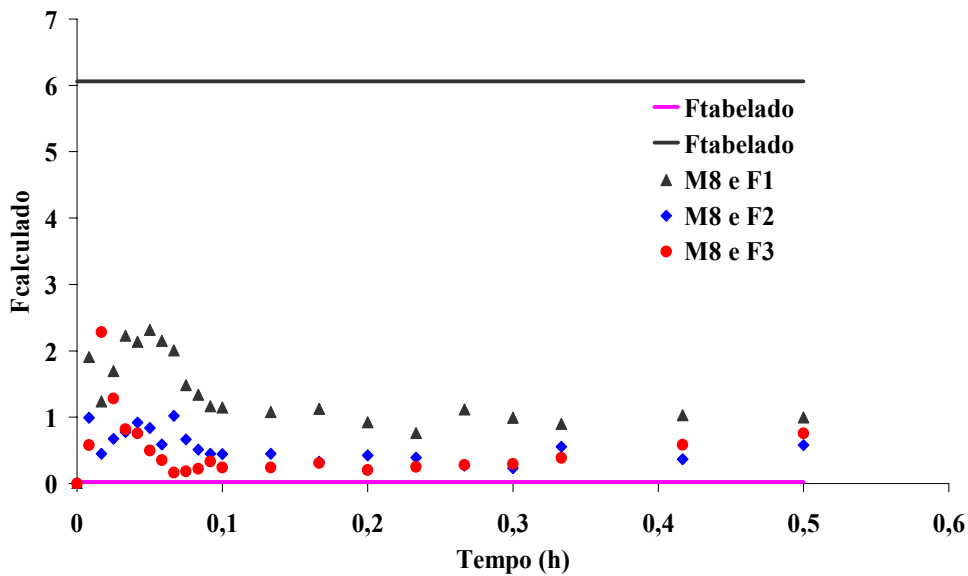


Figura 4.24 – Valores do teste F entre todas as reações do MEIO 5B (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)).

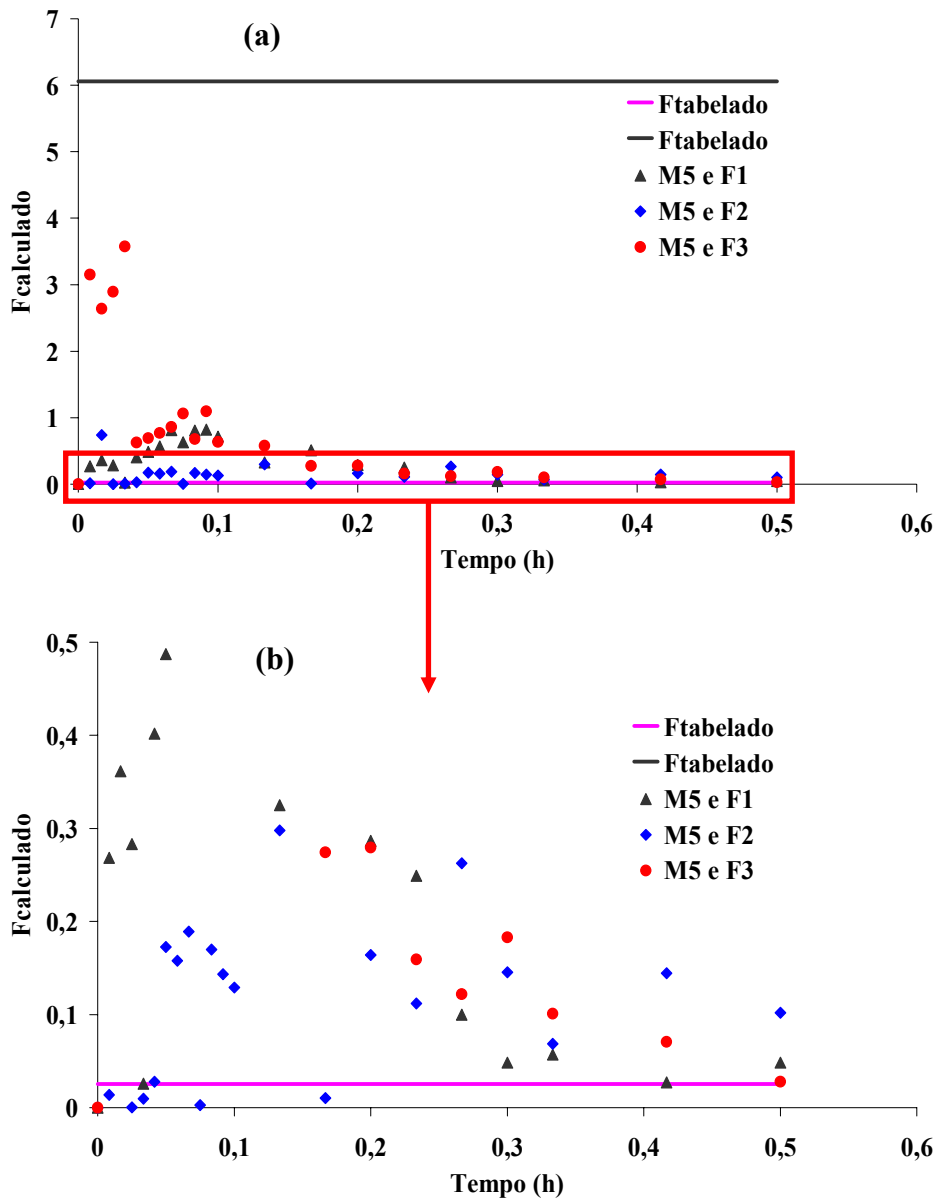


Figura 4.25 – Valores do teste F (a) entre todas as reações do MEIO 5A (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). No detalhe, uma ampliação da região em torno do valor de $F_{0,975}$ (b).

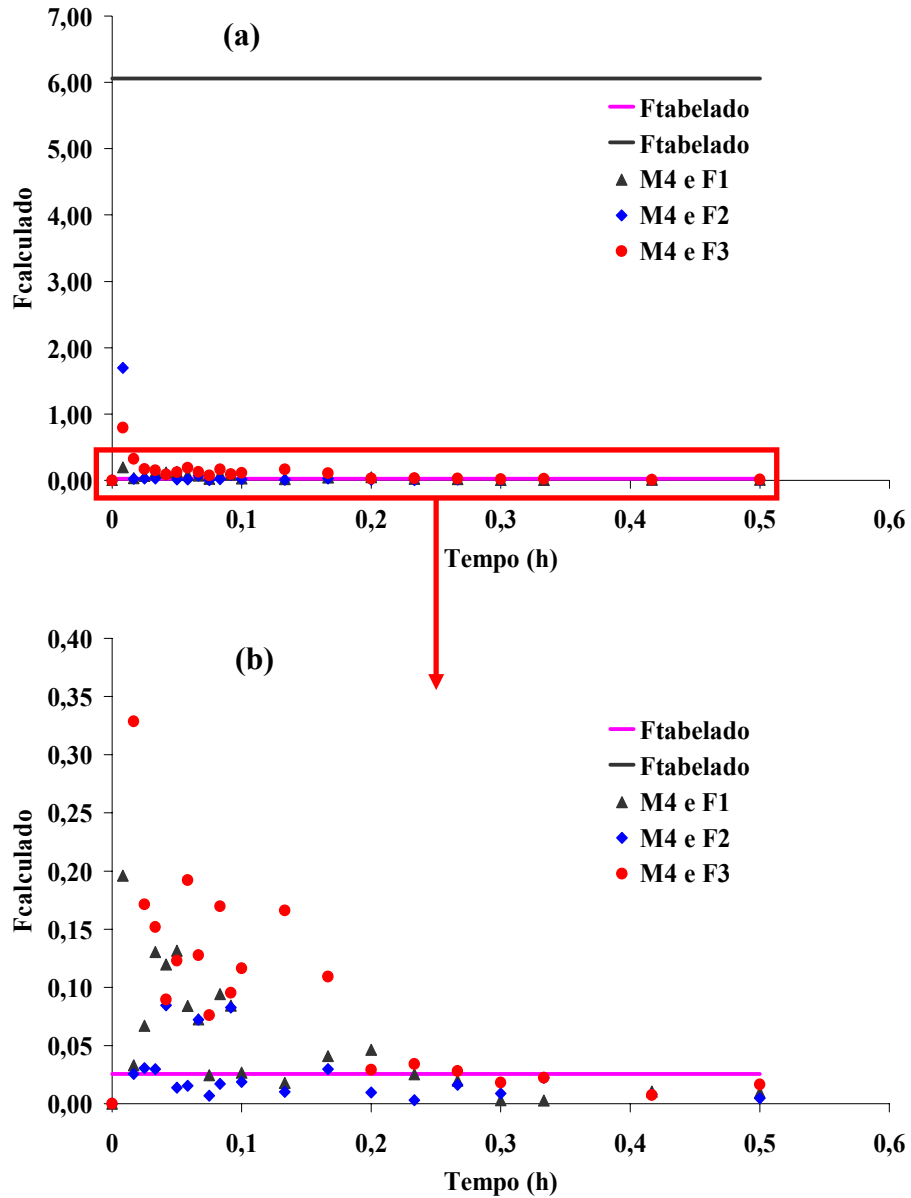


Figura 4.26 – Valores do teste F (a) entre todas as reações do MEIO 4A (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (—)). No detalhe, uma ampliação da região em torno do valor de $F_{0,975}$ (b).

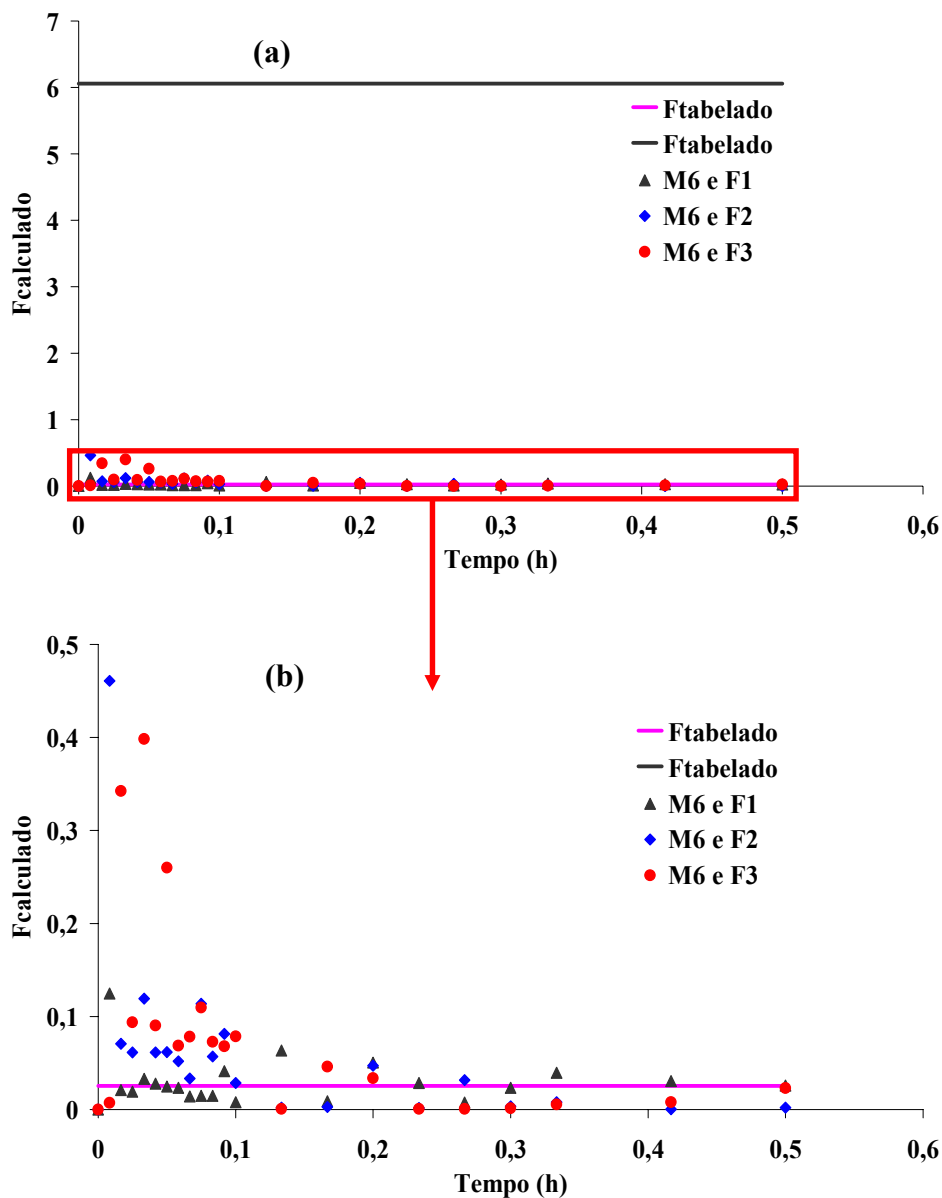


Figura 4.27 – Valores do teste F (a) entre todas as reações do MEIO 4B (grau de liberdade 8) com as reações com as células de cada uma das fermentações (grau de liberdade 2), e os valores tabelados do teste F ($F_{0,025}$ (—) e $F_{0,975}$ (---)). No detalhe, uma ampliação da região em torno do valor de $F_{0,975}$ (b).

A padronização do inóculo feita apenas pelo tempo de cultivo se mostrou válida, exceto para os meios 4A e 4B, que contêm apenas glicose e extrato de levedura. Conforme foi mostrado na Figura 4.9, as taxas específicas obtidas com células cultivadas no meio 5B apresentaram erros maiores quando comparada com as taxas específicas dos outros meios. Mesmo sendo reproduzível, esta fonte de erro pode estar relacionada com a composição do meio, uma vez que as células cultivadas no meio 5A,

o qual contém a mesma composição do meio 5B, porém com uma concentração de glicose menor, apresentaram erros menores.

4.2.4 - Análise das Curvas de Crescimento

Nesta seção, são apresentadas as curvas de crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* para cada um dos meios de cultivo estudados. As Figuras 4.28 (a) e (b) mostram as curvas para os meios com 100 e 150 g/L de glicose, respectivamente. A linha vertical mostrada nestas figuras representa o tempo no qual as células foram retiradas para servir de inóculo

Com base nos resultados mostrados anteriormente sobre a reprodutibilidade dos experimentos, verificou-se que os valores de taxas específicas obtidos com as células dos meios 4 e 6 não foram reprodutíveis, indicando que há alguma fonte de erro envolvida durante o cultivo das células nesses meios.

Uma das possíveis fontes de erro pode estar relacionada ao preparo do inóculo. As Figuras 4.28 (a) e (b) mostram que o único meio que não estava na fase exponencial, nas 18 horas de cultivo, era o meio 4A, que se já encontrava na fase estacionária, enquanto que o meio 4b estava na fase de desaceleração. Isso mostra que uma das possíveis fontes de erro está relacionado à fase de crescimento no momento da inoculação.

No processo de inoculação, variáveis como a concentração inicial de células no inóculo e o estado fisiológico do inóculo podem influenciar o crescimento no fermentador, fazendo com este seja um fator que pode introduzir consideráveis diferenças na reprodutibilidade do bioprocessamento, gerando uma maior dispersão nos resultados (ABUD, 2005).

Avaliação dos meios permitiu verificar a influência das células cultivadas nos diversos meios de cultivo sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico, mostrando que o meio 5B, meio de composição definida com 150 g/L de glicose, apresentou as maiores taxas específicas. No que diz respeito aos testes de repetitividade, conclui-se que nas diferentes reações realizadas para as fermentações de cada meio, as variabilidades induzidas por cada uma destas reações são semelhantes. Além disto, apenas para os meios 4A e 4B a padronização apenas pelo tempo de cultivo não se mostrou válida.

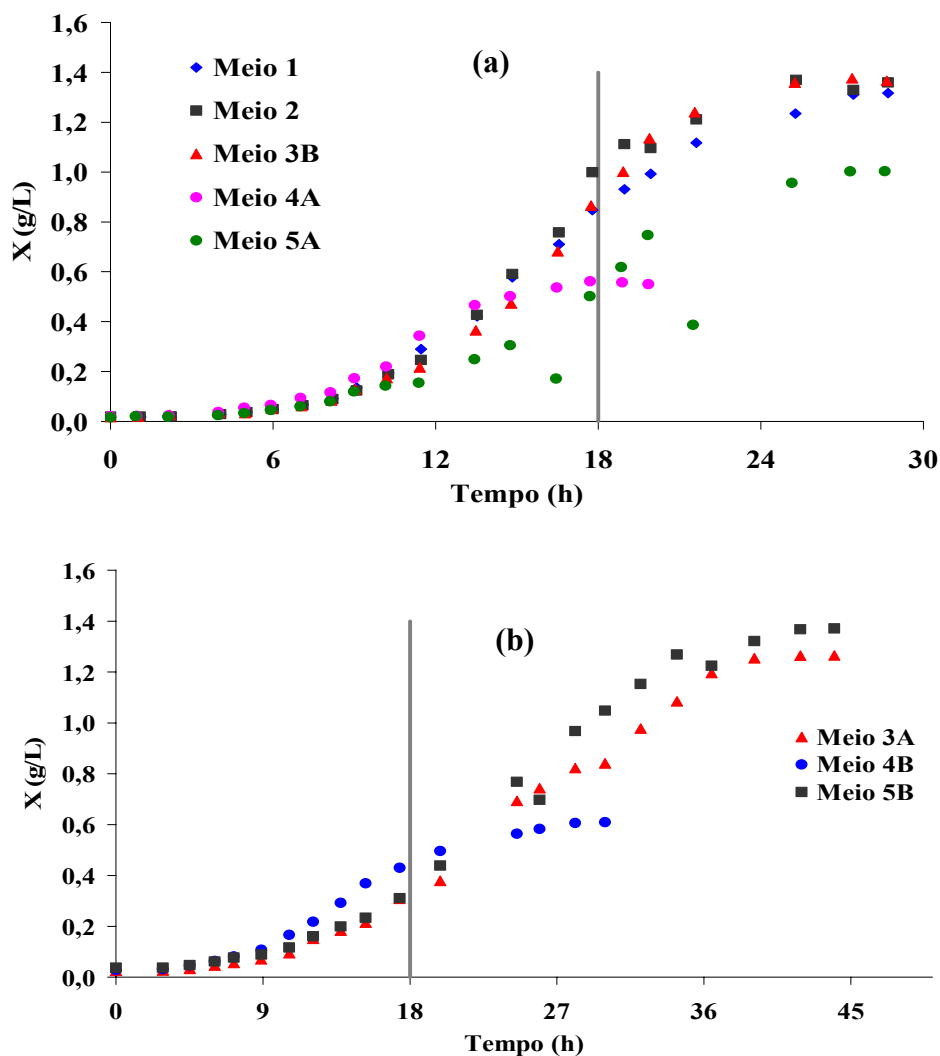


Figura 4.28 – Acompanhamento do crescimento celular em cultivo de *Zymomonas mobilis* para os meios com (a) 100 e (b) 150 g/L de glicose.

Constatou-se que o preparo do inóculo é uma fonte de variabilidade do processo e que, para diminuir essa variabilidade, uma outra forma de realizar a inoculação visando diminuir os erros experimentais é a realização do acompanhamento da taxa específica de crescimento bem como a determinação de um volume específico do meio de cultivo para a inoculação, para obter um controle mais adequado do processo. Além disso, a atividade das células utilizadas nas reações enzimáticas está relacionada possivelmente com a atividade da enzima produzida em cada meio de cultivo.

4.3 – Planejamento Experimental – Células Livres

4.3.1 – Obtenção do Modelo Empírico

Com base no estudo mostrado anteriormente sobre a avaliação dos meios de cultivo, o meio 5B, meio de composição definida com 150 g/L de glicose, foi escolhido como sendo o melhor para o cultivo das células de *Zymomonas mobilis*. Os estudos feitos por ZACHARIOU e SCOPES (1986), que purificaram a enzima GFOR a partir de células de *Zymomonas mobilis*, mostraram que o melhor substrato para a enzima é a glicose e frutose, produzindo ácido glicônico e sorbitol respectivamente. Além disso, eles também determinaram as melhores condições de temperatura e pH para a reação enzimática tendo como substrato a glicose e frutose e observaram que pH ótimo foi em torno de 6,2 e a temperatura ótima foi de 39-40 °C. Vale ressaltar que o estudo realizado por ZACHARIOU e SCOPES (1986) foi feito com a enzima purificada. Vários outros trabalhos na literatura relacionados à produção de sorbitol e ácido glicônico utilizam células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*, e não a enzima purificada.

No que diz respeito à produção de sorbitol e ácido lactobiônico por células de *Zymomonas mobilis*, os poucos trabalhos que existem tomam como base as condições estabelecidas para a produção de sorbitol e ácido glicônico encontradas na literatura. Por se tratar de um substrato diferente e buscando compreender melhor os fenômenos envolvidos nessa reação enzimática, foi realizado um estudo para avaliar o efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de células e concentração de açúcares sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico. Para isto, foi feito um planejamento experimental DCCR (delineamento composto central rotacional) do tipo 2⁴. A Tabela 4.2 mostra os níveis e valores de cada uma das variáveis utilizadas.

Tabela 4.2 – Níveis das variáveis utilizadas para o planejamento experimental utilizando células livres e permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*.

Variável	Variável Normalizada	Níveis				
		-2	-1	0	+1	+2
pH	pH^{norm}	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
Temperatura (°C)	T^{norm}	28	31	34	37	40
Concentração de açúcares (g/L)	C^{norm}	50	100	150	200	250
Concentração de células (g/L)	X^{norm}	5	10	15	20	25

Conforme a Tabela 4.2, o pH foi variado de 5 a 7. Não foram utilizados valores de pH inferiores a 5 para evitar a desativação da enzima e nem superiores a 7, considerando a futura integração da etapa de eletrodialise. No que diz respeito à temperatura, não foram utilizados valores acima de 40 °C para evitar a desnaturação da enzima. Já para as concentrações de açúcares, os valores mostrados na Tabela 4.2 são referentes à concentração de lactose enquanto que a concentração de frutose foi calculada de forma a corresponder à mesma concentração molar de lactose. Não foram utilizados valores de concentrações de lactose acima de 250 g/L por ser este seu limite de solubilidade em água. Já a concentração de células foi variada em torno de 15 g/L, baseando-se em estudos relatados na literatura (SILVEIRA *et al.*, 1999; ERZINGER *et al.*, 2003; CARRA *et al.*, 2005).

As Equações 4.4 a 4.7 representam as variáveis normalizadas, pH^{norm} , T^{norm} , C^{norm} (concentração de açúcares) e X^{norm} .

$$pH^{norm} = \frac{pH - 6,0}{0,5} \quad (4.4)$$

$$T^{norm} = \frac{T - 34}{3} \quad (4.5)$$

$$C^{norm} = \frac{C - 150}{50} \quad (4.6)$$

$$X^{norm} = \frac{X - 15}{5} \quad (4.7)$$

A Tabela 4.3 mostra a matriz planejamento contendo 29 experimentos, sendo 5 réplicas no ponto central, tendo como resposta a taxa específica de formação do ácido lactobiônico ($\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

É possível observar na Tabela 4.3 que as maiores taxas específicas obtidas (2,19 e 2,11 $\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foram para os experimentos 2 (pH 6,5, 31 °C, 10 g/L de células e 100 g/L de açúcares) e 6 (pH 6,5, 31 °C, 10 g/L de células e 200 g/L de açúcares), respectivamente. Os valores de taxa específica obtidos nas réplicas dos pontos centrais variaram de 1,02 a 1,34 $\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Baseando-se nos valores obtidos através do planejamento experimental, é possível analisar os efeitos de cada uma das variáveis sobre a taxa de formação do ácido lactobiônico, bem como verificar a significância destas. Isso pode ser feito através da

obtenção de um modelo empírico juntamente com a análise da superfície de resposta. Esta análise só é possível para o caso envolvendo apenas duas variáveis independentes e fixando a variável dependente (a resposta), gerando assim um gráfico com três eixos. Quando se faz uso de mais de 2 variáveis, como nesse estudo, análise de superfície é útil apenas para uma interpretação qualitativa dos resultados. Neste caso, os gráficos de superfície de resposta sempre são gerados combinando as variáveis duas a duas junto com a resposta, sendo analisados separadamente e comparados com o modelo obtido.

Tabela 4.3 – Matriz de planejamento para experimentos utilizando células permeabilizadas.

Exp.	pH^{norm}	T^{norm}	C^{norm}	X^{norm}	pH	T (°C)	Conc. Ac (g/L)	Conc. Cel (g/L)	Taxa Esp. (mmol.g _{cel} ⁻¹ .h ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	5,5	31	100	10	0,95
2	+1	-1	-1	-1	6,5	31	100	10	2,19
3	-1	+1	-1	-1	5,5	37	100	10	0,64
4	+1	+1	-1	-1	6,5	37	100	10	1,54
5	-1	-1	+1	-1	5,5	31	200	10	1,23
6	+1	-1	+1	-1	6,5	31	200	10	2,11
7	-1	+1	+1	-1	5,5	37	200	10	0,81
8	+1	+1	+1	-1	6,5	37	200	10	1,50
9	-1	-1	-1	+1	5,5	31	100	20	0,69
10	+1	-1	-1	+1	6,5	31	100	20	1,28
11	-1	+1	-1	+1	5,5	37	100	20	0,88
12	+1	+1	-1	+1	6,5	37	100	20	1,58
13	-1	-1	+1	+1	5,5	31	200	20	0,84
14	+1	-1	+1	+1	6,5	31	200	20	1,57
15	-1	+1	+1	+1	5,5	37	200	20	0,84
16	+1	+1	+1	+1	6,5	37	200	20	1,69
17	0	0	0	0	6,0	34	150	15	1,12
18	0	0	0	0	6,0	34	150	15	1,34
19	0	0	0	0	6,0	34	150	15	1,02
20	0	0	0	0	6,0	34	150	15	1,06
21	0	0	0	0	6,0	34	150	15	1,03
22	+2	0	0	0	7,0	34	150	15	1,74
23	-2	0	0	0	5,0	34	150	15	0,48
24	0	+2	0	0	6,0	40	150	15	0,89
25	0	-2	0	0	6,0	28	150	15	1,14
26	0	0	+2	0	6,0	34	250	15	1,16
27	0	0	-2	0	6,0	34	50	15	1,27
28	0	0	0	+2	6,0	34	150	25	1,32
29	0	0	0	-2	6,0	34	150	5	1,40

Vale ressaltar que, ao longo desse trabalho, a análise das superfícies de resposta será feita apenas em termos comparativos com o modelo, portanto todas as conclusões

que serão obtidas a partir deste planejamento serão com base no modelo empírico gerado.

As Figuras 4.29 a 4.34 mostram as superfícies de resposta geradas para cada conjunto de duas variáveis, tendo como resposta a taxa específica de formação do ácido lactobiônico. Na Figura 4.29, observa-se a taxa específica em função do pH e da temperatura, mostrando que quanto maior o pH e menor a temperatura, maior é a taxa. A Figura 4.30, que leva em conta o pH e a concentração de açúcares, mostra que esta última não exerce efeito significativo sobre a taxa específica de reação. Já a Figura 4.31 mostra a superfície de resposta para o pH e concentração de células, sendo possível observar que a taxa específica de reação é maior para valores elevados de pH e nos pontos extremos do intervalo de concentração de células.

A Figura 4.32 mostra que para qualquer concentração de açúcar é ideal trabalhar com temperaturas em torno de 30 °C, enquanto que a Figura 4.33 mostra haver uma combinação de efeitos entre a temperatura e concentração de células, havendo um aumento da taxa específica quando são combinados uma menor temperatura e concentração de células ou uma maior temperatura e concentração de células. A Figura 4.34 é evidenciado mais uma vez que a concentração de açúcares não influencia significativamente a taxa específica de reação.

De modo geral é possível observar que não há muita influência da concentração de açúcares sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico, e que a taxa tende a aumentar à medida em que ocorre um aumento de pH, diminuição de temperatura e extremos da concentração de células, mostrando que a concentração de células passa por um mínimo. Vale ressaltar que ao mencionar o aumento da taxa para menores ou maiores valores de uma determinada variável, isso é válido apenas para a faixa estudada.

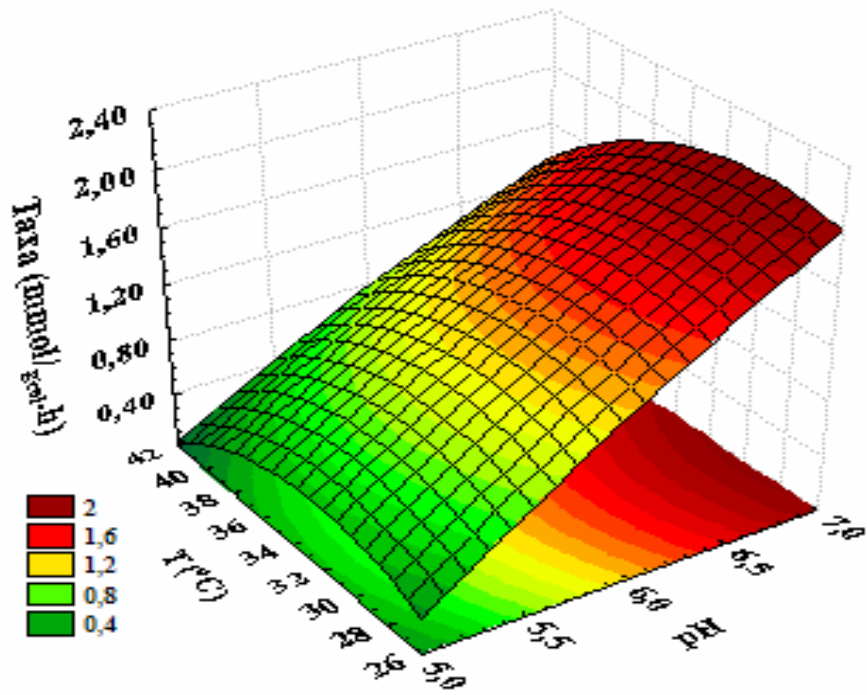


Figura 4.29 – Taxas específicas de formação em função do pH e temperatura.

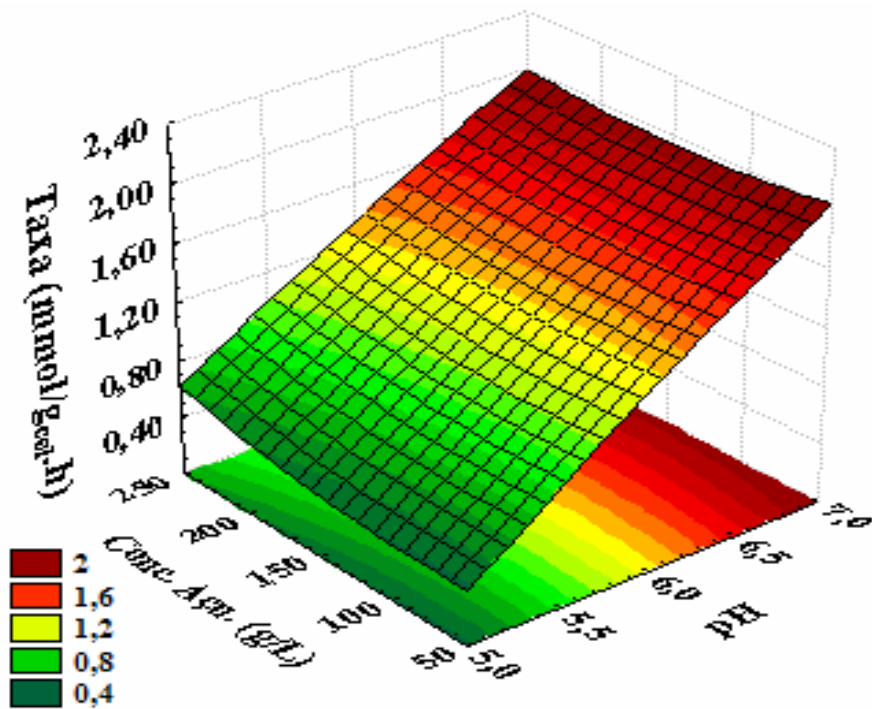


Figura 4.30 – Taxas específicas de formação em função do pH e concentração de açúcares.

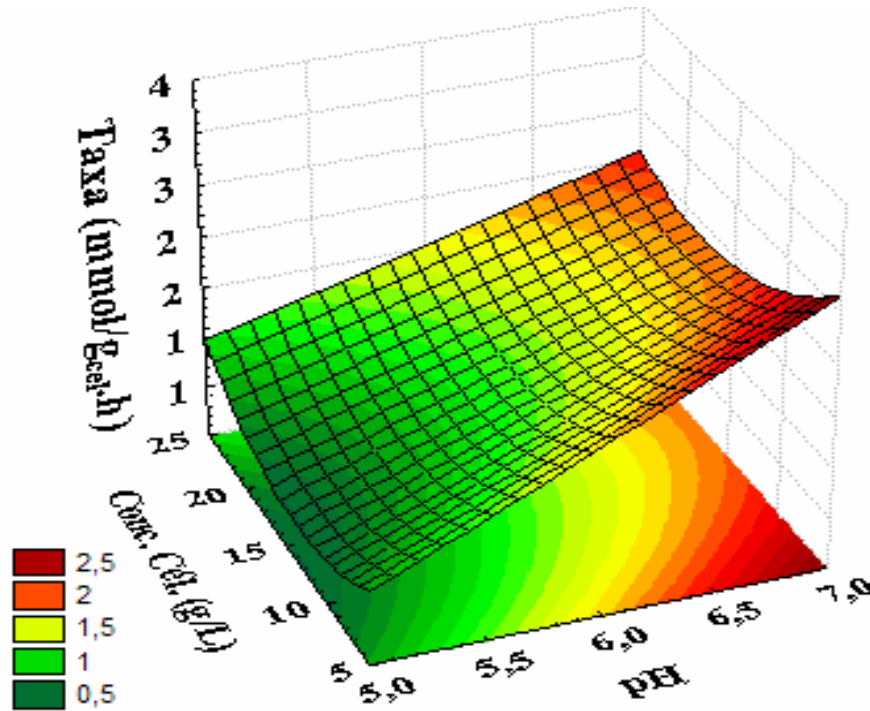


Figura 4.31 – Taxas específicas de formação em função do pH e concentração de células.

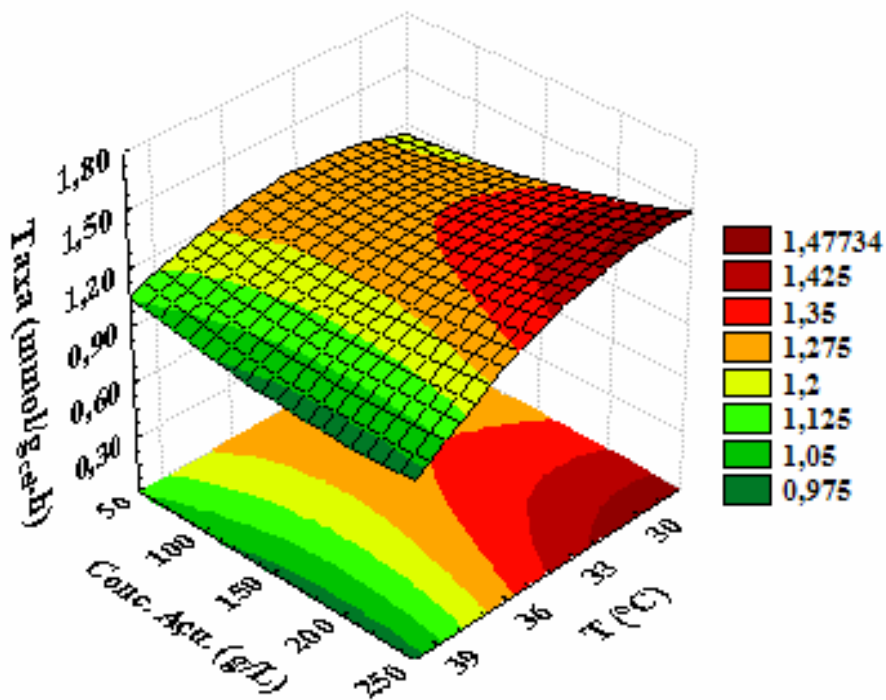


Figura 4.32 – Taxas específicas de formação em função da temperatura e concentração de açúcares.

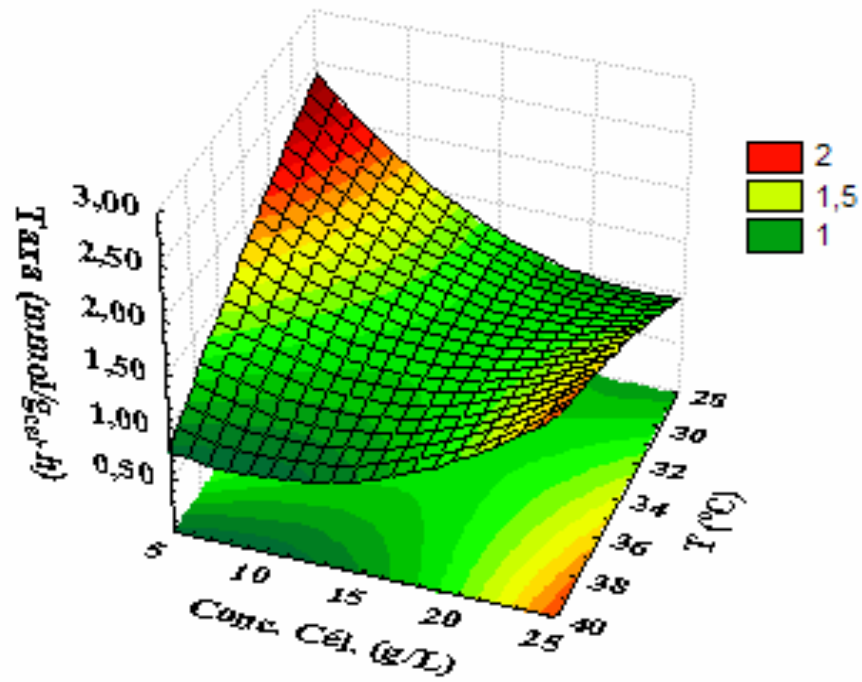


Figura 4.33 – Taxas específicas de formação em função da temperatura e concentração de células.

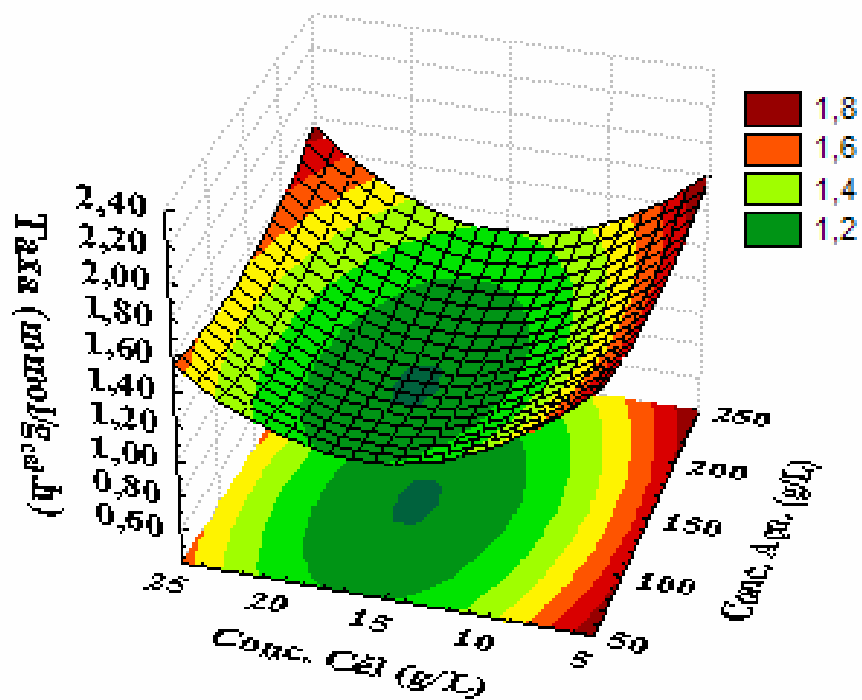


Figura 4.34 – Taxas específicas de formação em função da concentração de células e açúcares.

De acordo com o modelo empírico (Equação 4.8) obtido a partir dos dados da Tabela 4.3, é possível observar que os parâmetros significativos a 95 % de confiança foram pH, temperatura e concentração de células, enquanto que a concentração de açúcares não exerce influência estatisticamente significativa sobre a taxa de formação do ácido lactobiônico.

$$Taxa_Esp(mm\text{ol}g_{cel}^{-1}h^{-1}) = (1,136 \pm 0,038) + (0,379 \pm 0,032) \cdot pH^{norm} - (0,078 \pm 0,032) \cdot T^{norm} + (0,162 \pm 0,039) \cdot T^{norm} \cdot X^{norm} + (0,115 \pm 0,029) \cdot X^{norm^2} \quad (4.8)$$

A Tabela 4.4 mostra o coeficiente de correlação do modelo, bem como a variância obtida pelo modelo e a dos pontos centrais do planejamento, realizando assim o Teste F entre estas variâncias, mostrando que o $F_{calculado}$ está dentro do intervalo do $F_{tabelado}$. O Teste F realizado mostra que os erros de predição do modelo são semelhantes aos erros experimentais, e que, por isto, o modelo pode ser considerado satisfatório.

Tabela 4.4 – Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 4.8).

Variância		$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$		Coeficiente de Correlação
Ponto central	Modelo		Inferior	Superior	
0,016	0,024	0,672	0,295	8,510	0,938

A Equação 4.8 mostra que o pH é a variável que mais influencia a taxa específica. A taxa específica varia linearmente com o aumento do pH. Além disso, também existe uma combinação de efeitos entre a temperatura e concentração de células, além da temperatura apresentar uma dependência linear, entretanto, para valores menores de temperatura há um aumento na taxa. E a concentração de células passa por um mínimo, ou seja, a taxa específica aumenta à medida que se utilizam os extremos das concentrações de células.

A comparação feita entre a análise das superfícies de respostas juntamente com o modelo mostrou que as conclusões feitas com base nestas coincidiram com o modelo. Entretanto, este fornece informações sobre a influência de cada variável sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico.

4.3.2 – Novos Experimentos para Avaliação do Modelo Empírico

A Tabela 4.5 mostra alguns experimentos que foram realizados com objetivo de determinar quais condições forneceriam uma maior taxa específica de formação dentro da faixa de operação de cada uma das variáveis utilizadas, baseando-se nas informações fornecidas pelo modelo. Como a concentração de açúcares não influencia, optou-se por trabalhar com uma concentração de 50 g/L, pois à medida que a concentração aumenta, a viscosidade da solução também, dificultando a operação do processo.

Os dados apresentados na Tabela 4.5 mostram os valores de taxa específica preditos pelo modelo bem como os experimentais, sendo possível perceber que os dados preditos pelo modelo não coincidem satisfatoriamente com os dados experimentais. Entretanto, nota-se que o modelo é bem sucedido em prever qualitativamente o efeito de cada variável sobre a taxa específica de formação. Por exemplo, é possível perceber pelo modelo que a taxa aumenta com o aumento do pH e redução da temperatura, embora seus valores absolutos não reproduzam o observado experimentalmente.

Tabela 4.5 – Comparação entre os valores preditos e experimentais de taxa específica de formação do ácido lactobiónico ($\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Exp.	pH^{norm}	T^{norm}	C^{norm}	X^{norm}	pH	T (°C)	Conc. Aç. (g/L)	Conc. Cel. (g/L)	Taxa pred.	Taxa exper.
30	+1	+2	-2	+2	6,5	40	50	25	2,46	1,57
31	+1	-2	-2	-2	6,5	28	50	5	2,78	1,93
32	+2	+2	-2	+2	7,0	40	50	25	2,84	1,94
33	+2	-2	-2	-2	7,0	28	50	5	3,16	2,87

Assim, uma nova estimativa dos parâmetros foi realizada, incluindo na Tabela 4.3 os experimentos da Tabela 4.5 e obtendo um novo modelo empírico, como mostra a Equação 4.9.

$$Taxa_Esp(\text{mmol g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}) = (1,143 \pm 0,048) + (0,382 \pm 0,038) \cdot pH^{norm} - (0,111 \pm 0,032) \cdot T^{norm} + (0,100 \pm 0,027) \cdot X^{norm^2} \quad (4.9)$$

A principal diferença do novo modelo obtido (Equação 4.9) quando comparado com o anterior (Equação 4.8) é a ausência do termo que leva em conta a combinação dos efeitos da temperatura e concentração de células. A Tabela 4.6 mostra o Teste F

feito para o novo modelo (Equação 4.9) e que as flutuações experimentais observadas são semelhantes aos erros de predição do modelo.

Tabela 4.6 – Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 4.9).

Variância		$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}		Coeficiente de Correlação
Ponto central	Modelo		Inferior	Superior	
0,016	0,043	0,387	0,306	8,468	0,923

A Equação 4.9 mostra que o maior valor da taxa se encontra em um dos extremos da faixa de pH e temperatura investigada (pH 7,0, e temperatura 28 °C). Então, para verificar a consistência do modelo empírico obtido, o experimento 33 da Tabela 4.5 foi realizado novamente só que em triplicata, e comparado com o resultado predito pela Equação 4.9, como mostra a tabela a seguir.

Tabela 4.7 – Comparação entre os valores preditos e experimentais com base na Equação 4.9.

pH	T (°C)	Conc. Aç. (g/L)	Conc. Cel. (g/L)
7	28	50	5
pH^{norm}	T^{norm}	C^{norm}	X^{norm}
+2	-2	-2	-2
Taxa específica (mmol.g _{cel} ⁻¹ .h ⁻¹)			
Modelo		Experimento	
2,533		2,590 ± 0,248	

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4.7, o resultado predito pelo modelo está coerente com os obtidos experimentalmente. A dependência quadrática da concentração de células se manteve no novo modelo. Antes de tentar explicar fenomenologicamente esta dependência, foram realizados novos experimentos variando-se apenas a concentração de células, a fim de confirmar esse comportamento. O pH, a temperatura e a concentração de açúcares foram mantidas em 7,0, 28°C e 50 g/L respectivamente, e as concentrações de células utilizadas foram de 5, 15 e 25 g/L. Complementando a Tabela 4.5, foram realizados experimentos para as concentrações de células de 15 e 25 g/L, como mostra a Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Taxa específica de formação do ácido lactobiônico ($\text{mmol}\cdot\text{g}_{\text{cel}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) para os experimentos variando apenas a concentração de células.

Exp.	pH^{norm}	T^{norm}	C^{norm}	X^{norm}	pH	T (°C)	Conc. Aç. (g/L)	Conc. Cel. (g/L)	Taxa Esp. ($\text{mmol}\cdot\text{g}_{\text{cel}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
33	+2	-2	-2	-2	7,0	28	50	5	2,87
34	+2	-2	-2	0	7,0	28	50	15	1,95
35	+2	-2	-2	+2	7,0	28	50	25	1,73

O procedimento para a obtenção da Equação 4.9 foi refeito, acrescentando-se estes novos experimentos, totalizando agora 35 experimentos. A estimação dos parâmetros foi feita novamente obtendo o seguinte modelo empírico:

$$\begin{aligned} Taxa_Esp(\text{mmol}\text{ g}_{\text{cel}}^{-1}\text{h}^{-1}) = & (1,209 \pm 0,030) + (0,375 \pm 0,029) \cdot pH^{norm} - (0,081 \pm 0,027) \cdot T^{norm} \\ & - (0,071 \pm 0,028) \cdot X^{norm} + (0,090 \pm 0,019) \cdot X^{norm} \cdot T^{norm} \end{aligned} \quad (4.10)$$

A Equação 4.10 mostra que o pH continua sendo a variável que mais influencia no processo, e que à medida que diminui a temperatura, dentro da faixa estudada, há um ganho na taxa. Entretanto, observa-se que, agora, a concentração de células apresenta dependência linear, sendo um parâmetro negativo, mostrando que ocorre um aumento na taxa com a diminuição da concentração de células.

Além disso, há uma combinação de efeitos entre a temperatura e concentração de células. Essa combinação de efeitos indica a existência de componentes não lineares no problema experimental investigado, já que a resposta não pode ser descrita como uma simples soma de contribuições individuais, que no caso são os parâmetros lineares do modelo empírico obtido.

A Tabela 4.9 contém o Teste F para o modelo obtido (Equação 4.10), mostrando, mais uma vez, que os erros de predição do modelo são semelhantes às flutuações experimentais observadas.

Tabela 4.9 – Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 4.10).

Variância		$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}		Coeficiente de correlação
Ponto central	Modelo		Inferior	Superior	
0,016	0,030	0,555	0,308	8,461	0,947

Da Equação 4.10 encontram-se que as melhores condições para a taxa específica de formação do ácido lactobiônico dentro da faixa de cada uma das variáveis estudadas foram para um pH de 7,0, 28 °C e 5 g/L de células. Assim, nas etapas futuras desse trabalho foram empregadas essas condições. Quanto à concentração de açúcares, esta foi mantida no valor mínimo investigado, de 50 g/L, uma vez que esta variável não exerce influência sobre a taxa específica de formação.

Como mostrado em todas as tabelas relacionadas sobre a análise estatística do modelo, foi possível observar que o coeficiente de correlação variou de 0,92 a 0,95, e, de acordo com essa informação, foi feito um gráfico dos valores observados *versus* os valores preditos pelo modelo (Equação 4.10), como mostra a Figura 4.35.

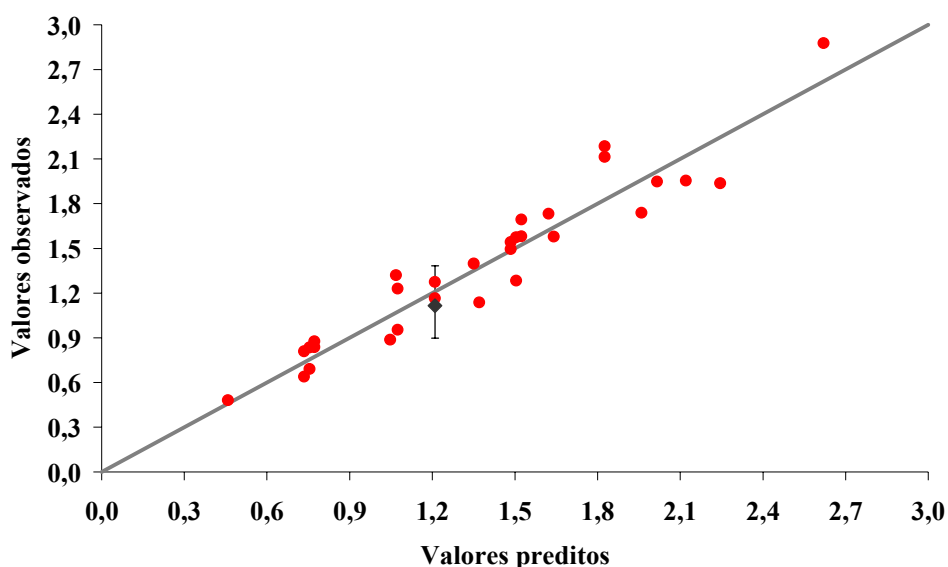


Figura 4.35 – Valores observados e preditos pelo modelo (Equação 4.10).

O intervalo de confiança das réplicas dos pontos centrais está representado pela barra preta na Figura 4.35, mostrando a incerteza experimental, conforme foi mostrado na Tabela 4.3. Assim pode-se dizer que o modelo mostrado na Equação 4.10 se mostrou bem sucedido, pois os dados preditos por ele conseguiram explicar os resultados experimentais com incertezas compatíveis com aquelas observadas experimentalmente (SCHWAAB e PINTO, 2007).

Um dos objetivos de se realizar um planejamento experimental é investigar a existência de vínculos entre as diversas variáveis dependentes, bem como a relevância destas variáveis no caso estudado. Para isto, é necessário que a matriz de covariâncias dos parâmetros seja diagonal (ou seja, que todas as covariâncias (correlações) sejam

iguais a zero e, portanto, as incertezas a respeito de um efeito particular não perturbem a análise dos demais efeitos) e que os termos da diagonal principal sejam mínimos (ou seja, que as incertezas existentes sobre os efeitos analisados após a realização dos experimentos sejam as menores possíveis) (SCHWAAB e PINTO, 2007).

A Tabela 4.10 mostra a matriz de correlação dos parâmetros estimados da Equação 4.10, sendo possível observar que as correlações não são iguais a zero, tornando a matriz não diagonal. Entretanto, nota-se que os parâmetros não estão fortemente correlacionados, pois todas as correlações se encontram abaixo de 0,70.

Tabela 4.10 – Matriz de correlação dos parâmetros estimados.

	a0	a1	a2	a3	a4
a0	1,00	-0,18	0,10	-0,08	-0,18
a1	-0,18	1,00	0,24	-0,18	-0,27
a2	0,10	0,24	1,00	-0,32	-0,24
a3	-0,08	-0,18	-0,32	1,00	0,22
a4	-0,18	-0,27	-0,24	0,22	1,00

De acordo com planejamento experimental, foi possível observar a partir do modelo empírico obtido que a taxa específica de formação do ácido lactobiônico aumenta à medida que há um aumento do pH e uma diminuição da temperatura e concentração de células. No que diz respeito ao pH, o valor ótimo encontrado diferiu daquele observado por ZACHARIOU e SCOPES (1986), que foi de 6,2, lembrando que os autores utilizaram GFOR purificada e utilizaram a glicose como substrato, enquanto que no presente trabalho foram utilizadas células permeabilizadas e um outro substrato, que é a lactose.

Outros trabalhos na literatura também mostram alguns estudos realizados para verificar a influência do pH sobre a produção de sorbitol e ácido glicônico a partir de células permeabilizadas e imobilizadas de *Zymomonas mobilis*, encontrando valores diferentes dos obtidos por ZACHARIOU e SCOPES (1986). Os estudos feitos por REHR *et al.* (1991) observaram uma faixa ótima de pH entre 6,5 e 7,0 para a produção de sorbitol e ácido glicônico por células de *Zymomonas mobilis* permeabilizadas e imobilizadas em carragenato. No trabalho realizado por MALVESSI *et al.* (2007), também se avaliou a influência do pH sobre a produção de sorbitol e ácido glicônico a partir de células de *Zymomonas* permeabilizadas e imobilizadas em alginato de cálcio. Os autores observaram que os melhores resultados foram para a faixa de pH entre 7,7 e 8,7.

No caso da produção de sorbitol e ácido lactobiônico a partir da lactose e frutose, o fato de as melhores taxas terem sido obtidas em um pH 7,0 (ou acima, caso a mesma estrutura do modelo empírico da Equação 4.10 seja válida acima do pH 7,0) pode estar relacionado ao pH do micro ambiente onde a enzima se encontra, pois como são utilizadas células permeabilizadas e não a enzima purificada, pode haver uma resistência à transferência de massa neste sistema, fazendo com o pH do meio reacional seja maior do que o do micro ambiente, onde a reação ocorre. Além disso, deve-se levar em conta que o sistema estudado nesse trabalho é diferente do normalmente encontrado em trabalhos anteriores, de forma que novas condições diferentes daquelas determinadas na literatura são esperadas.

O fato da taxa específica aumentar à medida que ocorre a diminuição da temperatura dentro da faixa estudada, pode estar relacionado à afinidade da enzima pelo substrato (lactose e frutose). Como a faixa de temperatura adotada foi de 28 a 40 °C, possivelmente se fosse utilizada uma faixa mais ampla de temperatura, a dependência desta variável poderia não ser linear, passando por um máximo em algum valor de temperatura que não foi avaliado ainda.

O modelo também mostra que a taxa específica aumenta à medida que a concentração de células diminui. Isso pode ser devido a efeitos relacionados à transferência de massa, uma vez que a enzima está no interior da célula permeabilizada, havendo limitações à transferência de massa dos açúcares ao sítio catalítico da enzima para reagirem com a mesma. À medida que a concentração de células vai aumentando pode ocorrer a formação de aglomerados dificultando o acesso dos açúcares ao interior das células.

Vale lembrar que a partir dos resultados obtidos sobre a avaliação dos meios de cultivo que mostraram que o meio 5B apresentava os melhores resultados, com uma taxa específica em torno de $1,76 \pm 0,23 \text{ mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, o planejamento experimental realizado permitiu a obtenção de taxas específicas desde de 0,48 até 2,87 $\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, havendo assim uma melhora na taxa específica de reação. Além disso, foi possível mostrar que toda rotina de planejamento experimental deve ser encarada como um processo iterativo, ao longo do qual os pressupostos vão sendo revistos e aperfeiçoados.

4.4 – Confinamento das Células em Membranas de Fibras Ocas

A partir dos experimentos já realizados, foi possível definir qual o melhor meio de cultivo, bem como as variáveis que mais influenciam a taxa específica de formação do ácido lactobiônico. Nessa etapa, avaliou-se a imobilização celular em módulos contendo membranas do tipo fibras ocas. Todos os experimentos foram feitos utilizando as células cultivadas no meio 5B, meio de composição definida, a um pH 7,0, temperatura de 28 °C, concentração de açúcares de 50 g/L (lactose) e de 25 g/L (frutose) e concentração de células de 5 g/L, como determinado anteriormente.

Nos estudos cinéticos que foram realizados confinando as células no exterior da fibra, o volume de células utilizado foi de 70 mL, correspondendo a 350 mg de células, e o volume da solução de açúcares foi de 100 mL. Para avaliar o efeito da vazão de circulação foram feitos experimentos em triplicata para as seguintes vazões de 15, 20 e 25 L/h.

A Figura 4.36 mostra o efeito da vazão de circulação da solução de açúcares para as células confinadas no exterior das fibras, sendo possível observar que há um aumento na taxa específica de formação ao elevar a vazão de 15 para 20 L/h. Entretanto, as limitações de transferência de massa cessam acima de 20 g/L pois não há nenhuma diferença significativa entre os perfis de taxa específica quando se aumenta a vazão de circulação para 25 L/h.

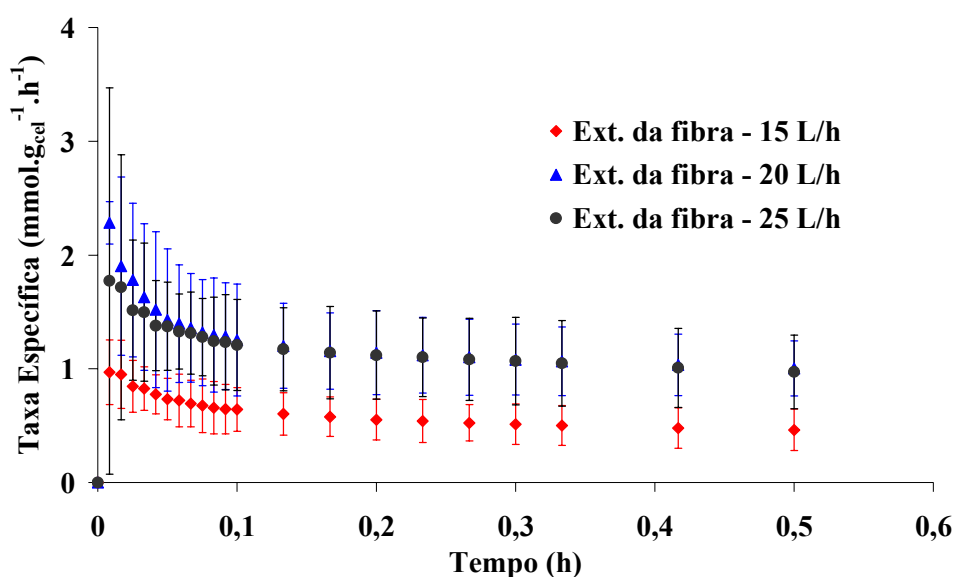


Figura 4.36 – Efeito da vazão de circulação sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiônico com as células imobilizadas no exterior da fibra. As barras representam os intervalos de confiança.

Para realizar os estudos cinéticos com as células no interior da fibra, bem como fazer uma comparação com experimentos realizados no exterior da fibra, foi necessário colocar no interior das fibras a mesma massa de células (350 mg). Para tanto, o volume de células colocadas no interior das fibras foi de, aproximadamente, 2 mL e o volume da solução de açúcares foi de 100 mL.

A Figura 4.37 mostra o efeito da vazão de circulação para as células confinadas no interior das fibras. Para a vazão de 20 L/h, o experimento foi feito em triplicata. Já para os experimentos realizados a 25 L/h, não foi possível confinar repetidamente a mesma massa de células no interior das fibras, impossibilitando a realização das réplicas dos experimentos. A dificuldade em confinar a mesma de células deve-se ao reduzido diâmetro interno das fibras ocas utilizadas, o que ocasionava uma perda de carga durante ao preenchimento das mesmas com a suspensão celular, levando à permeação de líquido e, conseqüentemente, à introdução de volumes variados da suspensão.

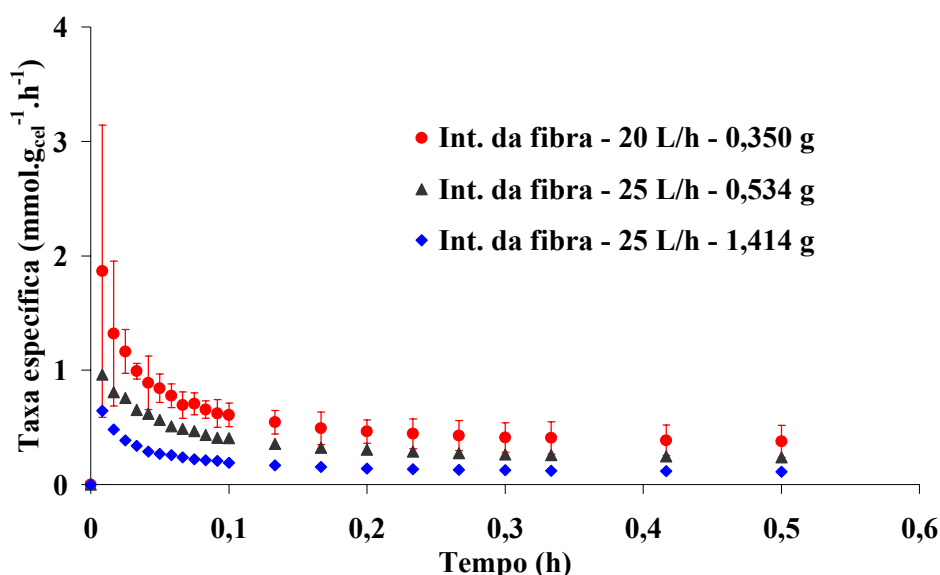


Figura 4.37 – Efeito da vazão de circulação sobre a taxa específica de formação do ácido lactobiónico com as células imobilizadas no interior da fibra. As barras representam os intervalos de confiança.

A Tabela 4.11 mostra os valores das taxas específicas para os experimentos realizados com as células confinadas no interior e exterior das fibras. Verifica-se na Tabela 4.11 que todos os experimentos realizados com as células confinadas no exterior da fibra apresentaram uma taxa maior do que os experimentos com as células confinadas no interior da fibra. Isto pode estar relacionado a limitações difusionais, pois

ao confinar as células no interior das fibras ocorre uma aglomeração das células dificultando o acesso dos açúcares ao interior das mesmas.

Tabela 4.11 – Taxas específicas médias de formação do ácido lactobiônico ($\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$) para as células confinadas em membranas de fibras ocas.

Confinamento das células	Vazão (L/h)	Taxa Esp. ($\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Desvio padrão
Exterior	15	0,65	0,07
	20	1,35	0,17
	25	1,25	0,21
Interior	20	0,46	0,05
	25	0,30	---
	25	0,14	---

A Tabela 4.12 mostra uma comparação entre as taxas específicas de formação do ácido lactobiônico obtidas desde a avaliação dos meios de cultivo até o confinamento das células em membranas de fibras ocas.

Tabela 4.12 – Taxas específicas de formação do ácido lactobiônico ($\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$) para as células confinadas em membranas de fibras ocas.

Etapa	Melhor condição	Taxa Esp. ($\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Avaliação dos meios de cultivo	Meio de cultivo 5B	$1,76 \pm 0,23$
Planejamento experimental com células livres	pH 7,0, 28 °C, 5 g/L de células, 50 g/L lactose e 25 g/L frutose	$2,87 \pm 0,13$
Confinamento das células em membranas de fibras ocas	Vazão de 20 L/h para as células confinadas no exterior das fibras	$1,35 \pm 0,17$

É possível observar na Tabela 4.12 que a taxa específica obtida para as células confinadas no exterior das fibras é aproximadamente metade da taxa obtida no planejamento experimental com as células livres. Mesmo sendo menor, devido a limitações difusionais, para fazer a integração do processo de reação e separação por eletrodialise, não seria possível trabalhar com as células livres. FERRAZ (1999) realizou a integração do processo de reação e separação de sorbitol e ácido glicônico utilizando células livres e acoplada a uma unidade de eletrodialise, e verificou que grande parte das células estava aderida às membranas de troca iônica, provocando assim um aumento da resistência elétrica.

Diante desses resultados, optou-se por fazer a integração do processo utilizando as células confinadas no exterior das fibras.

4.5 – Separação por Eletrodialise

Foram realizados testes preliminares com as membranas de troca iônica Hidrodex para a remoção de ácido lactobiônico. A Figura 4.38 mostra os testes preliminares variando apenas a tensão (30 e 60 Volts) e a concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos, tendo como alimentação apenas a solução de ácido lactobiônico a 10 g/L, mantido em circulação a uma vazão de 20 L/h.

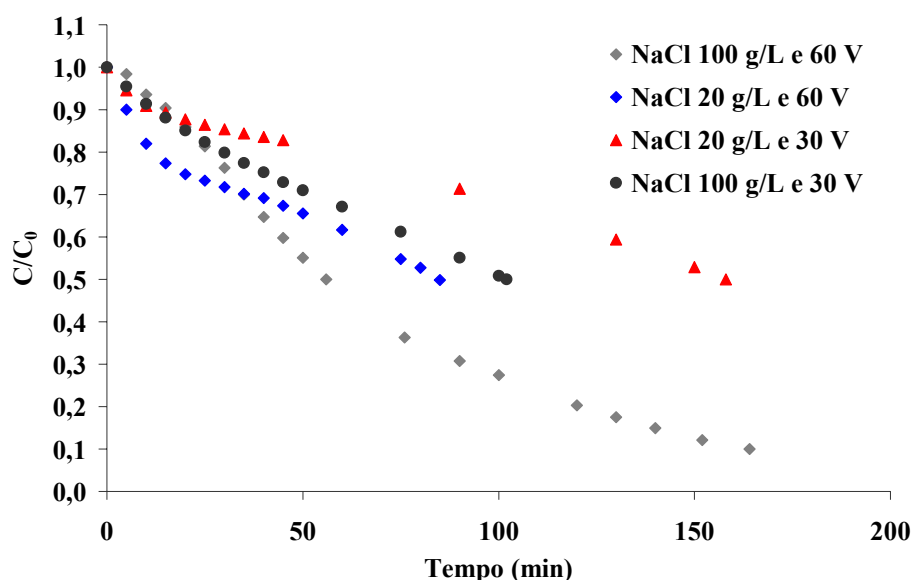


Figura 4.38 – Influência da concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos e da tensão durante a remoção de ácido lactobiônico.

Nesses experimentos, comparou-se a taxa de separação do ácido lactobiônico quando a remoção era de 50 % (Tabela 4.13). De acordo com a Tabela 4.13, observa-se que à medida em que a tensão e a concentração de NaCl nos eletrodos aumentam, a taxa de remoção do ácido lactobiônico aumenta. Como o experimento realizado a 60 V e 100 g/L de NaCl no compartimento dos eletrodos apresentou a maior taxa de remoção, prosseguiu-se então com o mesmo para verificar o tempo necessário para uma remoção de 90% do ácido que, nesse caso, foi de cerca de três horas para o experimento 4.

Tabela 4.13 – Testes preliminares para avaliar a remoção de ácido lactobiônico.

Experimento	Tensão (V)	Concentração de NaCl nos eletrodos (g/L)	Taxa para remover 50 % do ácido (g.min⁻¹.L⁻¹)
1	30	20	0,032
2	30	100	0,049
3	60	20	0,059
4	60	100	0,089

Apesar do bom desempenho das membranas Hidrodex na separação do ácido lactobiônico, observou-se um elevado transporte de água durante o experimento, pelo qual cerca de 40 % do volume da alimentação era transportado para corrente do concentrado. Assim, visando aumentar a eficiência do processo, selecionaram-se novas membranas, do fabricante Ionics (CR 67 HMR-412 e AR 204 SZRA-412).

Nesses testes, foi utilizado o íon gliconato, mais disponível e de menor custo, como modelo para o lactobionato. Empregou-se uma solução de gliconato de sódio a 80 g/L (300 mL), mantida em circulação a uma vazão de 20 L/h, aplicando-se uma diferença de potencial de 18 V, sendo adicionado no compartimento dos eletrodos uma solução de NaCl a 20 g/L. A concentração do gliconato foi monitorada por condutivimetria.

A Figura 4.39 mostra o resultado da avaliação das duas membranas utilizadas para promover a remoção do gliconato de sódio. As membranas da Ionics apresentaram um melhor desempenho quando comparadas com as da Hidrodex, além disso, as membranas da Ionics não possuíram um transporte significativo de água durante o tempo de operação do experimento, tendo-se escolhido essas membranas para a continuidade dos estudos.

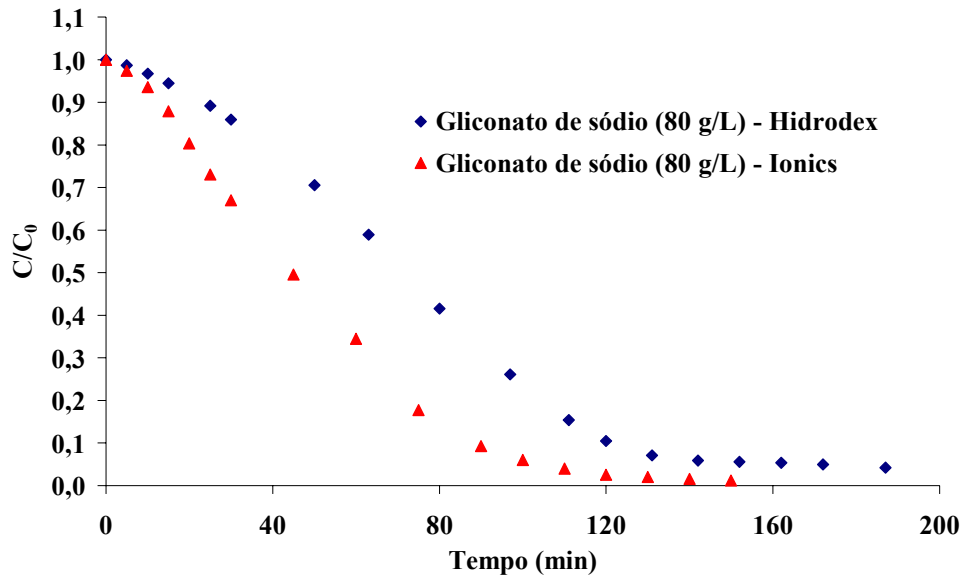


Figura 4.39 – Comparação entre as membranas Hidrodex e Ionics na remoção de íons gliconato.

O mesmo experimento havia sido realizado por FERRAZ (1999) em um sistema semelhante, obtendo uma remoção de mais de 90 % de gliconato de sódio em aproximadamente 5 horas, enquanto que nesse trabalho foi possível atingir a mesma remoção em menos de 2 horas. Isto se deve ao fato de que a célula de eletrodialise utilizada por FERRAZ (1999) possuía apenas 1 par de membranas de troca iônica, enquanto que a célula de eletrodialise projetada para ser usada nestes experimentos possui área de membrana 4 vezes maior e 4 pares de membranas de troca iônicas.

Outra observação é que, ao comparar os resultados obtidos para a remoção do ácido lactobiônico com o gliconato de sódio, verifica-se que é possível remover o gliconato de sódio com mais facilidade. Para a remoção do gliconato sódio, foi utilizado 20 g/L de NaCl no compartimento dos eletrodos e 18 V, removendo mais de 90 % em cerca de 120 minutos. Em condições semelhante, 30 V e 20 g/L de NaCl no compartimento dos eletrodos, nota-se que é necessário cerca de 160 minutos para remover apenas 50 % do ácido lactobiônico. Esta diferença pode ser atribuída ao fato de que o lactobionato possui massa molar maior que o gliconato (praticamente o dobro).

Diante dos resultados obtidos nos testes preliminares apresentados na Tabela 4.13, foi feito então um planejamento experimental utilizando as membranas Ionics, para verificar quais as melhores condições de taxa específica de remoção do ácido lactobiônico.

O planejamento experimental empregado foi do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional) do tipo 2³, tendo como variáveis a tensão, concentração de NaCl nos eletrodos e na corrente do concentrado. Esta última variável foi utilizada com o intuito de aumentar a condutividade, diminuindo, assim, a resistência ao transporte entre as membranas. A Tabela 4.14 mostra os níveis de cada uma das variáveis utilizadas.

Tabela 4.14 – Níveis das variáveis utilizadas para o planejamento experimental na unidade de eletrodialise.

Variável	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Tensão	20	28,09	40	51,9	60
Concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos (g/L)	24,4	55	100	145	175,6
Concentração de NaCl na corrente do concentrado (g/L)	0,0	0,619	1,512	2,404	3,0

Na Tabela 4.14, observa-se que a tensão foi variada de 20V a 60V. Não foram utilizados valores menores que 20 V devido à baixa eficiência de remoção nessa condição e não foram utilizados valores acima de 60 V para não exceder a capacidade da fonte de corrente contínua empregada nos estudos. No caso das outras variáveis, seus intervalos foram escolhidos em função de resultados obtidos em testes preliminares.

As Equações 4.11 a 4.13 representam as variáveis normalizadas, V^{norm} (tensão), $NaCl.El^{norm}$ (concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos), $NaCl.Conc^{norm}$ (concentração de NaCl na corrente do concentrado).

$$V^{norm} = \frac{Voltagem - 40}{11,91} \quad (4.11)$$

$$NaCl.El^{norm} = \frac{NaCl.EL - 100}{45} \quad (4.12)$$

$$NaCl.Conc^{norm} = \frac{NaCl.Conc - 1,512}{0,893} \quad (4.13)$$

A Tabela 4.15 mostra a matriz planejamento contendo 17 experimentos, sendo 3 réplicas no ponto central, tendo como resposta a taxa específica de remoção do ácido lactobiônico (g.min⁻¹.m⁻²).

Todos os experimentos foram feitos a 30 °C e a uma vazão de 20 L/h utilizando 150 ml de soluções sintéticas de lactose, frutose, sorbitol e ácido lactobiônico. Como serão utilizadas nas reações enzimáticas soluções com 50 g/L de lactose e 25 g/L de frutose, foram feitas soluções simulando uma conversão de 10 %, utilizando-se, assim, soluções contendo 40 g/L de lactose, 20 g/L de frutose, 5 g/L de sorbitol e 10 g/L de ácido lactobiônico. As taxas específicas de remoção mostradas na Tabela 4.15 foram calculadas quando a concentração de ácido lactobiônico na alimentação chegou a 1 g/L, concentração máxima desejável na saída do biorreator a membranas para o caso de haver inibição da atividade enzimática pelo produto.

As Figuras 4.40 a 4.43 mostram as curvas de remoção do ácido lactobiônico em função do tempo para todos os experimentos da Tabela 4.15. As Figuras 4.40 e 4.41 mostram os experimentos de 1 a 4 e 5 a 8, respectivamente, variando apenas a tensão e concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos, enquanto que a concentração de NaCl na corrente do concentrado é constante (2,404 g/L – Figura 4.40; 0,619 g/L – Figura 4.41). Em ambas as figuras observa-se que à medida que a tensão aumenta, a taxa de remoção aumenta também, sendo possível notar que a concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos não exerce muita influência sobre a remoção do ácido lactobiônico.

Já na Figura 4.42 são mostradas as curvas de remoção para as réplicas no ponto central, experimento 9 a 11, apresentando uma boa reprodutibilidade. A Figura 4.43 está relacionada às curvas de remoção dos pontos axiais do planejamento experimental, sendo possível observar uma grande influência da tensão como mostram os experimentos 12 e 13, pois, ao aumentar a tensão de 20 V para 60 V, o tempo para remover mais de 95 % de ácido lactobiônico cai de aproximadamente 100 min para 50 min. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença sobre a taxa específica de remoção do ácido lactobiônico ao variar a concentração de NaCl nos eletrodos (experimentos 14 e 15). Já para concentração de NaCl na corrente do concentrado observa-se, também, há uma grande influência desta variável sobre a remoção de ácido lactobiônico.

Tabela 4.15 – Matriz de planejamento para os experimentos realizados na unidade de eletrodialise.

Exp.	V^{norm}	$NaCl.El^{norm}$	$NaCl.Conc^{norm}$	Volt. (V)	NaCl nos eletr. (g/L)	NaCl no conc. (g/L)	Taxa Esp. de remoção ($g.min^{-1}.m^{-2}$)
1	+1	-1	+1	51,9	55	2,404	1,48
2	+1	+1	+1	51,9	145	2,404	1,33
3	-1	-1	+1	28,09	55	2,404	0,84
4	-1	+1	+1	28,09	145	2,404	0,80
5	+1	-1	-1	51,9	55	0,619	1,13
6	+1	+1	-1	51,9	145	0,619	0,92
7	-1	-1	-1	28,09	55	0,619	0,75
8	-1	+1	-1	28,09	145	0,619	0,76
9	0	0	0	40	100	1,512	1,16
10	0	0	0	40	100	1,512	1,01
11	0	0	0	40	100	1,512	1,03
12	-1,68	0	0	20	100	1,512	0,58
13	+1,68	0	0	60	100	1,512	1,31
14	0	-1,68	0	40	24,4	1,512	1,04
15	0	+1,68	0	40	175,6	1,512	1,01
16	0	0	-1,68	40	100	0,0	0,67
17	0	0	+1,68	40	100	3,0	0,88

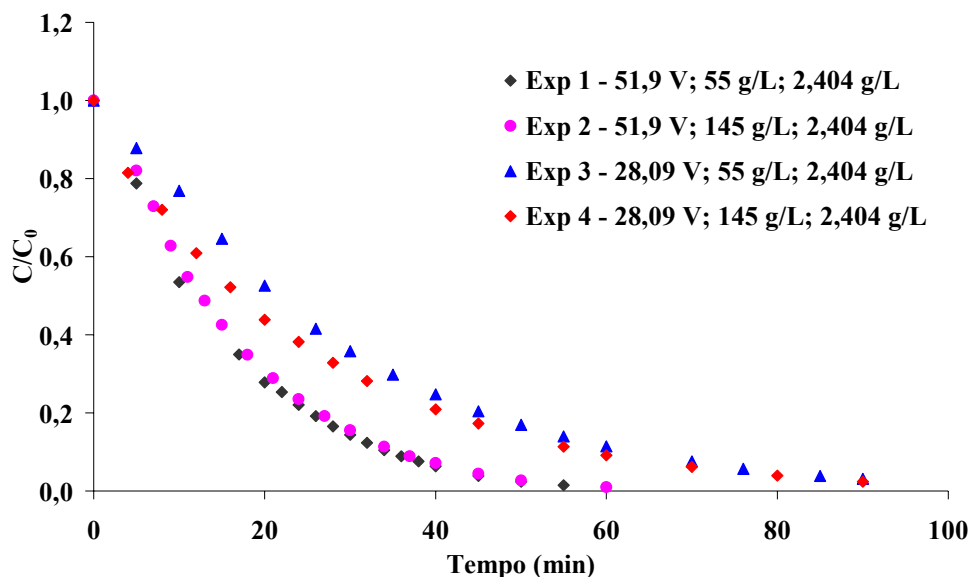


Figura 4.40 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico para os experimentos 1 até 4, mostrados na Tabela 4.15.

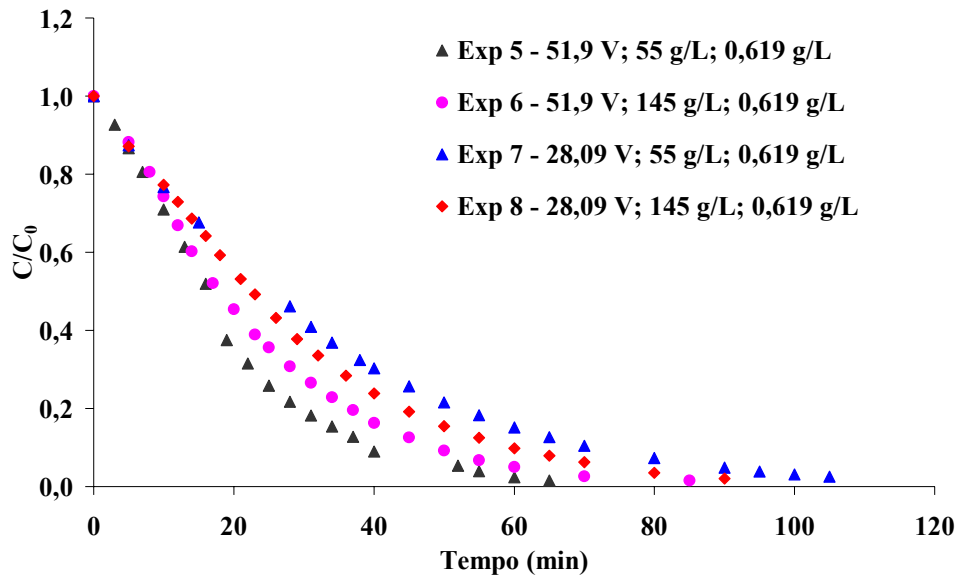


Figura 4.41 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico para os experimentos 5 até 8, mostrados na Tabela 4.15.

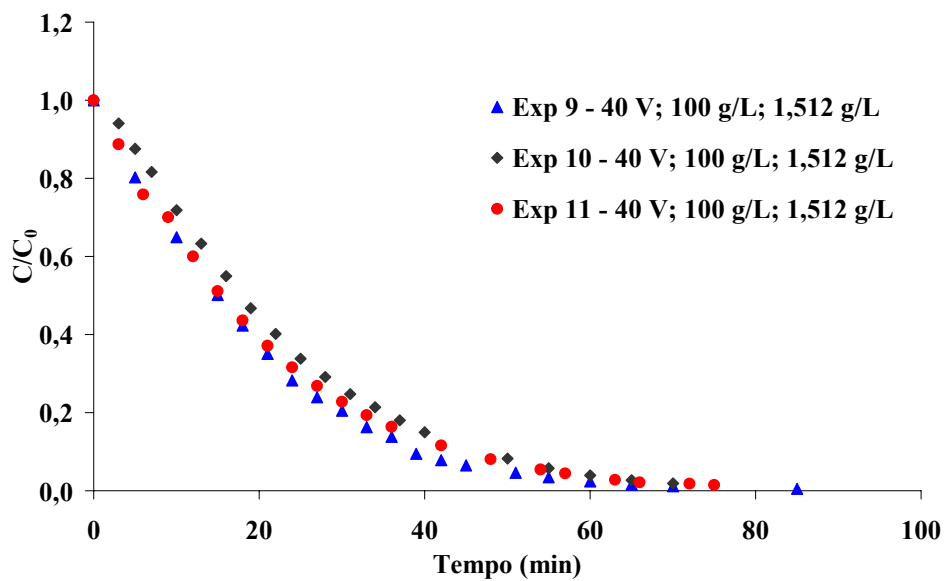


Figura 4.42 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico para os experimentos 9 até 11 (pontos centrais), mostrados na Tabela 4.15.

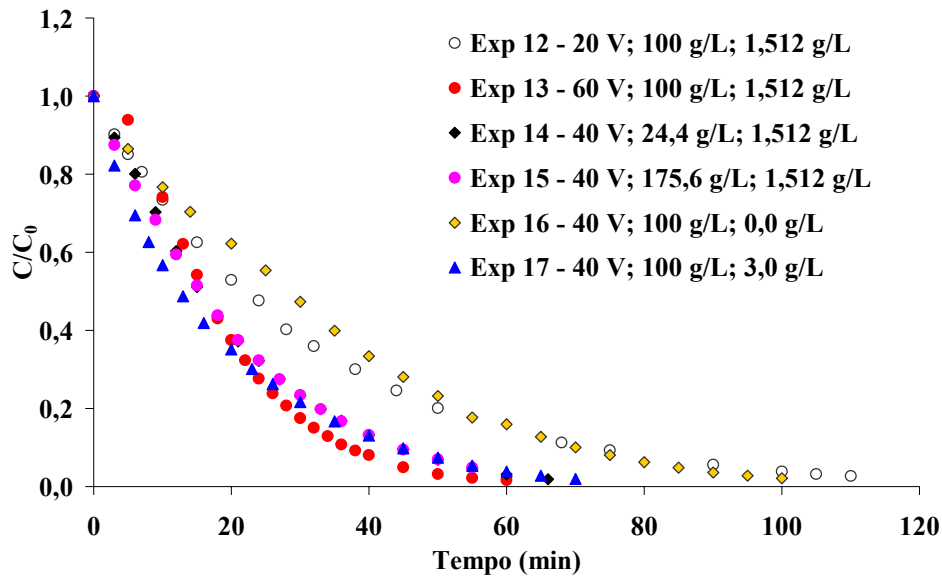


Figura 4.43 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico para os experimentos 12 até 17 (pontos axiais), mostrados na Tabela 4.15.

De acordo com os valores obtidos através do planejamento experimental, é possível analisar os efeitos de cada uma das variáveis sobre a taxa específica de remoção do ácido lactobiônico, bem como verificar a significância destas. Da mesma forma como foi feito no planejamento experimental para as células permeabilizadas, foi realizada uma análise das superfícies de resposta juntamente com o modelo empírico. Vale ressaltar, mais uma vez, que uma análise mais rigorosa dos resultados deve ser feita com base apenas no modelo empírico.

As Figuras 4.44 a 4.46 mostram as superfícies de respostas geradas para cada conjunto de duas variáveis tendo como resposta a taxa específica de remoção do ácido lactobiônico. Na Figura 4.44 observa-se a taxa específica de remoção em função da tensão e concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos, mostrando que quanto maior a tensão, maior a remoção, sem influência significativa da concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos sobre a taxa. A Figura 4.45, que leva em conta a tensão e a concentração de NaCl na corrente do concentrado, mostra que, quanto maior a tensão e concentração do sal, maior é a taxa específica de remoção, sendo possível observar que a concentração de NaCl na corrente do concentrado passa por um máximo. Já a Figura 4.46, em função da concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos e na corrente do concentrado, mostra a concentração de sal nos eletrodos não exerce

efeito significativo na taxa específica de remoção, entretanto, o efeito da concentração de sal na corrente do concentrado aparenta passar por um máximo.

De modo geral, observa-se que não há muita influência da concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos sobre a taxa específica de remoção do ácido lactobiônico. A taxa específica de remoção tende a aumentar à medida que ocorre um aumento da tensão e concentração de NaCl na corrente do concentrado. Vale ressaltar que, ao mencionar o efeito de uma determinada variável sobre a taxa, isso é válido apenas para faixa estudada.

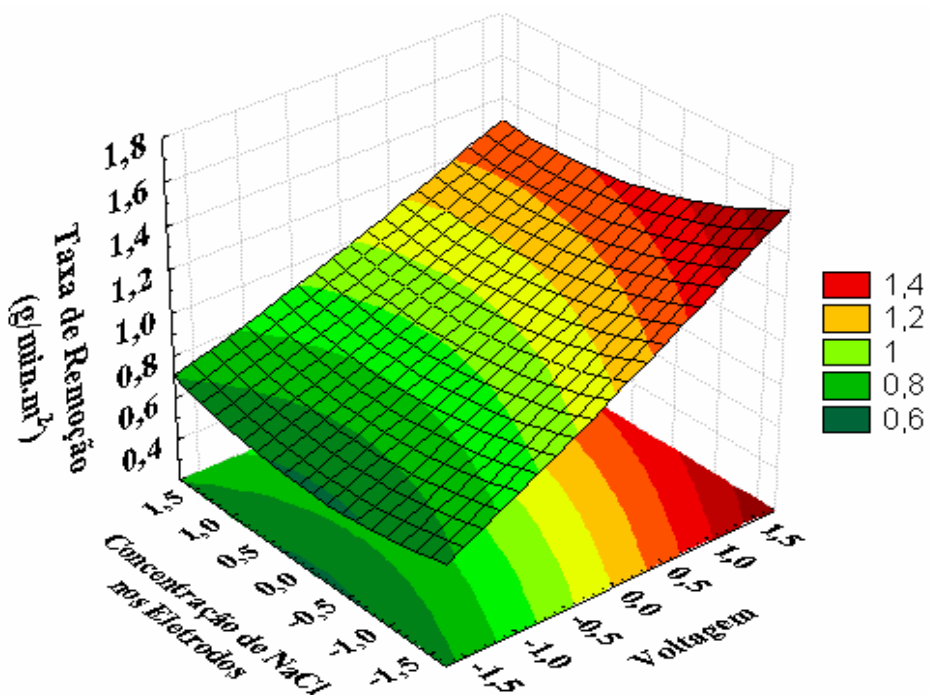


Figura 4.44 – Gráfico da superfície de resposta tendo como variáveis a concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos e tensão.

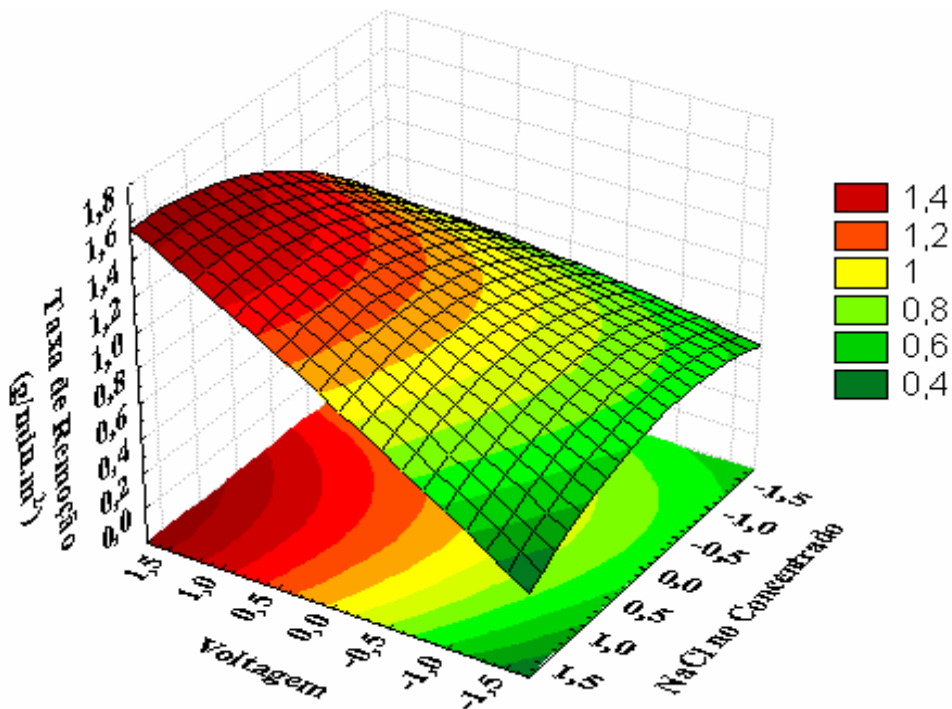


Figura 4.45 – Gráfico da superfície de resposta tendo como variáveis a concentração de NaCl na corrente do concentrado e tensão.

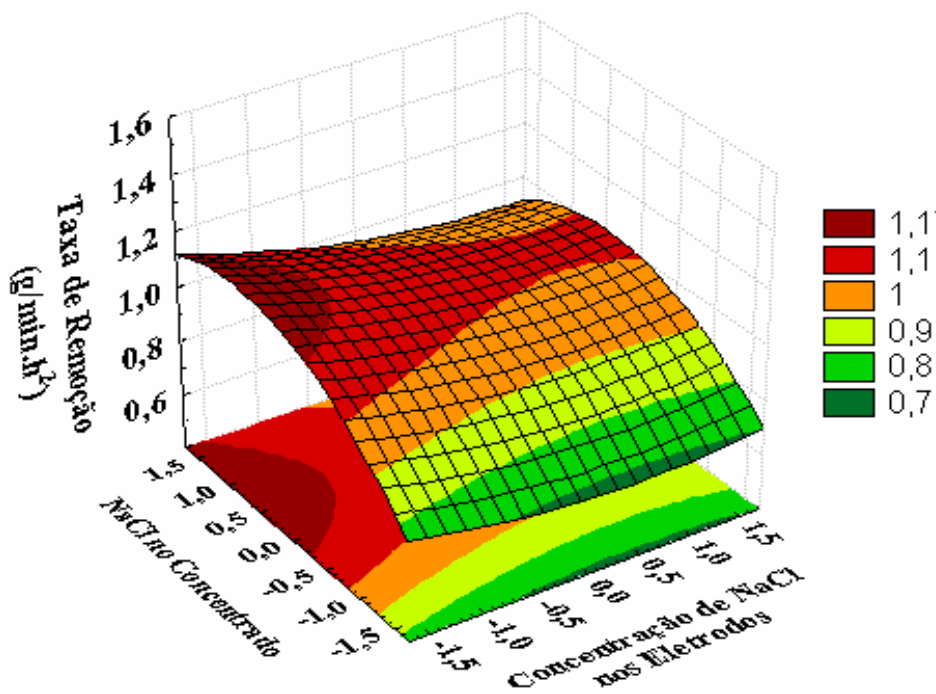


Figura 4.46 – Gráfico da superfície de resposta tendo como variáveis a concentração de NaCl na corrente do concentrado e no compartimento dos eletrodos.

A partir dos dados da Tabela 4.15 foi obtido um modelo empírico (Equação 4.14), pelo qual é possível observar que os parâmetros significativos a 95 % de confiança foram a tensão e a concentração de NaCl na corrente do concentrado, enquanto que a concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos não exerce influência sobre a taxa específica de remoção do ácido lactobiônico.

$$TER(g \cdot \text{min}^{-1} \cdot m^{-2}) = (1,045 \pm 0,028) + (0,215 \pm 0,023) \cdot V^{norm} + (0,091 \pm 0,023) \cdot NaClConc^{norm} + (0,078 \pm 0,031) \cdot V^{norm} \cdot NaClConc^{norm} - (0,078 \pm 0,042) \cdot NaClConc^{norm^2} \quad (4.14)$$

A Tabela 4.16 mostra o coeficiente de correlação do modelo, bem como a variância obtida pelo modelo e a dos pontos centrais do planejamento. Empregando-se o Teste F entre estas variâncias, obtém-se que o $F_{calculado}$ está dentro do intervalo do $F_{tabelado}$, permitindo concluir que os erros de predição do modelo são semelhantes aos erros experimentais observados, confirmando, assim, a sua qualidade.

Tabela 4.16 – Teste F para as variâncias dos pontos centrais e do modelo (Equação 4.14).

Variância		$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$		Coeficiente de correlação
Ponto central	Modelo		Inferior	Superior	
$6,544 \cdot 10^{-3}$	$7,666 \cdot 10^{-3}$	0,853	0,196	39,414	0,953

A Equação 4.15 mostra que a tensão é a variável que mais influencia a taxa específica de remoção, sendo um parâmetro linear e positivo, ou seja, quanto maior é a tensão maior é a taxa, e que esta varia linearmente com o aumento da tensão. Observa-se também que existe uma combinação de efeitos entre a tensão e a concentração de sal, indicando a existência de não linearidades no problema experimental investigado. De acordo com a Equação 4.14, o efeito da concentração de NaCl na corrente do concentrado passa por uma máximo. Com o auxílio do Software Mathcad foi utilizada uma função para achar quais os valores das variáveis, dentro da faixa estudada, maximizam a taxa específica de remoção. A melhor condição encontrada foi uma tensão de 60 V e uma concentração de 3,0 g/L de NaCl na corrente do concentrado.

A Figura 4.47 mostra resistência aparente da unidade de eletrodialise calculada para os experimentos 12 e 13, de forma a avaliar o efeito da tensão, e os experimentos 16 e 17, com o intuito de mostrar a influência da concentração de sal na corrente do

concentrado. A resistência aparente da unidade de eletrodialise foi calculada com base na Equação 4.15, como mostra a seguir:

$$R(Ohm) = \frac{V}{i} \quad (4.15)$$

onde V e i são a tensão aplicada e a corrente elétrica do sistema.

É possível verificar na Figura 4.47, no caso dos experimentos 12 e 13 que, ao aumentar a tensão de 12 V para 20 V, a resistência elétrica do sistema diminui pois a corrente elétrica também aumenta. Para o experimento 13 que utiliza a maior tensão, há uma menor resistência ao transporte ao longo de todo o tempo quando comparado com o experimento 12 a 20 V.

O efeito da concentração de sal na corrente do concentrado também é evidenciado na Figura 4.47 pois, no início do experimento (tempo = 0), a resistência aparente da unidade sem adição de sal é de aproximadamente 500 Ohms, enquanto que ao adicionar 3 g/L de sal na corrente do concentrado a resistência inicial fica em torno de 60 Ohms, cerca de 8 vezes menor que o experimento feito sem a adição de NaCl. Isso se deve ao fato de que o sal aumenta a condutividade no compartimento entre as membranas, diminuindo, assim, a resistência ao transporte.

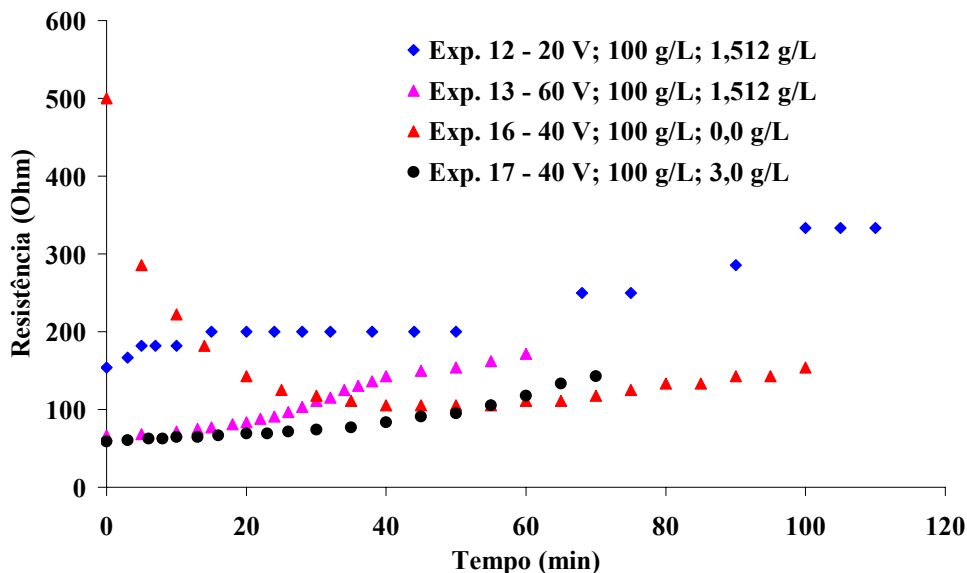


Figura 4.47 – Resistência elétrica aparente do sistema de eletrodialise dos experimentos 12, 13, 16 e 17 da Tabela 4.15.

Nos testes preliminares, evidenciou-se a influência da concentração de NaCl no compartimento dos eletrodos, e um dos motivos que pode ter feito com que no planejamento experimental realizado não tivesse sido observado a influência desta variável pode ser o fato de a membrana ser diferente, pois nos testes preliminares foram utilizadas membranas fornecidas pela Hidrodex LTDA e, no planejamento experimental, membranas da Ionics (GE Waters).

Nos experimentos preliminares, ocorreu a transferência de íons do compartimento dos eletrodos para a corrente do concentrado. À medida que a concentração de sal nos eletrodos aumentava, ocorria um aumento no transporte destes íons. Como os experimentos realizados no planejamento experimental já continham sal na corrente do concentrado, mesmo ocorrendo o transporte de íons do compartimento dos eletrodos para os canais do concentrado, esse transporte provavelmente não foi tão significativo frente à concentração de NaCl existente na corrente o concentrado.

Para todos os experimentos do planejamento experimental ocorreu uma remoção de mais de 95 % de ácido lactobiônico, diferentemente do trabalho desenvolvido PERETTI (2006), que estudou a utilização da eletrodialise para a separação de ácido provenientes do processo biotecnológico catalisado pela enzima GFOR de *Zymomonas mobilis*. Nas melhores condições encontradas pelo autor, houve uma remoção de 38,7 % em 250 min a partir de soluções sintéticas com 20 g/L de ácido lactobiônico a 15 V. Já a recuperação do ácido lactobiônico proveniente de uma solução contendo todos os componentes do ensaio de conversão (lactose, frutose e sorbitol) foi de 14 % no mesmo período.

Com base nas melhores condições obtidas experimentalmente através do planejamento experimental, foram feitos outros testes simulando uma nova condição que fosse o mais próxima possível daquela que seria obtida após a etapa de reação no biorreator à membrana. Deste modo, foram utilizadas 150 mL de soluções sintéticas contendo 49 g/L de lactose, 24,5 g/L de frutose, 1 g/L de ácido lactobiônico e 0,5 g/L de sorbitol. A solução era recirculada através do sistema de eletrodialise a uma vazão de 20 L/h e 30 °C. Como as melhores condições foram para uma tensão de 60 V e 3,0 g/L de NaCl na corrente do concentrado, foram feitos testes variando apenas a concentração de sal com o objetivo de verificar se haveria alguma melhora na remoção, pois a condutividade para soluções de 1 g/L de ácido lactobiônico é baixa.

Os experimentos mostrados na Figura 4.48 foram feitos utilizando 3, 5 e 7 g/L de NaCl na corrente do concentrado. Para cada condição o experimento foi realizado em

triplicata. Em todas as condições, a Figura 4.48 mostra que ocorre uma remoção de mais de 90 % em cerca de 30 minutos, e que o desempenho para as concentrações de 5 e 7 g/L de sal mostra-se melhor do que para 3 g/L.

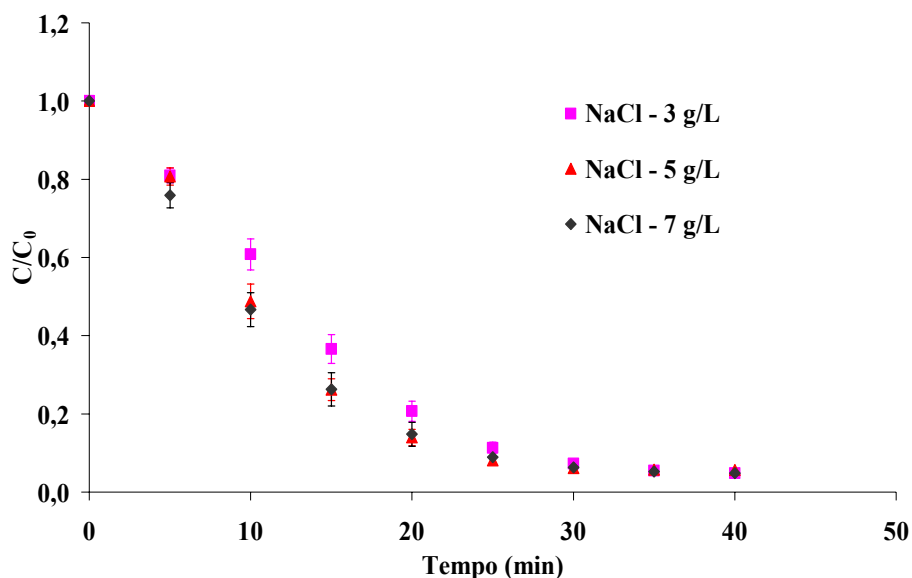


Figura 4.48 – Curvas de remoção do ácido lactobiônico variando apenas a concentração de NaCl na corrente do concentrado.

Assim, os estudos realizados no sistema de eletrodialise, bem como os demais feitos até o momento, forneceram base para realizar a integração do processo de reação e separação, que será discutida a seguir.

4.6 – Integração do Processo

Os resultados que serão mostrados a seguir estão relacionados à integração dos processos de reação, no biorreator à membrana, e separação através da eletrodialise. Com base em todos os estudos discutidos até esse ponto, foi possível estabelecer as condições para a realização desta integração. Assim, todos os experimentos para o sistema acoplado foram conduzidos a 30 °C, pH entre 6,5 e 7,0, 50 g/L lactose, 25 g/L de frutose, vazão de 20 L/h, 350 mg de células confinadas no exterior das fibras, tensão de 60 V, 5 g/L de NaCl na corrente do concentrado e 25 g/L de NaCl no compartimento dos eletrodos.

Para avaliar o desempenho do processo integrado realizaram-se reações de conversão total para os sistemas utilizando células livres e células confinadas no módulo de fibras ocas, com ou sem remoção por eletrodialise. Os ensaios de conversão total para as células livres e confinadas foram realizados com base nas melhores condições obtidas para cada processo, utilizando um volume reacional de 150 mL. Já no experimento do processo integrado foi utilizado um volume de 300 mL de solução de açúcares.

A Figura 4.49 mostra o monitoramento da condutividade ao longo do tempo para os três sistemas reacionais, sendo possível observar que as reações com as células livres e confinadas no módulo de fibras ocas mostram um aumento na condutividade. Isso se deve à produção de ácido lactobiônico ao longo da reação, o qual permanece no meio reacional. Já para o sistema acoplado, a baixa condutividade do meio reacional ao longo de todo o experimento indica que ocorreu a remoção simultânea do ácido via eletrodialise.

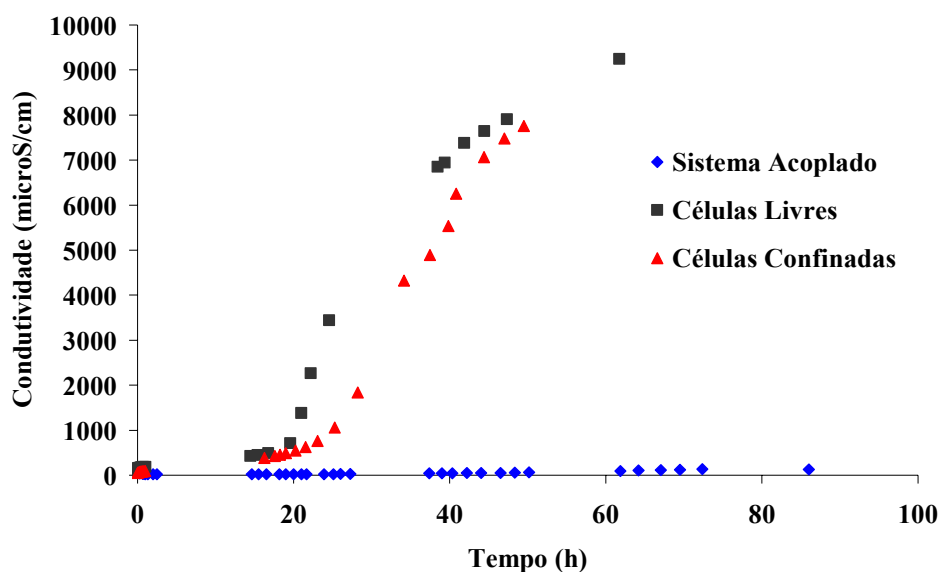


Figura 4.49 – Monitoramento da condutividade dos ensaios de conversão total.

A Figura 4.50 mostra os valores de conversões ao longo do tempo para os sistemas reacionais empregando células livres e confinadas no exterior das fibras. De acordo com a Figura 4.50, é atingida uma conversão em torno de 90 % a partir de 50 horas para os processos empregando células livres e confinadas no módulo de fibras ocas. No trabalho realizado por FERRAZ (1999), que trata da produção de sorbitol e ácido glicônico, foi obtida uma conversão 75 % ao final de 5 dias com células

confinadas no interior das fibras. Já os estudos feitos por SATORY *et al.* (1997), relacionados à produção de sorbitol e ácido lactobiônico, que estudaram diferentes modos de operação, como batelada e batelada alimentada (com conversão de 95 % a partir de 60 horas) e operando em modo contínuo fazendo uso de uma membrana de UF reter a enzima (com uma conversão de 44 %). Os resultados mostrados até o momento, neste trabalho, utilizando células livres e imobilizadas foram melhor que os encontrados na literatura.

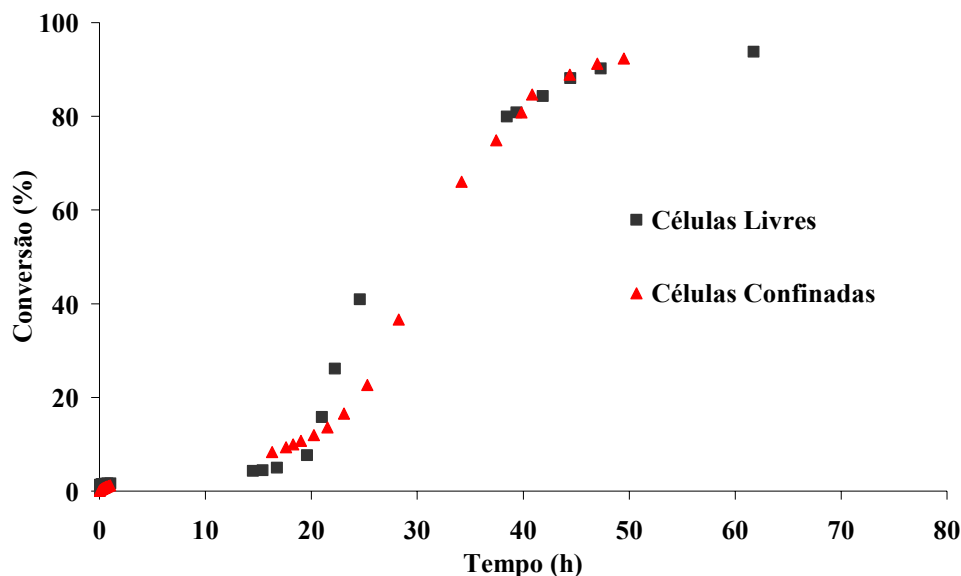


Figura 4.50 – Acompanhamento da conversão dos sistemas empregando células livres e confinadas no exterior das fibras.

A Figura 4.51 mostra os valores de conversão ao longo do tempo para o sistema acoplado. O primeiro experimento, com mostra a Figura 4.51, mostrou que em menos de 10 horas de reação, obteve-se uma conversão em torno de 30 %, enquanto que nos sistemas empregando as células livres ou confinadas, esse valor de conversão só era obtido em torno de 30 horas de reação. Entretanto, no sistema acoplado, a conversão se manteve constante, em torno de 40 %, por quase 60 horas. Este comportamento pode ser decorrente de problemas experimentais ocorridos no sistema de eletrodialise, como a formação de incrustações nos canais de circulação do corrente do concentrado, que pode ter afetado o desempenho da unidade. O primeiro experimento fez uso apenas de um módulo de fibras ocas para o confinamento das células.

Devido ao problema relatado na unidade de eletrodialise, foi feito outro experimento no sistema acoplado, nas mesmas condições, utilizando agora dois

módulos de membranas para confinar as células operando em paralelo. Para este experimento foram utilizados a mesma massa de células em cada módulo (350 mg).

É possível observar na Figura 4.51 que, para este segundo experimento, em aproximadamente 15 horas de processo foi obtido uma conversão em torno de 65 %, confirmando o bom desempenho do acoplamento. Nos sistemas empregando células livres e ou confinadas, para se obter a mesma conversão foram necessárias mais de 30 horas de processo. Entretanto, conversões maiores não foram atingidas por problemas de incrustações nos canais de circulação da corrente do concentrado, bem como pela ocorrência de vazamentos na unidade.

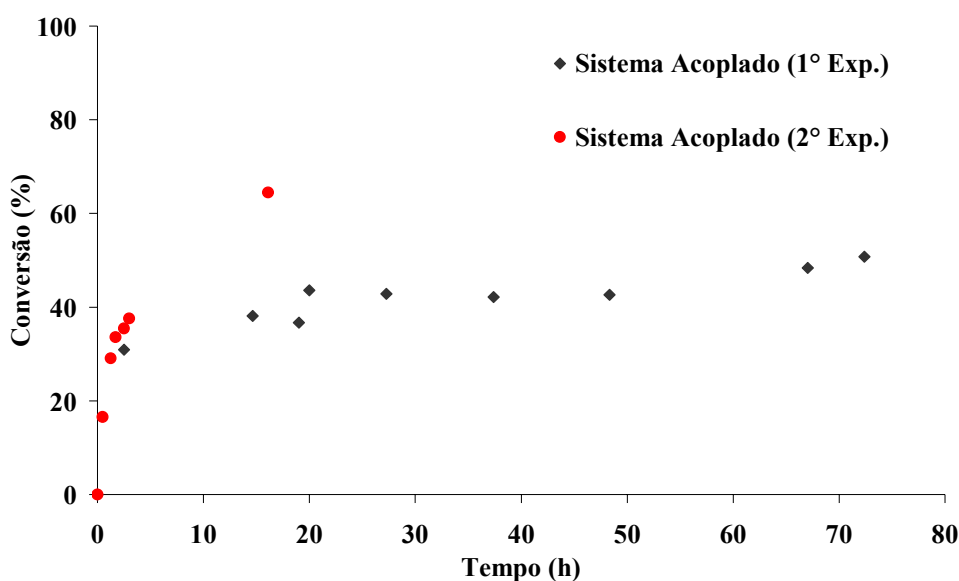


Figura 4.51 – Acompanhamento da conversão para o sistema acoplado.

Tais problemas, mencionados anteriormente, prejudicam o desempenho da unidade de eletrodialise em longos tempos. Dessa forma, foi empregada uma unidade piloto de eletrodialise (PCCell GmbH ED 64-0-02), contendo 10 pares de membranas, com uma área total de 1280 cm², separadas por uma distância de 0,5 mm, contendo eletrodos de titânio cobertos com platina. Para os experimentos utilizando esta unidade, foram adotadas as mesmas condições dos experimentos anteriores, com a diferença de que a tensão aplicada foi de 25 V, a máxima permitida por esse equipamento.

A Figura 4.52 mostra os resultados obtidos para todos os sistemas reacionais empregados, sendo possível notar a realização de um ensaio de conversão total para os dois módulos de membranas operando em paralelo. Os experimentos mostrados para células livres e confinadas em apenas um módulo são os mesmos apresentados

anteriormente. Para todos os experimentos feitos sem a remoção do ácido lactobiônico é possível observar que, a partir de aproximadamente 45 horas, é obtida uma conversão em torno de 90 %.

Foram feitos dois experimentos para o sistema acoplado, sendo o primeiro utilizando 750 mL de solução de açúcares na alimentação e o segundo, 1250 mL. Em ambos os experimentos, foram confinados 350 mg de células em cada um dos módulos de membrana. A análise da Figura 4.51 mostra que o sistema acoplado apresentaram um desempenho muito melhor do que os outros sistemas em que não há a remoção simultânea do ácido lactobiônico do meio reacional.

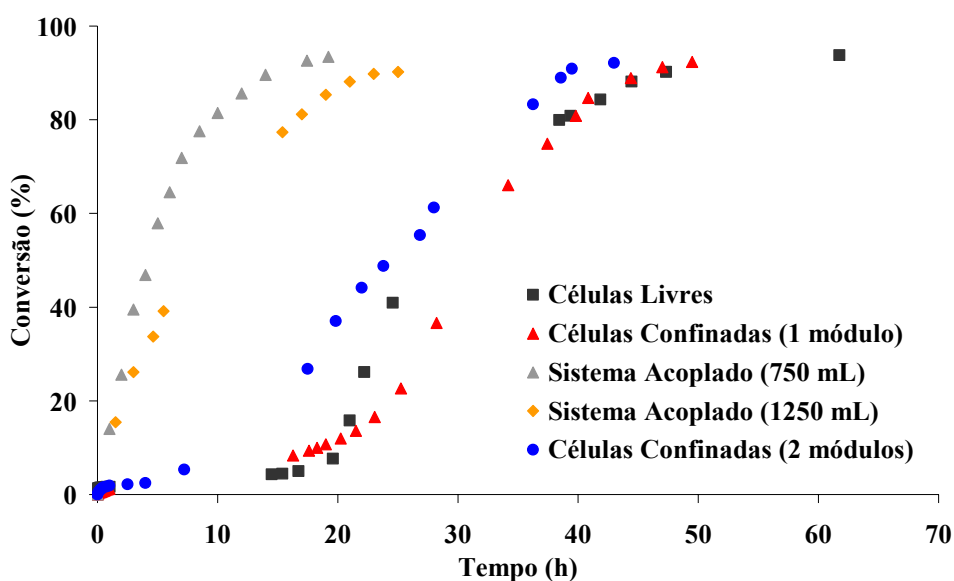


Figura 4.52 – Acompanhamento da conversão para os sistemas contendo células livres e confinadas, e para o sistema integrado utilizando a unidade de eletrodialise piloto.

Os resultados obtidos tanto na unidade construída no laboratório quanto na unidade piloto confirmam que o acoplamento da eletrodialise traz vantagens ao processo. O desempenho da unidade piloto foi ainda superior ao da unidade de laboratório devido ao fato da mesma apresentar uma área de membranas muito maior, bem como pelas melhores condições hidrodinâmicas da célula piloto. Cabe ressaltar que uma otimização das condições experimentais dessa célula certamente levaria a um desempenho ainda melhor, mas esta etapa foge ao escopo desse trabalho.

Cromatogramas de amostras retiradas no início e no final de um experimento acoplado podem ser vistos na Figura 4.53. Nesta Figura, é possível observar a presença

apenas de lactose e frutose antes do começo da reação, Figura 4.53 (a). No final da reação, observa-se a formação de sorbitol, bem como ausência do ácido lactobiônico no tanque de alimentação, Figura 4.53 (b), mostrando que ocorreu realmente a remoção deste pelo sistema de eletrodialise. E por fim, foi feita uma análise do tanque do concentrado mostrando conter apenas o ácido lactobiônico, Figura 4.53 (c), confirmando ser possível produzir e separar simultaneamente o ácido lactobiônico do meio reacional, bem como aumentar a eficiência do processo.

A Tabela 4.17 mostra os valores de taxa específica de formação do sorbitol ($\text{mmol}_{\text{sorbitol}} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) para os experimentos mostrados na Figura 4.51. A tabela mostra que as taxas para o sistema acoplado são cerca de 10 vezes maiores do que para os outros sistemas que não utilizam a eletrodialise para a remoção do ácido do meio reacional. A remoção do ácido confere uma melhora na atividade da enzima durante o processo de produção de sorbitol e ácido lactobiônico.

Tabela 4.17 – Comparação das taxas específicas para os diferentes sistemas reacionais.

Ensaio	Taxa Específica ($\text{mmol}_{\text{sorbitol}} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Células Livres	0,44
Células Confinadas no Exterior das Fibras (1 módulo)	0,49
Células Confinadas no exterior das Fibras (2 módulos)	1,22
Sistema Acoplado (750 mL)	12,50
Sistema Acoplado (1250 mL)	8,44

Esta melhora ao remover o ácido do meio reacional também foi observada por FERRAZ (1999), durante os estudos de remoção do ácido glicônico por eletrodialise, obtendo uma taxa específica de reação constante por mais de 60 horas, indicando uma maior estabilidade da enzima nesta condição de operação.

Com base nos resultados relacionados ao sistema acoplado é possível levantar uma hipótese de que a estabilidade da enzima está relacionada à baixa concentração de ácido lactobiônico no meio reacional. Quando há acúmulo do ácido glicônico produzido, ocorre uma inibição da hidrólise da lactona, com conseqüente acúmulo desta no meio reacional. Segundo FURLINGER *et al.* (1998), a interação da enzima com a lactona formada causaria a inativação da enzima GFOR. Desta forma, a separação do

ácido lactobiônico pela eletrodialise teria um efeito favorável impedindo o acúmulo de lactona no meio reacional.

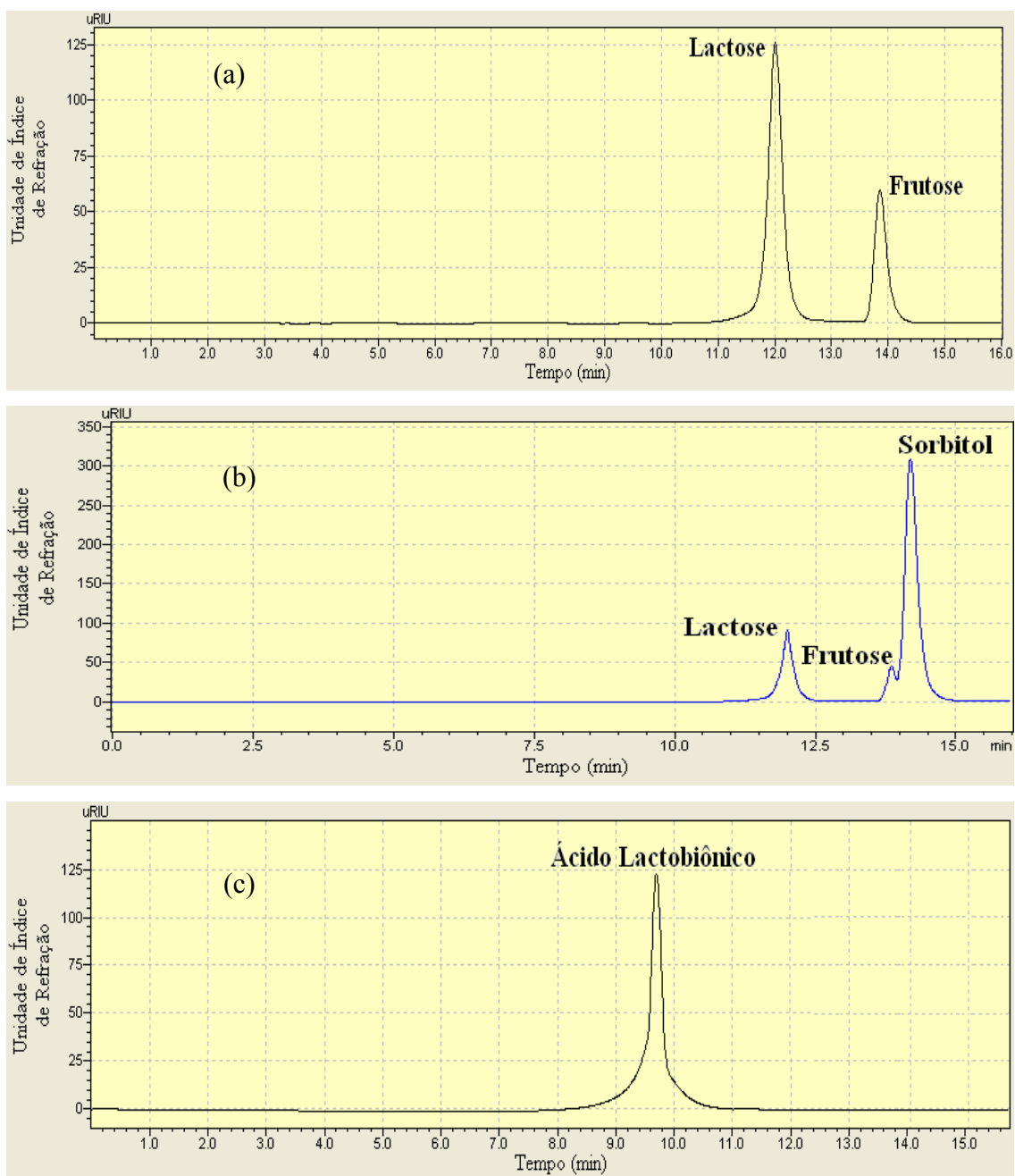


Figura 4.53 - Cromatogramas obtidos pela análise das amostras de um experimento empregando eletrodialise para a remoção do ácido lactobiônico. Antes de começar a reação, têm-se os picos relacionados somente à frutose e lactose (a); após o término da reação, observa-se a formação do sorbitol, e uma pequena quantia que não reagiu de lactose e frutose (b); na corrente do concentrado, observa-se o pico relativo ao ácido lactobiônico (c).

Os trabalhos encontrados na literatura que tratam da produção de sorbitol e ácido lactobiônico são os de CARRA *et al.* (2005), que alcançaram uma conversão de 80 % em 24 horas de processo, e o de SATORY *et al.* (1997), que obtiveram conversões em torno de 90 % a partir de 60 horas, para os sistemas batelada e batelada alimentada, e 44 % para o sistema operado em modo contínuo.

De acordo com os resultados mostrados no presente trabalho, observou-se que o sistema acoplado conseguiu uma conversão de 90 % em torno de 20 horas. Estes resultados são melhores do que os obtidos para sistemas utilizados neste trabalho, que não empregam a remoção do ácido por eletrodialise, além de serem melhores que os resultados encontrados na literatura para a produção de sorbitol e ácido lactobiônico.

5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho relacionados a produção de sorbitol e ácido lactobiônico a partir da enzima glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) de *Zymomonas mobilis* mostraram o grande potencial para aplicação industrial do processo proposto. Sua principal vantagem em relação aos processos tradicionais de obtenção destes dois produtos é a operação em condições mais amenas, resultando em um menor gasto energético.

As conclusões que serão mostradas a seguir serão divididas com base nos tópicos abordados no Capítulo 4.

Avaliação dos Meios de Cultivo:

Nesta etapa foi possível verificar a influência das células cultivadas nos diversos meios de cultivo sobre a taxa de formação do ácido lactobiônico e sorbitol catalisada pela enzima GFOR. Este estudo mostrou que a atividade da enzima pode estar relacionada não só ao aumento da concentração de glicose no meio de cultivo como a presença de outros nutrientes.

As taxas médias de formação do ácido lactobiônico obtidas para as células oriundas dos diversos meios variaram de 0,58 a 1,76 $\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, os maiores valores de taxa foram para as células cultivado em um meio com composição definida e 150 g/L de glicose (meio 5B).

Além disso, realizou-se uma análise estatística dos dados das reações com as células de cada meio com o objetivo de verificar a repetitividade e reprodutibilidade dos resultados, permitindo também verificar se a metodologia empregada no preparo do inóculo, baseada apenas no tempo de cultivo, mostrou-se válida. No que diz respeito a repetitividade dos experimentos, pode-se concluir que os erros cometidos para as reações de cada fermentação proveniente dos diversos meios de cultivo foram semelhantes.

Os testes de reprodutibilidade mostraram que padronização do inóculo feita apenas pelo tempo de cultivo se mostrou válida para todos os meios, exceto os meios contendo apenas glicose e extrato de levedura (meios 4A e 4B).

Planejamento Experimental – Células Permeabilizadas:

O planejamento experimental realizado com as células permeabilizadas mostrou que o pH é a variável que exerce maior influência sobre a taxa de formação do ácido lactobiônico, enquanto que a concentração de açúcares não influencia na taxa.

Os valores de taxa de específica de formação do ácido lactobiônico encontrados durante a realização do planejamento experimental variaram de 0,48 a 2,87 $\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, além disso, foi estabelecida as melhores condições dentro faixa de variações de cada uma das variáveis, que foram para um pH 7,0, temperatura em torno de 28-30 °C, 5 g/L de células, 50 g/L de lactose e 25 g/L de frutose.

O uso do planejamento de experimentos mostrou que toda rotina de planejamento experimental deve ser encarada como um processo iterativo, ao longo do quais os pressupostos vão sendo revistos e aperfeiçoados.

Confinamento das Células em Membranas de Fibras Ocas:

Nos estudos realizados com as células confinadas no módulo de membrana de fibras ocas, constatou-se que as melhores condições foram para as células confinadas no exterior das fibras com uma vazão de circulação de 20 L/h, e uma taxa de 1,37 $\text{mmol.g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Apesar de este valor de taxa ser aproximadamente metade do valor da melhor taxa obtida no planejamento experimental com as células permeabilizadas livres, a imobilização das células é mais conveniente para a integração do processo. Quando células livres são utilizadas, estas podem ficar aderidas às membranas de troca iônica, reduzindo o desempenho do processo.

Separação por Eletrodialise:

O planejamento experimental da etapa de separação do ácido lactobiônico por eletrodialise mostrou que as únicas variáveis que influenciam a taxa de remoção do ácido lactobiônico são a concentração de NaCl na corrente do concentrado e a voltagem, uma vez que com aumento destas variáveis há um aumento da força motriz, facilitando, assim a remoção. A melhor condição para a separação do ácido dentro faixa estudada de cada uma

das variáveis foi para tensão de 60 Volts, 3 g/L de NaCl na corrente do concentrado e 25 g/L de NaCl no compartimento dos eletrodos.

Os valores obtidos de taxa de remoção neste planejamento variaram de 0,58 a 1,48 g_{ácido}/min.m², e em todos os experimentos foi possível remover mais de 95 % de ácido lactobiônico, apresentando assim resultados melhores os descritos na literatura.

Integração do Processo:

A integração da unidade reação e separação apresentou bons resultados quando comparados ao demais sistemas que não utilizam a eletrodialise para remover o ácido lactobiônico à medida que ele é produzido. Esse é mais um indício de que a estabilidade da enzima está relacionada à remoção do ácido lactobiônico do meio reacional.

Mesmo tendo obtido bons resultados durante a integração do processo, ainda é necessário realizar mais estudos visando otimizar a produção de sorbitol e ácido lactobiônico, bem como buscar elucidar os fenômenos envolvidos no processo.

Este trabalho mostrou que o sistema acoplado conseguiu uma conversão de 90 % em torno de 20 horas, resultados estes que são melhores do que os relatados na literatura para a produção de sorbitol e ácido lactobiônico.

A seguir são apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros visando uma melhora na produção de sorbitol e ácido lactobiônico a partir das células permeabilizadas de *Zymomonas mobilis*.

- Avaliar a influência das células provenientes de diferentes cepas da bactéria *Zymomonas mobilis* sobre a taxa de formação do ácido lactobiônico;
- Realizar a continuação do planejamento experimental para as células permeabilizadas visando buscar as condições ótimas de operação com base nos resultados obtidos;
- Dar continuidade aos estudos com as células confinadas no interior das fibras, mas utilizando fibras com um diâmetro interno maior, para facilitar o confinamento das células;

- Fazer novos testes na unidade comercial de eletrodialise, para verificar as melhores condições de remoção de ácido lactobiônico;
- Investigar o controle do pH do meio reacional através da remoção do ácido lactobiônico por eletrodialise, sem adição de hidróxido.
- Estudar o processo em operação contínua para o sistema acoplado, verificando assim a estabilidade da enzima;
- Realizar a modelagem fenomenológica do processo integrado visando otimizar as melhores condições para a produção do sorbitol e ácido lactobiônico.

APÊNDICE A

A.1 – Curva de Calibração para a Determinação da Concentração de Células

Nas Figura A.1 até A.8, mostram as curvas de calibrações para os 8 meios de cultivos estudados obtidas a partir das medidas de absorvância das alíquotas do meio cultivo que foram diluídas com água destilada, buscando obter concentrações de 0,02 a 0,15 g/L.

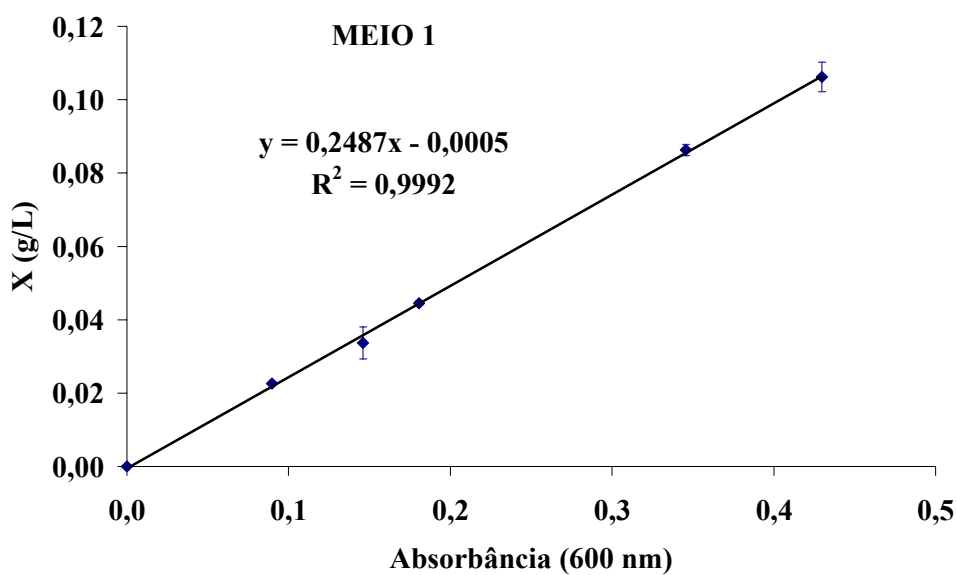


Figura A.1 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para o meio 1.

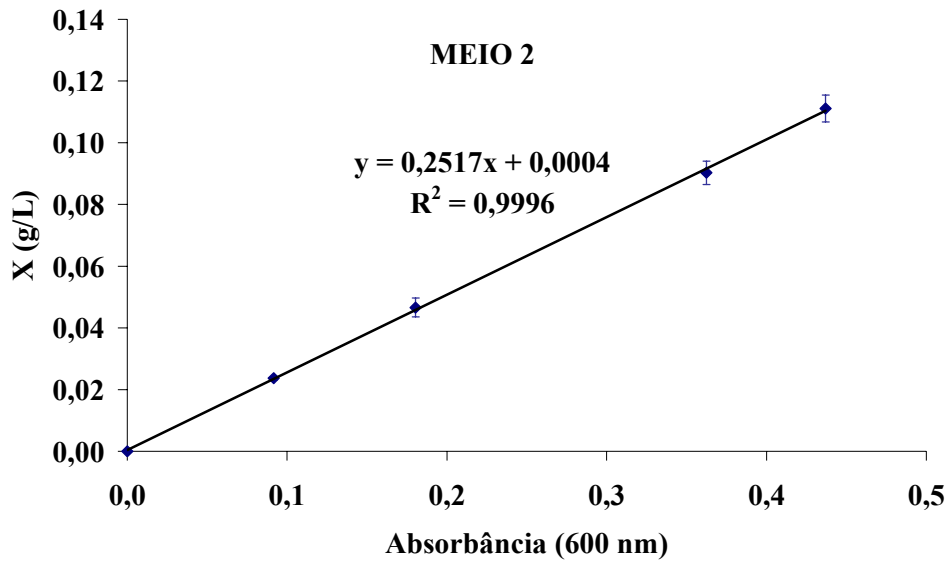


Figura A.2 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para o meio 2.

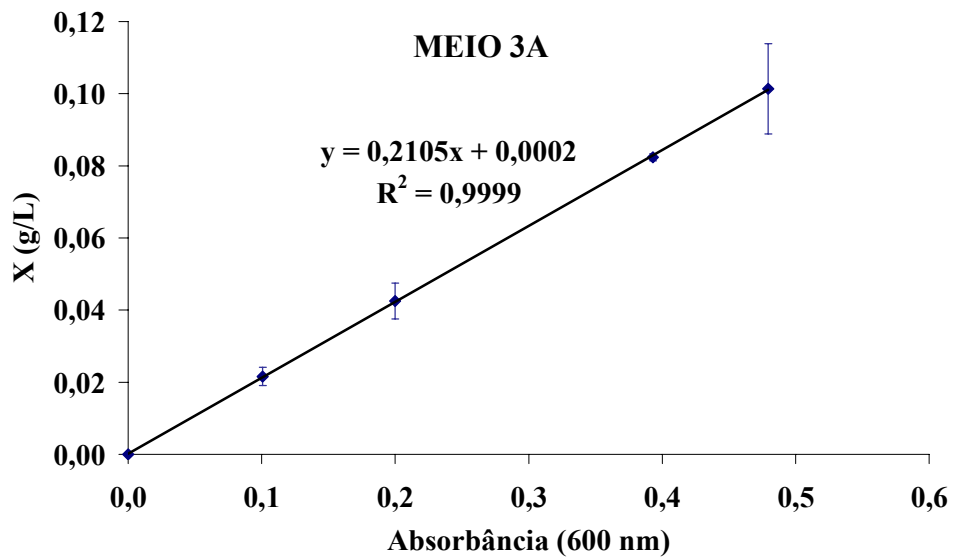


Figura A.3 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para o meio 3A.

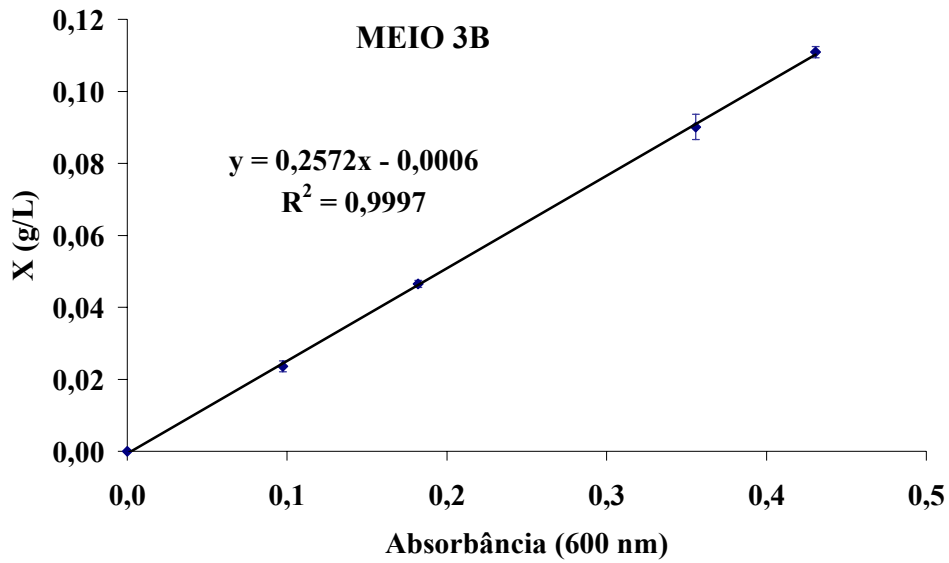


Figura A.4 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para o meio 3B.

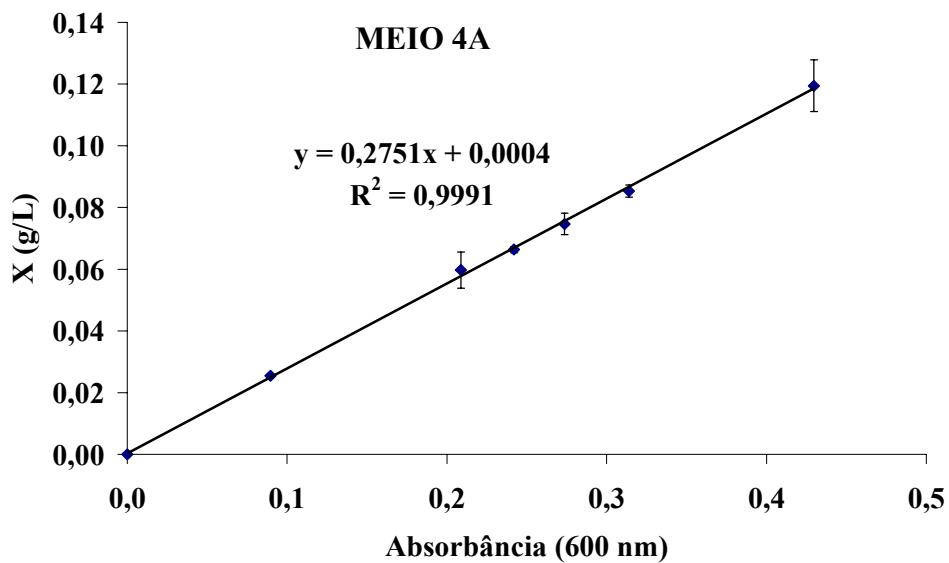


Figura A.5 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para o meio 4A.

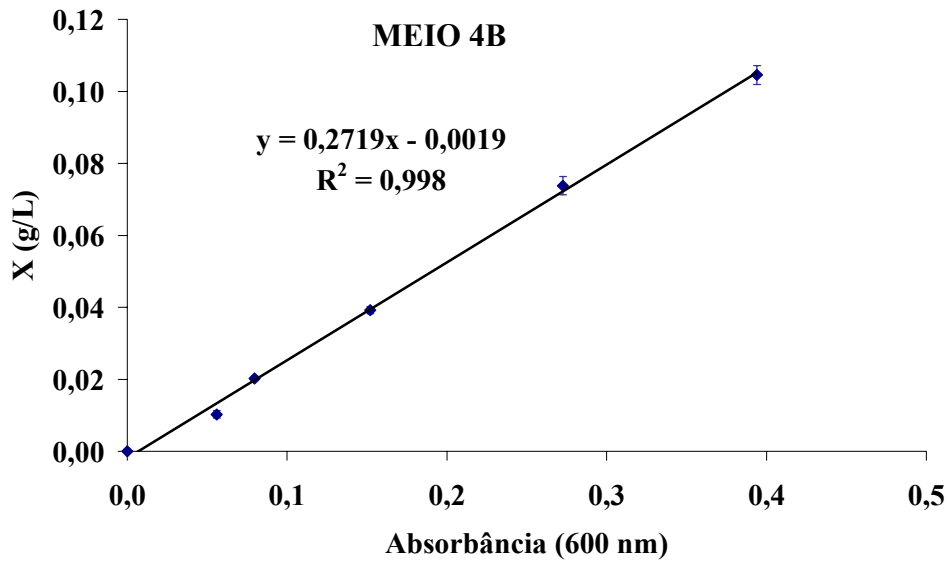


Figura A.6 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para o meio 4B.

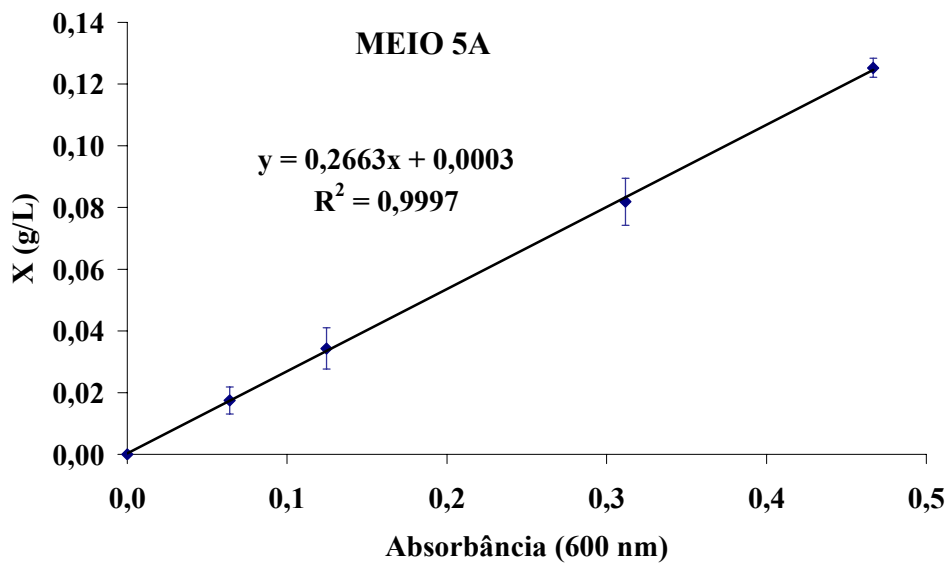


Figura A.7 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para o meio 5A.

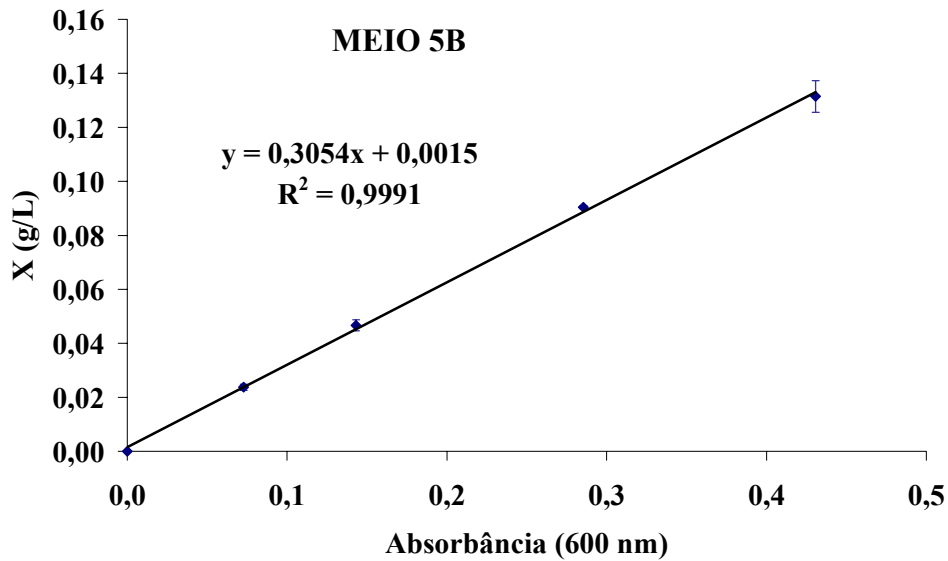
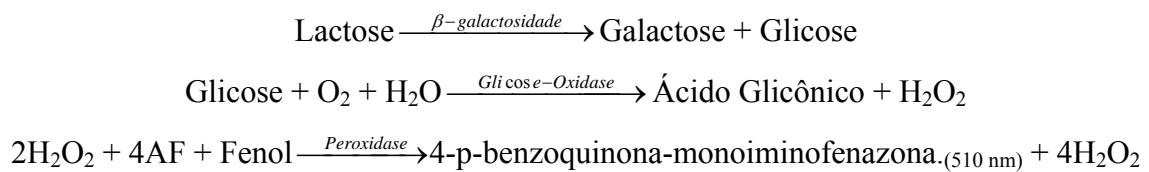


Figura A.8 – Curva de calibração da concentração de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para o meio 5B.

A.2 – Curva de Calibração para a Determinação da Concentração de Lactose por Kit Enzimático

As reações envolvidas no método enzimático utilizado, descrito no Capítulo 3, são mostradas a seguir bem como a curva de calibração para determinação da concentração de lactose (Figura A.9).



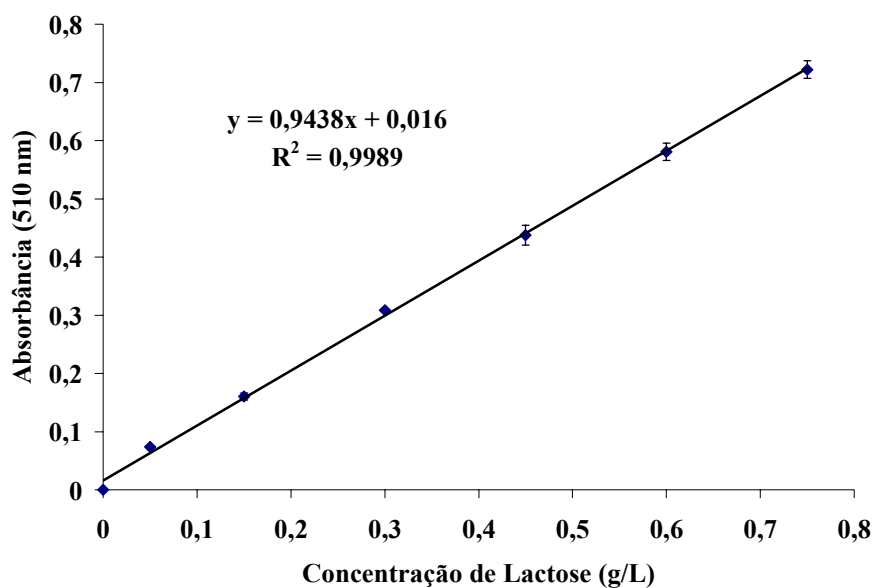


Figura A.9 – Curva de calibração da concentração de lactose.

A.3 – Curva de Calibração para a Determinação da Concentração de Ácido Lactobiônico Medida por Condutivimetria

Nos experimentos utilizando o sistema de eletrodialise a concentração de ácido lactobiônico foi determinada medindo-se a condutividade de várias soluções contendo lactose (40 g/L), frutose (20 g/L), sorbitol (5 g/L) e ácido lactobiônico (0,025 a 10 g/L), como mostra a curva de calibração na Figura A.10.

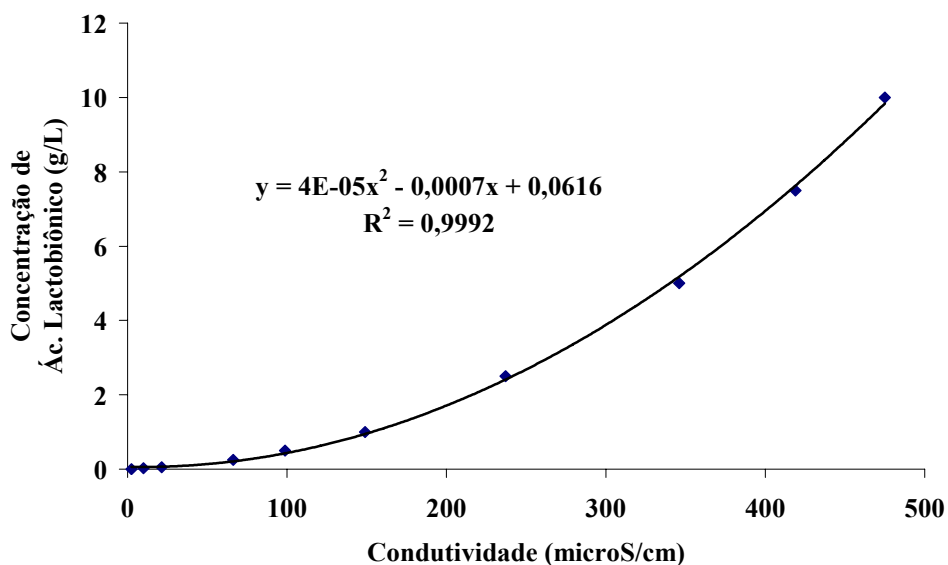


Figura A.10 – Curva de calibração da concentração de ácido lactobiônico por condutividade.

A.4 – Curva de Calibração para a Determinação da Concentração de Ácido Lactobiônico e Lactose medida por HPLC

Para a obtenção da curva de calibração, foram injetadas soluções contendo lactose, frutose, sorbitol e ácido lactobiônico na faixa de 0,5 a 10 g/L. A Figura A.11 mostra que é possível separar lactose e ácido lactobiônico. Entretanto os picos de frutose e sorbitol saem juntos. Como a reação é equimolar, basta conhecer a concentração de um desses componentes para inferir a dos demais. Além disso, é possível quantificar a remoção de ácido lactobiônico nos experimentos com o sistema acoplado.

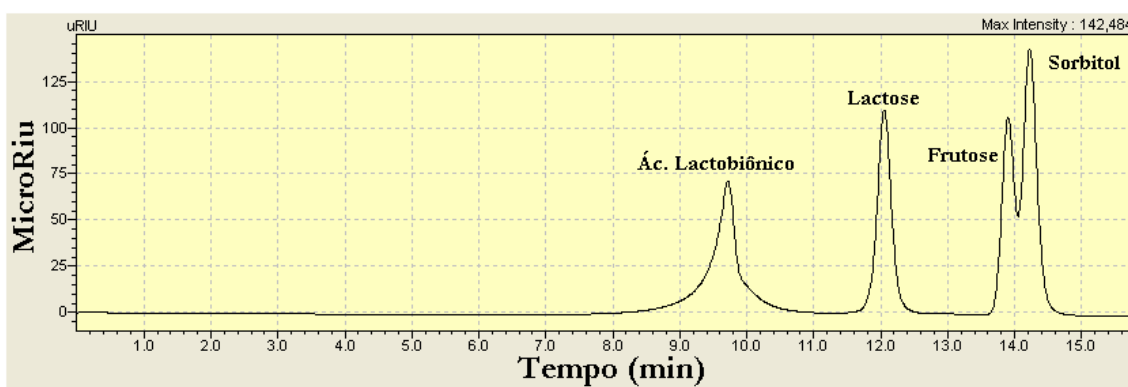


Figura A.11 – Cromatograma obtido para o ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol.

Com base nisso, foram calculadas as áreas relativas aos picos de ácido lactobiônico e lactose para fazer a curva de calibração como é mostrada nas Figuras A.12 e A.13.

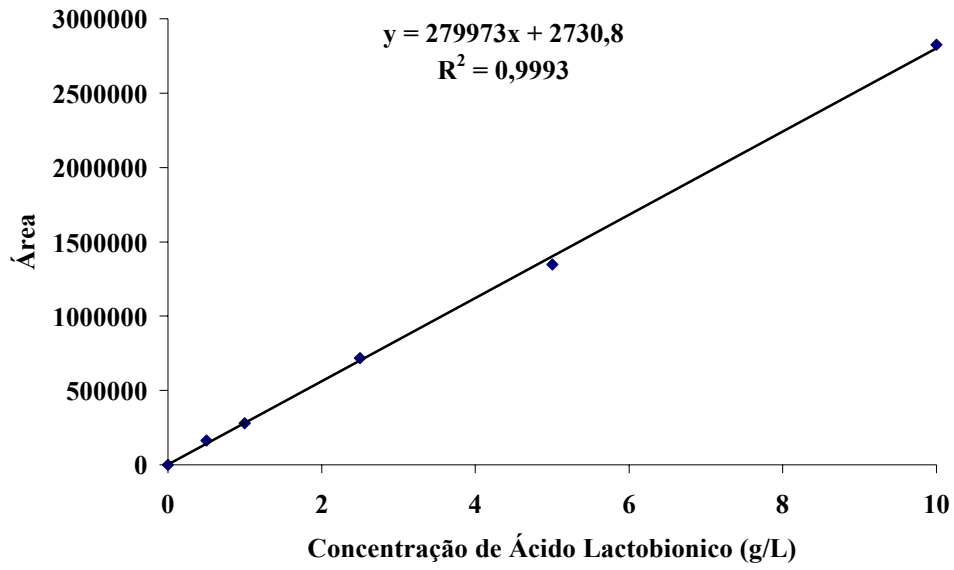


Figura A.12 – Curva de calibração para o ácido lactobiônico.

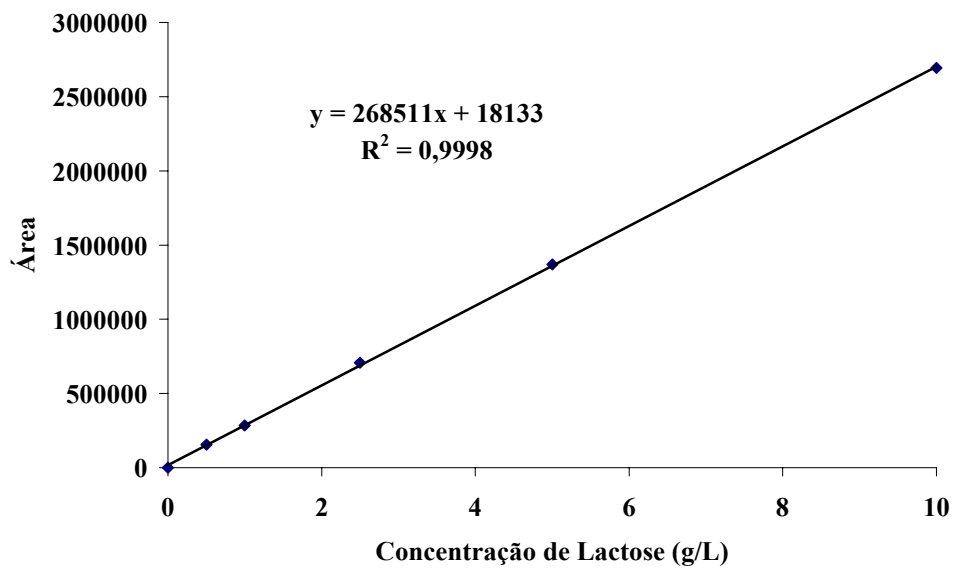


Figura A.13 – Curva de calibração para a lactose.

APÊNDICE B

B.1 – Cálculo da Taxa de Específica de Formação do Ácido Lactobiônico

O cálculo da taxa específica de formação do ácido lactobiônico feito com base no balanço de massa para reator, levando em conta a variação de volume devido a adição de base ao sistema para fazer o controle do pH, como mostra a Equação B.1.

$$Taxa = \frac{1}{X_{cel}} \left[\left(\frac{m_{NaOH} \cdot C_{NaOH}}{d \cdot t} \right) + \left(\frac{m_{NaOH} \cdot C_{NaOH} \cdot F}{d \cdot V} \right) \right] = mol \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1} \quad (B.1)$$

Onde:

X_{cel} – massa de células (g_{cel});

m_{NaOH} – massa de hidróxido consumida (g);

C_{NaOH} – concentração da solução de hidróxido (mol/L);

t – tempo (h);

d – densidade da solução de hidróxido (g/L);

F – vazão volumétrica;

V – volume do reator.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, A. K. DE S., 2005, *Estudo do controle de Qualidade da Produção de L-Asparaginase por Zymomonas mobilis*, Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ALVES, T.L.M., 1993, *Estudo da Produção de Etanol por Zymomonas mobilis*. Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ANDRÉS. L. J., RIERA, F. A, ALVAREZ, R., 1997, “Recovery and Concentration by Electro dialysis of Tartaric Acid from Fruit Juice Industries Waste Waters”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 70, pp. 247-252.
- BAKER, R.W., 2004, “Membrane Technology and Applications”, 2nd ed., ISBN: 0-470- 85445-6 (eletrônico), John Wiley & Sons Ltd.
- BASTOS, M. G. A., 2005, *Polímeros termorresistentes modi-ficados com inserção de grupos iônicos para o preparo de membranas seletivas de íons*. Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BOYAVAL, P., CORRE, C., TERRE, S., 1987, “Continuous Lactic Acid Fermentation with Concentrated Product Recovery by Ultrafiltration and Electro dialysis”, *Biotechnol. Letters*, v. 9, n. 3, pp. 207-212.
- BRODELIUS, P., VANDAMME, E. J., 1984, “Immobilized cell systems”, In: Rehm, H. J., Reed, G., Eds., *Biotechnology*, v. 7b. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 405.
- CARRA, S., PASQUALI, F.C., MALVESSI, E., SILVEIRA, M.M., 2005, “Bioconversão de Carboidratos em Sorbitol e Ácidos Orgânicos por Enzimas Periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*”, In: *XV Simpósio Nacional de Fermentações*, Recife, Pernambuco, Agosto.
- CAZETTA, M. L., CELLIGOI, M. A. P. C., BUZATO, J. B., SCARMINO, I. S., SILVA, R. S. F., 2005, “Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses”, *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 747–751.
- CHEN, D. H., WANG, W. S., HUANG, T. C., 1995, “Separation of Phenylacetic Acid, 6-Aminopenicillanic Acid and Penicillin G with Electro dialysis under Constant Current”, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 64, pp. 284-292.
- CHUN, U. H., ROGERS, P. L., 1988, “The Simultaneous Production of Sorbitol from Fructose and Gluconic Acid from Glucose Using an Oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 29, pp. 19-24.

- DHARIWAL, A., MAVROV, V., SCHROEDER, I., 2006, "Production of lactobionic acid with process integrated electrochemical enzyme regeneration and optimisation of process variables using response surface methods (RSM)", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 42, pp. 64–69.
- DUVNJAK, Z., TURCOTTE, G., DUAN, Z., 1991^a, "Production of sorbitol and ethanol from jerusalem-artichokes by *Saccharomyces-cerevisiae* ATCC-36859", *Appl. Microbiol. Biot.*, v. 35, pp. 711-715.
- DUVNJAK, Z., TURCOTTE, G., DUAN, Z., 1991^b, "Production and consumption of sorbitol and fructose by *Saccharomyces-cerevisiae* ATCC-36859", *J. Chem. Technol. Biot.*, v. 52, pp. 527-537.
- EDWARD, M., ISLIP, N. Y., 1952, "Production of Lactobionic Acid and its Lactone", Patent 2.746.916.
- ERZINGER, G. S., SILVEIRA, M. M., COSTA, J. P. C. L., VITOLO, M., JONAS, R., 2003, "Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations", *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, pp. 329-333.
- ERZINGER, G. S., VITOLO, M., 2006, "*Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, pp. 787-794.
- FERRAZ, H. C., 1999, *Produção de sorbitol e ácido glicônico por células permeabilizadas e imobilizadas de zymomonas mobilis e separação simultânea dos produtos por eletrodialise*. Dissertação de Mestrado., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FERRAZ, H. C., ALVES, T. L. M., BORGES, C. P., 2001, "Coupling of an electro dialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells", *Journal of Membrane Science*, v. 191, pp. 43–51.
- FONSECA, E.F., 2003, *Modelagem da Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico por Células Permeabilizadas e Imobilizadas de Zymomonas mobilis em Reator Tipo Cesta Agitada*. Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FURLINGER, M. et al., 1998, "A Multistep Process is Responsible for Product-Induced Inactivation of Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*", *Eur. J. Biochem.*, v.251, pp. 955-963.

- GOLLHOFER, D. et al., 1995, "Efficient Protection of Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* Against Irreversible Inactivation During its Catalytic Action", *Enzyme Microb. Technol.*, v. 17, pp. 235-240.
- GUNASEKARAN, P., RAJ, K. C., 1999, "Ethanol fermentation technology - *Zymomonas mobilis*", *Current Science*, v. 77, pp. 156-168.
- HÁBOVÁ, V., MELZOCH, K., RYCHTERA, M., SEKAVOVÁ B., 2004, "Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth", *Desalination*, v. 163, pp. 361-372.
- HAPALA, I., 1997, "Breaking the Barrier: Methods for Reversible Permeabilization of Cellular Membranes", *Critical Rev. Biotechnol.*, v. 17, pp. 105-122.
- HARDMAN, M. J., SCOPE, R. K., 1988, "The Kinetics of Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*", *Eur. J. Biochem.*, v. 173, p. 203-209.
- HONGO, M., NOMURA, Y., MASAYOSHI, I., 1986, "Novel Method of Lactic Acid Production by Electrodialysis Fermentation", *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 52, n. 2, pp. 314-319.
- JONAS, R., SILVEIRA, M. M., 2004, "Sorbitol Can Be Produced Not Only Chemically But Also Biotechnologically", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 118, pp. 321-336.
- KANNAN, T. R.; SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P., 1995, "Influence of Intra an Extracellular Sucrases of *Zymomonas mobilis* on the Ethanol Production and By-Product Formation", *Biotechnology Letters*, v. 19, pp. 661-664.
- KIKUCHI, K. ET AL., 1995, "Separation of Aminoacids by Electrodialysis with ion Exchange Membranes", *J. Chem. Eng. Japan*, v.28, pp. 103-105.
- KINGSTON, R. L., SCOPE, R. K., BAKER, E. N., 1996, "The Structure of Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an Osmoprotective Periplasmic Enzyme Containing non-Dissociable NADP", *Structure*, v. 4, pp. 1413-1428.
- KOKOH, K. B., ALONSO-VANTE, N., 2006, "Electrocatalytic oxidation of lactose on gold nanoparticle modified carbon in carbonate buffer", *J Appl Electrochem*, v. 36, pp. 147-151.
- LOOS, H., VÖLLER, M., REHR, B., STIERHOF, Y. D., SAHM, H., SPRENGER, G. A., 1991, "Localisation of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*", *FEMS Microbiology Letters*, v. 84, pp.211-216.

- LOOS, H.; KRÄMER, R.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A., 1994, “Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection”, *J. Bacteriol.* v. 176, pp. 7688–769.
- MALVESSI, ELOANE ; CARRA, SABRINA ; AYUB, MARCO A Z ; SILVEIRA, M. M., 2007, “Efeito da temperatura, do pH e da concentração de substratos sobre a atividade enzimática de *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato de cálcio”. In: *XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Paraná, Agosto.
- MELO, A. F., PINTO, G. A. S., GONÇALVES, L. R. B.; FERREIA, A. L. O., 2005, “Imobilização de tanase em suportes vítreos”, In: *XV Simpósio Nacional de Fermentações*, Recife, Pernambuco, Agosto.
- MIRESCU, A., PRÜBE, U., 2007, “A new environmental friendly method for the preparation of sugar acids via catalytic oxidation on gold catalysts”, *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 70, pp. 644-652.
- MIYAMOTO, Y., OOI, T., KINOSHITA, S., 2000, “Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas* sp. LS13-1”, *Biotechnology Letters*, v. 22, pp. 427–430.
- MURZINA, E. V., TOKAREV, A. V., KORDÁS, K., KARHU, H., MIKKOLA, J., MURZIN, D. Y., 2008, “d-Lactose oxidation over gold catalysts”, *Catalysis Today*, v. 131, pp. 385-392.
- NAGARALE, R. K., GOHIL, G. S., SHAHI, V. K., 2006, “Recent developments on ion-exchange membranes and electro-membrane processes”, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 119, pp. 97 – 130.
- NAGARALE, R. K., GOHIL, G. S., SHAHI, V. K., TRIVEDI, G. S., THAMPY, S. K., RANGARAJAN, R., 2004, “Studies on transport properties of short chain aliphatic carboxylic acids in electrodialytic separation”, *Desalination*, v. 171, pp. 195-204.
- NARABSKA, A., KURANTOWICZ, M., 1998, “Separation of Fermentation Products by Membrane Techniques. II. Conversion of Lactic Acid by electrodialysis”, *Separ. Sci. Tech.*, v. 33, n. 7, pp. 959-973.
- NIDETZKY, B., FÜRLINGER, M., GOLLHOFER, D., SCOPES, R. K., HALTRICH, D., KULBE, K. D., 1997, “Improved operational stability of cell-free glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* for the efficient synthesis of

- sorbitol and gluconic acid in a continuous ultrafiltration membrane reactor”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 53, pp. 623-629.
- NUNES, S. P., PEINEMANN, K. V., 2001, “Membrane Technology in the Chemical Industry”, Edited by Copyright, Wiley-VCH Verlag GmbH.
- PARK, J. K., KIM, H. S., 1990, “A New Biosensor for Specific Determination of Glucose or Fructose Using an Oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnol. Bioeng.*, v. 36, pp. 744-749.
- PARKER, C.; PEEKHAUS, N.; ZHANG, X. E.; CONWAY, T., 1997, “Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose metabolism by *Zymomonas mobilis*”, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 9, pp. 3519–3525.
- PATERSON, S. L. ET AL., 1988, “Sorbitol and Gluconate Production in a Hollow Fiber Membrane Reactor by Immobilized *Zymomonas mobilis*”, *Biocatalysis*, v. 1, pp. 217-229.
- PERETTI, F. A., 2006, *Avaliação de técnica de eletrodialise para a separação de ácido lactobiônico produzido por via rota biotecnológica*. Dissertação de Mestrado, UCS, Caxias do Sul, RS, Brasil.
- PINHEIRO, I. R., GUIMARÃES, L. M., AZEVEDO, J. G. W., GUIMARÃES, M. R. F., TONSO, A., FACCIOTTI, M. C. R., 2005, “Estudo da Produção do Antibiótico Antitumoral Retamicina em Biorreator do Tipo Cesta por *Streptomyces olindensis* ICB20, Imobilizadas em Alginato de Cálcio, sob Diferentes Condições de Transferência de Oxigênio”, In: *XV Simpósio Nacional de Fermentações*, Recife, Pernambuco, Agosto.
- PRAZERES, D. M. F., CABRAL, J. M. S., 1994, “Enzymatic Membranes Bioreactors and their Applications”, *Enzyme Microb. Technol.*, v. 16, pp 738-750.
- REGULY, J. C., 2000, “*Biotecnologia dos processos fermentativos; produção de enzimas / engenharia das fermentações*”. v. 3, Pelotas, RS: UFPEL.
- REHR., B., WILHELM, C., SAHM, H., 1991, “Production of Sorbitol and Gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 35, pp. 144-148.
- SAARELA, M., HALLAMAA, K., MATTILA-SANDHOLM, T., MATTO, J., 2003, “The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains”, *International Dairy Journal*, v. 13, pp. 291–302.

- SÁNCHEZ-MANZANARES, J. A., FERNÁNDEZ-VILLACAÑAS, M. R., MARIN-INIESTA, F, LAENCINA, J, 1993, “Determination of lactose by an enzymatic method”, *Food Chemistry*, v. 46, 425-427.
- SATORY, M. ET AL., 1997, “Continuous Enzymatic production of Lactobionic Acid Using Glucose-Fructose Oxidoreductase in a Ultrafiltration Membrane Reactor”, *Biotechnol. Letters*, v. 19, pp. 1205-1208.
- SCHMIDT, A; BRINGER-MEYER, S.; PORALLA, K.; SAHM, H., 1986, “Effect of alcohols and Temperature on the Hopanoid Content of *Zymomonas mobilis*”, *Chem. Eng. Technol.*, v. 17, pp. 10-20.
- SCHÜGERL, K., HUBBUCH, J., 2005, “Integrated Bioprocess”, *Ecology and industrial microbiology*, v. 8, pp. 294-300.
- SCHWAAB, M., PINTO, J. C., Análise de Dados Experimentais I – Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros, 2007, volume 1, E-papers
- SIKKEMA J., BONT, J.A.M., POOLMAN, B., 1995, “Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons”, *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 2, pp. 201-222, 1995.
- SILVEIRA, M. M., WISBECK, E., LEMMEL, C., ERZINGER, G., COSTA, J. P. L., BERTASSO, M., JONAS, R., 1999, “Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*”, *Journal of Biotechnology*, V. 75, pp. 99–103.
- SPLECHTNA, B., PETZELBAUER, I., BAMINGER, U., HALTRICH, D., KULBE, K. D., NIDETZKY, B., 2001, “Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, pp. 434–440.
- STRATHMANN, H., 1995, “Electrodialysis and related processes”. In: *Membrane Separations Technology – Principles and Applications*, R. D. Noble e S. A. Stern (eds), Chapter 6, New York, U.S.A., Elsevier.
- SWINGS, J.; De LEY, J., 1977, “The Biology of *Zymomonas*”, *Bacteriological Reviews*, v. 41, n. 1, pp. 1-46.
- TOKAREV, A.V., MURZINA, E.V., MIKKOLA, J.-P., KUUSISTO, J., KUSTOV, L.M., MURZIN, D.Y., 2007, “Application of in situ catalyst potential measurements for estimation of reaction performance: Lactose oxidation over Au and Pd catalysts”, *Chemical Engineering Journal*, v. 134, pp. 153-161.

- TOMOTANI, E. J., VITOLO, M., 2007, "Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor", *Journal of Food Engineering*, v. 80, pp. 662-667.
- VEERAMALLU, U.; AGRAWAL, P., 1990, "A Structured Kinetic Model for *Zymomonas mobilis* ATCC10988", *Biotechnol. Bioeng.*, v. 36, pp. 694-704.
- VIKARI, L., 1984^a, "Formation of Levan e Sorbitol form Sucrose by *Zymomonas mobilis*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 19, pp. 252-255.
- VIKARI, L., 1984^b, "Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 20, pp. 118-123.
- WANG, Z., LUO, Y., YU P., 2006, "Recovery of organic acids from waste salt solutions derived from the manufacture of cyclohexanone by electrodialysis", *Journal of Membrane Science*, v. 280, pp. 134–137.
- WEIER, A. J., GLATZ, B. A., GLATZ, C. E., 1992, "Recovery of Propionic and Acetic Acids from Broth by Electrodialysis", *Biotechnol. Prog.*, v. 8, pp. 479-4585.
- WIJK, A., SIEBUM, A., SCHOEVAART, R., KIEBOOM, T., 2006, "Enzymatically oxidized lactose and derivatives thereof as potential protein cross-linkers", *Carbohydrate Research*, v. 341, pp. 2921-2926.
- WILBERG, K. Q., ALVES, T. L. M., NOBREGA, R., 1997, "Enzymatic catalysis by permeabilized cells", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 14, pp. 17-22.
- WILBERG, K., 1995, *Estudo da Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico por Células Permeabilizadas de Zymomonas mobilis*. Dissertação de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- XU, T., 2005, "Ion exchange membranes: State of their development and perspective", *Journal of Membrane Science*, v. 263, pp. 1–29.
- ZACHARIOU, M.; SCOPES, R. K., 1986, "Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production". *J. Bacteriol.*, v. 3, pp. 863-869.
- ZHOU, H., CHEN, Z., YANG, R., SHANG, L., LI, G., 2006, "Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin in lactobionic acid film", *J Chem Technol Biot*, v. 81, pp. 58-61.