

PÓLO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DO VALE DO PARANHANA
Av. Oscar Martins Rangel, Nº 4.500, Taquara, RS

RELATÓRIO Nº 02

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS NO
PRODUTO DO BIO-REATOR EM JULHO DE 2005

TAQUARA, RS, BRASIL
2005

PÓLO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DO VALE DO PARANHANA
LABORATÓRIO DE QUÍMICA BIOTECNOLÓGICA

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS NO
PRODUTO DO BIO-REATOR EM JULHO DE 2005

Fabiana Jung Noel
Bel. Químico nº 05201293

PARTE 2
Determinação de Lactose, Atividade Enzimática, Densidade de Células e Proteínas
Durante o Processo de Obtenção de Enzima, Realizado no Período de 12/07/2005 à
20/07/2005

TAQUARA, RS, BRASIL
2005

ANÁLISE DO TEOR DE LACTOSE EM AMOSTRAS COLHIDAS DE 3 EM 3 HORAS DO PRODUTO DO BIO-REATOR

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS NA DETERMINAÇÃO DE LACTOSE:

1º) Procedimentos Experimentais Adotados:

- Succionou-se 10,0 mL da amostra bruta, coletada diretamente do Bio-reator para tubo de ensaio grande;
- Centrifugou-se por 60 minutos em centrífuga sorológica à 3.500 rpm, marca Bio Eng, modelo BE-5100;
- O tratamento da amostra para análise, seguiu-se o método fenol-ácido sulfúrico, descrito por Barale (1985) apud Rech (1998), que sofreu algumas alterações necessárias as condições existentes em nosso laboratório;
- Após a centrifugação, extraiu-se 3 alíquotas de 1,5 mL do sobrenadante e adicionou-se 1,0 mL de água deionizada, 48 µL de Fenol 80% e 1 mL de H₂SO₄, aguardou-se 30 minutos em temperatura ambiente;
- Agitou-se e realizamos a leitura em espectrofotômetro Spectrum, modelo SP-2000UV/VIS, em comprimento de onda igual a 490 nm.

2º) Os resultados das leituras realizadas, estão dispostos na tabela 1 abaixo:

Dia	Hora	Cubetas	Abs.Lida	Abs.Corr.	Média das Abs.Corr.
14/07/05	16:45 h	Branco	0,057	-	1,585
		1	1,644	1,587	
		2	1,641	1,584	
		3	1,643	1,586	
14/07/05	19:10 h	1	1,339	1,282	1,163
		2	1,114	1,057	
		3	1,208	1,151	
15/07/05	8:45 h	1	1,483	1,426	1,206
		2	0,895	0,838	
		3	1,413	1,356	
15/07/05	15:15 h	1	1,254	1,197	1,257
		2	1,343	1,286	
		3	1,345	1,288	
Dias 16 e 17 de Julho não foram realizadas análises (folga da química responsável)					
18/07/05	16:00 h	1	2,500	2,443	2,437
		2	2,484	2,427	
		3	2,500	2,443	
18/07/05	19:00 h	1	2,443	2,386	2,417
		2	2,500	2,443	
		3	2,479	2,422	
19/07/05	9:00 h	1	1,918	1,861	1,689
		2	1,801	1,744	
		3	1,519	1,462	
19/07/05	12:00 h	1	1,970	1,913	2,207
		2	2,461	2,404	
		3	2,362	2,305	
19/07/05	15:00 h	1	1,770	1,713	1,871
		2	2,045	1,988	
		3	1,971	1,914	
19/07/05	18:00 h	1	2,434	2,377	2,288
		2	2,301	2,244	
		3	2,301	2,244	

Tabela 1 – Coletas e análises realizadas no espectrofotômetro em um $\lambda=490$ nm

Observações:

- As coletas e análises das amostras foram realizadas à partir do dia 14/07, pois no período de 12 à 13 do referido mês estávamos instalando em linha com nosso Bio-reator um Cromatógrafo à Gás da CGS, modelo CG-3537R, com o auxílio do Químico Ayrton Argenton, este processo permite a análise dos gases produzidos no processo, bem como do etanol, subproduto das reações químicas produzidas pelos microorganismos *Kluyveromyces marxianus*.
- Do dia 12/07 a 15/07 o processo estava operando em batelada, cabe salientarmos que até o dia 15/07 foram analisados estes gases, após este período ocorreu uma parada estratégica na coleta dos gases pelo cromatógrafo, pois já havíamos comprovado a formação de etanol pelos microorganismos;
- Nos dias 16/07 e 17/07 os microorganismos receberam uma quantidade extra de alimentação, 360g/L de soro de leite, foi consumido 500 mL, processo de batelada alimentada, após este período voltamos com o processo em batelada.
- Devido a este fato, as coletas de amostras do bio-reator e suas respectivas análises, levaram-nos a encontrar valores um pouco mais elevados de lactose e proteína.
- Importante salientar que todas considerações contidas nestas observações, aplicam-se a todas coletas e amostras realizadas durante o período de operação do processo.

3º) Cálculos realizados para determinação da concentração de Lactose no processo:

Segundo Harris (2001) se amostras e padrões foram preparados de forma idêntica, então, a razão dos teores de lactose deve ser igual à razão de suas absorbâncias, corrigidas pela absorbância do branco. Abaixo, fórmula utilizada para determinar a absorbância corrigida de lactose, medida durante o processo.

$$\frac{\text{amostras}}{\text{padrão}} = \frac{\text{Abs.corr}}{\text{Abs.corr}} = \frac{\text{Abs.alíquota} - \text{Abs.branco}}{\text{Abs.padrão} - \text{Abs.branco}}$$

Como o padrão de lactose, continha 6,014g de lactose em 1 L de solução, o meio de cultura conterá o valor da fórmula acima multiplicado pela massa do padrão.

A concentração de lactose nas amostras coletadas é calculada segundo a expressão:

$$[\text{Lactose}] = \frac{n^{\circ} \text{ de } \dots \text{ mols}}{V(L) \text{ da } \dots \text{ solução}}$$

A tabela 2 contém as médias das absorvâncias corrigidas e a concentração de lactose resultante dos cálculos realizados.

Média das Absorbâncias Corrigidas	Conc. de Lactose das amostras (g/L)
1,585	8,7854
1,163	6,4463
1,206	6,6846
1,257	6,9673
2,437	13,5055
2,417	13,3970
1,689	9,3618
2,207	12,2330
1,871	10,3706
2,288	12,6820

Tabela 2 – Absorbâncias médias e concentração de lactose nas amostras

COMENTÁRIOS SOBRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS:

- Os quatro primeiros resultados constantes da tabela 2, representam a quantidade ou concentração de lactose no meio de alimentação que ocorreu em batelada, isto é, sem adição de alimentação;
- Como pode-se verificar, os resultados iniciam-se baixos, na 1ª coleta obteve-se 8,7854 g/L de lactose, esta coleta ocorreu depois de 26 horas e 45 minutos de funcionamento do bio-reator;
- As coletas subseqüentes mostram valores de concentração que foram diminuindo com o tempo, indicando que o microorganismo já estava consumindo a lactose do soro de queijo;
- A concentração inicial de lactose disponível no bio-reator para consumo dos microorganismos foi de 52,5 g/L, portanto, após 26 horas e 45 minutos já havia sido consumido 43,71 g/L de lactose;
- Com o início do processo de batelada alimentada, iniciado no dia 16/07, utilizando-se 500 mL de uma solução de soro de leite com 360 g/L, pode-se concluir que nestes 500 mL foi fornecido aos microorganismos 135 gramas de lactose;
- Assim sendo, no dia 18/07, na 1ª coleta realizada às 16:00 horas, a concentração de lactose no meio de cultivo, agora em batelada, foi de 13,5055 g/L;
- Pela análise subseqüente da tabela 2, pode-se verificar que foram ocorrendo diminuições sucessivas na concentração de lactose até a coleta do dia 19/07 às 9:00 horas;
- Na coleta do dia 19/07, ocorrida às 12:00 horas, ocorreu um aumento considerável na concentração de lactose no meio, este fato pode estar relacionado a algum erro cometido ao longo da análise, pois a concentração determinada às 15:00 horas do mesmo dia mostra-nos uma redução da concentração no meio reacional;

- A última coleta realizada no mesmo dia, porém às 18:00 horas, mostra-nos novamente um aumento na concentração de lactose que pode estar relacionado a parada do sistema, esta interrupção ocorreu devido a problemas relacionados ao sensor de rotação das hélices do bio-reator, ocasionando diversos problemas, tais como leituras errôneas de pH, que fizeram com que o sistema interpreta-se como um desajuste, e desta forma, o pH tentava ser corrigido com a adição ora de ácido, ora de base. Este problema instrumental ocasionou a entrada no sistema de 1 L de Ácido Fosfórico 0,08 mol/L e de 750 mL de Hidróxido de sódio 0,1 mol/L.

O gráfico 1 mostra a relação entre as absorbâncias corrigidas e as respectivas concentrações e corrobora os comentários feitos anteriormente nesta seção.

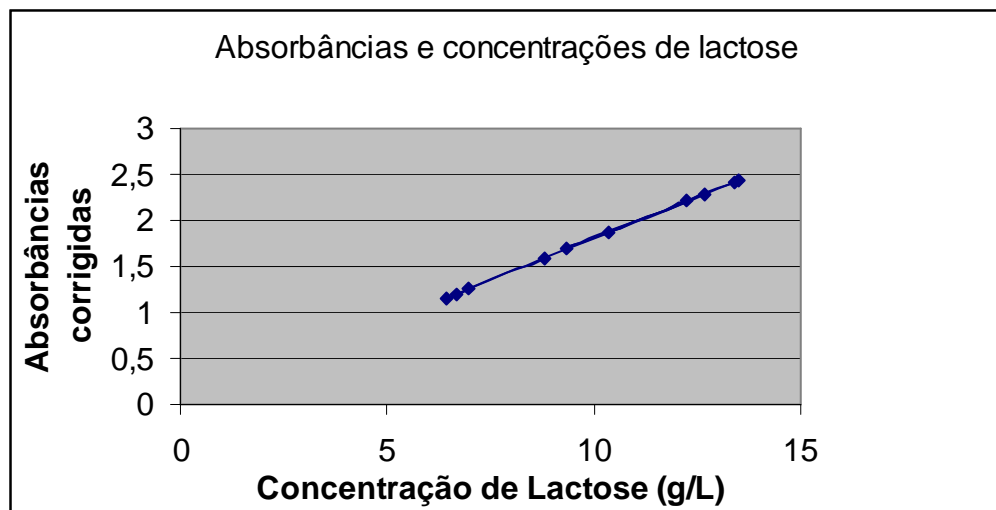


Gráfico 1 – Relação entre Absorbância e Concentração de Lactose

- O gráfico 2, considera apenas 4 pontos da curva, representantes da batelada alimentada, realizada no dia 16/07, como explicitado anteriormente.

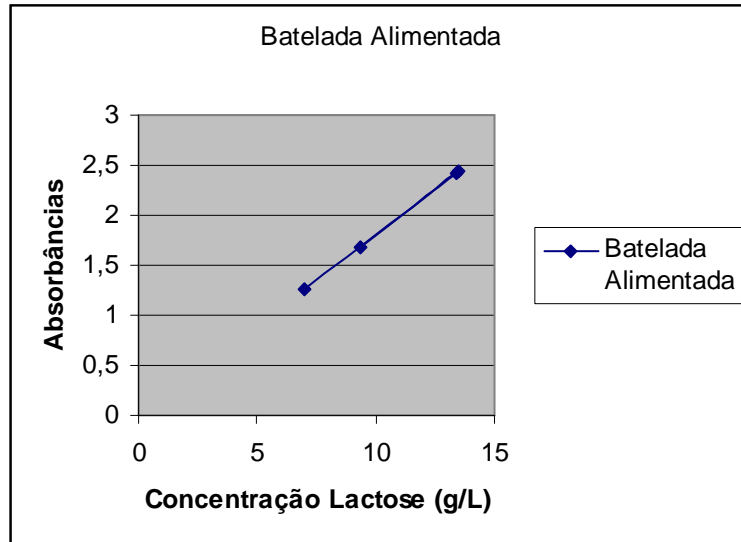


Gráfico 2 – Alimentação em batelada alimentada

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR (BIOMASSA) NAS AMOSTRAS COLETADAS

1º) Procedimentos Experimentais Adotados:

- Para esta análise, adotamos o procedimento descrito em Rech (1998), com pequena adaptação, esta foi à substituição de tubos Eppendorf, (utilizados em centrífuga de até 35.000 rpm) por tubos de centrífuga sorológica (3.500 rpm). A diferença entre as rotações por minuto das centrífugas, igualmente influenciou no tempo de centrifugação, que no trabalho original era de 3 minutos, sendo adaptado para 60 minutos segundo a nossa possibilidade de equipamento disponível.

- Os demais procedimentos foram adotados na íntegra e na tabela 3 encontram-se os resultados obtidos das coletas e análises realizadas em espectrofotômetro a um $\lambda=620$ nm.

2º) Resultados das Análises de Determinação de Densidade Ótica:

Dia	Hora	Cubetas	Abs.Lida	Abs.Corr.	Média das Abs.Corr.
14/07/05	16:45 h	Branco	0,042	-	-
		1	-	-	
		2	-	-	
		3	-	-	
14/07/05	19:10 h	1	0,186	0,144	0,148
		2	0,185	0,143	
		3	0,201	0,159	
15/07/05	8:45 h	1	1,927	1,885	1,877
		2	1,907	1,865	
		3	1,925	1,883	
15/07/05	15:15 h	1	1,932	1,890	1,879
		2	1,894	1,852	
		3	1,917	1,875	
Dias 16 e 17 de Julho não foram realizadas análises					
18/07/05	16:00 h	1	1,520	1,478	1,433
		2	1,511	1,469	
		3	1,396	1,354	
18/07/05	19:00 h	1	1,381	1,339	1,431
		2	1,454	1,412	
		3	1,584	1,542	
19/07/05	9:00 h	1	1,527	1,485	1,468
		2	1,619	1,577	
		3	1,386	1,344	
19/07/05	12:00 h	1	1,316	1,274	1,577
		2	1,597	1,555	
		3	1,945	1,903	
19/07/05	15:00 h	1	1,471	1,429	1,244
		2	1,427	1,385	
		3	0,961	0,919	
19/07/05	18:00 h	1	1,629	1,587	1,463
		2	1,294	1,252	
		3	1,593	1,551	

Tabela 3 - Coletas e análises realizadas no espectrofotômetro em um $\lambda=620$ nm

3º) Coletas e absorbâncias médias das análises realizadas em triplicata:

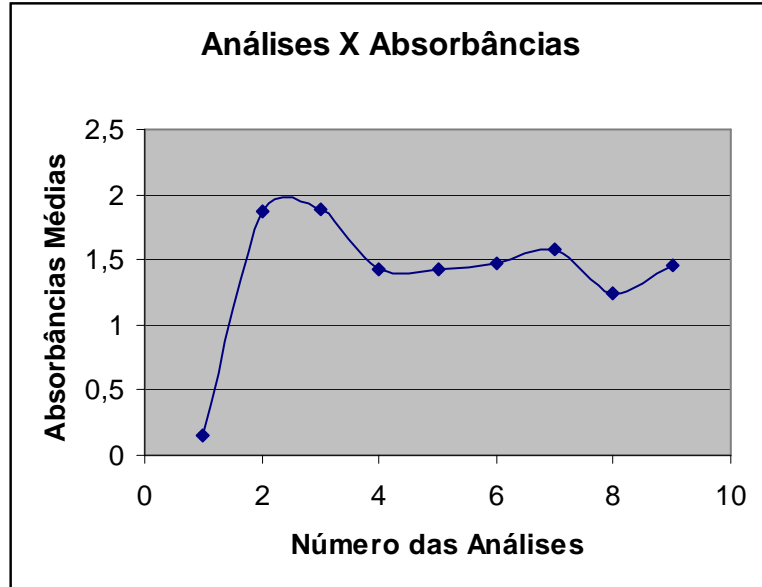


Gráfico 3 – Relação entre N° de coletas e Absorbâncias Médias

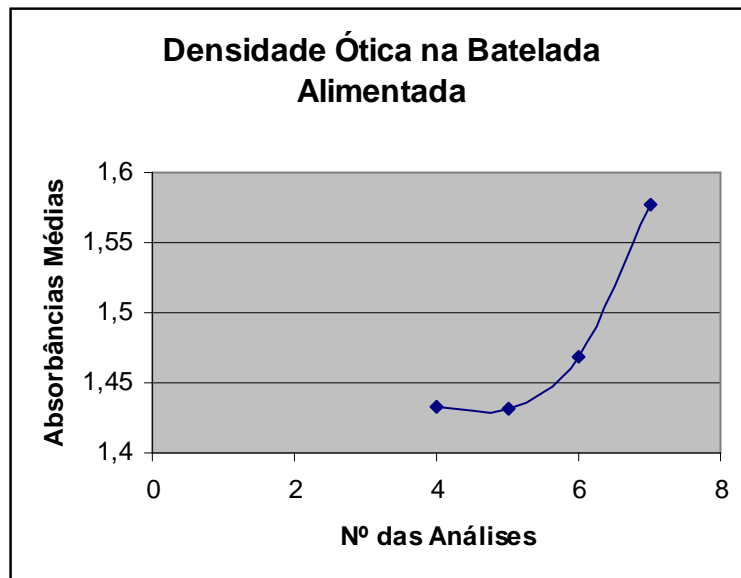


Gráfico 4 – Densidade Ótica após Batelada Alimentada

COMENTÁRIOS SOBRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS:

- A absorvância medida, segundo a Lei de Lambert-Beer, relaciona-se diretamente com a concentração de qualquer amostra, isto quer dizer que, mesmo os resultados não sendo apresentados em g/L de densidade de células, pode-se considerar os dados obtidos através da leitura em espectrofotômetro à um $\lambda=620$ nm;
- Através da análise do gráfico 3, pode-se concluir que, no início da alimentação em batelada, ou seja, quantidade fixa de alimento fornecido aos microorganismos, obtivemos um crescimento exponencial das colônias até a coleta 2, como estas coletas, foram realizadas após dois dias do início do processo de obtenção enzimática, provavelmente, o crescimento ocorreu da mesma maneira, e, desta forma, na coleta 3 e 4, tivemos um decréscimo no crescimento celular, devido, a possível falta de lactose ou outro nutriente necessário às colônias;
- Da coleta 4 até a coleta 7, nota-se novamente um aumento na concentração celular, devido a alimentação em batelada alimentada iniciada no dia 16/07, com mais alimento foi possível um aumento de colônias no meio reacional;
- Da coleta 7 à 8 tivemos um decréscimo no crescimento de células, pois como citado no item de determinação de lactose, tivemos problemas operacionais com o bio-reator, que levaram o programa de controle a enviar informações errôneas ao sistema ácido-base, com isso, ocorreu um descontrole no pH do meio, causando a morte de células.
- A coleta 9 foi realizada quando o processo estava parado, ou seja, a agitação do meio reacional era zero e os controladores do sistema ácido-base estavam inoperantes, ocorreu então um pequeno aumento na concentração celular, mas que não poderá ser considerado devido aos problemas ocorridos.

- O gráfico 4, representa apenas as coletas realizadas após o período de batelada alimentada, pode-se confirmar que após a inserção de lactose no meio, ocorreu um aumento na concentração de células.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE VOLUMÉTRICA DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE (LACTASE)

1º) Procedimentos Experimentais Adotados:

- A determinação da atividade da enzima foi realizada pelo método do ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) descrito por Lederberg (1950) apud Rech (1998). O método foi devidamente adaptado às condições e materiais encontrados no laboratório de química biotecnológica.

- A cada amostra coletada adicionou-se Lisoenzima, marca Sigma, na quantidade de $3,0 \times 10^{-4}$ g para cada 10 mL de amostra;

- O tempo de reação de quebra da parede celular do microorganismo *Kluyveromyces marxianus* para a liberação da enzima β -galactosidase (lactase) foi de 6 horas;

- Após decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas (em triplicata) durante 30 minutos, para separar a enzima das cascas celulares, uma vez que a enzima permanece no líquido sobrenadante e as cascas precipitam para o fundo dos tubos de centrifuga;

- Foi então colhido do sobrenadante uma alíquota de 1,1 mL, que foi tratada com 0,78 mL de tampão potássio, após 10 minutos em temperatura de 36,5°C, adicionou-se o reagente ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo);

- Após 1 minuto de reação a mesma é interrompida com a adição 0,22mL de Na_2CO_3 e lida em espectrofotômetro a um $\lambda=405$ nm.

2º) Resultados das Análises de Determinação de Atividade Volumétrica Enzimática:

Dia	Hora	Cubetas	Abs.Lida	Abs.Corr.	Média das Abs.Corr.
14/07/05	19:10 h	Branco	0,235	-	0,882
		1	1,137	0,902	
		2	1,103	0,868	
		3	1,112	0,877	
15/07/05	8:45 h	1	1,211	0,976	0,958
		2	1,217	0,982	
		3	1,152	0,917	
15/07/05	15:15 h	1	1,530	1,295	1,133
		2	1,286	1,051	
		3	1,288	1,053	
Dias 16 e 17 de Julho não foram realizadas análises					
18/07/05	16:00 h	1	0,952	0,717	0,674
		2	0,878	0,643	
		3	0,898	0,663	
18/07/05	19:00 h	1	1,545	1,310	1,273
		2	1,465	1,230	
		3	1,514	1,279	
18/07/05	22:30 h	1	1,361	1,126	1,143
		2	1,416	1,181	
		3	1,356	1,121	
19/07/05	9:00 h	1	1,588	1,353	1,290
		2	1,529	1,294	
		3	1,458	1,223	
19/07/05	12:00 h	1	1,734	1,499	1,406
		2	1,524	1,289	
		3	1,667	1,432	
19/07/05	15:00 h	1	1,228	0,993	0,959
		2	1,172	0,937	
		3	1,182	0,947	
19/07/05	18:00 h	1	1,164	0,929	0,860
		2	1,015	0,780	
		3	1,105	0,870	
19/07/05	21:15 h	1	1,128	0,893	0,892
		2	1,133	0,898	
		3	1,122	0,887	

Tabela 4 - Coletas e análises realizadas no espectrofotômetro em um $\lambda=405$ nm

3º) Cálculo da Atividade Volumétrica da Enzima:

- O cálculo da atividade da lactase segue a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{ONPG} \times L \times C_{ONPG}$$

- Onde A = absorvância da amostra; ϵ_{ONPG} = é o coeficiente de extinção molar do ONPG ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$), L = caminho ótico (cm) e C_{ONPG} = a concentração de ONPG ($\mu\text{mol/mL}$).

$$C_{ONPG} = \frac{A \times V_F}{\epsilon_{ONPG} \times L \times V_a}$$

- Considera-se que o V_F = volume final é sempre diluído, pelas adições de ONPG, solução tampão fosfato de sódio e Na_2CO_3 . Logo existe um fator de diluição dado por V_a/V_F , onde V_a = volume inicial da amostra.

- A atividade volumétrica da enzima é dada por $A_V = \frac{C_{ONPG}}{t}$ onde t = tempo de reação dado em minutos e A_V é a atividade volumétrica em U_{ONPG}/mL . A unidade de ONPG, (U_{ONPG}), é definida como a quantidade de μmoles de ONPG que reagem em um minuto nas condições de reação.

- Nos procedimentos experimentais realizados, temos que t = 1min, o V_F = 3,2 mL, o V_a = 1,1 mL, ϵ_{ONPG} = 3,1 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ e L = 1 cm. Então,

$$A_V = C_{ONPG} = \frac{A \times V_F}{\epsilon_{ONPG} \times L \times V_a} \times F$$

- Utilizando a expressão matemática acima pode-se chegar a uma fórmula reduzida, que é então aplicada para os cálculos posteriores de determinação da atividade volumétrica da enzima obtida nas diversas amostras coletadas.

- Esta nova expressão matemática é:

$$A_v = 0,9384 \times A \times F$$

- Onde A_v é a atividade volumétrica a ser determinada, o número 0,9384 é encontrado pela fórmula anterior, A é a absorbância da amostra e F é o fator de diluição.

- A tabela 5 mostra a relação de amostras coletadas e a atividade volumétrica de cada amostra, calculada através da fórmula acima.

Amostras	Atividade Volumétrica(U_{ONPG}/mL)
1	0,2845
2	0,3090
3	0,3654
4	0,2174
5	0,4106
6	0,3687
7	0,4161
8	0,4535
9	0,3093
10	0,2774
11	0,2877

Tabela 5 – Relação entre amostras e a atividade volumétrica da enzima

- O gráfico 5 representa a curva da atividade volumétrica das amostras analisadas;

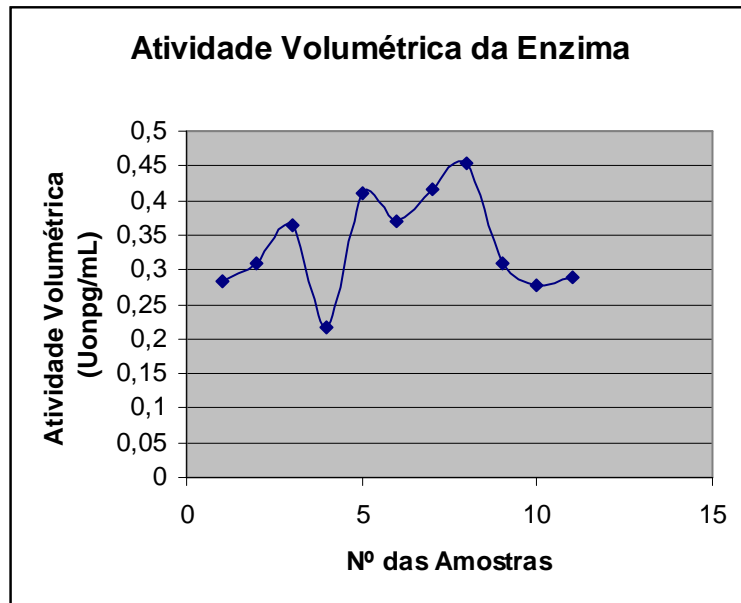


Gráfico 5 – Relação entre amostras e a atividade volumétrica da enzima

COMENTÁRIOS SOBRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS:

- Os mesmos comentários realizados até o presente momento, aplicam-se aos resultados encontrados de atividade volumétrica enzimática da lactase;
- Da amostra 1 até a amostra 3 tivemos um aumento da atividade volumétrica da enzima, já na amostra 4 a mesma teve um decréscimo, talvez devido ao início da fase onde encontrava-se pouco alimento para os microorganismos;
- Da amostra 5 até a amostra 9 tivemos um regime variável desta atividade, ora aumentando, ora diminuindo este fato pode ser explicado devido ao tempo de reação com o reagente ONPG, que muitas vezes na prática, como todas as amostras foram realizadas em triplicata, pode ter variado alguns segundos, quando da adição do inibidor da reação, o reagente Na_2CO_3 ;

- Como citado nas análises anteriores, após as 15:00 horas do dia 19/07, o mau funcionamento do bio-reator deve ter influenciado nos valores de atividade das amostras 10 e 11.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL

1º) Procedimentos Experimentais Adotados:

- O método utilizado está descrito em Revillion (1995) apud Rech 1998;
- Após a coleta de 1,1 mL de amostra adiciona-se 2,5 mL de solução de Sulfato de cobre II e Citrato de sódio/Hidróxido de sódio e Carbonato de sódio, deixa-se em repouso por 5 minutos e após transcorrido este período adiciona-se 0,25 mL de solução de Folin-Ciocalteu;
- Novamente aguarda-se 20 minutos para o processamento da reação e então lê-se em espectrofotômetro a um $\lambda=750$ nm as absorbâncias das amostras.

2º) Resultados das Análises de Determinação da Proteína no Meio Reacional:

Dia	Hora	Cubetas	Abs.Lida	Abs.Corr.	Média das Abs.Corr.
14/07/05	19:10 h	Branco	0,068	-	-
		1	1,180	1,112	1,155
		2	1,240	1,172	
		3	1,249	1,181	
15/07/05	8:45 h	1	1,338	1,270	1,327
		2	1,316	1,248	
		3	1,533	1,465	
15/07/05	15:15 h	1	1,484	1,416	1,365
		2	1,441	1,373	
		3	1,376	1,308	
Dias 16 e 17 de Julho não foram realizadas análises					
18/07/05	16:00 h	1	1,815	1,747	1,716
		2	1,845	1,777	
		3	1,693	1,625	
18/07/05	19:00 h	1	1,986	1,918	1,735
		2	1,786	1,718	
		3	1,638	1,570	
19/07/05	9:00 h	1	1,580	1,512	1,566
		2	1,647	1,579	
		3	1,677	1,609	
19/07/05	12:00 h	1	1,570	1,502	1,533
		2	1,522	1,454	
		3	1,711	1,643	
19/07/05	15:00 h	1	1,734	1,666	1,599
		2	1,629	1,561	
		3	1,638	1,570	
19/07/05	18:00 h	1	1,514	1,446	1,406
		2	1,520	1,452	
		3	1,390	1,322	

3º) Amostras e absorbâncias das análises realizadas em triplicata da proteína:

- O gráfico mostra-nos a proteína constante no meio reacional durante o período de análises que foram realizadas durante o processo de funcionamento do bio-reator.

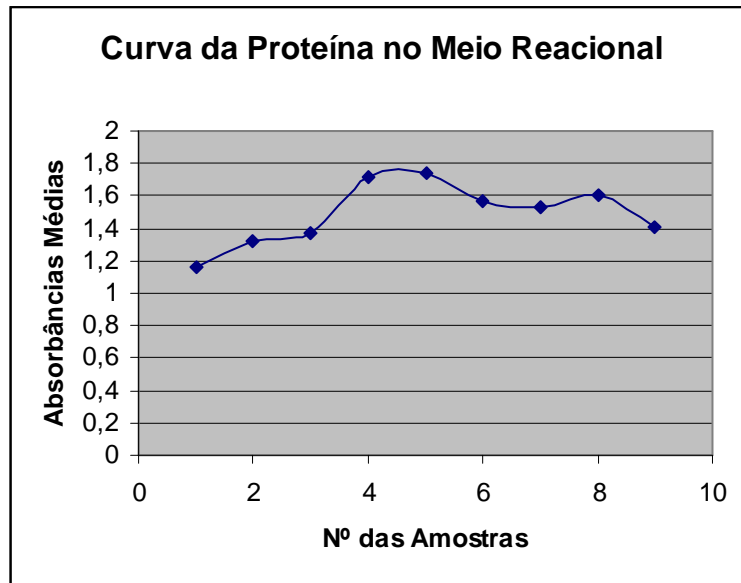


Gráfico 6 – Proteína no Meio Reacional

COMENTÁRIOS SOBRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS:

- A análise do gráfico permite inferir a variação na concentração de proteína no meio reacional;

- A proteína constante e que varia, ora aumentando ora diminuindo, é formada não só pela proteína do meio de alimentação fornecido aos microorganismos, bem como também se relaciona a própria enzima e as células, desta forma a análise comparativa entre os gráficos permite-nos dizer que a variação nas curvas é semelhante e é influenciada pelos mesmos fatores expostos ao longo dos comentários realizados neste relatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HARRIS, D. Análise Química Quantitativa. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. p 447.

RECH, Rosane. Aproveitamento do Soro de Queijo para a Produção de Lactase por *Klyveromyce marxianus*. 1998. 74 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.