

---

**RELATÓRIO FINAL**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS A PARTIR DO SORO DE LEITE**

**Fabiana Jung Noel**

Pesquisadora

**Waldemir Santiago Júnior**

Coordenador da Pesquisa

**Taquara, 5 de dezembro de 2005.**

**Período julho de 2002 a dezembro de 2005**

---

## 1 INTRODUÇÃO

Este relatório descreve a pesquisa intitulada “Produção de Enzimas à partir do Soro do Leite”, realizada no Laboratório de Química Biotecnológica (BIOLAB) da FACCAT, Unidade Executora do Pólo de Inovação Tecnológica do Vale do Paranhana e Encosta da Serra, pela seguinte Equipe Executora:

Prof. Dr. Waldemir Santiago Júnior (coordenador)

Profa. Fabiana Jung Noel (pesquisadora e responsável técnica do BIOLAB)

## 2 ATIVIDADES REALIZADAS

### Metas

#### 1 – Desenvolvimento do Processo

Reconhecendo a importância da área ambiental no cenário regional, o Programa de Apoio aos Pólos de Inovação Tecnológica resolveu apoiar projetos de pesquisa que contemplem a recuperação, preservação ou harmonização do Meio Ambiente, na busca do desenvolvimento ecologicamente sustentável..

Em resposta ao crescente interesse pelas questões ambientais e a real necessidade de qualificar profissionais capazes de entender responsavelmente o desenvolvimento sustentável a partir dos recursos hídricos, da terra e do ar, é que a FACCAT (Unidade Executora) tomou a iniciativa de apresentar este projeto à Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul dentro do Programa de Apoio aos Pólos de Inovação Tecnológica.

A FACCAT tem em seu quadro professores e pesquisadores, com a formação adequada para capacitar os recursos humanos das empresas da região na emergente área ambiental, de crescente importância no cenário regional, aptos a resolver os problemas envolvendo essa questão de modo transdisciplinar, em função

---

das diferentes especialidades e da experiência desses profissionais, que vêm ao longo dos últimos anos atuando e produzindo trabalhos de natureza técnico-científica de relevância.

A produção científica desses profissionais já representa por si só o credenciamento e a garantia do sucesso do projeto, graças a infra-estrutura já existente, podendo atingir sua capacidade plena com o mínimo de investimentos em novas contratações.

Faz-se objeto deste trabalho a obtenção de um processo viável de utilização de um resíduo, o soro de queijo das indústrias de laticínios das cidades de Taquara e Parobé, transformando-o em um produto de valor agregado e evitando que seja descartado ao meio ambiente, causando problemas de poluição.

## INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

O soro resultante da fabricação de queijos é obtido numa proporção de 9:1 da quantidade de queijo fabricada. Esse produto contém cerca de 6,0-6,5% de sólidos totais, sendo cerca de 4,5-5,0% de lactose, 0,8-1,1% de proteína, 0,03-0,1% de gordura, 0,5-0,8% de matéria mineral e 0,2-0,8% de ácido láctico (Rech, 1998).

Devido a essa alta quantidade de substâncias orgânicas, representadas principalmente pela lactose (aproximadamente 70% dos sólidos totais) e pelas proteínas aproximadamente 20% dos sólidos totais, o soro de queijo impõe um alto valor de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) às plantas de tratamento de água residuais de 30.000-60.000 mg/l, dependendo do processamento específico utilizado na fabricação de queijos e do conteúdo de lactose.

Segundo dados recentes da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo-ABIQ a produção anual de queijos no Brasil tem-se mantido em cerca de 350.000 toneladas nos últimos anos, o que corresponde à produção de cerca de  $3,5 \cdot 10^6$  toneladas de soro de queijo utilizado principalmente como alimento animal na sua forma bruta ou processado em pó para a produção de biscoitos e alimentos

---

lácteos. O elevado custo para a desidratação do soro limita sua adoção como prática comum.

Conseqüentemente, a maior parte do soro de queijo produzido em diversas partes do mundo ainda é incorporada às águas residuárias dos laticínios, sendo a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor.

O desenvolvimento de um processo adequado e economicamente viável através da geração de um sub-produto valorizado, permite ao setor de laticínios desonerar-se das conseqüências sócio-econômicas nefastas das opções de gerenciamento do problema até então adotadas, como também diversificar a sua linha de produtos e aumentar a sua receita.

#### APROVEITAMENTO DO SORO DE QUEIJO

O soro de queijo, obtido em grandes quantidades como resíduo da indústria de laticínios, consiste na parte líquida conseqüente à precipitação da caseína e é composto basicamente de 5% de lactose, 1 % de proteínas, 0.8 % de sais, 0.5% de ácido láctico, com pH 4.0 .

O descarte do soro têm incidência expressiva no custo da indústria de queijos. A pressão ambiental crescente faz com que a projeção deste custo seja ascendente. A demanda biológica de oxigênio (DBO) do soro é de aproximadamente 40.000 mg/l, fazendo deste um dos mais potentes efluentes orgânicos, sendo estimado que cerca de 100 kg de soro de queijo representa o equivalente ao esgoto produzido por 45 pessoas por dia. No Brasil, estima-se uma produção anual de cerca de 4.000.000 de litros de soro/ano sendo, cerca de metade deste volume é descartado "in natura".

Em termos econômicos, de um modo geral, as alternativas tradicionais de aproveitamento deste sub-produto não são satisfatórias. Os métodos tradicionais de esterilização pela aplicação do calor no soro implicam na precipitação da fração protéica que, de outra forma poderia ser utilizada juntamente com a lactose. Já os processos de esterilização mais sofisticados tais como a microfiltração, a ultrafiltração e a filtração tangencial a altas pressões são excessivamente caros e apresentam

---

problemas de retenção de moléculas de alto peso molecular, especialmente proteínas, e bloqueamento dos poros, causando entupimentos e contaminações bacterianas.

Entretanto, o uso de tecnologia de ponta permite que este efluente-problema seja transformado em produtos de valor agregado, que podem participar de mercado que movimentam milhões de dólares anuais. Algumas das aplicações sugeridas para a utilização do soro de queijo são discutidas a seguir.

Enzimas, bio-catalisadores utilizados em diversas indústrias, representam, em termos mundiais, um volume anual de negócios de bilhões de dólares, e sua produção está cada vez mais, dependendo de fontes microbianas. A utilização do soro de queijo como substrato para a propagação da biomassa representa uma excelente alternativa tecnológica a produção de diversas enzimas largamente comercializadas, como lactase, xilanase, lacase, pectinase e inulinase.

A lactase é objeto deste trabalho por se tratar de uma enzima de grande interesse e aplicação industrial, conforme descrito a seguir:

#### PRODUÇÃO DE LACTASE POR LEVEDURAS A PARTIR DO SORO DE QUEIJO:

A lactase (b-D-Galactosideo galactohidrolase, EC 3.2.1.23) é uma enzima capaz de hidrolisar o dissacarídeo lactose em glicose e galactose. Seu interesse econômico advém de suas inúmeras possibilidades de aplicação. O tratamento do leite e seus derivados pela lactase reduz o conteúdo de lactose, aumentando seu potencial de uso, resolvendo o problema de baixa solubilidade (11% p/v a 4°C em água) e de baixo poder adoçante.

No Brasil, um dos produtos mais afetados pela baixa solubilidade da lactose é o doce de leite, que cristaliza progressivamente durante a estocagem, adquirindo uma textura arenosa. Este problema pode ser facilmente solucionado pela hidrólise prévia da lactose presente no leite a ser utilizado na produção do doce.

Além da aplicação industrial, o leite hidrolisado, ou seja, o leite sem lactose, é de grande importância devido à intolerância de algumas populações à lactose.

---

Adicionalmente, pode-se citar a transformação do soro oriundo das indústrias de laticínios em produtos de valor agregado, através do uso da lactose. Desta forma, o soro de queijo pode ser convertido em melaço de lactose hidrolisada, que pode ser utilizado para produção de levedo de pão; xarope de lactose hidrolisada, um substituto parcial da sacarose em bebidas lácticas, compotas e geléias, entre outros produtos e xarope de soro hidrolisado, a ser usado na fabricação de glacês, doces e biscoitos. Para algumas dessas aplicações, o custo de produção deve ser competitivo com o do melaço, enquanto que para outras (xaropes de lactose) procura-se a competitividade com a sacarose.

Além destas, a Solvey do Brasil S/A e a Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil Ltda também comercializam a enzima. Estas empresas dominaram o mercado nacional da lactase até o presente. Entretanto, com a demanda crescente do setor industrial, o mercado desta enzima está em expansão no Brasil, surgindo então a Pfizer Neutral Lactase da Pfizer Inc..

Apesar da concorrência comercial entre estas empresas multinacionais no nosso mercado, a lactase não é produzida no Brasil e os custos de importação incidem diretamente em seu preço de venda.

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO

Na etapa de otimização, foi desenvolvido um sistema de determinação da condição ótima de alimentação na operação do tipo batelada alimentada.

O interesse no estudo da otimização de processos fermentativos resulta da crescente utilização de microorganismos em produção industrial. A minimização do consumo de matérias primas e minimização do tempo de produção podem ser citados como tipos de objetivos econômicos na otimização de processos biotecnológicos. A determinação de uma estratégia ótima de operação baseada em um modelo matemático do processo que represente o conhecimento obtido acerca do comportamento do microorganismo pode aumentar consideravelmente a lucratividade de uma planta industrial, a partir do fornecimento de condições para

---

forçar o microorganismo a apresentar uma maior produtividade e do melhoramento da reprodutibilidade da operação do bio-reactor. Mudanças na composição da carga e nos microorganismos utilizados podem justificar a utilização de técnicas adaptativas para correção dos modelos utilizados para controle e otimização "on-line" do processo fermentativo. A otimização on-line do processo consiste de um sistema de determinação de novas condições ótimas de operação para compensar a ocorrência de mudanças internas ou externas ao processo.

Assim sendo, este projeto desenvolveu a produção da enzima lactase a partir do soro de queijo das indústrias de laticínios do Vale do Paranhana e Encosta da Serra. Este nível de competitividade poderá ser atingido através de um trabalho conjunto que visa o aumento da produtividade em enzima, lançando-se mão de técnicas modernas de otimização e controle de processos e de diferentes formas de condução do processo fermentativo. Vale salientar que as técnicas de otimização e controle podem ser implementadas no processo de produção de pequenas empresas mesmo que estas não disponham de automação industrial. Isto é possível desde que essas empresas utilizem as técnicas desenvolvidas neste projeto através do uso de programas de computador (*software*) que indiquem qual a melhor forma de operar o processo, sendo a implementação prática executada manualmente na unidade industrial.

Este projeto contempla dessa forma o subprograma que obteve maior prioridade na Região do Vale do Paranhana e Encosta da Serra, a saber, "Desenvolvimento Tecnológico para a Área de Agropecuária e Alimentos", além de abranger o subprograma de "Estudos e Pesquisas para o Meio Ambiente".

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Rosane Rech, "Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Klyveromyces marxianus*", Dissertação de mestrado, DEQUI/UFRGS, 1998.

---

Foi utilizada uma frequência de rotação de 300 RPM e o diâmetro do impelidor é de 6,5 cm. O Volume do vaso variou de 1 L a 5 L na operação em batelada alimentada. O controle do processo visa obter uma maior produtividade de lactase.

### Microorganismos

O microrganismo utilizado no cultivo foi *Kluyveromyces marxianus*, cuja cultura foi feita em batelada alimentada com alta densidade celular (“High Cell Density Cultivation”).

As leveduras capazes de produzir a lactase (intracelular) são citadas a seguir:

- *Kluyveromyces marxianus*
- *Kluyveromyces lactis*
- *Cândida pseudotropicalis*
- *Brettanomyces anomalus*
- *Wingea roberstii*

Entre elas as mais expressivas são as leveduras *Kluyveromyces marxianus* (ou *fragilis*) e *K. lactis*. O mecanismo de absorção e hidrólise da lactose ocorre após seu transporte através da parede celular, mediado pelo sistema lactose permease. Dentro da célula, o dissacarídeo é desdobrado em glicose e galactose pela lactase. Estes açúcares são, então, metabolizados através da via glicolítica normal. Até o presente, o organismo mais estudado quanto ao metabolismo da lactose e produção da lactase tem sido a levedura *K. lactis*, inclusive com diversos genes clonados.

Os fungos produtores de lactase são:

- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus oryzae*
- *Aspergillus phoenicis*
- *Neurospora crassa*
- *Curvularia inequalis*

- 
- *Fusarium moliforme*
  - *Alternaria alternara*
  - *Mucor pucillus*

#### Bactérias

- *Escherichia coli*
- *Bacillus megaterium*
- *Thermus aquaticus*
- *Streptococcus lactis*
- *Lactobacillus bulgaricus*
- *Lactobacillus sporogenes*

#### REFERÊNCIA

Gekas, V. e López Lava, M. (1985) Hydrolysis of lactase: A literature Review. In: Process Biochem, 20(1), p. 2-3

No que se refere à produção industrial da lactase, a CHR. Hansen's utiliza cepas selecionadas de *K. fragilis* e comercializa a enzima sob o nome de Ha-Lactase. Já a Gist-Brocades utiliza cepas de *S. lactis* e comercializa a enzima sob o nome de Maxilact.

O cultivo em batelada alimentada apresenta algumas vantagens como a melhoria da produtividade de proteínas homólogas e heterólogas em cultivos de alta densidade celular; a superação de mecanismos regulatórios celulares: efeito Crabtree, repressão catabólita e inibição por produto. Nesse estudo, um tipo selvagem *Kluyveromyces marxianus* foi empregada na produção de  $\beta$ -galactosidase intracelular (lactase). *K. marxianus* exibe o efeito Crabtree, causando a fermentação indesejável da lactose para etanol devido à alta concentração de lactose no meio de cultura mesmo sob condições altamente aeróbias. A produtividade volumétrica de

lactase em culturas de alta densidade celular foi maximizada utilizando a estratégia de controle com otimização on-line para regular o suprimento de lactose.

A lactase pode ser produzida a partir de resíduos, como os da indústria de laticínios. Pode-se produzir lactase a partir do soro do leite. O aproveitamento desse resíduo da indústria de laticínios acarretaria um aumento no valor agregado do leite e beneficiaria o meio ambiente, evitando o despejo nos recursos hídricos, como apresentado a seguir:

#### Justificativa I

- Aproveitamento de Resíduo da Indústria de Laticínios.
- Linha de Produção de Queijos
- Subproduto da fabricação de queijos: SORO DO LEITE (produção de 9 Kg de soro/ 1 Kg de queijo fabricado).

#### Produção de Queijo (Censo agropecuário 1995-1996, IBGE)

- Rolante .....27 t
- Gramado.....20 t
- Canela .....16 t
- Igrejinha.....11 t
- Taquara.....10 t
- Três Coroas.....9 t
- Nova Petrópolis.....6 t
- Parobé.....2 t

#### Composição do Soro do Leite

- Lactose .....4,9 %
- Proteínas.....1,1 %
- Gordura ..... 0,2 %
- Sais Minerais ..... 0,6 %
- Ácido Lático .....0,25%
- Água .....93,0%

O soro do leite é altamente poluente.

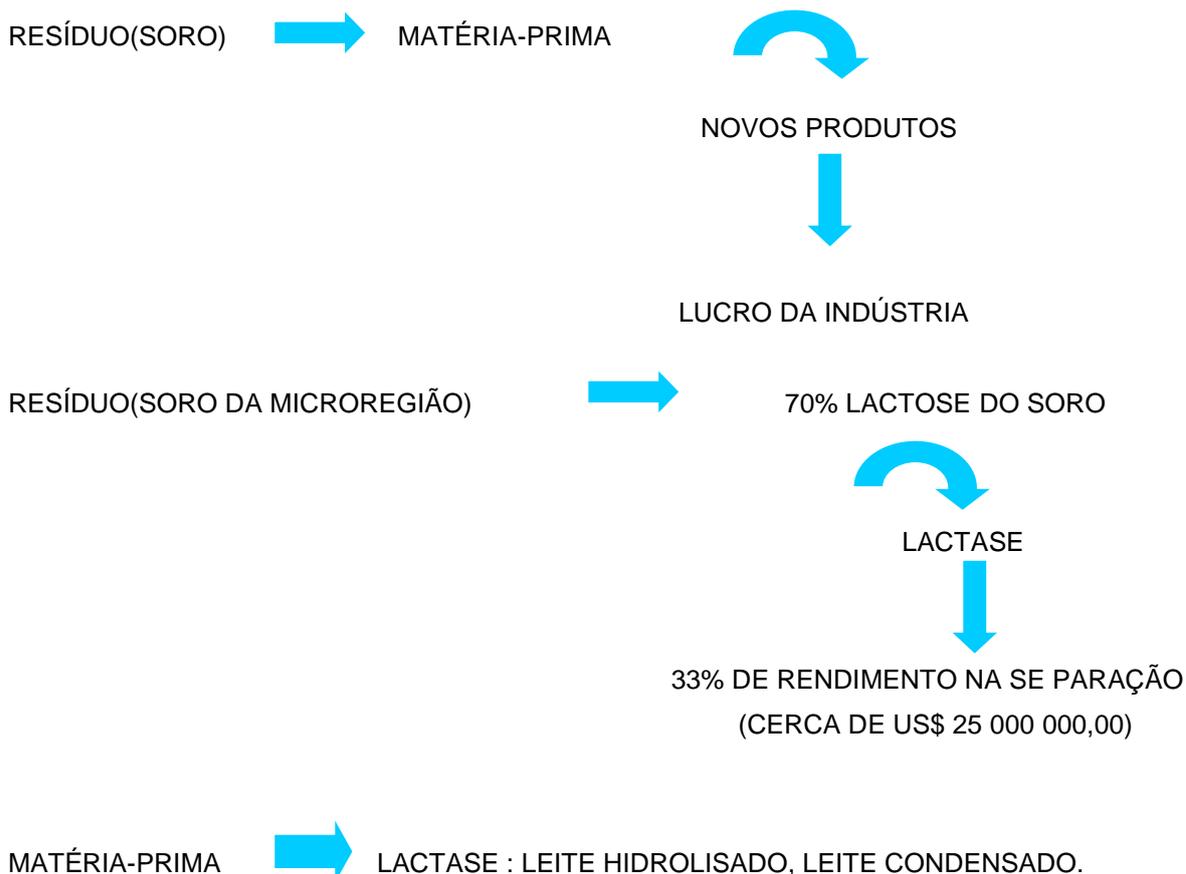
- Razões do potencial poluidor:
- Lactose = 70 %
- Proteína = 20 %

Dados Alarmantes:

- 100 Kg de Soro de Leite = esgoto produzido por 45 pessoas
- No Brasil produz-se cerca de: 4.000.000 L/ano de soro. A metade deste volume é descartado “in natura”.

Justificativa II

Obtenção de Novos Produtos



logurte → mais doce, com menor acidez posteriormente

melaço → produção de levedo de pão

Soro do leite



xarope → substituto da sacarose

Sorvetes → produto mais cremoso, menor custo.

### Justificativa III

Intolerância à lactose. Lactose = açúcar do leite

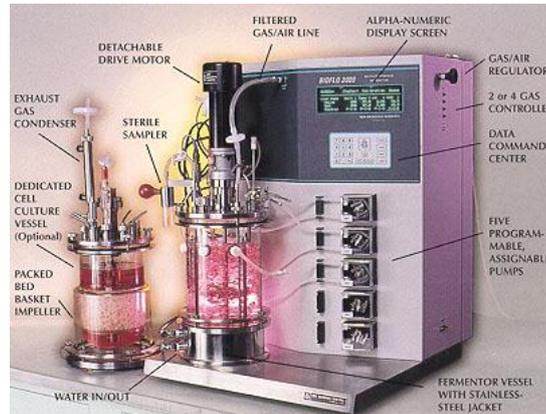
Fonte Natural : Leite dos mamíferos

Mamífero	lactose
Boi .....	4,8 %
Cabra .....	4,8 %
Cavalo .....	6,2 %
Homem .....	7,0 %

Aproximadamente 70 % da população mundial sofre de intolerância à lactose devido à falta da enzima LACTASE.

- Sintomas da Intolerância à Lactose
- Dores abdominais
- Inchaço da região abdominal
- Diarréia
- Náuseas
- Objetivo Geral
- Desenvolver tecnologia para a produção de enzimas a partir do aproveitamento do soro do leite como meio de cultura para fermentações microbianas;

## Bio-reator



## Objetivos Específicos

- Utilizar microorganismos para a fermentação do soro do leite;
- Estudar a cinética de produção da enzima em bio-reator;
- Otimizar o processo fermentativo;
- Desenvolver técnicas de recuperação e purificação da enzima;
- Criar recursos humanos qualificados para o setor agroindustrial e de alimentos;
- Estabelecer relações de cooperação entre a FACCAT e indústrias de alimentos.

Conversamos com a direção da empresa Marconi, no intuito de otimizar ou melhorar algumas características do fermentador. Desta forma, analisamos todos os aspectos que poderiam ser modificados e enviamos o fermentador para sofrer as devidas adaptações e melhorias.

Propusemos ao técnico responsável pelas alterações, que fossem colocadas alças na tampa de aço inox, isso facilitará o transporte do fermentador até a autoclave, quando da necessidade de se esterilizar o equipamento.

A colocação de mais um bocal, desta vez com septo de borracha, para inoculação dos microorganismos, também foi pedida, além de mais bocais de reserva.

---

O vaso do fermentador, como pode ser visto em foto em anexo, possui um fundo arredondado, contendo saída para o substrato que se encontra no interior. Em nossa pesquisa, não necessitamos desta saída, portanto pedimos que o vaso do fermentador fosse refeito e desta vez com fundo chato.

O sistema de sustentação do fermentador (base e haste de inox), não será mais necessário, sendo realizadas estas modificações no fundo do vaso do equipamento. Desta forma poderemos colocá-lo diretamente sobre a bancada reservada para este fim. Contudo, a base e a haste inox podem ser utilizadas para evitar sobrecarga no eixo do motor.

Após várias reuniões com os técnicos que dão suporte às modificações requeridas, enviamos o equipamento para a empresa Marconi no mês de Abril e o retorno do mesmo ocorreu no início do mês de Dezembro de 2004. Além das modificações já citadas, o encaixe do motor e os bocais de entrada e saída de água foram modificados de forma a possibilitar a utilização da autoclave AV-30 para esterilizar todo o vaso com meio de cultura e tampa.

Desta forma, após várias pesquisas, via internet, em sites de coleções de culturas, conseguimos, através da Fundação André Tosello, de Campinas, São Paulo, obter um orçamento de cepas do microorganismo *Kluyveromyces*.

Com a empresa White Martins foi feito o projeto de tubulação de gases para utilização no cromatógrafo à gás que opera em linha com o processo para análise on-line dos gases de saída (subproduto etanol, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>).

O CO<sub>2</sub> serve como medida indireta da concentração de biomassa. O O<sub>2</sub> e o etanol podem ser usados para recalcular a taxa específica de crescimento on-line. O efeito Crabtree acontece quando o microorganismo começa a produzir o etanol em vez da enzima caso a alimentação de lactose seja muito alta. Desta forma, quando a formação de etanol é detectada pelo cromatógrafo, a alimentação de lactose é suspensa.

Importante salientar a parceria para desenvolvimento do software de controle do Bio-reator (fermentador) entre a FACCAT, MS Tecnoyon (<http://www.tecnoyon.com.br>) e Marconi (<http://www.marconi.com.br>), com os custos

de participação da MS Tecnopon (atualmente representante no Brasil do fabricante do software de desenvolvimento Visual Designer da Intelligent Instruments) integralmente patrocinados pela Marconi, no sentido de possibilitar a modificação on-line de parâmetros dos controladores, monitoramento passivo do processo (controle manual), otimização do tempo de resposta da estratégia de controle e aprimoramento do funcionamento das bombas de alimentação de matéria-prima e controle de pH, que adequa o programa de controle aos objetivos do projeto quanto à otimização do processo.

A publicação de livro pelo GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, Alemanha) com o artigo “OPTIMAL CONTROL AND DOWNSTREAM PROCESSING ASPECTS OF PENICILLIN-G-ACYLASE PRODUCTION USING HIGH CELL DENSITY CULTIVATION“, cujos autores são: Prof. Dr. Waldemir Santiago Júnior<sup>1\*</sup>, Márcio Rosa da Silva<sup>2</sup>, Dr. José Miguel Müller<sup>3</sup>, Joseph Fuuna Hawumba<sup>4</sup>, Cyprian Katongo<sup>5</sup>, Reinhard Krützfeldt<sup>6</sup>, Dr. Anton Roß<sup>6</sup>

<sup>1</sup>FACCAT-Faculdade de Engenharia de Taquara, Taquara, RS, Brasil

<sup>2</sup>UNISINOS-Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS, Brasil

<sup>3</sup>UEM-Universidade Estadual de Maringá, Brasil e UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

<sup>4</sup>Makerere University, Kampala, Uganda

<sup>5</sup>University of Zambia, Lusaka, Zambia

<sup>6</sup>Pilot Plant Department, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, Germany

Portanto essa cooperação técnica com GBF (Centro de Pesquisa Alemão de Biotecnologia), Unisinos, UEM e universidades africanas teve como produto o desenvolvimento de nova tecnologia de controle ótimo aplicada à produção de enzimas utilizando cultura de microorganismos com alta densidade de células.

Com a EMBRAPA - CNPQV foi melhorado o projeto do Bio-reator em cooperação com a FACCAT envolvendo visitas de pesquisadores e apresentação de

---

palestra do Dr. Gildo Almeida no dia 24 de maio de 2004 para professores, acadêmicos, alunos da Escola Técnica Monteiro Lobato - Cimol e representantes da comunidade.

Apresentação de palestras do Prof. M.Eng. Carlos Fernando Jung e do Prof. Dr. Waldemir Santiago Júnior no dia 04 de novembro de 2004 para professores e acadêmicos da FACCAT intitulada “Otimização Dinâmica e Continuada da Gestão de Empresas”.

Foram adquiridos e instalados no laboratório BIOLAB (Laboratório de Química Biotecnológica) os seguinte equipamentos:

- Mesa incubadora agitação orbital MARCONI
- da empresa CGS (<http://www.cgs.com.br>) o Cromatógrafo à Gás modelo 3537R, com dois detetores (FID e TCD) e possibilidade de instalação de até 4 (quatro) colunas da empresa Bio Eng uma centrífuga de 16 tubos de ensaio

A instalação da(s) válvula(s) de controle automático com acionamento por software PeakSimple foi realizada a partir de 04 de julho de 2005 no Cromatógrafo a Gás da empresa CGS. A Profa. Fabiana Jung Noel realizou as análises dos produtos do processo e os pesquisadores atualizaram a revisão bibliográfica.

Foi utilizada a lisoenzima (L-6876 – Lysozyme/EC3.2.1.17) para romper a parede celular e possibilitar a análise da lactase produzida no experimento em que realizamos a análise dos gases de saída (etanol, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>), além do etanol no meio líquido. Foi feita uma ligação em paralelo com colunas do tipo peneira molecular e Porapak de forma a utilizar o detector de condutividade térmica para análise simultânea de oxigênio, nitrogênio e gás carbônico. O etanol foi analisado no detector de ionização de chama.

Conseguimos a cooperação com as empresas MS Tecnopon e Marconi para aprimoramento software de controle do bio-reator.

Dentre as atividades realizadas, destaca-se a realização de um experimento contínuo monitorado por computador com alimentação exponencial (batelada alimentada). Foram analisadas também lactose, lactase e a concentração de biomassa.

Dentre as atividades realizadas para o desenvolvimento do processo de produção da lactase a partir do soro de queijo, destaca-se:

Acoplamento do fermentador a um cromatógrafo para análise dos gases de saída, bem como a realização de um experimento contínuo monitorado por computador ao longo de mais de 54 horas.

A instalação da(s) válvula(s) de controle automático com acionamento por software PeakSimple foi realizada a partir de 04 de julho de 2005 no Cromatógrafo a Gás pela empresa CGS. Foi feita uma ligação em paralelo com colunas do tipo peneira molecular e Porapak de forma a utilizar o detector de condutividade térmica para análise simultânea de oxigênio, nitrogênio e gás carbônico. O etanol foi analisado no detector de ionização de chama.

- Realização de um experimento contínuo monitorado por computador com alimentação exponencial (batelada alimentada).
- Análise da concentração de lactose, lactase, concentração de biomassa e de proteínas
- Modificação do programa de controle do bio-reator no Visual Designer
- Utilização do PeakSimple
- Utilização do OpenWatcom
- Preparação da Prestação de Contas
- Registro Fotográfico do Experimento e dos Equipamentos
- Treinamento de Bolsistas:
  - Márcio Ricardo A. Kiszner (Operação do Bio-Reator e Cromatógrafo)
  - Michael Cristiano de Souza (Visual Designer)
  - Luis Fernando Elias Gonzaga (Visual Designer)
  - Cassiano Hubert (Open Watcom)
  - Carolina Kirsch (Operação do Bio-Reator e Cromatógrafo)
  - Flávio Lucas da Rosa (Automação e Programação no Visual Designer)

EXPERIMENTO 14 e 15/07/05 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA:

Quadro 1

Data	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	

Quadro 1 – Relação entre os volumes e os tempos de centrifugação

2º) Após a conclusão do tempo de centrifugação (60 minutos) procedeu-se como descrito em RECH, (1998), retirou-se 1,1 mL do sobrenadante, acrescentou-se 0,78 mL de tampão fosfato, 1,1 mL de ONPG e aguardamos por 1 min.

3º) Interrompemos a reação com adição de 0,22 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ;

4º) Fez-se a leitura em espectrofotômetro a um comp. de onda de 405 nm;

**OBSERVAÇÕES:**

1ª) Os volumes das amostras e de ONPG foram de 1,1 mL e de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para 0,22 mL, em

2ª) Assim o fator de diluição passou a ser de 0,03437 ( $F = V_a/V_F$ ) pois  $V_a = 1,1$  ml e  $V_F = 3,2$  mL.

---

CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA:

$$A_v = 3,576 \times A \times F$$

1º) Sendo que  $A_v$ =atividade volumétrica,  $A$  = absorvância corrigida e  $F$  = fator de diluição (já calculado e indicado nas observações acima);

Quadro 2

Atividade Volumétrica
1,084
1,177
1,392

Quadro 2 – Atividade Volumétrica

MÉTODO ALTERNATIVO PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA B-GALACTOSIDASE

ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA B-GALACTOSIDASE

Aplicação do Método Fenol-Sulfúrico (determinação de Açúcares Totais) para avaliar a concentração de lactose no produto do bio-reator, após seu tratamento com a enzima Lactase (B-galactosidase), produzida nos experimentos.

O teste da atividade enzimática foi realizado por 2 vias, ou seja, testou-se com ONPG, e com acréscimo de solução de lactose à 30 g/L.

---

## PROCEDIMENTOS PRÉVIOS

Preparação das seguintes soluções:

Sol. de Glicose 0,1 g/L

Sol. de Lactose 30 g/L

Sol. de Soro de Leite 70 g/L

Sol. Produto Bio-reator 1mL/100mL

Determinação dos teores de Lactose no soro de leite:

Para determinar a concentração de lactose no soro de leite, utilizou-se o método citado, segundo tabelas 1 e gráfico correspondente.

Quadro 3

Tubo	Água (mL)	Soro (mL)	Conc. Obtida (g/mL)	Fenol 80% (mL)	Ácido Sulfúrico (mL)	Abs. Lida	Abs. Corr.
0	1	0	0	0,05	5	0,068	0
1	0,8	0,2	0,014	0,05	5	0,275	0,207
2	0,6	0,4	0,028	0,05	5	0,476	0,408
3	0,4	0,6	0,042	0,05	5	0,524	0,456
4	0,2	0,8	0,056	0,05	5	0,651	0,583
5	0	1	0,07	0,05	5	0,711	0,643

Quadro 3: Método Fenol-Sulfúrico de determinação de lactose à  $\lambda = 490$  nm.

Figura 1

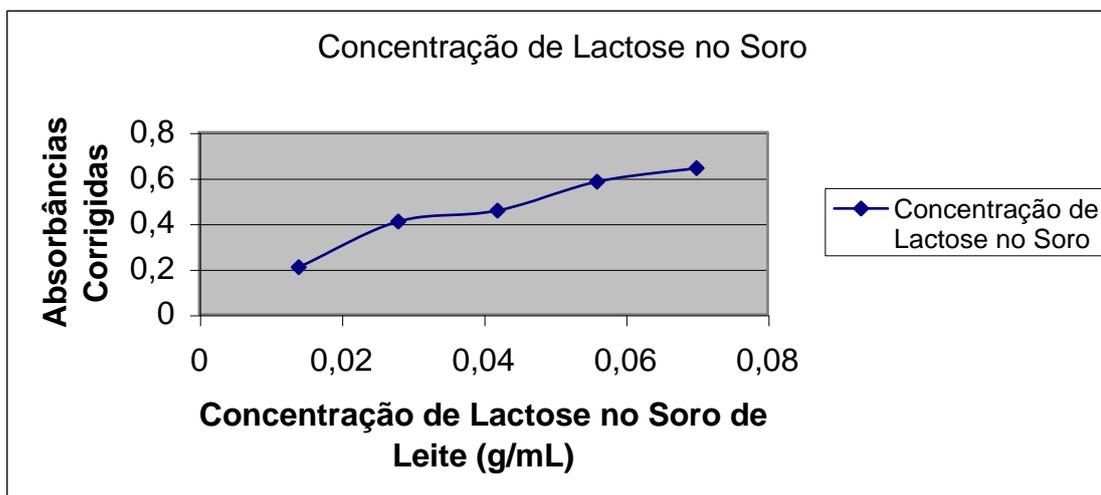


Figura 1: Relação da Absorbância com a Concentração de Lactose no Soro de Leite pelo Método Fenol-Sulfúrico

Determinação dos teores de Lactose no produto do Bio-reator:

A leitura das absorbâncias foi realizada em triplicata pelo método Fenol-Sulfúrico, em um comprimento de onda de 490 nm, onde o branco apresentou leitura de 0,068.

A absorbância da amostra apresentou uma leitura de 0,012. Para calcular a concentração de lactose, utiliza-se um fator de calibração, que segundo a Lei de Lambert-Beer, corresponde a razão entre a concentração de um padrão e a absorbância do mesmo. Abaixo a expressão matemática utilizada:

$$F_c = \frac{\text{Concentração do Padrão}}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

Após a determinação deste fator, basta multiplicar pelas absorbâncias das amostras de concentração desconhecida, para se encontrar a concentração.

---

$$\text{Conc. Amostra} = F_c \times \text{Abs. Amostra}$$

A concentração da amostra, determinada por este método é de  $1,3056 \times 10^{-3}$  g/mL, ou para fins de cálculos posteriores, 1,3 g/L.

### ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Enzima + Lactose 30 g/L:

Após reação ocorre liberação de glicose, medida pelo método Fenol-Sulfúrico em  $\lambda = 485$  nm, a absorbância encontrada foi de 0,147.

Em tubo de ensaio, colocou-se 1mL do produto contendo a enzima e como estimado anteriormente, contendo 1,3 g/L de lactose. A isto juntou-se 2 ml de lactose 30 g/L, aguardamos 30 minutos e procedemos a leitura em espectrofotômetro.

Enzima + ONPG:

Após reação com ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) descrito por Lederberg (1950) apud Rech (1998), ocorre liberação de orto-nitrofenol, que é detectado em  $\lambda = 405$  nm. A absorbância encontrada foi de 0,307.

Em tubo de ensaio, colocou-se uma alíquota de 1,1 mL, que foi tratada com 0,78 mL de tampão potássio, após 10 minutos em temperatura de  $36,5^\circ\text{C}$ , adicionou-se o reagente ONPG (o-nitrofenil-  $\beta$ -D-galactopiranosídeo);

Após 1 minuto de reação interrompe-se com a adição 0,22mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e lê-se em espectrofotômetro.

- 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;  $\epsilon_{ONPG}$  = 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . 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  $U_{ONPG}/\text{mL}$ . A unidade de ONPG, ( $U_{ONPG}$ ), é definida como a quantidade de  $\mu\text{moles}$  de ONPG que reagem em um minuto nas condições de reação.

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

O quadro 4 mostra a relação de amostras coletadas e a atividade volumétrica de cada amostra, calculada através da fórmula acima.

Quadro 4

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

Quadro 4 – Relação entre amostras e a atividade volumétrica da enzima

No quadro 5 pode-se encontrar a relação entre a atividade volumétrica da enzima ( $U_{ONPG}/mL$ ) e as absorbâncias medidas em um  $\lambda = 405$  nm.

Quadro 5

Atividade Volumétrica( $U_{ONPG}/mL$ )	Absorbâncias Corrigidas em $\lambda = 405$ nm
0,2845	0,882
0,3090	0,958
0,3654	1,133
0,2174	0,674
0,4106	1,273
0,3687	1,143
0,4161	1,29
0,4535	1,406
0,3093	0,959
0,2774	0,86

Quadro 5 : Relação entre Atividade Volumétrica e a absorbância lida e corrigida

O gráfico abaixo apresenta a curva padrão da atividade volumétrica em relação a um comprimento de onda de 405 nm.

Figura 2

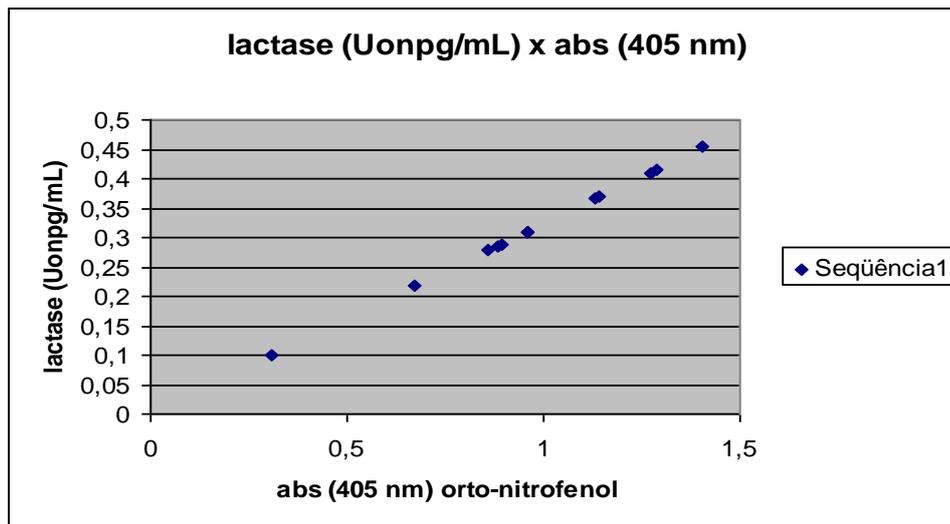


Figura 2: Curva Padrão de Atividade da Lactase X Absorbância à  $\lambda = 405 \text{ nm}$

Interpolando no gráfico da figura 2 as absorbâncias medidas pelo método fenol-sulfúrico, obtêm-se os fatores de conversão abaixo:

$$\text{Fator de conversão} \quad 9,2585 \cdot \text{Abs glicose} = \text{Abs ONPG}$$

$$2,98656 \cdot \text{Abs glicose} = \text{Lactase (Uonpg/mL)}$$

Através destes fatores de conversão pode-se, determinar a concentração da glicose (após quebra da lactose pela enzima), e, utilizando-se a absorbância lida, aplica-se nas fórmulas acima e poderemos então, obter, tanto a correspondente absorbância do ONPG no gráfico, quanto a atividade volumétrica da enzima.

Assim sendo, pode-se utilizar como substrato para determinação da atividade volumétrica, o açúcar (lactose), presente no soro de leite ou no próprio produto do bio-reator.

---

Tornando mais viável esta determinação, uma vez que o ONPG (orto-nitrofenil-galactopiranosídeo) é produto importado e de custo elevado.

#### BIBLIOGRAFIA:

Dubois, M. ET ALL. Colorimetric Method for Determination of sugars and Related Substances. Division of Biochemistry, Vol. 28, nº3. University of Minnesota, 1956.  
HARRIS, D. Análise Química Quantitativa. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. p. 447  
RECH, R. Aproveitamento do Soro de Queijo para a Produção de Lactase por *Kluyveromyces marxianus*. 1998. 74 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.  
VILLELA, G.G.; BACILA, M. e TASTALDI, H. Técnicas e Experimentos de Bioquímica. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1972, 522 p.

#### PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Processos Biotecnológicos envolvem sistemas reacionais que se utilizam de seres vivos para aplicação industrial

#### BIOPROCESSO

Compreendem um conjunto de operações:

- tratamento da matéria prima;
- preparo dos meios de cultivo;
- esterilização e a transformação do substrato em produto;
- processos de produção;
- processos de separação e purificação de produto

Um bioprocessamento consiste na utilização de organismos vivos (células) para a produção de produtos comercializáveis.

---

## Esquema Geral de um Bioprocesso

### Etapas do Processo – I

- O microorganismo a ser selecionado é a etapa de maior importância, pois dependendo do produto dele a ser extraído existem culturas próprias a cada tipo de substância requerida;
- Nossa produção é a enzima Lactase, logo, o microorganismo ideal é o *Kluyveromyces marxianus*

### Etapas do Processo – II

- Preparo do inóculo;
- Semeadura de novas colônias, obedecendo as indicações de caldos nutritivos cedido juntamente quando do envio das cepas;

### Etapas do Processo – III

- A esterilização dos meios de cultura e do vaso reacional faz-se necessária uma vez que pode haver contaminação com outros microorganismos presentes no ar e na sala de operação do Bio-reator;
- Geralmente esteriliza-se o vaso de reação por 20 min. a uma temperatura de 100°C.

### Etapas do Processo – IV

- O substrato de alimentação fornecido aos microorganismos também deve ser esterilizado previamente;
- Nosso substrato foi 1 L de Soro de Leite Elegê 70 g/L (na fase de Batelada) e 4 L à 360g/L (na fase de Batelada Alimentada).

---

#### Procedimento Off-Line

- Durante o funcionamento do Bio-reator, para controle dos produtos formados e do desaparecimento do substrato oferecido, faz-se necessário a realização de análises químicas off-line;
- São elas: Densidade de células, Conc. De Lactose, Atividade Enzimática.

#### Análises Off-Line

- Concentração de lactose:
- Para verificação do consumo deste açúcar pelos microorganismos;
- Método Analítico: Fenol-Sulfúrico

#### Método Fenol-Sulfúrico

- Reação da amostra do produto com fenol 80% e ácido sulfúrico conc.;
- Ocorre formação de produto estável que é então medido em espectrofotômetro em  $\lambda=490$  nm;
- O método consta do artigo:

#### Análises Off-Line

- Densidade de Células;
- Mede o aumento da massa celular (não diferencia microorganismos vivos de mortos);

#### Análises Off-Line

- Determinação da Atividade Enzimática;
  - Mede quanto a enzima converte em produto o substrato (açúcar lactose);
  - Método ONPG.
  - Utilização do Orto-Nitro-Fenil-Galactopiranosídeo (ONPG) para hidrólise por b-galactosidase (Enzima Lactase);
-

---

•O ONPG como substrato para medir a atividade enzimática é o mais utilizado, pois libera o 2-orto-nitrofenol (amarelo) que é detectado por espectrofotometria a um  $\lambda = 405$  nm.

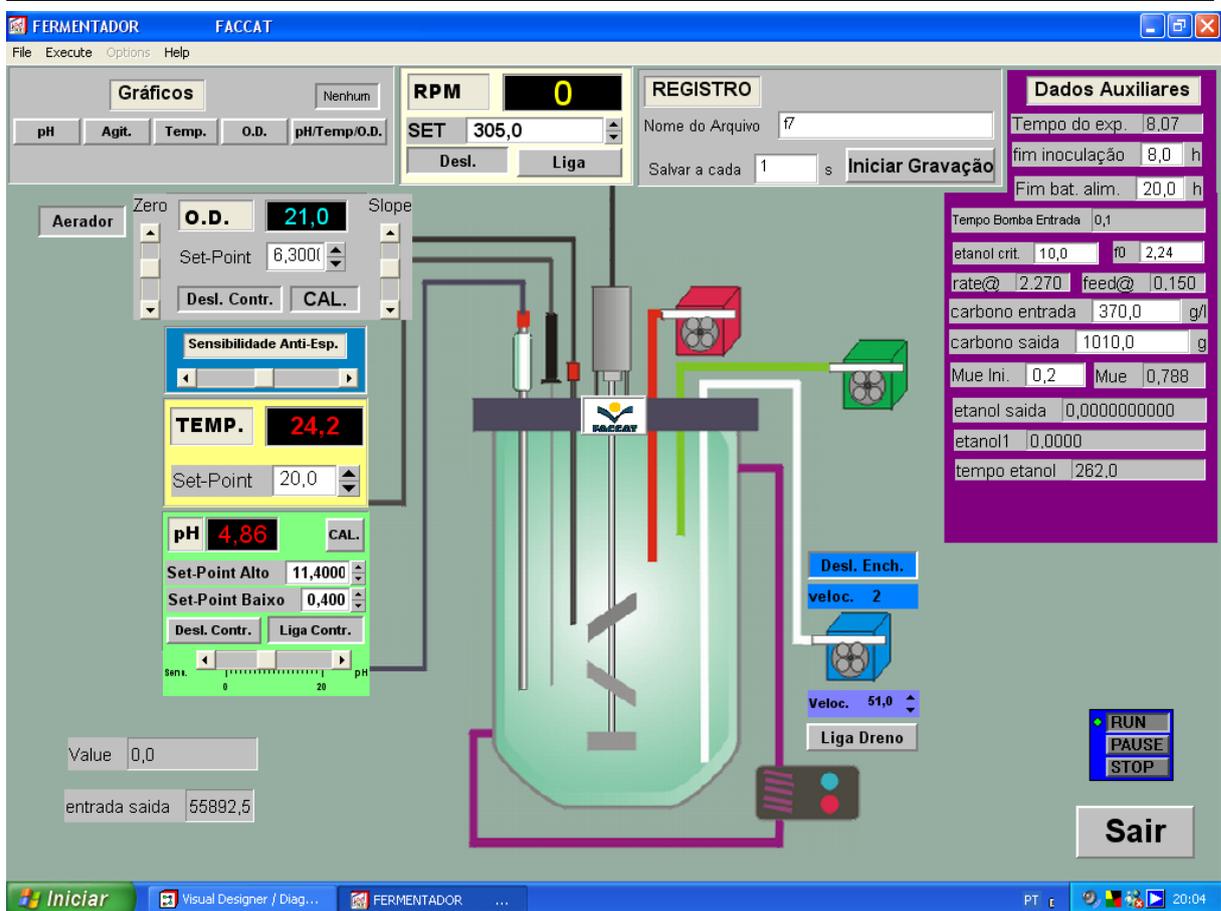
•Reação de Catálise Observada

#### Método Alternativo

- Utilização de Açúcar Lactose como substrato;
- Tempo de reação maior (30 minutos);
- Após reação de catálise, os produtos são a galactose e a glicose;
- A glicose ou a lactose restante são medidas pelo método Fenol-Sulfúrico;
- Se a Enzima não estiver isolada e purificada, o método não é confiável, prefere-se o método ONPG, muito mais preciso neste caso.

#### Enzimas

- proteínas especializadas na catálise de reações biológicas;
- unidades funcionais do metabolismo celular;
- aceleram a velocidade de uma reação, sem no entanto participar dela como reagente ou produto.



## 2 – Simulador do Processo

A simulação consiste numa avaliação do comportamento de um modelo que representa um produto ou processo. Esta avaliação pode ser física e/ou química, através de ensaios de laboratório ou de campo.

### Objetivo

A simulação permite a detecção de erros apresentados pelos modelos, tem como objetivo a otimização do produto ou processo.

### Simulação de processos

---

As simulações podem ser realizadas através de meios físicos ou virtuais. E alguns tipos de simulação são: a Icônica, a Matemática e a Analógica. Nesta síntese falaremos um pouco da simulação Matemática.

A simulação matemática utiliza-se de um modelo matemático para representar o sistema físico real a ser simulado. Sendo necessário o conhecimento dos fenômenos físicos e químicos envolvidos e, respectivas equações que os descrevem. À solução matemática encontrada deve ser imposta uma validação. Então se aplica uma ferramenta computacional para o auxílio dos cálculos.

As vantagens de uma simulação matemática são que custos envolvidos são relativamente baixos, há rapidez na obtenção de resultados, a quantidade de informações obtidas, a facilidade de simulação de condições reais e a facilidade de simulação de condições ideais.

Porém como desvantagens na simulação matemática temos que: nem todos os problemas podem ser adequadamente descritos através da matemática; a simulação de sistemas complexos pode envolver custos elevados; certos problemas matemáticos admitem mais de uma solução, nestes casos não é fácil determinar se a solução encontrada corresponde a realidade.

Um tipo de aplicação para simulação numérica é na mecânica dos fluídos e transferência de calor, que consiste numa simulação matemática que emprega métodos numéricos para resolver as equações obtidas no modelamento de problemas que envolvem mecânica dos fluídos e transferência de calor e sua correta utilização depende do preparo do usuário na área numérica e na correspondente área de aplicação. É uma poderosa ferramenta para a solução de problemas aplicados da engenharia. Foi adaptado um simulador em EXCEL originalmente utilizado para produção de Penicilina-G-acilase desenvolvido no GBF (Alemanha). Além do simulador em EXCEL, também foi desenvolvido um simulador equivalente no Visual Designer para ser executado com o programa de controle do Bio-reator.

---

## Metodologia

O modelo utilizado é o seguinte:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \qquad S_f = \frac{dS}{dt} = Y_S \frac{dX}{dt} + mS \cdot X$$
$$\mu_i = \frac{S_f - mS \cdot X}{Y_S X_i} \qquad X_i = X_{i-1} e^{\mu_i \Delta t}$$

Onde **X** é o produto (saída) e **S** é a alimentação (entrada).

### 3 – Experimento com Monitoramento On-line da Estratégia Ótima de Operação

A otimização on-line em processos industriais, busca a utilização mais eficaz de energia e matérias primas, a minimizar a geração de resíduos e com isso atingir e preservar uma performance econômica ótima utilizando ações de controle.

#### Otimização on-line

Para que tenhamos esta performance ótima é necessário adaptar continuamente a operação do processo às mudanças de condições ótimas em um ambiente dinâmico, assim desenvolvendo e implementando estratégias de operação e de sistemas de controle de processos de maneira eficaz.

Com a presença de perturbações persistentes há a necessidade da otimização on-line. Tais perturbações podem ser:

- Mudanças nas matérias primas e produtos
- Variação de demanda do mercado
- Diferentes fontes de energia
- Flutuações em preços
- Novas restrições operacionais
- Mudanças de temperatura e vazões

---

Mas para proceder com um processo de otimização devem ser levados em conta critérios tecnológicos, econômico-financeiros, legais mercadológicos e comerciais, bem como gestores e administrativas.

A partir daí, o que podemos fazer é traçar um modelo matemático dinâmico, como por exemplo:  $A = E - S + G - C$ . Onde:

**A** é o que Acumula dentro do Sistema;

**E** é o que entra no Sistema;

**S** é o que sai do Sistema;

**G** é gerado dentro do Sistema;

**C** é consumido dentro do Sistema.

Com base num modelo como este, podemos transformar a necessidade relativa ao processo em um problema. E a engenharia permite-nos representa-lo numa série de especificações. Por estas especificações projeta-se o controlador, o qual atuará no processo.

Mas o processo necessita ser monitorado para ver se corresponde às especificações. Esta identificação de variáveis passa por uma avaliação e um sistema ótimo vai atuar diretamente no processo, especificações ou até mesmo no controlador para que o resultado seja o problema resolvido e o objetivo seja alcançado.

Através da otimização de um processo podemos transformar resíduos em novos produtos, assim aumentar o lucro na indústria.

## DESENVOLVIMENTO DA ESTRATÉGIA DE CONTROLE

A otimização consiste numa série de ajustes feitos no decorrer de um processo com o objetivo de se obter uma operação o mais próximo possível da ideal, com um mínimo de perdas. Quanto mais rápido ocorrerem estes ajustes, menores serão as perdas relativas ao processo. A otimização on-line busca reduzir o tempo entre a detecção do problema e a atuação no sistema com vistas a corrigi-lo.

**Objetivos:**

- Utilização mais eficaz de energia e matéria prima;
- Minimizar a geração de resíduos;
- Atingir e preservar uma performance econômica ótima utilizando ações de controle;
- Adaptar continuamente a operação do processo às mudanças de condições ótimas em um ambiente dinâmico.
- O objetivo geral proposto consiste no desenvolvimento de tecnologias para a produção de enzimas a partir do aproveitamento do soro do leite como meio de cultura para fermentações microbianas.

**Nomenclatura:**

**QUADRO 6**

$f$	Lactose acumulada (g)
$F$	Taxa de alimentação de lactose (g/h ou l/h)
$S$	Concentração de lactose no meio (g lactose/g meio ou g/l)
$S_i$	Concentração de lactose na solução de alimentação (g lactose/g alimento ou g/l)
$t$	Tempo de cultivo (h)
$T$	Intervalo de alimentação da batelada alimentada (h)
$V$	Volume do cultivo (l)
$X$	Concentração celular (g/l)
$X_0$	Concentração celular inicial (g/l)
$Y_{XS}$	Desempenho celular em relação à lactose (g célula/g lactose)
<b>Símbolo Grego:</b>	
$\mu$	Taxa de crescimento celular específico ( $h^{-1}$ )

Sob condições de crescimento em equilíbrio, obtém-se o crescimento exponencial num cultivo em batelada alimentada com volume variável por:

$$\text{Equação 1: } VX=V_0X_0\exp(\mu t)$$

Em cultivo de levedura com efeito Crabtree-positivo, o metabolismo celular deve utilizar a via oxidativa para prevenir o efeito Crabtree e, portanto, a formação do etanol.

Para uma taxa constante de crescimento específica, a taxa instantânea de alimentação de um substrato limitante de crescimento é dada por:

Equação 2:

$$F = \frac{\mu}{Y_{x/s} (S_i - S)} V_0 X_0 \exp(\mu t)$$

$S_i$  e  $S$  são concentrações do substrato na solução de alimentação e no reator.  $Y_{x/s}$  é o desempenho celular teórico no substrato. A Eq. (2) projeta o cultivo em batelada com escala de alimentação exponencial e é a base para se projetar estratégias de controle antecipativo.

As concentrações de substrato devem ser mantidas a baixo do nível crítico (em que se inicia o efeito Crabtree), sendo controladas por controle indireto através do monitoramento da taxa de crescimento específica.

Um rápido aumento do nível de DO indica o esgotamento do substrato. Por conseguinte, injeta-se um pulso de alimentação que provê quantidade de suprimento adequado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A linhagem de levedura do cultivo foi do tipo *K. marxianus*

O meio de cultura foi definido a partir do melhoramento de meios para cultivos de leveduras com alta densidade celular.

A temperaturas abaixo de 4<sup>o</sup> C. Um método de alimentação contínua de traços de sais foi aplicado conjuntamente com a solução de alimentação da lactose, a fim de estimar o consumo deles.

QUADRO 7

Componentes	Concentração
Lactose (g/L)	35.0
Meio sais minerais	10.0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.0
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0.5
NaCl	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.0
Solução de vitaminas	10.0 <sup>a</sup>
Traço de solução salina	2.0 <sup>a</sup>
Antiespumante	0.2 <sup>a</sup>
Traço de solução salina (g/L)	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5.40
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.20
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.85
KI	0.20
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.16

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.80
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.40
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.80
Solução de vitaminas (mg/L)	
Biotina	30.0
Ca-pantotenatida	400.0
Ácido fólico	40.0
Inositol	1800.0
Ácido P-aminobenóico	80.0
Niacina	200.0
Pirodoxina	160.0
Riboflavina	80.0
Tiamina	360.0

Quadro 7: composição do meio definido para cultivo de *K. marxianus*.

Os cultivos iniciais foram usados como inóculos em todos os experimentos para garantir que os cultivos que foram inoculados tenham células com características fisiológicas similares.

#### Métodos Analíticos

A concentração celular foi analisada quantitativamente por gravimetria e turbodimetria.

A concentração de lactase nas amostras sem células foi medida por colorimetria reação com o ácido fenol-sulfúrico.

A concentração de etanol no meio foi medida por cromatografia gasosa.

Para medir a concentração de lactase foi necessário o rompimento das células e a atividade foi estimada, de acordo com o método enzimático Sigma, em unidade de atividade enzimática (U) - a quantidade de lactase que hidrolisa um  $\mu\text{mol}$  de ONPG ( $\alpha$ -nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo) por minuto a pH de 7,3 a 37° C.

---

Foram utilizados nas bateladas um fermentador (MBR Biorreator AG) equipado com controladores para pH, T, taxa de agitação e DO.

As culturas foram operadas por 13,5 horas (tempo estimado para completa utilização da lactose inicial do meio).

#### Controle Otimizante

Visual designer foi utilizado para monitoramento em linha de todas as variáveis do processo, para estimação dos parâmetros cinéticos e controle da taxa de alimentação do substrato.

A taxa de crescimento específica crítica, antes do início do efeito Crabtree foi estimada em 0,2/h, correspondendo a concentração de lactose de 4,4g/L.

Durante cada intervalo de alimentação, a taxa de alimentação do substrato foi atualizada a cada 3 min.

#### Comparação das Estratégias de Controle de Batelada Alimentada

A alimentação exponencial baseia-se na alimentação contínua com um perfil exponencial fixo, permitindo, teoricamente, crescimento celular exponencial por alimentação de substrato de acordo com a demanda de crescimento. A alimentação exponencial com controle automático de retroalimentação procura compensar as variações de  $\mu$  devido a perturbações do processo.

A taxa de produção mais alta foi obtida com a estratégia de alimentação batelada exponencial

A estratégia de controle otimizante para cultivo aeróbio em batelada alimentada maximizou o crescimento da biomassa e a produtividade volumétrica de lactase. Outra vantagem refere-se ao fato de que o controle só requer o monitoramento do nível de etanol no gás de saída do bio-reator.

---

## BIBLIOGRAFIA

JENO M.; JERVIS, Eric J.; MOO-YOUNG, Murray; NOR, Zairossani M.; TAMER, Melih I.; Scharer. Automated Fed-Batch Culture of *Kluyveromyces fragilis* Based on A Novel Method for On-Line Estimation of Cell Specific Growth Rate. **Biochemical Engineering Journal** 9, p. 221-231, 16 de agosto de 2001.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. de A.; SCHMIDELL, W.. **Biotecnologia Industrial v. 2: Engenharia Bioquímica**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

Bojorge Ramirez, Ninoska, Produção de Lactase por Fermentação de *Kluyveromyces marxianus* e Avaliação de Modelo semi-estruturado para Otimização do Processo, UFRJ, 1999

### 4 – Escalonamento do Processo

O escalonamento ou variação de escala de processos trata da transposição de dados obtidos em escala de laboratório (ou piloto) para a escala de produção industrial.

Na escala de laboratório (bancada: 1 a 5 L) foram levantados os dados básicos sobre o processo envolvendo o microorganismo escolhido e as condições de operação do processo.

Para uma escala de 5000 L foi calculado um diâmetro do impelidor de 22,11 cm para se obter 88,2 RPM baseado no critério de constância da velocidade na extremidade do impelidor. A manutenção da aeração constante dada por 2 vvm (volume de ar/(volume de meio x minuto) também pode ser usada para escalonamento.

---

## 5 – Cursos de Difusão Tecnológica

Os cursos de Difusão Tecnológica foram assim programados:

Curso: Processos Biotecnológicos de Produção de Enzimas

Local: FACCAT (auditório e Biolab)

Carga Horária: 20 horas (4 aulas de 5 horas)

Mês: 29/10, 05/11, 12/11, 19/11 (2005) – sábados (manhã – 7:00 às 12:00)

Público alvo: setor agroindustrial e de alimentos

Número de vagas: 30

Conteúdo:

- 1) O que são Enzimas
- 2) Interesse comercial na produção de enzimas
- 3) Etapas do processo de produção
- 4) Estudo de caso

Curso: Simulação e Otimização de Bioprocessos

Local: FACCAT (auditório e Biolab)

Carga Horária: 20 horas (4 aulas de 5 horas)

Mês: 29/10, 05/11, 12/11, 19/11 (2005) – sábados (tarde – 13:00 às 18:00)

Público alvo: setor agroindustrial e de alimentos

Número de vagas: 30

Conteúdo:

- 1) Aplicações de Processos biotecnológicos
- 2) Estratégias de Produção
- 3) Modelagem, simulação e otimização de processos
- 4) Controle de processos



**PÓLO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DO  
VALE DO PARANHANA/ENCOSTA DA SERRA**



---

Instrutores:

Prof<sup>a</sup>. Fabiana Jung Noel

Bel. Químico CRQ-V nº: 05201293

Waldemir Santiago Júnior

Prof. Dr. Engenharia Química

Inscrições gratuitas foram realizadas através do portal <http://polovp.faccat.br>

Tivemos número suficiente de pessoas inscritas nos cursos de difusão tecnológica (cerca de 60 pessoas inscritas), com estudantes e professores (CIMOL, FACCAT, UERGS e UFRGS) e profissionais do setor empresarial. As listas de presença estão em anexo e as fichas de inscrição estão disponíveis na FACCAT.

**CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO: 42 MESES**

ATIVIDADES		TRIMESTRES															
N.º	DESCRIÇÃO	1/3	4/6	7/9	10/12	13/15	16/18	19/21	22/24	25/27	28/30	31/33	34/36	37/39	40/42	43/45	46/48
01	Aquisição e instalação de equipamentos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
02	Prestação de contas a SCT					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
03	Simulação Numérica	X	X														
04	Montagem Unidade exp.			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
05	Estudo cinético													X	X		
06	Desenvolvimento do sistema de otimização da unidade experimental						X	X	X	X	X	X	X	X	X		
07	Estudo de operação do bio-reator								X	X	X	X					
08	Otimização do processo selecionado										X	X	X	X	X		
09	Otimização on-line dos dados obtidos no processo selecionado													X	X		
10	Implementação da estratégia de otimização automática na unidade experimental													X	X		
11	Escalonamento do processo para aplicação industrial														X		
12	Curso de processos biotecnológicos de produção de enzimas														X		
13	Curso sobre simulação e otimização de bioprocessos														X		
14	Relatórios trimestrais e final do projeto	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		

---

Conforme o ilustrado no item “Cronograma de Execução do projeto”, a marcação em vermelho, representa as atividades concluídas. O décimo quarto trimestre corresponde ao período de Outubro a Dezembro de 2005 (meses 40/42), e neste relatório foram detalhadas todas as atividades realizadas até o dia 5 de Dezembro de 2005. Como se pode notar pelo cronograma de atividades, concluímos os trabalhos desta pesquisa em menos de 42 meses, conforme solicitado pela Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul.

---

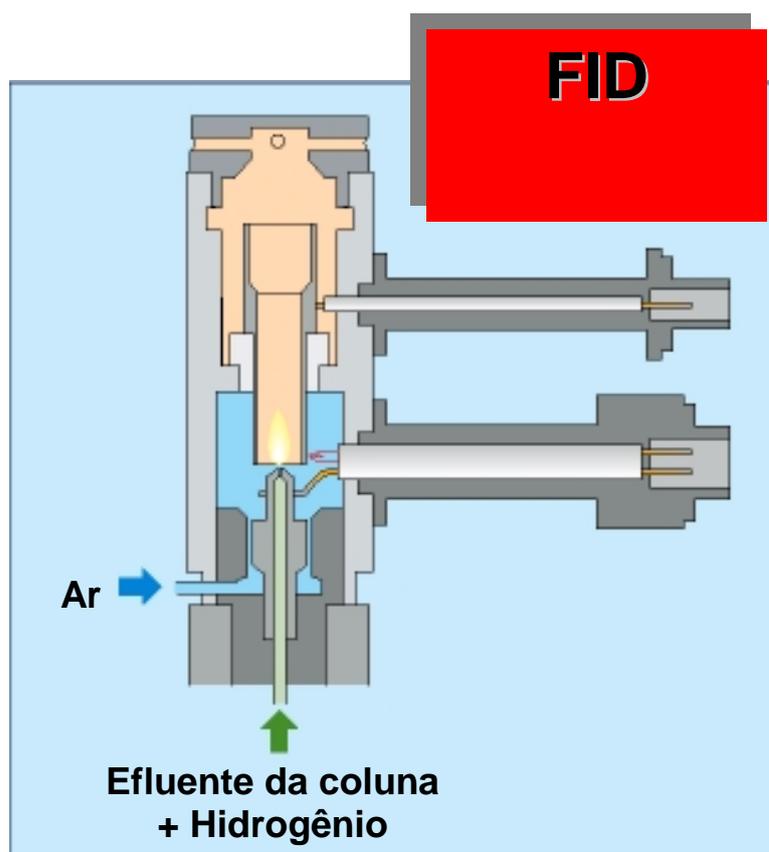
Prof. Dr. Waldemir Santiago Júnior  
**Coordenador da Pesquisa**

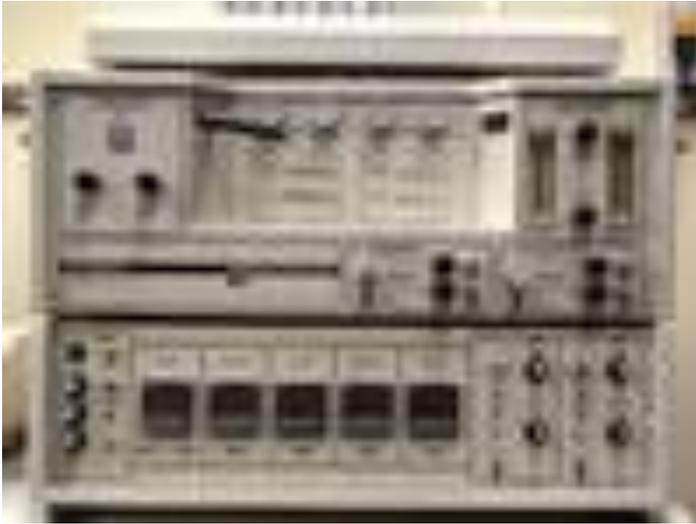
---

Profa. Fabiana J. Noel  
**Pesquisadora**

## ANEXO I – Cromatógrafo

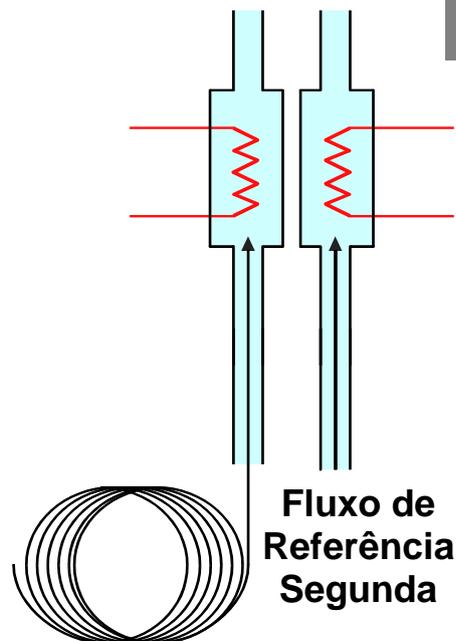
O cromatógrafo instalado em linha com o bio-reator dispõe de dois detetores: Condutividade Térmica ou TCD e Ionização de chama ou FID. No TCD foram instaladas duas colunas, uma PORAPAK para separar o O<sub>2</sub> do N<sub>2</sub> e outra coluna tipo Peneira Molecular em paralelo (instalada no lugar da coluna de referência) para separar o CO<sub>2</sub> do Ar. No FID foi instalada uma coluna Porapak para separar o etanol do Ar. As colunas do TCD também podem ser ligadas em série com o objetivo de reverter o sentido de fluxo com uma válvula 10 vias antes do vapor d'água atingir a segunda coluna (peneira molecular).





Cromatógrafo CG3537R

**TCD coluna simples**



**TCD**

---

Índice de Fotos (CD em anexo)

Hpim0704 – Cromatógrafo CGS em linha com o bio-reator para análise dos gases de saída com válvula manual de admissão de gases

Hpim0705 - Cromatógrafo CGS em linha com o bio-reator para análise dos gases de saída com detalhe do banho termostatizado para a camisa do bio-reator ao fundo

Hpim0706 - Cromatógrafo CGS em linha com o bio-reator para análise dos gases de saída com detalhe das válvulas de gases (Ar sintético, Hidrogênio e Nitrogênio)

Hpim0707 – Detalhes do laboratório com estufa de esterilização e secagem, geladeira duplex com freezer, extintores de incêndio e autoclave vertical. Biblioteca no alto.

Hpim0708 – Mesas de trabalho com computadores, chapa de aquecimento (bancada inferior), deionizador, tanque de água desmineralizada, espectrofotômetro, centrífuga, estufa e geladeira, detalhes de tubulação de água, GLP e ar comprimido. Biblioteca no alto.

Hpim1097 – Válvula 10 vias automática de reversão de fluxo com duas colunas cromatográficas ligadas em série

Hpim1098 – Detalhe da conexão da coluna a ser colocada no injetor/detector do cromatógrafo

Hpim1099 – Detalhes das conexões das colunas cromatográficas nas válvulas automáticas de 10 vias

Hpim1100 – Primeira Coluna cromatográfica ligada em série na válvula de 10 vias

Hpim1101 – Segunda Coluna Cromatográfica ligada em série na válvula de 10 vias

Hpim1102 - Válvula 10 vias automática de reversão de fluxo com duas colunas cromatográficas ligadas em série e conexões com o injetor e o detector

Hpim1103 – Forno do cromatógrafo com duas colunas instaladas em paralelo no detector de condutividade térmica e uma coluna instalada no detector de ionização de chama

---

Hpim1104 - Forno do cromatógrafo com duas colunas instaladas em paralelo no detetor TCD e uma coluna instalada no detetor FID

Hpim1105 - Válvula 10 vias automática de injeção da amostra nas três colunas cromatográficas

Hpim1106 - “PeakSimple Chromatography Data System” – placa de aquisição de dados e controle com quatro canais e válvula 10 vias automática de injeção da amostra

Hpim1107 - “PeakSimple Chromatography Data System” – placa de aquisição de dados e controle com quatro canais e válvula 10 vias automática de injeção da amostra conectados ao cromatógrafo

Hpim1108 – Cromatógrafo conectado à válvula automática de injeção, à placa de aquisição de dados e ao computador com software de integração PeakSimple

Hpim1109 - Cromatógrafo com forno aberto e conectado à válvula automática de injeção, à placa de aquisição de dados e ao computador com software de integração PeakSimple com impressora acoplada

Hpim1110 – Vaso do bio-reator aberto, monitor do computador de controle (alto), banho termostaticado embaixo da placa de aquisição de dados e controle do bio-reator, computador de controle do bio-reator e cromatógrafo em linha

Hpim1111 – Tampa do bio-reator com agitador, poço do sensor de temperatura, canaleta do dreno, sensor de pH, sensor de oxigênio dissolvido e tubo circular perfurado para aeração, ao fundo as bombas de adição de ácido e base, dreno, enchimento (alimentação) e adição de anti-espumante, ao lado da pia de aço inoxidável

Hpim1112 – Vista superior da tampa do bio-reator

Hpim1113 - Tampa do bio-reator com agitador, poço do sensor de temperatura, canaleta do dreno, sensor de pH, sensor de oxigênio dissolvido e tubo circular perfurado para aeração

Hpim1114 – Válvula manual de injeção de amostra gasosa do bio-reator no cromatógrafo

Hpim1115 - Válvula manual de injeção de amostra

- 
- Hpim1116 - Válvula manual de injeção de amostra
- Hpim1117 – Bolsista da Faccat (Michael) junto ao cromatógrafo conectado à válvula automática de injeção, à placa de aquisição de dados e ao computador com software de integração PeakSimple
- Hpim1118 - Bolsista da Faccat (Luis Fernando) junto ao cromatógrafo conectado à válvula automática de injeção, à placa de aquisição de dados e ao computador com software de integração PeakSimple
- Hpim1119 – Coordenador do Projeto (Prof. Waldemir) na sala de computadores anexa à sala do bio-reator no BIOLAB
- Hpim1120 - Pesquisadora do Projeto (Profa. Fabiana) e Responsável técnica do Biolab na sala do bio-reator
- Hpim1121 – Prof. Waldemir com a tampa do bio-reator para introdução no vaso
- Hpim1122 – Vista frontal do freezer com amostras congeladas do meio de cultura
- Hpim1123 – Aspergillus niger numa ampola com Agar-agar
- Hpim1124 - Aspergillus niger numa ampola com Agar-agar
- Hpim1125 – Michael, Luis Fernando e Prof. Waldemir dentro da sala do bio-reator
- Hpim1126 - Prof. Waldemir, Luis Fernando e Michael dentro da sala do bio-reator
- Hpim1127 – Integrador CGS
- Hpim1128 - Integrador CGS
- Hpim1129 – Lâmpada germicida UV instalada dentro da capela
- Hpim1130 - Lâmpada germicida UV instalada dentro da capela
- Hpim1131 - Lâmpada germicida UV instalada dentro da capela