

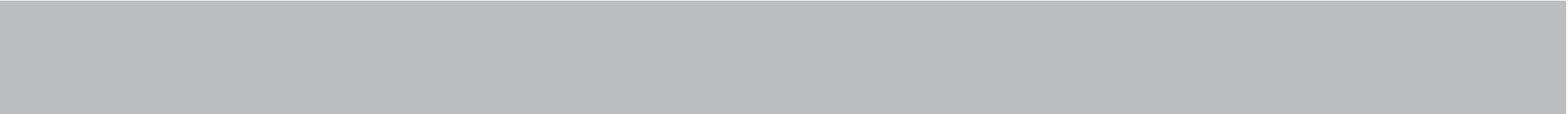
Coleção UAB-UFSCar

Tecnologia Sucroalcooleira

Reinaldo Gaspar Bastos

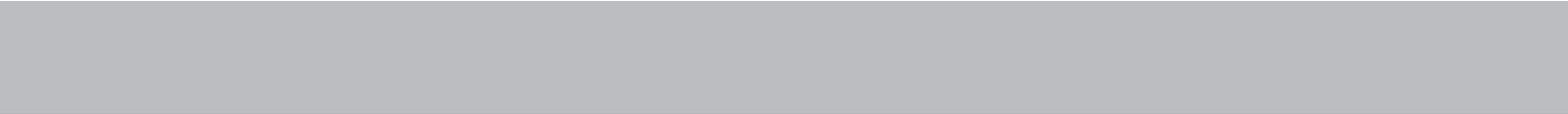
Tecnologia das fermentações

fundamentos de bioprocessos



Tecnologia das fermentações

fundamentos de bioprocessos



**Reitor**

Targino de Araújo Filho

Vice-Reitor

Adilson J. A. de Oliveira

Pró-Reitora de Graduação

Claudia Raimundo Reyes

**Secretária Geral de Educação a Distância - SEaD**

Aline Maria de Medeiros Rodrigues Reali

Coordenação SEaD-UFSCar

Daniel Mill

Glauber Lúcio Alves Santiago

Marcia Rozenfeld G. de Oliveira

Sandra Abib

Coordenação UAB-UFSCar

Daniel Mill

Sandra Abib

**Coordenador do Curso de
Tecnologia Sucoalcooleira**

Gilberto Miller Devós Ganga

UAB-UFSCar

Universidade Federal de São Carlos

Rodovia Washington Luís, km 235

13565-905 - São Carlos, SP, Brasil

Telefax (16) 3351-8420

www.uab.ufscar.br

uab@ufscar.br



EdUFSCar

Conselho Editorial

Ana Claudia Lessinger

José Eduardo dos Santos

Marco Giulietti

Nivaldo Nale

Oswaldo Mário Serra Truzzi (Presidente)

Roseli Rodrigues de Mello

Rubismar Stolf

Sergio Pripas

Vanice Maria Oliveira Sargentini

EdUFSCar

Universidade Federal de São Carlos

Rodovia Washington Luís, km 235

13565-905 - São Carlos, SP, Brasil

Telefax (16) 3351-8137

www.editora.ufscar.br

edufscar@ufscar.br

Reinaldo Gaspar Bastos

Tecnologia das fermentações

fundamentos de bioprocessos

São Carlos



EdUFSCar

2015

© 2010, Reinaldo Gaspar Bastos

Concepção Pedagógica

Daniel Mill

Supervisão

Douglas Henrique Perez Pino

Revisão Linguística

Clarissa Galvão Bengtson

Daniel William Ferreira de Camargo

Kamilla Vinha Carlos

Paula Sayuri Yanagiwara

Rebeca Aparecida Mega

Diagramação

Izis Cavalcanti

Juan Toro

Vagner Serikawa

Capa e Projeto Gráfico

Luís Gustavo Sousa Sguissardi

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária da UFSCar

B327t	Bastos, Reinaldo Gaspar. Tecnologia das fermentações : fundamentos de bioprocessos / Reinaldo Gaspar Bastos. -- São Carlos : EdUFSCar, 2010. 162 p. -- (Coleção UAB-UFSCar).
	ISBN – 978-85-7600-190-4
	1. Biotecnologia. 2. Bioprocessos. 3. Fermentação. 4. Microbiologia industrial. 5. Enzimologia. I. Título.
	CDD – 660.6 (20ª) CDU – 66:577.1

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	9
---------------------------	---

UNIDADE 1: Introdução

1.1 Biomassa microbiana	21
1.2 Enzimas microbianas	22
1.3 Metabólitos microbianos	22
1.4 Produtos recombinantes	25
1.5 Biotransformação	25
1.6 Microrganismos de interesse industrial	25
Referências	27

UNIDADE 2: Metabolismo microbiano e biomoléculas envolvidas

2.1 Enzimas	31
2.2 Metabolismo microbiano	35
2.2.1 Glicólise e Ciclo TCA	37
2.2.2 Respiração	40
2.2.3 Metabolismo anaeróbio	41
Referências	43

UNIDADE 3: Cinética enzimática

3.1 Cinética de Michaelis-Menten	49
3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos	54
3.3 Inibição enzimática	55
3.3.1 Inibição enzimática irreversível	56
3.3.2 Inibição enzimática reversível.	57
3.3.2.1 Inibição enzimática reversível competitiva	57
3.3.2.2 Inibição enzimática reversível não competitiva	59
3.3.2.3 Inibição enzimática reversível incompetitiva	60
3.3.2.4 Inibição enzimática reversível pelo substrato.	62
3.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática	63
3.5 Efeito do pH na atividade enzimática.	66
Referências	67

UNIDADE 4: Balanços elementares em processos biotecnológicos

4.1 Balanços materiais	71
4.2 Os bioprocessos podem ser conduzidos em:	71
4.3 Estequiometria dos processos microbiológicos.	77
4.4 Grau de redução dos substratos	79
Referências	81

UNIDADE 5: Cinética dos processos biotecnológicos

5.1 Parâmetros cinéticos	86
5.2 Fases de crescimento celular	92
5.3 Cinética de Monod.....	95
5.4 Modelos de crescimento celular	97
5.5 Influência de parâmetros físico-químicos no crescimento celular.....	99
Referências	101

UNIDADE 6: Operações unitárias dos processos fermentativos

6.1 Esterilização	109
6.2 Agitação e mistura.....	114
6.2.1 Transferência de oxigênio.....	115
6.2.2 Agitação mecânica sem aeração.....	121
Referências	123

UNIDADE 7: Biorreatores

7.1 Biorreatores de mistura	127
7.2 Biorreatores de mistura contínuos	131
7.3 Biorreatores tubulares	133
7.4 Configurações de biorreatores	135

7.5 Aumento de escala de biorreatores	138
7.5.1 Método da constância da potência por unidade de volume de meio	140
7.5.2 Método da constância do coeficiente global de transferência de oxigênio	140
7.5.3 Método da constância da velocidade na extremidade do impelidor	141
7.5.4 Método da constância do tempo de mistura	141
7.5.5 Método da constância do Número de Reynolds	142
7.5.6 Escolha do critério de <i>scale-up</i>	142
Referências	142

UNIDADE 8: Purificação de biomoléculas

8.1 Rompimento celular	149
8.2 Filtração e centrifugação	150
8.3 Purificação baseada na solubilidade	152
8.4 Extração em sistemas de duas fases aquosas	156
8.5 Cromatografia	157
8.6 Tratamentos finais	158
Referências	160

APRESENTAÇÃO

O principal objetivo deste livro é apresentar os princípios da engenharia de bioprocessos e da biotecnologia industrial, de forma prática, acessível e condensada.

Apesar da ocorrência de excelentes referências sobre bioprocessos em inglês, são escassas as bibliografias em português que abordem esse tema. Sendo assim, esta revisão tem a proposta de atenuar esse problema encontrado em cursos que abordem as áreas de bioquímica industrial.

De maneira didática procurou-se classificar esse amplo assunto em oito Unidades. No início são apresentados os conceitos fundamentais, com a definição dos termos que serão usados amplamente durante a leitura do texto. A seguir, procurou-se apresentar os principais modelos metabólicos utilizados por microrganismos de interesse industrial. É importante salientar que o leitor interessado em aprofundar os conhecimentos em metabolismo celular e bioenergética, por exemplo, deve procurar as referências listadas no final de cada Unidade.

Na sequência do texto analisamos os processos enzimáticos e microbiológicos por meio da estequiometria e balanços elementares. Um ponto fundamental no estudo dos bioprocessos é a cinética das reações, abordada com a definição dos parâmetros mais importantes e exemplo de casos. Por fim, comentamos sobre as principais operações unitárias utilizadas nos bioprocessos, incluindo os princípios da purificação de biomoléculas.

O autor espera que o texto seja o primeiro passo, ou seja, um agradável impulso inicial para que o leitor se interesse pelo assunto devido à facilidade de leitura e procure aprimorar seus estudos nesta área.

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
DTAiSER/CCA/UFSCar

UNIDADE 1

Introdução

O termo “fermentação” é derivado do latim *fervere*, que significa “ferver”, devido à aparência da produção de gás carbônico pela ação de leveduras sobre extrato de frutas de grãos maltados. Entretanto, a fermentação recebe diferentes definições do ponto de vista bioquímico e da microbiologia industrial. Bioquimicamente, a fermentação é definida como processo de catabolismo, ou seja, conversão anaeróbia de compostos orgânicos complexos tais como carboidratos em moléculas mais simples, como alcoóis e ácidos orgânicos. Por exemplo, a fermentação alcoólica ou etanólica é um processo de conversão anaeróbia da glicose em etanol, realizado principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O catabolismo de açúcares resulta na produção de nucleotídeos reduzidos, que vão sendo reoxidados para continuidade das reações. Sob condições aeróbias, a reoxidação do nucleotídeo piridina ocorre por transferência de elétrons via sistema citocromo, com oxigênio agindo como último acceptor de elétrons. Por outro lado, sob condições anaeróbias, a oxidação do nucleotídeo piridina reduzido está ligada à redução de compostos orgânicos, que são frequentemente produtos das vias catabólicas. Esse é o caso da ação de leveduras sobre o extrato de frutas e a origem da palavra “fermentação”, uma vez que NADH é regenerado pela redução de ácido pirúvico a etanol. Assim, o termo fermentação é usado bioquimicamente como o processo de obtenção de energia em que compostos orgânicos agem tanto como doadores como aceptores finais de elétrons. A redução de piruvato a diversos produtos úteis pela ação de microrganismos é demonstrada na Figura 1.

No entanto, os microbiologistas industriais estendem o uso do termo fermentação para descrever qualquer processo em que ocorra formação de biomassa microbiana. Assim, os cinco principais grupos de fermentações comercialmente importantes são:

- processos em que o produto é a própria massa microbiana;
- produção de enzimas microbianas;
- produção de metabólitos microbianos;
- obtenção de produtos recombinantes;
- biotransformação ou bioconversão de compostos.

Nesse contexto, substratos são os compostos consumidos para obtenção de energia e produção de metabólitos nos cultivos microbianos e na formação de produtos em reações enzimáticas. Esses processos ocorrem nos chamados biorreatores, fermentadores ou dornas, ou seja, recipientes onde ocorrem reações bioquímicas, catalisadas por enzimas ou envolvendo crescimento de microrganismos.

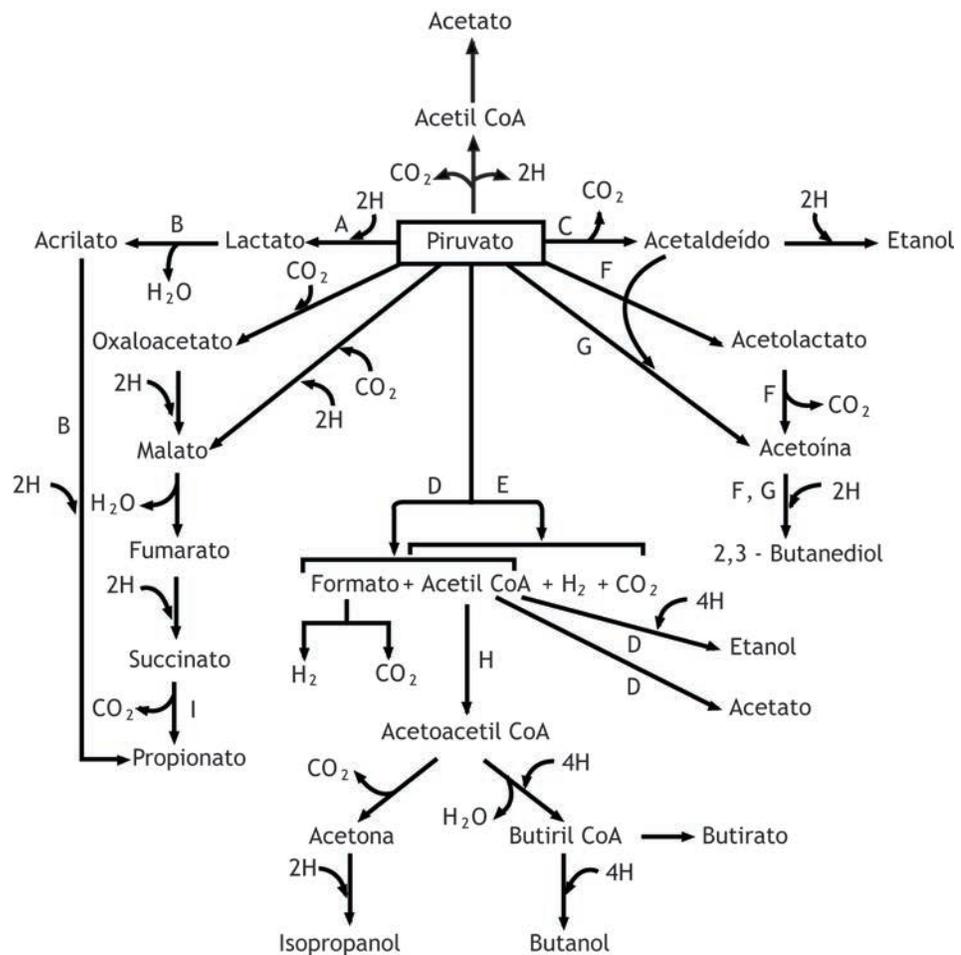


Figura 1 Produtos da redução microbiana do piruvato. Produtos finais: a) ácido láctico (*Streptococcus*, *Lactobacillus*); b) *Clostridium propionicum*; c) Leveduras, *Acetobacter*, *Zymomonas*, *Sarcina ventriculi*, *Erwinia amylovora*; e) Clostridia; f) *Klebsiella*; g) Leveduras; h) Clostridia (ácido butírico); i) Bactérias do ácido propiônico.

Fonte: adaptada de Stanbury, Whitaker & Hall (2003).

De maneira geral, esses processos podem ser submersos em estado sólido ou ainda com biocatalisadores imobilizados. Processos submersos são aqueles em que o biocatalisador (enzimas ou microrganismos) encontra-se em suspensão num meio líquido, formando uma fase única considerada homogênea. Os processos em estado sólido são aqueles em que os microrganismos crescem em suportes sólidos na ausência ou próximo da ausência de água livre, sendo considerado um processo heterogêneo pela importância de mais de uma fase: o suporte compreende uma fase sólida; a quantidade de água do suporte consiste na fase líquida; além de uma fase gasosa muitas vezes importante para disponibilizar oxigênio. Os microrganismos utilizados podem ser heterotróficos (exigência de fontes orgânicas de carbono) ou autotróficos (Figura 2).

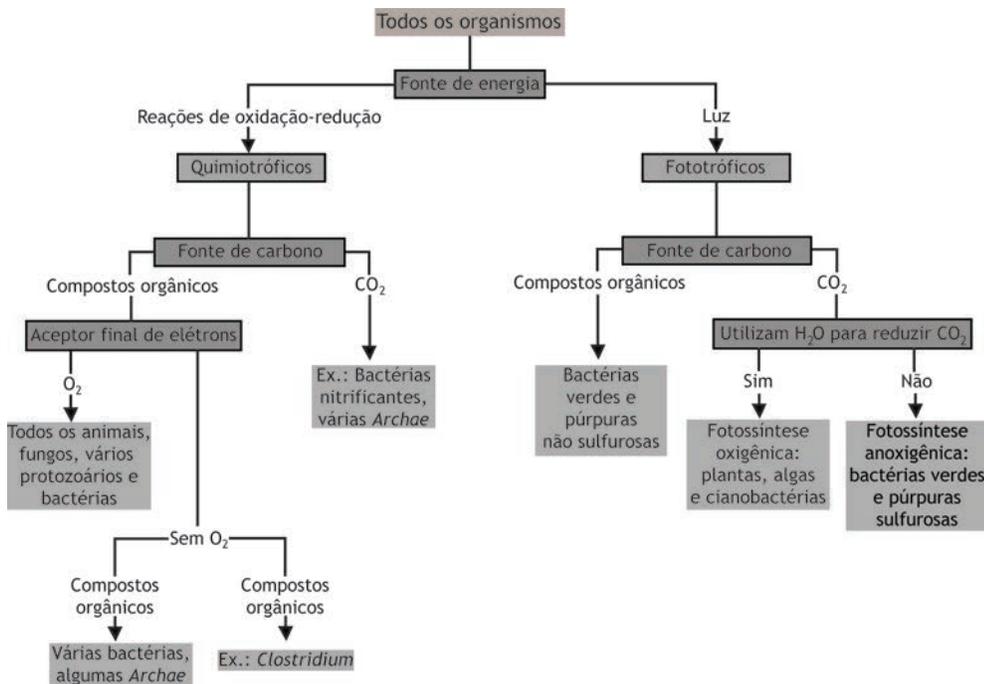


Figura 2 Classificação dos organismos quanto ao metabolismo.

Milênios antes de saber da existência de seres microscópicos, o homem já se utilizava deles. O homem das cavernas produzia bebida alcoólica, já sabia que a carne maturada tinha melhor sabor, fabricava queijos, produzia coalhada e vinagre. O pão fermentado por leveduras foi encontrado em pirâmides egípcias construídas há milênios. Muitos produtos obtidos pela ação de microrganismos podem ser incluídos nessa lista histórica: vinho (conhecido pelos antigos gregos), cerveja (2000 a.C.), soja fermentada, entre outros.

Até meados do século XIX o homem permaneceu sem conhecimento sobre as causas da fermentação. Em 1857, Pasteur demonstrou que a fermentação alcoólica era produzida por leveduras, que estas eram células vivas e que várias doenças eram causadas por microrganismos. Em 1901, Rudolf Emmerich e Oscar Loco, da Universidade de Munique, isolaram a piocianase da *Pseudomonas aeruginosa*. Centenas de pacientes foram tratados com sucesso pela piocianase, considerado o primeiro antibiótico conhecido. Porém, pela inexistência de técnicas seguras e apropriadas de produção e controle de qualidade, a piocianase foi abandonada prematuramente pelos riscos apresentados. No início do século XX já se produzia levedura de panificação em tanques abertos e aerados. Durante a Primeira Guerra Mundial, Chain Weismann produziu acetona a partir de amido usando a bactéria *Clostridium acetobutlicum*, livrando a Inglaterra de uma séria falta de munição, já que a acetona é usada na fabricação de cordite. Em 1923, Pfizer inaugurou a primeira fábrica para obtenção de ácido cítrico por fermentação, utilizando *Aspergillus niger* na conversão do açúcar em ácido, diminuindo o custo do produto.

Alexander Fleming, em 1928, manipulando *Staphylococcus aureus*, notou que numa das placas de cultura desse microrganismo havia contaminação por bolor da família *Penicillium*, e que ao redor deste não houve crescimento da bactéria. Extraiu do bolor uma substância, que denominou de penicilina, com atividade contra bactérias. Mas foi somente durante a Segunda Guerra que a penicilina foi industrializada, devido à grande necessidade de agentes bactericidas mais eficientes que a sulfa, até então utilizada. Seguiu-se, depois, o aparecimento de outros antibióticos. Selman Waksman isolou um actinomicete (*Streptomyces griseus*) da garganta de uma galinha, produtor de estreptomicina. Esse antibiótico mostrou-se altamente eficaz contra bactérias causadoras da tuberculose. A lista dos antibióticos atualmente é longa. Muitas vitaminas são produzidas por fermentações, como a B₂ (riboflavina), a B₁₂ (cianocobalamina) e a C (ácido ascórbico). Processos fermentativos também são usados na produção de cortisona e seus derivados, assim como na síntese de aminoácidos (L-lisina e ácido glutâmico) e hormônio regulador do crescimento das plantas (giberelina). Além disso, inseticidas bacterianos produzidos por *B. thuringiensis* encontram grande aplicação na agricultura. A evolução cronológica dos diversos processos fermentativos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 Estágios cronológicos de desenvolvimento da indústria de fermentação.

Estágio	Produtos principais	Processo	Seleção de microrganismos
Pré 1900	Álcool	Batelada, em tanques de madeira e cobre	Culturas puras usadas primeiramente na cervejaria Carlsberg em 1886
	Vinagre	Batelada, barris e bandejas	Fermentações inoculadas com vinagre
1900-1940	Levedura de panificação, ácido cítrico, ácido láctico e acetona	Batelada e sistemas semicontínuos em tanques de aço de centenas de metros cúbicos	Uso de culturas puras
1940-dias atuais	Penicilina e outros antibióticos, aminoácidos, nucleotídeos, enzimas	Tanques mecanicamente aerados, operados assepticamente, com eletrodos de pH e oxigênio, processos contínuos e em batelada	Seleção programada de microrganismos e mutações
1964-dias atuais	Proteínas unicelulares a partir de resíduos	Tanques pressurizados, configurações para contornar problemas de transferência de calor, processos contínuos com reciclos	Linhagens geneticamente modificadas
1979-dias atuais	Proteínas heterólogas e anticorpos monoclonais	Fermentadores adaptados para células animais com sensores de controle	Introdução de genes em células microbianas e animais (técnica do DNA recombinante)

Fonte: adaptada de Stanbury, Whitaker & Hall (2003).

Antes de a produção de penicilina em escala industrial ter se iniciado, já se produziam industrialmente certos produtos como leveduras de panificação, ácido cítrico e ácido glicônico, em que as condições de acidez do meio de cultura eram adversas a microrganismos contaminantes. Da mesma forma, na obtenção de produtos como sorbose, acetona, butanol e etanol, as concentrações de substrato ou produto eram muito elevadas, de forma que microrganismos contaminantes eram quase inexistentes. Assim sendo, as exigências de utilização de culturas puras na obtenção dos produtos anteriormente descritos eram praticamente nulas.

Entretanto, no caso da penicilina, as condições de operação tinham que ser estritamente assépticas. Assim, os engenheiros bioquímicos encontraram um grande desafio: o surgimento de novos fermentadores e técnicas de operação mais estéreis. Além disso, para a extração de alguns produtos como a penicilina, que era obtida em baixas concentrações e relativamente instável, exigiu-se o desenvolvimento de novas técnicas de filtração, extração, adsorção e concentração, dando origem a técnicas modernas de extração e purificação de produtos de origem biológica. O esquema típico de um processo biotecnológico está ilustrado na Figura 3, separando as operações anteriores à biorreação (*upstream*) e as posteriores (*downstream*).

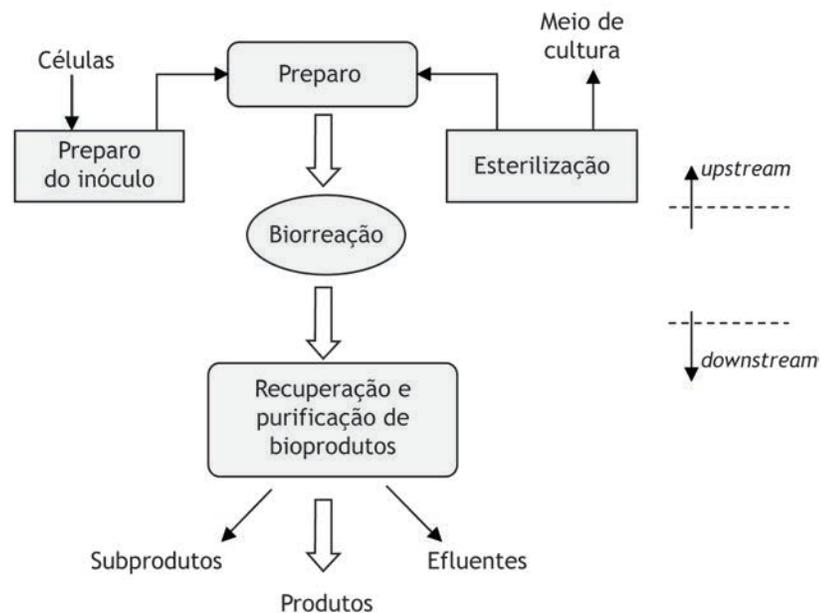


Figura 3 Esquema de um processo biotecnológico genérico.

De maneira geral, o processo fermentativo pode ser dividido em seis etapas fundamentais (Figura 4):

- a) a formulação do meio de cultivo durante o desenvolvimento do inóculo;
- b) a esterilização do meio, do fermentador e do material auxiliar;
- c) a produção de cultura pura suficiente para inocular o tanque;
- d) o crescimento do microrganismo dentro do biorreator;
- e) a extração do produto e sua purificação;
- f) o destino dos efluentes produzidos no processo.

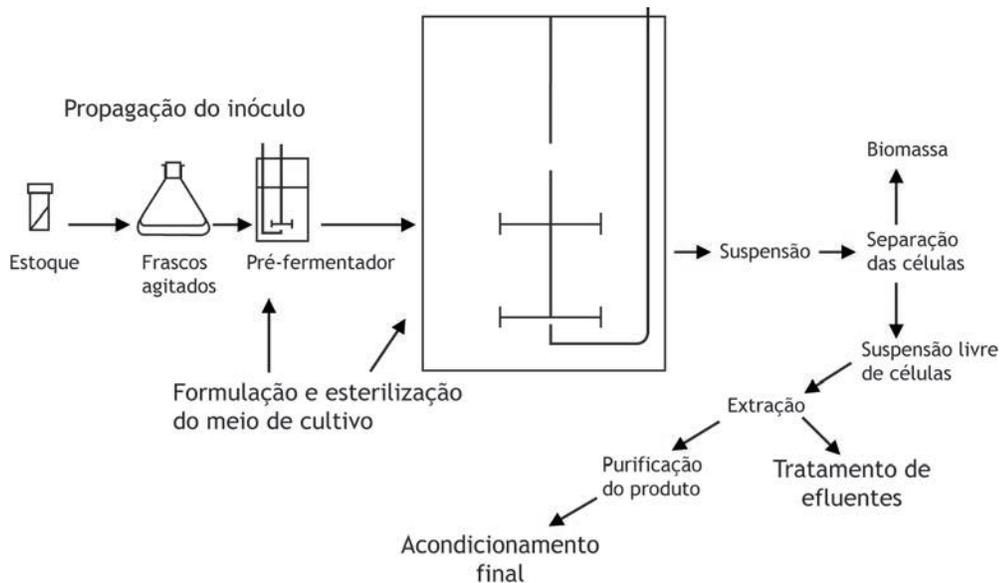


Figura 4 Processo fermentativo típico.
 Fonte: adaptada de Stanbury, Whitaker & Hall (2003).

Com relação aos processos de purificação de bioprodutos, cabe ressaltar que muitas vezes essa etapa compreende a maior parte dos custos do processo. A escolha das operações utilizadas para concentrar o produto de interesse e purificá-lo dependerá da localização da molécula, muitas vezes intracelular. A Figura 5 ilustra diferentes passos do chamado *downstream*, ou seja, operações de purificação de bioprodutos.

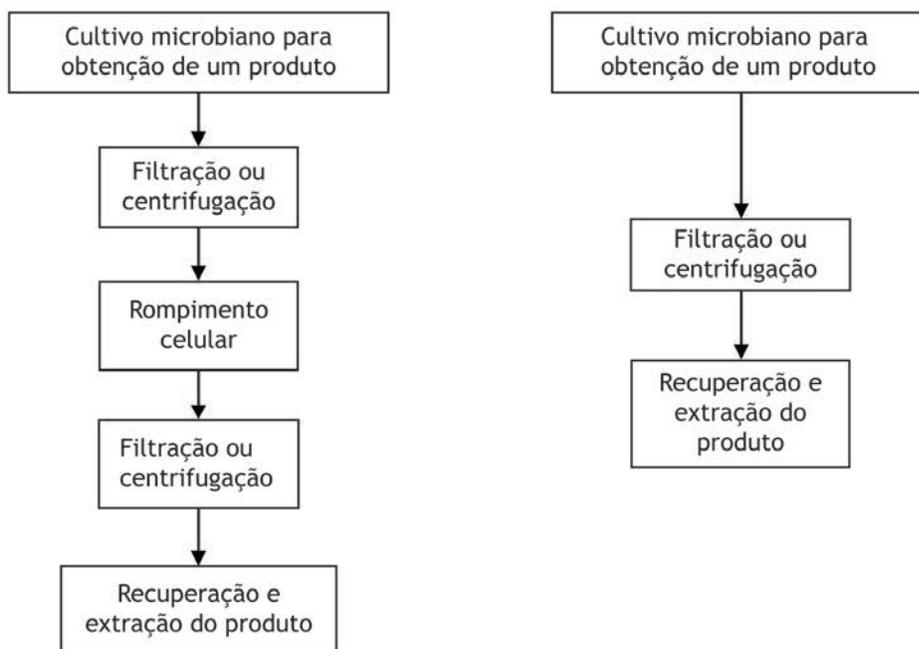


Figura 5 Etapas de separação e purificação de produtos intra e extracelular.

As técnicas desenvolvidas para a produção de penicilina, como a fermentação submersa, foram posteriormente aplicadas em outros antibióticos e também a diferentes produtos, de forma que os equipamentos sofreram uma espécie de padronização, com algumas adaptações dependendo das características de certos processos. Além disso, os equipamentos e operações empregados em diferentes processos fermentativos são similares aos de processos químicos. Por isso a Engenharia Bioquímica é baseada nos conceitos de operações unitárias e processos unitários da Engenharia Química, assim como em seus princípios estequiométricos, cinéticos e termodinâmicos. O caráter multidisciplinar da Biotecnologia Industrial ou da Engenharia Bioquímica está ilustrado na Figura 6, capa de uma das principais referências da área no Brasil (SCHMIDELL et al., 2001).

No entanto, é evidente que, apesar de características comuns entre as duas áreas, existem peculiaridades diferentes entre elas, de forma que a Engenharia Bioquímica ou a Microbiologia Industrial são encaradas como ramos especializados da Engenharia Química e da Engenharia de Alimentos. Como exemplos de operações unitárias comuns entre elas são citadas a mistura de três fases heterogêneas (microrganismos, meio e ar), transporte de massa (oxigênio do ar para o microrganismo) e transporte de calor (do meio de cultura para o ambiente). Transformações de matéria-prima em produtos por ação microbiológica possuem aspectos comuns sob o ponto de vista químico ou físico, fornecendo-nos a possibilidade de classificar os diferentes mecanismos de reação em processos unitários, como reduções, oxidações, conversões de substrato, transformações, hidrólises, polimerização, biossínteses complexas e formação de células. A Tabela 2 sintetiza uma comparação entre os processos químicos e biotecnológicos.

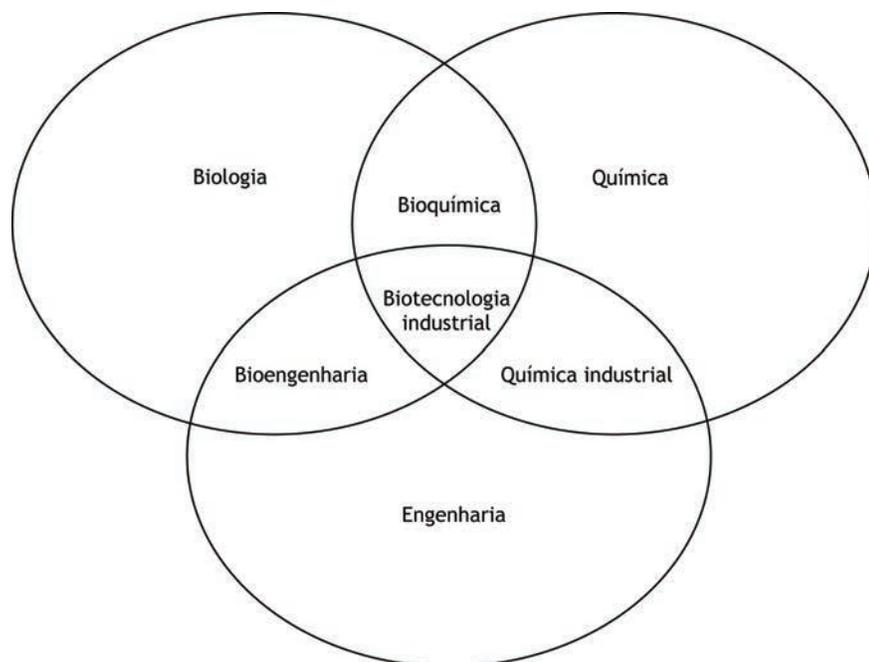


Figura 6 Multidisciplinaridade da Biotecnologia Industrial.

Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

Tabela 2 Comparação entre processos químicos e bioquímicos.

Características	Reator químico	Biorreator
Concentração, pressão	não diluída	diluída, baixa
Temperatura	-100 a 1200 °C	15 a 40 °C
Acidez, alcalinidade (valor de pH)	extremo	pequena faixa (3 a 8)
Taxa de reação	alta	baixa
Tempo de vida do catalizador	meses, anos	geralmente curto
Seletividade	frequentemente alta	moderada a baixo
Reator	sistemas pequenos e compactos	alto, volumoso
Produtividade	alta	baixa
Modo de operação	contínuos, especialidades descontínuos	descontínuos

1.1 Biomassa microbiana

O desenvolvimento da produção de biomassa microbiana é devido a dois processos: produção de leveduras de panificação e produção de células para alimentação humana e animal, as chamadas “proteínas unicelulares”.

As leveduras de panificação têm sido produzidas em larga escala desde 1900, para a alimentação humana na Alemanha, durante a Primeira Guerra Mundial. No entanto, o desenvolvimento das proteínas unicelulares se deu principalmente na década de 1970, utilizando hidrocarbonetos. No decorrer dos anos, esses processos foram tornando-se economicamente mais viáveis a partir do uso de resíduos industriais.

1.2 Enzimas microbianas

As enzimas são obtidas comercialmente a partir de plantas, células animais e de microrganismos. Entretanto, a produção por via microbiana apresenta diversas vantagens operacionais, com alguns exemplos de utilização apresentados na Tabela 3.

1.3 Metabólitos microbianos

O crescimento de uma cultura microbiana pode ser dividido em fases ou estágios. Após a incubação de uma quantidade inicial de microrganismos (inóculo) em um meio de cultivo com nutrientes, ocorre um período sem crescimento celular aparente, que é conhecido como fase de adaptação ou fase *lag*. Em seguida, temos uma fase em que a taxa de multiplicação celular aumenta até chegar num valor máximo, em que o crescimento é exponencial. Assim, essa fase é conhecida como fase exponencial ou fase *log*. Devido à concentração limitada de nutrientes, as células entram na chamada fase estacionária de crescimento. Essas fases podem ser tanto descritas pela cinética de crescimento celular quanto pela cinética de formação de produtos durante as diferentes fases de crescimento. Por exemplo, durante a fase de crescimento exponencial, as células produzem moléculas essenciais para o seu desenvolvimento, incluindo aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. Esses produtos são conhecidos como produtos primários do metabolismo, ou metabólitos primários. Muitos destes apresentam valor comercial, como pode ser verificado na Tabela 4.

Tabela 3 Aplicações comerciais de enzimas microbianas.

Setor industrial	Aplicação	Enzima	Fonte microbiana
Panificação	- redução da viscosidade das massas - aceleração da fermentação - melhora na textura	amilase/ proteases	fúngica/ bacteriana
Cervejaria	- mistura	amilase/ proteases	fúngica/ bacteriana
Chocolate	- produção de xaropes	amilase	fúngica/ bacteriana
Café	- fermentação dos grãos	pectinase	fúngica
Laticínios	- obtenção de hidrolisados proteicos - estabilização de leite evaporado	proteases/ lactase	fúngica/ bacteriana
Ovos	- remoção de glicose	glicose oxidase	fúngica
Sucos de frutas	- clarificação - remoção de oxigênio	pectinases glicose oxidase	fúngica
Farmacêutica	- auxiliares digestivos - anticoagulação sanguínea	amilase/ proteases estreptoquinase	fúngica/ bacteriana
Vegetais	- preparo de purês e sopas	pectinase, amilase e celulases	fúngica

Fonte: adaptada de Stanbury, Whitaker & Hall (2003).

Tabela 4 Alguns produtos do metabolismo primário de microrganismos e sua importância comercial.

Metabólito primário	Valor comercial
etanol	combustível, bebidas alcoólicas
ácido cítrico	indústria de alimentos
ácido glutâmico	flavorizante
lisina	suplemento alimentar
nucleotídeos	flavorizante
fenilalanina	precursor de aspartame, edulcorante
polissacarídeos	indústria de alimentos
vitaminas	suplementos

Durante a fase de desaceleração do crescimento e estacionária, os microrganismos produzem compostos que não apresentam uma função direta no metabolismo celular. Esses compostos são referenciados como metabólitos secundários, de grande ocorrência em microrganismos de crescimento lento. As relações entre metabolismo primário e secundário são apresentadas na Figura 7.

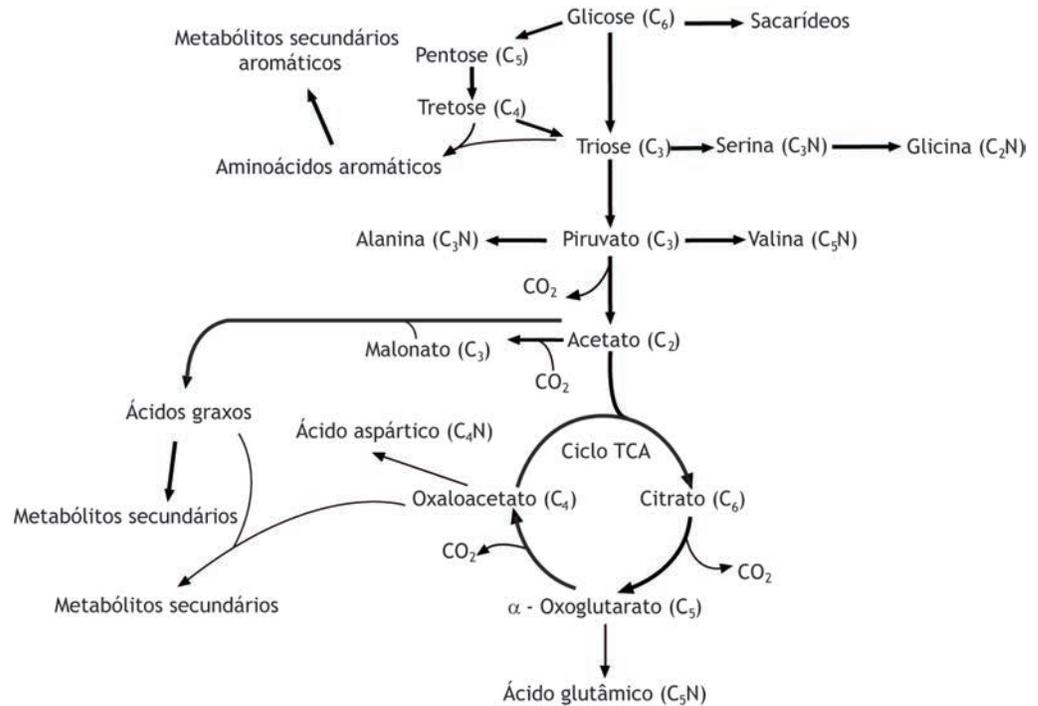


Figura 7 Inter-relações entre metabolismo primário e secundário.

As rotas metabólicas ilustradas podem ocorrer em diferentes microrganismos. É importante salientar que nem todos os microrganismos apresentam produção de metabólitos secundários, sendo mais comum em bactérias e fungos filamentosos. Além disso, muitas vezes é difícil categorizar determinados metabólitos como primários ou secundários, e a cinética de síntese de certos componentes pode variar com as condições de cultivo.

A função dos metabólitos secundários para as células ainda é discutível, apesar da sua importância tecnológica em muitos casos. Alguns metabólitos apresentam atividade antimicrobiana, são inibidores de enzimas, promotores de crescimento e apresentam propriedades farmacêuticas.

1.4 Produtos recombinantes

A tecnologia do DNA recombinante ampliou a gama de produtos obtidos por fermentação. Genes de outros organismos são introduzidos em células microbianas, que começam a sintetizar outras proteínas (proteínas heterólogas). Entre os microrganismos utilizados destacam-se *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e fungos filamentosos. Interferon, insulina, albumina do soro bovino, Fatores VIII e IX compreendem alguns dos produtos obtidos por organismos geneticamente modificados.

1.5 Biotransformação

Microrganismos podem ser usados para converter compostos a partir de outras estruturas para produtos de maior valor agregado. As células microbianas comportam-se como catalisadores quirais com grande especificidade posicional e estereoespecificidade. Assim, processos microbiológicos são mais específicos que processos químicos, promovendo modificações ou removendo grupos funcionais em locais específicos numa molécula complexa. As reações catalisadas incluem desidrogenação, oxidação, hidroxilação, desidratação e condensação, descarboxilação, aminação, deaminação e isomerização. Os processos microbianos têm ainda a vantagem sobre os processos químicos de operação em baixas temperaturas e pressões.

1.6 Microrganismos de interesse industrial

Microrganismos de interesse industrial podem ser obtidos a partir de recursos naturais, compra em coleções de culturas, obtenção de mutantes naturais, obtenção de mutantes induzidos por técnicas convencionais ou obtenção de microrganismos recombinantes.

O isolamento de microrganismos a partir dos recursos naturais (água, solo, plantas) é uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens de interesse industrial. É uma atividade que envolve muito trabalho experimental, com conseqüente custo elevado. Empresas de biotecnologia mantêm programas de isolamento de linhagens de recursos naturais com o objetivo de melhorar processos e encontrar novas linhagens produtoras de antibióticos e enzimas, por exemplo.

A compra em coleções de culturas é bastante usual, com destaque para as coleções de culturas do *Agricultural Research Service Culture Collection* nos EUA, conhecido como NRRL Culture Collection, e a Coleção de Culturas Tropical em Campinas-SP.

Quando as células se multiplicam, há sempre a possibilidade do surgimento de mutantes naturais, que podem ser isolados para verificar sua potencialidade de produção. A rigor, essas alterações naturais são indesejáveis durante um processo biotecnológico, mas eventualmente podem gerar novas linhagens industrialmente interessantes. Assim, são utilizadas técnicas de obtenção de mutantes, processos aleatórios de recuperação de células sobreviventes em meios ou condições específicas, muitas vezes estressantes.

Nas últimas décadas as técnicas de engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante trouxeram um imenso avanço nas possibilidades de se obter células mais produtivas ou na obtenção de produtos diferenciados. A introdução de fragmentos de DNA de certas células em outras, via vetores como plasmídeos, permite a obtenção de microrganismos engenheirados. Assim, essas técnicas têm sido utilizadas para a produção de proteínas heterólogas de alto valor agregado, por exemplo: produção de hormônio do crescimento humano, insulina, interferons e Fator VIII. Além de microrganismos dos gêneros *Saccharomyces*, *Escherichia*, *Bacillus* e *Aspergillus* como receptores de codificação genética, são usadas células animais para a produção de proteínas mais complexas.

De uma maneira genérica, visando aplicações industriais, as principais características desejáveis para os microrganismos seriam:

- elevada eficiência na conversão de substrato em produto;
- permitir a rápida liberação e acúmulo de produto no meio de cultivo, de forma a se obter em alta concentração;
- produção minimizada de substâncias incompatíveis com o processo;
- estabilidade quanto ao comportamento fisiológico;
- não ser patogênico;
- não exigir condições de processo muito complexas;
- não exigir meios de cultivo dispendiosos.

As células devem apresentar elevada conversão de substrato em produtos, uma vez que as matérias-primas incidem significativamente no custo do produto final. O acúmulo de produto no meio, sem sofrer inibição mais acentuada, é desejável para a redução nos custos de recuperação. Por exemplo, considerando a fermentação etanólica ilustrada pela equação química de conversão em anaerobiose da glicose em etanol e gás carbônico:



Podemos observar que o rendimento estequiométrico é 0,511, ou seja, cada grama de glicose geraria 0,511 gramas de etanol, sendo que as leveduras normalmente utilizadas nesse processo costumam apresentar rendimentos na ordem de 90%. Obviamente não se consegue uma fermentação etanólica com 100% de rendimento porque as células se proliferam, o que leva à síntese de muitos compostos intermediários. Além disso, sabe-se que quando se atinge 8-10% de etanol no meio de cultivo já ocorre a inibição das leveduras pelo produto e a velocidade de conversão fica prejudicada.

A estabilidade do microrganismo é uma das questões mais importantes para sua aplicação industrial, fato que muitas vezes deve ser visto com cuidado para microrganismos engenheirados. Um potencial problema desses microrganismos é a perda ou inativação dos plasmídeos, uma vez que a velocidade das células sem estes pode ser maior do que a das células engenheiradas, o que leva a um aumento de uma população de microrganismos sem a propriedade desejada.

Referências

SCHMIDELL, W. et al. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford: Butterworth Heinemann, 2003. 357 p.

UNIDADE 2

Metabolismo microbiano e biomoléculas
envolvidas

2.1 Enzimas

As enzimas são geralmente proteínas com alta massa molar (de 15000 a milhões de Da) que apresentam ação catalítica. Algumas moléculas de RNA também aceleram biorreações, sendo chamadas de *ribozimas* ou *RNAses*. Entretanto, a maioria das reações de ocorrências nas células é mediada por catalisadores proteicos. As enzimas são específicas, versáteis e catalisadores efetivos, aumentando em muitas vezes as taxas de reações, se comparadas com catalisadores químicos, mesmo em condições ambiente. Por exemplo, a catalase encontrada no fígado e nos glóbulos vermelhos do sangue é capaz de catalisar a transformação de 5 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por minuto. Essa característica é muito útil nos processos industriais, uma vez que são formadas quantidades mínimas de produtos secundários, o que representa benefícios econômicos e ambientais.

Apesar das enzimas terem sido empiricamente utilizadas pelo homem há milênios, o interesse científico que conduziu sua identificação e caracterização iniciou-se em meados do século passado. Em virtude do interesse pelo entendimento da fisiologia humana e por serem as enzimas do trato digestivo mais facilmente acessíveis, foram estas as primeiras enzimas cuja ação foi verificada. Assim, em 1783, Lazzaro Spallanzani demonstrou que o suco gástrico degradava carne *in vitro*. Posteriormente, em 1836, Theodor Schwann denominou pepsina a substância presente nesse fluido biológico. A história da bioquímica está em grande parte associada às pesquisas com enzimas, com destaque aos trabalhos desenvolvidos por Wilhelm Friedrich Kühne sobre enzimas proteolíticas. A palavra “enzima” foi sugerida por Kühne no seu primeiro trabalho como nome genérico para “fermentos” (*én*: na; *zymos*: levedura). Anos mais tarde as enzimas eram relacionadas aos chamados “fermentos não organizados”, que seriam distintos dos “fermentos organizados”, característicos dos processos fermentativos. Assim, supõe-se que Kühne já distinguiu as células de microrganismos responsáveis pelos processos fermentativos dos sistemas responsáveis pelas transformações bioquímicas que ocorrem na ausência de células. Louis Pasteur, mais de 150 anos depois, identificou os microrganismos responsáveis pelas fermentações associando os chamados “fermentos organizados” à atividade enzimática. Mesmo assim, o conceito de que a fermentação dependia da existência de células vivas perdurou até 1897, quando Büchner publicou o trabalho *Sobre a fermentação alcoólica na ausência de células de levedura* e demonstrou que os extratos microbianos eram capazes de fermentar açúcar a álcool, atuando de maneira semelhante às células vivas. Essa descoberta foi um marco na história da bioquímica e valeu a Büchner a atribuição do Prêmio Nobel de Química em 1907, encorajando diversas pesquisas e estudos sobre extração e caracterização de enzimas.

Com relação à tecnologia enzimática, a tripsina estudada por Kühne em 1876 foi utilizada em 1908 por Otto Röhn no tratamento de couro e em 1913 na formulação de detergentes. Dois anos antes, Emil Christian Hansen extraiu a renina com uma solução salina a partir de estômagos secos de bezerras, atividade esta que correspondeu à primeira preparação enzimática minimamente purificada usada com fins industriais, para produção de queijo. Antes disso, a diastase foi extraída do malte por Anselme Payen em 1833.

Embora alguns biocatalisadores sejam até hoje extraídos de tecidos animais e vegetais, a grande maioria das enzimas industriais é obtida de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (conforme já apresentado na Tabela 3). A produção industrial de enzimas envolve processos de fermentação submersa ou em estado sólido para o cultivo dos microrganismos. No caso dos processos submersos, o mosto fermentado é centrifugado ou filtrado para a recuperação das enzimas presentes no sobrenadante das culturas, ainda que em alguns casos as moléculas-alvo estejam localizadas nas células. No caso dos processos em estado sólido, os biocatalisadores são extraídos da massa de sólido fermentado.

Atualmente diversas preparações enzimáticas, incluindo misturas de biocatalisadores, encontram-se disponíveis no mercado em diferentes graus de pureza. Os produtos comerciais abrangem desde aqueles de custo baixo e disponibilizados em alto volume, tais como o malte (fonte de amilases), até preparações de elevado custo e altamente purificadas, com finalidade analítica, científica e médica. O mercado mundial de enzimas aumenta cerca de 6% ao ano, atingindo US\$ 5 bilhões em 2009. Um dos grandes motivos para esse crescimento é a questão ambiental e a busca por tecnologias mais limpas e eficientes, que vem sugerindo a tecnologia enzimática como alternativa para a substituição gradual dos processos químicos convencionais.

Mais de 2000 enzimas são conhecidas e catalogadas. As enzimas são nomeadas adicionando-se o sufixo ase ao final do nome do substrato (uréase) ou então à reação catalisada (álcool desidrogenase). A Enzyme Commission, em 1961, estabeleceu uma nomenclatura baseando-se nos tipos de reações catalisadas (Tabela 5).

Certas enzimas apresentam uma estrutura simples, correspondendo a uma cadeia polipeptídica, como é o caso de diversas enzimas hidrolíticas. No entanto, várias enzimas apresentam mais de uma unidade e algumas exigem um grupamento não proteico para desempenhar sua atividade catalítica. Esse grupo é chamado “cofator” no caso de íons metálicos (*Mg*, *Zn*, *Mn*, *Fe*) ou coenzimas no caso de moléculas orgânicas (*NAD*, *FAD*, *CoA*, *vitaminas*). Uma enzima que contenha um grupo não proteico é chamada “holoenzima”, sendo a parte proteica chamada de “apoenzima” (holoenzima = apoenzima + cofator). Enzimas

que apresentam diferentes formas moleculares mas catalisam a mesma reação são chamadas de “isoenzimas”.

As enzimas agem em reações biológicas baixando a energia de ativação pela ligação com o substrato e pela formação de um complexo enzima-substrato, não alterando a constante de equilíbrio químico (Figura 8). Os aspectos moleculares da interação enzima-substrato ainda não são completamente entendidos. Estudos com raios X revelam a presença do complexo enzima-substrato mantido por forças de van der Waals e pontes de hidrogênio. O substrato liga-se num local específico da molécula enzimática chamado “sítio ativo”. O substrato corresponde a uma molécula relativamente pequena em relação à enzima e ajusta-se a certa região. O modelo mais simples dessa interação é chamado de “modelo chave-fechadura” (Figura 8). Nas enzimas que catalisam transformação de múltiplos substratos, as ligações ocorrem próximas umas das outras, provocando o “efeito de proximidade”. Além disso, as enzimas podem ligar-se a substratos em certas posições e ângulos tornando possível a reação, conhecida como “efeito de orientação”. Em outros casos ainda, a formação do complexo enzima-substrato causa ligeiras modificações na estrutura tridimensional da enzima e esse ajuste induzido pode influenciar a ação catalítica da enzima. Sendo assim, estabelece-se que não apenas a estrutura primária das enzimas afeta a catálise, mas fundamentalmente as suas estruturas secundária, terciária e quaternária.

Tabela 5 Classes de enzimas e tipos de reações catalisadas.

Classe da Enzima	Tipo de reação
1. <i>oxidorreductases</i>	Redução-oxidação: oxigenação de ligações de <i>C-H</i> , <i>C-C</i> , <i>C=C</i> ; ou remoção total ou adição de equivalentes de átomos de hidrogênio
2. <i>transferases</i>	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, açúcar, fosfato ou metila
3. <i>hidrolases</i>	Hidrólise: formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas anidridos, glicosídeos, organohaletos
4. <i>liases</i>	Adição-eliminação de pequenas moléculas nas ligações <i>C=C</i> , <i>C=N</i> , <i>C=O</i>
5. <i>isomerases</i>	Isomerização, epimerização, rearranjos
6. <i>ligases</i>	Formação-clivagem de ligações <i>C-O</i> , <i>C-S</i> , <i>C-N</i> , <i>C-C</i> com concomitante clivagem de trifosfato

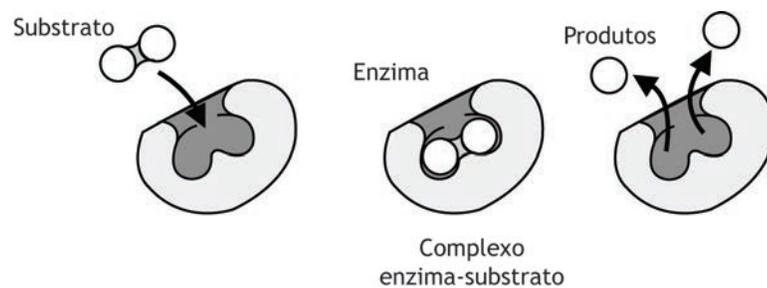


Figura 8 Esquema de modelo chave-fechadura da catálise enzimática.

2.2 Metabolismo microbiano

Várias classes de organismos produzem diferentes produtos como resultado do seu metabolismo. As diferenças metabólicas podem ser parcialmente atribuídas às diferenças de estágio de evolução (diferenças genéticas) e em relação ao meio ambiente. Mesmas espécies podem produzir diferentes moléculas quando cultivadas sob diferentes condições de cultivo e nutrientes. O controle das vias metabólicas pela regulação de nutrientes e condições de processo é uma importante consideração na engenharia de bioprocessos. Como exemplo clássico, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz etanol em anaerobiose e produz biomassa quando é fornecido oxigênio. Em condições aeróbias e altas concentrações de açúcares há produção de etanol, o que sugere que o metabolismo não é regulado apenas pelo oxigênio (Efeito *Crabtree*).

As principais vias metabólicas são agrupadas em aeróbias e anaeróbias. Há dois conceitos em discussão: catabolismo, ou seja, processo intracelular de degradação de compostos formando produtos mais simples como glicose, CO_2 e H_2O , produzindo energia para as células; e anabolismo, síntese de compostos mais complexos com exigências energéticas.

Células vivas exigem energia para biossíntese, transporte de nutrientes, mobilidade e manutenção. A energia é obtida a partir do catabolismo de compostos de carbono, principalmente carboidratos. Os carboidratos são sintetizados a partir de CO_2 e H_2O na presença de luz pela fotossíntese. As reações metabólicas podem ser classificadas em três grandes categorias, representadas pela Figura 9: (I) degradação de nutrientes; (II) biossíntese de pequenas moléculas; (III) biossíntese de macromoléculas. Essas reações são categorizadas didaticamente dessa forma, mas ocorrem simultaneamente nas células. Como resultado das reações metabólicas, os produtos são formados e liberados pelas células, consistindo em ácidos orgânicos, aminoácidos e antibióticos, que apresentam valor comercial.

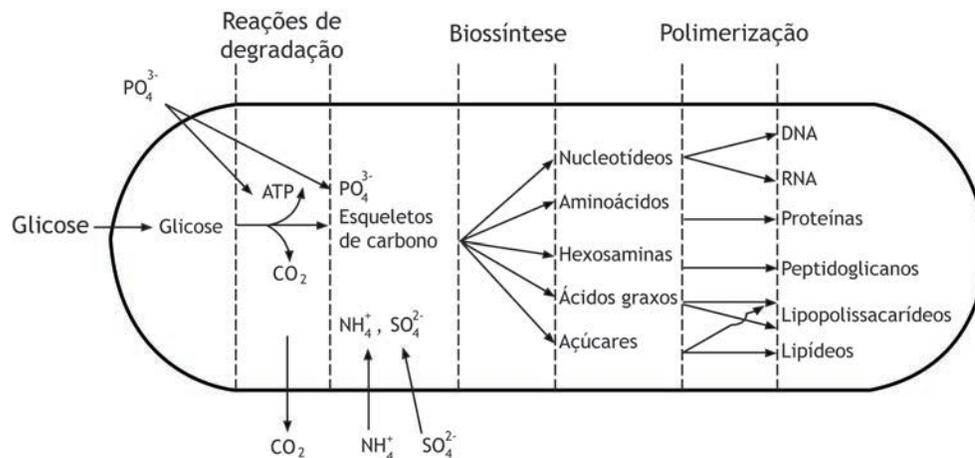
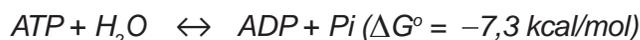
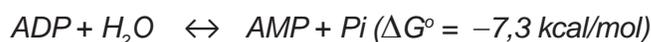


Figura 9 Diagrama esquemático de reações que ocorrem nas células microbianas.
 Fonte: adaptada de Shuler & Kargi (1992).

A energia nos sistemas biológicos é armazenada e transferida via adenosina trifosfato (*ATP*), que contém ligações de fosfato altamente energéticas. A forma ativa do *ATP* é complexada com Mg^{2+} . A energia livre padrão para hidrólise de *ATP* é 7,3 kcal/mol. A energia liberada pelas células pode ser substancialmente maior, uma vez que a concentração de *ATP* é frequentemente muito maior que a de *ADP*.



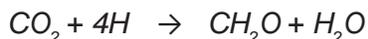
A energia biológica é armazenada em *ATP* por reversíveis ligações para formar *ATP* a partir de *ADP* e *Pi*. Similarmente, *ADP* dissocia-se:



Compostos análogos ao *ATP* são usados em menor escala para armazenar e transferir energia via ligações fosfato, tais como guanosina trifosfato (*GTP*), uridina trifosfato (*UTP*) e citidina trifosfato (*CTP*). Os compostos com ligações fosfato produzidos durante o metabolismo, tais como fosfoenol piruvato 1,3 difosfoglicerato, transferem seus grupamentos fosfato para *ATP*. A energia armazenada no *ATP* é depois transferida para compostos de menor energia, como glicose 6-fosfato e glicerol 6-fosfato.

Os átomos de hidrogênio liberados nas biorreações de oxirredução são carregados por nucleotídeos derivativos, especialmente a nicotinamida adenina dinucleotídeo (*NAD⁺*) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (*NADP⁺*). As reações de oxirredução são prontamente reversíveis. *NADH* pode doar elétrons a certos compostos e aceitar de outros, dependendo do potencial de oxirredução dos compostos. *NADH* tem duas funções principais nos sistemas biológicos:

- Poder redutor: *NADH* e *NADPH* fornecem hidrogênio para as reações, como a fixação de CO_2 por organismos autotróficos:



- Formação de *ATP* no metabolismo respiratório: os elétrons (átomos de hidrogênio) carreados por *NADH* são transferidos para o oxigênio via uma série de compostos intermediários (cadeia respiratória). A energia liberada pelo transporte de elétrons resulta na formação de moléculas de *ATP*. Além disso, *ATP* pode ser formado a partir do poder redutor de *NADH* na ausência de oxigênio se um acceptor de elétrons alternativo estiver disponível, como o NO_3^- .

2.2.1 Glicólise e Ciclo TCA

A glicose é a principal fonte de carbono e energia para os organismos. Diversas vias metabólicas podem ser usadas por diferentes microrganismos para o catabolismo da glicose, sendo que a principal é a “Glicólise” ou “Via Embden-Meyerhof-Parnas (*EMP*)”, podendo ser citadas ainda as vias “hexose monofosfato (*HMP*)” e “Entner-Doudoroff (*ED*)”. O catabolismo aeróbio de compostos orgânicos como a glicose compreende três diferentes fases:

1. Via *EMP* para fermentação da glicose a piruvato;
2. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou Ciclo de Krebs (Ciclo *TCA*) para conversão de piruvato a CO_2 e *NADH*;
3. Cadeia respiratória ou cadeia de transporte de elétrons para formação de *ATP* por transferência de elétrons do *NADH* a um acceptor.

Na fase final, ou respiração, as variações no grau de redução dos compostos são usadas para gerar energia (*ATP*). A respiração pode ser aeróbia ou anaeróbia, dependendo do acceptor final de elétrons. Se o oxigênio é usado como último acceptor, a respiração é chamada aeróbia. Quando outros aceptores de elétrons (NO_3^- , SO_4^{-2} , Fe^{+3} , Cu^{+2}) são usados, é chamada de respiração anaeróbia.

A glicólise resulta na quebra da glicose em duas moléculas de piruvato. A sequência de reações e as enzimas envolvidas são apresentadas na Figura 10.

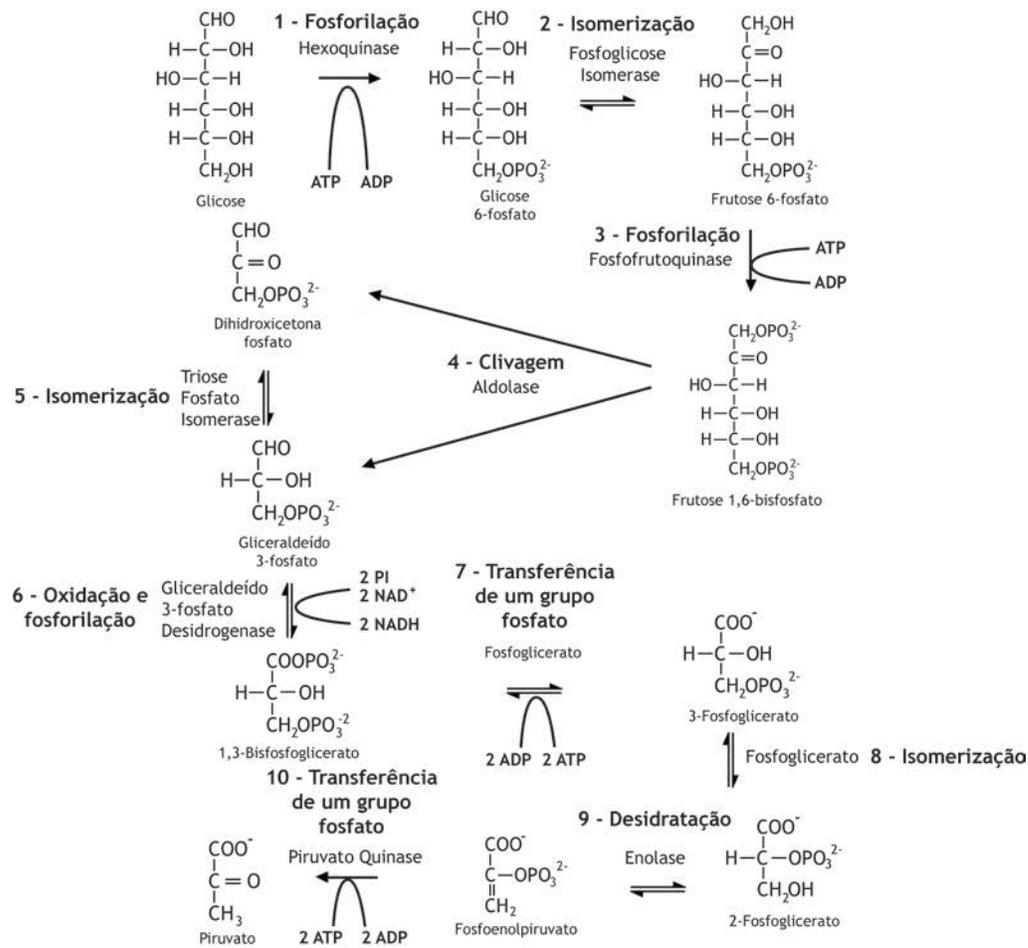
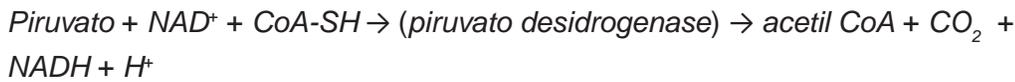


Figura 10 Reações envolvidas na quebra da glicose, na glicólise.

Quando fosfoenol piruvato é desfosforilado a piruvato pela ação da piruvato quinase, há formação de duas moléculas de *ATP*, já que ocorre a formação de duas moléculas de piruvato para cada molécula de glicose. O piruvato como produto final da glicólise é peça chave para o metabolismo. Em condições anaeróbias, o piruvato pode ser transformado em ácido láctico, etanol, acetona, butanol e ácido acético por conversões anaeróbias conhecidas como fermentação. Esse termo, no entanto, é usado geralmente para designar quaisquer conversões enzimáticas e microbianas. Em condições aeróbias, o piruvato é convertido a CO_2 e *NADH* no ciclo *TCA*. O balanço global da glicólise é:



O ganho líquido de *ATP* na glicólise é 2 mols de *ATP/glicose*. O piruvato produzido na via *EMP* transfere o seu poder redutor para *NAD*⁺ via Ciclo de Krebs. A glicólise ocorre no citoplasma, enquanto o local para o Ciclo de Krebs é a mitocôndria, nos eucariotos. Nos procaríotos, essas reações estão associadas a enzimas ligadas às membranas. A entrada no Ciclo de Krebs ocorre pela ailação da coenzima A pelo piruvato:



Acetil CoA é transferido através da membrana mitocondrial via conversão dos NADHs produzidos na glicólise para 2 FADH. As reações envolvidas no Ciclo de Krebs são apresentadas na Figura 11.

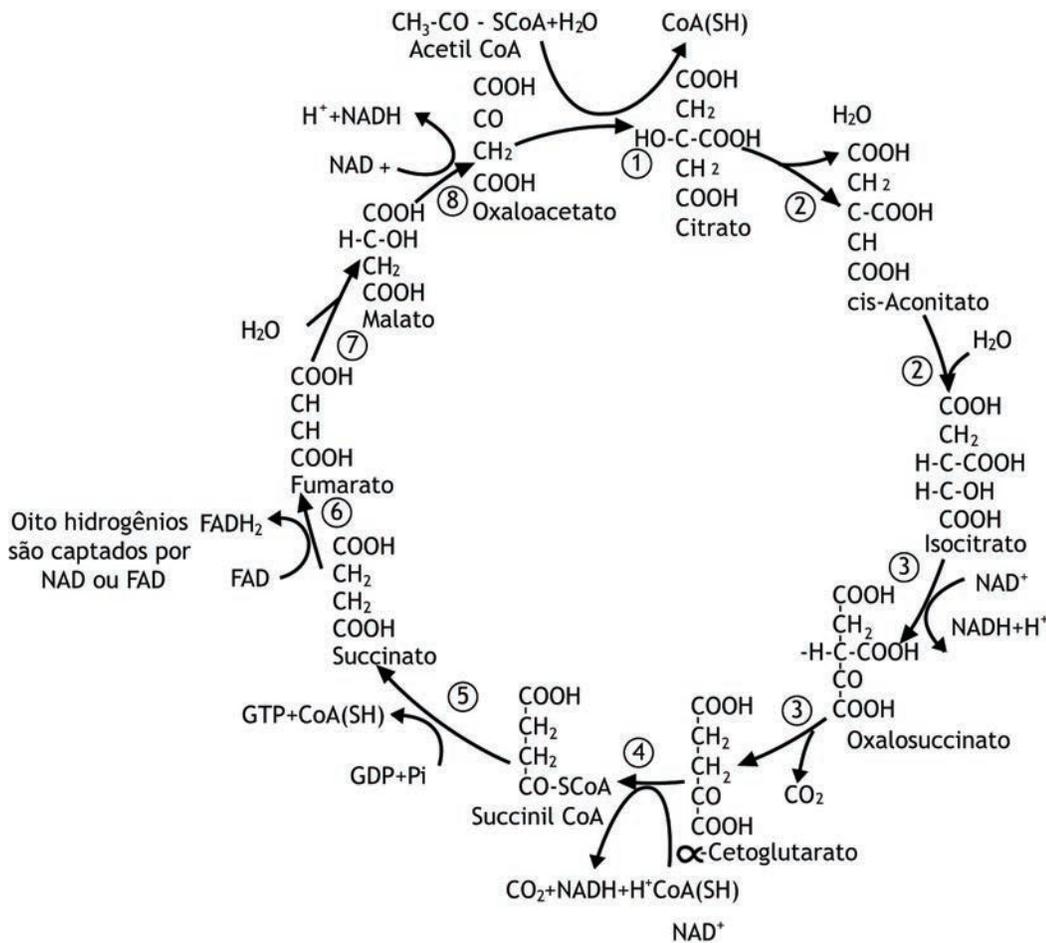
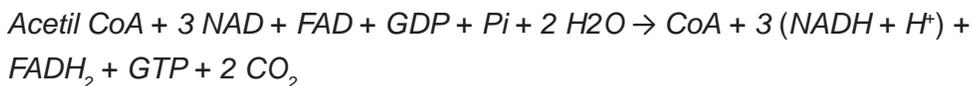


Figura 11 Ciclo de Krebs.

A condensação de acetil CoA com ácido oxalacético resulta em ácido cítrico. Para cada molécula de piruvato que entra no ciclo, dois CO₂, três (NADH + H⁺) e um FADH₂ são produzidos. Os redutores produzidos (NADH + H⁺ e FADH₂) são usados para geração de ATP na cadeia de transporte de elétrons. A reação global do Ciclo de Krebs é:



As principais funções do Ciclo *TCA* são:

- providenciar elétrons (*NADH*) para a cadeia de transporte de elétrons e biossíntese;
- fornecer esqueletos de carbono para a síntese de aminoácidos;
- gerar energia.

2.2.2 Respiração

A sequência de reações da respiração é conhecida como “cadeia de transporte de elétrons” e o processo de formação de *ATP* é conhecido como “fosforilação oxidativa”. Os elétrons do *NADH + H⁺* e *FADH₂* são transportados para o oxigênio e *ATPs* são formados (2 *ATPs* para cada *NADH + H⁺* e 1 *ATP* para cada *FADH₂* nos eucariotos). Os detalhes da cadeia respiratória são apresentados na Figura 12.

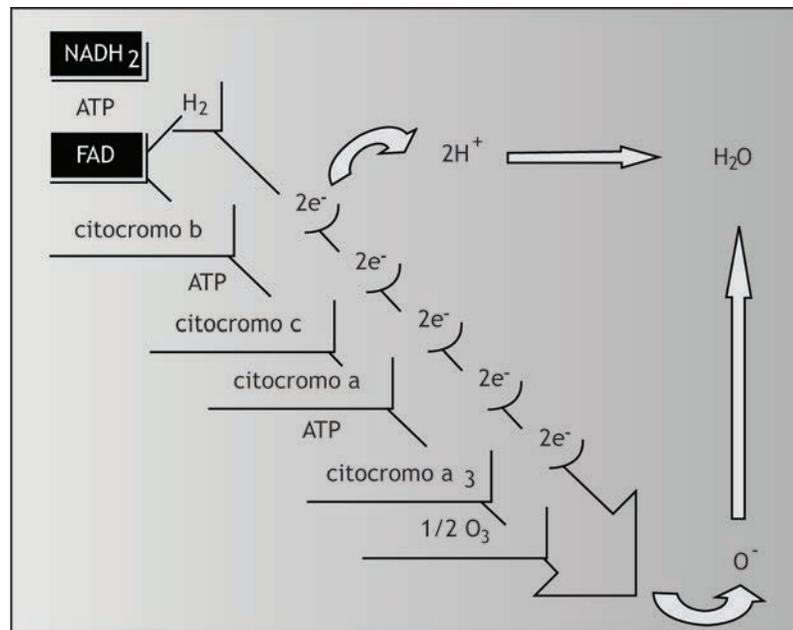


Figura 12 Cadeia de transporte de elétrons.

As maiores funções da cadeia de transporte de elétrons são regenerar os *NADH* reduzidos para a glicólise e produzir *ATPs* para a biossíntese celular. Na reação global, assumindo 3 *ATP/NADH* durante o catabolismo aeróbio de glicose em eucariotos, temos:



A energia de 36 mols de *ATP* é 263 kcal/mol de glicose. A energia livre da oxidação direta de glicose é 686 kcal/mol. Assim, a eficiência da glicólise é de 38% em condições padrão. A energia remanescente é dissipada como calor. Em procariotos, a conversão dos redutores em *ATP* é menos eficiente, sendo gerados normalmente menos que dos *ATP* por *NADH + H⁺*.

2.2.3 Metabolismo anaeróbio

A produção de energia na ausência de oxigênio apresenta como principal diferença o uso de um aceptor de elétrons alternativo. Como exemplo, temos o uso de nitrato em processos chamados de nitrificação. Muitos organismos crescem sem utilizar cadeia de transporte de elétrons, em processos fermentativos. Sem transporte de elétrons, um substrato orgânico é utilizado para balancear as séries de reações de oxirredução. Esse contraste exige que as taxas de conversão de *NAD⁺* e *NADP⁺* para *NADH* e *NADPH* devem ser iguais às taxas de conversão do sentido inverso da reação. As duas moléculas de *NAD* reduzido formadas na via *EMP* são reoxidadas para oxidação de piruvato a outros produtos como etanol e ácido láctico, entre outros bioprodutos comercialmente importantes.

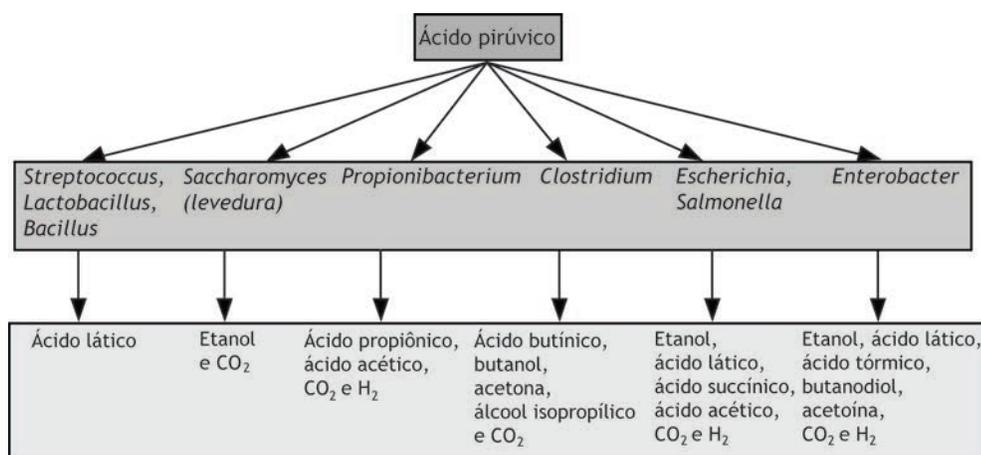


Figura 13 Produtos finais da fermentação microbiana de açúcares.

Piruvato é o metabólito chave, formado normalmente pela glicólise. No entanto, outras vias alternativas para produção de piruvato podem ocorrer, como a “Via Entner-Doudoroff”, na bactéria *Zymomonas* (Figura 14).

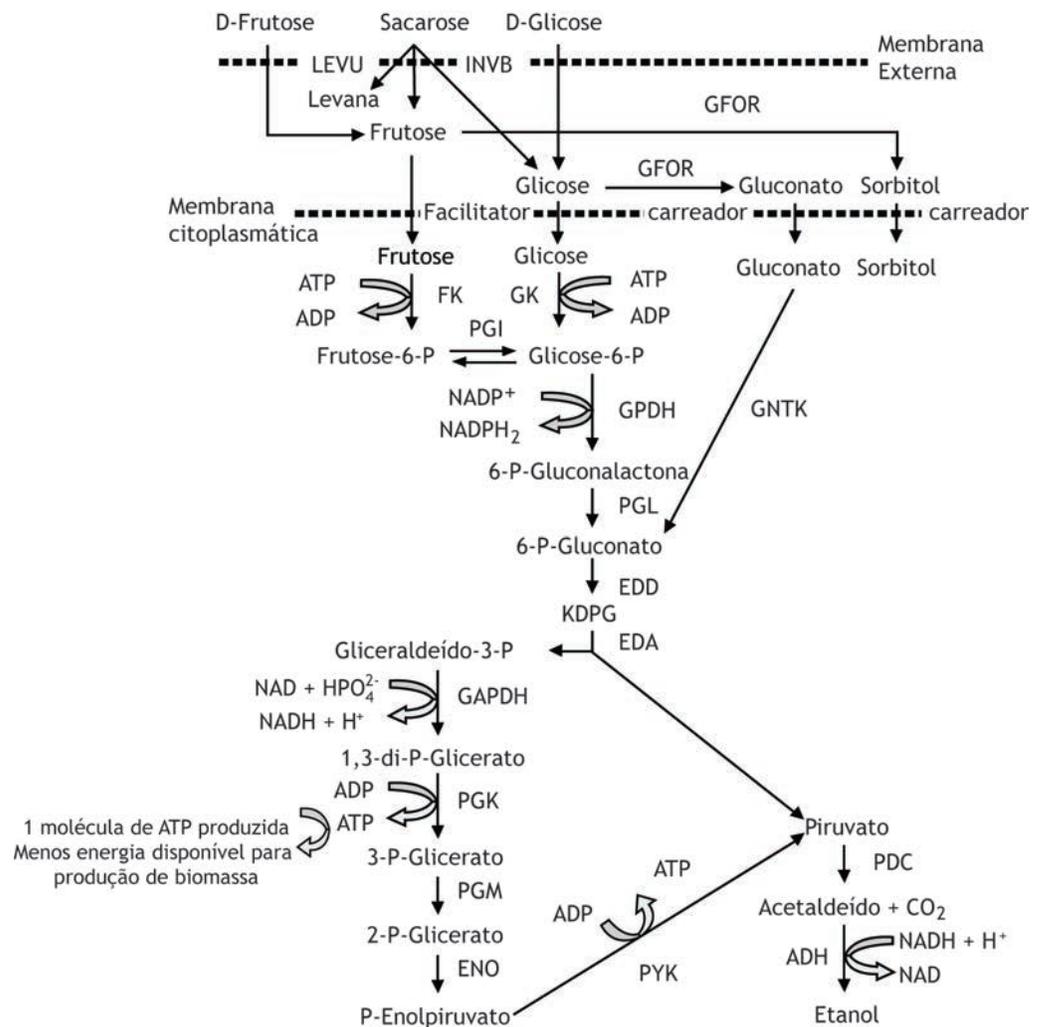


Figura 14 Metabolismo de carboidrato por *Zymomonas mobilis*.

Fonte: adaptada de Bai, Anderson & Moo-Young (2008).

Z. mobilis produz etanol a partir de glicose pela Via Entner-Doudoroff (ED) em conjunção com enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase. Diferentemente da via *EMP*, há formação de gliceraldeído 3-fosfato e piruvato a partir da clivagem de 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato pela 2-ceto-3-deoxi-gluconato aldolase, rendendo apenas uma molécula de *ATP* por molécula de glicose. Como consequência, *Z. mobilis* produz menos biomassa do que *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras, por sua vez, produzem etanol via glicólise (*EMP*), com formação de duas moléculas de piruvato (Figura 16). Em condições anaeróbias, o piruvato é reduzido para etanol com liberação de CO_2 . Teoricamente, o rendimento é 0,511 para etanol e 0,489 para CO_2 em relação à massa de glicose metabolizada. Dois *ATPs* são produzidos pela glicólise e utilizados para biossíntese das células de leveduras. A produção de etanol é vinculada ao crescimento das células, e sem o consumo contínuo de *ATP* para o crescimento celular o metabolismo glicolítico seria interrompido pelo acúmulo intracelular de *ATP*, inibindo a fosfofrutoquinase.

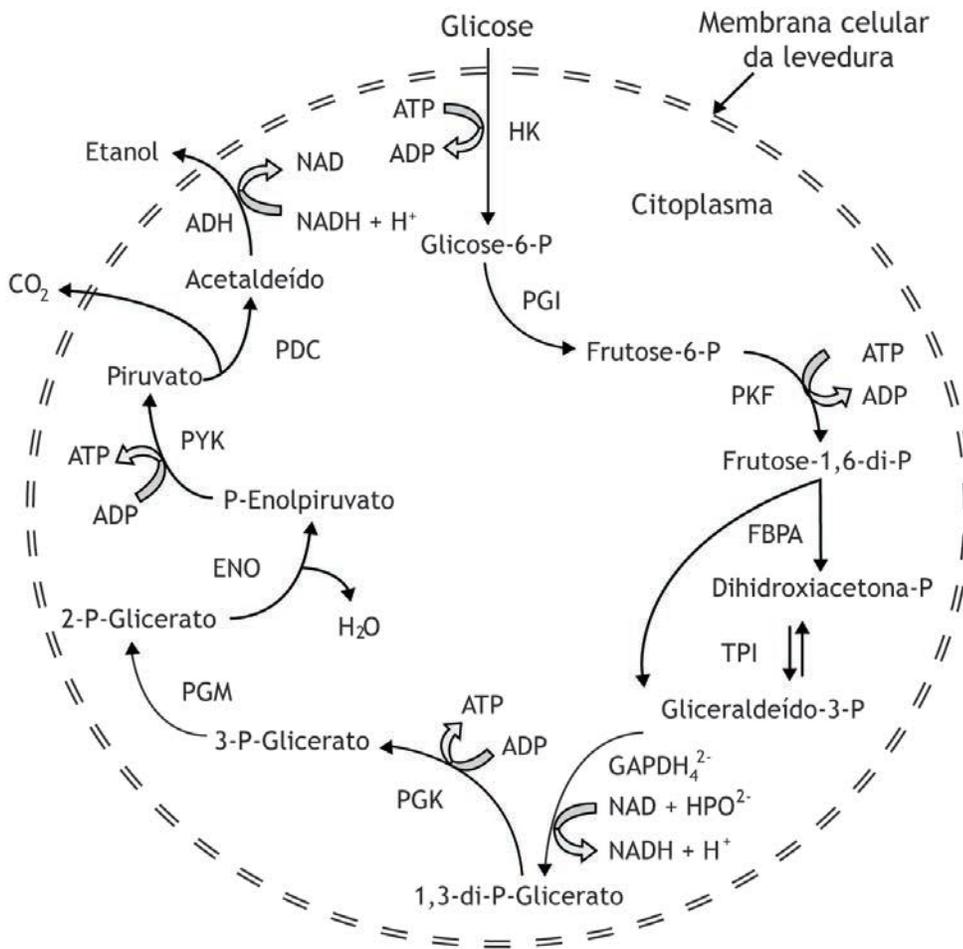


Figura 15 Vias metabólicas da fermentação etanólica por *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: adaptada de Bai, Anderson & Moo-Young (2008).

Referências

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 89-105, 2008.

SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 477 p.

UNIDADE 3

Cinética enzimática

O estudo da cinética das reações enzimáticas é fundamental para o entendimento dos processos fermentativos e dos que envolvem o crescimento de microrganismos, visto que o metabolismo microbiano consiste em uma série de reações enzimáticas. As células dos microrganismos são sensíveis às modificações de temperatura e pH, devido, especialmente, às propriedades das enzimas, que são dependentes desses parâmetros.

As enzimas são proteínas sintetizadas pelas células com alta especificidade e propriedades catalíticas, que atuam diminuindo a energia de ativação dos reagentes, acelerando as taxas de reação sem afetar a constante de equilíbrio e sem serem consumidas. As enzimas catalisam reações biológicas, que apresentam alta barreira energética entre reagentes e produtos e que dificilmente ocorreriam à temperatura e pressão ambiente. Com a sua atuação, o equilíbrio é atingido rapidamente mesmo em temperaturas relativamente baixas.

As enzimas podem ser obtidas a partir de células animais, vegetais e de microrganismos. A atividade catalítica de uma enzima secretada por determinadas células ou isolada das mesmas pode ser mantida sob condições adequadas, o que permite sua utilização como biocatalisador fora das células. Em processos biotecnológicos, as enzimas são utilizadas para catalisar a produção de compostos de interesse, sendo que ao final do processo podem ser recuperadas.

A alta especificidade das enzimas pelos seus substratos é consequência da presença dos chamados “sítios ativos” constituídos por resíduos de aminoácidos, que são locais específicos onde ocorre a ligação da enzima com o substrato para a formação do intermediário instável “Complexo Enzima-Substrato (*ES*)”, fundamental para a formação dos produtos. Algumas enzimas apresentam mais de um sítio ativo na mesma molécula e a formação de *ES* pode ocorrer por meio de múltiplas interações, como pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. De acordo com a Figura 16, as enzimas frequentemente necessitam de cofatores, compostos não proteicos que combinam com a enzima em estado inativo (apoenzimas) para formar um complexo cataliticamente ativo (holoenzima). Como exemplo para esse fenômeno, podemos citar a necessidade de cofatores (íons metálicos) como Zn^{2+} para a ativação da enzima álcool desidrogenase e Fe^{2+} para a catalase. Além disso, existem enzimas que necessitam de moléculas orgânicas complexas chamadas de coenzimas (*NAD*, *FAD*, coenzima *A*).

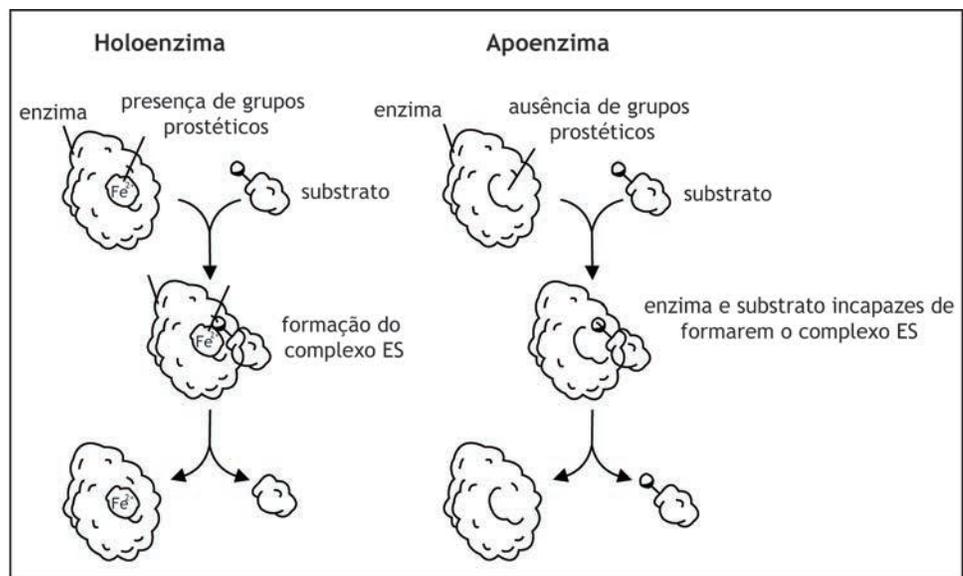


Figura 16 Participação de cofatores e coenzimas (grupos prostéticos) nas reações enzimáticas.

As reações enzimáticas diferem das reações químicas catalisadas por catalisadores inorgânicos em vários aspectos, entre os quais podemos citar:

- as velocidades de reação são mais elevadas – reações catalisadas por uma enzima podem ser 10^6 a 10^{12} vezes mais rápidas que uma reação não catalisada e várias ordens de grandeza mais rápidas que uma reação catalisada por um catalisador inorgânico;
- condições de reação – as reações catalisadas por enzimas ocorrem em condições relativamente suaves, ou seja, temperaturas abaixo dos $100^\circ C$, pressão atmosférica e pH próximo da neutralidade, enquanto a catálise química frequentemente exige temperaturas e pressões elevadas e valores de pH extremos;
- elevada especificidade – as enzimas têm uma especificidade de reação muito maior com relação aos reagentes (chamados de “substratos”) e produtos do que os catalisadores químicos, levando a raras formações de produtos secundários;
- enzimas são biodegradáveis e atóxicas;
- capacidade de regulação – a atividade enzimática responde a variações na concentração de compostos diferentes dos substratos, com mecanismos de regulação que incluem o controle alostérico, a modificação covalente das enzimas e a variação nas quantidades de enzima sintetizada.

A quantidade de enzima presente ou ativa em um processo é de quantificação complicada em termos absolutos, por exemplo, em massa (gramas, miligramas), já que a pureza é frequentemente baixa e pode existir certa proporção da enzima em estado inativo. Assim, a atividade da enzima é o parâmetro mais relevante. Essa atividade é usualmente medida em termos de unidades de atividade (U ou UI), que é definida como a quantidade que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto em condições de pH e temperatura ótimas. Assim, como a atividade de uma enzima é claramente mais importante em termos de processo, as enzimas são comercializadas em termos de atividade (UI) ao invés de massa (gramas), ou então pela atividade específica (UI/kg de proteína).

3.1 Cinética de Michaelis-Menten

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten, baseando-se no conceito da formação do complexo *ES* (enzima-substrato) como intermediário do processo de catálise enzimática introduzido em 1882, propuseram uma equação para a velocidade das reações enzimáticas. Para chegarem a essa equação, os pesquisadores observaram que:

- a velocidade de uma reação enzimática depende da concentração dessa enzima;
- a concentração de substrato é um dos fatores que mais afetam a velocidade das reações enzimáticas, de modo que, fixando-se a concentração de enzima e variando-se a concentração de substrato, observa-se o seguinte comportamento:

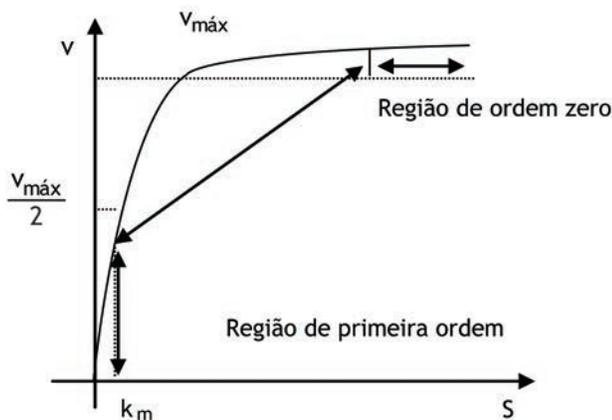


Figura 17 Relação entre concentração de substrato e velocidade da reação enzimática.

A primeira parte da curva representa uma condição em que o aumento na concentração de substrato implica em um aumento da velocidade da reação, sempre que ocorram no meio as condições padrão de trabalho para a enzima. A estabilidade que ocorre na segunda parte da curva significa que a concentração de substrato não é mais o fator limitante, já que seu aumento não acarreta aumento na velocidade de reação. Inicialmente têm-se uma reação de primeira ordem e depois uma reação de ordem zero, que independe da concentração de substrato. Esse comportamento pode ser explicado em termos da formação do complexo *ES*. Quando a concentração de substrato é baixa, nem todas as moléculas de enzima estão combinadas com o substrato, portanto, um máximo de velocidade pode ser encontrado para cada quantidade de enzima. Se a concentração de substrato é alta, todas as moléculas de enzima estarão complexadas com o substrato, ou seja, os sítios ativos da enzima começam a ficar saturados e, para cada molécula de produto formado, só uma molécula de substrato é ligada à enzima – isso significa que a velocidade da reação é constante.

Esse comportamento cinético foi proposto em 1913 por Michaelis-Menten, que postularam que a enzima se complexa reversivelmente com o substrato para formar *ES*. De acordo com esses pesquisadores, o modelo cinético representado pela Figura 17, para uma reação enzimática simples, está demonstrado a seguir, em que *E* é a molécula enzimática, *S* é o substrato, *ES* é o complexo enzima-substrato, *P* é o produto, e *k* são as constantes de cada reação.



Segundo Michaelis-Menten, quando enzima e substrato são postos em contato, a formação do complexo *ES* é imediata e este imediatamente se rompe, havendo a formação do produto e a liberação da enzima livre. Para chegar ao modelo matemático, Michaelis-Menten assumiram que:

- como o estudo se baseava em velocidades iniciais, a concentração de produto neste caso pode ser considerada desprezível, de forma que a reação inversa praticamente não ocorreria, ou então k_4 é muito inferior a k_3 :



- após a mistura da enzima com o substrato ocorre a formação do complexo *ES*, que permanece numa concentração constante, em regime permanente:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Assim, tem-se:

$$\frac{d[ES]}{dt} = [E] \cdot [S] \cdot k_1 - [ES] \cdot k_2 - [ES] \cdot k_3 = 0$$

Agrupando as constantes, tem-se uma constante que representa a relação entre destruição e formação do complexo ES :

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = k_m$$

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{k_m}$$

A constante k_m , dita constante de Michaelis-Menten, é um valor característico para cada reação enzimática e quanto menores seus valores, maior é a afinidade da enzima pelo substrato (k_m corresponde à concentração de substrato em que $v = v_{m\acute{a}x}/2$). k_m pode ser aproximadamente igual à constante de dissociação do complexo $[ES]$, visto a constante k_3 ser geralmente muito menor que k_1 e k_2 , assim:

$$k_m \cong \frac{k_2}{k_1}$$

O total de enzima participando da reação $[E_0]$ é igual à soma da enzima livre $[E]$ com a enzima em forma de complexo $[ES]$, ou seja:

$$[E_0] = [E] + [ES]$$

Como k_3 é bem menor que k_1 e k_2 , a transformação de ES em $E + P$ será a etapa limitante do processo. Assim, podemos definir que a velocidade do processo, ou seja, de obtenção do produto e dissociação de ES é:

$$v = k_3[ES]$$

Da mesma forma, se toda a enzima estiver participando da reação, então a velocidade de reação estará no seu máximo quando:

$$v_{m\acute{a}x} = k_3[E_0]$$

Então, podemos definir a velocidade relativa $v/v_{m\acute{a}x}$ como:

$$\frac{v}{v_{m\acute{a}x}} = \frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{[ES]}{[E] + [ES]}$$

Na expressão anterior temos a velocidade em função do complexo ES , não mensurável na prática. Para relacionar a velocidade com parâmetros mais práticos, como a concentração de substrato, rearranjamos as expressões e temos:

$$\frac{v}{v_{m\acute{a}x}} = \frac{\frac{[E] \cdot [S]}{k_m}}{[E] + \frac{[E] \cdot [S]}{k_m}} = \frac{[S]}{k_m + [S]}$$

Assim, temos a chamada Equação de Michaelis-Menten:

$$v = v_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{k_m + [S]}$$

Podemos analisar a equação das seguintes formas, considerando a curva formada na Figura 18:

- Se $[S] \gg k_m$ (concentração de substrato pelo menos uma ordem de grandeza maior que k_m), localiza-se na região da curva onde $v = v_{m\acute{a}x}$ (reação de ordem zero);
- $[S] \ll k_m$ (concentração de substrato pelo menos uma ordem de grandeza menor que k_m), $v = \frac{v_{m\acute{a}x}}{k_m} [S]$, ou seja, reação de 1ª ordem;
- Se $v = \frac{v_{m\acute{a}x}}{2}$; $k_m = [S]$ (vários k_m na Tabela 6).

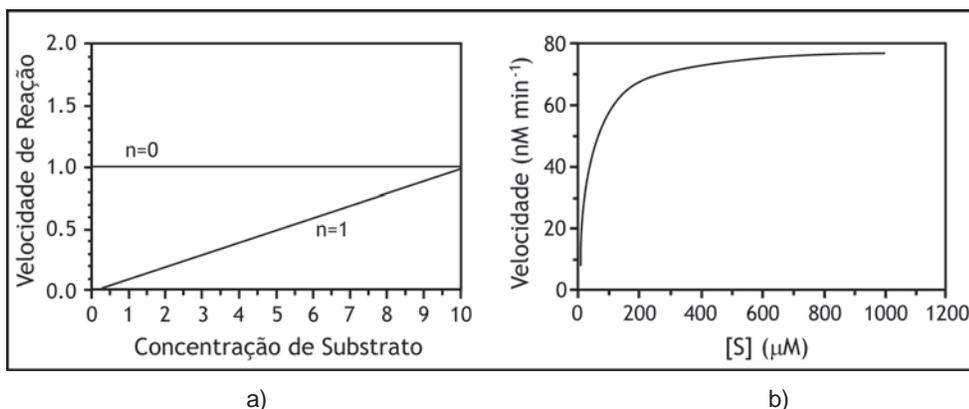


Figura 18 a) perfis de velocidade para reações de ordem zero ($n = 0$) e primeira ordem ($n = 1$) em função da concentração de reagente; b) perfil típico de velocidades para reações enzimáticas seguindo a equação de Michaelis-Menten.

Fonte: adaptada de Marangoni (2003).

A teoria de Michaelis-Menten, embora seja válida para a maioria das enzimas, é uma simplificação, uma vez que a formação do complexo *ES* engloba um conjunto de intermediários até a liberação da enzima e do produto formado.

Tabela 6 Constante de Michaelis-Menten para diversas enzimas e substratos.

Enzima	Fonte	Substrato	k_m (mM)
Álcool desidrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol	13,0
α -Amilase	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Amido	1,0
	Pâncreas suíno	Amido	0,4
β -Amilase	Batata-doce	Amilose	0,07
Aspartase	<i>Bacillus cadaveris</i>	L-Asparato	30,0
β -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	Lactose	3,85
	<i>Aspergillus niger</i>	D-Glicose	33,0
Glicose oxidase	<i>Penicillium notatum</i>	D-Glicose	9,6
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	L-Histidina	8,9
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sacarose	9,1
	<i>Neurospora crassa</i>	Sacarose	6,1
Lactato desidrogenase	<i>Bacillus subtilis</i>	Lactato	30,0
Peniciliase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Benzilpenicilina	0,049
Urease	Feijão	Ureia	10,5

Fonte: adaptada de Doran (1995).

3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação das constantes k_m e $v_{m\acute{a}x}$ a partir da Equação de Michaelis-Menten é difícil de ser obtida no gráfico v vs. S , pois, além da relação ser não linear, para concentrações elevadas de substrato a velocidade da reação aproxima-se assintoticamente de $v_{m\acute{a}x}$. Na prática, é muito difícil estimar $v_{m\acute{a}x}$ com precisão a partir de um gráfico como o do item *b* da Figura 18. Sendo assim, existem maneiras mais práticas de se obter essas constantes, seguindo técnicas de linearização da equação.

Nesse sentido, a transformação da equação de Michaelis-Menten em uma equação linear foi proposta por Hans Lineweaver e Dean Burk por meio da inversão e do posterior rearranjo dos termos da equação, obtendo-se:

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{v_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{m\acute{a}x}}$$

A equação é do tipo $y = a \cdot x + b$.

Quando $1/v = 0$, ou seja, altas velocidades, $\frac{1}{S} = \frac{-1}{k_m}$; e quando $1/S = 0$, ou seja, altas concentrações de substratos, $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{m\acute{a}x}}$, região de ordem zero. A representação gráfica da obtenção dos parâmetros cinéticos k_m e $v_{m\acute{a}x}$ pode ser visualizada no item *a* da Figura 19.

A relação de Lineweaver-Burk é a mais utilizada apesar de dar ênfase aos valores baixos por usar o inverso dos dados de velocidades e concentração de substrato, em que os valores de v são relativamente imprecisos. Além disso, a tangente é pouco precisa ($k_m/v_{m\acute{a}x}$).

Outra linearização da Equação de Michaelis-Menten é a expressão de Eadie-Hanes (item *b* da Figura 19), que é interessante para altos valores de v , apesar de obter intersecção próxima de zero, resultando em erros na medida de k_m :

$$\frac{S}{v} = \frac{1}{v_{m\acute{a}x}} S + \frac{k_m}{v_{m\acute{a}x}}$$

A equação de Hofstee é obtida multiplicando-se a Lineweaver-Burk por $v \left(\frac{v_{m\acute{a}x}}{k_m} \right)$:

$$v = -k_m \frac{v}{S} + v_{m\acute{a}x}$$

O gráfico de Hofstee (item c da Figura 19) coloca igual ênfase em todos os pontos, dando um bom k_m , necessitando, porém, de altas concentrações de S para fornecer um bom $v_{m\acute{a}x}$. No entanto, apresenta a variável v nas ordenadas e abscissas, o que pode provocar grandes erros.

Em vista disso, a estratégia mais correta e aconselhável para a avaliação de k_m e $v_{m\acute{a}x}$ é a seguinte: determinar $v_{m\acute{a}x}$ pela 1a ou 2a equação e, posteriormente, voltar ao gráfico v vs. S e encontrar S correspondente a $v = v_{m\acute{a}x}/2$, que corresponde ao valor de k_m .

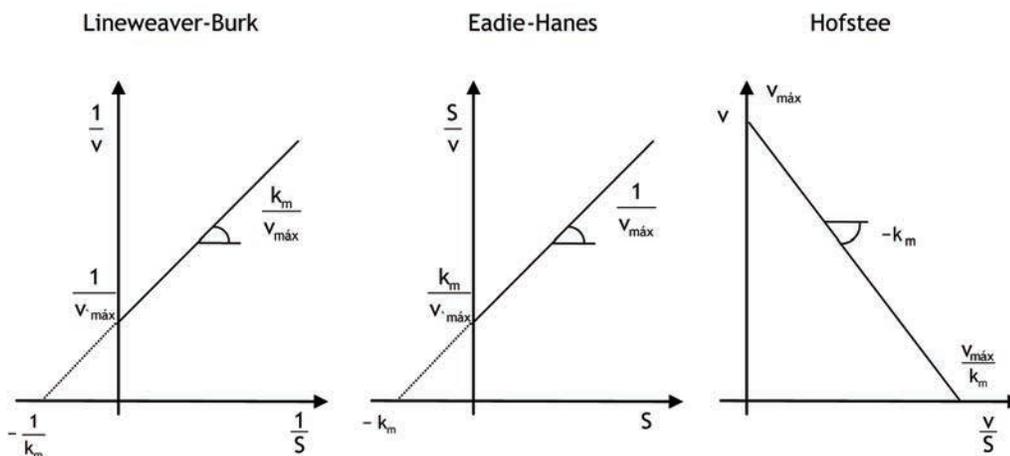


Figura 19 Linearizações da Equação de Michaelis-Menten: a) Lineweaver-Burk; b) Eadie-Hanes; c) Hofstee.

3.3 Inibição enzimática

Nem todas as reações enzimáticas seguem a teoria clássica descrita por Michaelis-Menten, apresentando muitas vezes problemas de inibições, seja por compostos que podem estar presentes na solução, seja pelo produto formado ou pelo substrato a partir de uma determinada concentração. Os inibidores afetam a atividade das moléculas enzimáticas combinando-se com elas, influenciando negativamente a ligação do substrato ou a velocidade de reação, e são classificados conforme o seu modo de ação. Os processos de inibição podem ser reversíveis ou irreversíveis, conforme descrito a seguir.

3.3.1 Inibição enzimática irreversível

Nesse tipo de inibição, o inibidor liga-se à enzima diretamente no seu centro ativo, formando um complexo EI inativo, irreversível com a enzima, impedindo que esta se ligue ao substrato (Figura 20). Como exemplos de inibidores irreversíveis podem-se citar os cianetos, gases tóxicos e metais pesados.

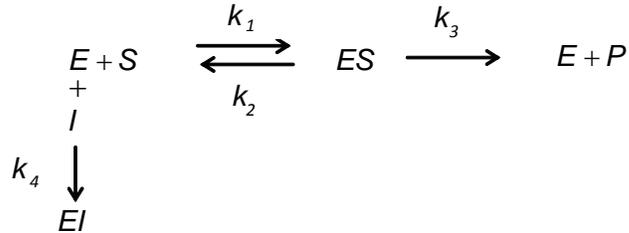


Figura 20 Mecanismo de inibição enzimática reversível.

Neste caso, o somatório de todas as formas presentes de enzima é:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI]$$

A velocidade relativa será:

$$\frac{v}{v_{\text{máx}}} = \frac{k_3 \cdot [ES]}{k_3 \cdot [E_0]} = \frac{[ES]}{[E] + [ES] + [EI]}$$

Para encontrar a relação para $[ES]$ em função da concentração de substrato (mensurável), tem-se que:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = [E] \cdot [S] \cdot [k_1] - [ES] \cdot k_2 - [ES] \cdot k_3$$

Mas, para $[EI]$:

$$\frac{d[EI]}{dt} \neq 0$$

Logo, não há modelo cinético para esse tipo de inibição, pois com o decorrer do tempo, $[EI]$ estará sendo acumulado e a enzima sendo consumida. Isso é o grande problema da inibição irreversível, o que leva à formação e ao acúmulo de formas inativas de EI .

3.3.2 Inibição enzimática reversível

Na classe de inibidores reversíveis encontra-se uma grande diversidade de tipos. Os mais comuns são: competitivos, não competitivos e incompetitivos ou incompetitivos.

3.3.2.1 Inibição enzimática reversível competitiva

Um inibidor competitivo é uma molécula que compete diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Um inibidor desse tipo, em geral, tem suficientes semelhanças estruturais com o substrato para se ligar ao centro ativo, mas é suficientemente diferente para não reagir (Figura 21).

O grau de inibição dependerá da relação entre as concentrações do inibidor e do substrato, de modo que, aumentando-se a concentração de substrato, o efeito pode ser revertido. Isso ocorre em função de que com uma maior concentração de substrato, a reação será desviada no sentido de formação do complexo ES .

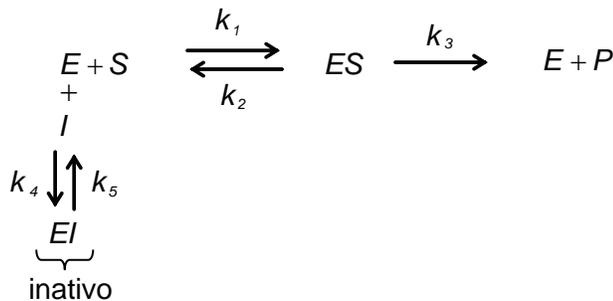


Figura 21 Mecanismo de inibição enzimática reversível competitiva.

Na prática, esse tipo de inibição é identificado pela redução da porcentagem de inibição, por meio do aumento da concentração de substrato. Pela análise cinética, que se faz por meio do uso de diversas concentrações de substrato em concentração fixa do inibidor (Figura 22), verifica-se que o valor de k_m é alterado, porém, $v_{m\acute{a}x}$ permanece constante.

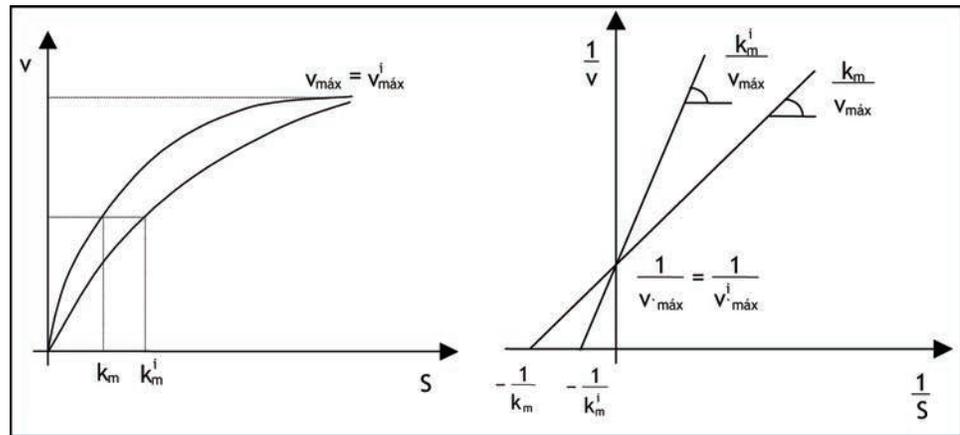


Figura 22 Representação gráfica da inibição enzimática reversível competitiva.

Para a obtenção dos mecanismos de reação e modelos cinéticos da inibição reversível competitiva, considera-se:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = [E] \cdot [S] \cdot [k_1] - [ES] \cdot k_2 - [ES] \cdot k_3 \longrightarrow [ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{k_m}$$

$$\frac{d[EI]}{dt} = 0 = [E] \cdot [I] \cdot [k_4] - [EI] \cdot k_5 \longrightarrow [EI] = \frac{[E] \cdot [I]}{k_i}, \text{ em que } 1/k_i = k_4/k_5$$

$$v = k [ES]$$

$$v_{m\acute{a}x} = k [E_0]$$

$$\frac{v}{v_{m\acute{a}x}} = \frac{[ES]}{[E] + [ES] + [EI]} = \frac{\frac{S}{k_m}}{1 + \frac{S}{k_m} + \frac{I}{k_i}} = \frac{S}{k_m + S + k_m \frac{I}{k_i}}$$

$$v = v_{m\acute{a}x} \frac{S}{S + k_m \left(1 + \frac{I}{k_i}\right)}$$

Podemos expressar em função da constante de inibição competitiva ou constante de Michaelis-Menten aparente ou chamado k_m com inibição (k_m^i), sendo k_i a constante de inibição:

$$k_m^i = k_m \left(1 + \frac{I}{k_i} \right)$$

3.3.2.2 Inibição enzimática reversível não competitiva

O inibidor com essa característica liga-se à enzima em um ponto diferente do centro ativo, combinando-se reversivelmente com a enzima ou com o complexo enzima-substrato, interferindo na ação de ambos (Figura 23). A enzima perde a capacidade de formar ES na velocidade normal e a inibição não pode ser revertida pelo aumento da concentração de substrato, pois a reação com o inibidor produz formas inativas de EI e EIS . É um tipo comum de inibição, pois reagentes podem combinar-se com grupos funcionais da enzima, fora do sítio ativo, mas que podem ser essenciais para a manutenção da atividade catalítica ou da conformação da enzima.

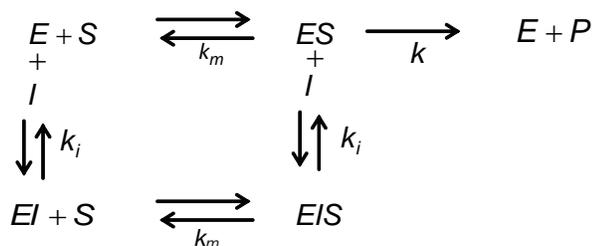


Figura 23 Mecanismo de inibição enzimática reversível não competitiva.

Esse tipo de inibição é reconhecido na prática em gráficos de $1/v$ vs. $1/[S]$, porque na presença do inibidor, o gráfico apresenta diferente inclinação e a intersecção $1/v_{\text{máx}}$ é maior para a enzima inibida do que para a enzima não inibida (Figura 24). Portanto, a velocidade máxima é diminuída pelo inibidor e não pode ser restabelecida. No entanto, k_m permanece inalterado.

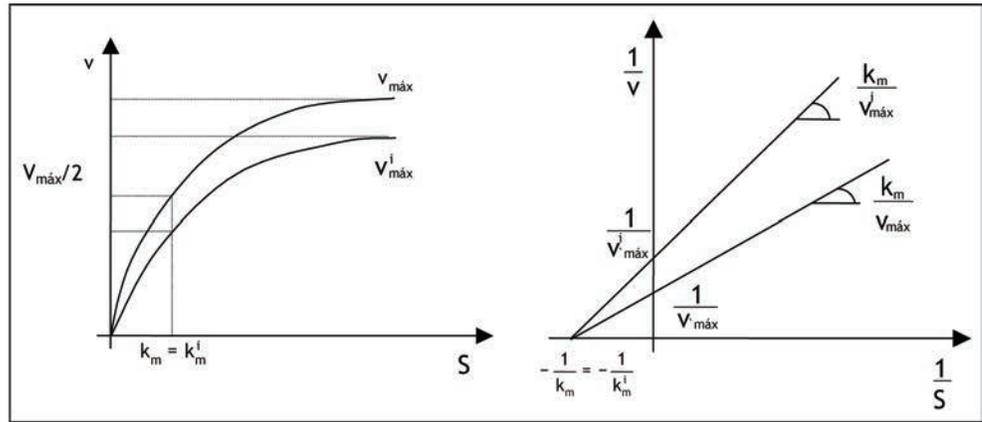


Figura 24 Representação gráfica da inibição enzimática reversível não competitiva.

A equação de velocidade de reação é dada pela equação:

$$v = v_{m\acute{a}x}^i \frac{S}{k_m + S}, \text{ sendo: } v_{m\acute{a}x}^i = \frac{v_{m\acute{a}x}}{1 + I/k_i}$$

3.3.2.3 Inibição enzimática reversível incompetitiva

O inibidor incompetitivo não se combina com a enzima livre, nem afeta sua reação normal com o substrato. No entanto, combina-se com o complexo *ES* formando *ESI* inativo, incapaz de sofrer a transformação em produto (Figura 25). O grau de inibição aumenta com o aumento da concentração de substrato. O esquema desse tipo de inibição está demonstrado a seguir, bem como a representação gráfica. As constantes k_m e $v_{m\acute{a}x}$ sofrem uma diminuição.

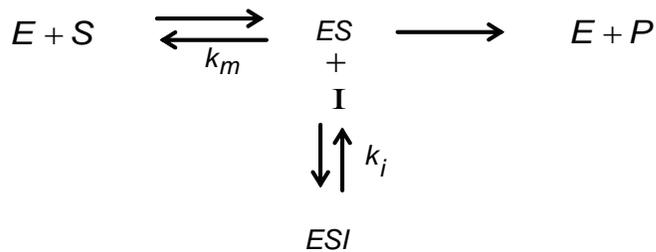


Figura 25 Mecanismo de inibição enzimática reversível incompetitiva.

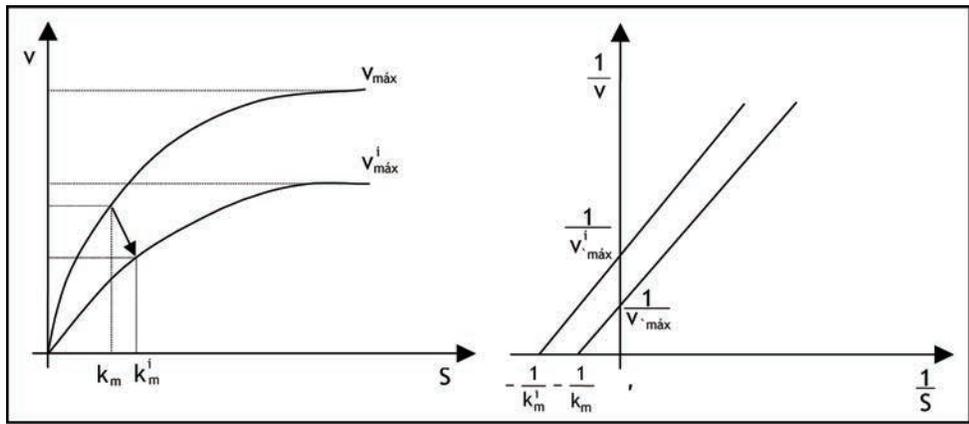


Figura 26 Representação gráfica da inibição enzimática reversível incompetitiva.

Neste caso, o modelo cinético será obtido a partir de:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [ESI]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = [E] \cdot [S] \cdot [k_1] - [ES] \cdot k_2 - [ES] \cdot k_3 - [ES] \cdot [I] \cdot k_4 + [ESI] \cdot k_5$$

$$\frac{d[ESI]}{dt} = 0 = [ES] \cdot [I] \cdot [k_4] - [ESI] \cdot k_5 \longrightarrow [ESI] = \frac{[ES] \cdot [I] \cdot k_4}{k_5}$$

Substituindo as expressões, temos que:

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{k_m}$$

Como $k_4/k_5 = 1/k_i$, o modelo cinético para esse tipo de inibição é:

$$\frac{v}{v_{m\acute{a}x}} = \frac{[ES]}{[E] + [ES] + [ESI]} = \frac{[S]}{k_m + [S] + \frac{[S][I]}{k_i}}$$

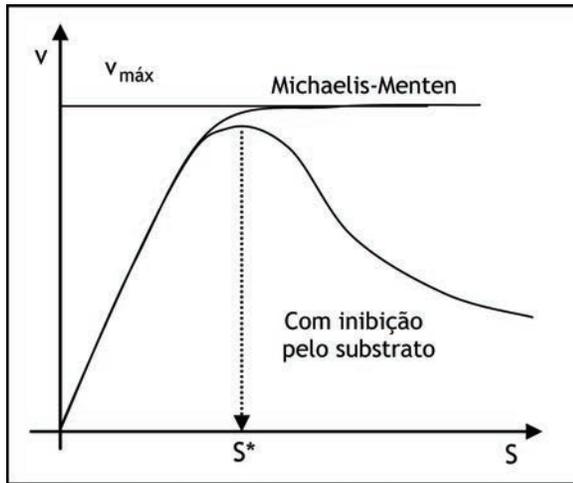


Figura 28 Representação gráfica da inibição enzimática pelo substrato.

Assim, analisando pela curva dos recíprocos:

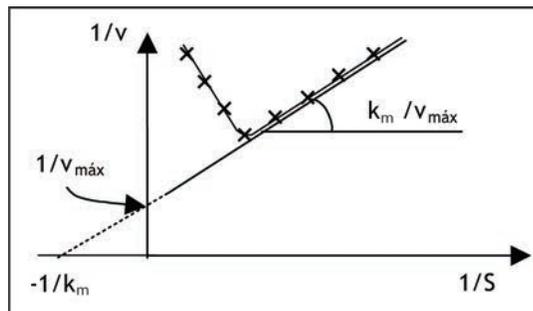


Figura 29 Comportamento da inibição enzimática pelo substrato no gráfico dos recíprocos.

3.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Os biocatalisadores estão sujeitos à desnaturação, o que necessariamente implica na perda da sua atividade. Geralmente essa desnaturação é irreversível, significando perda definitiva do poder catalisador. O efeito da temperatura sobre as enzimas é complexo, podendo afetar o estado de dissociação dos grupos funcionais envolvidos na reação enzimática, a afinidade da enzima por ativadores ou inibidores e a disponibilidade de substratos como o oxigênio.

As reações enzimáticas seguem o comportamento da maioria das reações químicas, ou seja, têm sua velocidade aumentada pelo aumento da temperatura. No entanto, isso ocorre somente na faixa de temperatura em que a enzima é estável e mantém sua atividade. A maior parte das enzimas apresenta temperatura ótima em torno de 30-40°C, sofrendo rápida desnaturação térmica acima de 50°C. A baixas temperaturas, as enzimas apresentam baixa atividade, sendo dificilmente inativadas. Assim, sugere-se o uso de baixas temperaturas para a conservação

e a estocagem de enzimas. O comportamento típico da ação da temperatura na atividade enzimática pode ser observado na Figura 30, sendo que o formato das curvas depende do tempo de reação:

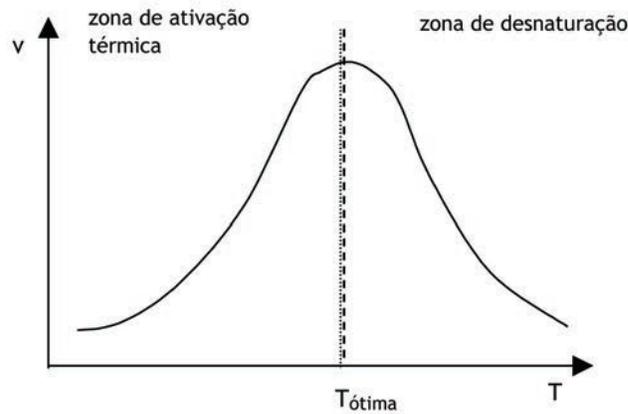


Figura 30 Efeito da temperatura nas reações enzimáticas.

Sabe-se que a velocidade enzimática, ou seja, de obtenção do produto, depende da constante cinética e da disponibilidade de enzimas ativas ($v = k [E]$). A velocidade das reações químicas é reconhecidamente relacionada com a temperatura segundo a equação proposta por Arrhenius. Analisando em termos de cinética enzimática, para a região de ativação térmica, temos que:

$$v = v_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

em que v é a velocidade de reação enzimática; v_0 é a velocidade a uma temperatura de referência; E_a é a energia de ativação da reação; R é a constante universal dos gases; e T é a temperatura em escala absoluta. Linearizando a equação, temos:

$$\ln(v) = \ln(v_0) - \frac{E_a}{RT}$$

O termo E_a/R é a tangente da reta de $\ln v$ vs. $1/T$. Considerando desnaturação desprezível para baixas temperaturas, a velocidade é proporcional à constante cinética:

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

Linearizando, temos o comportamento representado pela Figura 31.

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_a}{RT}$$

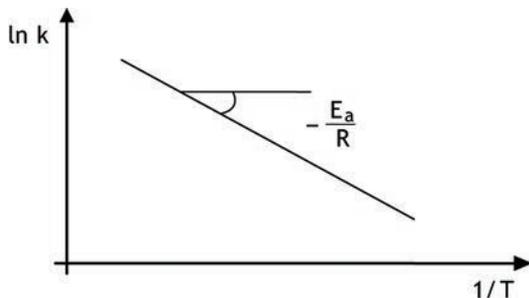


Figura 31 Influência da temperatura na constante cinética das reações enzimáticas.

Por outro lado, a desativação a temperaturas mais altas pode não ser desprezível, de forma que nesse caso deve ser considerada cinética de desnaturação. É comum descrever a cinética de desnaturação como de 1ª ordem, muito embora casos mais complexos sejam frequentes. Assim, temos uma perda da atividade segundo a equação a seguir:

$$\frac{dE}{dt} = -k_d \cdot E$$

A integração da equação anterior resulta em uma expressão para a concentração de enzima ativa em função do tempo:

$$E = E_0 \exp(-k_d \cdot t)$$

em que E_0 é a quantidade de enzima ativa no tempo zero; k_d é a constante de desnaturação térmica; e t é o tempo de reação na temperatura considerada. Verifica-se que a quantidade de enzima ativa varia exponencialmente com o tempo a uma temperatura acima do valor ótimo, ou seja, na região de desnaturação térmica, como já havia sido visualizado na Figura 30.

A estabilidade das enzimas pode ser expressa pelo chamado tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que corresponde ao período que a enzima leva para perder 50% da sua atividade inicial quando submetida a uma temperatura acima do valor ótimo.

$$\text{Assim, } \frac{E}{E_0} = 0,5 = \exp(-k_d \cdot t_{1/2}).$$

Substituindo as equações, temos:

$$\frac{E}{E_0} = 0,5 = e^{-k_d t_{1/2}} \text{ que integrando leva a:}$$

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k_d}$$

A constante de desnaturação térmica k_d depende da temperatura. Assim, calcula-se k_d pela inclinação da curva $\ln v$ vs. t na temperatura de desnaturação e a partir dela o valor de $t_{1/2}$, para caracterizar o efeito da temperatura na atividade enzimática.

3.5 Efeito do pH na atividade enzimática

O pH influencia a atividade enzimática interferindo na estabilidade dos grupos ionizáveis das enzimas, no sítio ativo e na conformação tridimensional das moléculas. O pH adequado propicia que os grupamentos do sítio ativo fiquem na forma química adequada para interagirem com o substrato. Em geral, enzimas são ativas numa faixa limitada de pH e em muitos casos existe um valor ótimo (Figura 32). Apesar de existirem algumas equações cinéticas, o efeito do pH na atividade enzimática é geralmente analisado experimentalmente. A força iônica e a atividade de água também devem ser consideradas como fatores que podem afetar as enzimas, apesar de existirem poucas correlações disponíveis para prever esses efeitos.

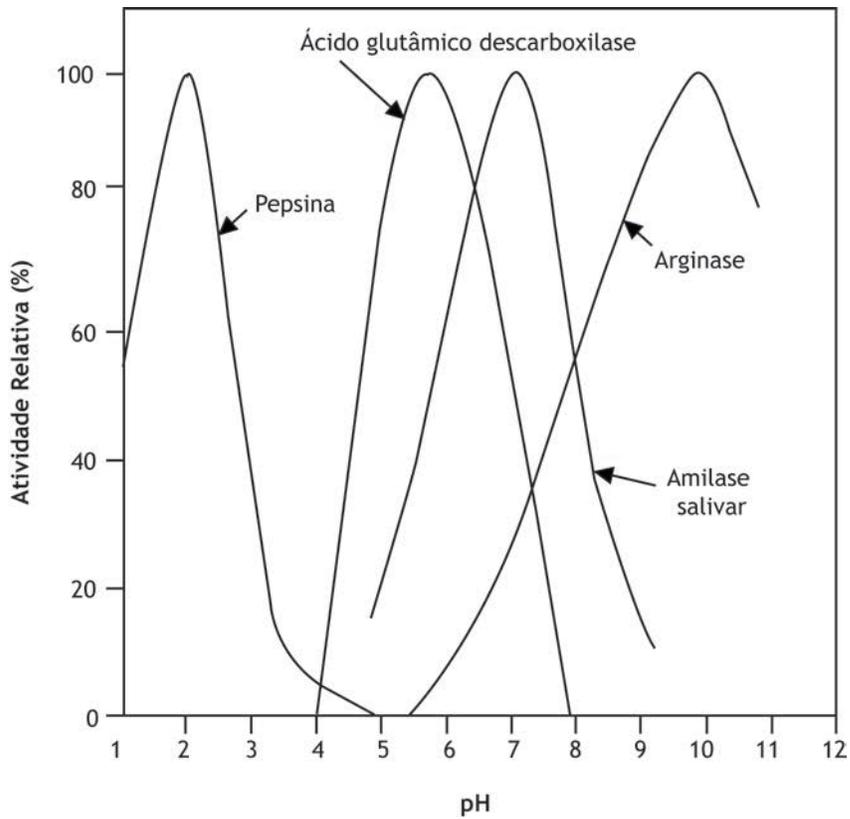


Figura 32 Efeito do pH na atividade enzimática.
 Fonte: adaptada de Doran (1995).

Referências

- DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press, 1995. 439 p.
 MARANGONI, A. G. *Enzymes Kinetics: A modern approach*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003. 229 p.

UNIDADE 4

Balances elementares em processos
biotecnológicos

4.1 Balanços materiais

Um dos conceitos fundamentais da engenharia de processos é o balanço material ou de massa. A massa nos sistemas biológicos é conservada durante o tempo, sendo a lei da conservação de massa utilizada para responder questões importantes dos bioprocessos, como quantidade de CO_2 no gás de saída do fermentador, a fração de substratos não convertida em produtos, a quantidade de reagentes necessários para produzir uma quantidade específica de produtos e quanto de oxigênio deve ser fornecido num biorreator. Aspectos da estequiometria metabólica também são analisados em termos de balanços de massa.

4.2 Os bioprocessos podem ser conduzidos em:

- batelada ou descontínuo: sistema fechado, todo o material é adicionado no início do processo e os produtos são removidos apenas no final, processos dinâmicos em estado transiente;
- semicontínuo: permite a entrada de substrato ou saída de produtos, mas não concomitantemente;
- batelada alimentada: permite entrada de material, sem saída durante o processo;
- contínuo: entrada e saída contínua de material (regime permanente).

O balanço de massa para um sistema pode ser definido como:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Massa acumulada} \\ \text{dentro do sistema} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Massa que} \\ \text{entra no sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Massa que} \\ \text{sai do sistema} \end{array} \right] +$$

$$\left[\begin{array}{l} \text{Massa gerada} \\ \text{no sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Massa consumida} \\ \text{no sistema} \end{array} \right]$$

O termo de acúmulo pode ser negativo, no caso do esgotamento de um componente, ou positivo. A massa referenciada na equação de balanço pode ser de moléculas particulares ou biomassa. Quando o balanço é analisado em termos de taxas ou fluxos, como nos processos contínuos, o balanço é chamado de diferencial. Em processos semi ou descontínuos, normalmente são usados valores em massa coletados num período de tempo, caracterizando o balanço como integral.

A equação geral do balanço de massa pode ser simplificada dependendo do processo. Por exemplo, se a situação analisada encontra-se em regime permanente, elimina-se o termo de acúmulo. Se o balanço for feito para um componente

inerte no sistema, os termos de geração e consumo também são nulos, tornando a equação uma relação simples de quantidade de massa na entrada igual à saída.

O primeiro passo para a resolução do balanço de massa é o entendimento do problema. Como certas informações estão disponíveis, resta utilizá-las para calcular as quantidades desconhecidas. Alguns pontos são essenciais, como:

- esquematizar o processo por um diagrama ou fluxograma, indicando as informações relevantes;
- selecionar as variáveis de processo e suas unidades;
- selecionar uma base de cálculo, ou seja, um parâmetro que sirva como base para os demais procedimentos. Por exemplo, nos processos contínuos normalmente são usados períodos específicos de tempo, enquanto nos processos descontínuos são usadas quantidades totais de material produzido;
- realizar todas as considerações sobre o problema.

Como exemplo será citado um processo de fermentação acética contínua (DORAN, 1995): *Acetobacter aceti* converte etanol em ácido acético em condições aeróbias num reator contínuo, com crescimento celular mínimo. A produção desejada é de 2 kg/h de ácido acético. Entretanto, as células toleram um máximo de 12% de ácido no meio. O reator tem alimentação de ar na vazão de 200 gmol/h. Pergunta-se:

- a) Qual a quantidade mínima de etanol exigida?
- b) Qual a quantidade mínima de água que deve ser usada para diluir o meio de cultivo de forma que o ácido produzido não iniba as células?
- c) Qual a composição do gás de saída do fermentador?

1ª Etapa: Esquematizar o processo, conforme a Figura 33.

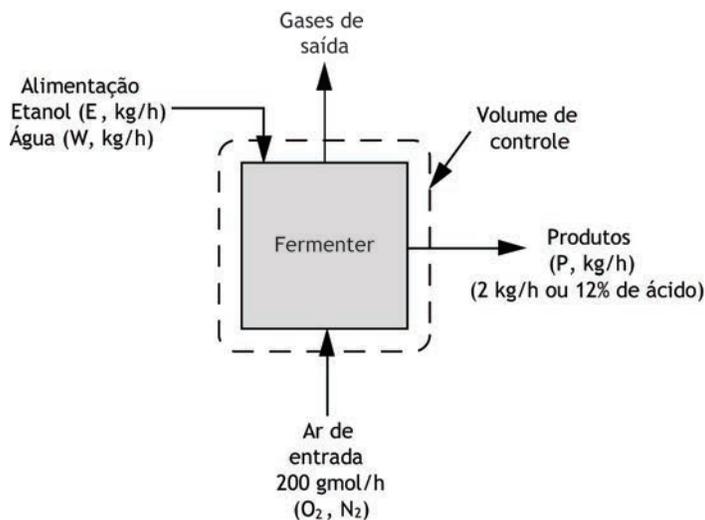
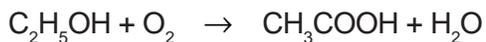


Figura 33 Diagrama para produção contínua de ácido acético.

2ª Etapa: Considerações.

Considerando ausência de crescimento celular, a equação que define a produção de ácido acético é:



Assumindo:

- regime permanente;
- tanque sem vazamentos ou perdas;
- ar de entrada seco, contendo apenas oxigênio e nitrogênio;
- evaporação de etanol, ácido acético e água desprezíveis;
- conversão completa do etanol, sem ocorrência de reações paralelas;
- que a disponibilidade de oxigênio é suficiente;
- concentração de ácido acético no produto de 12%.

Dados:

- Massa molar: Etanol (46 g/gmol); Ácido Acético (60 g/gmol); Oxigênio (32 g/gmol); Nitrogênio (28 g/gmol) e Água (18 g/gmol).
- Composição do ar: 21% O_2 ; 79% N_2 .

Base de cálculo: a resolução baseia-se na produção de 2 kg de ácido acético ou 1 hora.

Balanço de massa: para etanol, ácido acético, oxigênio e água:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Massa que} \\ \text{entra no sistema} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Massa gerada} \\ \text{no sistema} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Massa que} \\ \text{sai do sistema} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Massa consumida} \\ \text{no sistema} \end{array} \right]$$

No entanto, para nitrogênio:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Massa que} \\ \text{entra no sistema} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Massa que} \\ \text{sai do sistema} \end{array} \right]$$

Alguns cálculos preliminares para o ar de entrada são necessários:

$$\text{Conteúdo de } O_2 = (0,21) \cdot (200 \text{ gmol}) \cdot \left[\frac{32 \text{ g}}{\text{gmol}} \right] = 1344 \text{ g} = 1,344 \text{ kg}$$

$$\text{Conteúdo de } N_2 = (0,79) \cdot (200 \text{ gmol}) \cdot \left[\frac{28 \text{ g}}{\text{gmol}} \right] = 4424 \text{ g} = 4,424 \text{ kg}$$

Sendo assim, temos um total de 5,768 kg de ar.

Se 2 kg de ácido acético representa 12% em massa do produto, o total em massa será $2/0,12$ ou 16,67 kg. Assim, 88% da massa total na saída é água, ou seja, 14,67 kg.

3ª Etapa: Balanço de massa por componentes.

- Balanço de nitrogênio:

$$4,424 \text{ kg } N_2 \text{ na entrada} = N_2 \text{ da saída}$$

$$N_2 \text{ da saída} = 4,424 \text{ kg}$$

- Balanço de ácido acético:

0 kg ác. acético na entrada + ác. acético gerado = 2 kg ác. acético na saída + 0 kg ác. acético consumido

Assim, são gerados 2 kg de ácido acético ou $3,33 \times 10^{-2}$ kgmol.

Sendo a reação estequiométrica, a geração de $3,33 \times 10^{-2}$ kgmol de ácido acético exige $3,33 \times 10^{-2}$ kgmol de etanol e O_2 , acompanhada pela geração de $3,33 \times 10^{-2}$ kgmol de água. Assim:

- $3,33 \times 10^{-2}$ kgmol de etanol ou 1,533 kg são consumidos;
- $3,33 \times 10^{-2}$ kgmol de O_2 ou 1,067 kg são consumidos;
- $3,33 \times 10^{-2}$ kgmol de H_2O ou 0,6 kg são gerados.

Usamos essas informações para completar os balanços de massa de etanol, O_2 e água.

- Balanço de etanol:

Etanol na entrada + 0 kg etanol gerado = 0 kg etanol na saída + 1,533 kg etanol consumido

$$\text{Etanol na entrada} = 1,533 \text{ kg}$$

- Balanço de O_2 :

1,344 kg O_2 na entrada + 0 kg O_2 gerado = O_2 saída + 1,677 kg O_2 consumido

$$O_2 \text{ saída} = 0,277 \text{ kg}$$

Como o gás de saída apresenta apenas O_2 e N_2 , temos um total de $0,277 + 4,424 = 4,701$ kg.

- Balanço de água:

Água na entrada + 0,6 Água gerada = 14,67 kg Água na saída + 0 kg Água consumida

$$\text{Água na entrada} = 14,07 \text{ kg}$$

Sendo assim, já foram respondidas as duas primeiras questões. A quantidade de etanol exigido para o processo é 1,533 kg, enquanto a quantidade de água para diluí-lo é 14,07 kg. Resta calcular a composição do gás de saída:

$$\text{Conteúdo de } O_2 \text{ na saída} = 0,277 \text{ kg} \left[\frac{1 \text{ kgmol}}{32 \text{ kgmol}} \right] = 8,656 \cdot 10^{-3} \text{ kgmol}$$

ou 5,19%

$$\text{Conteúdo de } N_2 \text{ na saída} = 4,424 \text{ kg} \left[\frac{1 \text{ kgmol}}{28 \text{ kgmol}} \right] = 0,1580 \text{ kgmol ou } 94,8\%$$

Consideremos agora um processo batelada com reciclo de células na fermentação etanólica (Figura 34). O mosto (M) alimenta a dorna com nutrientes e o vinho bruto (V) é centrifugado, sendo que as leveduras, o chamado “leite de leveduras” (F), vai a uma cuba para tratamento e retorna à dorna. Calcular o rendimento da fermentação considerando volume de vinho (V) de 100000 L, teor alcoólico do vinho bruto (E_v) de 7,5°GL, volume do pé de cuba de 20000 L, teor alcoólico do pé de cuba (E_p) de 2,8°GL, volume de mosto (M) de 80000 L e teor de açúcares redutores totais (ART) no mosto de 15 g/100mL, com 0,5 g/100mL de substâncias não fermentescíveis.

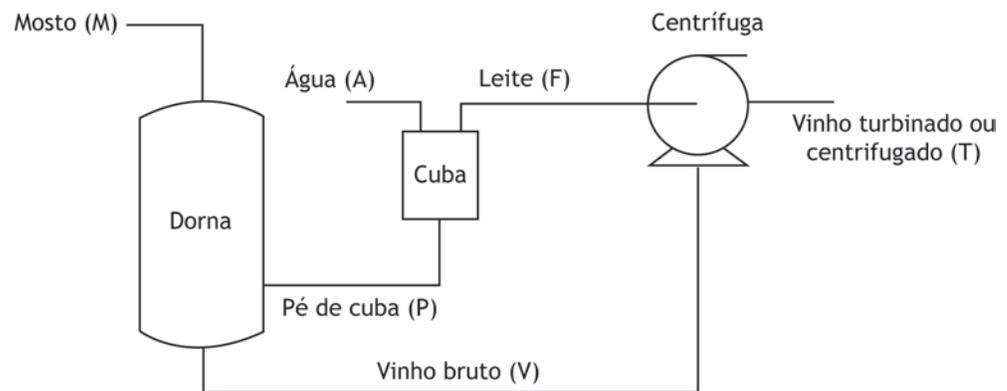


Figura 34 Esquema de fermentação etanólica.

O primeiro passo é a correção do mosto, ou seja, o cálculo da quantidade de açúcares que pode ser convertido em etanol, os açúcares fermentescíveis:

$$ART = 15 - 0,5 = 14,5 \text{ g/100mL}$$

Considerando o balanço de massa de etanol, temos que:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Etanol produzido} \\ \text{na dorna} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Etanol que entra} \\ \text{pelo pé de cuba} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Etanol que sai} \\ \text{vinho} \end{array} \right]$$

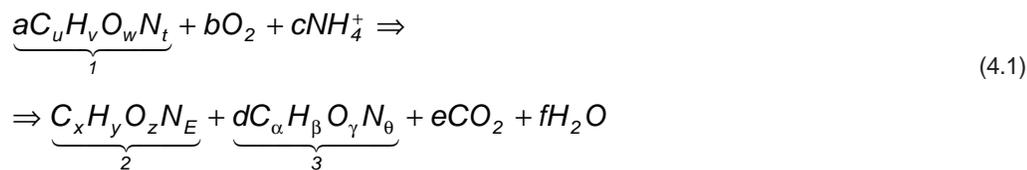
Assim:

$$0,647r_i M + PE_p = VE_v$$

Note que o primeiro termo do balanço de massa diz respeito à conversão de glicose em etanol, ou seja, é o termo de reação, e “0,647” equivale ao rendimento estequiométrico $0,51 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, dividido pela densidade do etanol (0,7893 g/mL) para que o resultado represente volume de etanol. O segundo termo representa a quantidade de etanol no pé de cuba e o termo à direita representa a quantidade de etanol no vinho bruto. Como todos os termos são conhecidos, o rendimento da fermentação (r_f) calculado pelo balanço de massa para a conversão estequiométrica de $0,5151 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ é 0,9247 ou 92,47%.

4.3 Estequiometria dos processos microbiológicos

Pode-se escrever a equação estequiométrica de um processo microbiológico genérico da seguinte forma:



Sendo:

- 1) Substrato contendo a fonte de carbono, com massa molar M_S
- 2) Biomassa, com massa molar equivalente M_X
- 3) Produto, com massa molar M_P

A grande dificuldade de analisar os processos microbiológicos pela estequiometria é considerar a composição das células, uma vez que esta é dependente de diversos fatores, como as condições de cultivo e as fases de crescimento. Assim, a composição elementar média de um microrganismo é determinada empiricamente ou a partir de dados da literatura (Tabela 7).

Tabela 7 Composição média de bactérias e leveduras.

Elemento	Bactérias (%)	Leveduras (%)
C	53	47
O	20	30
N	12	7,5
H	7	6,5
P	3	1,5
S	1	1
Mg	0,5	0,5
Cinzas (P, Mg, Cu, Ca, Co, Fe, Mn, Mo)	7	8

Fonte: adaptada de Doran (1995).

Analisando a estequiometria da reação, os coeficientes $u, v, w, t, x, y, z, E, \alpha, \beta, \gamma,$ e θ podem ser determinados experimentalmente, gerando parâmetros interessantes, como os rendimentos. O rendimento de substrato em células ($Y_{X/S}$) pode ser calculado considerando a relação entre massa molar de biomassa e substrato:

$$Y_{X/S} = \frac{M_x}{aM_s}$$

Analogamente, o rendimento de substrato em produtos ($Y_{P/S}$) é definido por:

$$Y_{P/S} = \frac{dM_P}{aM_s}$$

Todos os coeficientes ($a, b, c, d, e,$ e f) são determinados pelos balanços dos elementos:

$$\text{C: } a.u = x + d.\alpha + e$$

$$\text{H: } a.v + 4.c = y + d.\beta + 2.f$$

$$\text{O: } a.w + 2.b = z + d.\gamma + 2.e + f$$

$$\text{N: } a.t + c = E + d.\theta$$

Outro parâmetro interessante de ser determinado pela estequiometria é a demanda de oxigênio, com larga aplicação nos bioprocessos. É calculado em termos de mol pela relação entre massa molar de biomassa e massa molar de

oxigênio. Em termos de massa, b' seria a quantidade em gramas de oxigênio para produzir um grama de biomassa e o rendimento seria:

$$Y_{o_2/x} = \frac{1}{b'} \left[\frac{g_{biomassa}}{g_{O_2}} \right]$$

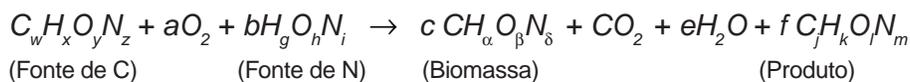
4.4 Grau de redução dos substratos

O crescimento celular necessita de uma grande variedade de elementos em quantidade variável. Geralmente, a composição e o tipo de fonte de carbono definem a quantidade dos outros elementos do meio de cultivo. Dois substratos na mesma proporção ou quantidade num meio de cultivo não produzem necessariamente o mesmo rendimento em biomassa (Tabela 8). Com os valores de $Y_{x/s}$ previamente conhecidos e as equações estequiométricas, é possível calcular as quantidades necessárias e suficientes para formular os meios de cultivo.

Tabela 8 Dados de $Y_{x/s}$ para alguns microrganismos cultivados em diferentes fontes de carbono.

Substrato		Microrganismo	$Y_{x/s}$
Maltose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	<i>Aerobacter aerogenes</i>	0,43
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	<i>Aerobacter aerogenes</i>	0,50
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	<i>Aerobacter aerogenes</i>	0,40
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,43
Acetato	$C_2H_4O_2$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,28
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	<i>Candida utiles</i>	0,51
Acetato	$C_2H_4O_2$	<i>Candida utiles</i>	0,36
Etanol	C_2H_6O	<i>Candida utiles</i>	0,68
N-hexano	$C_{14}H_{30}$	<i>Candida lipolítica</i>	0,78
N-octadecano	$C_{28}H_{58}$	<i>Candida lipolítica</i>	0,88

Com relação ao substrato, podemos estabelecer a propriedade chamada grau de redução (γ), definido como o número de equivalentes de elétrons disponíveis na quantidade de material contendo 1g de carbono. Assim, compostos com baixo grau de redução são altamente oxidáveis (Tabela 9). Se considerarmos um processo envolvendo crescimento de microrganismos conforme a equação química a seguir, para substrato limitante ($C_wH_xO_yN_z$):



Assim, o número de elétrons disponíveis do substrato é $4w + x - 2y - 3z$ e o grau de redução pode ser calculado por:

$$\gamma_s = \frac{4w+x-2y-3z}{w}$$

O grau de redução pode ser calculado para a biomassa, desde que se tenha a fórmula elementar ou uma estimativa, assim como para o produto. Considerando a quantidade de elétrons do substrato e que o oxigênio é o aceptor final de elétrons em aerobiose, o balanço de elétrons seria:

$$w\gamma_s - 4a = c\gamma_B + fj\gamma_P$$

Rearranjando a equação, temos que:

$$1 = \frac{4a}{w\gamma_s} + \frac{c\gamma_B}{w\gamma_s} + \frac{fj\gamma_P}{w\gamma_s}$$

O primeiro termo da relação anterior diz respeito à fração de elétrons disponíveis transferidos do substrato para o oxigênio; o segundo termo aos elétrons disponíveis para a biomassa; enquanto o último termo é a fração de elétrons disponíveis transferidos para o produto.

Com essas relações, é possível estimar a demanda de oxigênio para um determinado cultivo microbiano com formação de produto:

$$a = \frac{1}{4}(w\gamma_s - c\gamma_B - fj\gamma_P)$$

em que "a" é o número de moléculas de O_2 exigidas para consumo de um substrato com grau de redução γ_s por uma biomassa γ_B para formação de um produto γ_P .

Tabela 9 Grau de redução de diversos compostos.

Componente	Fórmula	Grau de redução relativo a NH ₃
Acetaldeído	C ₂ H ₄ O	5,00
Ácido Acético	C ₂ H ₄ O ₂	4,00
Acetona	C ₃ H ₆ O	5,33
Adenina	C ₅ H ₅ N ₅	2,00
Alanina	C ₃ H ₇ O ₂ N	4,00
Amônia	NH ₃	0
Arginina	C ₆ H ₁₄ O ₂ N ₄	3,67
Asparagina	C ₄ H ₈ O ₃ N ₂	3,00
Ácido Aspártico	C ₄ H ₇ O ₄ N	3,00
n-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	6,00
Butiraldeído	C ₄ H ₈ O	5,50
Ácido Butírico	C ₄ H ₈ O ₂	5,00
Monóxido de Carbono	CO	2,00
Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	3,00
Citosina	C ₄ H ₅ ON ₃	2,50
Etano	C ₂ H ₆	7,00
Etanol	C ₂ H ₆ O	6,00
Eteno	C ₂ H ₄	6,00
Etilenoglicol	C ₂ H ₆ O ₂	5,00
Etino	C ₂ H ₂	5,00
Formaldeído	CH ₂ O	4,00
Ácido Fórmico	CH ₂ O ₂	2,00
Ácido Fumárico	C ₄ H ₄ O ₄	3,00
Glicitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	4,33
Ácido Glucônico	C ₆ H ₁₂ O ₇	3,67
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	4,00
Ácido Glutâmico	C ₅ H ₉ O ₄ N	3,60
Glutamina	C ₅ H ₁₀ O ₃ N ₂	3,60
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	4,67
Glicina	C ₂ H ₅ O ₂ N	3,00

Fonte: adaptada de Doran (1995).

Referências

DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press. 1995. 439 p.

UNIDADE 5

Cinética dos processos biotecnológicos

Quando uma quantidade de células viáveis é colocada numa solução contendo nutrientes essenciais em condições favoráveis de pH e temperatura, as células se adaptarão ao ambiente e se multiplicarão, atingindo uma fase de crescimento máximo. No caso de microrganismos unicelulares que se dividem quando crescem por fissão binária simples, o aumento da biomassa é acompanhado diretamente pelo aumento do número de células, ou seja, aumento de população. Quando se trata de bolores ou fungos filamentosos a situação é completamente diferente, com crescimento associado ao comprimento e número de micélios, aumentando em dimensão e densidade a biomassa, mas não necessariamente em número. Em ambos os casos, o crescimento envolve consumo de material do meio e liberação de metabólitos.

A medida do crescimento pode ser acompanhada por métodos gravimétricos e turbidimétricos, uma vez que a densidade ótica da suspensão celular é função linear da biomassa somente para baixos valores de densidade. Outras formas de monitorar o crescimento celular é por meio da estimativa de biomassa pela medida de componentes celulares, tais como proteínas, ácidos nucleicos, glicosamina, entre outros.

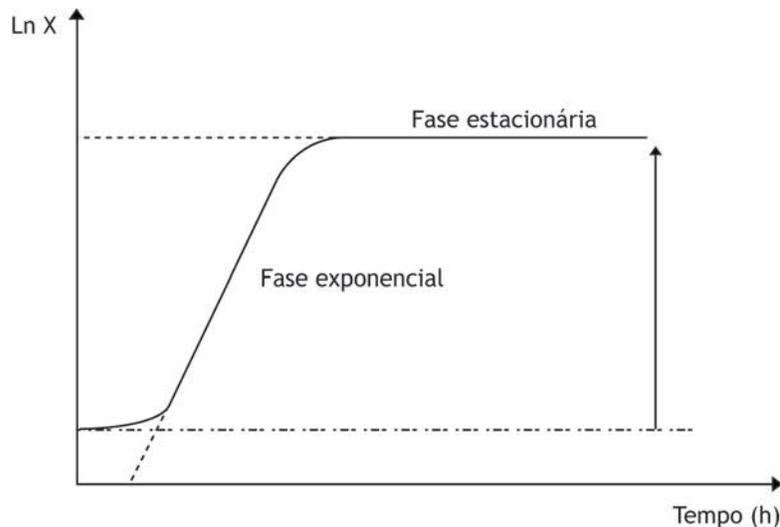


Figura 35 Comportamento do crescimento celular batelada em meio de cultivo limitado de nutrientes.

O crescimento celular envolve fenômenos descritos na Tabela 10, que dependem da fase biótica, ou seja, o tipo de microrganismo, e da fase abiótica, ou seja, o meio de cultivo e suas características. Apesar de todos esses fenômenos, são realizadas considerações para analisar o crescimento de microrganismos:

- Presença de um único substrato limitante e o resto em excesso, de forma que se considere a concentração somente desse substrato;
- Ocasionalmente a presença de um inibidor;
- Frequentemente controla-se ou mantêm-se outras variáveis no meio (pH, temperatura, O₂) em valores que afetarão minimamente a cinética de crescimento.

Tabela 10 Processo de crescimento de um microrganismo. G: fase gasosa; L: fase líquida; S: fase sólida.

Meio de cultivo	Nutrientes	População celular
Multicomponentes	⇒	Componentes múltiplos
Reações em solução	Produtos	Heterogeneidade entre indivíduos
Equilíbrio ácido-base	⇐	Reações múltiplas
pH, T, variáveis	Calor	Controles internos
Prop. reológicas variáveis	⇔	Adaptabilidade
Fases múltiplas (G-L, S-L, G-S)	Interações mecânicas	Probabilidade
Heterogeneidade espacial	⇔	Degenerescência

5.1 Parâmetros cinéticos

Para definir as diferentes velocidades de reação que ocorrem em processos fermentativos em geral, considere um cultivo em batelada, amplamente utilizada no laboratório e na indústria, caracterizado pelo sistema fechado com uma carga inicial de microrganismos inoculada numa quantidade limitada de nutrientes. Num processo em batelada é possível, a partir de amostras retiradas ao longo do cultivo, visualizar os perfis de concentração de células (X), substrato (S) e de produto (P) e determinar as taxas de transformação (Figura 36).

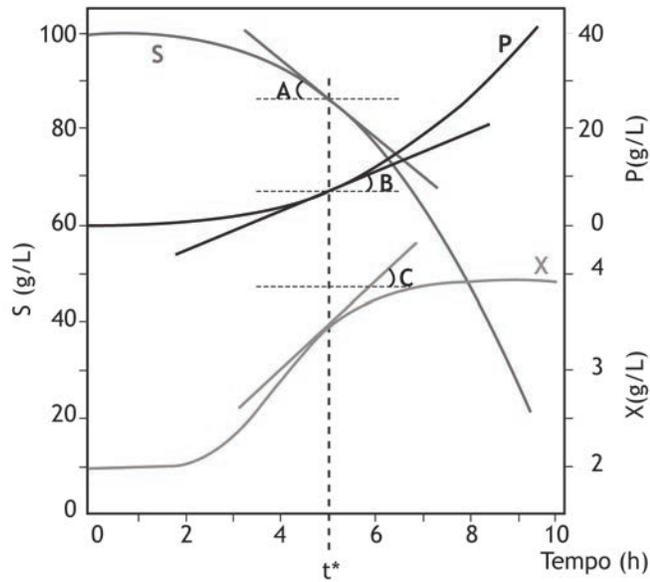


Figura 36 Perfis de concentração celular (X), substrato (S) e produto (P) para cultivo em batelada.

Na Figura 36, podemos definir:

$$A = -\left. \frac{dS}{dt} \right|_{t=t^*}$$

$$B = \left. \frac{dP}{dt} \right|_{t=t^*}$$

$$C = \left. \frac{dX}{dt} \right|_{t=t^*}$$

As inclinações das curvas descritas nos perfis definem as velocidades instantâneas de transformação, ou seja, crescimento celular (r_x), de consumo de substrato (r_s) e de formação de produto (r_p):

$$r_x = \frac{dX}{dt}$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt}$$

$$r_p = \frac{dP}{dt}$$

Os rendimentos são definidos com base no consumo de um material para a formação de outro, tratando-se de parâmetros relacionados com a estequiometria, conforme a análise feita na Unidade 4. Assim, como exemplos de coeficientes de rendimento, temos:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

$Y_{X/S}$ é definido como o coeficiente global de conversão de substrato em células, também conhecido como coeficiente de rendimento aparente ou observado. O valor desse parâmetro varia ao longo de um cultivo, alcançando o valor máximo durante a etapa de crescimento exponencial em cultivos descontínuos (batelada).

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Assim como para $Y_{X/S}$, o $Y_{P/S}$ trata-se de um coeficiente global de conversão de substrato em produto, variável durante o cultivo. Os coeficientes globais levam em consideração o consumo total de um material para a formação de outro. Por exemplo, $Y_{X/S}$ indica a razão entre a quantidade de células formada e a quantidade total de substrato consumida num cultivo, podendo esse substrato também ser utilizado para outros fins, tais como para a formação de produto e energia de manutenção celular. Assim, para um determinado intervalo de tempo, o cálculo do coeficiente de rendimento celular e de produto pode ser analisado pela cinética a partir das seguintes relações:

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS}$$

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{-dS}$$

Como exemplo de determinação das taxas de reação em cultivo microbiano, considere os dados da Tabela 11 para *Saccharomyces cerevisiae*. Quais as velocidades instantâneas de transformação em 8h?

Tabela 11 Dados para cultivo em batelada de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	0,91	106,9	0
4	0,91	106,9	0
8	1,61	96,8	6,2
12	2,42	83,6	15
16	3,59	59,9	23,5
20	4,71	31,6	34,3
24	5,51	10,6	42,2
28	5,56	7	42,8

X: concentração celular; S: concentração de substrato (açúcares redutores totais – ART); P: concentração de produto (etanol).

O primeiro passo é analisar o comportamento das curvas, que pode ser visualizado na Figura 37. Existem duas formas mais simples de determinar as taxas em 8h: a primeira seria aproximar a variação infinitesimal para uma variação simples, analisando os dados imediatamente antes e depois das 8h de cultivo; a outra forma seria ajustar as curvas em polinômios, derivá-los e substituir o tempo em 8h.

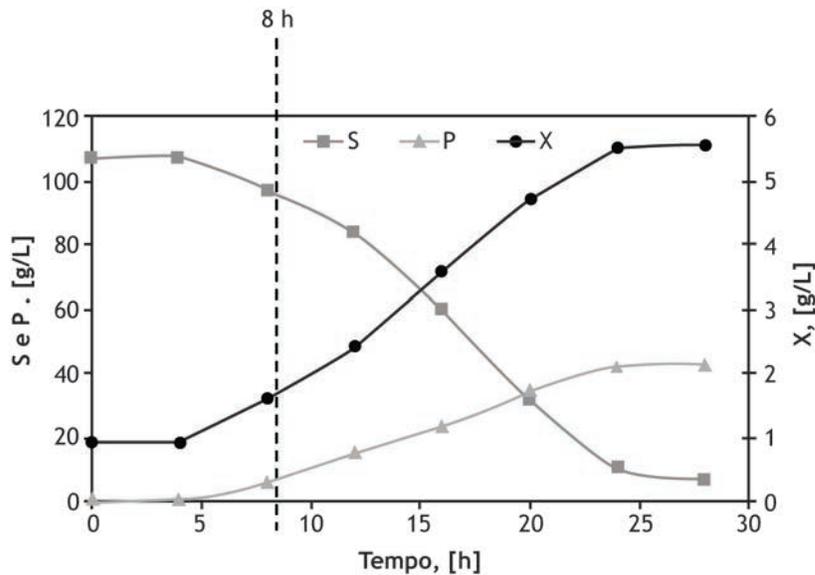


Figura 37 Perfis de concentração celular (X), substrato (S) e produto (P) para cultivo em batelada a partir dos dados da Tabela 11.

Primeiramente, na forma mais simples, para 8h de cultivo considerando os tempos mais próximos, temos que:

$$r_x = \frac{dx}{dt} \cong \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{(2,42 - 0,91)g/L}{(12 - 4)h} = 0,19 \text{ g}_{\text{levedura}}/L.h$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \cong -\frac{\Delta S}{\Delta t} = -\frac{(83,6 - 106,9)g/L}{(12 - 4)h} = 2,9 \text{ g}_{\text{ART}}/L.h$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \cong \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{(15 - 0)g/L}{(12 - 4)h} = 1,9 \text{ g}_{\text{etanol}}/L.h$$

Analisando os resultados, conforme já mencionado na Unidade 4, podemos calcular os fatores de conversão ou rendimento analisando a variação da concentração de células, substrato e produto. Sendo assim, o rendimento de substrato em células pode ser calculado como:

$$Y_{X/S} = -\frac{dx}{dS} = \frac{r_x}{r_s} = 0,06 \text{ g}_{\text{levedura}}/\text{g}_{\text{ART}}$$

Analogamente, o rendimento de substrato em produto seria:

$$Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS} = \frac{r_p}{r_s} = 0,64 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ART}}$$

Assim, os rendimentos podem ser definidos tanto pela estequiometria, conforme foi demonstrado na Unidade 4, como pela cinética dos processos. No entanto, se analisarmos o rendimento de substrato em produto estimado ($Y_{P/S}$), vemos que o valor é maior que o máximo teórico possível (0,51 g/g). O erro está exatamente na estimativa das velocidades, já que houve uma aproximação da variação infinitesimal para uma variação simples. Assim, analisando pelo ajuste das curvas (Figura 38), temos:

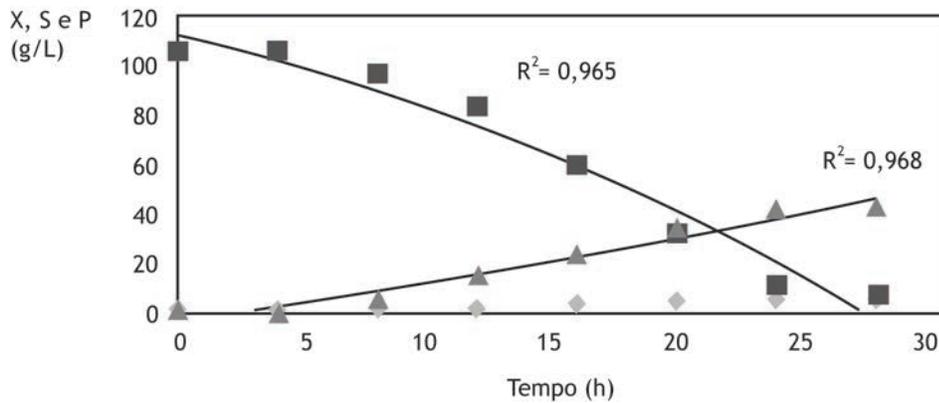


Figura 38 Ajuste dos perfis de consumo de substrato e formação de produtos.

Considerando os polinômios das curvas de consumo de substrato e formação de produto, a velocidade instantânea de consumo de substrato seria 3,33 g/L·h e a velocidade instantânea de formação de produto seria 1,66 g/L·h. Assim, o novo rendimento seria:

$$Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS} = \frac{r_P}{r_S} = 0,49 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ART}}$$

Um rendimento de 0,49 g/g seria um valor mais razoável, uma vez que representa 96% do valor máximo teórico.

Como a concentração celular varia durante um processo descontínuo, aumentando normalmente, e como as células constituem o “catalisador” das reações microbianas, o aumento da concentração celular acarreta também na variação das taxas. Assim, seria mais correto analisar as velocidades instantâneas em relação à concentração celular (X). Logo, torna-se necessária a definição das velocidades específicas de crescimento celular (μ_x ou μ), consumo de substrato (μ_s) e de formação de produto (μ_p), nas formas que seguem:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt} \right)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

Conforme as definições de velocidades instantâneas e velocidades específicas, os rendimentos resultam das seguintes relações:

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu_X}{\mu_S}$$

$$Y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{\mu_P}{\mu_S}$$

5.2 Fases de crescimento celular

Quando uma quantidade de microrganismos é colocada num meio com concentração limitada de nutrientes, o crescimento passa por diferentes fases (Figura 39). A saber:

- Fase lag: chamada também de “fase de adaptação”, em que nenhum crescimento aparente ocorre, uma vez que ocorre uma adaptação das células ao novo meio de cultivo;
- Fase exponencial: também chamada de “fase logarítmica” ou “fase log”, em que ocorre um aumento exponencial do número de células, atingindo-se a sua velocidade máxima;
- Fase estacionária: a população atinge sua população máxima e constante;
- Fase de morte: devido ao acúmulo de metabólitos e limitação de nutrientes, eventualmente poderá ocorrer uma fase de declínio do número de células, característico da fase de morte.

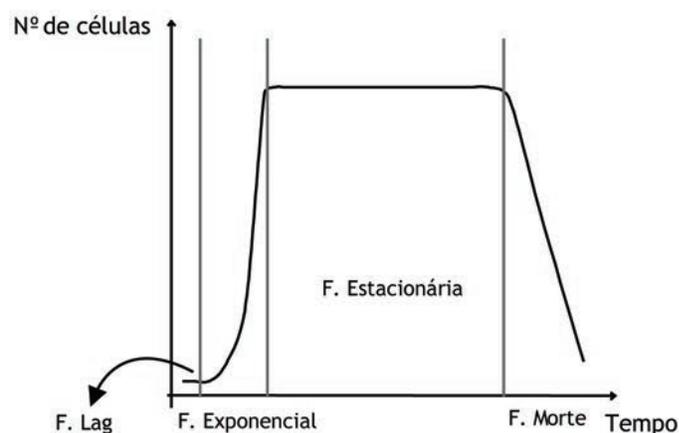


Figura 39 Fases de crescimento celular.

Todas as fases apresentam características que podem ser aproveitadas nos processos microbiológicos. Geralmente os objetivos são a minimização da fase lag, a obtenção da máxima velocidade de crescimento microbiano, a extensão da fase exponencial e o retardamento da fase estacionária. Para controle das diferentes fases de crescimento é necessário o entendimento de como cada variável influencia o processo.

A fase lag, normalmente indesejável, é uma adaptação do microrganismo à composição do meio de cultivo onde este é inoculado, da idade do inóculo (velocidade de crescimento) e do volume. A forma de minimizar ou até mesmo eliminar essa fase é fazer inóculos sucessivos em volumes crescentes até que o volume de trabalho seja atingido, utilizando meios de cultura idênticos. A mudança de meio implica na adaptação do microrganismo aos novos nutrientes e concentrações, o que requer a síntese de outros tipos de enzimas, necessárias para as novas condições. Múltiplas fases de adaptação podem ser observadas, normalmente devido à existência de diferentes fontes de carbono, no fenômeno conhecido como diauxia. Sendo assim, para minimizar a fase lag, podemos:

- manter o inóculo tão ativo quanto for possível, preferencialmente ainda na fase exponencial;
- a suspensão do inóculo deve ter a mesma composição ou a mais próxima possível da composição do meio usado na etapa final do processo;
- usar uma quantidade de inóculo razoável (5 a 10%) do volume de meio.

Ao final da fase de adaptação, a população de microrganismos começa a multiplicar-se rapidamente, dobrando seu número em espaços regulares de tempo, conforme ilustrado na Tabela 12:

Tabela 12 Quantificação da multiplicação microbiana por fissão binária simples.

Nº de células	Nº de gerações	Quantidade
1	0	$X_0 \cdot 2^0$
2	1	$X_0 \cdot 2^1$
4	2	$X_0 \cdot 2^2$
8	3	$X_0 \cdot 2^3$
	N	$X_0 \cdot 2^N$

Assim, após N gerações, teremos uma quantidade de células (X) relacionada com a quantidade inicial ou inóculo (X_0) de:

$$X = X_0 2^N$$

Considerando μ na fase exponencial de crescimento, temos que:

$$\mu = \left(\frac{1}{X} \right) \frac{dX}{dt}$$

Rearranjando, temos:

$$\mu \cdot dt = \frac{dX}{X}$$

Integrando, obtêm-se:

$$\mu = \frac{\ln(X/X_0)}{t - t_0}$$

Na relação anterior, μ é a velocidade específica de crescimento na fase exponencial, chamada de máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), correspondendo à máxima inclinação obtida na parte linear da curva, como ilustrado na Figura 40. O intervalo de tempo " $t - t_0$ " corresponde exatamente ao período da fase exponencial; " X_0 " seria a concentração celular no início da fase log, enquanto " X " seria a concentração celular no final da fase log.

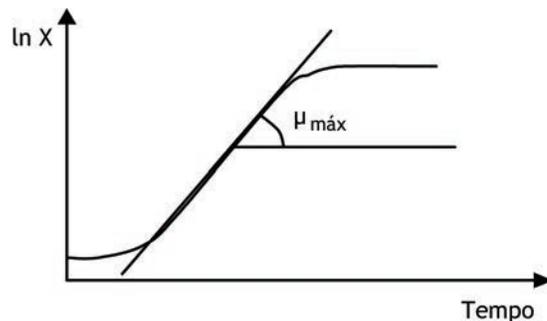


Figura 40 Caracterização de $\mu_{\text{máx}}$.

Outro parâmetro importante pode ser definido para a fase exponencial de crescimento, o chamado tempo de geração (t_g), ou seja, o tempo que os microrganismos levam para duplicar a sua biomassa ($X = 2 \cdot X_0$):

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln(2X_0/X_0)}{t_g} = \frac{\ln 2}{t_g}$$

Assim:

$$t_g = \frac{0,693}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

O tempo de geração é importante na interpretação do crescimento celular, uma vez que d uma ideia mais prática de quão rápido ocorre o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A Tabela 13 ilustra velocidades máximas de crescimento e tempo de geração para alguns microrganismos, com destaque para *Saccharomyces cerevisiae*, com crescimento mais intenso e conseqüente menor tempo de geração a 30°C, temperatura mais adequada.

Tabela 13 Velocidades de crescimento e tempo de geração para alguns microrganismos.

Microrganismos	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	tg (h)
<i>Aspergillus niger</i> a 30°C	0,2	3,46
<i>Penicillium chrysogenum</i> a 25 °C	0,123	5,65
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 20 °C	0,14	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 30 °C	0,32	2,2

5.3 Cinética de Monod

Se somente um substrato é limitante, os outros encontram-se em excesso, de forma que somente a mudana da concentração do substrato limitante é relevante e a cinética de crescimento varia tipicamente numa forma hiperbólica, como mostrado na Figura 41. S  o substrato limitante, normalmente a fonte de carbono, e μ a velocidade específica de crescimento no início do processo, mantendo a concentração de substrato praticamente constante. Monod, em 1942, expressou esse tipo de curva de forma idêntica  de Michaelis-Menten para enzimas.

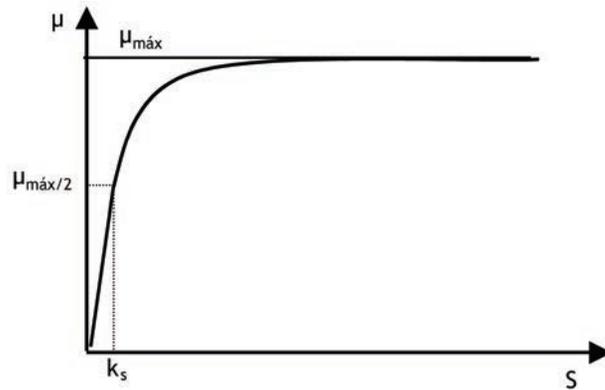


Figura 41 Cinética de crescimento de Monod.

Assim:

$$\mu = \mu_{máx} \frac{S}{k_s + S}$$

Na Equação de Monod, k_s é chamada constante de Monod ou constante de saturação. Sua análise pode ser feita de forma análoga à equação de Michaelis-Menten para enzimas:

- quando $S \gg k_s \Rightarrow \mu = \mu_{máx}$ ($S > 10 k_s$): região de cinética de ordem zero da curva;
- quando $S \ll k_s \Rightarrow \mu = k_s$ ($S < 0,10 k_s$): região de primeira ordem da curva, com a velocidade dependente da concentração do substrato limitante.

k_s pode ser definido como afinidade do microrganismo pelo substrato, e corresponde à concentração de substrato quando a velocidade vale a metade do seu valor máximo:

$$\mu = \frac{\mu_{máx}}{2} \Rightarrow k_s = S$$

A determinação de k_s e $\mu_{máx}$ é mais bem feita pela linearização da equação de Monod, ilustrada pela Figura 42.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{k_s}{\mu_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S}$$

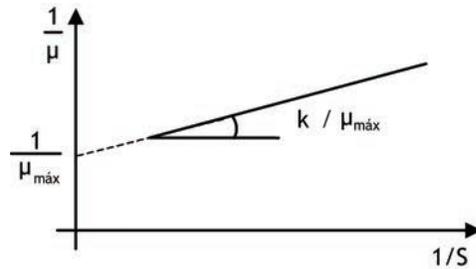


Figura 42 Linearização da Equação de Monod.

5.4 Modelos de crescimento celular

Os modelos matemáticos de estimativa de crescimento celular mais simples são chamados de “não estruturados”, ou seja, trata a fase biótica como sendo formada apenas por um elemento (normalmente massa celular) que se multiplica em crescimento balanceado. Podemos citar todas as relações apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 Modelos cinéticos para estimativa da velocidade de crescimento.

Monod	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{k_s + S}$
Teissier	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} (1 - e^{-S/k_s})$
Moser	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S^n}{k_s + S^n}$
Contois & Fugimoto	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{k_s \cdot x + S}$

A produção de um dado metabólito pode estar intimamente associada ao crescimento celular, de forma que só haverá formação de produto quando ocorrer crescimento. A cinética de formação de produtos pode ser descrita de forma simples, segundo a descrição de Gaden e Luedeking-Piret. A inter-relação entre produção e crescimento pode ser ilustrada pela Figura 43.

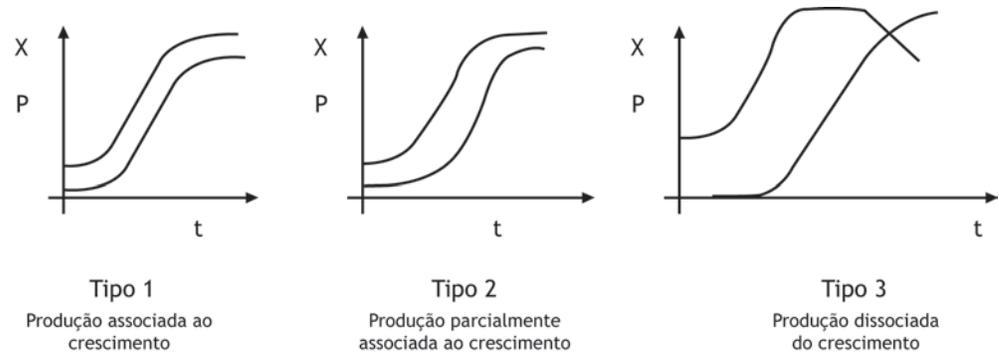


Figura 43 Classificação de crescimento associado à formação de produtos.

Luedeking e Piret, em 1959, propuseram o seguinte modelo para a formação de produto:

$$\frac{dP}{dt} = \underbrace{\alpha \frac{dX}{dt}}_{\text{Termo de produção associada ao crescimento}} + \underbrace{\beta \cdot X}_{\text{Termo de produção associada à massa celular}}$$

Assim:

Tipo 1: $\mu_P = \alpha\mu = Y_{P/X}\mu$

Tipo 2: $\mu_P = \alpha\mu + \beta$

Tipo 3: $\mu_P = \beta$

O modelo de Luedeking-Piret é o que apresenta maior aplicação para explicar o surgimento do produto. Microrganismos “tipo 1” são aqueles em que o termo associado ao crescimento (α) é muito superior ao termo associado à quantidade de biomassa (β) e reflete os casos em que o surgimento do produto está fortemente associado ao crescimento celular. Por outro lado, os microrganismos “tipo 3” são aqueles em que o parâmetro β é muito superior a α , caracterizando a produção de metabólitos secundários ou o surgimento de produtos na fase estacionária de crescimento, conforme observado na Figura 43. Os microrganismos “tipo 2” apresentam um comportamento intermediário.

5.5 Influência de parâmetros físico-químicos no crescimento celular

As velocidades de crescimento até aqui analisadas dizem respeito a condições de pH e temperatura constantes. A variação nesses fatores leva à variação quantitativa no rendimento dos processos e à extensão de determinadas fases de crescimento.

O pH ou concentração de H^+ pode afetar grandemente a atividade biológica. De forma geral, sempre existe um pH ótimo para uma dada propriedade específica do microrganismo, como crescimento e formação de produto. Num desenvolvimento de processo, essas características têm de ser levadas em conta no momento da otimização, ou seja, na busca pelas condições ótimas de crescimento ou produção de um componente desejado. A Figura 44 apresenta o perfil típico de velocidade de crescimento relativa ($\mu/\mu_{m\acute{a}x}$) e formação de produtos para uma faixa de pH.

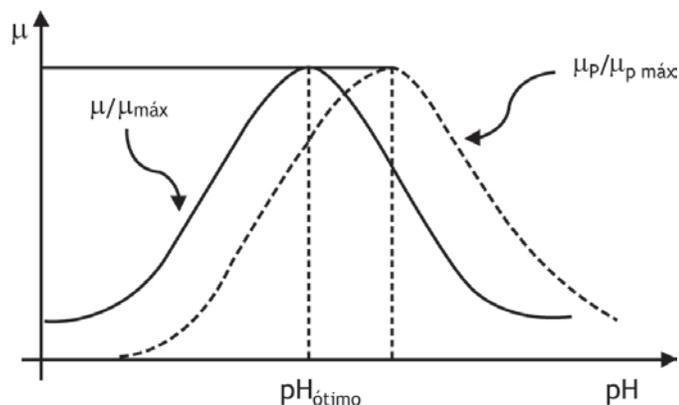


Figura 44 Perfil do processo microbiológico para diferentes pHs.

As reações que ocorrem dentro das células são influenciadas pela temperatura, sendo que as velocidades de reação são dadas pela equação de Arrhenius:

$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right),$$
 em que k é a velocidade das reações; A é a constante

de Arrhenius; E_a é a energia de ativação da reação; R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta. Observa-se normalmente uma curva típica, conforme a Figura 45.

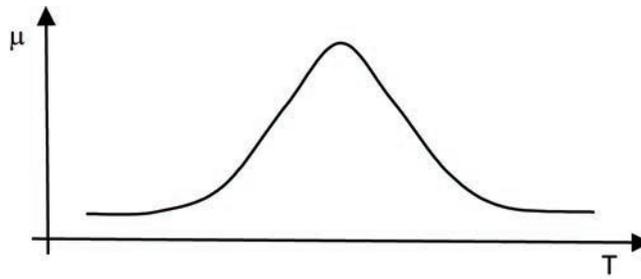


Figura 45 Influência da temperatura na velocidade específica de crescimento.

Na Figura 45, podemos verificar a existência de uma região de ativação térmica a temperaturas inferiores à temperatura ótima e uma região de morte celular a temperaturas superiores, num comportamento similar ao efeito da temperatura sobre as enzimas. A classificação de microrganismos em termos da dependência da velocidade de reação em função da temperatura é ilustrada na Tabela 15.

Tabela 15 Classificação dos microrganismos segundo a temperatura ótima de crescimento.

	T (°C)		
	Mínimo	Ótimo	Máximo
Termófilos	40 a 45	55 a 75	60 a 80
Mesófilos	10 a 15	30 a 45	35 a 47
Psicrófilos obrigatórios	- 5 a 5	15 a 18	19 a 22
Facultativos	- 5 a 5	25 a 30	30 a 35

Em um modelo não estruturado, se ocorre o fenômeno da mudança de temperatura durante o processo, este deve ser incorporado à expressão matemática. De forma geral, as constantes cinéticas incorporam o efeito dos parâmetros físico-químicos. No caso da temperatura, temos que:

$$\mu_m(T) = \mu_m^* \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) - k_d^* \exp\left(\frac{-E_d}{RT}\right), \text{ sendo que } k_d^* \text{ é a constante cinética}$$

de morte celular ou inativação térmica.

UNIDADE 6

Operações unitárias dos processos
fermentativos

O cultivo industrial de microrganismos é geralmente operado segundo uma sequência básica: controle da matéria-prima, preparo dos substratos, incubação e controle do bioprocesso.

A maioria das indústrias usa matérias-primas que contêm açúcares fermentescíveis ou substâncias que levam à formação destes. Entretanto, há microrganismos que metabolizam outros materiais que não contêm açúcares, levando à produção de diversos metabólitos. É o caso, por exemplo, do etanol para a produção de vinagre, e de hidrocarbonetos diversos para a produção de proteínas unicelulares. As matérias-primas para qualquer processo devem ser obtidas e mantidas em condições adequadas de conservação. Assim, melaços e açúcar invertido comercial devem ser armazenados em tanques, em condições de umidade relativa e temperatura apropriada. Açúcar deve ser estocado em armazéns ou silos ou mais herméticos possível para evitar absorção de água. Cereais devem ser armazenados como grãos íntegros, secos, isentos de infestação de insetos, não mofados e com impurezas mínimas. A cana-de-açúcar deve ser colhida e moída o mais rápido possível, sendo armazenada em tempo não superior ao período diário de moagem. Os materiais celulósicos devem também ser protegidos da umidade e da contaminação microbiana.

Os substratos devem apresentar composição capaz de suprir as exigências dos microrganismos, sendo assim, são preparados de acordo com a matéria-prima a ser usada. Materiais amiláceos são hidrolisados, xaropes e melaços são diluídos, uvas e outras frutas, beterraba e cana-de-açúcar sofrem extração de suco. Os líquidos açucarados obtidos têm seu pH corrigido, sendo adicionados nutrientes quando necessário. As Tabelas 16 e 17 ilustram a composição do caldo de cana e do melaço, usados como meio de cultivo na fermentação etanólica. O caldo de cana é utilizado nas chamadas “destilarias autônomas”, utilizando-o exclusivamente para obtenção do etanol. Nas “destilarias anexas”, a matéria-prima submetida à fermentação é o melaço, subproduto da fabricação de açúcar.

Tabela 16 Composição do caldo de cana das destilarias autônomas.

Água	75	86%
Sacarose	14,5	23,5%
Açúcares redutores	0,25	2,0%
Cinzas	0,2	0,7%
Sólidos totais	16	25°Brix
Compostos nitrogenados	0,5	1,5%
pH	5,2	5,8

Fonte: adaptada de Reguly (1998).

Tabela 17 Composição do melaço das usinas de cana-de-açúcar.

Água	17	25%
Açúcares	50	60%
Sacarose	30	40%
Açúcares redutores	10	25%
Gordura	0,3	0,4%
Cinzas	7	9%
Comp. nitrogenados	8	9%
pH	5,2	5,8%
Peso específico	1,46	
°Brix (sólidos totais)	75	88

Fonte: adaptada de Reguly (1998).

O inóculo é definido como quantidade inicial de células suficientes para dar início a um processo microbiano viável economicamente. Quanto mais células forem colocadas em contato com o substrato adequado, mais rápido e econômico será o processo. Por exemplo, nas pequenas cantinas e destilarias de aguardente costuma-se deixar a fermentação ocorrer a partir de microrganismos selvagens, ou seja, aqueles que acompanham os caldos naturais. Nesse caso, obtém-se facilmente grande massa de inóculo, partindo-se de 10 a 20g de leveduras por litro de meio. Costuma-se usar essa quantidade para inocular uma fração inicial do volume total de caldo, deixando a fermentação prosseguir com 13°Brix. Após um período, divide-se o meio fermentado em diversos recipientes e faz-se a realimentação com meios diluídos, até completar o volume total das dornas a serem utilizadas. Também são utilizadas leveduras selecionadas com maior eficiência e tolerância ao etanol, partindo de tubos de culturas selecionadas, fazendo inoculação subsequente de volumes de meio em quantidades e concentrações crescentes (Figura 46). Nesse tipo de propagação, distinguem-se as etapas de laboratório e a industrial. As operações são realizadas em pré-fermentadores com dispositivos de esterilização, aeração, coleta de amostras, inoculação, refrigeração, aquecimento e outros acessórios de instrumentação. Geralmente são proporcionais ao volume das dornas, podendo prover até 10% de volume dos tanques industriais.

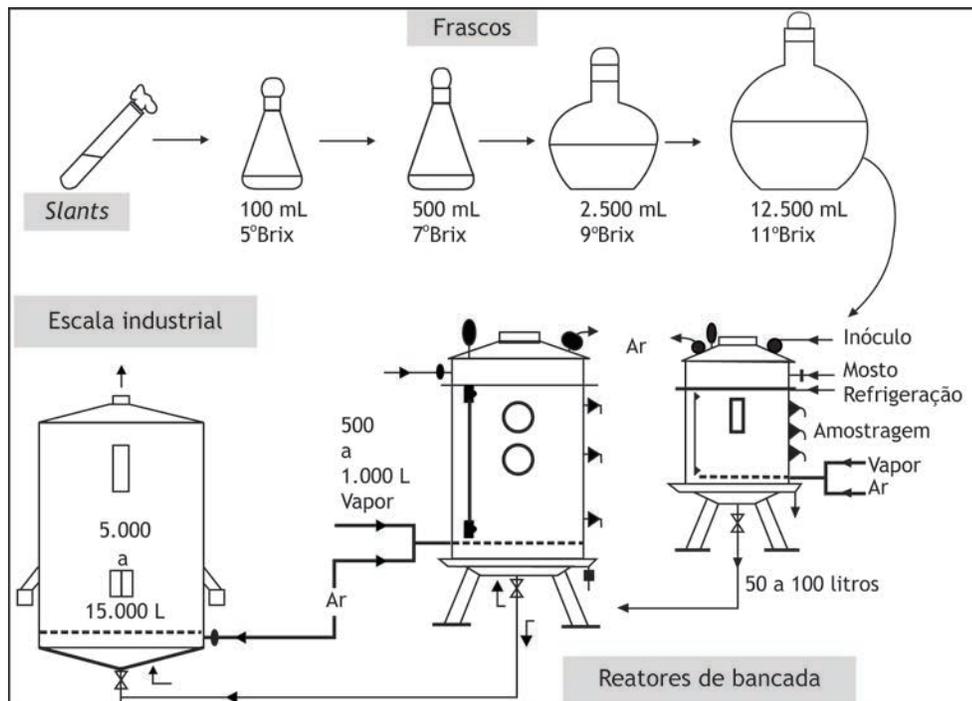


Figura 46 Esquema de propagação do inóculo.
 Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

Na fase laboratorial, a cultura pura adquirida vai sendo sucessivamente escalonada para volumes maiores de mosto esterilizado, na proporção aproximada de 1:5, aumentando gradativamente o teor de açúcar fermentescível a fim de adaptar a levedura a pressões osmóticas crescentes (Figura 47).

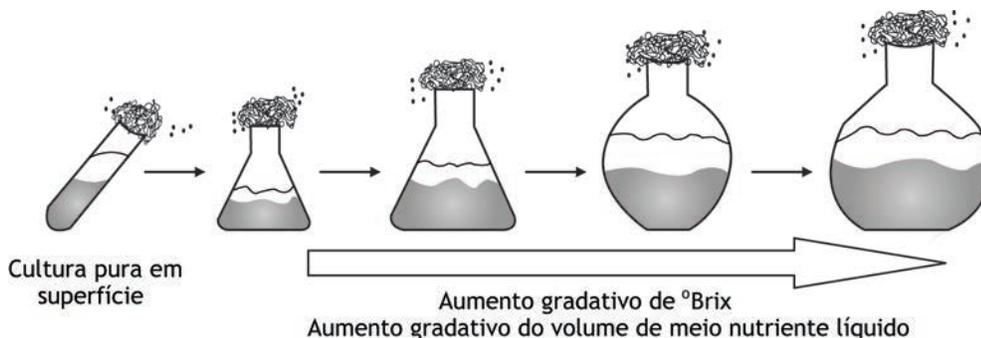


Figura 47 Escalonamento de culturas puras em laboratório.
 Fonte: adaptada de Reguly (1998).

Por exemplo, para a obtenção de leveduras são sugeridos mostos com baixas concentrações de açúcar (o equivalente a cerca de 1,5% em glicose), com forte aeração, com imediato consumo de glicose e baixa formação de álcool. A grande formação de biomassa nessas condições de intensa aeração e limitada concentração de açúcares é conhecida como “Efeito Pasteur”. Em condições aeróbias, basta um meio de cultivo com carboidrato solúvel contendo 0,6% $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$;

0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e elementos traços (Na, Zn, Fe, Cu). Entretanto, em meio anaeróbio, as leveduras requerem um meio muito mais completo, contendo algumas vitaminas. Além disso, na prática industrial, as leveduras distinguem-se em decorrência da predominância com relação ao oxigênio. As leveduras conhecidas como “altas” sobem à superfície do biorreator, permanecendo na forma de uma película ou camada. As leveduras baixas se desenvolvem no fundo do biorreator, mas no decorrer da fermentação sobem à superfície por ação do CO_2 . A Figura 48 exemplifica a propagação de células em aparelhos de cultura pura, com relação de escalonamento de 1:50 e 1:100.

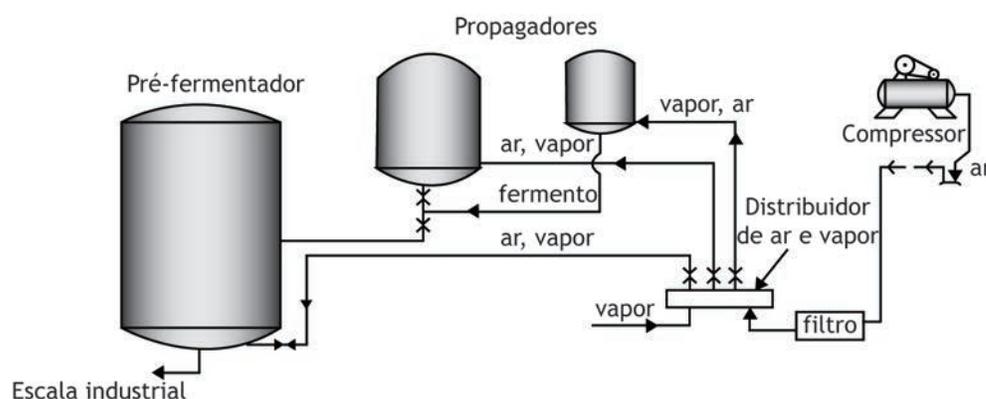


Figura 48 Preparo de inóculo na fase industrial em aparelhos de cultura pura.
Fonte: adaptada de Reguly (1998).

As fermentações devem ser processadas em ambientes limpos, submetidos a cuidados especiais de higiene, assepsia e esterilização, de acordo com as exigências do microrganismo ou dos processos. Higiene é a limpeza dos locais, recipientes, instrumentos, equipamentos e acessórios, a eliminação ou a minimização da ocorrência de materiais que carreguem contaminantes. A higiene estabelece as condições que evitam o desenvolvimento de microrganismos prejudiciais, envolvendo a aplicação de detergentes, germicidas e desinfetantes.

Na fermentação acética, as lavagens frequentes e a assepsia do local são suficientes para manter as condições de operação, uma vez que a temperatura elevada do processo (38 a 45°C) e o baixo pH são elementos de controle dos contaminantes. Na produção de antibióticos, vitaminas, acetona e butanol, por exemplo, são exigidas rigorosas técnicas de assepsia e esterilização.

Um projeto industrial deve satisfazer todos os critérios para a produção econômica de um determinado composto por via fermentativa. Isso representará a escolha das melhores técnicas nas diversas operações unitárias envolvidas. Nesta Unidade vamos atentar para duas das principais operações em biorreações, que podem levar a baixos rendimentos se não forem bem executadas: a esterilização de meios de cultivo e a agitação e aeração dos biorreatores.

6.1 Esterilização

A esterilização de um meio de cultivo ou ambiente é a operação de eliminação de formas vegetativas e esporuladas de microrganismos. A esterilização difere da desinfecção pelo fato de que neste último processo ocorre o emprego de uma substância que destrói ou inibe o crescimento de certos microrganismos em determinados meios. Os agentes de esterilização e desinfecção podem ser físicos ou químicos. Como agentes físicos entendem-se calor (seco ou úmido), filtração e radiação. Como agentes químicos, temos o emprego de ácidos, bases, sais, halogênios, álcoois, aldeídos, éteres e fenóis.

A esterilização pelo calor seco é feita à temperatura de 160-170° C por duas horas, não sendo aplicada em meios de cultivo ou líquidos, mas na vidraria, no material de laboratório e no recheio dos filtros de ar.

A esterilização com calor úmido é feita num ambiente de vapor saturado a 1 atm de pressão ($T = 121^{\circ}\text{C}$) durante 15-20 min. Essas condições são suficientes para a eliminação das formas mais resistentes, os esporos de bactérias. Pode-se utilizar vapor a 100°C , ou seja, usando o calor latente da água ou o vapor à pressão atmosférica, recomendado quando os compostos em solução podem sofrer decomposição em temperaturas muito superiores e quando as condições de cultivo podem inibir naturalmente o crescimento de contaminantes, como o pH baixo. Nesse grupo existe a chamada esterilização simples e a “tindalização”, que é o aquecimento em ambiente úmido com vapor fluente feito a $100^{\circ}\text{C}/30$ min e repetido mais 2 vezes com intervalos de 24 horas. A esterilização com vapor saturado sob pressão é feita em autoclaves a 1 atm (121°C) por 15 a 20 minutos.

Quando uma quantidade de células é submetida a temperaturas muito superiores ao seu ótimo de crescimento, a destruição térmica dos microrganismos pode ser classificada como morte logarítmica (Figura 49), sendo expressa por:

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N,$$

em que N é o número de microrganismos viáveis por mL , k é a constante cinética de destruição térmica (constante de reação de 1ª ordem) em min^{-1} e t é o tempo em minutos.

Integrando a equação anterior temos:

$$\ln \frac{N}{N_0} = -k \cdot t$$

Na Figura 49, a inclinação das retas é numericamente igual à constante cinética de destruição térmica “k” (min^{-1}). O valor absoluto da taxa específica é a medida da resistência térmica do microrganismo: quanto menor esse valor, maior a resistência térmica.

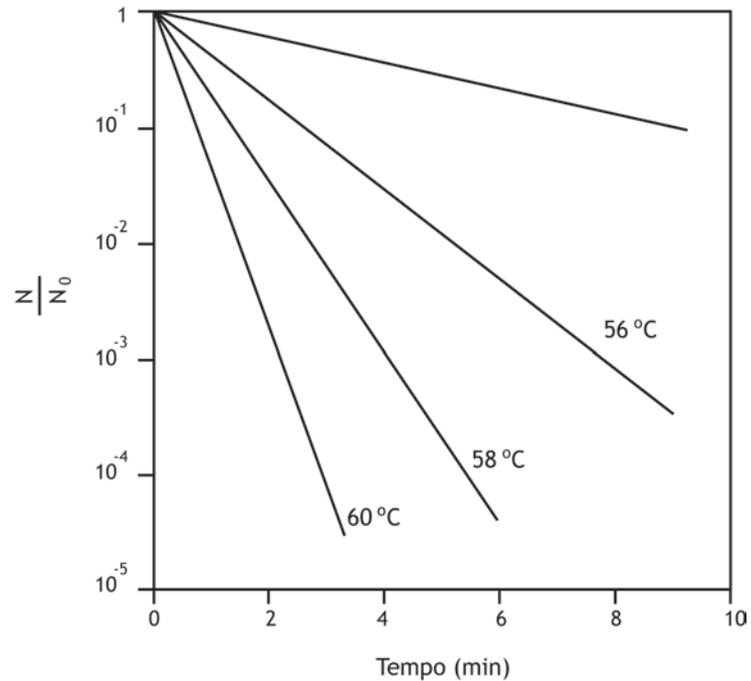


Figura 49 Dados de destruição térmica para *E.coli*. N = número de células viáveis; N_0 = número original de células viáveis.

O parâmetro que caracteriza a resistência térmica de esporos e formas vegetativas é o tempo de redução decimal (D_r), que é definido na Figura 50, para uma temperatura constante. D_r é o tempo necessário para a destruição de 90% dos microrganismos presentes (ciclo logaritmo) a uma temperatura de esterilização constante.

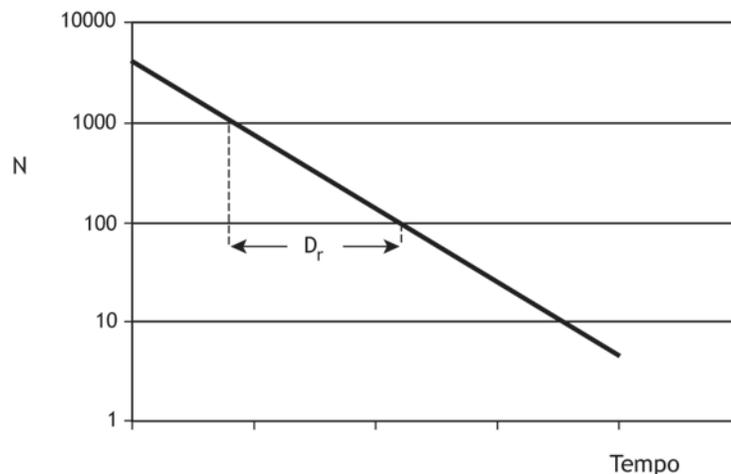


Figura 50 Tempo de redução decimal para temperatura de esterilização.

Na Figura 51 podemos verificar as curvas de inativação térmica de microrganismos e algumas moléculas. Como se pode verificar, os esporos bacterianos são os mais resistentes ao calor. Assim, a esterilização é baseada na destruição dos esporos bacterianos, o que nos garantirá que os outros tipos de contaminantes serão destruídos simultaneamente.

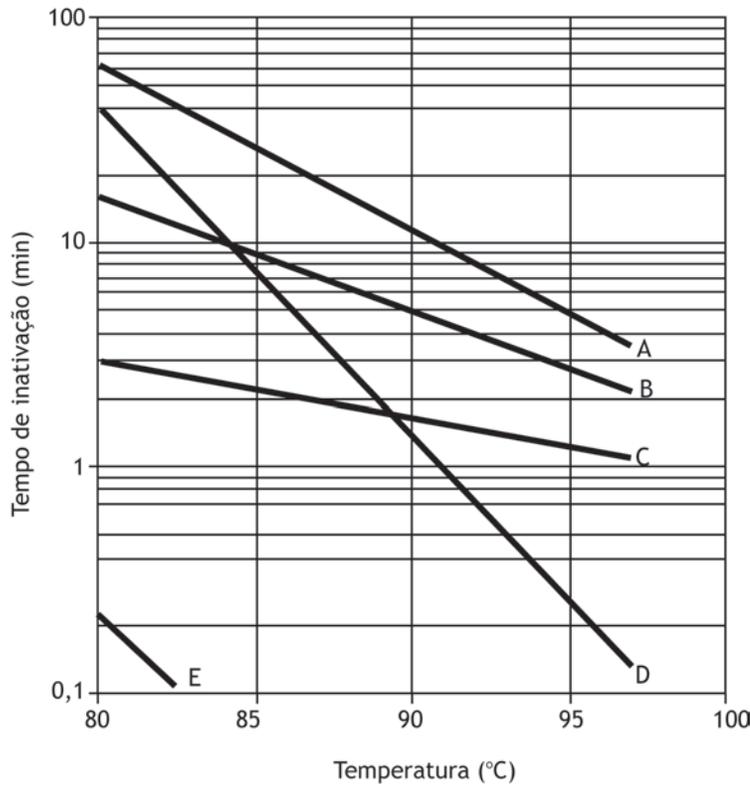


Figura 51 Inativação térmica: a) pectinesterase; b) poligalacturonase; c) ascórbico oxidase; d) *Clostridium pasteurianum*; e) fungos e leveduras.

A constante de destruição térmica “k”, no que diz respeito às suas relações com a temperatura, comporta-se como as constantes de velocidade das reações químicas, podendo ser expressa, portanto, pela reação empírica de Arrhenius:

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

em que A é a constante da equação de Arrhenius; R é a constante universal dos gases perfeitos; T é a temperatura absoluta; e E_a é a energia aparente de ativação da destruição térmica dos microrganismos. Linearizando a Equação de Arrhenius, temos:

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{R} \frac{1}{T}$$

Graficando $\ln k$ vs. $1/T$, a inclinação da reta resultante é numericamente igual à E_a/R .

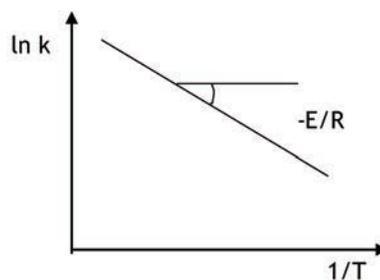


Figura 52 Linearização da Equação de Arrhenius.

A energia de ativação é a medida da suscetibilidade do microrganismo ao calor. Para a maioria dos microrganismos, a energia de ativação de destruição térmica encontra-se entre 65 e 85 kcal. A alta temperatura destrói os microrganismos e certos compostos presentes no meio de cultura e que são sensíveis ao calor, como as vitaminas do complexo B (Tabela 18).

Tabela 18 Energias de ativação para destruição de esporos bacterianos e de algumas vitaminas.

	Energia de ativação (cal/mol)
Ácido fólico	16800
Cianocobalamina	23100
Tiamina	22000
<i>B. stearothermophilus</i>	67700
<i>B. subtilis</i>	76000
<i>C. botulinum</i>	82000
Vitamina C	23100
Vitamina A	14600

Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

O fermentador e o mosto podem ser esterilizados em conjunto ou separadamente. Em conjunto, isso pode ser feito por vapor indireto (serpentina ou camisa) ou direto, nesse caso, pelo fundo da dorna. Assim, ocorrerá diluição e isso deve ser levado em conta quando da diluição da matéria-prima.

A esterilização do meio de cultivo de forma descontínua se dá em recipiente, o qual é interligado à dorna por uma tubulação que também é esterilizada antes da transferência. Esse processo é muito empregado na esterilização de mostos amiláceos, sendo aproveitado para cozimento e gelatinização ou solubilização do amido. Normalmente o tempo gasto nesse processo de esterilização é de algumas horas, pois deve ser considerado também o tempo necessário para aquecer e

resfriar o mosto.

O meio de cultivo pode ser esterilizado em sistemas contínuo com injeção de vapor, conforme a Figura 53. Nesse caso, o líquido circula através de uma tubulação. Uma das seções dessa tubulação (tubo de espera) é isolada termicamente e o tempo que o mosto leva para percorrer essa seção em temperatura praticamente constante é o tempo de esterilização propriamente dito.

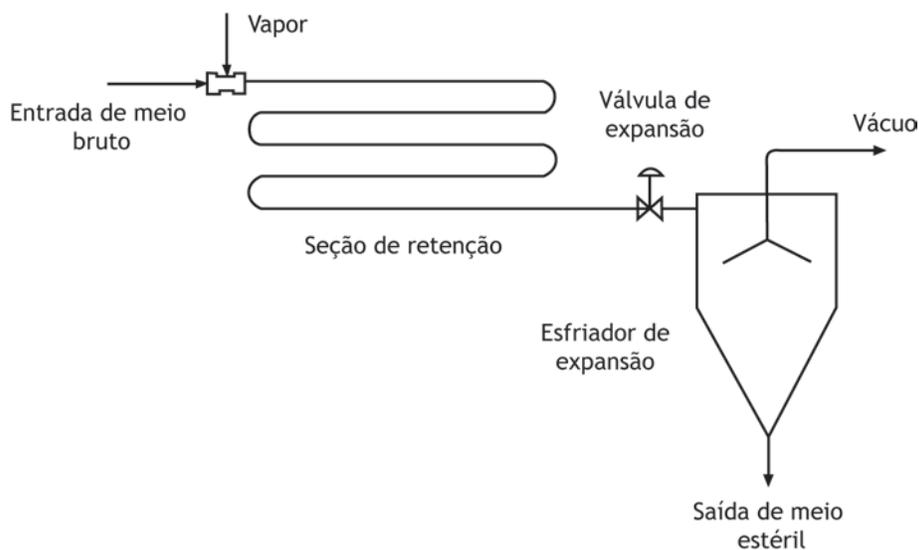


Figura 53 Esquema de esterilização contínua.

As vantagens dos processos contínuos incluem:

- flexibilidade de tempo e de temperatura;
- o líquido permanece menos tempo em contato com temperatura elevada, minimizando as degradações;
- menor consumo de vapor;
- ausência de incrustação;
- permite alimentar continuamente um reator;
- controle automatizado.

A maior aplicação da filtração na indústria de fermentações é a esterilização do ar. Assim, tanto a lã de vidro quanto a lã de rocha apresentam bons resultados na filtração do ar, com eficiências próximas de 99% (Figura 54).

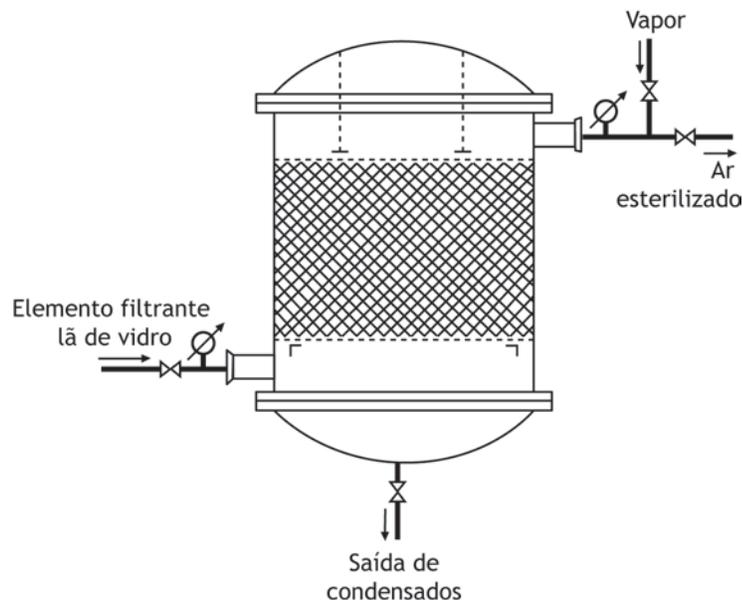


Figura 54 Esquema de um filtro típico de esterilização de ar.

6.2 Agitação e mistura

Os processos microbianos conduzidos em aerobiose encontram uma situação de enorme destaque entre os cultivos microbianos de interesse industrial, incluindo produção de antibióticos, enzimas, vitaminas, biomassa, proteínas recombinantes e tratamento biológico de águas residuárias. Em todos esses casos há a necessidade de um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio, que compreende a operação de dissolução do oxigênio contido na fase gasosa (ar ou oxigênio puro) para a fase líquida, em que ocorre o consumo pelos microrganismos.

A importância bioquímica do oxigênio é vital, uma vez que é o último elemento a aceitar elétrons ao final da cadeia respiratória, sendo reduzido a água para reoxidação das coenzimas que participam da desidrogenação durante a glicólise e Ciclo de Krebs, permitindo ainda o armazenamento da energia pela passagem das moléculas de ADP para ATP. Considerando que para que ocorra a oxidação de 1 mol de glicose são necessários 6 mols de oxigênio, é óbvia a necessidade de agitar e aerar um meio de cultivo em processos aeróbios. Outra constatação é que normalmente é possível dissolver quantidades consideráveis das fontes de carbono e nitrogênio, além dos micronutrientes. Já o oxigênio é pouco solúvel em água e menos ainda em líquidos contendo solutos. De fato, a concentração de oxigênio dissolvido na saturação é da ordem de 7 mg/L, borbulhando-se ar atmosférico à pressão de 1 atm a 35°C. Assim, não resolve dissolver, por exemplo, grandes quantidades de glicose por litro de meio de

cultivo sem introduzir ao longo do processo oxigênio suficiente para suportar a condição de aerobiose. Por isso é que muitas vezes o período máximo de alto rendimento de cultivo em batelada depende da capacidade do biorreator de transferir oxigênio para a solução.

6.2.1 Transferência de oxigênio

O objetivo principal de um sistema de agitação e aeração é fazer com que o oxigênio da fase gasosa passe para a fase líquida e chegue até as células suspensas, atingindo o local específico onde será consumido. Sendo assim, didaticamente imaginamos várias resistências ao transporte de oxigênio, ilustradas na Figura 55, a saber:

- (i) transferência do interior da bolha para a interface gás-líquido;
- (ii) movimento através da interface gás-líquido;
- (iii) difusão através do filme líquido estagnado ao redor das bolhas;
- (iv) transporte através do seio do líquido;
- (v) difusão através do filme líquido formado ao redor das células;
- (vi) movimento através da interface líquido-células;
- (vii) na presença de agregados celulares, difusão através dos sólidos até as células individuais;
- (viii) transporte via citoplasma até o local da reação.

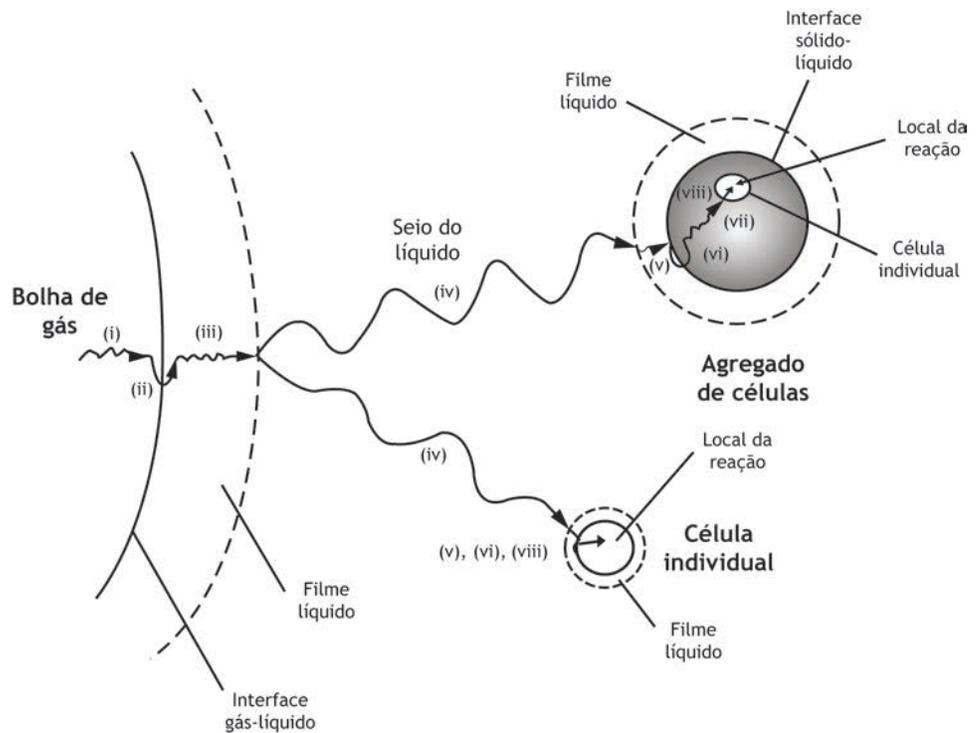


Figura 55 Etapas da transferência de oxigênio das bolhas de ar para as células.
 Fonte: adaptada de Bailey & Ollis (1986).

Logicamente, as relativas magnitudes das várias resistências à transferência de massa dependem da composição e propriedades reológicas do líquido, intensidade de mistura, tamanho de bolha, tamanho dos agregados celulares, características de adsorção nas interfaces. Algumas considerações podem ser feitas para elucidar o estudo da transferência de massa nesses casos:

1. a transferência de massa na fase gasosa dentro da bolha é relativamente rápida;
2. a interface gás-líquido apresenta resistência baixa;
3. o filme líquido ao redor das bolhas é a maior resistência à transferência de massa;
4. em sistemas bem misturados, os gradientes de concentração no seio do líquido são evitados;
5. como as células são muito menores que as bolhas, o filme líquido formado ao redor das células é desprezível, assim como a resistência na interface líquido-células;
6. quando as células crescem como *pellets*, a resistência intrapartículas pode ser importante;
7. a resistência ao transporte de oxigênio intracelular é desconsiderada devido às baixas distâncias envolvidas.

A transferência de oxigênio ocorre de acordo com a “Teoria do Filme Estagnado”, sugerindo a existência de um filme delgado em cada lado da interface, com a transferência de massa ocorrendo apenas por difusão (Figura 56). Assim, a maior resistência à transferência de massa acontece no filme estagnado.

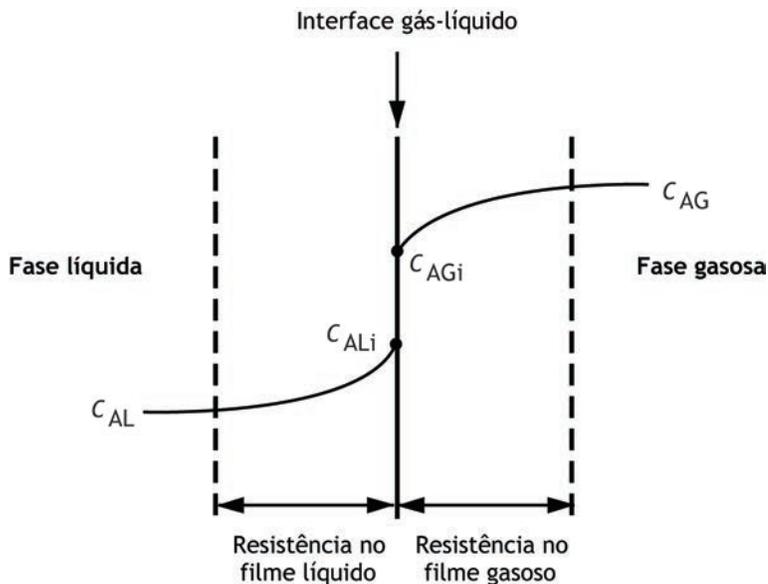


Figura 56 Transferência de massa gás-líquido e a representação esquemática da Teoria do Filme Estagnado.

Fonte: adaptada de Doran (1995).

Nesta situação, temos que definir a taxa de transporte de oxigênio no gás (N_{AG}) e no líquido (N_{AL}):

$$N_{AG} = k_G a (C_{AG} - C_{AGi})$$

$$N_{AL} = k_L a (C_{ALi} - C_{AL})$$

Nas relações anteriores, k_G é o coeficiente de transferência de massa na fase gasosa; a é a área de transferência de massa (área/volume); C_{AG} é a concentração de oxigênio no gás; C_{AGi} é a concentração de oxigênio na interface gás em equilíbrio com o líquido; k_L é o coeficiente de transferência de massa no líquido; C_{ALi} é a concentração de oxigênio na interface líquida em equilíbrio com o gás e C_{AL} é a concentração de oxigênio no líquido. A definição dos coeficientes de transferência de massa dá ideia da resistência ao transporte de oxigênio. Como a maior resistência ocorre na fase líquida, no filme líquido ao redor das bolhas de ar, a segunda equação é a mais utilizada e o $k_L a$ é a constante que define a capacidade de um biorreator em transferir oxigênio para a fase líquida

independente do volume do tanque. Nesse caso, C_{AL} é definido como a concentração de saturação ou a solubilidade de oxigênio na fase líquida (C^*).

O balanço de oxigênio durante um cultivo aeróbio é dado por:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) - Q_{O_2} X$$

Na expressão, o termo da esquerda refere-se ao acúmulo de oxigênio no sistema. O primeiro termo da direita indica quanto de oxigênio está sendo transferido para a fase líquida, enquanto o termo final é a demanda de oxigênio pelas células, o quanto é consumido (dado pela taxa específica de consumo de oxigênio “ q_o ”) e a quantidade de células, X . Em situações em que não há acúmulo de oxigênio, ou seja, regime permanente:

$$k_L a (C^* - C) = q_o X$$

A partir dessa relação podemos extrair informações úteis, como a máxima concentração de células possível para essa condição de aeração ($X_{máx}$):

$$X_{máx} = \frac{k_L a (C_{AL}^* - C_{AL})}{q_o}$$

Outra informação importante é o valor de $k_L a$ necessário para suportar o sistema ou mantê-lo a uma concentração de oxigênio acima do valor crítico. Concentração crítica de oxigênio pode ser definida como concentração capaz de manter o consumo conforme reação de ordem zero, de acordo com a Figura 57. Assim, o $k_L a$ necessário para isso é chamado “ $k_L a$ crítico” estimado por:

$$k_L a_{crit} = \frac{q_o X}{(C_{AL}^* - C_{crit})}$$

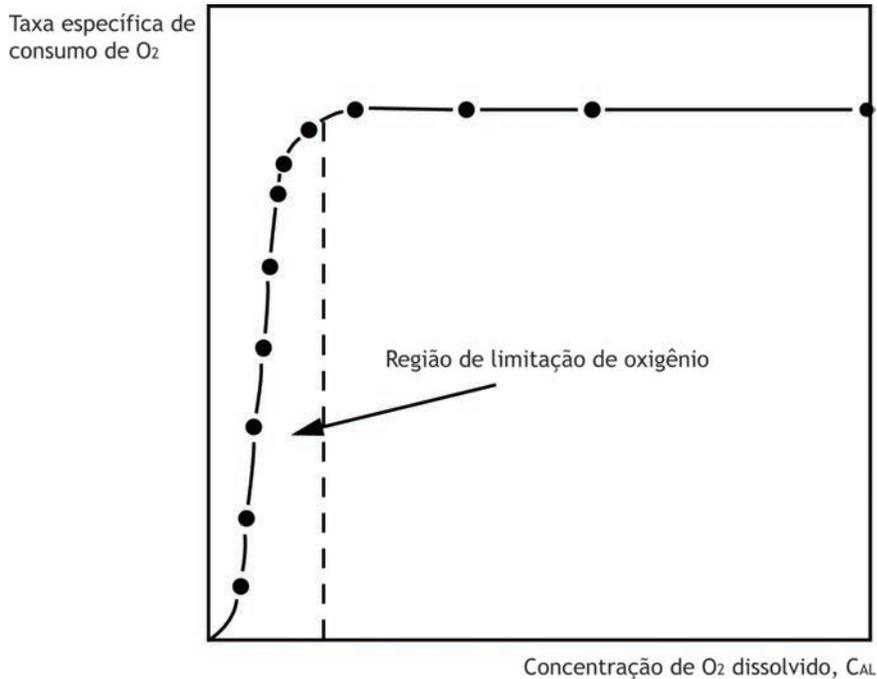
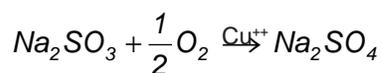


Figura 57 Perfil da taxa específica de consumo de oxigênio e região de limitação abaixo da concentração crítica.

Fonte: adaptada de Doran (1995).

Fica claro que para avaliar as condições de transferência de oxigênio deve-se estimar o coeficiente global de transferência gás-líquido ($k_L a$). Assim, entre alguns métodos existentes, os mais utilizados são:

- Método do sulfito: baseia-se no consumo do oxigênio solúvel por sulfito de sódio na presença de cobre como catalisador. É um método químico não utilizado na presença de microrganismos devido à toxidez do sulfito.



- Método do balanço de oxigênio: baseia-se no balanço de oxigênio na entrada e saída do reator; em que V_L é o volume de líquido, F_g é a vazão de ar e C_{AG} a concentração de oxigênio no gás. $(F_g C_{AG})_i$ é a quantidade de oxigênio que entra no reator, enquanto $(F_g C_{AG})_o$ é a quantidade que sai.

$$Na = \frac{1}{V_L} [(F_g C_{AG})_i - (F_g C_{AG})_o]$$

- Método dinâmico: baseia-se no corte do fornecimento do oxigênio e posterior oxigenação (Figura 58), sendo o $k_L a$ estimado na região de realimentação do ar, a partir da curva linearizada (Figura 59).

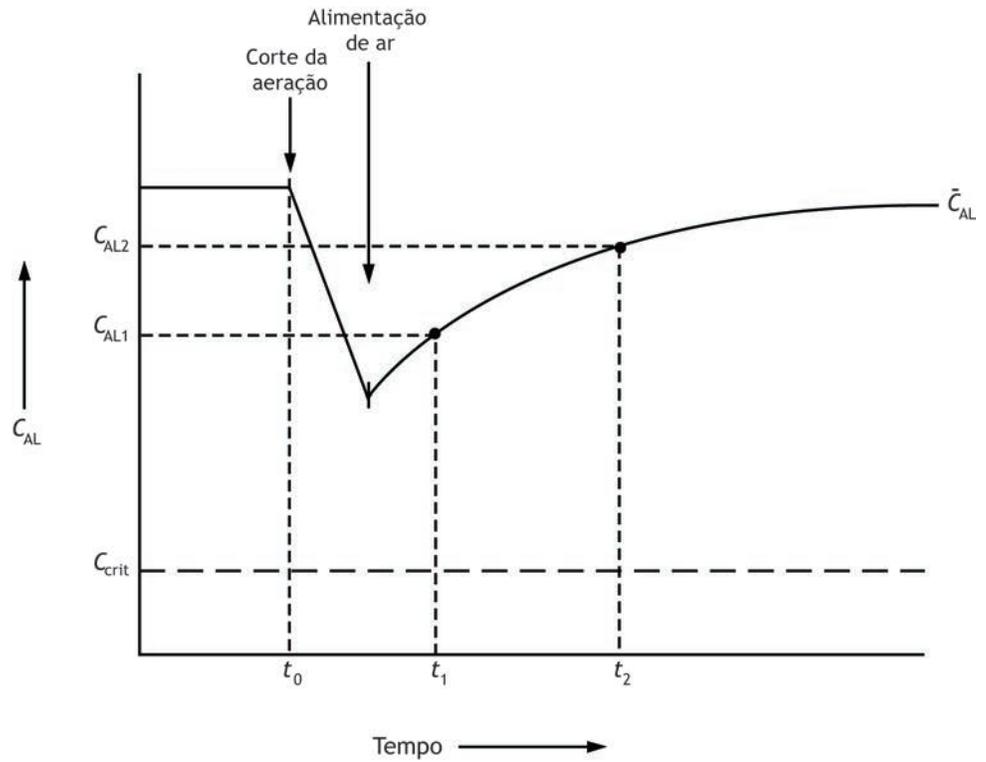


Figura 58 Estimativa do $k_L a$ pelo método dinâmico.

Fonte: adaptada de Doran (1995).

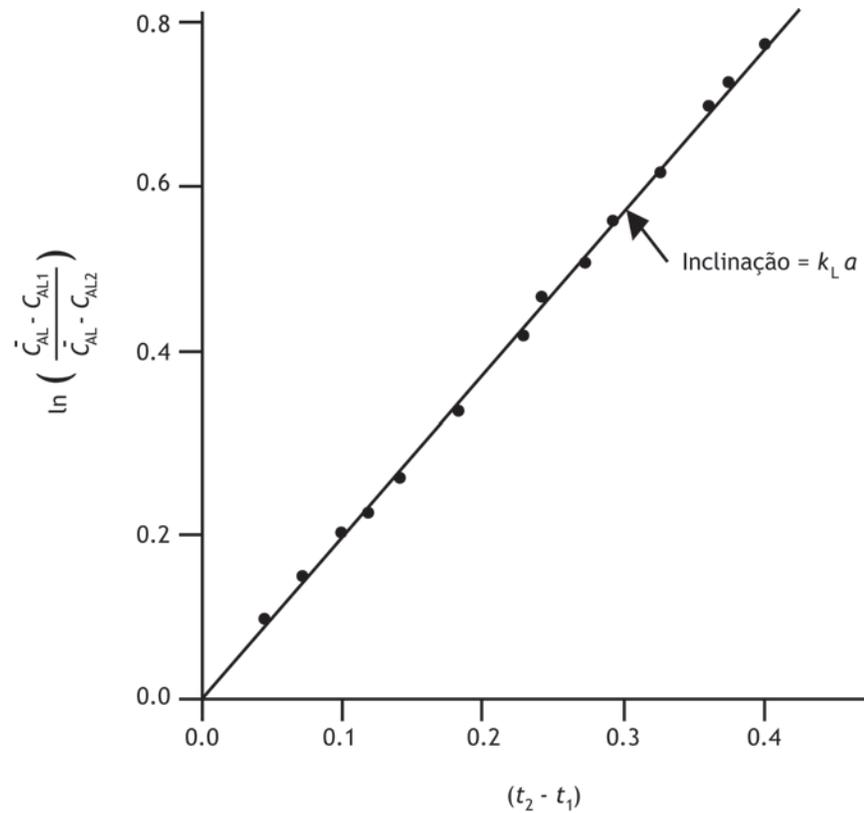


Figura 59 $k_L a$ pela inclinação da curva de dados linearizados na reoxigenação.

Fonte: adaptada de Doran (1995).

6.2.2 Agitação mecânica sem aeração

Nos biorreatores, as propriedades dos fluidos afetam as exigências energéticas e a efetividade da mistura. Esses fluidos normalmente apresentam sólidos suspensos, mais de uma fase presente e comportamento não newtoniano. Vários fatores afetam a viscosidade e o comportamento reológico do meio de cultivo (fase líquida do biorreator), entre eles:

- concentração celular;
- morfologia celular;
- pressão osmótica;
- concentração de substratos e produtos poliméricos;
- taxa de cisalhamento.

A agitação nos bioprocessos tem como objetivo tornar ou manter a homogeneidade das soluções, manter sólidos em suspensão e tornar eficiente o transporte de massa e energia. Dessa forma, movimenta-se o fluido e transmite-se potência ao líquido. A mistura é a operação física que faz isso, reduzindo a não uniformidade no fluido, eliminando gradientes de concentração, temperatura e outras propriedades. Um sistema misturado é aquele que apresenta uma distribuição randômica homogênea das propriedades do sistema. A agitação envolve:

- mistura de componentes solúveis no meio (açúcares);
- dispersão de gases no meio líquido, formando pequenas bolhas;
- suspensão de partículas sólidas, incluindo as células;
- quando necessário, dispersar líquidos imiscíveis formando emulsões;
- transferência de calor.

A capacidade de transmitir potência ao líquido depende do tipo de impelidor (agitador), seu diâmetro e frequência de agitação, o diâmetro do tanque e a altura da coluna de líquido, além das características deste, como densidade e viscosidade. Alguns sistemas de agitação e mistura são ilustrados na Figura 60:

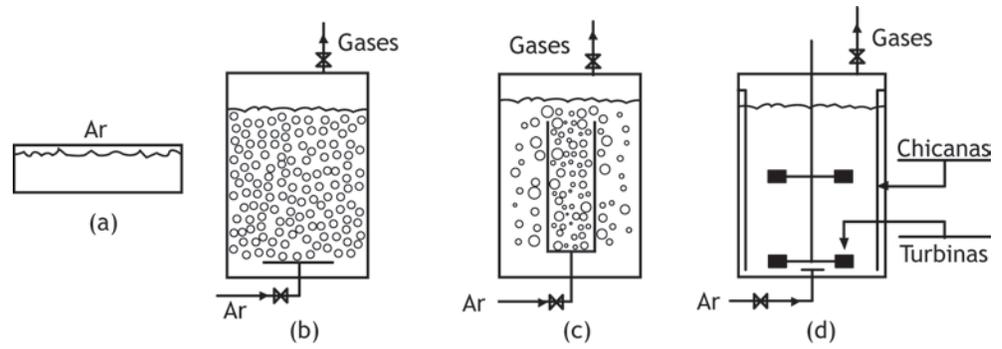


Figura 60 Sistemas de transferência de oxigênio em biorreatores: a) lagoa/bandeja; b) coluna de bolhas; c) air-lift; d) tanque agitado e aerado.

Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

É comum o uso de relações geométricas como a relação entre o diâmetro do tanque e o diâmetro do impelidor (D_t/D_i), altura da coluna de líquido e diâmetro do impelidor (H_L/D_i), tamanho dos defletores e do tanque (W_b/D_t). Os principais tipos de impelidores utilizados para a agitação de biorreatores são apresentados na Figura 61.

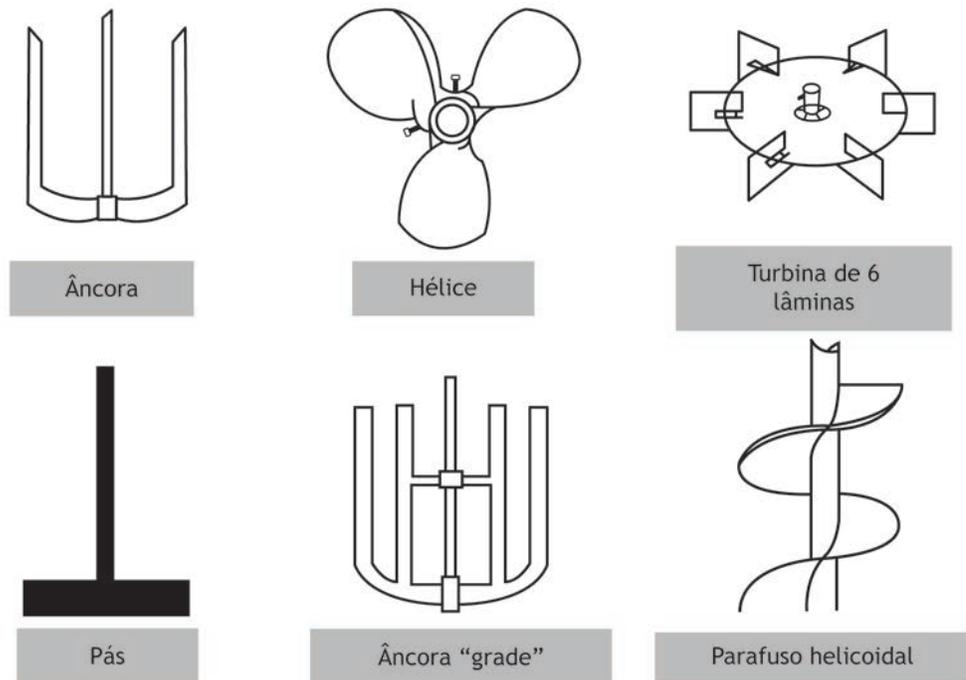


Figura 61 Tipos de impelidores.

Fonte: adaptada de Doran (1995).

Algumas das relações geométricas típicas para tanques com diferentes impelidores apresentados na Figura 62 são: $D_t/D_i = 3$; $H_L/D_i = 3$; $H_f/D_t = 1$; $W_b/D_t = 0,1$; número de defletores = 4.

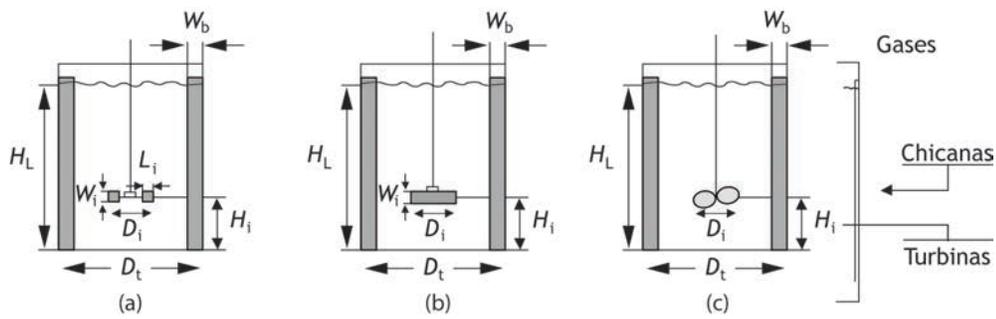


Figura 62 Esquema para tanques com impelidores: a) tipo Rushton; b) pás; c) hélice.

Fonte: adaptada de Doran (1995).

Referências

- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering*. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1986.
- DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press, 1995. 439 p.
- REGULY, J. C. *Biotecnologia dos processos fermentativos*. Pelotas: EDUFPeI, 1998. v. 2.
- SCHMIDELL, W. et al. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

UNIDADE 7

Biorreatores

Os biorreatores ou reatores bioquímicos são o centro dos processos biotecnológicos, compreendendo reatores ou tanques onde uma dada reação bioquímica ocorre. Essa reação pode ser o resultado do crescimento de microrganismos ou uma reação catalisada por enzimas. No primeiro caso, podemos dizer que o biorreator é um fermentador ou dorna. O estudo do projeto, o dimensionamento e o comportamento dos biorreatores, é possível de ser efetuado pela combinação de conhecimentos de cinética das reações biológicas com balanços de energia e massa.

7.1 Biorreatores de mistura

Os reatores de mistura são aqueles em que há ausência ou quase ausência de gradientes de concentração e temperatura. Existem, basicamente, três modos de operação de um sistema batelada em reatores de mistura:

- processos em que a dorna recebe um inóculo;
- processos com recirculação do microrganismo;
- processo por meio de cortes.

Na primeira situação, o sistema oferece as melhores condições para o processo, uma vez que recebe o inóculo de células ativas e está praticamente isento de contaminantes. No segundo caso, algumas dornas são incubadas no início do processo. O meio, uma vez fermentado, é centrifugado, obtendo-se, assim, uma suspensão de microrganismos de elevada concentração. A suspensão pode ser tratada com o objetivo de eliminar as células inativas e os microrganismos contaminantes. Essa suspensão é reutilizada então como inóculo de outro fermentador. No terceiro caso, inocula-se uma dorna no início do processo e quando a fermentação atinge um estágio apropriado, passa-se parte do conteúdo para outra dorna e completam-se ambas as dornas com o meio fresco, a fermentar. A sucessão de cortes pode ocasionar perda de rendimento, principalmente se o meio não é esterilizado. Esse processo pode ser utilizado também na propagação do inóculo, o que evita que o processo seja reiniciado repetidas vezes. Existem também processos mistos que associam mais de um dos processos citados. Um reator batelada ideal é espacialmente homogêneo, de forma que as propriedades físicas e químicas do meio são iguais em todo o reator. O balanço de microrganismos para esse tipo de tanque, ilustrado na Figura 63, pode ser descrito como:

Acúmulo = entrada – saída – consumo + produção

$$\frac{d(XV)}{dt} = 0 - 0 + \mu VX \quad \text{ou} \quad \frac{dX}{dt} = \mu X$$

Em que V é o volume do reator; X é a concentração de microrganismos; t é o tempo de processo; μ é a velocidade específica de crescimento celular. Analogamente, para substrato, temos:

$$\frac{d(SV)}{dt} = 0 - 0 - r_s V \quad \text{ou} \quad \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X$$

Para produto, temos:

$$\frac{d(PV)}{dt} = 0 - 0 + r_p V \quad \text{ou} \quad \frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S} Y_{P/S}} \mu X$$

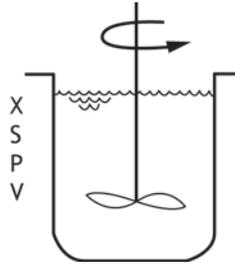


Figura 63 Esquema de reator batelada simples de mistura.

Assim, os balanços de células, substrato e produto em sistemas batelada levam a relações diretas do acúmulo com as velocidades de transformação, definidas na Unidade 5.

Se considerarmos um sistema “batelada alimentada”, e que o substrato é alimentado constantemente de forma a manter essa concentração constante, resultando num sistema com volume variável, temos as seguintes equações de balanço:

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_o - r_s V \quad (\text{balanço do substrato})$$

$$\frac{d(XV)}{dt} = r_x V \quad (\text{balanço de células})$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = r_p V \text{ (balanço de produto)}$$

A batelada alimentada é um processo interessante nos casos de inibição pelo substrato, resultando em altas produtividades. Os balanços são muito similares à batelada simples, exceto pelo fato de que existe uma alimentação e, portanto o volume do reator é variável (Figura 64).

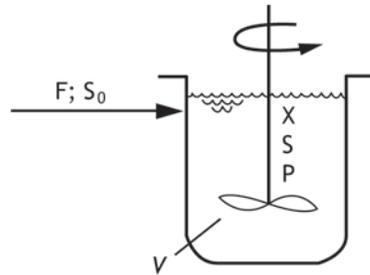


Figura 64 Reator em regime de batelada alimentada.

Um exemplo bastante prático da estimativa do volume de reatores em batelada é o citado por Borzani (SCHMIDELL et al., 2001), no caso de processos em que é exigida a produção contínua de um determinado componente ou o envio deste para as etapas de concentração e purificação. Esse caso é particularmente atrativo para o setor sucroalcooleiro, em que as colunas de destilação trabalham em fluxo contínuo. A estimativa depende de algumas considerações e do cronograma ilustrado na Figura 65:

F: vazão média do meio fermentado enviado ao setor de tratamentos finais;

t_f : tempo de fermentação;

V: volume do fermentador;

n: número de fermentadores;

t_d : tempo de descarga de um fermentador;

t_c : tempo de limpeza e carregamento;

M: massa do produto que se deseja obter num tempo t;

r: rendimento do tratamento final;

C: concentração do produto no meio fermentado.

Definidos os termos, tem-se:

$$F = \frac{M}{C \cdot t \cdot r}$$

$$t_d = \frac{V}{F}$$

Para facilitar os cálculos, toma-se $t_c = t_d$.

Existirá o intervalo t_d entre o começo de funcionamento de duas dornas consecutivas e, tomando-se como tempo zero o início de funcionamento da primeira dorna, a dorna "n" deverá iniciar o funcionamento no instante $(n - 1)t_d$. Por outro lado, a dorna "n" deverá iniciar seu funcionamento no instante $t_f + t_d$, como indica a figura a seguir:

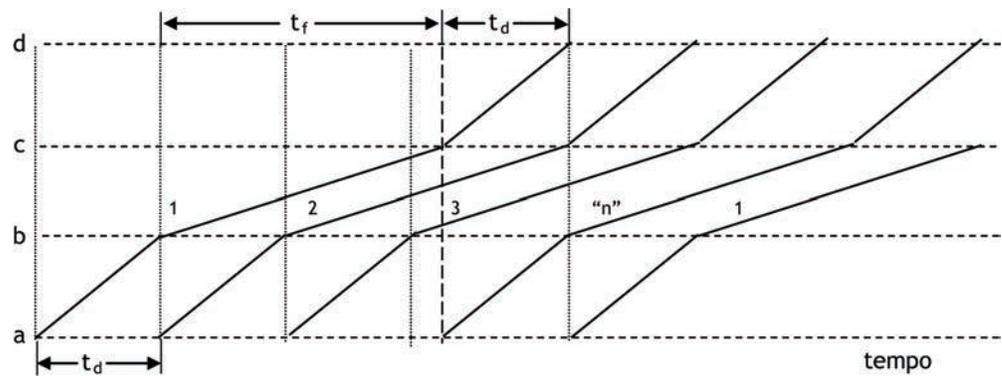


Figura 65 Cronograma de funcionamento de dornas em processo descontínuo: a) início do preparo do fermentador; b) fim da carga e início da fermentação; c) final da fermentação e início da descarga; d) final da descarga e início de outro ciclo de operação.

Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

Podemos então escrever:

$$(n-1) \cdot t_d = t_d + t_f \therefore n = 2 + \frac{t_f}{t_d}$$

$$\text{Assim, } n = 2 + \frac{F \cdot t_f}{V}$$

Como F e t_f são conhecidos, V é determinado em função de custos mínimos.

7.2 Biorreatores de mistura contínuos

O uso de reatores contínuos vem da descoberta de que culturas de microrganismos podiam ser mantidas em regime permanente por longos períodos, crescendo a $\mu_{\text{máx}}$ (Figura 66).

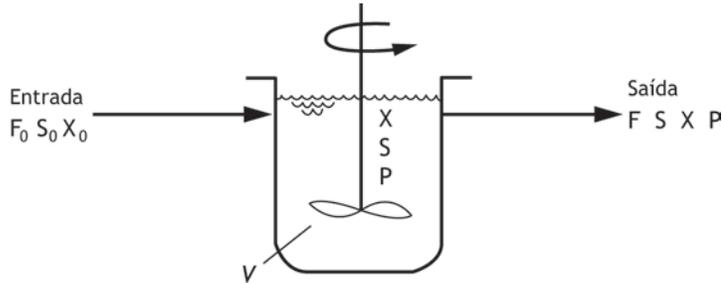


Figura 66 Esquema de biorreator contínuo de mistura.

Um meio de cultivo novo, normalmente estéril, é introduzido no reator e o volume é mantido constante pela retirada de meio na mesma vazão de entrada. Esses reatores são chamados de “quimiostato”, uma vez que as propriedades químicas do ambiente permanecem constantes em regime permanente. Quando há constância na turbidez, o reator é conhecido como “turbidostato”, com regulagem do aumento da vazão de entrada do meio (F_0) quando a concentração celular ultrapassa o nível desejado. Assim como foi realizado para os reatores em batelada e batelada alimentada, as equações de balanço podem ser escritas para as principais variáveis do processo.

a) balanço de células:

Acúmulo de biomassa = Biomassa na entrada – Biomassa na saída + Biomassa gerada

$$\frac{d(XV)}{dt} = F_0 X_0 - FX + r_x V$$

Como $r_x = \mu X$ e $F_0 = F$ (V é constante), portanto:

$$\frac{d(X)}{dt} = \frac{F}{V} \cdot X_0 - \frac{F}{V} \cdot X + \mu \cdot X$$

Usualmente a alimentação é estéril ($X_0 = 0$), o que leva a:

$$-\frac{F}{V} \cdot X + \mu \cdot X = \frac{dX}{dt} \Rightarrow \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu - \frac{F}{V}$$

Em regime permanente não há acúmulo de células ($\frac{dX}{dt} = 0$):

$$\mu = \frac{F}{V}$$

Chamando $\frac{F}{V}$ de taxa de diluição "D", que é o inverso do tempo de residência em reatores (τ), temos:

$$\mu = D = \frac{1}{\tau}$$

Portanto, em regime estacionário, a taxa específica de crescimento será igual à taxa de diluição, podendo ser controlada pela regulação da vazão.

b) balanço do substrato limitante:

Acúmulo de substrato = Substrato na entrada – Substrato na saída + Substrato consumido

$$\frac{F}{V} \cdot S_0 - \frac{F}{V} \cdot S - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot X = \frac{dS}{dt}$$

Em regime permanente $\frac{dS}{dt} = 0$:

$$\frac{F}{V} \cdot S_0 - \frac{F}{V} \cdot S - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot X = 0$$

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu \cdot X}{Y_{x/s}}$$

Como $\mu = D$:

$$X = Y_{x/s} (S_0 - S)$$

Assim, considerando que o rendimento de substrato em células é constante para determinados microrganismos, a concentração de células dentro do quimios-tato pode ser calculada considerando apenas o consumo do substrato limitante e a conversão deste.

c) balanço de produto:

Acúmulo de produto = - Produto na saída + Produto gerado

$$\frac{d(PV)}{dt} = -FP + r_p V \quad \text{ou} \quad \frac{dP}{dt} = -DP + r_p$$

Tão importante quanto realizar um balanço de produto é analisar um proces-so em termos de produtividade. Assim, a produtividade em células de um biorrea-tor de mistura contínuo, operando em regime permanente, é definida por:

$$Pr = D \cdot X$$

7.3 Biorreatores tubulares

A aplicação de reatores tubulares em processos biotecnológicos é mais rara devido às características do processo, em que normalmente é necessá-ria a aeração e a agitação, tornando quase impossível manter-se um fluxo pistonado. Além disso, a existência de material particulado, como o microrga-nismo, tende à formação de um sistema bifásico. Apesar das dificuldades, conhecendo-se a teoria dos reatores tubulares, são obtidos sistemas que se aproximam desse tipo de reator (Figura 67).

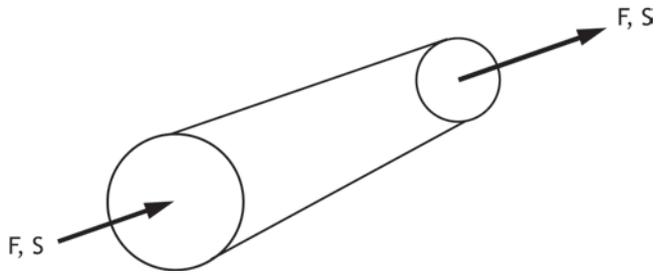


Figura 67 Reactores tubulares contínuos.

Como característica principal de um tubular, as concentrações variam no interior do tubo. Além disso, o formato das curvas assemelha-se muito aos processos descontínuos em reatores de mistura. Embora as concentrações mudem no interior do tubo, quando o regime permanente está estabelecido, as concentrações não mudam num mesmo ponto durante o tempo. Isso significa que o reator tubular é um sistema variável no espaço, mas constante no tempo (Figura 68). A análise matemática pode ser feita a partir do esquema a seguir:

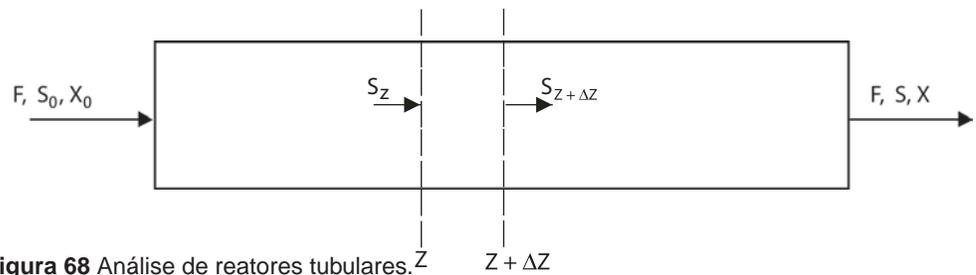


Figura 68 Análise de reatores tubulares.

Assim, o balanço infinitesimal de substrato seria

$$\frac{d(SV)}{dt} = F_z S_z - F_{z+\Delta z} S_{z+\Delta z} - r_s V$$

Em regime permanente o acúmulo é zero e, portanto, $dS/dt = 0$. Assim, temos como tempo de residência para esse tipo de reator

$$\tau = -\frac{dS}{r_s}$$

Como é impossível se obter um verdadeiro sistema tubular com microrganismos, consegue-se aproximadamente o mesmo efeito dividindo-se o reator tubular em várias diferentes seções, ou seja, colocando-se vários reatores de mistura em

série (Figura 69). Nesse sistema, a variação das concentrações será em degrau e quanto maior o número de reatores de mistura, mais próximo se estará do tubular verdadeiro.

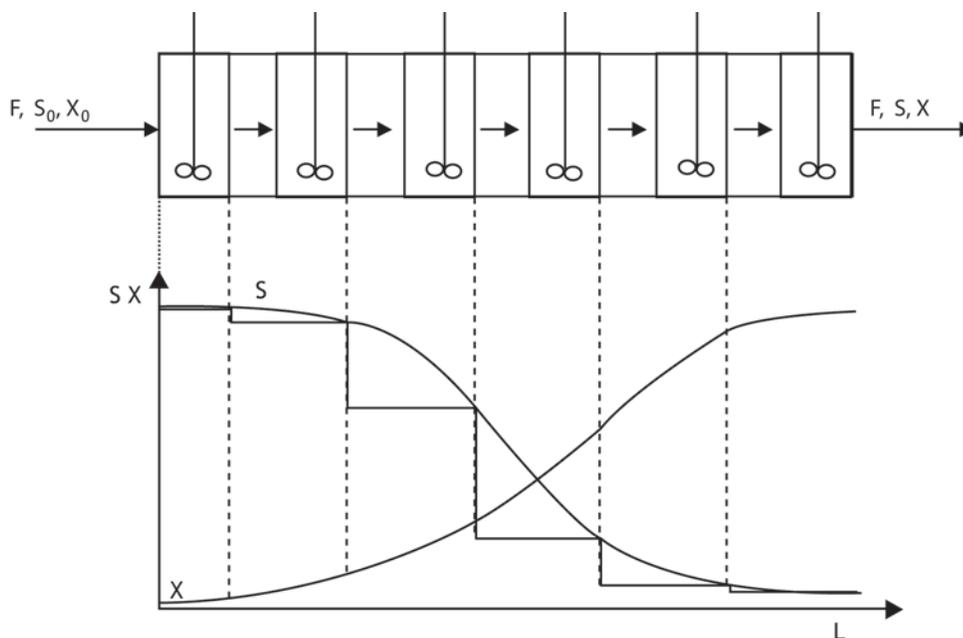


Figura 69 Analogia entre reatores tubulares e sistemas de múltiplos estágios.

Esse tipo de sistema é aplicável para alguns processos fermentativos, indicado principalmente naqueles em que o produto é inibidor e a concentração do substrato é geralmente alta na entrada do primeiro reator. Esse sistema exige um tempo de residência longo para que todo o substrato seja convertido, conseguido com altos rendimentos e altas produtividades em reatores de múltiplos estágios.

7.4 Configurações de biorreatores

Os biorreatores mais comumente utilizados podem ser classificados quanto à forma de se transferir oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, tópico abordado na Unidade 6. Nesse sentido, a Figura 70 ilustra os sistemas com aeração superficial, sendo todo o oxigênio transferido por difusão. Nesse grupo estão incluídas a operação em bandejas ou lagoas de oxidação em sistemas de tratamento biológico de águas residuárias. Já a Figura 71 sugere a transferência em reatores com catalisadores imobilizados ou aderidos em leito fixo de partículas.

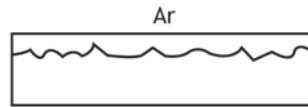


Figura 70 Sistema com aeração superficial.

Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

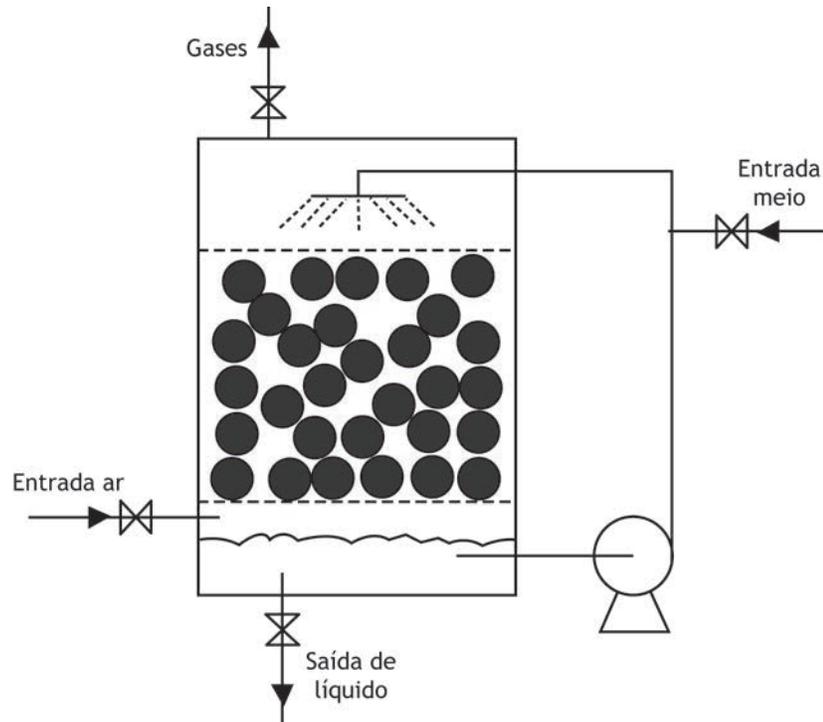


Figura 71 Coluna de leito fixo.

Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

O reator indicado na Figura 72 é conhecido como “coluna de bolhas”, e é utilizado, por exemplo, na produção de biomassa. Consiste de uma serpentina localizada no fundo da coluna, de onde devem surgir bolhas de pequeno diâmetro, que sobem toda a altura da coluna de líquido, agitando e disponibilizando oxigênio. Uma alternativa a esse sistema de serpentinas pode ser a colocação de calotas de aço sinterizado, para dentro das quais se faz fluir o ar, que passa para o líquido na forma de pequenas bolhas. Uma variação desse sistema de transferência de oxigênio por borbulhamento de ar são os reatores “air-lift”, nos quais o ar é introduzido em uma chaminé no interior do reator, através de metal ou material cerâmico sinterizado de pequenos poros. Os reatores apenas aerados têm merecido atenção devido ao menor cisalhamento das células e por evitarem sistema de agitação, o que simplifica a construção do biorreator e reduz gastos energéticos. Por outro lado, esses reatores normalmente exigem altas vazões de aeração a fim de manter um nível de agitação aceitável, o que significa um dispêndio de energia na compressão do ar. Nesses casos, é comum operarem a vazões próximas a 1 VVM (volume de ar por volume de meio por minuto).

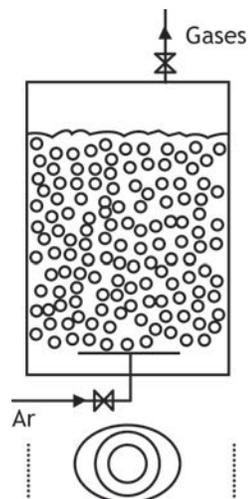


Figura 72 Coluna de bolhas.

Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

A Figura 73 exemplifica um reator agitado e aerado, tradicionais tanques frequentemente utilizados na indústria. O reator agitado e aerado padrão apresenta altura de líquido igual ao diâmetro do tanque, sendo agitado por um impelidor tipo turbina com seis pás planas com o diâmetro de $1/3$ do diâmetro do tanque. A fim de evitar formação de vórtice, usa-se um sistema com quatro defletores diametralmente opostos, de largura mínima de $1/12$ do diâmetro do tanque.

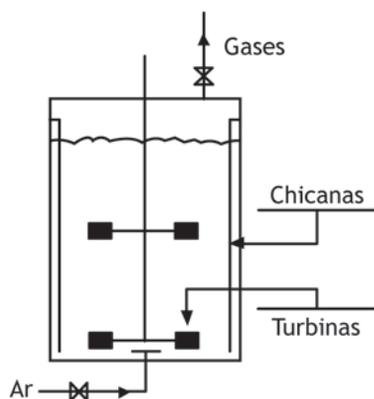


Figura 73 Tanque agitado e aerado.

Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

A Figura 74 apresenta o sistema conhecido como “batelada com reciclo de células” ou “Processo Melle-Boinot”. Esse é o processo de fermentação etanólica mais comumente utilizado nas destilarias do Brasil, com recuperação da levedura por centrifugação do vinho (meio fermentado) obtendo-se o leite de levedura (fermento concentrado), que é encaminhado para tratamento na cuba para eliminação de contaminantes. Inicialmente desenvolvido por F. Boinot nas usinas de

Melle (França), tem como principal objetivo prover o reator com alta população microbiana para eliminar ou diminuir a fase de adaptação das leveduras e economizar substrato (açúcar), já que este seria consumido apenas para reprodução celular.

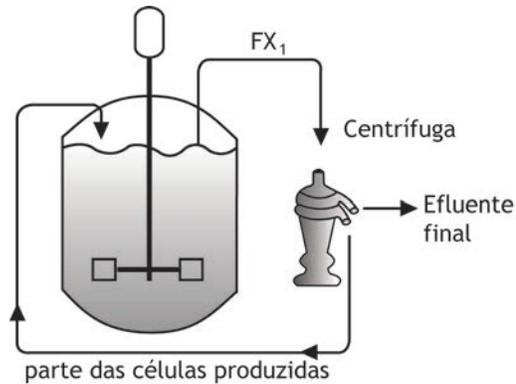


Figura 74 Processo Melle-Boinot para fermentação etanólica.

Fonte: adaptada de Reguly (1998).

7.5 Aumento de escala de biorreatores

O desenvolvimento de biorreatores envolve diferentes etapas, conforme descrito na Figura 75. A escala de bancada ou laboratorial envolve o *screening* de microrganismos, a obtenção de dados cinéticos e a otimização dos meios e condições de cultivo. A escala piloto verifica a estabilidade e a reprodutibilidade do processo, enquanto numa escala industrial há a maximização da produtividade. Os volumes de operação de biorreatores podem variar de 1 a 2 m³ quando se utiliza microrganismos patogênicos, crescimento de células animais e vegetais e bioprodutos ligados à área de saúde (vacinas); de 10 a 200 m³ na produção de enzimas, antibióticos e vitaminas e até milhares de m³ para processos que não exigem muitos cuidados com assepsia (fermentação etanólica e tratamento biológico de resíduos).

Assim, existem diversos critérios que podem ser utilizados para o escalonamento dos biorreatores, com destaque para a manutenção:

- da constante volumétrica de transferência de O₂ constante ($k_L a$);
- da velocidade terminal do propulsor constante ($\pi N D_i$);
- da potência por volume constante (P/V);
- do tempo de mistura;
- do número de Reynolds.

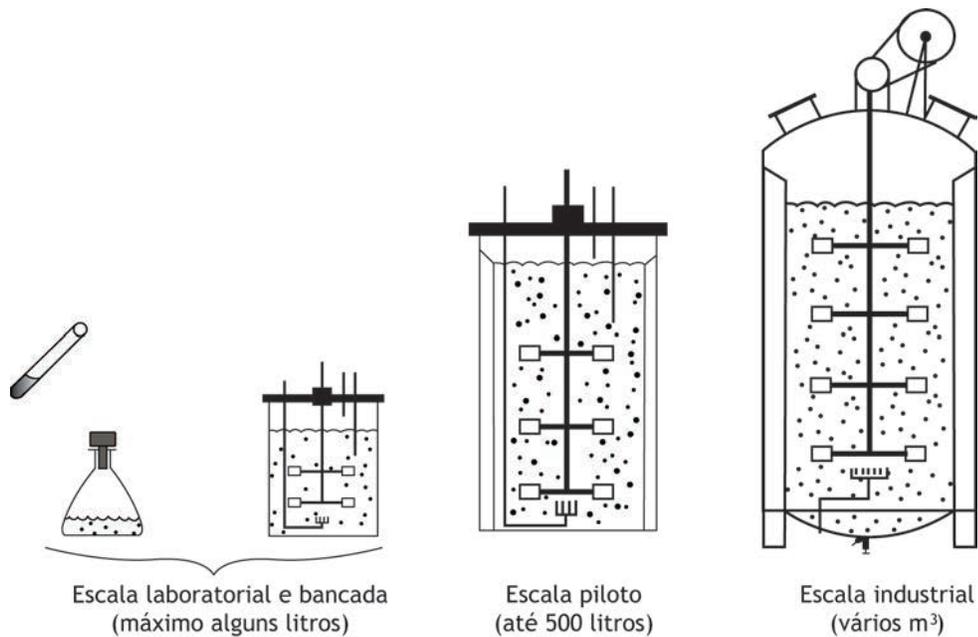


Figura 75 Escala de bioprocessos.
Fonte: adaptada de Schmidell et al. (2001).

Nos processos de adaptação de cultivo piloto de pequenas escalas para grandes escalas, as condições ótimas ambientais devem ser mantidas, o que não é difícil com relação ao meio de cultivo, porém é complicada para os aspectos físicos, como transferência de massa, agitação, tensões de cisalhamento e potência dissipada.

Em processos nos quais o oxigênio é um fator de controle importante, $k_L a$ é um critério de ampliação adequado. No entanto, nem sempre é necessário ou desejável satisfazer inteiramente a demanda de oxigênio para o microrganismo, uma vez que a taxa máxima pode ser atingida mesmo quando a demanda de oxigênio não é satisfeita e a potência adicionada pode não justificar economicamente os ganhos em produtividade. Os procedimentos de *scale-up* baseados em agitação e aeração envolvem técnicas de previsão da velocidade de agitação necessária para se obter a mesma eficiência de aeração da pequena escala a partir de quatro pontos básicos:

- aumento da área interfacial das bolhas;
- aumento do tempo de retenção das bolhas;
- baixa coalescência;
- diminuição da espessura do filme líquido.

7.5.1 Método da constância da potência por unidade de volume de meio

A manutenção de P/V (potência em HP e volume em m^3) é um dos critérios mais utilizados para variação de escala de biorreatores. Considerando variação de uma escala 1 para 2, temos:

$$(P/V)_1 = (P/V)_2$$

Como P/V é proporcional a $N^3 D_i^2$ (sendo N a velocidade de agitação em s^{-1} e D_i o diâmetro do reator em metros):

$$N_2 = N_1 (D_{i1}/D_{i2})^{2/3}$$

Cabe ressaltar que essa relação considera um regime turbulento de agitação, ou seja, altos valores de Número de Reynolds.

7.5.2 Método da constância do coeficiente global de transferência de oxigênio

Em bioprocessos que envolvam alta demanda de oxigênio, como na produção de antibióticos e fármacos em geral, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) mostra-se como critério ideal.

$k_L a$ é proporcional a relação P/V :

$$k_L a \propto \left(\frac{P}{V}\right)^A (V_s)^B, \text{ sendo } V_s \text{ a velocidade superficial (m/s); e os coeficientes } A$$

e B função da geometria do reator.

Assim:

$$(k_L a)_1 = (k_L a)_2$$

$$\left(\frac{P}{V}\right)_1^A (V_s)_1^B = \left(\frac{P}{V}\right)_2^A (V_s)_2^B$$

7.5.3 Método da constância da velocidade na extremidade do impelidor

Outro critério importante na ampliação de escala de fermentadores e biorreatores é a velocidade na extremidade do impelidor (v_{imp}), que se relaciona com a frequência de rotação (N) e o diâmetro do impelidor (D_i):

$$v_{imp} = \pi D_i N$$

Assim:

$$(v_{imp})_1 = (v_{imp})_2$$

$$N_1 D_{i1} = N_2 D_{i2}$$

7.5.4 Método da constância do tempo de mistura

Uma característica comum observada na ampliação de escala de biorreatores é que fluidos agitados em grandes tanques apresentam características não uniformes. O tempo de mistura t_m é definido como o período necessário para a completa homogeneização de um fluido agitado. Do ponto de vista prático, pode ser utilizado para definir o grau de mistura ou turbulência em tanques. Em regimes turbulentos, o tempo de mistura é proporcional ao diâmetro do agitador e a frequência de agitação como segue:

$$t_m \propto \frac{D_i^{1/6}}{N^4}$$

Na ampliação de uma escala 1 para 2, mantendo-se t_m constante:

$$(t_m)_1 = (t_m)_2$$

$$\left(\frac{D_{i1}}{N_1^4}\right)^{1/6} = \left(\frac{D_{i2}}{N_2^4}\right)^{1/6} \quad \text{ou} \quad N_2 = N_1 \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^{1/4}$$

7.5.5 Método da constância do Número de Reynolds

Outro critério de ampliação de escala diretamente ligado ao grau de agitação do meio é o número de Reynolds (N_{Re}):

$$N_{Re} = \frac{\rho N D_i^2}{\mu}$$
, conhecido como Reynolds do impelidor, sendo ρ a densidade do fluido, N a frequência de agitação, D_i o diâmetro do impelidor e μ a viscosidade do fluido.

Logo, na ampliação de escala de 1 para 2 tem-se que:

$$(N_{Re})_1 = (N_{Re})_2$$

Como a densidade e a viscosidade são constantes para o fluido na temperatura considerada:

$$N_1 D_{i1}^2 = N_2 D_{i2}^2 \quad \text{ou} \quad N_2 = N_1 \left(\frac{D_{i1}}{D_{i2}} \right)^2$$

7.5.6 Escolha do critério de *scale-up*

Como não existe um método ideal que possa ser aplicado a qualquer tipo de reator com alta probabilidade de sucesso, a escolha de um método depende de preferência pessoal, das características do processo, do fluido e das condições de operação. Assim, métodos baseados no tempo de mistura não têm muita aplicabilidade; a velocidade terminal constante pode ser aplicada se o microrganismo é sensível ao cisalhamento; $k_L a$ constante é demorado e o método de P/V constante, apesar de suas limitações, é provavelmente o melhor procedimento. É frequente dizer que a tarefa de ampliar a escala é uma “arte”, em virtude de contar com muita experiência específica obtida por meio da observação de resultados experimentais em escala de bancada.

Referências

- DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press, 1995. 439 p.
REGULY, J. C. *Biotechnologia dos processos fermentativos*. Pelotas: EDUFPEL, 1998. v. 2.
SCHMIDELL, W. et al. *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

UNIDADE 8

Purificação de biomoléculas

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas constitui-se numa das etapas mais complexas do processo, dadas às variadas características do meio de cultivo e das biomoléculas de interesse como ácidos orgânicos, alcoóis, antibióticos, polissacarídeos e proteínas. Entre as características dos meios, podemos destacar a elevada quantidade de água, presença de moléculas orgânicas e inorgânicas, metabólitos extras e intracelulares distintos da molécula que será purificada. Em resultado disso, as etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que a otimização do cultivo microbiano, uma vez que não existe um processo de purificação com aplicação geral. Ainda assim, a purificação pode ser didaticamente dividida em quatro etapas genéricas: separação das células e seus fragmentos (clarificação); concentração de baixa resolução; purificação em alta resolução; operação para o acondicionamento final do produto. A Figura 76 apresenta etapas de um processo genérico de purificação, chamadas etapas de *downstream*. O objetivo desta Unidade é dar uma ideia geral dos métodos de purificação mais utilizados, pois seria impossível analisar detalhadamente cada um. Maiores informações podem ser obtidas na bibliografia apresentada no final desta Unidade.

A operação de clarificação é assim chamada por envolver remoção dos sólidos suspensos, constituídos por células íntegras e seus fragmentos. O rompimento celular faz-se necessário para produtos formados no interior das células. As operações de purificação de baixa resolução compreendem a separação da molécula-alvo a ser purificada de outras moléculas com características físico-químicas relativamente diferentes. Já a purificação de alta resolução envolve separação de moléculas similares, como a purificação de proteínas de um meio de cultivo. A Tabela 19 exemplifica as operações unitárias empregadas nos processos de purificação em escala industrial. A completa purificação e acondicionamento podem envolver diversas operações, levando-o à perda de rendimento. Considerando o alto custo dos processos de purificação, podendo chegar a 80% do custo total de uma planta de fermentação, torna-se interessante reduzir o número de etapas, aumentando o rendimento total. De acordo com a Figura 77, se considerarmos o rendimento em produto de 90% por etapa, a aplicação de nove etapas levará a um rendimento final de 40%. Se analisarmos para produtos obtidos em baixa concentração, os custos tornam-se muito consideráveis. Assim, geralmente, quanto menor a concentração da molécula-alvo obtida no meio de cultivo, maior será o número de etapas para sua concentração, levando a um produto de alto valor agregado (Figura 78).

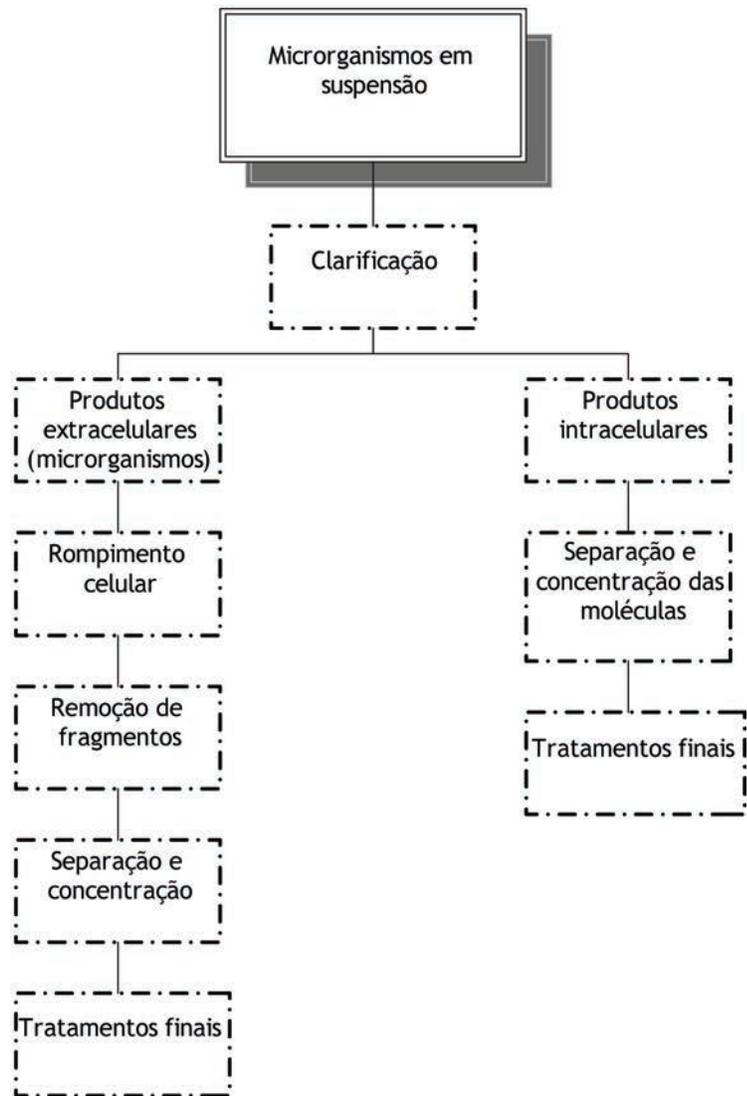


Figura 76 Etapas de um processo de purificação genérico.

Tabela 19 Operações unitárias envolvidas nos processos de purificação de bioprodutos.

Etapa do processo	Operações unitárias	Princípio
Clarificação	Filtração convencional Centrifugação Filtração tangencial (membranas) Floculação	Tamanho de partículas Tamanho de densidade de partículas Tamanho de partículas Hidrofobicidade de partículas
Rompimento de células	Homogeneização Ultrassom Moagem em moinho de bolas Rompimento químico ou enzimático	Cisalhamento Cisalhamento Cisalhamento Hidrólise, solubilização ou desidratação de moléculas que compõem a parede ou a membrana celular
Purificação de baixa resolução	Precipitação Ultrafiltração (membranas) Extração em sistemas de duas fases líquidas	Solubilidade Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas Solubilidade, massa molar
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca-iônica Cromatografia de afinidade (biológica ou química) Cromatografia de imunoafinidade Cromatografia de interação hidrofóbica Cromatografia de exclusão molecular Membrana adsortivas	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção) Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo) Massa molar Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína
Tratamentos finais	Cristalização Liofilização Secagem	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido Características de equilíbrio líquido-sólido Características de equilíbrio líquido-sólido

Fonte: adaptada de Pessoa & Kilikian (2005).

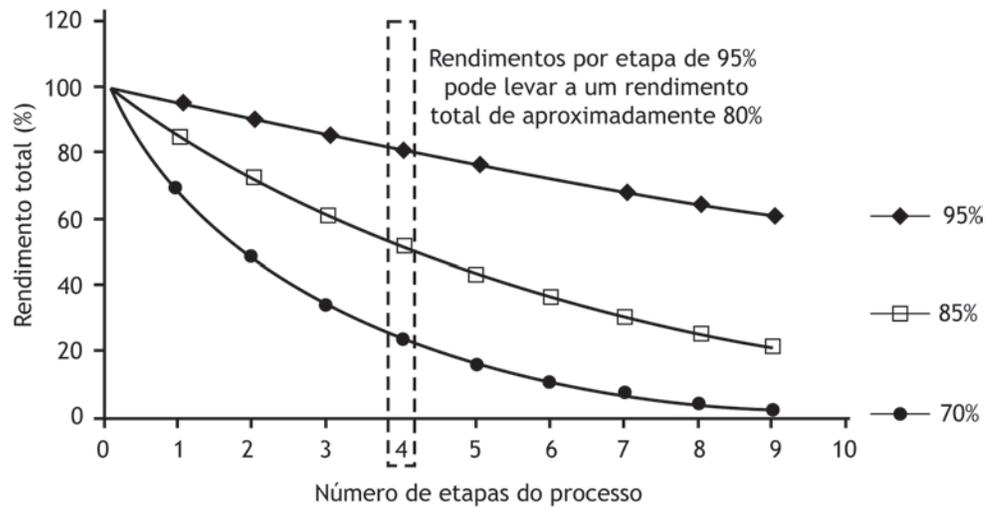


Figura 77 Variação do rendimento total no processo de purificação de um produto em função do número de etapas e do rendimento de cada etapa.

Fonte: adaptada de Pessoa & Kilikian (2005).

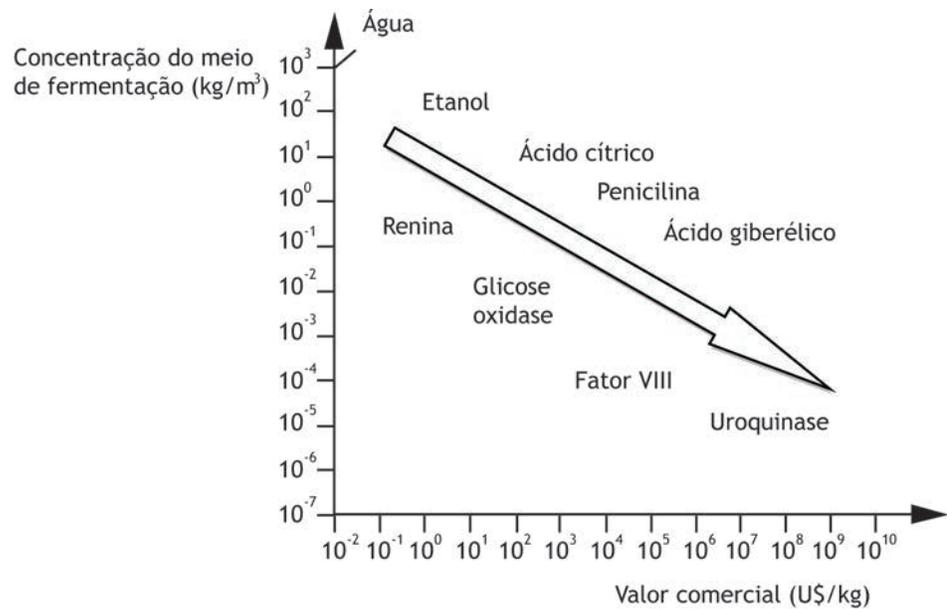


Figura 78 Relação entre o preço de venda e a concentração do bioproduto após as etapas de *downstream*.

Fonte: adaptada de Shuler & Kargi (1992).

8.1 Rompimento celular

O desenvolvimento de técnicas de rompimento celular vem ao encontro da produção de compostos intracelulares, como proteínas. O rompimento ocorre após a etapa de separação e lavagem (clarificação). A técnica deve considerar o tamanho das células, tolerância ao cisalhamento, necessidade de controle de temperatura, tempo de operação, gastos energéticos e custo (Tabela 20).

A forma mais adequada de rompimento celular dependerá do tipo de microrganismos empregado. Bactérias Gram-positivas apresentam paredes mais rígidas que as Gram-negativas, sendo, portanto, mais difíceis de serem rompidas. Fungos filamentosos e leveduras são ainda mais difíceis.

Os métodos de rompimento podem ser divididos em mecânicos (homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, prensas, ultrassom), físicos (choque osmótico, congelamento e descongelamento, aquecimento, secagem), químicos (ação de álcalis, solventes, detergentes e ácidos) e enzimáticos (lise enzimática ou inibição da síntese de parede celular). Dependendo do caso, a parede celular poderá ser parcialmente rompida ou parcialmente permeabilizada, permitindo que a molécula-alvo seja liberada para o meio extracelular (Figura 79). A liberação das moléculas facilita a purificação devido à presença de um menor número de contaminantes, obtida geralmente por choques osmóticos.

Tabela 20 Diâmetro de moléculas, organelas e células com interesse biotecnológico.

Moléculas/Organelas/Células	Diâmetro
Glicose-6-fosfato desidrogenase	140 Å
Glicose oxidase	70 Å
Ovoalbumina	58 Å
Vírus	0,01 a 0,1 µm
Mitocôndria	0,4 a 4,0 µm
Bactérias	0,5 a 5,0 µm
<i>E. coli</i>	1 a 2 µm
Leveduras	2 a 15 µm
Fungo: filamentosos	5 a 10 µm
<i>S. cerevisiae</i>	4 a 5 µm
Células animais em geral	~10 µm
Células vermelhas do sangue	5 a 8 µm
Células de planta	20 a 100 µm
Células de fígado humano	30 a 40 µm

Fonte: adaptada de Pessoa & Kilikian (2005).

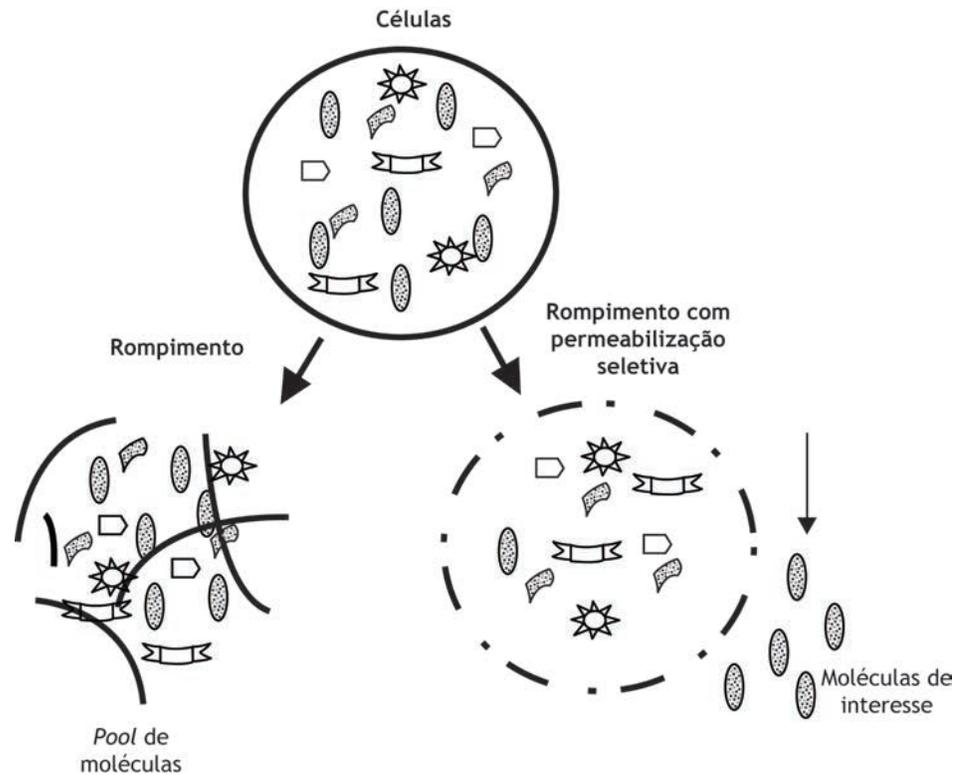


Figura 79 Esquema comparativo entre rompimento total da célula e permeabilização seletiva. Fonte: adaptada de Pessoa & Kilikian (2005).

Após o rompimento celular obtém-se um homogeneizado constituído pela molécula-alvo a ser purificada, biomoléculas contaminantes e fragmentos celulares. Os compostos indesejáveis serão removidos por filtração, centrifugação, precipitação ou extração líquido-líquido. Os produtos intracelulares são de purificação mais custosa, exigindo um maior número de etapas.

8.2 Filtração e centrifugação

A separação das células suspensas de um meio de cultivo é frequentemente a primeira operação unitária da purificação. A seguir, seguem-se os processos de clarificação, baseados no uso de membranas (tamanho das partículas) e diferença de densidade (centrifugação).

Na filtração, a suspensão sob pressão é perpendicularmente direcionada a um meio filtrante (Figura 80). A fração volumétrica que atravessa o meio é denominada filtrado, e a contínua deposição de células e fragmentos sobre o filtro leva à formação de uma torta de filtração.

Os equipamentos utilizados com mais frequência na clarificação de suspensões microbianas são os filtros rotativos a vácuo (Figura 81). Estes consistem de um tambor oco coberto com uma malha metálica filtrante. O tambor fica

parcialmente suspenso no meio líquido, o qual é brandamente agitado para evitar a sedimentação dos sólidos. A suspensão é alimentada pela parte externa do tambor e a reduzida pressão no seu interior promove a filtração.

Outra operação utilizando membranas é a utilização de escoamento tangencial (Figura 81). Nesse caso, a solução escoar em paralelo à superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado transversalmente a esta. A vantagem dessa operação é que a tensão de cisalhamento do fluido minimiza o acúmulo de células e seus fragmentos na superfície das membranas.

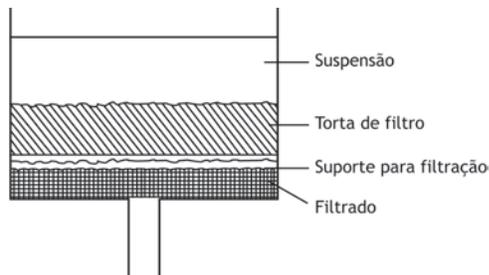


Figura 80 Esquema de filtração convencional.

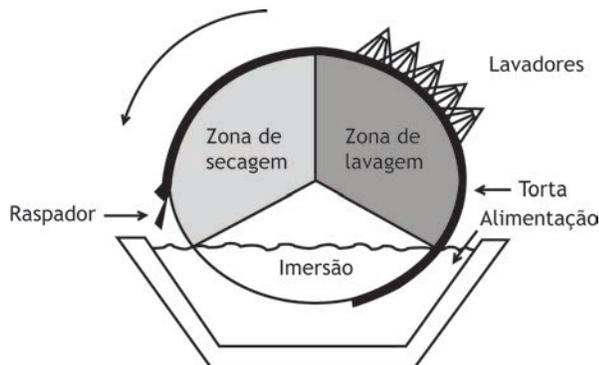


Figura 81 Filtro rotativo a vácuo.

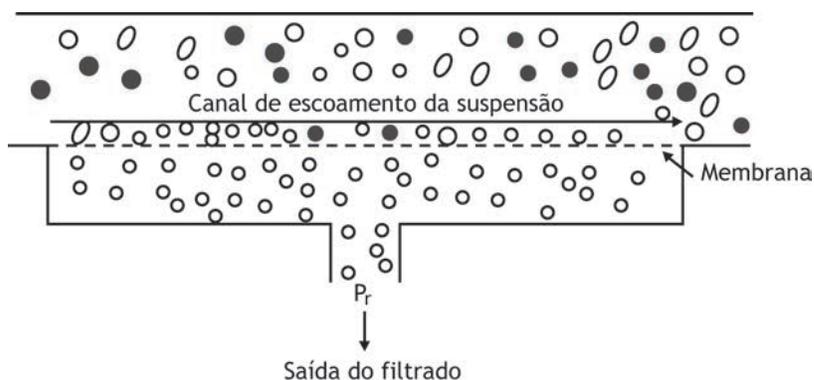


Figura 82 Esquema de filtração tangencial.

A centrifugação compreende a aceleração da sedimentação de solutos em suspensão por ação de um campo gravitacional centrífugo. Da centrifugação resultam suspensões de células mais concentradas em relação à original. Na clarificação de suspensões microbianas é comum o uso de centrífugas de discos ou tubulares (Figura 83). As centrífugas de disco podem operar sob refrigeração, da ordem de 13000 a 17000 xg, permitindo o processamento contínuo de até 200 m³/h. A tubular é aplicada para suspensões menos concentradas, da ordem de 30 g/L de células.

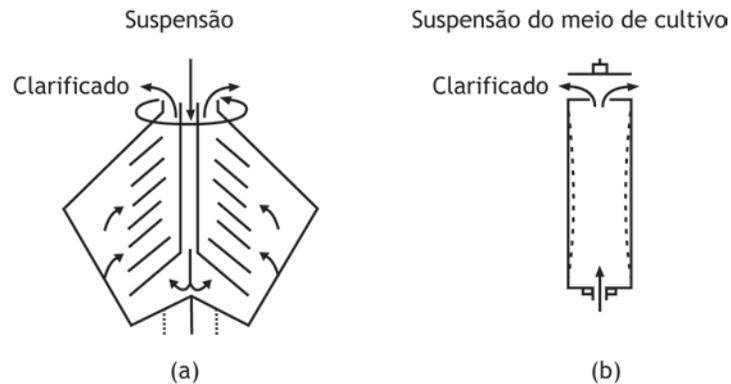


Figura 83 Centrífugas de disco (a) e tubular (b).

8.3 Purificação baseada na solubilidade

A precipitação é uma das operações mais adotadas em escala de bancada e industrial para a purificação de proteínas de origem microbiana. Precipitados de proteínas são agregados de diferentes moléculas proteicas, macroscópicas, que sedimentam sob valor de força centrífuga relativamente baixa. As vantagens dessa operação são as facilidades adaptáveis a grandes escalas, uso de processo contínuo, equipamentos relativamente simples, ampla faixa de precipitantes de baixo custo.

Em termos gerais a solubilidade de um soluto em um solvente é determinada pelo resultado global das interações atrativas entre as moléculas de solvente e soluto. A solubilidade é favorecida quando as interações entre as moléculas de soluto são repulsivas e as interações entre as moléculas de soluto e as moléculas do solvente são atrativas. Assim, uma molécula pode se tornar insolúvel por qualquer perturbação que resulte em diminuição das forças atrativas com o solvente, ou então, em um aumento das interações atrativas entre as moléculas de soluto. Dessa forma, a distribuição de cargas determina a solubilidade das proteínas em solventes aquosos.

Em soluções aquosas a precipitação pode ocorrer com o aumento (*salting-out*) ou diminuição (*salting-in*) da concentração de sais, com a adição de solventes orgânicos, polieletrólitos, polímeros não iônicos, calor, ajuste de pH (Tabela 21).

Os grupos carregados interagem com os íons na solução, e a precipitação pode ser induzida por mudanças de pH, força iônica, adição de solventes orgânicos e polímeros. O precipitado pode ser então recuperado por centrifugação, ressuspenso em um tampão adequado e dessalinizado por diálise ou filtração em gel.

Quando a distribuição de cargas na superfície de uma proteína é neutra (ponto isoelétrico), ocorre precipitação isoelétrica. Esse procedimento é mais utilizado na remoção de proteínas indesejáveis pelo risco de desnaturação.

Tabela 21 Principais métodos de precipitação de proteínas.

Precipitante	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Sais neutros (<i>salting-out</i>)	Interações hidrofóbicas pela redução da camada de hidratação da proteína	- Uso universal - Baixo custo	- Corrosivo - Liberação de amônia em pH alcalino
Polímeros não iônicos	Exclusão da proteína da fase aquosa reduzindo a quantidade de água disponível para a solvatação da proteína	- Uso de pequenas quantidades de precipitante	- Aumento da viscosidade
Calor	Interações hidrofóbicas e interferência das moléculas de água nas ligações de hidrogênio	- Baixo custo - Simples	- Risco de desnaturação
Polieletrólitos	Ligação com a molécula de proteína atuando como agente floculante	- Uso de pequenas quantidades de precipitante	- Risco de desnaturação
Precipitação isoeletrica	Neutralização da carga global da proteína pela alteração do pH do meio	- Uso de pequenas quantidades de precipitante	- Risco de desnaturação
Sais metálicos	Formação de complexos	- Uso de pequenas quantidades de precipitante	- Risco de desnaturação
Solventes orgânicos	Redução da constante dielétrica do meio aumentando as interações eletrostáticas intermoleculares	- Facilidade de reciclagem - Facilidade na remoção do precipitado	- Risco de desnaturação - Inflamável e explosivo

Fonte: adaptada de Pessoa & Kilikian (2005).

Os meios que contêm a proteína ou a biomolécula a ser purificada apresentam, em geral, misturas de vários componentes e as precipitações devem ser conduzidas em mais de uma etapa. Assim, primeiramente, removem-se as proteínas indesejáveis menos solúveis e, nas seguintes, precipitam-se uma ou mais moléculas-alvo. A precipitação simples, em um único estágio, tem valor mais como técnica de concentração. Já a precipitação fracionada é amplamente utilizada nas purificações industriais. O fracionamento em dois cortes é o mais utilizado. No primeiro estágio adiciona-se o precipitante em concentração suficiente para remover os contaminantes menos solúveis que a proteína a ser purificada; remove-se o precipitado formado e adiciona-se mais precipitante, de modo a aumentar a concentração na fase líquida e promover a precipitação da proteína de interesse na nova fase precipitada, com os contaminantes mais solúveis permanecendo em solução. Geralmente, em fracionamentos com solventes orgânicos, o primeiro corte ocorre com 20 a 30% (volume) de etanol ou acetona, e o segundo corte, acima de 50% (Figura 84).

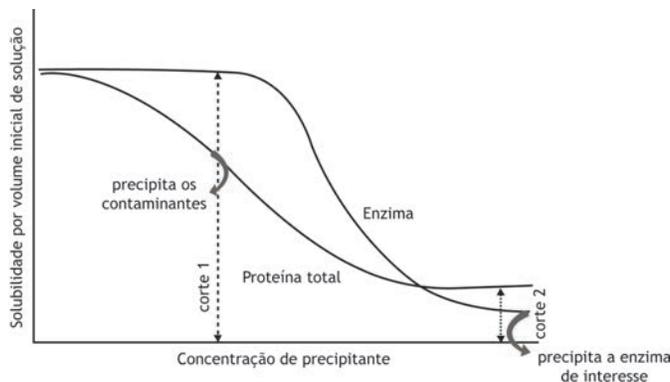


Figura 84 Perfis de solubilidade da molécula de interesse e dos contaminantes presentes em concentrações crescentes de precipitante.

Fonte: adaptada de Pessoa & Kilikian (2005).

O principal efeito da precipitação por solventes orgânicos é a redução da atividade de água pela diminuição da constante dielétrica do meio, ou seja, o poder de solvatação da água nas regiões carregadas e hidrofílicas da superfície das proteínas diminui com a presença de solvente e aumentam as forças eletrostáticas de atração entre as moléculas proteicas.

A precipitação por polímeros de alta massa molar, como polietileno glicol (PEG), é a exclusão da proteína do meio aquoso. Os polieletrólitos são polímeros iônicos solúveis em água usados devido ao seu baixo custo e redução de resíduos. Nesse sentido, os mais utilizados são o polícatión polietilenoimina (PEI) e poliânion ácido poliacrílico (PAA).

A precipitação pela temperatura também é uma técnica que pode ser utilizada uma vez que o calor induz a interações hidrofóbicas e aumenta a interferência das moléculas de água nas ligações de hidrogênio. Isso resulta na desnaturação da proteína, reduzindo sua solubilidade, com perda de suas estruturas secundárias e terciárias, expondo grupos hidrofóbicos e formando agregado. Essa operação deve ser vista com cautela na purificação de moléculas ativas, as quais podem perder ou modificar a sua atividade em altas temperaturas.

8.4 Extração em sistemas de duas fases aquosas

A extração com solventes orgânicos é a principal técnica de separação em bioprocessos. No entanto, solventes orgânicos podem ser inadequados para purificação de algumas proteínas ou biopolímeros mais sensíveis. Assim, solventes aquosos que formam duas fases distintas têm sido utilizados por favorecerem a separação de proteínas, fragmentos celulares e organelas, protegendo a sua atividade biológica. Sistemas com duas fases aquosas são produzidos quando polímeros particulares ou um polímero e um sal são dissolvidos conjuntamente em água a determinadas concentrações. Alguns desses componentes estão listados na Tabela 22. Quando são adicionadas nessas misturas, as biomoléculas e os fragmentos de células migram para a fase de maior afinidade. Após a partição, o produto pode ser removido da fase de extração por uma operação de cristalização ou precipitação.

Tabela 22 Exemplos de sistemas em duas fases aquosas.

Componente 1	Componente 2
Polietileno glicol	Dextrana
	Polivinil álcool
	Fosfato de potássio
	Fosfato de amônio
	Fosfato de magnésio
Polipropileno glicol	Sulfato de sódio
	Polivinil álcool
	Dextrana
Metilcelulose	Fosfato de potássio
	Dextrana
	Hidroxipropildextrana

Fonte: adaptada de Doran (1995).

A Figura 85 apresenta as curvas de equilíbrio para o sistema formado por PEG/fosfato de potássio, tendo por parâmetros massa molar do PEG e pH do meio. Podemos verificar que quanto maior a massa molar do polímero, menor é a concentração necessária para a formação de duas fases, ou seja, a curva de equilíbrio desloca-se no sentido da região monofásica.

Sistemas de duas fases aquosas são aplicados na purificação de produtos obtidos em células animais, vegetais e microbianas e separação de vírus, organelas e ácidos nucleicos. Como principais vantagens dessa técnica, podemos citar a possibilidade de operação contínua em larga escala a temperatura ambiente; manutenção das proteínas em solução e meio com polímeros ou sais que as protegem da desnaturação; possibilidade de eliminação de algumas etapas do processo de purificação para moléculas intracelulares.

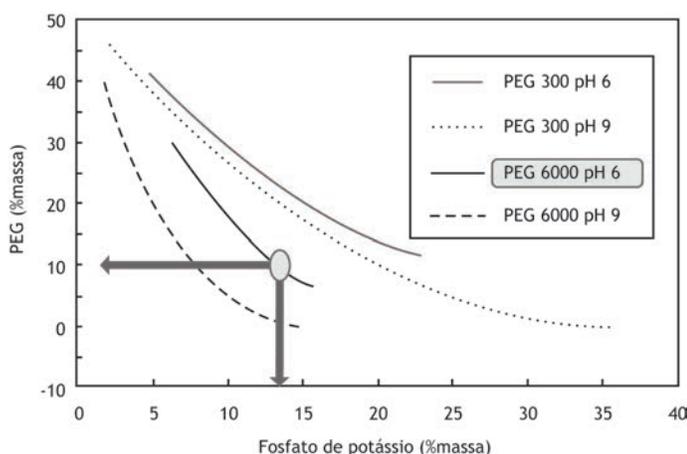


Figura 85 Curvas de equilíbrio do sistema PEG/fosfato de potássio em função da massa molar do PEG e pH do meio.

Fonte: adaptada de Pessoa & Kilikian (2005).

8.5 Cromatografia

A adsorção é um fenômeno de superfície em que componentes de um gás ou líquido são concentrados na superfície de partículas sólidas ou na interface de fluidos. É resultado de interações eletrostáticas, forças de van der Waals, dentre outros tipos de interações e ligações. Quatro tipos de adsorções podem ser descritas: troca, físicas, químicas e não específicas. Nas operações de adsorção, a substância a ser concentrada é chamada de adsorvido, enquanto o material no qual ocorre o fenômeno é chamado de adsorvente. A Figura 86 ilustra a passagem de uma mistura em uma coluna de adsorção de leito fixo e a correspondente curva de saturação do meio.

A operação que utiliza os princípios da adsorção é a cromatografia. Os solutos presentes num meio líquido são retidos em um leito de material poroso por fenômenos de adsorção, ou ainda partição e exclusão molecular. A fase estacionária pode ser constituída de pó sílica porosa, polímeros orgânicos sintéticos, polímeros de carboidratos como gel. Neste específico, a cromatografia é denominada de exclusão em gel, ou ainda, exclusão molecular, filtração em gel ou cromatografia de peneira molecular. O princípio básico desse método é que as moléculas sofrem partição em virtude das diferenças de tamanho das espécies entre um solvente (fase móvel) e uma fase estacionária de porosidade definida.

Na cromatografia de troca iônica há separação de proteínas no equilíbrio de íons da fase móvel e estacionária. Assim, a fase estacionária deve ser capaz de ligar proteínas carregadas positivamente ou negativamente. Acima do pI (ponto isoelétrico) as proteínas possuem carga líquida negativa, enquanto abaixo possuem carga líquida positiva.

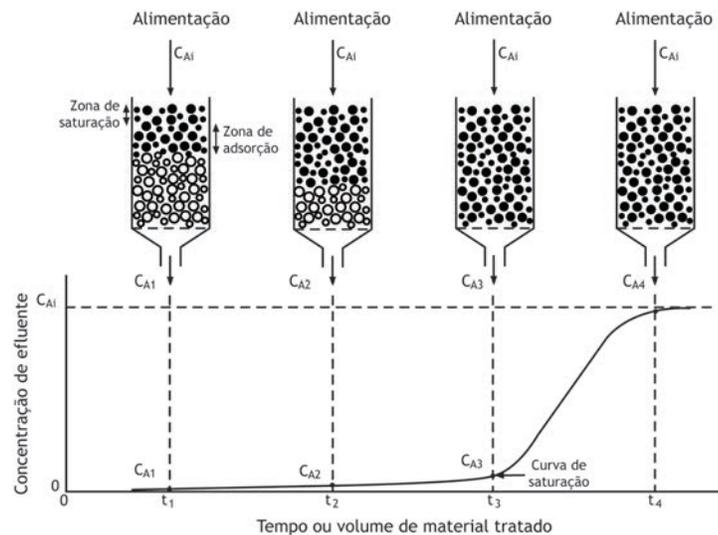


Figura 86 Movimento na zona de adsorção para coluna com leito fixo de adsorvente.

Fonte: adaptada de Doran (1995).

Existem diversos tipos de processos cromatográficos e seria complicado explicar todos com consistência técnica desejada neste item. Para mais informações, consultar as referências listadas no final da Unidade.

8.6 Tratamentos finais

Considerando que o acondicionamento do produto e o grau de pureza dependerão da aplicação final deste, há uma série de tratamentos complementares utilizados para obtenção do produto final. Por exemplo, biomassa ou proteínas unicelulares normalmente exigem etapas de secagem simples. Já extratos

enzimáticos necessitam de uma purificação parcial e secagem mais apropriada, como liofilização. Produtos farmacêuticos podem ser obtidos na forma cristalina, ou seja, agregação de cristais de moléculas presentes em soluções homogêneas super saturadas.

A liofilização é um dos métodos mais utilizados nas etapas finais dos processos de purificação de proteínas, particularmente enzimas. É reconhecidamente o melhor método para obtenção de produtos desidratados de alta qualidade, sendo preferido para a conservação de produtos biológicos. As modificações físico-químicas são inibidas, minimizando a perda de constituintes voláteis ou da atividade biológica. Na liofilização ocorre remoção da maior parte da água contida em um material previamente congelado por sublimação, ou seja, passagem da água diretamente do estado sólido para vapor sem passar pelo estado líquido (Figura 87). A uma pressão superior a 4,58 mmHg, ao fornecer calor a um material congelado, a água se fundirá tornando-se líquida e com o contínuo fornecimento de calor ela evaporará. Em condições de 4,58 mmHg de pressão e 0°C tem-se o ponto triplo da água, com a coexistência das três fases. Assim, o fornecimento de calor a um material congelado submetido à pressão menor que 4,58 mmHg é o princípio da liofilização. Na prática a temperatura do produto congelado é mantida abaixo de 0°C. O sucesso de um processo de liofilização está ligado ao fato do material ser mantido no estado sólido, minimizando as reações de degradação mais comuns em processos convencionais de secagem.

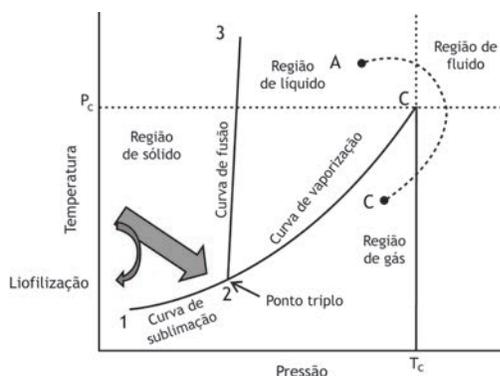


Figura 87 Diagrama de fases da água.

Referências

- DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press, 1995. 439 p.
- PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. Barueri: Manole, 2005. 444 p.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 477 p.

SOBRE O AUTOR

Reinaldo Gaspar Bastos

Reinaldo Gaspar Bastos é engenheiro de alimentos, Mestre em Engenharia de Alimentos e Doutor em Engenharia Química. Professor do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural (DTAiSER) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Leciona disciplinas da área de Microbiologia Industrial no curso de Biotecnologia e desenvolve pesquisas na área de Engenharia de Processos Biotecnológicos.

