

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**ESTUDOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO
GLUCÔNICO A PARTIR DE SACAROSE INVERTIDA EM
BIORREATOR AIRLIFT**

Sidney Magalhães Lopes.

São Carlos / SP — 2011

**ESTUDOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO
GLUCÔNICO A PARTIR DE SACAROSE INVERTIDA EM
BIORREATOR AIRLIFT**

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

ESTUDOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO A PARTIR DE SACAROSE INVERTIDA EM BIORREATOR AIRLIFT

Sidney Magalhães Lopes

Aluno de Pós-Graduação

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

Orientador PPG-EQ/UFSCar

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química –
área de concentração: Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos Químicos.

São Carlos / SP — 2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L864ep

Lopes, Sidney Magalhães.

Estudos preliminares de produção de ácido glucônico a partir de sacarose invertida em biorreator airlift / Sidney Magalhães Lopes. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
61 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Ácidos. 2. Enzimas. 3. Biorreatores pneumáticos. I. Título.

CDD: 661.86 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
SIDNEY MAGALHÃES LOPES APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 22 DE DEZEMBRO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Júnior
Orientador, UFSCar



André Bernardo
UFSCar



Marcel Otávio Cerri
UFSJ

EPÍGRAFE

*“Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte,
não temerei mal algum...”*

Salmo 23, 4

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Alberto Colli Badino Jr. pela orientação, paciência e compreensão ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Helvécio e Carminha, que, mesmo distantes, sempre me apoiaram e me incentivaram confiando-me suas esperanças.

Aos meus irmãos, Simone e Eduardo, que encontraram minha força quando pensei já tê-la perdido.

A toda minha família que concluí ser meu bem maior dentre todos os quais sempre desejei e que ainda venha a desejar.

Aos amigos e companheiros de laboratório, de cafezinho (embora eu não bebesse) e de tantos bons momentos, Sérgio, Cecília, Maritza, Gabriel, Mateus, Fernanda. Aos amigos da Engenharia Química e da Química dos quais guardo boas lembranças.

Aos amigos de São Carlos, de Viçosa, de Teixeiras e aos que já estão espalhados pelo país. Não importa a quantidade, mas a qualidade. Agradeço por reconhecermo-nos como amigos.

A todos os que de alguma forma contribuíram com meu crescimento nestes anos, perto ou longe.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1. Enzimas.....	5
3.2. Ácido Glucônico e Gluconatos.....	7
3.3. Cinética de Produção de Ácido Glucônico	11
3.4. Frutose	13
3.5. Biorreatores	14
3.6. Transferência de Oxigênio.....	16
3.7. Considerações Finais.....	21
4. Materiais e Métodos.....	22
4.1. Materiais	22
4.1.1. Glicose e Frutose	22
4.1.2. Enzima.....	22
4.1.3. Dióxido de Manganês	22
4.2. Equipamentos	22
4.2.1. Biorreator Airlift.....	22
4.2.2. Biorreator para Testes de Atividade	24
4.2.3. Reômetro	24
4.2.4. Analisador de Glicose	25
4.3. Metodologia Experimental	25
4.3.1. Medidas de Atividade da Glicose Oxidase (GOD)	25
4.3.2. Determinação da Concentração de Glicose.....	25
4.3.3. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais (ART)	26
4.3.4. Estimativa da Concentração de Ácido Glucônico.....	26
4.3.5. Medidas de Viscosidade.....	26
4.3.6. Medidas do Coeficiente de Transferência de Oxigênio ($k_L a$).....	27
4.3.7. Avaliação da Transferência de Oxigênio em Biorreator Airlift	28
4.3.8. Ensaio para a Produção de Ácido Glucônico.....	28
4.3.9. Avaliação Preliminar da Cinética do Processo	31

5. Resultados e Discussão	33
5.1. Avaliação da Transferência de Oxigênio	33
5.2. Avaliação da Atividade da Glicose Oxidase (GOD)	35
5.3. Produção de ácido glucônico	37
5.3.1. Avaliação da Influência da Presença de Frutose	37
5.3.2. Avaliação Preliminar da Cinética do Processo	44
5.3.3. Cálculos de Produtividade em Ácido Glucônico	50
6. Conclusões	52
7. Referências Bibliográficas	53
ANEXOS	60
A. Comparativo entre os Métodos de Dosagem de Glicose	60
B. Especificidade da GOD em Relação à Glicose	61

RESUMO

A utilização da sacarose para a produção de insumos de maior valor agregado é de grande interesse industrial, destacando-se a glicose e a frutose com inúmeras vantagens frente à própria sacarose em processos industriais. Como produtos de segunda geração, pode-se citar o ácido glucônico e seus sais derivados, tendo os mesmos também grande aplicabilidade industrial. O presente trabalho teve por objetivo a avaliação preliminar do processo enzimático de produção simultânea de ácido glucônico e, por consequência, seus sais derivados e um xarope de frutose, a partir da sacarose invertida utilizando glicose oxidase (GOD) em biorreator *airlift* de cilindros concêntricos com 2,0 L de volume útil. Para tal, foi inicialmente avaliada a transferência de oxigênio a partir de valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$), obtidos sob diferentes condições de aeração e utilizando soluções com diferentes concentrações de sacarose invertida. Os resultados obtidos levaram a uma correlação para estimar $k_{L,a}$ durante o processo de oxidação da glicose a ácido glucônico em biorreator *airlift* em função da vazão de alimentação de ar e da viscosidade do meio. Na sequência foram realizados ensaios em batelada a 35°C e pH 5,5 visando à produção de ácido glucônico em sistemas com diferentes concentrações de glicose (20 e 40 g.L⁻¹), na presença ou não de frutose, e com duas diferentes concentrações de enzima. O consumo de glicose e a concentração de oxigênio dissolvido foram acompanhados ao longo dos ensaios. Parâmetros cinéticos referentes ao processo (V_{max} , K_S e K_O) foram obtidos por ajuste de modelo cinético aos valores experimentais. Os resultados obtidos mostraram que a presença da frutose não influenciou significativamente a afinidade da GOD pela glicose dada a pequena variação de K_S , como também não alterou V_{max} em concentrações iguais de glicose nas condições avaliadas. A análise dos valores obtidos de K_O mostrou que, apesar de a concentração de O₂ ser pequena em relação à de glicose no meio, o oxigênio não foi o fator limitante do processo. Os resultados, ainda que de forma preliminar, evidenciam a viabilidade de desenvolvimento de uma tecnologia de produção para a obtenção simultânea de ácido glucônico e xarope de frutose a partir da sacarose invertida.

ABSTRACT

The use of sucrose for the production of industrial inputs with higher added value has a great industrial interest, especially glucose and fructose which present many advantages over sucrose in industrial processes. Gluconic acid and its derived salts can be mentioned as second generation products also having wide industrial applicability. This study aimed to perform a preliminary evaluation of the enzymatic process for simultaneous production of gluconic acid and, consequently, its derived salts and a high-fructose syrup from sucrose inverted using glucose oxidase (GOD) enzyme in a concentric draft tube airlift bioreactor with 2.0 working volume. For this propose, the volumetric oxygen transfer coefficient (k_La), obtained under different aeration conditions using solutions with different inverted sucrose concentrations, was firstly evaluated. The results led to a correlation to estimate k_La during the oxidation of glucose to gluconic acid in an airlift bioreactor as a function of air flow rate and medium viscosity. Experimental trials were carried out in batch at 35 °C and pH 5.5 in order to produce gluconic acid with different initial glucose concentrations (20 and 40 g.L⁻¹) in the presence or absence of fructose, and with two different enzyme concentrations. The consumption of glucose and dissolved oxygen was monitored throughout the trials. The kinetic parameters for the process (V_{max} , K_S and K_O) were obtained by fitting of the kinetic model to the experimental values. The results showed that the presence of fructose did not significantly affect the affinity of GOD for glucose due to the small variation of K_S , as well as it did not alter V_{max} values for equal concentrations of K_O showed that, although the dissolved O₂ concentration was small compared to that of glucose in the medium, the oxygen was not the limiting factor of the process. The results, even though preliminary, demonstrate the viability of developing a simultaneous production process for gluconic acid and high-fructose syrup from inverted sucrose.

1. Introdução

Há muitos anos o estudo da sacarose como matéria-prima para a produção de insumos para a indústria química e a produção de novos derivados com maior valor agregado tem despertado o interesse dos pesquisadores e de políticas específicas para este setor. Esse ramo da química é tão importante que passou a ser conhecido como sucroquímica, que é entendida como o ramo da ciência e da tecnologia cujo objetivo é acrescentar ao mercado novas utilizações da sacarose e seus derivados, seja por processos de transformações radicais na estrutura carbônica ou por processos que envolvem modificações nos grupos hidroxila (FERREIRA *et al.*, 2009).

Dentre os vários produtos obtidos a partir da sacarose, pode-se citar a D-glicose, que juntamente com a frutose, é gerada pela hidrólise ácida ou enzimática da sacarose. A oxidação da glicose gera o ácido glucônico, produto comercializado em forma de solução e considerado seguro pela FDA (*Food and Drug Administration*), órgão regulamentador americano para alimentos e insumos farmacêuticos, sendo fundamentalmente utilizado na indústria alimentícia como acidulante. Seus sais derivados, os gluconatos, também são avaliados da mesma maneira tendo ampla aplicação industrial, se destacando nas áreas alimentícia, têxtil, farmacêutica e de cimento (WONG *et al.*, 2008).

Os sais com maior destaque são gluconato de sódio e gluconato de cálcio. O primeiro é um agente complexante e por isso muito utilizado para a lavagem de materiais de vidro ou embalagens retornáveis. Já o segundo tem como principal função a reposição de cálcio em pessoas com tal deficiência (Ficha Técnica – Cimental).

O ácido glucônico é produzido em grande escala através da oxidação de glicose por três vias: Fermentativa, Catálise Química e Catalise Enzimática.

Na conversão por catálise química normalmente são empregados catalisadores metálicos – Pt, Pd, Au – ou bimetálicos constituídos por Pd junto a' outro metal (Bi, Tl, Sn, Co). O processo químico mostrou bons resultados, porém, muitas são as complicações a ele associadas e que dificultam sua

utilização. As reações de catálise química geralmente têm baixa seletividade para o ácido glucônico e os catalisadores podem ainda sofrer desativação durante a reação (LIU e CUI, 2007).

Assim, a via fermentativa é uma das rotas predominantes para a produção de ácido glucônico. Isto se justifica no bom rendimento do processo, além da baixa quantidade de subprodutos formados e da possibilidade do emprego de glicose comercial como substrato para a reação enzimática. Entretanto, apesar das vantagens do processo de conversão microbiológica, a biotransformação apresenta dois grandes problemas; o primeiro deles é a diminuição da produtividade resultante da inibição do microorganismo provocada pela glicose ou pelo ácido glucônico produzido; além disso, há ainda a dificuldade em se separar o produto do caldo de fermentação visto que o processo de transformação produz uma grande quantidade de resíduos (LIU e CUI, 2007).

Em meio às dificuldades dos dois procedimentos anteriores cresceu o interesse na aplicação do método de conversão por catálise enzimática. Nesse âmbito, a utilização da glicose oxidase (GOD) oferece todas as vantagens da biotransformação em termos de especificidade, promovendo em alguns casos uma eficiência de conversão de glicose em ácido glucônico de aproximadamente 100%, além de reduzir o tempo de reação em comparação ao processo fermentativo, haja vista não ser necessário o tempo de crescimento do microorganismo, obtendo um produto mais puro (WONG *et al.*, 2008) com menor consumo de energia (LIU e CUI, 2007).

A formação de ácido glucônico está diretamente relacionada com a atividade da enzima. A GOD é induzida na presença de níveis elevados de glicose no meio, valores de pH em torno de 5,5 e grande quantidade de oxigênio dissolvido, para o qual se dispõe da concentração de saturação nas condições do meio reacional. No processo, faz-se necessária a utilização de catalase ou dióxido de manganês devido à inibição causada pelo peróxido de hidrogênio na atividade enzimática (BAO *et al.*, 2001a).

Sendo assim, os principais parâmetros operacionais que influenciam a produção de ácido glucônico por via enzimática são o pH, uma vez que os valores vão diminuindo conforme a formação do ácido glucônico, e

a quantidade de oxigênio dissolvido no meio visto que o mesmo é um dos substratos no processo de bioconversão enzimática.

Além disso, a baixa solubilidade do oxigênio no meio de reação em relação aos outros compostos torna-o fator limitante do processo. Diante disso, a transferência de oxigênio para o meio deve ser quão eficiente possível e neste âmbito, o biorreator tem papel fundamental, pois permite otimizar essa transferência.

A glicose oxidase (β -D-glucose oxygen 1-oxidoreductase) é uma glicoproteína que atua em conjunto com coenzimas FAD para produzir ácido glucônico a partir de glicose com liberação de peróxido de hidrogênio como subproduto. A oxidação da glicose pela GOD ocorre em quatro etapas, porém, visto que a solubilidade do oxigênio é muito menor do que a dos demais componentes do meio reacional, seu nível de concentração influenciará diretamente a velocidade de reação. Daí a importância em se avaliar os parâmetros cinéticos não só da enzima utilizada, mas também do processo como um todo, o que envolve a reação e a transferência de massa do oxigênio da fase gasosa para a fase líquida.

Paralelamente à oxidação da glicose, quando se utiliza sacarose invertida como substrato, há a formação de um xarope rico em frutose, produto também de interesse comercial no país e sobre o qual recairá parte considerável de nossa atenção.

O xarope rico em frutose (*High Fructose Syrup*) é amplamente utilizado como adoçante na indústria alimentícia e farmacêutica. Além de ser uma fonte de energia instantânea, tem mais propriedades funcionais desejáveis frente ao xarope de sacarose, tais como alta pressão osmótica e alta solubilidade, impedindo a cristalização de açúcar em produtos alimentícios. O xarope de frutose é também matéria prima para obtenção de frutose cristalina.

A partir das considerações anteriores, este trabalho tem por objetivo geral avaliar a produção de ácido glucônico por glicose oxidase livre em biorreator *airlift* utilizando sacarose invertida.

Para este fim, o mesmo está fundamentado em dois objetivos específicos: a avaliação da transferência de oxigênio em biorreator *airlift* de cilindros concêntricos em diferentes condições de alimentação de ar e utilizando fluidos de diferentes viscosidades; avaliação da influência da frutose

na oxidação de glicose por glicose oxidase por meio dos parâmetros cinéticos associados à produção de ácido glucônico em biorreator *airlift* de cilindros concêntricos a partir de sacarose invertida utilizando GOD.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Enzimas

A vida depende de uma série de reações químicas muito bem orquestradas. Muitas destas, porém, ocorrem muito lentamente por conta própria. Em função disso, a natureza projeta catalisadores aos quais chamamos enzimas. O poder catalítico das enzimas conduz os processos vitais em qualquer organismo vivo. Muitas enzimas mantêm seu potencial catalítico após serem extraídas do organismo vivo, sendo assim, não demorou muito para que as pessoas reconhecessem e explorassem seu poder catalítico para fins comerciais. Os mais antigos referem-se à fabricação de pães, queijos e bebidas alcoólicas. Atualmente as enzimas continuam a ser peças chave em muitos processos alimentícios, porém também são utilizadas em diversos outros setores, podendo ser adicionadas à composição de alguns produtos, como, por exemplo, detergentes em pó que dissolvem manchas de origem proteica com a ajuda de enzimas proteolíticas (COPELAND, 2000) e servem de base para muitos medicamentos sejam como constituintes de suas fórmulas ou mesmo na busca por inibidores de sua ação catalítica.

Exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico, todas as enzimas são proteínas cuja ação catalítica depende da integridade de sua conformação sendo que sua desnaturação ou dissociação pode levar à perda da atividade.

Algumas enzimas dependem apenas de suas próprias subunidades de aminoácidos para desempenhar suas funções catalíticas enquanto que outras necessitam de componentes químicos adicionais denominados cofatores, os quais podem ser íons metálicos ou estruturas moleculares mais complexas chamadas coenzimas que ligados covalentemente à enzima são denominados grupos prostéticos.

O local específico da enzima onde ocorrem as reações químicas é chamado sítio ativo. O sítio ativo de uma enzima é revestido por aminoácidos que se ligam ao substrato da reação e catalisam a transformação química.

A atividade enzimática é habitualmente expressa em Unidades Internacionais (UI). Segundo a *Enzyme Commission*, uma unidade é a

quantidade de enzima capaz de formar (gerar) uma dada quantidade de produto por unidade de tempo (mmol/min) em condições ótimas de medida (pH, temperatura, etc.) especificadas para cada caso. É definida ainda a Atividade Específica de uma enzima como sendo o número de UI por miligrama de proteína. Nos processos que levam à purificação de uma enzima, inicialmente presente em uma mistura contendo outras proteínas, a atividade específica da preparação aumenta em cada etapa de purificação, até tornar-se máxima e constante para a enzima pura.

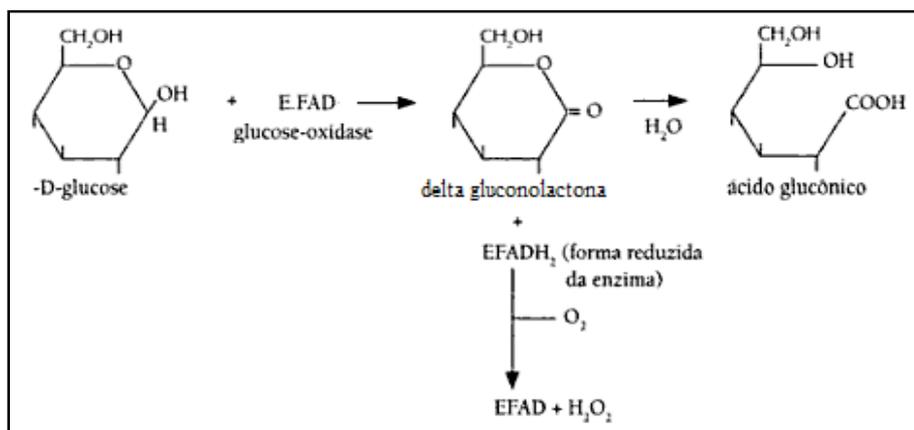
As enzimas são classificadas segundo a reação química que catalisam. Para cada enzima são atribuídos dois nomes e uma sequência de dígitos que identificam as classes e subclasses. Seguindo este princípio, adotado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas estão divididas em seis classes: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Para o momento, atenta-se apenas para a primeira delas, as oxidorreduções, enzimas que catalisam reações de oxidação-redução, grupo do qual faz parte a glicose oxidase (GOD), que é responsável pela oxidação de um grupo hidroxila da molécula de glicose em um grupo carboxila do ácido glucônico.

GOD é uma das enzimas de maior aplicação tecnológica desde a década de 1950 (BANKAR, 2009) sendo purificada de uma grande variedade de fungos dentre os quais destacam-se os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Destes, os da espécie *Aspergillus niger* são os mais comumente utilizados. Entre as diversas aplicações comerciais da GOD incluem-se a remoção de glicose de ovos em pó; melhorias na cor, sabor e validade de produtos alimentícios; remoção de oxigênio de sucos de frutas, bebidas enlatadas e de maionese. Pode também ser usada juntamente com catalase em kits para quantificação automática de glicose e ainda em sensores para a detecção de glicose em soluções industriais e em sangue e urina humanos (BANKAR, 2009).

GOD é uma glicoproteína dimérica de massa molar variando entre 130 e 175 kDa tendo suas subunidades ligadas covalentemente por pontes dissulfeto (BANKAR, 2009).

A figura 2.1 ilustra a atuação da GOD sobre a glicose auxiliada pelo cofator FAD.

Figura 2.1. Reações envolvidas no mecanismo catalítico da GOD.



2.2. Ácido Glucônico e Gluconatos

O ácido glucônico tanto quanto seus sais derivados são considerados como seguros pela FDA (*Food and Drug Administration*), órgão governamental dos Estados Unidos que controla os alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos, materiais biológicos, produtos derivados do sangue humano, dentre outros, a serem comercializados.

Trata-se de material largamente aplicado industrialmente em áreas como farmacêutica, alimentícia, têxtil, dentre outras; sendo usado como um acidulante leve em indústrias de metal e de couro (BANKAR *et al.*, 2009).

O ácido glucônico é um ácido orgânico fraco, não-corrosivo, não-volátil e atóxico. A tabela 2.1 apresenta algumas características gerais da solução saturada comercial.

Tabela 2.1. Características gerais da solução saturada de ácido glucônico (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

Ácido glucônico	
Natureza	Não-corrosivo, levemente ácido, pouco irritante, inodoro, atóxico, facilmente biodegradável, não-volátil.
Massa molar	196,16
Fórmula química	$C_6H_{12}O_7$
Sinônimo	Ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxiexanóico
pKa	3,7
Ponto de fusão (solução 50%)	Abaixo de 12 °C
Ponto de ebulição (solução 50%)	Acima de 100 °C
Densidade	1,24 g.mL ⁻¹
Aparência	Transparente a marrom
Solubilidade	Solúvel em água

Sua produção mundial se aproxima de 60.000 ton/ano, podendo ser produzido pela oxidação parcial de glicose por meio de três processos: catálise química; conversão microbiológica; catálise enzimática (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

Na conversão por catálise química normalmente são empregados catalisadores metálicos – Pt, Pd, Au – ou bimetálicos constituídos por Pd junto a outro metal (Bi, Ti, Sn, Co). O processo químico mostrou bons resultados, porém, muitas são as complicações a ele associadas e que dificultam sua utilização. As reações de catálise química geralmente têm baixa seletividade, não ocorrendo de forma diferente para o ácido glucônico, podendo inclusive os catalisadores sofrer desativação durante a reação (LIU e CUI, 2007).

Desta forma, a via fermentativa torna-se uma das rotas predominantes para a produção de ácido glucônico. Tal predominância encontra justificativa no bom rendimento do processo, além da baixa quantidade de subprodutos formados e da possibilidade do emprego de glicose comercial como substrato para a reação enzimática. Por esta razão o ácido glucônico é amplamente produzido industrialmente através de processos

fermentativos (KLEIN *et al.*, 2002; SANKPAL e KULKARNI, 2002; ZNAD *et al.*, 2004; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; ANASTASSIADIS *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2005, SHARMA *et al.*, 2007).

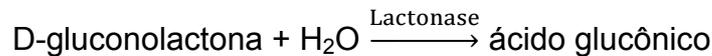
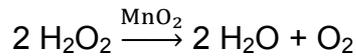
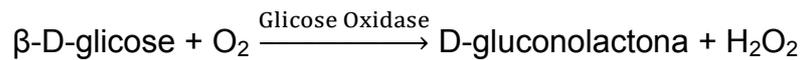
As fontes mais comuns de fermentação microbiana para a produção de GOD e subsequente obtenção de gluconatos são as espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces*, sendo que a maioria da GOD produzida comercialmente é isolada de micélio de *Aspergillus niger*. (BANKAR *et al.*, 2009). A GOD pode ser produzida nesses microorganismos intra ou extracelularmente e algumas vezes pode estar associada aos micélios sendo que, quanto mais periférica for sua localização, mais facilitada será sua extração e transferência ao caldo fermentativo.

Apesar das vantagens do processo de conversão microbiológica, a biotransformação apresenta dois grandes problemas; o primeiro deles é a queda na produtividade resultante da inibição provocada pelo ácido glucônico produzido. Além disso, há ainda a dificuldade em se separar o produto do caldo de fermentação visto que o processo de transformação produz uma grande quantidade de resíduos (LIU e CUI, 2007).

Em meio às dificuldades dos dois procedimentos anteriores cresceu o interesse na aplicação do método de conversão por catálise enzimática. Nesse âmbito, a utilização da GOD oferece todas as vantagens da biotransformação em termos de especificidade, promovendo em alguns casos uma eficiência de conversão de glicose em ácido glucônico de aproximadamente 100%, além de reduzir o tempo de reação em comparação à fermentação, de findar em produtos mais puros (WONG *et al.*, 2008) e de necessitar de quantidades menores de energia (LIU e CUI, 2007).

A oxidação da glicose a ácido glucônico pela GOD ocorre em duas etapas: formação de D-gluconolactona e peróxido de hidrogênio; hidrólise da D-gluconolactona a ácido glucônico. O primeiro passo é realizado pela ação catalítica da GOD. No passo seguinte, tanto a D-gluconolactona quanto o peróxido são decompostos, espontaneamente ou por intermédio de catalisadores (lactonase e MnO₂ ou catalase, respectivamente).

Reações:



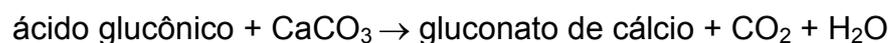
A formação de ácido glucônico está diretamente relacionada com a atividade da enzima. A GOD é induzida na presença de níveis elevados de glicose no meio, valores de pH em torno de 5,5 e grande quantidade de oxigênio dissolvido no meio. A utilização do dióxido de manganês é necessária devido à inibição causada pelo peróxido de hidrogênio na atividade enzimática. O MnO_2 catalisa a decomposição do peróxido em água e oxigênio (BAO *et al.*, 2003).

Sendo assim, os principais parâmetros operacionais que influenciam a produção de ácido glucônico por via enzimática são o pH – uma vez que os valores vão diminuindo conforme a formação do ácido glucônico – e a quantidade de oxigênio dissolvido no meio visto que o mesmo é um dos substratos no processo de bioconversão enzimática.

Além disso, a baixa solubilidade do oxigênio no meio de reação em relação aos outros compostos torna-o fator limitante do processo. Diante disso, a transferência de oxigênio para o meio deve ser quão eficiente possível e neste âmbito, o biorreator tem papel fundamental, pois permite otimizar tal fator.

Uma última etapa, considerando a produção de gluconatos, é a neutralização do ácido glucônico produzido através da utilização de uma base forte ou sal que contenha o íon de interesse como, por exemplo, o carbonato de cálcio utilizado na fabricação do sal de cálcio segundo a reação que segue.

Reação:



O gluconato de cálcio é uma das principais fontes de cálcio passível de administração a indivíduos com deficiência específica deste mineral. Caracteriza-se como um sólido branco-cristalino na forma de agulhas

finas apresentando baixa solubilidade em água quando comparado a outros gluconatos alcalinos (BAO *et al.*, 2001a).

Outro sal derivado do ácido glucônico de grande importância industrial é o gluconato de sódio. Por ser um agente complexante, é muito utilizado para a lavagem de materiais de vidro ou de embalagens reutilizáveis. Também é aplicado na indústria de cimentos onde modifica as propriedades das misturas aumentando a dureza e a sua resistência a água.

Nas últimas duas décadas, estudos têm avaliado a produção de ácido glucônico e seus derivados em diferentes biorreatores (NAKAO *et al.*, 1997, 1999; BAO *et al.*, 2000, 2001a e b, 2003a e b; ARIMATSU *et al.*, 2004; GODJEVARGOVA *et al.*, 2004; LIU e CUI, 2007; TOMOTONI e VITOLLO, 2007b). Os trabalhos recentes (BAO *et al.*, 2001b e 2003a e b; ARIMATSU *et al.* 2004), priorizam a utilização do biorreator *airlift* devido à sua eficiência nos processos de transferência de calor e massa. Outras vantagens atribuídas são as facilidades no projeto e na construção, além do relativamente baixo custo de fabricação do equipamento quando comparado a biorreatores convencionais do tipo tanque agitado e aerado (CHISTI e MOO-YOUNG, 2002).

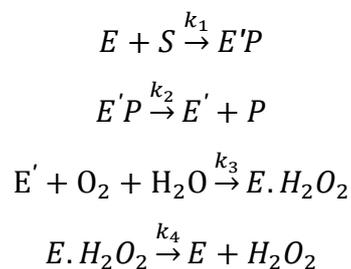
Devido à baixa solubilidade do oxigênio em comparação às das fontes de carbono e outros nutrientes, sua transferência entre as fases gasosa e líquida é fator limitante dos bioprocessos aeróbios. Tal fato fica mais evidente quando se trata de meios com alta viscosidade devido às grandes concentrações de substrato. Em casos como estes a agitação e/ou a aeração do meio são importantes fatores para o bom andamento do processo.

2.3. Cinética de Produção de Ácido Glucônico

A glicose oxidase é uma enzima que catalisa a oxidação da β -D-glicose a ácido glucônico com formação de D-gluconolactona. A enzima atua em conjunto com um grupo cofator FAD (flavina adenina dinucleótido) que atribui à proteína a capacidade para catalisar reações de oxidação-redução. A reação se processa em dois passos principais, no primeiro, o grupo FAD sofre redução a FADH₂, que é acompanhada pela oxidação da β -D-glicose a D-gluconolactona. No segundo passo a flavina reoxida-se convertendo o oxigênio gasoso em peróxido de hidrogênio.

Nakamura e Yasuyuki (1962) propuseram um mecanismo de oxidação da glicose por GOD em quatro etapas seguidas da decomposição do peróxido de hidrogênio, subproduto de reação, por um catalisador auxiliar. No caso descrito, como em outros constantes da literatura, foi utilizada catalase para a decomposição do peróxido. Com efeito, utilizou-se neste trabalho o dióxido de manganês atuando com a mesma função assim como em outros trabalhos.

Com base nas quatro reações que seguem, assumindo condições de pseudo estado estacionário, pode-se obter o modelo cinético de produção de ácido glucônico dada pela equação 2.2:



$$\frac{C_E}{r_P} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_3 C_O} + \frac{1}{k_1 C_S} \quad (2.1)$$

As constantes k_1 a k_4 são as constantes das reações de oxidação e redução, onde E e E' são as formas oxidada e reduzida da GOD, S é o substrato (glicose) e P é o produto formado (ácido glucônico).

$$r_P = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_S}{C_S} + \frac{K_O}{C_O}} \quad (2.2)$$

Através do ajuste da equação da cinética aos resultados experimentais utilizando rotina computacional, é possível obter-se os valores das constantes de saturação K_S e K_O e da velocidade máxima de conversão de glicose em ácido glucônico V_{max} , como propõem Sikula e colaboradores (2006).

Outros trabalhos recentes como os de Juraščík *et al.* (2006 e 2007) e o de Sikula e Markoš (2008) tratam de métodos para o desenvolvimento de processos enzimáticos e das influências das propriedades do meio reacional na hidrodinâmica dos biorreatores.

2.4. Frutose

A frutose, isolada pela primeira vez em 1847 a partir da cana-de-açúcar (BARREIROS, 2005), é amplamente utilizada como adoçante pelas indústrias alimentícias e de bebidas, por apresentar poder edulcorante 70% maior que a sacarose sem os problemas de cristalização do xarope de sacarose (CRUZ *et al.*, 1998). Também conhecida como levulose, pode ser encontrada na natureza em forma isolada ou como constituinte da sacarose e de outros polímeros como a inulina. Outras vantagens da utilização da frutose são o aumento da absorção de ferro em crianças (PESSOA-JR e VITOLO, 1999) e a tolerância por indivíduos diabéticos. Por esse motivo, a frutose vem sendo recomendada como adoçante alternativo para diabéticos, pois promove a diminuição no nível de glicose plasmática e, diferentemente da glicose, pode ser metabolizada independentemente da insulina (PESSONI *et al.*, 2004). Atualmente, o xarope rico em frutose é obtido através do processo de isomerização da glicose (obtida de amido) empregando a enzima glicose-isomerase imobilizada em biorreator de leito fixo. Embora esse processo represente um marco para a tecnologia enzimática, a produtividade depende do controle rígido de temperatura e pH e da qualidade do xarope de glicose utilizado no processo (TOMOTANI E VITOLO, 2007a). Tais fatores acarretam considerável aumento no preço final do produto.

Tomotani e Vitolo (2007a) avaliaram o desempenho da enzima invertase na produção de xarope de frutose a partir de sacarose em biorreator de membrana, alcançando rendimento de 100% com utilização de ultrafiltração.

Outro processo de obtenção da frutose é a hidrólise de inulina de alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) por inulinase, sobre o qual constam muitos trabalhos como os de D'Egídio e colaboradores (1998) e de Yu e colaboradores (2010), porém ainda são necessários estudos mais aprofundados relacionados à cinética do processo de produção.

A grande aplicação da frutose está na indústria alimentícia, contudo há aplicações fora do contexto alimentar, que correspondem à produção de hidroximetilfurfural e ácido levulínico (FERREIRA *et al.*, 2009).

2.5. Biorreatores

Biorreatores ou reatores bioquímicos ou biológicos são equipamentos nos quais ocorrem reações químicas intermediadas por biocatalisadores tais como enzimas ou células microbianas, células animais ou vegetais (SCHMIDELL, 2001). No caso da utilização de células, para adequados crescimento celular e produção dos metabólitos desejados, é fundamental que sejam pré-estabelecidas condições ideais de cultivo. Neste contexto, o papel principal do biorreator é propiciar tais condições, sejam de temperatura, pH, substratos e sais nutricionais, vitaminas e oxigênio dissolvido, para o caso de microrganismos aeróbios (SCHÜRGERL, 1987). Da mesma maneira, para o caso de reações químicas catalisadas por enzimas, é necessário que se estabeleça no interior do biorreator condições mais próximas possíveis das ideais para a atuação das mesmas, sejam temperatura, pH da solução e aeração do meio quando se fizer necessário.

Outro fator relevante é a homogeneização do meio reacional. A importância é devida à necessidade, a priori, de homogeneizar os valores de pH, temperatura e nutrientes além de dispersar possíveis sólidos insolúveis e contribuir para a transferência de oxigênio para o meio líquido em processos aeróbios, assim como em reações químicas nas quais é reagente ou substrato de uma enzima.

Os processos biotecnológicos envolvendo cultivos de células microbianas conduzidos em aerobiose têm grande interesse industrial. Produção de antibióticos, enzimas, vitaminas, por exemplo, são em sua grande maioria processos aeróbios. Tais processos necessitam de um adequado sistema de transferência de oxigênio para que este, quando dissolvido em meio líquido, possa ser utilizado pelas células para produção de biomassa gerando energia necessária ao processo. Esse é um dos pontos críticos na operação de biorreatores uma vez que o oxigênio é pouco solúvel em água, da ordem de 8 ppm ao se borbulhar ar atmosférico a 1 atm e 25°C (SCHMIDELL, 2001 e BAILEY e OLLIS, 1986). Tendo em vista a grande demanda de oxigênio, seja pela respiração celular ou pelo consumo como substrato limitante, a transferência da fase gasosa para a líquida deve ser quão eficiente possível a fim de suprir as necessidades do processo.

Os biorreatores pneumáticos são equipamentos onde tanto a agitação como a homogeneização do meio de cultura são efetuadas somente pela injeção de gás. Esse tipo de biorreator é bastante interessante, pois, embora apresente maior cisalhamento, quando comparado a biorreatores de tanque agitado e aerado, possibilita um menor consumo de energia e uma construção simplificada uma vez que dispensa o emprego de sistemas de agitação mecânicos (CHISTI, 1989). Um ponto importante é o fato de que a vazão de gás deve ser superior à dos tanques agitados. Para aumentar o tempo de resistência do gás em contato com o líquido, os biorreatores pneumáticos possuem maior relação altura/diâmetro.

Entre os biorreatores pneumáticos mais utilizados estão os tipo coluna de bolhas e tipo *airlift*, tendo este último maior preferência frente ao anterior devido à vantagem de impor maior transferência de oxigênio, devido à circulação do meio reacional (CHISTI, 1998).

O biorreator tipo coluna de bolhas é o tipo de reator pneumático mais simples. Nele, homogeneização e aeração do meio são providas pelo simples borbulhamento de gás pela parte inferior do recipiente cilíndrico. A transferência de oxigênio, a homogeneização, bem como outros fatores de desempenho são influenciados principalmente pela taxa de vazão do gás e pelas propriedades do fluido (CHISTI e MOO-YOUNG, 2002).

Um tipo especial de reator pneumático ou não-convencional é o tipo "*airlift*". Essa denominação é dada aos biorreatores utilizados em processos aeróbios no qual o volume do fluido contido no tanque encontra-se dividido por meio de defletores em duas regiões distintas interligadas. Somente em uma dessas regiões é borbulhado gás. A região aspergida por gás é chamada região de subida enquanto que a região não aspergida é dita de descida. Em reatores *airlift* do tipo *split-cylinder*, As regiões de subida (*riser*) e de descida (*downcomer*) são separadas por uma placa vertical enquanto que nos do tipo cilindros concêntricos (*concentric draft-tube*) há a presença de um tubo imerso por dentro do qual é aspergido o gás. Neste último caso, a região de descida circunda o cilindro imerso.

Devido à densidade na região de subida ser menor do que a da região de descida, a diferença entre as retenções gasosas das regiões de subida e de descida e a conseqüente disparidade entre as densidades de

dispersão resultam na circulação do fluido no interior do biorreator (CHISTI e MOO-YOUNG, 2002).

Há também o biorreator *airlift* de circulação externa, porém com menor utilização principalmente em processos industriais.

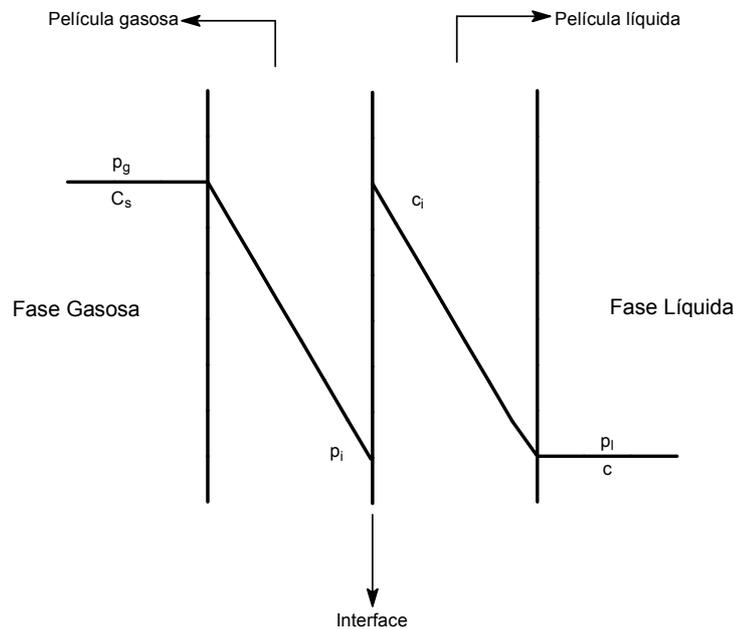
Reatores *airlift* têm sido empregados com sucesso devido a sua elevada eficiência energética frente aos fermentadores agitados e sua maior eficácia em manter sólidos em suspensão quando comparados aos biorreatores do tipo coluna de bolhas (CHISTI e MOO-YOUNG, 2002). Muitos são os trabalhos descritos na literatura referentes à utilização desses biorreatores, principalmente ao longo dos últimos anos tanto para caracterização de culturas e metabólitos, quanto para estabelecer parâmetros cinéticos e hidrodinâmicos referentes aos biorreatores e às formas de cultivo (MOLINA *et al.*, 1999; CHISTI e JAUREGUI-HAZA, 2002; KLEIN *et al.*, 2002; MIRÓN *et al.*, 2004; SIKULA *et al.*, 2007; YAZDIAN *et al.*, 2009; LITTLEJOHNS e DAUGULIS, 2009; CERRI *et al.*, 2008; CERRI *et al.*, 2010; THOMASI *et al.*, 2010).

2.6. Transferência de Oxigênio

Uma vez que, em processos aeróbios, o crescimento celular (quando células estão envolvidas) e a produção dos metabólitos almejados, seja em processos celulares ou enzimáticos é essencialmente dependente da utilização do oxigênio, deve-se avaliar a eficiência da dissolução do gás no meio de cultivo líquido. Esse é o objetivo principal do sistema de agitação e/ou aeração dos biorreatores.

Em relação à dissolução do oxigênio para o meio líquido são previstas três resistências, duas delas devido às películas estagnadas (fases gasosa e líquida) e a última devido à interface gás-líquido (Figura 2.2). A resistência segundo a película estagnada da fase gasosa pode ser desprezada em virtude da movimentação das moléculas de oxigênio; assim também ocorrendo para a interface a menos que se utilizem substâncias que possam aderir à mesma. Resta, portanto, apenas aquela associada à película estagnada da fase líquida, que é função da difusividade do oxigênio no meio líquido.

Figura 2.2. Representação da interface líquido-gás e películas estagnadas (THOMASI, 2010.)



Após estas considerações, chega-se a um resultado final onde a única variável agravante no processo de transferência será a resistência devido à película líquida estagnada perante a interface gás-líquido.

Diante dos apontamentos, pode-se concluir que a necessidade maior, portanto, consiste em propiciar uma eficiente dissolução do oxigênio no meio líquido, deixando então para que as células ou as macromoléculas enzimáticas, sob condições máximas de presença de oxigênio, consumam o substrato de forma plena, dentro das características biológicas próprias de cada espécie (SCHMIDELL, 2001).

Analisando o esquema para a região interfacial, pode-se equacionar a transferência de oxigênio. Na película estagnada gasosa estaria localizada a resistência ao transporte do oxigênio, neste caso caracterizada pelo inverso do coeficiente de transporte da mesma (k_g), coeficiente este definido pela relação entre a difusividade do oxigênio e a espessura da película. Dessa maneira, a transferência dependeria de um gradiente entre as pressões parciais de O_2 no interior da bolha (p_g) – região homogênea de pressão constante – e na interface (p_i), ocorrendo apenas segundo efeito difusional.

Analogamente, pode-se fazer as mesmas considerações para a fase líquida, sendo que a resistência agora será caracterizada pelo inverso do coeficiente de transporte na película estagnada líquida (k_L) e também haverá necessidade de um gradiente entre as concentrações de O_2 na interface (C_i) e no meio líquido (C).

Admitindo que o sistema esteja em estado estacionário em termos da transferência de oxigênio, bem como a existência de um perfil linear de concentração de oxigênio no interior das películas, pode-se escrever:

$$n_{O_2} = \frac{\text{gradiente}}{\text{resistência}} \quad (2.3)$$

onde n_{O_2} é o fluxo de oxigênio por unidade de área interfacial ($gO_2/m^2.h$) e a resistência é o inverso do coeficiente de transferência, ou seja:

$$n_{O_2} = k_g \cdot H(p_g - p_i) = k_L \cdot H(p_i - p_l) = k_g(C_s - C_i) = k_L(C_i - C) \quad (2.4)$$

onde: k_g = coeficiente de transferência de massa da película gasosa (m/h)

k_L = coeficiente de transferência de massa da película líquida (m/h)

p_g = pressão parcial de O_2 no seio gasoso (atm)

p_i = pressão parcial de O_2 na interfase (atm)

p_l = pressão parcial de O_2 em um gás que estaria em equilíbrio com a concentração de oxigênio C no líquido, segundo a lei de Henry (atm)

H = constante de Henry (gO_2/m^3)

C_s = concentração de O_2 dissolvido no líquido em equilíbrio com p_g , segundo a lei de Henry (gO_2/m^3)

C_i = concentração de O_2 dissolvido em equilíbrio com p_i (gO_2/m^3)

C = concentração de O_2 no seio líquido (gO_2/m^3)

Na equação 2.4 introduziram-se como gradientes as diferenças entre as pressões parciais de O_2 , ou estas traduzidas em concentrações através da lei de Henry.

Em termos gerais é preferível trabalhar com um coeficiente global que represente a soma das resistências das películas, uma vez que não se é possível conhecer os valores relativos à interface. Tendo ainda em vista que a resistência devido à película gasosa pode ser desprezada e que toda a resistência da transferência se deve à película líquida, a equação para o fluxo de oxigênio torna-se:

$$n_{O_2} = k_L H(p_g - p_l) = k_L(C_s - C) \quad (2.5)$$

Sendo o fluxo de oxigênio definido por unidade de área interfacial e devido à dificuldade de quantificação da mesma em função da enorme quantidade de bolhas em suspensão, pode-se definir:

$$a = \frac{\text{área interfacial de transferência de massa (m}^2\text{)}}{\text{volume total de líquido (m}^3\text{)}} \quad (2.6)$$

Assim pode-se escrever:

$$n_{O_2} a = k_L a H(p_g - p_l) = k_L a(C_s - C) \quad (2.7)$$

onde: $n_{O_2} a = N_{O_2}$ = velocidade de transferência de oxigênio (gO₂/m³.h)

$k_L a$ = coeficiente volumétrico de transferência de O₂ (h⁻¹)

Durante um processo aeróbio em que haja transferência (N_{O_2}) e consumo de oxigênio (r_{O_2}), o balanço de massa para o oxigênio na fase líquida é dado por:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C_s - C) - r_{O_2} \quad (2.8)$$

C_s neste trabalho foi posteriormente substituído por C^* .

A equação acima permite exata compreensão de todas as formas de que se dispõe para o controle da concentração de O₂ dissolvido no meio em questão (SCHMIDELL, 2001).

Os valores de $k_L a$ são alterados por fatores físicos associados ao tipo de crescimento, velocidade de agitação, vazão de alimentação de ar, difusividade do gás no meio líquido, força iônica, ação de tensoativos e a viscosidade do fluido que pode variar com a velocidade de cisalhamento. Em alguns casos, o fluido pode apresentar comportamento não-Newtoniano cabendo maior atenção.

Littlejohns e Daugulis (2009) realizaram um experimento em biorreator *airlift* de tubos concêntricos contendo água pura e polímeros sequestradores de compostos orgânicos voláteis com o objetivo de avaliar o coeficiente volumétrico de transferência de massa ($k_L a$). Para avaliação dos parâmetros foram testados um tipo de polímero com alta afinidade por oxigênio e outro com baixa afinidade pelo mesmo, em concentrações idênticas, sob variadas taxas de aeração. Como era de se esperar, a adição do polímero com afinidade por oxigênio diminuiu os valores de $k_L a$ em relação ao sistema sem o polímero com aumento da quantidade total de oxigênio transferido ao sistema. Além disso, outros parâmetros hidrodinâmicos revelaram um aumento na mistura da fase líquida.

2.7. Considerações Finais

Recorrentes e diversos são os trabalhos constantes da literatura relacionados à produção de ácido glucônico e de gluconatos o que confirma sua importância (Nakao *et al.*, 1997; Bao *et al.*, 2000, 2001a e b, 2003a e b, 2004; Klein *et al.*, 2002; Godjevargova *et al.*, 2004; Liu e Cui, 2007; Sikula, Jurascík e Markos, 2007). Por vezes o processo envolvido é completamente enzimático e em alguns casos utilizam-se catalisadores inorgânicos. No presente trabalho foram iniciados estudos referentes à produção de ácido glucônico onde optou-se aliar a especificidade enzimática da oxidação da glicose em conjunto com a eficiência de decomposição do peróxido de hidrogênio pelo dióxido de manganês.

Para desenvolver uma metodologia de produção em biorreator, faz-se necessário um conhecimento dos fluidos a serem utilizados e, principalmente das condições de transferência de oxigênio no meio reacional a fim de se avaliar a capacidade de transferência do mesmo. Neste âmbito buscou-se a obtenção de uma equação capaz de estimar os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) ao longo do processo, em função da vazão volumétrica de alimentação de ar e da viscosidade do meio.

Em decorrência da utilização de sacarose invertida como matéria prima, o presente trabalho teve por objeto também a proposição de uma alternativa de produção para o xarope concentrado de frutose, visando à redução dos custos de fabricação do ácido glucônico e por consequência de seus gluconatos derivados, além do desenvolvimento de uma alternativa nacional frente à importação da frutose, fundamentando-se na utilização de matéria prima obtida da sacarose de cana-de-açúcar, uma das culturas agrícolas mais abundantes no Brasil, fato que alia uso de matéria prima nacional de baixo custo à alta tecnologia dos bioprocessos enzimáticos. Dada a presença da frutose no meio reacional, cuja principal atividade refere-se à oxidação enzimática da glicose, coube também avaliar a influência da presença da frutose na cinética do processo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Glicose e Frutose

Em todos os experimentos realizados foram utilizadas D-glicose e D-frutose anidras, ambas com grau de pureza P.A. marca Synth como simulação de sacarose invertida.

3.1.2. Enzima

A enzima utilizada no presente trabalho foi a Gluzyme 10000 BG (glicose-oxidase obtida de *Aspergillus niger*), produzida pela empresa Novo Nordisk BioIndustrial do Brasil. Sua atividade, declarada pelo fabricante é de 10000 GODU por grama de proteína. Uma unidade (U) de GOD corresponde a 1 mg de glicose oxidada por minuto a 35°C e pH 5,5 (TOMOTANI e VITOLLO, 2007b). Segundo o fabricante, o pH ótimo da enzima é de 5,1, com atividade superior a 95% com o pH entre 4,5 e 6,0. A temperatura ótima para utilização da enzima em pH 5,1 encontra-se entre 33 e 37°C.

3.1.3. Dióxido de Manganês

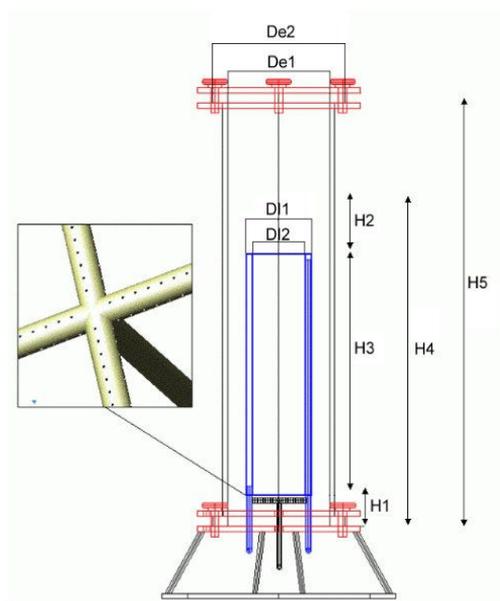
A fim de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio gerado pela oxidação da glicose no processo de produção do ácido glucônico, utilizou-se dióxido de manganês IV com grau de pureza P.A. da marca Vetec.

3.2. Equipamentos

3.2.1. Biorreator Airlift

Utilizou-se um biorreator *airlift* do tipo cilindros concêntricos com 2,0 L de capacidade útil (Figura 3.1 - Badino *et al.*, 2006 e 2007), com monitoramento dos valores de pH e da concentração de oxigênio dissolvido.

Figura 3.1. Representação esquemática com detalhe do aspersor do biorreator *airlift* utilizado (Badino *et al.*, 2006).



Os detalhes referentes às medidas específicas do equipamento são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Características geométricas do biorreator utilizado

DIMENSÕES	MEDIDAS (mm)
H1	32
H2	33
H3	262
H4	327
H5	450
DE1	90
DE2	100
D11	65
D12	55
H4/DE1	3,63
AD/AS	1,68
D12/DE1	0,61

O sistema reacional consta ainda de analisadores de pH (GLI International – model 33) e de oxigênio dissolvido (Mettler Toledo - O₂ 4100e), banho termostatizado duplo para controle simultâneo de temperatura do reator

e do condensador; fluxômetro de massa para controle da vazão de entrada de ar e sistema de aquisição de dados, conforme ilustra a Figura 3.2.

Figura 3.2. Ilustração do sistema reacional utilizado.



3.2.2. Biorreator para Testes de Atividade

Para a realização dos testes de atividade específica da enzima, foi utilizado um reator tipo copo com volume útil de 150 mL encamisado para controle de temperatura.

3.2.3. Reômetro

Foi utilizado reômetro da Brookfield® Engineering Laboratories modelo DVIII+, equipado com dispositivo de cilindros concêntricos.

3.2.4. Analisador de Glicose

Utilizou-se analisador portátil de glicose Accu-Chek[®] Active, fabricante Roche. O equipamento foi comparado ao método mais tradicional de análise que utiliza kit enzimático Laborlab, apresentando resultados confiáveis. Os dados obtidos em ensaio teste constam do anexo A.

3.3. Metodologia Experimental

3.3.1. Medidas de Atividade da Glicose Oxidase (GOD)

Os experimentos foram realizados em reator do tipo copo com volume útil de 150 mL e com controle de temperatura em 35°C. Foram utilizadas soluções de glicose com concentração de 1,0 g.L⁻¹ em tampão acetato de sódio 0,2 M. As medidas de atividade foram obtidas a partir da análise da quantidade de peróxido de hidrogênio produzido, segundo metodologia apresentada em Bergmeyer (1984). As alíquotas eram retiradas e levadas a aquecimento para inativação da enzima. As amostras foram submetidas à análise espectrofotométrica em 240 nm para a obtenção da concentração de peróxido de hidrogênio.

A atividade da enzima é dada pela inclinação da reta no período linear de liberação do peróxido. De acordo com isso, a atividade é dada em mg de H₂O₂ por mL de solução. Sendo que uma unidade (GODU) corresponde a 1 mg de glicose oxidada por minuto a 35°C e pH 5,5 (TOMOTANI e VITOLO, 2007b).

3.3.2. Determinação da Concentração de Glicose

A concentração de glicose foi determinada utilizando analisador Accu-Chek[®]. As amostras iniciais, mais concentradas, retiradas do biorreator foram previamente diluídas 10 vezes a fim de se ajustarem à amplitude de análise do equipamento. Para a leitura foram colocados 20 µL da amostra sobre a fita reativa previamente introduzida no aparelho. Após alguns instantes, a medida era mostrada no visor do analisador. Para fins comparativos, a

concentração de glicose foi também determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase (kit Laborlab).

3.3.3. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais (ART)

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS proposto por Miller (1959). O método baseia-se na reação de monossacarídeos com o reagente DNS (ácido 3-5 dinitrosalicílico). O reagente utilizado é composto de 300 g.L⁻¹ de sal de Rochelle P.A. (tartarato duplo de sódio e potássio), 10 g.L⁻¹ de DNS e 16 g de NaOH.

3.3.4. Estimativa da Concentração de Ácido Glucônico

A concentração de ácido glucônico gerado no meio reacional foi estimada supondo completa conversão da glicose consumida. A hipótese sustenta-se no próprio modelo matemático apresentado por Sikula e colaboradores (equações 4.1 e 4.2) e utilizado por este trabalho na estimativa dos parâmetros cinéticos relativos ao processo. Sendo assim, tomou-se a diferença entre a concentração inicial de glicose e a concentração da mesma ao final do processo e, utilizando a proporção sugerida pela estequiometria da reação, calculou-se a quantidade de ácido produzida ao longo do tempo (SIKULA *et al.*, 2006).

3.3.5. Medidas de Viscosidade

As medidas de viscosidade das soluções foram realizadas em reômetro Brookfield[®], modelo DVIII+, equipado com dispositivo de cilindros concêntricos.

Para cada uma das concentrações utilizadas na avaliação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e também para cada uma das amostras retiradas durante os testes de produção de ácido glucônico foram analisados os valores de viscosidade dinâmica (μ), obtendo-se os resultados em condições de porcentagem de torque em torno de 80% como recomendado

pelo fabricante haja vista que as soluções apresentam comportamento de fluido Newtoniano.

Todas as medidas foram realizadas com controle de temperatura sendo esta aferida em 35°C.

3.3.6. Medidas do Coeficiente de Transferência de Oxigênio (k_La)

Medidas do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foram efetuadas a partir de ensaio degrau, através da aquisição dos valores de concentração de oxigênio dissolvido ao longo dos ensaios. Os valores obtidos pelo eletrodo foram corrigidos considerando o atraso de resposta do eletrodo que ocorre devido ao fato de o oxigênio dissolvido no seio do líquido difundir através da membrana do eletrodo que isola o meio líquido da superfície do cátodo, onde o oxigênio é reduzido gerando o fluxo de elétrons. Aerando-se o sistema, o meio líquido é saturado com o oxigênio do ar e ajusta-se o valor de 100% no analisador. Em seguida borbulha-se nitrogênio no líquido, a fim de eliminar todo o oxigênio dissolvido, até que o eletrodo indique o valor zero. Dessa forma define-se a faixa de medida. Em um dado instante seguinte, aplica-se o ensaio degrau iniciando-se a aeração do meio líquido nas condições em que se pretende obter o valor de k_La , passando-se então a registrar o sinal do eletrodo ao longo do tempo. Para facilitar a determinação do k_La , foi utilizada uma rotina computacional (JESUS *et al.*, 2007) que auxilia no tratamento matemático dos dados experimentais. Durante os ensaios, os valores da concentração de oxigênio são apresentados em um gráfico para facilitar seu acompanhamento. Ao final do experimento, o usuário pode escolher diretamente sobre o gráfico o trecho da curva que será utilizado para a determinação do k_La .

As soluções aquosas de sacarose invertida foram produzidas a partir de quantidades iguais de glicose e frutose P.A. com concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 g.L⁻¹ para aplicação nos referidos testes de obtenção de k_La . A temperatura foi controlada em 35°C.

3.3.7. Avaliação da Transferência de Oxigênio em Biorreator Airlift

Foram realizados testes em triplicata para a obtenção do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para as soluções de sacarose invertida de concentrações iguais a 20, 40, 60, 80 e 100 g.L⁻¹, sob vazões volumétricas de alimentação de ar variando entre 1 e 5 vvm (vvm é definido como a razão entre o volume de ar alimentado, em L.min⁻¹, e o volume útil do reator, em L), totalizando setenta e cinco pontos experimentais. Para cada uma das concentrações avaliadas foi medida a viscosidade dinâmica em viscosímetro a 35°C.

3.3.8. Ensaios para a Produção de Ácido Glucônico

Foram realizados ensaios para avaliar a produção de ácido glucônico observando-se a influência da variação nas concentrações de glicose e de enzima e também da presença de frutose no meio reacional.

Na avaliação do processo foi considerada a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida e a cinética da reação enzimática.

Foram propostos testes em concentrações relativamente baixas de glicose, 20 e 40 g.L⁻¹, sendo: 20 g.L⁻¹ de glicose sem frutose (ensaio G20) e com frutose a 20 g.L⁻¹ (GF20); 40 g.L⁻¹ de glicose sem frutose (G40) e com frutose a 40 g.L⁻¹ (GF40). A temperatura foi mantida constante durante toda a reação em 35°C e o fluxo de alimentação de ar foi controlado em 4 vvm em todos os testes. O pH foi controlado em 5,5 pela adição de hidróxido de sódio ao meio reacional ao longo dos ensaios.

A concentração inicial de dióxido de manganês utilizada foi proporcional à quantidade de GOD (1% m/v de MnO₂ para cada 1,0 g.L⁻¹ de GOD).

Figura 3.3. Biorreator *Airlift* durante ensaio de produção de ácido glucônico.



A figura 3.3 mostra o biorreator em atividade durante os testes de produção de ácido glucônico juntamente com os analisadores de pH e O_2 dissolvido e o sistema de alimentação de NaOH.

Uma síntese das condições dos testes realizados está apresentada na Tabela 3.2 que segue.

Tabela 3.2. Concentrações de açúcares e de enzima empregadas nos ensaios.

Teste	C _{Gli} (g.L ⁻¹)	C _{Fru} (g.L ⁻¹)	C _{GOD} (g.L ⁻¹)	C _{MnO₂} (%m/V)	T (°C)	pH	φ _{ar} (vvm)
G20	20,0	0	1,0	1,0			
GF20	20,0	20,0	1,0	1,0			
G40	40,0	0	1,0	1,0	35,0	5,5	4,0
GF40	40,0	40,0	1,0	1,0			
G402E	40,0	0	2,0	2,0			

Os ensaios G20, GF20, G40 e GF40 tiveram como objetivo avaliar a influência da concentração de açúcares na transferência de oxigênio e na cinética do processo. Além disso, aos pares G20/GF20 e G40/GF40 coube avaliar a cinética do processo em relação à presença ou não de frutose.

Uma condição final para análise da cinética do processo foi o teste GF402E no qual se utilizou o dobro de concentração de GOD (2,0 g.L⁻¹) em comparação com o mesmo teste realizado com 1,0 g.L⁻¹ de GOD (GF40).

Os ensaios G20, GF20 e G40 foram realizados em duplicata enquanto que para os demais não foi possível fazê-lo por motivo de término da enzima e impossibilidade de nova aquisição, devido à política de doação da empresa Novo Nordisk BioIndustrial do Brasil. Foram realizados um total de 8 (oito) ensaios de produção.

Em todos os ensaios, inicialmente foi preparada uma solução de glicose ou glicose + frutose com a presença de MnO₂, nas concentrações definidas na Tabela 4.2. O meio reacional foi submetido à aeração até a saturação do meio com oxigênio.

Atingido 100% de saturação, foi adicionada ao biorreator uma massa de GOD de modo a obter-se concentração de 2,0 g.L⁻¹ no ensaio GF402E e 1 g.L⁻¹ nos demais ensaios. O momento da adição da enzima foi tomado como ponto inicial de cada ensaio (t = 0). Ao longo do processo foram retiradas amostras para análise da viscosidade e do teor de glicose. No momento da retirada das amostras eram também coletados os valores de temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e pH pela leitura dos analisadores. Devido à maior variação das concentrações de glicose, no início dos ensaios foram retiradas amostras em intervalos menores de tempo e,

conforme a reação se processava, os intervalos de amostragem foram sendo aumentados. As amostras, contendo aproximadamente 20 mL de solução, foram submetidas à fervura a fim de inativar a enzima. Após a diminuição da temperatura, foram centrifugadas e o sobrenadante retirado para análise posterior de viscosidade e teor de glicose.

A viscosidade foi obtida no reômetro, separando-se parte para a análise do teor de glicose no analisador (kit portátil Accu-Chek). O restante da amostra utilizada para medida da viscosidade foi separada para análise posterior do teor de açúcares redutores.

3.3.9. Avaliação Preliminar da Cinética do Processo

Buscando-se avaliar a cinética do processo de produção de ácido glucônico, procurou-se ajustar o modelo apresentado por Sikula e colaboradores (2006), obtido a partir do mecanismo de oxidação da glicose estudado e detalhado por Nakamura e Yasuyuki (1962) e por Gibson e colaboradores (1964), aos dados experimentais, bem como realizar a simulação computacional dos mesmos. Os balanços materiais para a glicose e oxigênio na fase líquida, considerando o modelo cinético de produção de ácido glucônico levam às seguintes equações:

$$\frac{dC_g}{dt} = -0,9184 \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_S}{C_S} + \frac{K_O}{C_O}} \quad (3.1)$$

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -0,0816 \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_S}{C_S} + \frac{K_O}{C_O}} + k_L a (C^* - C) \quad (3.2)$$

onde as constantes numéricas (0,9184 e 0,0816) correspondem às relações entre a massa molar de ácido glucônico e as massas molares de glicose e oxigênio, respectivamente.

A integração e o ajuste do modelo (equações 3.1 e 3.2) aos resultados experimentais dos ensaios foram obtidos pela utilização de dois algoritmos utilizados em sequência; o primeiro utilizado foi o algoritmo SA que gera parcialmente os parâmetros que são introduzidos posteriormente no

algoritmo de Levenberg-Marquardt para que se obtenham resultados mais refinados. Todos os resultados foram obtidos utilizando a rotina de resolução ODE45, disponível no *software* comercial MATLAB R2007b versão 7.5.0.

O ajuste do modelo aos pontos experimentais de C_G e C_{O_2} ao longo do tempo de ensaios permitiu a obtenção dos parâmetros cinéticos K_S , K_O e V_{max} .

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação da Transferência de Oxigênio

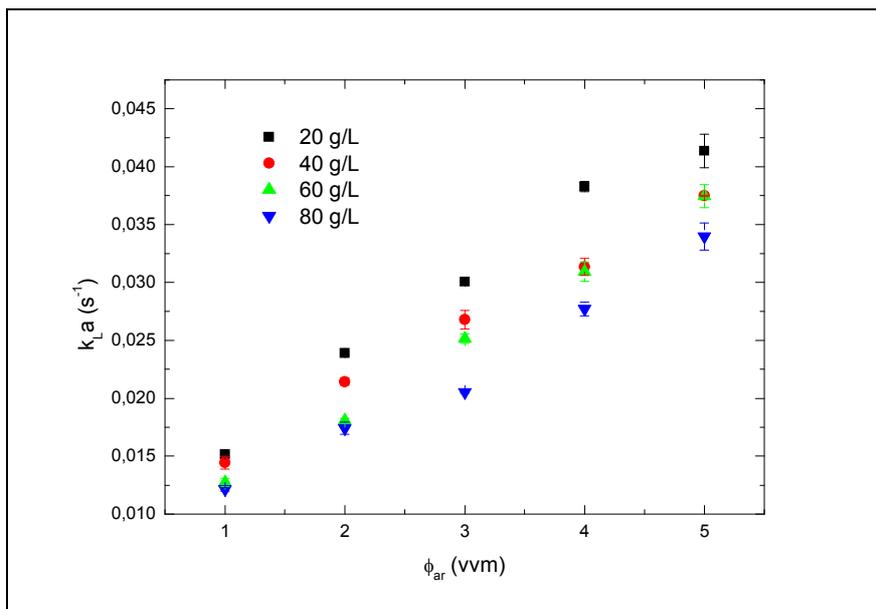
Como primeira etapa do trabalho buscou-se avaliar a variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$) em função da concentração das soluções de sacarose invertida, observadas suas viscosidades dinâmicas.

Tabela 4.1. Viscosidades das soluções de sacarose invertida (glicose+frutose).

C (g.L ⁻¹)	20	40	60	80	100
μ (cp)	2,02	2,08	2,12	2,17	2,18

As medidas das viscosidades dinâmicas para as soluções utilizadas estão dispostas na Tabela 4.1. Os resultados do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$) são apresentados graficamente na Figura 4.1 em função da vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar} em vvm).

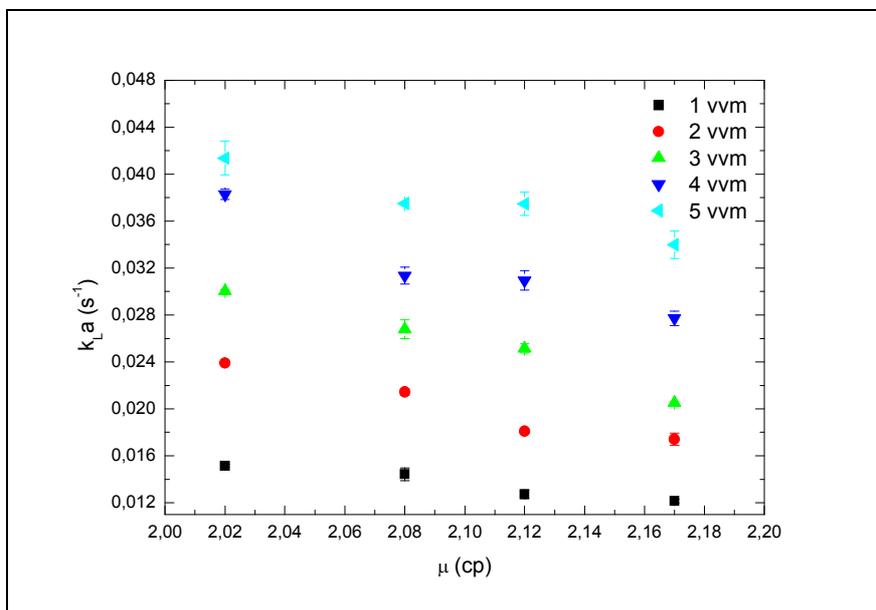
Figura 4.1. $k_{L,a}$ para as diferentes soluções de sacarose invertida em função da vazão específica de alimentação de ar. As barras de erro referem-se ao desvio padrão das triplicatas.



Os resultados obtidos demonstram a dependência do k_{La} com ϕ_{ar} , bem como com a viscosidade dinâmica da solução (μ). A análise dos resultados comprova a diminuição dos valores de k_{La} com o aumento da viscosidade e diminuição da vazão específica de alimentação.

O gráfico da Figura 4.2 evidencia o decaimento dos valores de k_{La} conforme o aumento da viscosidade dos fluidos envolvidos nas diferentes vazões específicas de alimentação de ar.

Figura 4.2. k_{La} em função das viscosidades dinâmicas dos fluidos. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das triplicatas.



A partir dos pontos obtidos experimentalmente, foi proposto um modelo matemático que se ajustasse aos mesmos. O modelo escolhido baseou-se no proposto por Li e colaboradores. (1995) no qual se propõe estimar os valores de k_{La} a partir da viscosidade da solução (μ) e da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) que é proporcional à vazão específica de alimentação de ar.

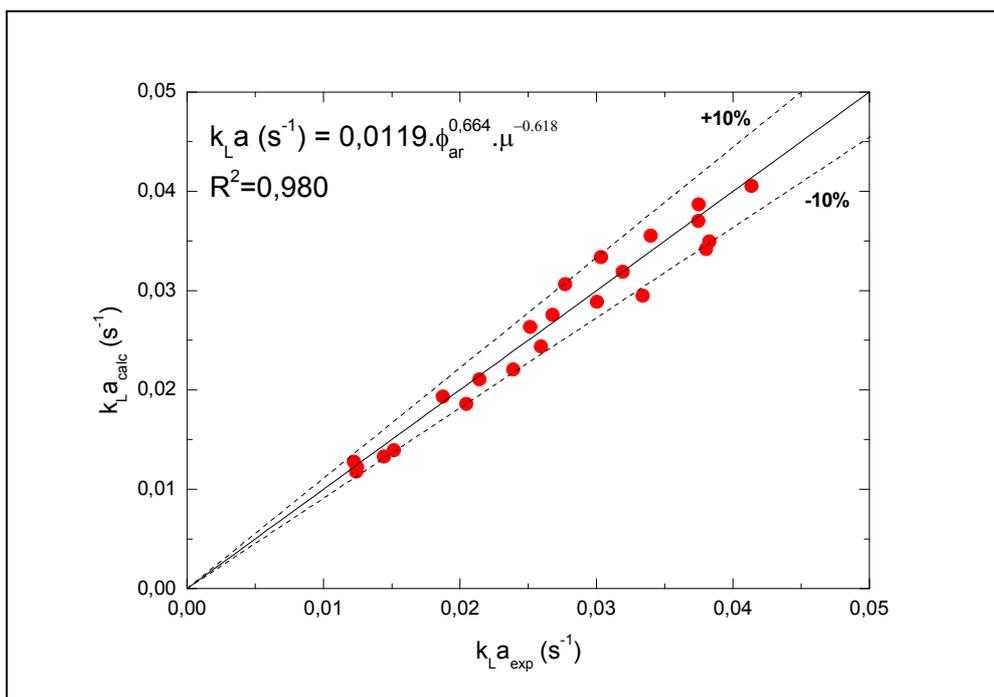
A equação 4.1 apresenta o modelo ajustado aos valores experimentais:

$$k_{La} = 0,0119 \cdot \phi_{ar}^{0,664} \cdot \mu^{-0,618} \quad (R^2 = 0,980) \quad (4.1)$$

onde $k_L a$ é dado em s^{-1} , ϕ_{ar} em vvm e μ em cp.

Observando os resultados obtidos apresentados na Figura 4.3 e o coeficiente de correlação do ajuste, constata-se que o modelo proposto mostrou bom ajuste aos pontos experimentais dado que os pontos experimentais ficaram dentro de uma variação de 10%.

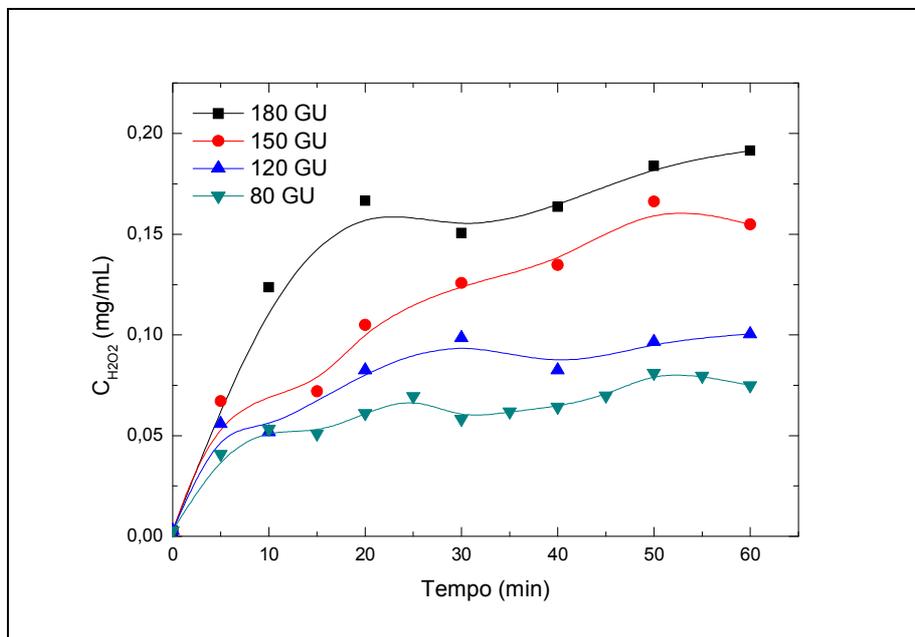
Figura 4.3. Comparação entre os resultados experimentais e calculados de $k_L a$ obtidos a partir do modelo para as soluções de sacarose invertida.



4.2. Avaliação da Atividade da Glicose Oxidase (GOD)

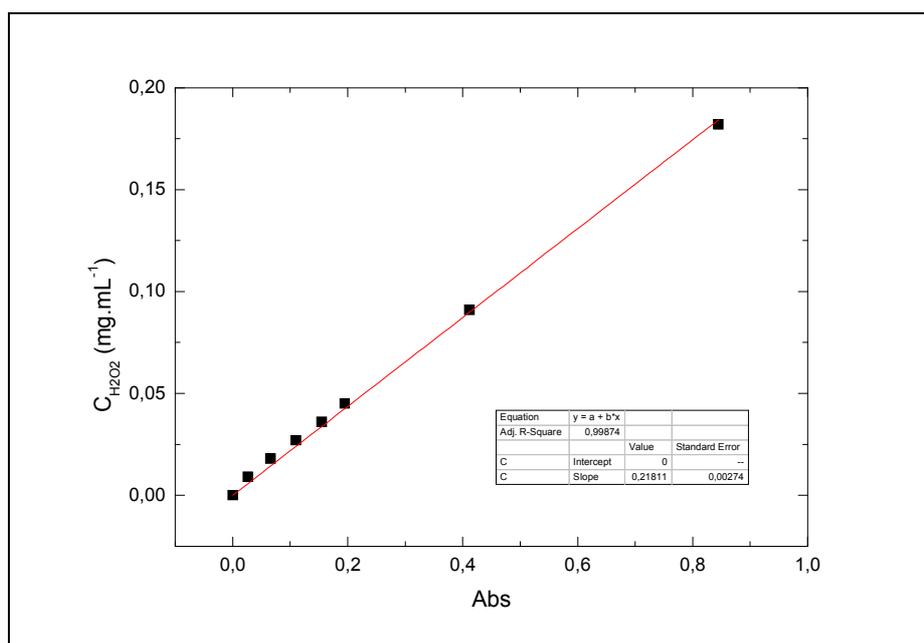
De acordo com a metodologia, a atividade da GOD é determinada como sendo o coeficiente angular no intervalo linear da curva da concentração de peróxido de hidrogênio liberado da oxidação da glicose. Os ensaios foram realizados com a finalidade de avaliar as condições da GOD armazenada no momento da sua utilização. As curvas de concentração são resultado das leituras espectrofotométricas das amostras retiradas periodicamente segundo metodologia preconizada por Bergmeyer (1984) conforme equação da curva padrão obtida para as mesmas condições. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 240 nm.

Figura 4.4. Concentração de H_2O_2 em função do tempo para determinação da atividade da GOD armazenada. As curvas referem-se a concentrações de enzima diferentes expressas em GU (unidades de glicose oxidase) como descrito pelo fabricante.



As medidas de concentração de H_2O_2 foram obtidas segundo a curva padrão apresentada na figura 4.5.

Figura 4.5. Curva padrão para concentração de H_2O_2 em função da absorbância em 240 nm.



4.3. Produção de ácido glucônico

4.3.1. Avaliação da Influência da Presença de Frutose

Como disposto nos métodos experimentais, foram realizados 8 ensaios visando à produção de ácido glucônico, variando-se as concentrações de glicose e de GOD com e sem a presença de frutose no meio reacional.

Os ensaios G20, GF20, G40 e GF40 foram realizados em duplicata e os resultados em termos dos perfis de concentrações de oxigênio dissolvido (C_{O_2}) e glicose (C_G) estão ilustrados nas Figuras 4.6 e 4.7 e 4.8 e 4.9, respectivamente.

Figura 4.6. Variação das concentrações de glicose e de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio G20 (20 g.L⁻¹ de glicose na ausência de frutose).

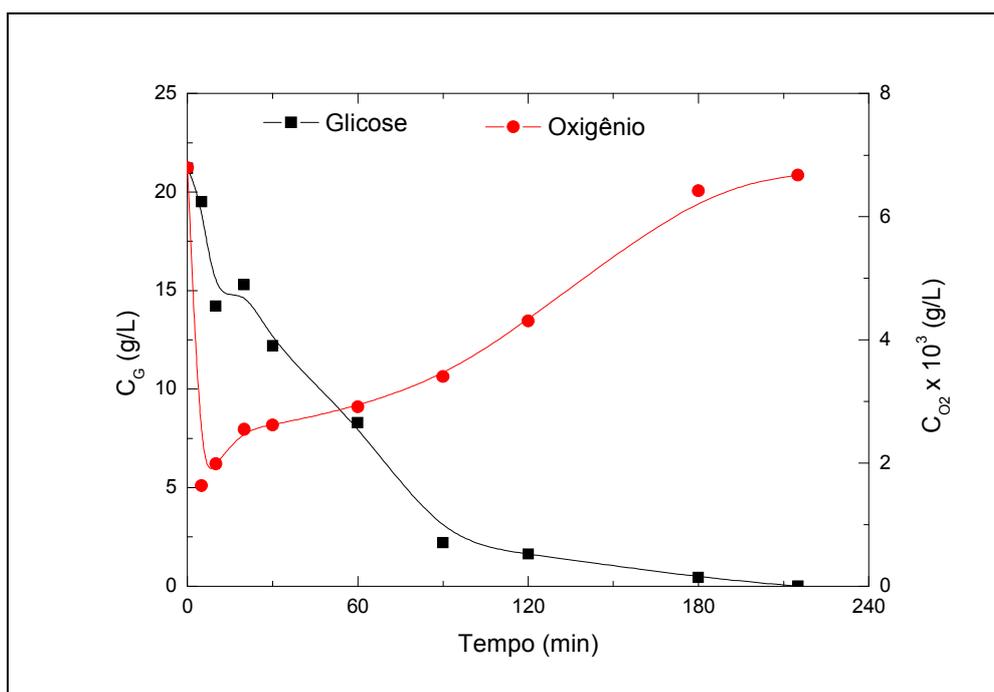


Figura 4.7. Variação das concentrações de glicose e de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GF20 (20 g.L⁻¹ de glicose na presença de 20 g.L⁻¹ de frutose).

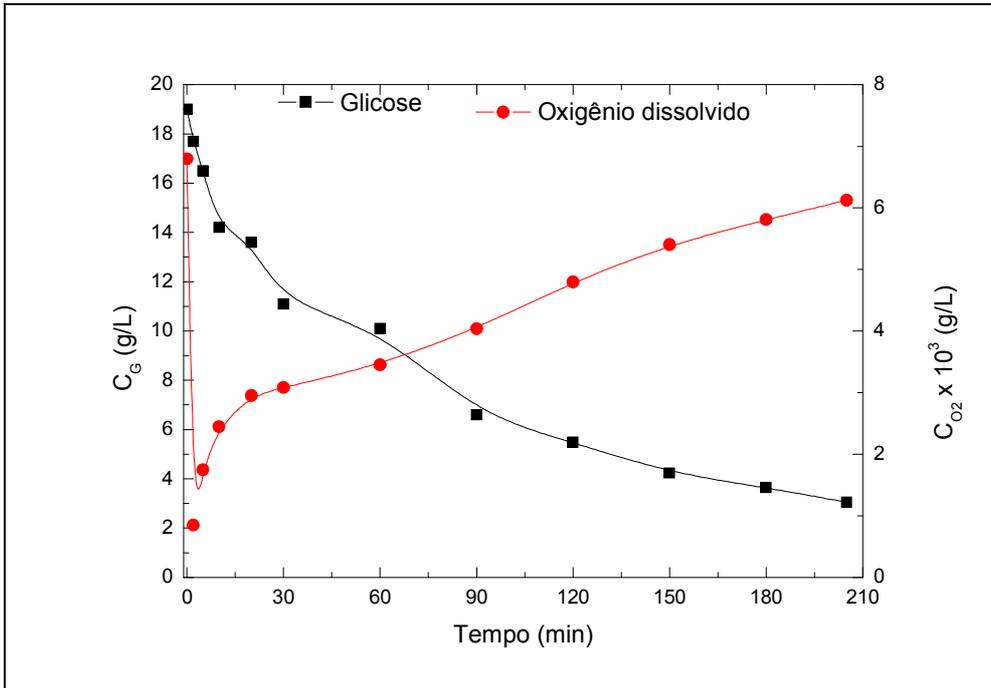


Figura 4.8. Variação das concentrações de glicose e de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio G40 (40 g.L⁻¹ de glicose sem frutose).

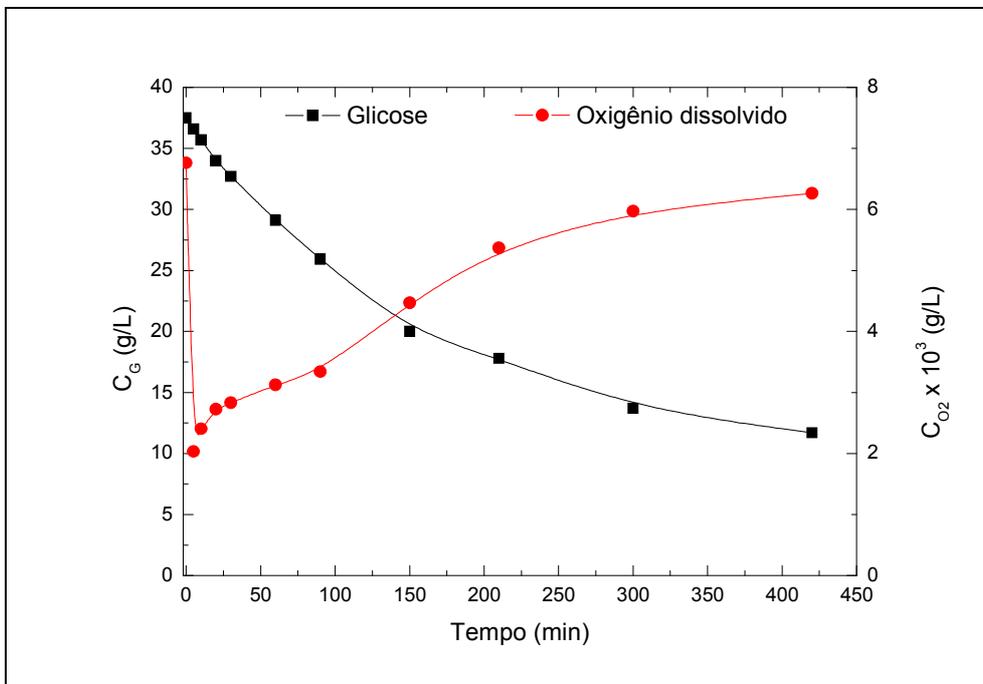
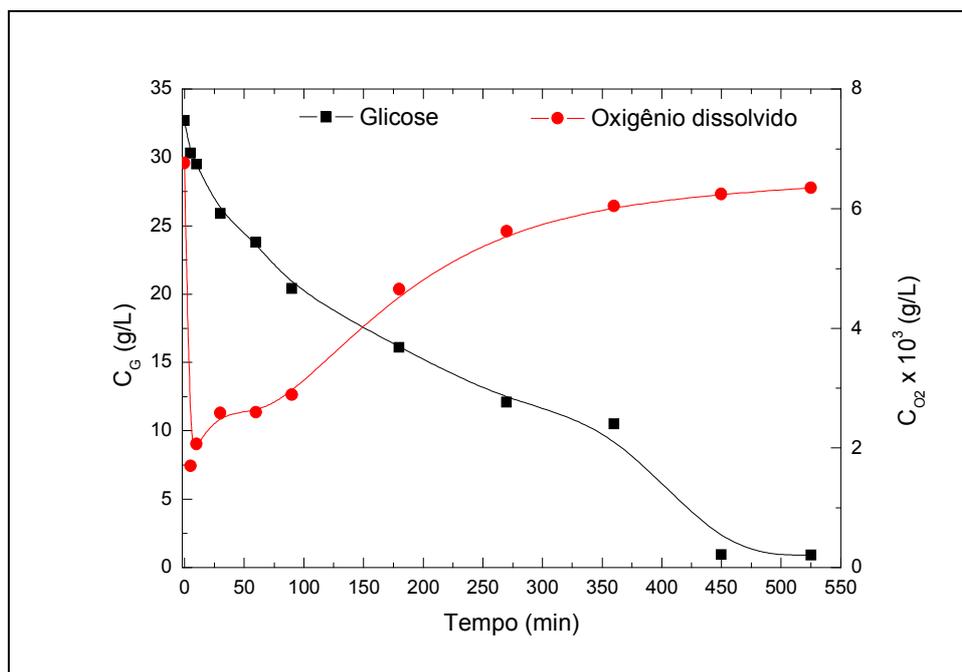


Figura 4.9. Variação das concentrações de glicose e de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GF40 (40 g.L⁻¹ de glicose na presença de 40 g.L⁻¹ frutose).



Primeiramente, é importante salientar que os resultados de concentração de frutose (C_F), obtidos pela diferença entre a concentração de açúcares redutores (glicose+frutose) e a concentração de glicose, não apresentaram variação ao longo de todos os ensaios (dados não mostrados), fato que evidencia a especificidade da GOD pela glicose. Esse resultado viabiliza a hipótese inicial do trabalho, qual seja, a obtenção de ácido glucônico e seus sais derivados conjuntamente com um xarope de frutose que pode ser ainda concentrado.

Observando-se os perfis das Figuras 4.6 e 4.7 e das Figuras 4.8 e 4.9, não se observam grandes diferenças nas variações das concentrações com o tempo de ensaio, nos levando a acreditar que, ao menos sob esses níveis de concentração, a presença da frutose não influenciou significativamente o processo de oxidação da glicose pela GOD.

Para uma comparação mais minuciosa, as Figuras 4.10 e 4.11 ilustram os perfis de concentração de glicose ao longo dos ensaios G20/GF20 e G40/GF40 para os dois casos anteriormente referidos, respectivamente. Note-se que os perfis de concentração de glicose ao longo do tempo são praticamente coincidentes, com uma pequena diferença a partir de

aproximadamente 2 horas de reação. Isso mostra que na etapa inicial do processo, a velocidade não foi influenciada pela presença da frutose no meio.

Resultados similares foram obtidos em termos da concentração de oxigênio dissolvido ao longo dos ensaios, como pode-se observar nas Figuras 4.12 e 4.13 que ilustram os perfis de concentração de oxigênio dissolvido ao longo dos ensaios G20/GF20 e G40/GF40, respectivamente. Novamente, pode-se notar, embora pequena, uma diferença que começa a se pronunciar e que, provavelmente, venha a ser um fator importante na determinação da eficiência do processo. Um ponto relevante deve ser questionado: até que valores de concentração de açúcares seria possível efetuar-se o processo oxidativo, pressupondo-se que à medida que a viscosidade da fase líquida é aumentada a transferência de massa fica comprometida.

Aparentemente o único fator responsável pela diferenciação dos perfis ao longo do tempo seria o fato de a viscosidade da fase líquida ser aumentada pela presença de frutose que dobra a concentração de açúcares. Como estudado no primeiro momento deste trabalho, à medida que a viscosidade do fluido aumenta, reduz-se a transferência de oxigênio entre as fases líquida e gasosa, o que fica evidenciado pelos valores de $k_L a$ para diferentes concentrações.

Figura 4.10. Concentração de glicose ao longo do tempo nos ensaios G20 e GF20.

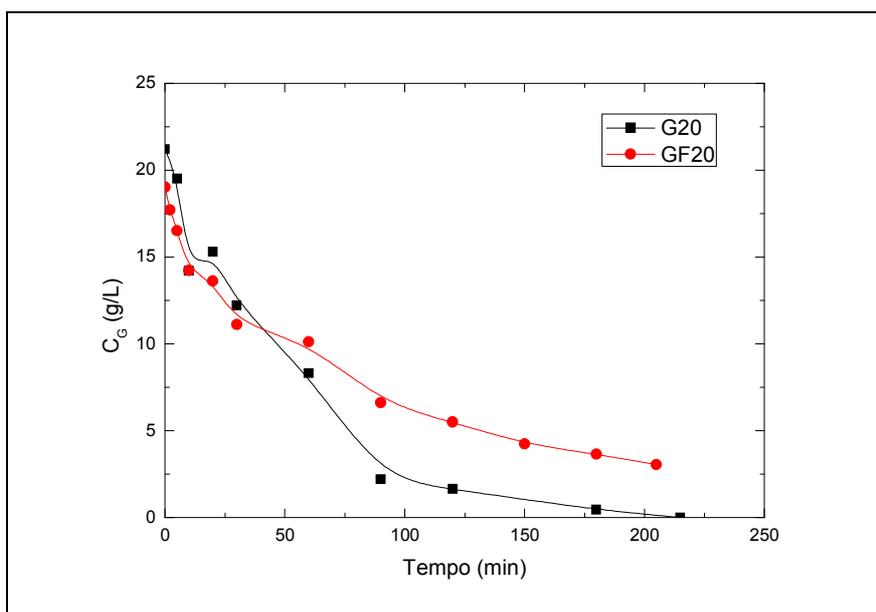
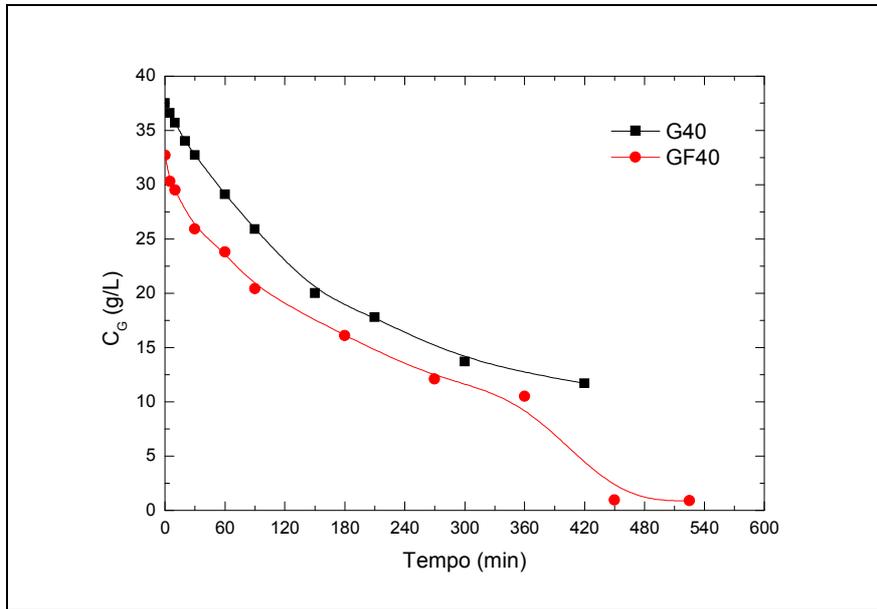


Figura 4.11. Concentração de glicose ao longo do tempo nos ensaios G40 e GF40.



Embora o resultado seja representativo, fazem-se necessários ensaios com maiores concentrações de açúcar invertido, de modo a validar esse comportamento em condições experimentais que visem tanto a produção de ácido glucônico quanto de xarope de frutose.

Figura 4.12. Concentração de oxigênio ao longo do tempo nos ensaios G20 e GF20.

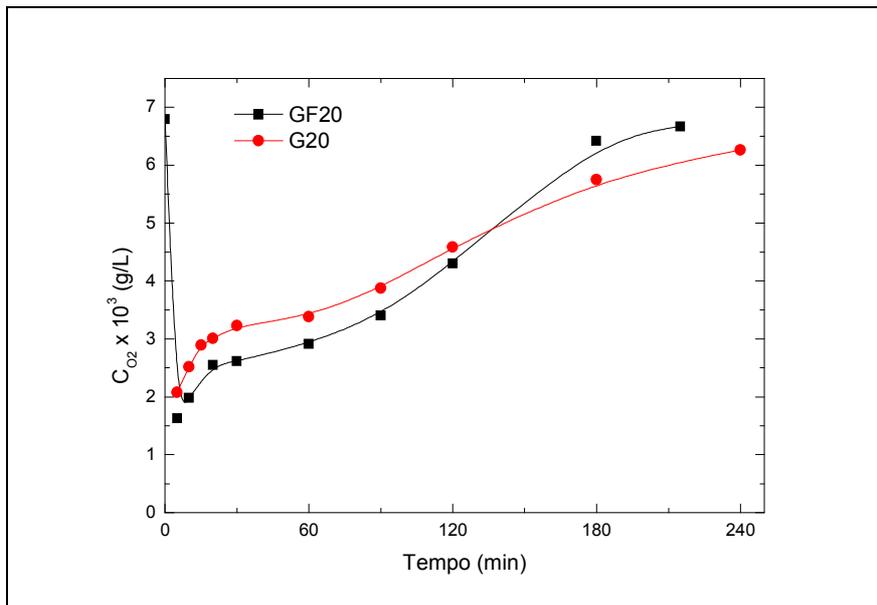
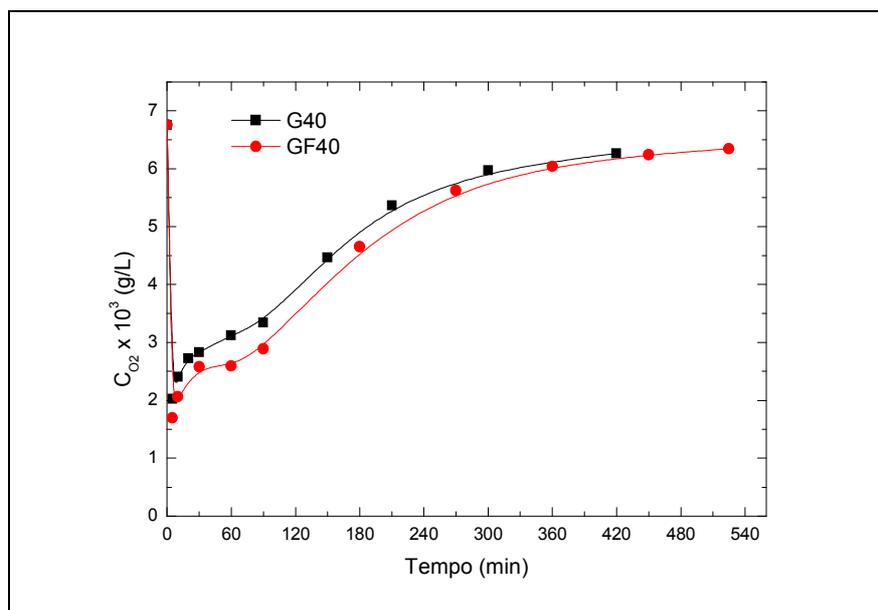


Figura 4.13. Concentração de oxigênio em função do tempo nos ensaios G40 e GF40.



Analisando a Figura 4.12 mais uma vez nota-se pequena diferença nos perfis de concentração quando se adicionou frutose ao meio. Embora esperássemos uma discrepância mais pronunciada, isso não aconteceu levantando indícios de que devêssemos avaliar a influência da presença de frutose em outras variáveis do processo a fim de identificar a efetiva contribuição da mesma no comportamento da reação.

A fim de identificar tais contribuições, procurou-se analisar a maneira pela qual a presença de frutose poderia afetar a velocidade da reação e, por conseguinte, o tempo total do processo. Haja vista que, pelas análises feitas, a influência está mais evidenciada nesse ponto do que na maneira pela qual se dá a reação.

Tomando como princípio o fato de que a concentração da glicose dissolvida na fase líquida é muito superior à quantidade de oxigênio e a queda instantânea e brusca do percentual do mesmo no início do processo, o oxigênio deveria ser o substrato limitante da reação, ditando o ritmo de todo o processo. Isto mostrou a necessidade de se avaliar os fatores determinantes que afetam a transferência de massa entre as fases líquida e gasosa.

A partir de tais considerações, pode-se analisar então os perfis da transferência de oxigênio na reação ao longo do tempo (No_2). Na medida em

que a reação caminha, os substratos são consumidos e No_2 , por consequência, também diminui. As Figuras 4.14 e 4.15 ilustram os perfis de transferência em função dos tempos para os ensaios G20 e GF20 e G40 e GF40, respectivamente. Os respectivos valores referentes à velocidade de transferência de oxigênio foram obtidos segundo a equação 4.2.

$$\text{No}_2 = k_L a (C^* - C) \quad (4.2)$$

onde o $k_L a$ foi calculado ao longo do ensaio pela Equação 4.1, a partir dos valores de viscosidade da fase líquida (μ) e da vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}). C^* foi definido segundo valor apresentado por Bailey e Ollis (1986) para a saturação de oxigênio dissolvido em meio aquoso na temperatura de operação do sistema.

Figura 4.14. Perfis de velocidade de transferência nos ensaios contendo 20 g.L^{-1} de glicose na presença (GF20) e na ausência de frutose (G20).

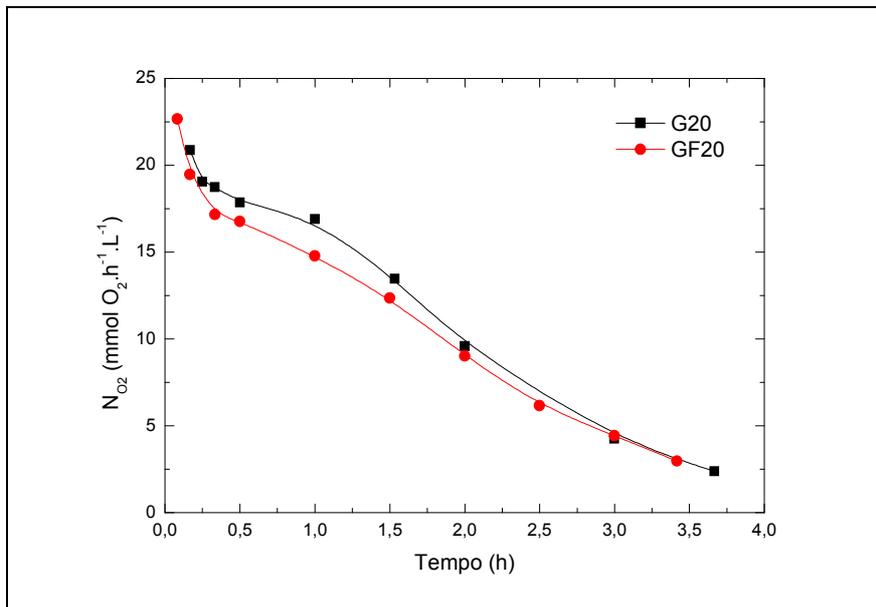
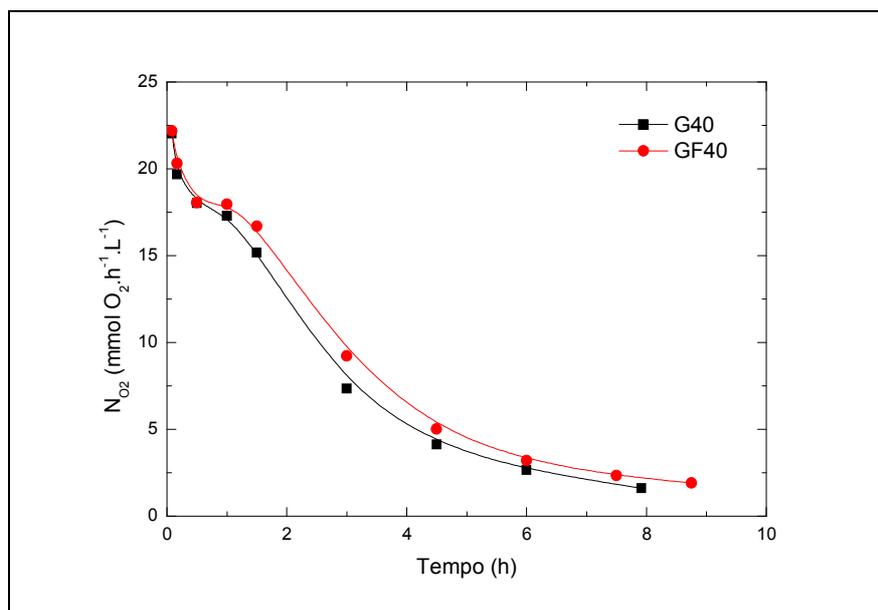


Figura 4.15. Perfis de velocidade de transferência nos ensaios contendo 40 g.L⁻¹ de glicose na presença (GF40) e na ausência de frutose (G40).



Neste caso os gráficos para ambas as condições se assemelham, não evidenciando uma tendência visto que para concentração de 20 g.L⁻¹ de glicose (Figura 4.14) na presença de frutose, as velocidades são discretamente menores do que na ausência da mesma e para concentração de 40 g.L⁻¹ de glicose (Figura 4.15) ocorre o contrário, ou seja, na presença de frutose as velocidades são relativamente mais elevadas do que na ausência da mesma. A mencionada tendência poderá ser comprovada em testes futuros com soluções mais concentradas e/ou mais diluídas com relação à glicose. A proposta inicial deste trabalho incluía esta etapa, porém, devido ao término da enzima e à impossibilidade de nova aquisição, não foi possível concluí-la.

4.3.2. Avaliação Preliminar da Cinética do Processo

De acordo com procedimento descrito no item 3.3.9, foi realizado o ajuste do modelo (equações 3.1 e 3.2) aos resultados experimentais dos ensaios G20, GF20, G40 e GF40. Além dos parâmetros cinéticos, estimou-se também valores de $k_L a$, haja visto que os valores de concentração de glicose utilizados nos testes de produção foram aquém daqueles utilizados para obter a correlação de $k_L a$ em função de ϕ_{ar} e de μ , além de ser observado que a

transferência de oxigênio na presença de MnO_2 foi superior, fato não considerado na obtenção experimental da relação entre k_{La} e ϕ_{ar} e μ . Testes a serem realizados na etapa final deste trabalho ampliarão a faixa de abrangência do ajuste de k_{La} , a fim de comparar os resultados gerados pela simulação computacional com os obtidos experimentalmente e ajustados segundo equação como função da vazão específica de alimentação de ar e da viscosidade dinâmica para soluções mais diluídas, como as efetivamente utilizadas no presente trabalho.

Os resultados obtidos dos ajustes do modelo dado pelas equações 3.1 e 3.2 aos resultados experimentais dos ensaios G20, GF20, G40, GF40 e GF402E estão ilustrados nas Figuras 4.16 a 4.20.

Figura 4.16. Ensaio G20 - resultados de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido experimentais e calculados pelo modelo cinético ao longo do tempo.

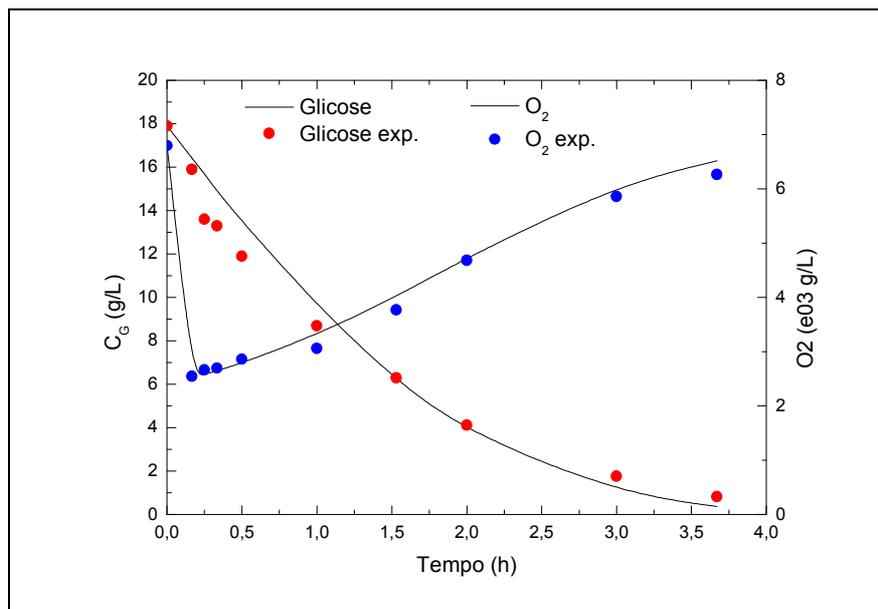


Figura 4.17. Ensaio GF20 - resultados de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido experimentais e calculados pelo modelo cinético ao longo do tempo.

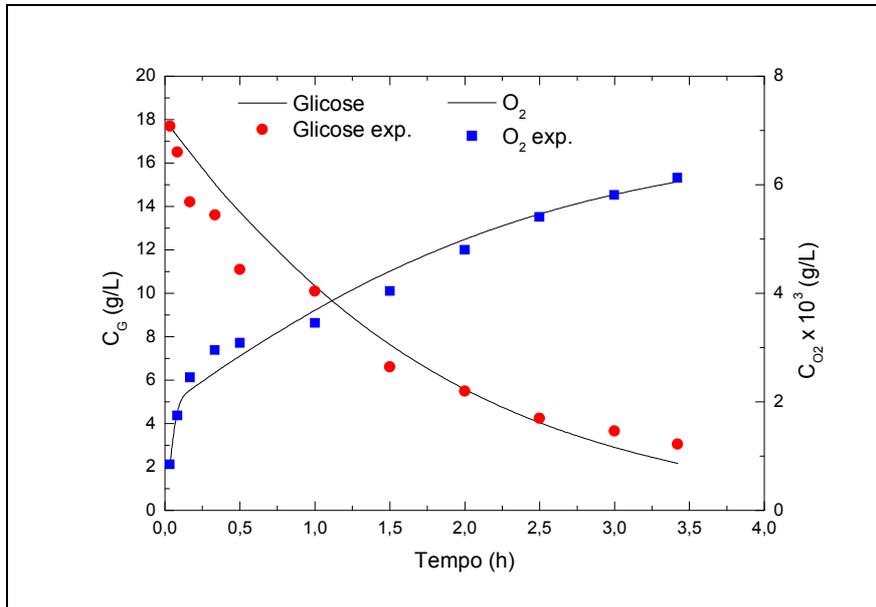


Figura 4.18. Ensaio G40 - resultados de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido experimentais e calculados pelo modelo cinético ao longo do tempo.

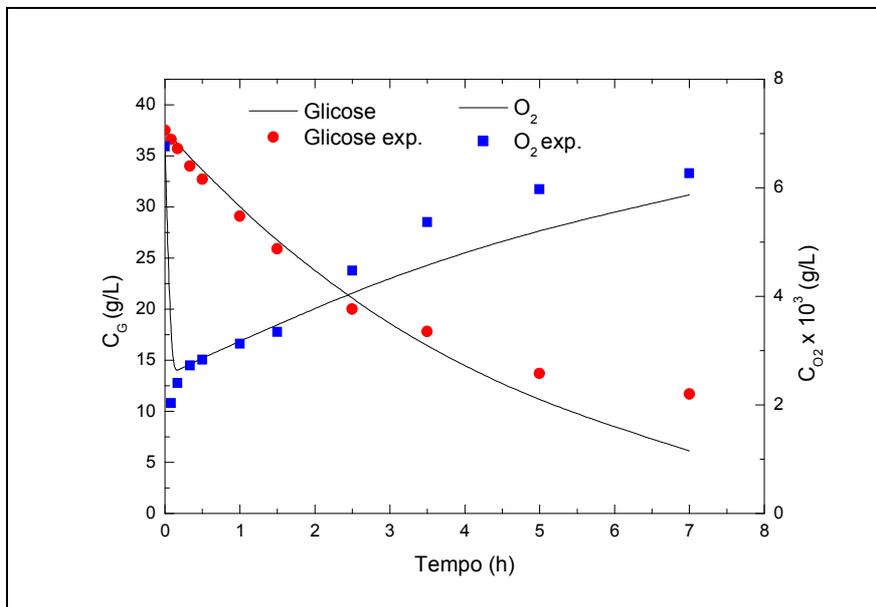


Figura 4.19. Ensaio GF40 - resultados de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido experimentais e calculados pelo modelo cinético ao longo do tempo.

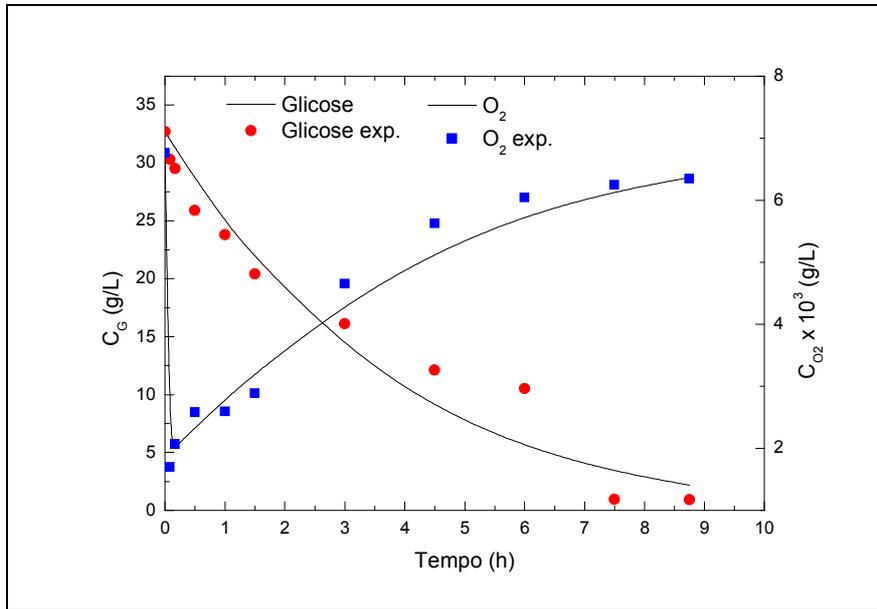
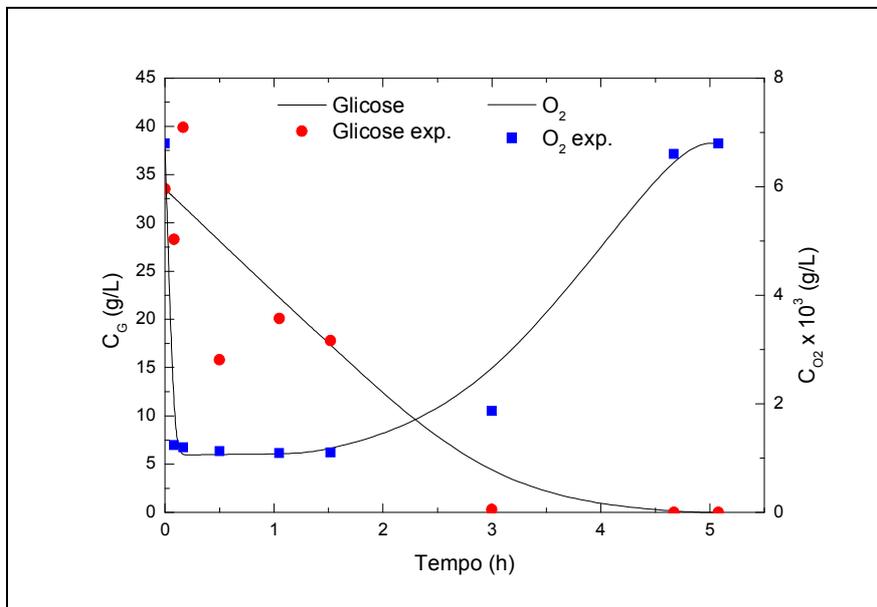


Figura 4.20. Ensaio G402E - resultados de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido experimentais e calculados pelo modelo cinético ao longo do tempo.



Os resultados das análises demonstram bons ajustes do modelo aos dados experimentais, gerando os parâmetros cinéticos do processo que estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste do modelo aos resultados experimentais dos ensaios.

Experimento	V_{max} (g.L⁻¹.h)	K_s (g.L⁻¹)	K_o (g.L⁻¹)	k_{La} (h⁻¹)
G20	15,8	8,5 ± 4,8	10 ⁻⁵	190,3 ± 24,2
GF20	15,8	15,2 ± 1,5	10 ⁻⁵	161,3 ± 13,3
G40	15,8	52,5 ± 16,7	10 ⁻⁵	136,1 ± 37,2
GF40	15,8	37,1	10 ⁻⁵	152,0
GF402E	23,4	2,00	10 ⁻³	165,8

Observando-se os resultados da Tabela 4.2 nota-se que os valores obtidos dos parâmetros cinéticos apresentam uma tendência. Os valores de k_{La} apresentaram diminuição com o aumento da concentração inicial de açúcares, que influencia diretamente a viscosidade do meio. Logo, os ensaios com soluções mais concentradas apresentaram menores valores de k_{La} . Quanto aos valores de V_{max} , os valores estimados relativos aos ensaios G20, GF20, G40 e GF40 foram obtidos para o primeiro ensaio e fixados para a obtenção dos outros parâmetros nos demais, haja vista que esse parâmetro depende apenas da temperatura e da concentração de enzima utilizada no processo. Reflexo disso foi o valor de V_{max} relativo ao ensaio GF402E que apresentou-se superior àqueles dos ensaios anteriores, uma vez que a quantidade de enzima foi o dobro da anteriormente utilizada nos demais ensaios. Experimentalmente, a influência do aumento da concentração de enzima é nítida, uma vez que no ensaio GF402E a concentração de glicose se esgotou em 3 h e no ensaio GF40 (com a metade da concentração de enzima) a glicose se esgotou em cerca de 8 h. Os valores obtidos para K_s , embora com alguma variação, se mostraram satisfatórios analisando-se os desvios padrão. Os resultados indicam que a afinidade da GOD pela glicose diminui quando a concentração desta foi dobrada dado que se pode observar a partir do aumento de K_s .

Um fato relevante é que, apesar da proposição inicial de que o processo seria controlado pela transferência de oxigênio à fase gasosa dado que a concentração deste seria significativamente menor do que a de glicose a ser oxidada, os resultados obtidos para K_o mostram que isso não ocorreu. Apesar da concentração de O_2 ser baixa, os valores de K_o , da ordem de 10⁻⁵,

mostram que o processo não foi controlado pela transferência de oxigênio. Apenas quando dobrou-se a concentração de GOD (GF402E) tal efeito pode ser observado como nota-se pela figura 4.20, período no qual a concentração de O₂ dissolvido permaneceu constante, e também no valor obtido para K_O para o mesmo ensaio.

Os resultados referentes aos ensaios GF40 e GF402E não apresentam desvios por não possuírem duplicatas.

Sikula e colaboradores (2006) obtiveram parâmetros cinéticos em concentração mais baixa de glicose em reator *airlift* de 12 L operado com vazão de ar mais branda do que a utilizada no presente trabalho, bem como utilizando catalase para catalisar a decomposição de peróxido de hidrogênio, sendo que no presente trabalho foi utilizado MnO₂. Os resultados obtidos por Sikula e colaboradores (2006) estão dispostos na Tabela 4.3. Embora o sistema utilizado pelos autores tenha sido diferente do utilizado no presente trabalho, pode-se notar que a maioria dos valores obtidos dos parâmetros cinéticos encontra-se dentro de uma mesma ordem de grandeza daqueles obtidos nos ensaios realizados no presente trabalho.

Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos obtidos por Sikula e colaboradores (2006): α e β são razões entre as massas molares de produto e substratos.

V_m/h^{-1}	31.226
$K_S/(g L^{-1})$	6.1388
$K_O/(g L^{-1})$	9.597×10^{-4}
β	0.9184
δ	0.0816

A proposta final para o fechamento do trabalho foi avaliar a transferência de oxigênio nas condições dos ensaios para obter-se uma correlação que estimasse o $k_L a$ a partir dos valores de vazão volumétrica de alimentação de ar e da viscosidade da solução. O objetivo era conseguir valores mais elevados para $k_L a$ e utilizar estes valores na rotina computacional para encontrar os parâmetros cinéticos relacionados ao processo. Os valores encontrados para $k_L a$ foram significativamente mais elevados do que nos testes

anteriores nos quais foi-se avaliada a transferência de O₂ na ausência de MnO₂. Porém ficaram ainda baixos frente aos valores estimados pela rotina. Tal fato fez com que abandonássemos a proposta de utilizar dados experimentais de k_La e continuássemos a estimá-los juntamente com os parâmetros cinéticos.

Devido a forte correlação entre os parâmetros, os desvios padrão obtidos para os mesmos são impraticáveis, dado que uma ampla combinação de valores é possível para as mesmas condições experimentais. Com o intuito de minimizar tais erros, buscou-se a utilização das duas rotinas simultaneamente embora, ainda assim, tenhamos obtidos valores elevados para os desvios.

4.3.3. Cálculos de Produtividade em Ácido Glucônico

Para os cálculos de produtividade em ácido glucônico (P_{AG}) foram consideradas as quantidades de ácido glucônico (AG) geradas, obtidas a partir da glicose consumida no decorrer dos ensaios, uma vez que a atividade enzimática da GOD é específica para a glicose, neste caso. Conhecendo-se a estequiometria do processo, foi possível obter a massa de ácido glucônico (m_{AG}) produzido nos ensaios realizados e a P_{AG} foi calculada pela equação 4.2.

$$P_{AG} = \frac{C_{AG}}{\Delta t} \quad (4.2)$$

onde C_{AG} é a concentração de ácido glucônico e Δt é o tempo decorrido do processo.

Os resultados de produtividade em AG para os ensaios realizados estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Produtividade dos ensaios de produção de ácido glucônico

Ensaio	G20	GF20	G40	GF40	GF402E
P _{AG} (g.L ⁻¹ -h)	22,8	20,4	11,5	13,3	32,3

Com base nos resultados obtidos de produtividade do processo, observa-se que os mesmos apresentam um padrão significativo de variação quando analisados com base na presença ou não de frutose no meio, tanto para concentração de 20 g.L⁻¹ quanto para concentração de 40 g.L⁻¹ de glicose.

Ficou evidente também que, para a faixa experimental estudada, o processo não foi controlado pela transferência de oxigênio, uma vez que as produtividades dos ensaios G20 e GF20 e G40 e GF40, respectivamente, apresentaram valores próximos, mesmo tendo os meios reacionais viscosidades diferentes, o que influenciaria na transferência de oxigênio de acordo com a equação 3.1. Tanto a glicose como a frutose apresentam solubilidade em água elevada, o que resulta em soluções concentradas de viscosidade baixa. Talvez, por isso, as diferenças nas viscosidades não tenham sido suficientemente grandes para se observar diferenças nas velocidades de transferência de oxigênio.

Observando-se os resultados dos ensaios com 20 g.L⁻¹ de glicose (G20 e GF20) e 40 g.L⁻¹ de glicose (G40 e GF40), nota-se uma forte diminuição na P_{AG} , indicando que o aumento na concentração de glicose afetou negativamente esse parâmetro do processo. Ou seja, quando se dobrou C_G , P_{AG} foi reduzido praticamente à metade. Em termos da cinética do processo, o aumento da concentração de glicose (C_G) de 20 para 40 g.L⁻¹ se traduziu numa diminuição da afinidade da enzima pela glicose (maior valor de K_S – vide Tabela 4.2), que por sua vez não foi afetada pela presença de frutose.

Por fim, a adição do dobro da quantidade de enzima restabeleceu um alto nível de P_{AG} , praticamente o triplo do valor obtido para a mesma concentração de glicose (40 g.L⁻¹) com metade da quantidade de enzima e cerca de 1,5 vezes o valor para o sistema com a metade da concentração de glicose (20 g.L⁻¹) com metade da quantidade de enzima, mostrando ser o processo muito sensível a essa variável. Estes resultados mostram que deve haver uma proporção ideal entre enzima e substrato que possa otimizar a produção, sem contudo elevar os demasiadamente os custos do processo.

5. Conclusões

Os resultados obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) foram correlacionados com a vazão de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e a viscosidade dinâmica das soluções (μ), a partir de um modelo simples que apresentou excelente ajuste, sendo uma equação útil para a previsão de valores de k_{La} durante o processo de oxidação da glicose a ácido glucônico em biorreator airlift.

Os resultados obtidos nos ensaios de produção de ácido glucônico mostraram que a presença de frutose não afetou o processo de oxidação da glicose a ácido glucônico nas condições experimentais estudadas, fato demonstrado pela pequena variação nos valores da constante de saturação referente à glicose (K_S), que expressa a afinidade da enzima por esse substrato.

Os resultados preliminares obtidos também demonstram claramente que a transferência de oxigênio não foi o fator limitante ao processo, hipótese de partida do trabalho. Apesar de a concentração de oxigênio na fase líquida ser pequena (da ordem de 10^{-3} g.L⁻¹) em relação à de glicose, a constante K_O , por ser ainda menor (da ordem de 10^{-5}), demonstra que o oxigênio presente foi suficiente para que ocorresse a reação de acordo com o modelo cinético de oxidação da glicose por GOD.

Ainda que de forma preliminar, os resultados obtidos até agora apontam para a viabilidade de se desenvolver uma tecnologia de produção para a obtenção simultânea de ácido glucônico e xarope concentrado de frutose. Entretanto, ainda são necessários testes complementares com concentrações mais elevadas de glicose e frutose a fim de se obter informações numa faixa mais ampla de condições experimentais. Proposta final ainda seria o desenvolvimento de uma técnica de imobilização da enzima adaptada às condições de reação para possibilitar o reaproveitamento da mesma, o que refletiria em uma diminuição significativa dos custos.

6. Referências Bibliográficas

- ANASTASSIADIS, S.; AIVASIDIS, A.; WANDREY, C.; REHM, H. Process optimization of continuous gluconic acid fermentation by isolated yeast-like strains of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 91, n. 4, August 20. 2005.
- ARIMATSU, Y.; BAO, J. FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Continuous production of calcium gluconate crystals in an integrated bioreaction- crystallization process using external loop airlift bubble columns with immobilized glucose oxidase gel beads. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v. 37, n.8, p. 1035-1040. 2004.
- BADINO JR., A. C. Reologia consumo de potência e de transferência de oxigênio em cultivos descontínuos *Aspergillus awamori* NRRL 312. São Paulo, SP, [Tese de doutorado, USP], 1997.
- BADINO, A.C.; HOKKA, C.O; CERRI, M. O. Biorreator pneumático de circulação interna e uso do mesmo. Brasil. Patente BR 04703-6 A. 2006.
- BADINO, A.C.; HOKKA, C.O; CERRI, M. O. Sistema reacional pneumático e uso do mesmo. Brasil. PI 0701608-5. 2007.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D.F.; *Biochemical Engineering*, New York, McGraw Hill, 1986.
- BANKAR, S. B.; BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; ANANTHANARAYAN, L. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 489-501. 2009.
- BAO, J.; FURUMOTO, K.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Average and local oxygen transfer properties in bubble column with axial distribution of immobilized glucose oxidase gel beads. *Chemical Engineering Science*, v. 55, p. 5405-5414. 2000.
- BAO, J.; FURUMOTO, K.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for

- production of calcium gluconate. *Biochemical Engineering Journal*, v. 8, p. 91-102. 2001a.
- BAO, J.; KOUMATSUA, K.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTOA, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Optimal operation of an integrated bioreaction–crystallization process for continuous production of calcium gluconate using external loop airlift columns. *Chemical Engineering Science*, v. 56, p. 6165–6170. 2001b.
- BAO, J.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 69-72. 2003a.
- BAO, J.; KOUMATSU, K.; ARIMATSU, Y.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on crystallization of calcium gluconate in external loop airlift column and stirred tank for an immobilized glucose oxidase reaction with crystallization. *Biochemical Engineering Journal*, v. 15, p. 177–184. 2003b.
- BARREIROS R. C., BOSSOLAN G., TRINDADE C.E. P.. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Rev. Nutr.*, Campinas, 18(3). p. 377-389, 2005.
- BERGMEYER, H.U., *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, 3.ed., v. 3. 1984.
- CIMENTAL FERMAFLEX. Ficha Técnica - Gluconato de Sódio. Cimental LTDA.
- CHISTI, Y.; *Airlift Reactors – Design and Diversity*. *The Chemical Engineer*, February, 1989b.
- CHISTI, Y., *Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental bioprocessing: hydrodynamics, hydraulics, and transport phenomena*, *Appl. Mech. Rev.* v. 51 p. 33-112, 1998.

- CHISTI, Y., JAUREGUI-HAZA, U. J., Oxygen transfer and mixing in mechanically-agitated airlift bioreactors, *Eng. J.*, v. 10, p.143-153, 2002.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M., Communication to the editor, on the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* v. 34, p. 1391-1392, 1989.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M., *Encyclopedia of physical science and technology*, 3rd edition, Volume 2. Academic Press. 2002.
- COPELAND, R. A. *Enzymes – A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. 2nd edition. Wiley-Vch. New York. 2000.
- CRUZ, V.D.; BELOTE, J.G.; BELLINE, M.Z.; CRUZ, R. Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*-245: Hydrolysis of inulin from several sources. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 301-306, 1998.
- D'EGIDIO M.G., CECCHINI C., CERVIGNI T., DONINI B., PIGNATELLI V. Production of fructose from cereal stems and polyannual cultures of Jerusalem artichoke. *Industrial Crops and Products* 7. p. 113–119. 1998.
- FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. .; SILVA F. C., Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Química Nova*, Vol. 32, No. 3, 623-638, 2009
- GODJEVARGOVA, T.; DAYAL, R.; TURMANOVA, S. Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. *Macromol. Bioscience*, v. 4, p. 950-956. 2004.
- JESUS, C. D. F.; CERRI, M. O.; FUTIWAKI, L; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C., Software para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em biorreator, *Anais Sinaferm 2007*, Curitiba, PR, (CD-ROM), 2007.
- JURAŠČÍK, M.; HUCÍK, M.; SIKULA, I.; ANNUS, J.; MARKOŠ, J. Influence of biomass on hydrodynamics of an internal loop airlift reactor. *Institute of*

Chemistry, Slovak Academy of Sciences - Chem. Pap. v. 60 n. 6, p. 441-445. 2006.

JURAŠČÍK, M.; SIKULA, I.; ROSENBERG, M.; MARKOŠ, J. Measurement of mass transfer coefficients in airlift reactors with internal loop using the glucose oxidase method. Chem. Biochem. Eng. V. 21 n. 3, p. 207–212. 2007.

KLEIN, J.; ROSENBERG, M.; MARKOS, J.; DOLGOS, O.; KROSLAK, M.; KRISTOFKOVA, L. Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* — study of mass transfer in an airlift bioreactor. Biochemical Engineering Journal, v. 10, p. 197-205. 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M; Principles of biochemistry. 2.Ed., Nova Yorque, Worth Publishers Inc., 1993.

LI, G. Q.; YANG, S. Z.; CAI, A. L.; CHEN J. Y. Liquid phase axial backmixing in an airlift biorreactor with non-Newtonian fluids. Chem. Eng. Commun., 125, 13 – 26. 1995.

LITTLEJOHNS, J. V.; DAUGULIS, A. J. Oxygen mass transfer and hydrodynamics in a multi-phase airlift bioscrubber system. Chemical Engineering Science , v. 64, p. 4171-4177. 2009.

LIU, J.; CUI, Z. Optimization of operating conditions for glucose oxidation in an enzymatic membrane bioreactor. Journal of Membrane Science, v. 302, p. 180-187. 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, V. 31, N. 3, p. 426-428. 1959.

MIRÓN A. S., GARCÍA M. C. C., CAMACHO F. G., GRIMA E. M., CHISTI Y. Mixing in bubble column and airlift reactors. Chemical Engineering Research and Design, v. 82(A10), p. 1367–1374. 2004.

MOLINA, E.; CONTRERAS A.; CHISTI Y. Gas holdup, liquid circulation and mixing behaviour of viscous Newtonian media in a split-cylinder airlift

- bioreactor. Food and Bioproducts Processing, Volume 77 - 1, p. 27-32., 1999.
- MUKHOPADHYAY, R; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B.P.; BANERJEE, P.C.; GUHA, A. K. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. International Dairy Journal, v.15, p. 299–303. 2005.
- NAKAMURA, T.; YASUYUKI, O. Kinetic studies on the action of glucose oxidase. J. Biochem. – Tokyo, 52, p. 214-220. 1962.
- NAKAO, K.; KIEFNER, A.; FURUMOTO, K.; HARADA, T. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. Chemical Engineering Science, v. 52., p. 4127-4133. 1997.
- PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 16, p. 237-245, 1999.
- PESSONI, R. A. B.; OLMEDO, P. M. O.; CLEMENTE FILHA, A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Produção de concentrados de frutose por inulinasas de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 24, n. 3, p. 373-377, jul. –set. 2004.
- RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. Food Technol. Biotechnol., v. 44, n.2, p. 185-195. 2006.
- SANKPAL, N.V. and KULKARNI, B. D. Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose micro fibrils. Process Biochemistry, v. 37, n. 12, p. 1343-1350. 2002.
- SCHIMIDELL, W. Biotecnologia Industrial, Volume 2, Engenharia Bioquímica, Editora Edgard BlücherLtda, São Paulo, 2001.

- SCHÜGERL, K. Bioreaction Engineering, volume 2: Characteristics Features of Bioreactors. John Wiley and Sons, 1987.
- SHARMA, A.; VIVEKANAND, V.; SINGH, R. P. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. Bioresource Technology. 2007.
- SIKULA, I.; MARKOŠ, J. Modeling of enzymatic reaction in an airlift reactor using an axial dispersion model. Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences – Chemical Papers. v. 62, n.1, p. 10–17. 2008.
- SIKULA I., JURAŠČÍK M., MARKOŠ J. Modelling of enzymatic reaction in an internal loop airlift reactor. Chem. Pap. 60 (6), p. 446 – 453. 2006.
- SIKULA I., JURAŠČÍK M., MARKOŠ J. Modeling of fermentation in an internal loop airlift bioreactor. Chemical Engineering Science, v. 62, p. 5216 – 5221. 2007.
- SINGH, O.V.; KAPUR, N.; SINGH R.P. Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by, *Aspergillus niger* ORS-4.410. World J. Microb. Biot., v. 21, p. 519–524. 2005.
- THOMASI, S. S. Avaliação de Parâmetros de Desempenho de Três Modelos de Biorreatores Pneumáticos de Bancada, São Carlos – SP, [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos], 2010.
- TOMOTANI, E. J; VITOLO, M. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. Journal of Food Engineering, v. 80, p. 662–667. 2007a.
- TOMOTANI, E. J; VITOLO, M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using membrane reactor. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 1020–1025. 2007b.

- WONG, C; WONH, K.; CHEN, X. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.78, p. 927–938. 2008.
- YAZDIAN F.,SHOJAOSADATI S. A., NOSRATI M., PESARANHAJIABBAS M., VASHEGHANI-FARAHANI E. Investigation of gas properties, design, and operational parameters on hydrodynamic characteristics, mass transfer, and biomass production from natural gas in an external airlift loop bioreactor. *Chemical Engineering Science*,v. 64, p. 2455 – 2465. 2009.
- YU J., JIANG J., JI W., LV H., LI Y., LIU J.. Glucose-free fructose production from Jerusalem artichoke using a recombinant inulinase-secreting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Biotechnology* 150S. S1-S576. 2010.
- ZNAD, H.; MARKOS, J.; BALES, V. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*. growth and non-growth conditions. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1341-1345. 2004.

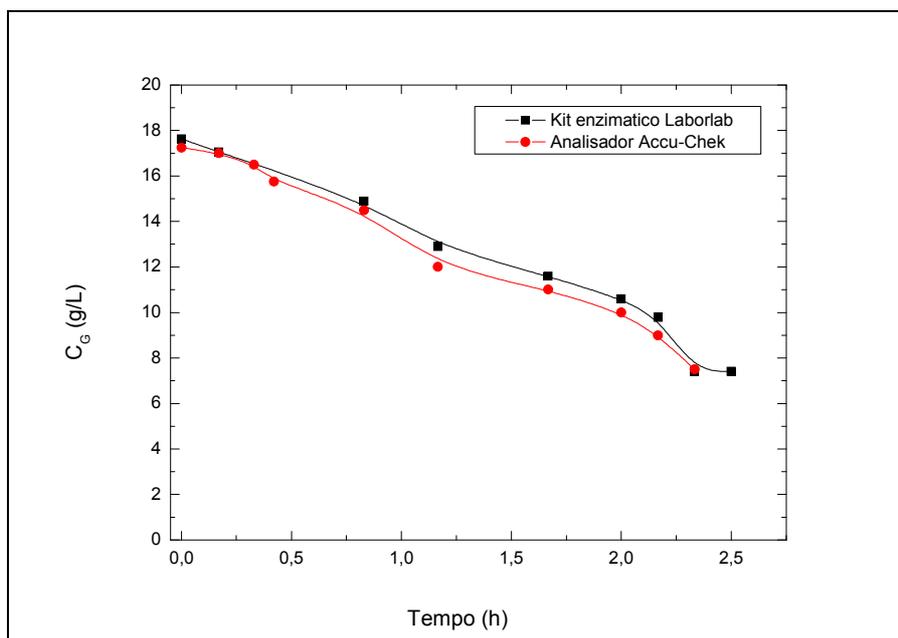
ANEXOS

A. Comparativo entre os Métodos de Dosagem de Glicose

A fim de se verificar a eficiência do analisador glicêmico, foi realizado um teste comparativo, utilizando para tanto o kit enzimático Laborlab amplamente empregado para medidas de concentração de glicose. Os valores obtidos foram plotados em comparação aos resultados do analisador Accu-Chek (utilizado neste trabalho).

Os resultados do referido teste foram previamente estabelecidos pelo grupo de pesquisa do laboratório de bioquímica do departamento de engenharia química desta universidade. A figura A.1 apresenta o comparativo entre as metodologias testadas.

Figura A.1. Comparativo entre o consumo de glicose medido para através do kit enzimático Laborlab e do medidor glicêmico Accu-Chek.



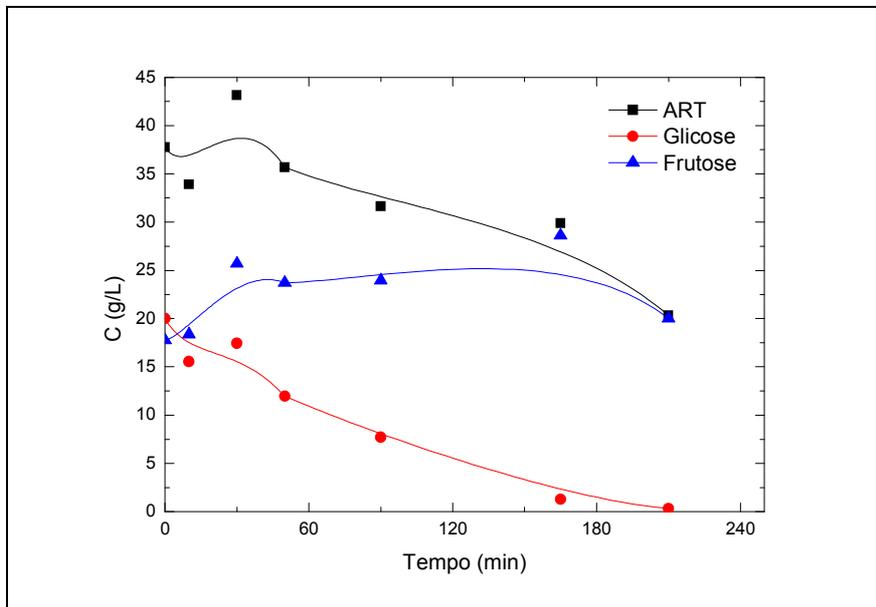
Através da observação da figura A.1 pode-se comprovar que as leituras obtidas tanto pelo espectrofotômetro quanto pelo analisador portátil se assemelham garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos neste trabalho.

B. Especificidade da GOD em Relação à Glicose

Com o objetivo de comprovar a especificidade da GOD em relação à glicose na presença de frutose, foi realizado um ensaio para a quantificação dos açúcares redutores totais (ARTs). Para isso utilizou-se o método de análise do DNS (ácido dinitrosalicílico). Do total de ARTs quantificados ao longo do ensaio foi-se subtraído algebricamente a glicose dosada e assim, estimou-se a concentração de frutose em solução.

Os resultados encontram-se apresentados na figura B.1.

Figura B.1. Concentrações dos açúcares ao longo do ensaio teste.



Através da observação da figura B.1 nota-se que a concentração de frutose foi constante durante a oxidação por GOD que consumiu apenas a glicose presente em solução no ensaio teste.

Estes resultados foram previamente estabelecidos pelo grupo de trabalho e referem-se a um ensaio teste com concentração inicial de glicose de 40 g.L^{-1} .