

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO
DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES POR *Zoogloea*
sp EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

FRANCISCO DE ASSIS DUTRA MELO

RECIFE – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO
DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES POR *Zoogloea*
sp EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

FRANCISCO DE ASSIS DUTRA MELO

Dissertação de mestrado apresentada por
Francisco de Assis Dutra Melo ao Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Química

Área de Concentração: Processos Bioquímicos

Orientadores: Prof. Dr. Mohand Benachour
Prof. Dr. Sérgio Lucena

RECIFE - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
ESCOLA DE ENGENHARIA – DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
QUÍMICA

**Dissertação de mestrado apresentada por Francisco de Assis Dutra
Melo ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como
parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química**

**DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 11 DE NOVEMBRO DE 2003,
DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Mohand Benachour

Prof. Dr. Sérgio Lucena

Prof. Dr. Nelson Medeiros Lima Filho

Profª Drª Maria de Fátima V. de Queiroz Souza

Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar

Este trabalho é dedicado aos meus pais Ricardo e Etelvina, que tanto se empenharam para minha formação moral e realização como profissional, e à minha família Marcília, Mayara, Bernardo, Ana e René.

AGRADECIMENTOS

- § Aos professores Mohand Benachour e Sérgio Lucena, pela orientação para a realização deste trabalho, pelo incentivo profissional e confiança demonstrados em todos os momentos.
- § Aos professores César Augusto Moraes de Abreu e Nelson Medeiros de Lima Filho, antigo e atual coordenadores, respectivamente, do curso de pós-graduação a nível mestrado em Engenharia Química, pela contribuição, orientação e incentivo profissional.
- § Aos professores do Departamento de Engenharia Química da UFPE, Sandra Maria Sarmiento, Florival Rodrigues de Carvalho, Luiz Stragevitch, Andréa Stragevitch, Maria de Fátima V. de Queiroz Souza, Maria Fernanda Pimentel Avelar, Humberto Dória Silva, Maria de Los Angeles Perez F. Palha, um agradecimento especial pela valiosa contribuição e amizade.
- § Aos técnicos da EECAC/UFRPE, Carmelita Bezerra de Melo, Virgínia Medeiros Ferreira, Antonio Gonçalves Ramos, Josias Rufino dos Santos e Ricardo Otaviano de Lima, pela amizade ao longo dos anos, incentivo profissional e contribuição na realização deste trabalho.
- § Ao Prof. José Otamar Falcão de Moraes, Departamento de Antibióticos - UFPE, pela contribuição na caracterização do microorganismo, amizade e incentivo profissional.
- § Aos professores Eugênia Rios Maranhão e Irapuan Oliveira Pinheiro, pela valiosa colaboração.

- § À Dr^a Marion Paterson, University of Birmingham, Inglaterra, pelos estudos de caracterização do exopolissacarídeo, pelo companheirismo e amizade.
- § Ao Engenheiro Químico José Martins Palha Júnior, Petroflex Indústria e Comércio S/A, pelos estudos de caracterização física do exopolissacarídeo, pelo apoio e companheirismo.
- § Ao Prof. Maurício A. da Motta Sobrinho, do Departamento de Engenharia Química, pela realização das análises de microscopia eletrônica, executadas no Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (UP 6811), Nancy, França, pela amizade e incentivo.
- § Aos funcionários das Secretarias de Pós-Graduação Flávio Barbosa Garrett e Voleide Barros Ferreira Gomes, e de Engenharia Química, Maria do Socorro de Hollanda Ferreira Gomes, pela amizade e prestação de serviços.
- § A todos os companheiros do mestrado em Engenharia Química, especialmente Antonio Francisco Araújo Brito, Luciano André Pedrosa Vieira, Gilson Lima da Silva, Givanilda Honório Silva, Giovanna Moés Albuquerque Pontes, Andréia Lopes de Araújo Sá, Eraldo de Jesus Argolo, pela amizade sincera, pelo incentivo profissional.
- § A Usina Petribú, em especial a Dr^a Tânia Mertens, pela valiosa colaboração.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	4
2.1. Polímeros.....	5
2.2. Polissacarídeos.....	7
2.3. Exopolissacarídeos.....	13
2.4. Substrato.....	18
2.5. Microorganismo - <i>Zoogloea</i>	20
2.6. Cinética Microbiana.....	24
2.7. Planejamento Experimental.....	27
3. Material e Métodos.....	29
3.1. Microorganismo.....	30
3.1.1. Identificação.....	30
3.1.2. Etapas do Cultivo do Microorganismo.....	30
3.2. Produção de Exopolissacarídeo.....	31
3.2.1. Etapa I	32
3.2.2. Etapa II	35
3.3. Acompanhamento da Fermentação.....	36
3.4. Obtenção do Exopolissacarídeo	37
3.5. Estudos Estatísticos.....	37
3.6. Características Físico-Químicas.....	37
3.6.1. Composição Química do Exopolissacarídeo e Solubilidade.....	37

3.6.2. Ensaio de Fusão – DSC.....	38
3.6.3. Ensaio de Tração Mecânica.....	38
3.6.4. Análise Morfológica do Exopolissacarídeo.....	38
4. Resultados Experimentais e Discussões.....	40
4.1. Avaliação da Massa de Exopolissacarídeo Produzido – Etapa I	42
4.1.1. Estudo Paramétrico.....	42
4.1.2. Avaliação dos Efeitos Principais e de Interações.....	43
4.2. Avaliação da Biomassa.....	46
4.3. Quantificação dos Açúcares Redutores Livres.....	49
4.4. Comportamento do pH Durante o Processo Reacional.....	50
4.5. Avaliação da Concentração de Exopolissacarídeo, de Biomassa e de Substrato Residual em Condições Otimizadas – Etapa II.....	51
4.6. Características Físico-Químicas do Exopolissacarídeo.....	53
4.6.1. Composição Química e Solubilidade do Exopolissacarídeo.....	53
4.6.2. Ensaio de Fusão – DSC.....	54
4.6.3. Testes Preliminares de Tração Mecânica.....	55
4.6.4. Análise Morfológica do Exopolissacarídeo.....	56
5. Modelagem Cinética.....	58
5.1. Avaliação dos Parâmetros do Processo Reacional de Produção do Exopolissacarídeo.....	59
5.2. Otimização de Parâmetros.....	62

6. Conclusões e Perspectivas.....	71
Referências Bibliográficas.....	76
Apêndice 1. Depósito de Pedido de Patente INPI.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição média do melação de cana-de-açúcar.....	19
Tabela 2. Planejamento experimental considerando os fatores pH, T (°C) e °Brix e os níveis (-) e (+).....	32
Tabela 3. Matriz de planejamento fatorial 2 ³ levando em consideração os fatores pH, T (°C), °Brix e os níveis (-) e (+).....	33
Tabela 4. Composição do melação - Usina Petribú - PE.....	33
Tabela 5. Massa de exopolissacarídeo (g) obtida no período do 9º ao 18º dia a partir do planejamento fatorial 2 ³	42
Tabela 6. Resultados para o planejamento fatorial 2 ³ , com valores das repetições 1 e 2 e médias relativas à massa de exopolissacarídeos nos oito ensaios, após 18 dias de experimentação.....	44
Tabela 7. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2 ³ e seus erros.....	45
Tabela 8. Concentração celular (g/L) obtida nos 8 ensaios pertencentes ao planejamento fatorial 2 ³	47
Tabela 9. Valores de Açúcares Redutores Livres (g/L) obtidos nos 8 ensaios, conforme planejamento experimental 2 ³	49
Tabela 10. Valores de pH observados conforme planejamento fatorial 2 ³	50

Tabela 11. Resultados obtidos (g/L) a partir da condição otimizada (°Brix = 10; pH = 4,5 e T = 30°C) para massa celular, substrato e exopolissacarídeo produzido.....	52
Tabela 12. Parâmetros de solubilidade do exopolissacarídeo, utilizando a água e o ácido trifluoroacético.....	54
Tabela 13. Teste de tração mecânica realizado no exopolissacarídeo.....	56
Tabela 14. Pesos de ponderação da função objetivo F_0 , levando em consideração os dados experimentais.....	65
Tabela 15. Limites inferiores e superiores, valores ótimos para os parâmetros cinéticos de μ_0 (dia ⁻¹), K_m (g/L), K_d (dia ⁻¹), K_1 , K_2 (dia ⁻¹), K_3 , obtidos para os modelos de Monod e Tessier.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Zoogloeas</i> amorfas ramificadas coletadas da superfície dos filtros de gotejamento.....	21
Figura 2. Esquema dos ensaios referentes a etapa I.....	34
Figura 3. Representação geométrica das variáveis X_1 (pH), X_2 (temperatura) e X_3 (°Brix) do planejamento fatorial 2^3	46
Figura 4. Dados de massa celular (g/L) para os tratamentos definidos no planejamento fatorial 2^3 , sendo pH = 4,5.....	48
Figura 5. Dados de massa celular (g/L) para os tratamentos definidos no planejamento fatorial 2^3 , sendo pH = 6,0.....	48
Figura 6. Substrato (ART g/L), exopolissacarídeos (g/L) e biomassa (g/L), na condição otimizada de máxima conversão (°Brix = 10; pH = 4,5; T = 30°C).....	53
Figura 7. Termograma do exopolissacarídeo.....	55
Figura 8. Imagens do exopolissacarídeo por técnica de microscopia eletrônica de varredura.....	57
Figura 9. Análise morfológica do exopolissacarídeo realizada em microscopia eletrônica de varredura.....	57
Figura 10. Comparação entre os resultados experimentais nas condições otimizadas e as simulações utilizando-se os modelos de Monod e Tessier. a) concentração de biomassa; b) concentração de substrato; c) concentração de produto.....	68

NOTAÇÃO UTILIZADA

ART	Açúcares Redutores Totais (g/L)
C	Vetor de concentrações
DSC	Colorimetria Diferencial Exploratória
F ₀	Função objetivo quadrática
GLP	Glicose, extrato de levedura, peptona
MCL	Meio completo para levedura
P	Vetor de parâmetros
YPD	Extrato de levedura, glicose e fosfato di-ácido de potássio
K ₁	Coefficiente de consumo de substrato
K ₂	Coefficiente de manutenção de biomassa (dia ⁻¹)
K ₃	Coefficiente de produção de exopolissacarídeo
K _a	Coefficiente de agregação celular ao exopolissacarídeo (dia ⁻¹)
K _d	Coefficiente de morte celular (dia ⁻¹)
K _{de}	Coefficiente de desaparecimento total de células (dia ⁻¹)
K _m	Constante de Monod (g/L)
μ	Taxa de crescimento específico (dia ⁻¹)
μ _m	Micrômetros
μ ₀	Taxa de crescimento específico máximo (dia ⁻¹)
ξ _i	Vetor erro para o componente i
Θ _i	Matriz de covariância dos dados experimentais para o componente i

RESUMO

Este trabalho objetivou o estudo cinético da produção de exopolissacarídeo por *Zoogloea* sp. em melação de cana-de-açúcar. Inicialmente foram realizados ensaios em frascos, obedecendo a um planejamento fatorial 2^3 , tendo como variáveis independentes e os seus respectivos níveis, os seguintes valores: temperatura (30 e 35°C); pH inicial (4,5 e 6,0) e concentração inicial de substrato (10 e 15° Brix).

A condição operacional na qual se obteve a maior produção do biopolímero (6,51 g) foi aquela em que se empregou: °Brix = 10; pH = 4,5 e T = 30°C. Nesta condição otimizada foram realizados experimentos em frascos, visando determinar os parâmetros cinéticos. Após 18 dias de processo obteve-se uma conversão de substrato em biopolímero de 76,8% e de substrato em biomassa de 2,4%. Os parâmetros cinéticos determinados para os modelos de Monod e Tessier, respectivamente, foram: taxa de crescimento máximo - μ_0 (dia⁻¹) (4,249 e 4,187); constante de Monod - K_m (g/L) (2,947 e 10,000); coeficiente de desaparecimento total de células - K_{de} (dia⁻¹) (3,961 e 4,089); coeficiente de consumo de substrato pela biomassa - K_1 (0,001 e 0,395); coeficiente de manutenção de biomassa - K_2 (dia⁻¹) (1,630 e 0,001); coeficiente de produção de exopolissacarídeo - K_3 (0,264 e 0,263).

As curvas obtidas, segundo os modelos de Monod e Tessier, para os parâmetros de biomassa, substrato e produto, não apresentaram uma boa aproximação dos resultados experimentais.

O biopolímero produzido apresentou solubilidade em água (17,9%), em ácido trifluoroacético (72,2%) e a fração solúvel é constituída dos seguintes monossacarídeos: glicose (87,6%); xilose (8,6%); manose (0,8%); ribose (1,7%); galactose (0,1%); arabinose (0,4%) e ácido glucurônico (0,8%).

O exopolissacarídeo produzido exibiu diâmetro de poro em torno de 0,07 μm , temperatura de fusão de 118°C e, quando submetido aos testes de tração mecânica, apresentou os seguintes resultados: espessura (0,08 mm), carga na ruptura (0,01 kN), tensão de ruptura (30,9 MPa), alongamento na ruptura (236%).

Palavras chave: melaço, cana-de-açúcar, exopolissacarídeo, cinética microbiana, Monod e Tessier, *Zoogloea* sp.

ABSTRACT

The object of this kinetic study of the production of the exopolisaccharides by *Zoogloea* sp. in sugarcane molasses initially, experiments were realized in flasks, following a factorial planning 2^3 , having as independent variables and their respective levels, the following values: temperature (30 and 35°C), initial pH (4,5 and 6,0) and initial substrate concentration (10 and 15 °Brix).

In the operational condition that was obtained, the most biopolymer production (6,51 g) was that which was used: Brix = 10, pH = 4,5 and T = 30°C. In this optimized condition there were realized experiments in flasks, with the object of determining the kinetic parameters. After 18 days of processing, there was obtained a substrate conversion in biopolymer of 76,8% and biomass substrate of 2,4%. The kinetic parameters determined for the Monod and Tessier models, respectively, were: maximum growth rate - μ_0 (dia⁻¹) (4,249 and 4,187); constant of Monod - K_m (g/L) (2,947 and 10,000); coefficient of total absence of cells - K_{de} (dia⁻¹) (3,961 and 4,089); consumption coefficient of substrate by the biomass - K_1 (0,001 and 0,395); coefficient of biomass maintenance - K_2 (dia⁻¹) (1,630 and 0,001); coefficient of exopolisaccharid production - K_3 (0,264 and 0,263).

The obtained curves, by the Monod and Tessier models, for the biomass parameters, substrate and product, did not present a good approximation of the experimental results.

The biopolymer produced presented solubility in water (17,9%), in trifluoroacetic acid (72,2%) and the soluble fraction is constituted of the following monosaccharids: glycosed (87,6%), xilose (8,6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose (0,4%) and glucuronic acid (0,8%).

The exopolissacharid produced exhibited a poro diameter of about 0,07 μm , fusion temperature of 118°C, and when submitted to the mechanical traction test, it presented the following results: with (0,08 mm), rupture charge (0,01 kN), rupture tention (30,9 MPa), rupture prolonging (236%).

Keywords: molasses, sugar cane, exopolysaccharides, microbial cynetic, Monod and Tessier, *Zoogloea* sp.