

Filipe António Calado Antunes

Produção de um agente de controlo biológico de doenças pós-colheita, em reactor biológico, a partir de resíduos de alfarroba.
Estudos de transferência de massa.

**Dissertação para obtenção do
grau de Mestre em Engenharia Biológica**



Universidade do Algarve

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

2009

Tese realizada sob a orientação de:

Professora Doutora Maria Emília Lima-Costa

Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo

Agradecimentos

Aos meus pais...

Resumo

A estirpe PBC-1 de *Pantoea agglomerans* é um eficaz agente de controlo biológico em pomóideas e citrinos. O seu uso comercial depende do desenvolvimento de um meio de cultura que permita obter um elevado rendimento em biomassa a um custo mínimo, sem perder a sua eficácia como agente de biocontrolo. Para reduzir custos foi estudado o uso de sub-produtos da indústria agro-alimentar como fonte de carbono. Optou-se utilizar resíduos de alfarroba por apresentarem um elevado teor em açúcares (40 - 60%) facilmente extraídos em água e serem um sub-produto da indústria da alfarroba, abundante na região algarvia.

Determinaram-se as condições óptimas de extracção dos açúcares da alfarroba, avaliando diferentes temperaturas e tempos de extracção.

Para avaliar o uso de extracto de alfarroba como fonte de carbono, foram realizados ensaios em Erlenmeyer com *P. agglomerans*. O efeito da concentração da fonte de carbono foi comparado com crescimentos em glucose e extracto de levedura.

Foram avaliadas as condições óptimas de produção da bactéria *P. agglomerans* quando cultivada em reactor biológico de 3 L mecanicamente agitado. Os ensaios de produção foram realizados usando como fonte de carbono extracto de alfarroba 10 g/L de açúcares totais, dos quais aproximadamente 5 g/L são açúcares redutores.

Foram ainda estudados os coeficientes de transferência de massa de oxigénio ($K_L a$) em diferentes meios aquosos contendo os vectores de oxigénio n-hexadecano e n-dodecano. O melhor vector de oxigénio foi utilizado num ensaio de crescimento de *P. agglomerans* em biorreactor.

Os resultados mostram que o n-dodecano 1% (v/v), pode ser usado para aumentar o $K_L a$ durante as fermentações em biorreactor.

A produtividade em biomassa alcançada nestes estudos demonstrou que sub-produtos da indústria de alfarroba podem ser usados como fonte de carbono na produção do agente de controlo biológico *P. agglomerans*.

Os resultados obtidos neste estudo poderão ser usados como base para o *scale-up* deste processo fermentativo a uma escala industrial.

Abstract

Strain PBC-1 of *Pantoea agglomerans* is an effective biocontrol agent in pome and citrus fruit. Its commercial use depends on the development of a culture medium which can produce high amount of biomass at a minimum cost, without loss of efficacy as a biocontrol agent. To reduce costs, food industry by-products were studied as carbon source. The use of carob residues was chosen because of its high contents (40 - 60%) of easily extractable sugars and because they represent by-products of the carob industry, which is abundant in the Algarve region.

The optimal extraction conditions were established under different temperatures and extraction times.

To evaluate the use of carob extract as carbon source, fermentations were carried out in shake flasks with *P. agglomerans*. The effect of carbon source concentration was compared with growth in glucose and yeast extract.

The optimal production conditions of *P. agglomerans* were studied in a 3 L mechanically stirred bioreactor. The production assays were carried out using as carbon source carob extract 10 g/L of total sugars, of which approximately 5 g/L are reducing sugars.

The oxygen mass transfer coefficients (K_{La}) of different mediums containing the oxygen vectors n-hexadecane and n-dodecane were studied. The best oxygen vector was used in a *P. agglomerans* production assay in a bioreactor.

The results show that n-dodecane 1% (v/v) can be used to enhance the K_{La} during bioreactor fermentations.

The biomass productivity achieved in these assays shows that carob industry sub-products can be used as a carbon source in the production of biocontrol agent *P. agglomerans*.

The results obtained in this study could be used to provide a reliable basis for *scale-up* of this fermentation process to an industrial level.

Objectivos

Este trabalho tem como objectivo principal a obtenção de uma fonte de carbono de baixo custo, sub-produto da indústria de alfarroba, para produção de um agente de controlo biológico com elevado rendimento em biomassa e a custo mínimo.

Foram objectivos específicos desta dissertação:

- A optimização do método de extracção dos açúcares existentes no resíduo de alfarroba, sub-produto proveniente da indústria de alfarroba.

- Optimização da concentração de fonte de carbono proveniente do sub-produto da indústria de alfarroba, em comparação com fontes de carbono comerciais.

- Avaliação do crescimento do agente de controlo biológico em biorreactor agitado mecanicamente de 3 L, num meio de cultura à base do sub-produto de baixo valor comercial.

- Estudo do efeito da adição de vectores de oxigénio no crescimento do agente de controlo biológico, em biorreactor de 3 L, de modo a contornar a limitação de oxigénio e a aumentar a biomassa formada.

- Estudo da influência do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ($K_L a$), determinado pelo método dinâmico, em diferentes meios aquosos (água, n-hexadecano e n-dodecano), a diferentes concentrações e em diferentes condições operacionais de agitação e arejamento.

- Avaliação da toxicidade dos diferentes vectores de oxigénio no crescimento do agente de controlo biológico.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Objectivos	iv
1 Introdução	1
1.1 Introdução Geral	2
1.2 Controlo Biológico Pós-Colheita	3
1.2.1 Principais doenças de pós-colheita	3
1.2.2 Agentes de biocontrolo pós-colheita	5
1.2.3 Mecanismos de acção dos agentes de biocontrolo	7
1.2.4 <i>Pantoea agglomerans</i> como agente de biocontrolo	8
1.3 Alfarroba	10
1.3.1 A alfarrobeira	10
1.3.2 Composição e aplicações da alfarroba	11
1.3.3 Extracção de xaropes de alfarroba	13
1.3.4 Uso de sub-produtos industriais	14
1.4 Transferência de Massa de Oxigénio em Biorreactor	18
1.4.1 Mecanismo de transferência de oxigénio	18
1.4.2 Métodos convencionais de aumentar a transferência de oxigénio	21
1.4.3 Vectores de oxigénio	22
1.4.4 Modo de acção dos vectores de oxigénio	24
2 Material e Métodos	27
2.1 Equipamentos	28
2.2 Material Biológico e Meios de Cultura	29
2.2.1 Microrganismo	29
2.2.2 Meios de cultura	29
2.3 Condições de Crescimento	30

2.3.1	Fontes de carbono	30
2.4	Método de Extração de Açúcares a Partir de Alfarroba	31
2.5	Ensaio de Crescimento com <i>P. agglomerans</i>	31
2.5.1	Ensaio de crescimento em Erlenmeyers	31
2.5.2	Ensaio de crescimento em reactor biológico mecanicamente agitado	32
2.6	Parâmetros de Crescimento Celular	33
2.6.1	Unidades formadoras de colónia	33
2.6.2	Densidade celular	34
2.6.3	Taxa respiratória	34
2.7	Métodos Analíticos	34
2.7.1	Quantificação dos açúcares redutores - Método do DNS	34
2.7.2	Análise de açúcares por HPLC	35
2.7.3	Quantificação dos fenóis	36
2.7.4	pH	36
2.7.5	Condutividade	37
2.8	Transferência de Massa de Oxigénio	37
2.8.1	Método Dinâmico	37
2.8.2	Vectores de Oxigénio	39
2.9	Caracterização Reológica	39
3	Resultados e Discussão	41
3.1	Coeficiente Volumétrico de Transferência de Massa	42
3.1.1	Influência do tipo de agitador e da velocidade de agitação no K_La	42
3.1.2	Influência do arejamento no K_La	50
3.2	Ensaio de Toxicidade dos Vectores de O_2	54
3.3	Extração de Açúcares de Sub-Produtos da Indústria da Alfarroba	57
3.4	Crescimento em Erlenmeyer do Agente de Controlo Biológico em Meio Glucose e Meio Alfarroba	59
3.5	Ensaio de Crescimento em Meio Alfarroba	67
3.6	Ensaio de pH	74

3.7	Ensaio em Reactor Agitado	77
4	Conclusões e Perspectivas Futuras	92
4.1	Conclusões	93
4.2	Perspectivas para Trabalho Futuro	95
5	Bibliografia	97
5.1	Referências Bibliográficas	98
Anexos		103
	Anexo A - Curvas de Calibração	104
	Anexo B - Tabelas e Gráficos Complementares ao Estudo do K_La	106

Índice de Figuras

Figura 1.1	Gradientes de concentração para a transferência de massa gás-líquido (adaptado de Doran, 1995).	19
Figura 1.2	Vias possíveis para a transferência de O ₂ das bolhas gasosas para os microrganismos na presença de um vector de O ₂ . Os diâmetros médios vão de 0,5 a 5 µm para as células, 0,5 a 50 µm para as gotículas de vector de O ₂ e 0,5 a 5 mm para as bolhas de gás (adaptado de Rols <i>et al.</i> ,1989).	25
Figura 3.1	Variação dos K _L a determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12 vvm.	44
Figura 3.2	Variação dos K _L a determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12 vvm.	44
Figura 3.3	Variação dos K _L a determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,16 vvm.	46
Figura 3.4	Variação dos K _L a determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,16 vvm.	47
Figura 3.5	Variação dos K _L a determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,20 vvm.	49
Figura 3.6	Variação dos K _L a determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,20 vvm.	49
Figura 3.7	Variação dos K _L a determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice (H) e uma turbina Rushton (R), para arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm e agitação de 100 rpm.	51
Figura 3.8	Variação dos K _L a determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice (H) e uma turbina Rushton (R), para arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm e agitação de 150 rpm.	51

- Figura 3.9 Variação dos $K_L a$ determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice (H) e uma turbina Rushton (R), para arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm e agitação de 200 rpm. 52
- Figura 3.10 Variação dos $K_L a$ determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice (H) e uma turbina Rushton (R), para arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm e agitação de 300 rpm. 52
- Figura 3.11 Influência da adição de vectores de oxigénio no perfil de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1, expresso em log ufc/mL (A) e absorvância a 640 nm (B), crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio SAC 5 g/L e meio SAC 5 g/L suplementado com n-hexadecano e n-dodecano 1% (v/v). Valores médios \pm desvio padrão (n=3). 55
- Figura 3.12 Concentração dos açúcares redutores presentes no extracto de alfarroba obtido com diferentes tempos e temperaturas de extracção. 58
- Figura 3.13 Perfis de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm com diferentes concentrações de glucose (A), apenas com extracto de levedura (B) e com diferentes concentrações de meio Alfarroba, expressos em absorvância a 640 nm (C) e expressos em log ufc/mL (D). Valores médios \pm desvio padrão (n=3). 60
- Figura 3.14 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm com diferentes concentrações de glucose. 62
- Figura 3.15 Perfil do consumo de açúcares redutores por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm com diferentes concentrações de meio Alfarroba. Valores médios \pm desvio padrão (n=3) 63
- Figura 3.16 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 5 g/L (AçR). O gráfico A representa os perfis dos açúcares frutose, glucose e sacarose, presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o perfil dos açúcares totais. 64
- Figura 3.17 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L (AçR). O

gráfico A representa os perfis dos açúcares frutose, glucose e sacarose, presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o perfil dos açúcares totais. 65

Figura 3.18 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 15 g/L (AçR). O gráfico A representa os perfis dos açúcares frutose, glucose e sacarose, presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o perfil dos açúcares totais. 65

Figura 3.19 Perfis de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1, expressos em log ufc/mL (A) e absorvância a 640 nm (B), crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 5, 10, 15 e 20 g/L. Valores médios \pm desvio padrão (n=3). 68

Figura 3.20 Variação do pH (A) e da concentração de fenóis (B) ao longo do ensaio de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 5, 10, 15 e 20 g/L. Valores médios \pm desvio padrão (n=3). 69

Figura 3.21 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 5 g/L. O gráfico A representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o consumo dos açúcares totais. 71

Figura 3.22 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L. O gráfico A representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o consumo dos açúcares totais. 71

Figura 3.23 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 15 g/L. O gráfico A representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o consumo dos açúcares totais. 72

Figura 3.24 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 20 g/L. O gráfico A representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o consumo dos açúcares totais. 73

Figura 3.25 Perfil de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L a diferentes pH (A); e variação do pH e condutividade ao longo do ensaio (B). Valores médios \pm desvio padrão (n=3).74

Figura 3.26 Perfis do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L a diferentes pH. Os gráficos A e B representam o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba para pH normal e pH 7, respectivamente. O gráfico C representa o perfil dos açúcares totais nos dois pH diferentes. 76

Figura 3.27 Curvas de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L (A) e meio Alfarroba 10g/L + n-dodecano 1% (v/v) (B). 78

Figura 3.28 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L usando um agitador em hélice. O gráfico A representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o perfil dos açúcares totais. 80

Figura 3.29 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) usando um agitador em hélice. O gráfico A representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o perfil dos açúcares totais 81

Figura 3.30 Variação do pH e da condutividade ao longo do crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L (A) e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) (B), usando um agitador em hélice. 82

Figura 3.31 Variação da concentração de fenóis ao longo do crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L (A) e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) (B), usando um agitador em hélice. Valores médios \pm erro padrão (n=3). 83

Figura 3.32 Variação do oxigénio dissolvido no meio de cultura ao longo do crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L (A) e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) (B), usando um agitador em hélice. 84

Figura 3.33 Reogramas da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L usando um agitador em hélice. 87

Figura 3.34 Reogramas da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) usando um agitador em hélice. 88

Índice de Tabelas

Tabela 1.1	Quantidade de resíduos vegetais produzidas anualmente em diferentes países (adaptado de (Couto, 2008)	16
Tabela 2.1	Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.	28
Tabela 2.2	Composição dos meios NYDA, NYDB, SAC, Glucose e Alfarroba.	29
Tabela 2.3	Propriedades dos vectores de oxigénio n-hexadecano e n-dodecano em comparação com a água.	39
Tabela 2.4	Principais dimensões do adaptador UL.	40
Tabela 3.1	Valores de K_La determinados, pelo método dinâmico, em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice e uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12 vvm.	43
Tabela 3.2	Valores de K_La determinados, pelo método dinâmico, em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice e uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,16 vvm.	45
Tabela 3.3	Valores de K_La determinados, pelo método dinâmico, em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice e uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,20 vvm.	47
Tabela 3.4	Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g), taxas específicas de morte celular (k_d) e concentrações máximas em ufc/mL determinados no ensaio de toxicidade dos vectores de O_2 .	56
Tabela 3.5	Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g) e concentração máxima em ufc/mL determinados no ensaios de crescimento de <i>P. agglomerans</i> PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em glucose, extracto de levedura e meio Alfarroba.	62
Tabela 3.6	Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g) e concentrações máximas em ufc/mL determinados no ensaios de crescimento de <i>P. agglomerans</i> PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em diferentes concentrações de meio Alfarroba.	69
Tabela 3.7	Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g) e concentrações máximas em ufc/mL determinados no ensaios de crescimento de <i>P. agglomerans</i> PBC-	

1 em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L a diferentes pH. 75

Tabela 3.8 Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g) e concentrações máximas em ufc/mL determinados nos ensaios de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v), usando um agitador em hélice. 79

Tabela 3.9 Valores de K_{La} e taxas respiratórias determinadas ao longo da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L usando um agitador em hélice. 85

Tabela 3.10 Valores de K_{La} e taxas respiratórias determinadas ao longo da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) usando um agitador em hélice. 85

Tabela 3.11 Valores da viscosidade aparente (μ_a) em função do aumento da velocidade de corte (γ), determinados em diferentes tempos ao longo da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L usando um agitador em hélice. 89

Tabela 3.12 Valores da viscosidade aparente (μ_a) em função do aumento da velocidade de corte (γ), determinados em diferentes tempos ao longo da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) usando um agitador em hélice. 90

Lista de Símbolos e Abreviaturas

- ❖ A - Área (m^2)
- ❖ a - Área interfacial de transferência por unidade de volume de líquido ($m^2 \cdot m^{-3}$)
- ❖ A# nm - Absorvância a # nm
- ❖ T# nm - Transmitância a # nm
- ❖ k_L - Coeficiente de transferência de massa na fase líquida ($m \cdot h^{-1}$)
- ❖ k_G - Coeficiente de transferência de massa na fase gasosa ($m \cdot h^{-1}$)
- ❖ $K_L a$ - Coeficiente volumétrico de transferência de massa global (h^{-1})
- ❖ OD - Oxigénio dissolvido
- ❖ DO - Densidade óptica
- ❖ rpm - Rotações por minuto
- ❖ vvm - Volume de gás por volume útil de reactor por minuto
- ❖ AçR - Açúcares redutores
- ❖ Yext - Extracto de levedura
- ❖ TF - Solução tampão fosfato
- ❖ M - Molar (mol/dm^3)
- ❖ LBG - *Locust bean gum*
- ❖ PFC - Perfluorocarbonos
- ❖ UE - União Europeia
- ❖ EUA - Estados Unidos da América
- ❖ TR - Taxa respiratória
- ❖ ufc - Unidades formadoras de colónia
- ❖ UV - Ultravioleta
- ❖ μS - micro Siemens
- ❖ μ - Viscosidade (cP)
- ❖ μ_a - Viscosidade aparente (cP)
- ❖ τ - Tensão de corte (N/m^2)
- ❖ γ - Velocidade de corte (s^{-1})
- ❖ λ - Comprimento de onda (nm)
- ❖ \emptyset - Diâmetro

1 Introdução

1.1 Introdução Geral

Antagonistas microbianos naturais têm sido desenvolvidos como potencial alternativa a fungicidas químicos ou como parte de sistemas integrados de gestão de culturas para reduzir o uso de fungicidas em frutas na pós-colheita. Os antagonistas estudados têm-se mostrado eficientes contra microrganismos patogénicos fúngicos em pomóideas e citrinos entre outros (Costa *et al.*, 2001; Francés *et al.*, 2005). A produção em massa de agentes de controlo biológico tem apresentado grande interesse na investigação e desenvolvimento industrial na procura de alternativas viáveis aos tratamentos químicos na pós-colheita, estando já alguns destes antagonistas a ser desenvolvidos comercialmente.

Estudos detalhados mostram que estirpes de *Pantoea agglomerans* são antagonistas eficientes contra os principais agentes patogénicos de pós-colheita em pomóideas e citrinos (Costa *et al.*, 2001), evidenciando assim o seu potencial como agente de controlo biológico a ser produzido a nível comercial.

O meio de cultura utilizado para o crescimento de *P. agglomerans* deverá permitir a produção em grande escala, com um máximo de concentração em biomassa e elevada qualidade da cultura a preço reduzido (Costa *et al.*, 2001).

O uso de produtos comerciais como fontes de nitrogénio e de carbono, satisfazem alguns desses critérios. No entanto, na produção à escala industrial, representam muitas vezes o encarecimento final do agente de biocontrolo.

É importante então encontrar fontes de carbono alternativas que permitam a produção de um máximo de biomassa de *P. agglomerans* a um mínimo de custo ao mesmo tempo que se mantém a eficiência como agente de biocontrolo.

A limitação do oxigénio (O₂) durante as fermentações é também um factor relevante nos processos fermentativos, pelo que se torna necessário melhorar a transferência de oxigénio do ar para o meio de cultura de modo a otimizar o processo.

A adição de vectores de O₂ apresenta-se como uma solução possível para resolver as limitações de oxigénio que condicionam muitos processos biotecnológicos.

A optimização das condições de arejamento inclui o estudo do efeito do caudal de arejamento e velocidade de agitação no coeficiente volumétrico de transferência de

massa de oxigénio em meio aquoso. A optimização do arejamento contempla ainda o estudo da aplicação de vectores de O₂ para aumentar a solubilidade do oxigénio no meio de cultura.

É assim objectivo deste trabalho avaliar o crescimento da bactéria *P. agglomerans* em diferentes meios com adição de sub-produtos da indústria da alfarroba como fonte de carbono e investigar a adição de vectores de O₂ ao meio de cultura de forma a aumentar a disponibilidade de oxigénio às células.

Esta investigação foca nas condições de operação e crescimento de *P. agglomerans* para obter resultados que possam ser usados para providenciar uma base credível para o *scale-up* deste processo de fermentação ao nível industrial.

1.2 Controlo Biológico Pós-Colheita

1.2.1 Principais doenças de pós-colheita

O apodrecimento pós-colheita de fruta fresca devido a infecções fúngicas durante o armazenamento, transporte e comercialização da fruta, causam perdas económicas significativas à indústria. As doenças pós-colheita mais importantes são causadas por fungos como *Penicillium* spp., *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* e *Rhizopus stolonifer*. Estes microrganismos patogénicos são eficientemente controlados por uma combinação de tecnologias de armazenagem, métodos físicos e fúngicidas químicos sintéticos (Francés *et al.*, 2005).

O bolor verde causado por *Penicillium digitatum* e o bolor azul causado por *Penicillium italicum* são as doenças pós-colheita mais importantes a nível económico que afectam os citrinos em quase todas as regiões do mundo onde se produzem (Torres *et al.*, 2007; Cañamás *et al.*, 2007a; Cañamás *et al.*, 2007b).

P. digitatum é um organismo patogénico específico das feridas das frutas e que pode infectar a fruta no pomar, nas centrais de fruta e durante a sua distribuição (Usall

et al., 2008). Os conídios são ubíquos nos pomares e armazéns e são facilmente transportados via aérea da fruta infectada para a fruta sã (Usall *et al.*, 2008).

O uso de fungicidas sintéticos é o método mais usado contra as principais doenças pós-colheita que afectam os citrinos (Cañamás *et al.*, 2007a). Fungicidas como imazalil ou thiabendazol possuem acção curativa controlando infecções pré-existentes e deixam um resíduo que previne infecções subsequentes e retarda a esporulação. No entanto, a sua ampla distribuição levou à proliferação de microrganismos com resistência (Torres *et al.*, 2007; Usall *et al.*, 2008).

Os bolores causados por *Penicillium expansum* (bolor azul), *Botrytis cinerea* (bolor cinzento) e em alguns casos *Rhizopus stolonifer* são das doenças mais significativas em pomóideas a nível mundial (Nunes *et al.*, 2002a; Nunes *et al.*, 2002b). O apodrecimento pós-colheita de pêras e maçãs provocado por estes fungos é responsável por perdas económicas substanciais nestes mercados (Nunes *et al.*, 2001).

As perdas causadas por *Monilinia laxa* (podridão parda) e *Rhizopus stolonifer* (podridão mole) são os principais problemas na pós-colheita de prunóideas na Europa (Bonaterra *et al.*, 2002).

As prunóideas normalmente entram imediatamente no mercado após a colheita sem armazenamento a frio prolongado, o que resulta em perdas económicas importantes devido à acção de fungos (Bonaterra *et al.*, 2002).

Perdas no rendimento devido à podridão parda podem ser importantes dependendo das condições climáticas nos pomares, caso se registem temperaturas amenas e chuva abundante na fase de pré-colheita. A podridão parda é controlada por práticas sanitárias e programas de aplicação de fungicidas na fase de pré-colheita. Normalmente tratamentos pós-colheita não se realizam. Os programas de controlo são muitas vezes ineficazes e níveis significativos de podridão parda podem surgir durante o armazenamento, transporte e comercialização. As perdas devido a *R. stolonifer* surgem durante armazenagem e em casa do consumidor. A podridão mole não é controlada eficientemente pelos fungicidas o que tem implicações económicas durante o processamento da fruta (Bonaterra *et al.*, 2002).

A videira é altamente vulnerável a várias doenças de origem fúngica, entre as quais o bolor cinzento causado por *Botrytis cinerea* que leva a sérios danos às culturas em França, particularmente em regiões onde o clima é frio e húmido. Este fungo infecta flores, frutos e folhas. Actualmente o bolor cinzento é controlado pré-colheita através de fungicidas preventivos (Trotel-Aziz *et al.*, 2007).

A aplicação de fungicidas sintéticos pós-colheita tem sido o principal meio de controlo destas doenças. Mas têm sido progressivamente restritos e existe grande pressão para reduzir ou eliminar o seu uso (Torres *et al.*, 2007). Isto deve-se às crescentes preocupações ambientais e de saúde humana devido à presença de resíduos químicos nos alimentos (Nunes *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2002a; Costa *et al.*, 2002), ao aparecimento de resistências aos fungicidas, ao número limitado de ingredientes activos autorizados (Francés *et al.*, 2005) e falta de fungicidas de substituição (Torres *et al.*, 2007).

Estes factores têm contribuído para o maior interesse por parte da comunidade científica e opinião pública (Costa *et al.*, 2002) no desenvolvimento de métodos alternativos ou complementares.

O controlo biológico pós-colheita usando antagonistas microbianos surge assim como uma das alternativas mais promissoras (Nunes *et al.*, 2002a; Cañamás *et al.*, 2007b).

Este método é considerado uma alternativa desejável aos fungicidas sintéticos, tanto para aplicação individual como parte de uma política de gestão integrada de controlo de doenças que visa a redução do uso de pesticidas (Costa *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007).

1.2.2 Agentes de biocontrolo pós-colheita

A fase pós-colheita dos frutos é restringida por parâmetros ambientais como a temperatura, gases atmosféricos e humidade relativa, que podem ser alterados de forma a atrasar a senescência e reduzir a decomposição. O potencial de um agente de

controlo biológico dependerá também da sua compatibilidade com estas condições de armazenamento (Nunes *et al.*, 2002a).

A eficiência de vários agentes de biocontrolo pós-colheita tem sido avaliada por diversos testes em laboratório e em condições semi-comerciais (Nunes *et al.*, 2002a; Cañamás *et al.* 2007b).

Diversas estirpes de fungos e bactérias controlam doenças pós-colheita em citrinos, maçã, pêra, pêsego, nectarina, cereja, kiwi e uva. Algumas estão em fase de desenvolvimento ou estão já disponíveis no mercado (Costa *et al.*, 2002; Francés *et al.*, 2005).

Estirpes de *Pantoea agglomerans* isoladas de fruta saudável controlam agentes patogénicos pós-colheita em determinadas variedades de frutos (Usall *et al.*, 2008). A estirpe CPA-2 é eficiente contra 3 espécies de *Penicillium* em pêra e laranja, e *R. stolonifer* e *B. cinerea* em maçã e pêra (Nunes *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2002a; Nunes *et al.*, 2007).

A estirpe EPS125 de *P. agglomerans* também apresentou elevada eficiência na redução do bolor azul causado por *P. expansum* em pomóideas e os resultados não diferem significativamente dos tratamentos com fungicidas de referência (Bonaterra *et al.*, 2002).

A bactéria *P. agglomerans* também tem sido identificada como agente de controlo biológico pós-colheita em prunóideas. A estirpe EPS125 reduziu significativamente a podridão parda e podridão mole em prunóideas que foram feridas e inoculadas com *M. laxa* e *R. Stolonifer* inibindo infecções em pêsego, damasco e nectarina (Bonaterra *et al.*, 2002, Francés *et al.*, 2002).

Algumas bactérias não patogénicas associadas à videira pertencentes às espécies *Acinetobacter iwoffii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans* e *Bacillus subtilis* estão identificadas como potenciais agentes de biocontrolo contra *B. cinerea*. Resultados de experiências *in vitro* revelaram que *P. agglomerans* PTA-AF1 e *P. fluorescens* PTA-CT2 são activas contra *B. cinerea* (Trotel-Aziz *et al.*, 2007).

Muitos dos estudos existentes em videira centram-se no uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. para o controlo do bolor cinzento. Outro possível

controlo tem sido estudado com *Burkholderia* sp. Também *Bacillus subtilis* QST 713 tem demonstrado eficiência contra vários fungos patogénicos (Trotel-Aziz *et al.*, 2007).

Estudos em Espanha têm demonstrado que *Candida sake* estirpe CPA-1 é um antagonista eficiente contra os principais microrganismos patogénicos pós-colheita em pomóideas (Nunes *et al.*, 2002b).

1.2.3 Mecanismos de acção dos agentes de biocontrolo

Os microrganismos patogénicos normalmente infectam a fruta através de feridas infligidas por acções mecânicas durante a época de produção e operações de colheita e manuseamento (Cañamás *et al.*, 2007b).

O conhecimento do mecanismo de acção envolvido no processo de biocontrolo pode permitir estabelecer as condições óptimas para a interacção entre o agente patogénico e o agente antagonista e é importante para a implementação de um controlo biológico a um dado sistema (Bonaterra *et al.*, 2002).

Várias bactérias exibem uma acção antifúngica através de antagonismo directo e também através da indução de reacções de defesa da planta (Trotel-Aziz *et al.*, 2007).

O mecanismo exacto pelo qual *P. agglomerans* suprime as doenças não é claro. A competição por nutrientes e locais de infecção (Trotel-Aziz *et al.*, 2007; Usall *et al.*, 2008), a inibição dos microrganismos patogénicos por produção de condições acídicas, a indução de defesas da planta (Nunes *et al.*, 2001), parasitismo e produção de compostos antimicrobianos têm sido sugeridos como mecanismos pelos quais a *P. agglomerans* actua como agente de controlo biológico (Nunes *et al.*, 2002a).

O estabelecimento das populações bacterianas na superfície dos frutos é uma fase crítica dado estes poderem ser inactivados por factores ambientais como luz solar, temperatura, humidade, vento, chuva e competição com outros microrganismos (Cañamás *et al.*, 2007a).

Quando os agentes de biocontrolo são aplicados na pós-colheita apresentam dificuldade em controlar infecções previamente estabelecidas ou incipientes que originaram no campo. De facto, a eficiência do antagonista decresce em proporção ao aumento do tempo desde que originou a infecção e em que o antagonista foi aplicado (Cañamás *et al.*, 2007b).

Os estudos efectuados mostram que a eficácia do agente de biocontrolo está relacionado com o número de células viáveis e para atingir um controlo eficaz é por vezes necessário usar elevadas concentrações do antagonista (Nunes *et al.*, 2002a; Cañamás *et al.*, 2007a).

O conhecimento das relações de densidade celular entre antagonista e agente patogénico tornam-se assim importantes para obter um controlo adequado (Bonaterra *et al.*, 2002).

O biocontrolo pós-colheita é especialmente viável pois os frutos colhidos estão prontamente acessíveis ao tratamento com os antagonistas e vários microrganismos patogénicos dos frutos infectam através de feridas pós-colheita. A decomposição causada pelos principais agentes patogénicos pós-colheita tem sido controlada em pomóideas, citrinos, prunóideas, videira e outros, através de antagonistas bacterianos e leveduras.

Daí que seja natural que nos últimos anos o controlo biológico de doenças pós-colheita com antagonistas naturais tenham surgido como uma alternativa ao controlo por parte de fungicidas sintéticos. Alguns destes agentes estão disponíveis comercialmente.

De entre as formulações de controlo biológico disponíveis no mercado temos Serenade™ (*Bacillus subtilis* QST 713) (Trotel-Aziz *et al.*, 2007), SHEMER™ WDG (*Metschnikowia fructicola*; Agro Green, Israel), Bio-Save® 10 LP e BioSave® 11 (*Pseudomonas syringae* estirpe ESC-10 e ESC-11; JET Harest Solutions, Orlando, FL, USA) (Cañamás *et al.*, 2007b; Torres *et al.*, 2007) e ainda Aspire™ (*Candida oleophila* estirpe 182; Ecogen Inc., Langhorne, PA, USA) (Nunes *et al.*, 2002b).

1.2.4 *Pantoea agglomerans* como agente de biocontrolo

Células frescas de *P. agglomerans*, que demonstraram sua eficácia no controlo das principais doenças pós-colheita, podem servir como base para um novo produto de biocontrolo. A sua capacidade de colonizar, crescer e sobreviver nas feridas, o facto de seus principais mecanismos de acção serem por interacção directa e a ausência de problemas toxicológicos são algumas características interessantes para um uso

comercial (Bonaterra *et al.*, 2002). A sua capacidade de controlar várias doenças em diferentes tipos de fruta é uma mais-valia que aumenta o seu interesse comercial, dado que em geral os agentes de controlo biológico tendem a ter um espectro de acção mais estreito do que os fungicidas (Torres *et al.*, 2007, Nunes *et al.*, 2007).

Atendendo a que a produção comercial de *P. agglomerans* para uso como agente de biocontrolo pós-colheita requer baixos custos e elevadas concentrações celulares, a optimização das condições nutricionais e de produção desta bactéria baseiam-se em minimizar o custo e maximizar a densidade celular (Costa *et al.*, 2001).

Os constituintes de um meio devem satisfazer os requerimentos básicos para a produção de biomassa e metabolitos pelo fornecimento adequado de energia para a biosíntese e manutenção celular. A fonte de nitrogénio pode ser inorgânica ou orgânica. O substrato de carbono tem uma dupla função na biosíntese e produção de energia, sendo os hidratos de carbono a fonte de carbono usual em processos de fermentação microbiana (Costa *et al.*, 2002).

Na escolha de um meio devem também ser considerados aspectos como a viscosidade, baixa transferência gasosa, facilidade de obtenção e/ou preparação e custos finais (Costa *et al.*, 2002).

Para usar um agente biológico como produto comercial é essencial otimizar a sua formulação. Isto é necessário para providenciar o produto de uma forma adequada de modo a otimizar a sua eficácia, estabilidade, segurança e facilidade de aplicação (Costa *et al.*, 2000, Nunes *et al.*, 2007).

O uso de *P. agglomerans* deve ser compatível com as práticas existentes nas centrais de fruta e deve implicar um mínimo de precauções ambientais e de segurança pessoal em comparação com os produtos químicos (Torres *et al.*, 2007, Usall *et al.*, 2008).

Actualmente, o principal obstáculo à adopção do biocontrolo pela indústria de citrinos na Europa tem a ver com a difícil regulamentação e registo de produtos comerciais de controlo biológico, em especial quando comparado com as políticas menos restritivas de outros países como os EUA (Usall *et al.*, 2008).

No que diz respeito à distribuição e persistência no ambiente, os estudos realizados mostram que a *P. agglomerans* tem pouco impacto pois não cresceu nem se dispersou no ambiente. Isto é muito importante para o seu uso nas centrais de fruta e no campo pois sugere que terá pouco efeito na microflora indígena, o que poderá facilitar a seu registo (Nunes *et al.*, 2007).

1.3 Alfarroba

1.3.1 A alfarrobeira

A alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.) é uma espécie subtropical pertencente à família *Leguminosae*, sub-família *Caesalpinioidea* e é uma árvore característica da vegetação perene das zonas de baixa elevação da bacia do mediterrâneo e sudoeste asiático (Santos *et al.*, 2005; Barracosa *et al.*, 2007).

Tem-se assumido há muito tempo que o género *Ceratonia* L. consiste apenas de *C. siliqua* L., até à descoberta da nova espécie *Ceratonia oreothauma* (Barracosa *et al.*, 2007).

A alfarroba é resistente à seca, requer pouca manutenção e é cultivada no mediterrâneo há aproximadamente 4000 anos (Santos *et al.*, 2005). É uma cultura que se encontra tipicamente em zonas semi-áridas do sul da Europa e algumas zonas da América do Norte (Bulut *et al.*, 2004) e apresenta-se como uma cultura de rendimento e um recurso valioso para a reflorestação e controlo da erosão em terrenos não cultivados (Roseiro *et al.*, 1991b; Rizzo *et al.*, 2004; Biner *et al.*, 2005).

A produção mundial de alfarroba está estimada em 315000 toneladas por ano e seus principais produtores e exportadores são a Espanha (42%), Itália (16%), Portugal (10%), Marrocos (8%), Grécia (7%), Chipre (6%) e Turquia (5%). A área cultivada é de aproximadamente 200000 hectares.

Portugal e Espanha possuem cerca de 100000 hectares de alfarrobeira e processam aproximadamente metade do fornecimento comercial de alfarroba a nível mundial (Biner *et al.*, 2005, Santos *et al.*, 2005).

1.3.2 Composição e aplicações da alfarroba

O fruto da alfarrobeira é a vagem de alfarroba. Os dois principais componentes do fruto são a polpa e as sementes. As sementes representam cerca de 10% do peso do fruto enquanto a polpa representa os outros 90%. A sua composição depende grandemente da variedade, clima, região e técnicas de cultivo (Petit & Pinilla, 1994; Biner *et al.*, 2005).

Historicamente, devido ao seu elevado teor em açúcares, a vagem de alfarroba foi consumida como alimento humano, especialmente em tempos de emergência de guerra e fome (Owen *et al.*, 2003).

Hoje em dia diversos produtos são produzidos a partir da semente e da polpa, e a importância económica da cultura resulta principalmente do seu uso pelas indústrias (Biner *et al.*, 2005).

A alfarroba é explorada maioritariamente pela indústria de transformação das sementes. As sementes de alfarroba são a matéria-prima na produção de LBG (*Locust Bean Gum*) representando cerca de 12% da produção mundial de goma (Mendes *et al.*, 2007). O endoesperma é extraído das sementes para produzir galactomanana, o polissacarídeo responsável pelas propriedades espessantes que dá origem ao LBG (Santos *et al.*, 2005).

O LBG é o produto de alfarroba mais amplamente usado na indústria alimentar (Roseiro *et al.*, 1991b; Rizo *et al.*, 2004; Barracosa *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2007) onde é usada como espessante em preparados alimentares devido à sua capacidade em formar soluções viscosas e de estabilizar emulsões. É um valioso aditivo alimentar em produtos como gelados, doces e sopas (Biner *et al.*, 2005). O *European Codex* classifica o LBG como um aditivo alimentar (E 410) para uso humano (Rizzo *et al.*, 2004; Barracosa *et al.*, 2007; Barracosa *et al.*, 2008).

Devido à sua elevada viscosidade a concentrações relativamente baixas (Dakia *et al.*, 2006) o LBG é também utilizada nas indústrias têxtil, cosmética (Biner *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005) e farmacêutica (Barracosa *et al.*, 2007).

É também utilizada pelas propriedades sinérgicas com carrageno, agár e xantano para formar géis mais fortes e elásticos (Dakia *et al.*, 2006).

A polpa de alfarroba (vagem sem semente), também conhecido por *kibble*, caracteriza-se por possuir um elevado nível de açúcares, nomeadamente sacarose, glucose e frutose e um baixo conteúdo de outros açúcares como xilose e maltose (Petit & Pinilla, 1994) mas as suas proporções relativas são variáveis (Biner *et al.*, 2005). Contém ainda elevado teor em taninos e baixa quantidade de proteína e lípidos (Petit & Pinilla, 1994; Mendes *et al.*, 2007).

A vagem compõe-se de cerca de 40 - 60% açúcares totais (Yousif & Alghazawi, 1999; Bulut *et al.*, 2004; Biner *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005), predominantemente sacarose, que constitui cerca de 30% (Biner *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005) a 75% (Petit & Pinilla, 1994; Yousif & Alghazawi, 1999). A glucose e frutose representam aproximadamente 15 - 25% do total de açúcares (Petit & Pinilla, 1994). Tem baixo teor em proteína (3 - 4%) e lípidos (0.4 - 1%) (Biner *et al.*, 2005; Bulut *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005).

A vagem tem ainda na sua composição (p/p): 10 - 15% humidade; 1 - 2% de pectina; 7% de celulose; 5% de hemicelulose; 20% de compostos fenólicos; 0,5 - 1% de lípidos e 2 - 3% de cinzas (Bulut *et al.*, 2004).

Dada a elevada concentração em açúcares a polpa é usada como alimento energético para gado, mas a baixa quantidade em proteína e elevados níveis de polifenóis (Roseiro *et al.*, 1991b; Mendes *et al.*, 2007; Petit & Pinilla, 1994) limita o seu uso devido a baixa digestibilidade (Santos *et al.*, 2005).

Na nutrição humana, é também usada extensivamente como matéria-prima na produção de xaropes para a indústria alimentar (Roseiro *et al.*, 1991a; Santos *et al.*, 2005) e confecção de variados produtos incluindo doces, biscoitos e bebidas (Biner *et al.*, 2005; Bengoechea *et al.*, 2007).

A alfarroba é um adoçante natural com sabor e aparência semelhante à do chocolate, e é por isso usado muitas vezes como substituto do chocolate ou cacau (Yousif & Alghazawi, 1999; Santos *et al.*, 2005; Petit & Pinilla, 1994). A vantagem de usar a alfarroba em substituição do chocolate é o facto de a alfarroba ser livre de cafeína e teobromina (Bengoechea *et al.*, 2007). Na Europa existem alguns produtos comerciais usados como substitutos de cacau na confecção de bolos, barras de cereais, confetaria de chocolate, gelados e produtos light (Bengoechea *et al.*, 2007).

Os antioxidantes naturais presentes nas sementes e polpa têm potencial como novos produtos na indústria alimentar (Barracosa *et al.*, 2007; Barracosa *et al.*, 2008).

As vagens de alfarroba são também exploradas como matéria-prima na produção de bioetanol (Barracosa *et al.*, 2007; Barracosa *et al.*, 2008). Outras aplicações são como produtos farmacêuticos e extracção de açúcar (Petit & Pinilla, 1994).

A qualidade do fruto depende essencialmente do teor em sementes. O fruto das estirpes selvagens contém sementes relativamente maiores das que encontramos em estirpes cultivadas. Por outro lado, as empresas produtoras de xarope de alfarroba ou farinha de alfarroba preferem as estirpes cultivadas pois as vagens das estirpes cultivadas têm elevado teor em açúcar e são usadas extensivamente como matéria-prima na produção de xaropes, e conseqüentemente as empresas preferem estas estirpes (Biner *et al.*, 2005).

A domesticação de *C. siliqua* no Algarve promoveu a produção de frutos grandes com elevado teor em açúcares para a nutrição humana e animal de que resultou um número limitado de variedades. As principais variedades de alfarroba em Portugal são a "Mulata", "Galhosa", "Canela", "Spargale", "Aida", e "Lagoinha" (Barracosa *et al.*, 2007; Barracosa *et al.*, 2008).

A alfarroba tem uma importância económica significativa no Algarve, onde estão localizadas algumas empresas de transformação primária e secundária, que correspondem a 14% (40100 t) da produção anual a nível mundial, com tendência para aumentar devido à plantação de um elevado número de árvores nos últimos 10 anos (Barracosa *et al.*, 2007; Barracosa *et al.*, 2008).

1.3.3 Extracção de xaropes de alfarroba

O elevado teor em açúcar presente na polpa de alfarroba é facilmente extraído tornando este material apropriado para a produção de xaropes que podem ser usados como substratos em processos fermentativos (Roseiro *et al.*, 1991b; Mendes *et al.*, 2007).

A produção de açúcar de alfarroba pratica-se a nível industrial em Portugal mas apenas para uso em tecnologias não-fermentativas apesar de a alfarroba já ter sido usada em estudos de fermentação líquida, sólida e semi-sólida. Foi descrita a inibição devido à presença de ácido tânico e de polifenóis de baixo peso molecular, outras substâncias não foram referidas como biologicamente tóxicas. A inibição do crescimento bacteriano é normalmente associada com a presença de ácidos orgânicos em extractos vegetais (Roseiro *et al.*, 1991b).

Roseiro *et al.*, (1991a; 1991b) descrevem um processo de extracção simples realizada por contacto da alfarroba com água, produzindo assim xaropes ricos em açúcar. A extracção de açúcar a partir de alfarroba é um processo difusional em que o modo como a água é adicionada e a forma como o processo é realizado têm um efeito considerável no rendimento de extracção. A extracção dos açúcares segue um padrão onde se podem definir duas fases: a fase de solubilização durante a qual apenas os açúcares mais facilmente acessíveis são removidos, e uma fase difusional durante a qual a extracção está dependente da capacidade do processo em permitir a perfusão da água através da polpa. A fase difusional também está dependente de factores externos que afectam a extracção como o pH e temperatura. No entanto, Roseiro *et al.*, (1991b) referem que o uso de elevadas temperaturas leva à solubilidade de polifenóis que são inibidores do crescimento microbiano. Uma forma de evitar a solubilização de polifenóis é diminuindo a temperatura de extracção. Xaropes (extractos) obtidos abaixo dos 45 °C não apresentam um conteúdo significativo de polifenóis (menos de 20 g/L) dado que se mantêm insolúveis no resíduo. No entanto valores até 50 g/L podem ser obtidos a temperaturas de extracção acima dos 50 °C (Roseiro *et al.*, 1991b). A extracção de polifenóis é dependente na temperatura (Roseiro *et al.*, 1991b) mas por outro lado, o aumento da temperatura de extracção origina um aumento da quantidade de açúcar extraído (Roseiro *et al.*, 1991a).

1.3.4 Uso de sub-produtos industriais

A selecção de um substrato apropriado desempenha um papel importante no desenvolvimento de um processo de produção eficiente. Além da sua composição

química, o seu custo e disponibilidade são também considerações bastante importantes a ter em conta (Couto, 2008).

Na maioria dos processos comerciais documentados, a glucose é usada como fonte de carbono e energia, dado ser uma matéria-prima facilmente acessível para muitos processos fermentativos industriais. A glucose é normalmente obtida na forma de xaropes de glucose provenientes da hidrólise (química e enzimática) do amido de milho (Mendes *et al.*, 2007).

O elevado custo em matérias-primas pode ser drasticamente reduzido usando subprodutos vegetais como substratos (Couto, 2008).

A reutilização destes resíduos biológicos é de grande interesse dado que devido à legislação e razões ambientais, as indústrias são cada vez mais forçadas a encontrar usos alternativos para a sua matéria residual. Estes resíduos são ricos em açúcares que, devido à sua natureza orgânica, são facilmente assimilados por microrganismos. Isto torna estes materiais muito apropriados para a exploração como matéria-prima na produção de produtos industrialmente relevantes (Couto, 2008).

Os resíduos biológicos são abundantes e prontamente disponíveis. As indústrias alimentar, agrícola e florestal produzem grandes volumes de resíduos anualmente por todo o mundo, causando sérios problemas de eliminação desses resíduos. Isto é especialmente problemático em países em que a economia é grandemente dependente da agricultura e onde as produções de culturas são intensivas (Couto, 2008).

A escala do problema é facilmente ilustrada olhando para a quantidade total de matéria residual produzida por diferentes países. A Tabela 1.1 mostra uma lista de resíduos e suas quantidades produzidas mencionadas na literatura. Correntemente estes agro-resíduos ou são deixados a degradarem-se naturalmente ou são queimados. No entanto, são potenciais substratos para a conversão microbiana via fermentação de produtos de valor acrescentado.

O uso alternativo destes produtos é um método de gestão de resíduos eficaz e amigo do ambiente visto que, a sua eliminação representa um custo adicional às empresas de processamento e a eliminação directa em terrenos ou aterros causa sérios problemas ambientais (Couto, 2008). Por isso a investigação e desenvolvimento

de processos de valor acrescentado utilizando resíduos biológicos é altamente atractiva (Couto, 2008).

Tabela 1.1 Quantidade de resíduos vegetais produzidas anualmente em diferentes países (adaptado de (Couto, 2008)

País	Quantidade e tipo de resíduo
Alemanha, 1997	380 000 t - resíduos orgânicos do processamento de batata, vegetais e fruta 1 954 000 t – bagaço de cevada e lúpulo (cervejeiras) 1 800 000 t - bagaço de uva (vinicultura) 3 000 000 t – resíduos fibrosos (produção de açúcar) 100 000 t - bagaço de maçã húmido (≈25 000 t de bagaço de maçã seco) restam 400 000 t se as maçãs são processadas em sumo
Bélgica, 1992	105 000 t - bioresíduos (vegetais, jardins e fruta) 280 000 t - estimativas devido à legislação de separação de resíduos caseiros
Tailândia, 1993	Produção de óleo de palma: 386 930 t de resíduos de frutos, 165 830 t/a de fibra de palma prensada, 110 550 t/a restos de sementes de palma 1 000 000 - t polpa de mandioca
Espanha, 1997	>250 000 t - bagaço de azeitona
UE, 1996	14 000 000 t - polpa de beterraba (peso seco)
Portugal, 1994	14 000 t - bagaço de tomate
Jordânia, 1999	36 000 t - bagaço de azeitona
Malásia, 1996	Produção de óleo de palma: 2 520 000 t de fibra de palma, 1 440 000 t restos de sementes de palma, 4 140 000 t - resíduos de frutos
Austrália, 1995	400 000 t - casca de ananás
EUA	300 000 t - bagaço de uva, California 9525 t - bagaço de arando 200 000 t - casca de amêndoa 3 300 000 t - casca de laranja na Florida
Sarawak (Malásia), 2006	50 - 110 t/dia - sago hampas
Grécia, 2007	35 000 t - casca de citrinos (peso seco)

Estes resíduos biológicos podem ser usados como substratos para produzir produtos industrialmente relevantes como metabolitos, enzimas, ácidos orgânicos, aromas, polisacáridos, polímeros, antibióticos, biomassa etc., com grande vantagem económica. Assim, a cultura de microrganismos nestes resíduos ou subprodutos pode

ser um processo de valor acrescentado, convertendo materiais que de outro modo seriam considerados resíduos, em produtos valiosos (Couto, 2008).

Tem sido feita investigação no sentido de empregar extracto de alfarroba em processos de fermentação para produzir produtos de elevado valor acrescentado (Santos *et al.*, 2005).

Santos *et al.* (2005) estudaram a produção de dextrano de baixo peso molecular e frutose com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f) usando resíduos agro-industriais, entre os quais alfarroba. Mendes *et al.* (2007) demonstraram que o xarope de polpa de alfarroba poderá ser usado para a produção em larga escala de DHA (ácido docosahexaenóico) com *Cryptocodium cohnii* CCMP 316. Bulut *et al.* (2004) demonstraram claramente que é possível a produção de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* com subprodutos agrícolas baratos como a alfarroba. Os açúcares extraídos da vagem de alfarroba podem ser um substrato alternativo e mais barato que os açúcares comerciais (Bulut *et al.*, 2004).

Vários outros produtos industrialmente importantes tais como ácido cítrico, protease, tetraciclina, xantano etc., têm sido produzidos usando diferentes resíduos biológicos como substrato (Couto, 2008).

Apesar do xarope/extracto da polpa de alfarroba resultar de um processo de extracção prévio, este processo é fácil de executar do qual resulta um mínimo de resíduo (Mendes *et al.*, 2007).

Segundo Mendes *et al.* (2007) o xarope de polpa de alfarroba é um sub-produto barato da indústria da alfarroba com um preço estimado em 105 €/t, que o torna bastante competitivo em comparação com outras fontes de carbono.

O uso de extracto de polpa de alfarroba como substrato em fermentações de produtos de elevado valor acrescentado pode ser uma forma útil de dispor deste subproduto da indústria da alfarroba, reduzindo assim a quantidade de resíduos industriais, contribuindo para a protecção do ambiente (Mendes *et al.*, 2007).

Esta é uma questão ambiental determinante pois as empresas têm que lidar com os resíduos que produzem, sendo a reutilização uma solução óptima (Santos *et al.*, 2005), contribuindo também para a redução dos custos de produção (Couto, 2008).

Estes factores associados ao manuseio fácil, limpo e seguro do xarope de polpa de alfarroba, fazem deste material uma fonte de carbono promissora para a produção em larga escala (Mendes *et al.*, 2007)

1.4 Transferência de Massa de Oxigénio em Biorreactor

O arejamento é uma das limitações quando se opera com tecnologia convencional em condições de fermentação aeróbica (Lima-Costa *et al.*, 1997; Rols & Goma, 1991). O fornecimento de O₂ ao meio é um factor decisivo para o sucesso do *scale-up* de processos de produção biológicos e desempenha um papel importante na economia dos processos (Jia *et al.*, 1996; Elibol, 2001; Cascaval *et al.*, 2006) ao nível industrial e laboratorial (Elibol & Mavituna, 1998).

A eficiência do arejamento depende da solubilização do O₂ e da taxa de difusão nos meios que por sua vez afecta a capacidade do biorreactor em satisfazer a necessidade de O₂ da população microbiana (Cascaval *et al.*, 2006).

A baixa solubilidade do O₂ em meios aquosos limita a quantidade que pode ser introduzida e dissolvida no meio. A limitação ocorre quando o consumo de O₂ excede o seu fornecimento, resultando numa queda do nível de O₂ dissolvido abaixo da concentração crítica necessária ao metabolismo dos microrganismos (Elibol & Mavituna, 1995; Jianlong, 2000). Isto acontece especialmente quando os microrganismos estão presentes em grandes concentrações e em crescimento exponencial (Giridhar & Srivastava, 2000).

A oxigenação clássica através do contacto directo gás-líquido, está dependente da solubilidade do gás no líquido, da área interfacial e do coeficiente de transferência de massa gás-líquido (Rols & Goma, 1991).

1.4.1 Mecanismo de transferência de oxigénio

Para cada fluido de cada lado duma camada limite (ou interface), a força motriz para a transferência de massa pode ser expressa em termos de uma diferença de

concentração. Assim, a taxa de transferência de massa para uma interface é dada pela equação 1.1:

$$N_A = k_A \Delta C_A = k_A (C_{A0} - C_{Ai}) \quad (\text{eq. 1.1})$$

Onde N_A é a taxa de transferência de massa do componente A, k é o coeficiente de transferência de massa de A, “ a ” é a área interfacial de contacto por unidade de volume disponível para a transferência de massa, C_{A0} é a concentração do componente A no fluido e C_{Ai} é a concentração de A na interface (Doran, 1995).

A Figura 1.1 ilustra a situação na interface entre uma fase gasosa e uma fase líquida contendo o componente A. Assume-se que A é transferido da fase gasosa para a líquida. A concentração de A na fase líquida é C_{AL} e na sua interface é C_{ALi} . No gás, a concentração de A é C_{AG} na fase gasosa e C_{AGi} na interface.

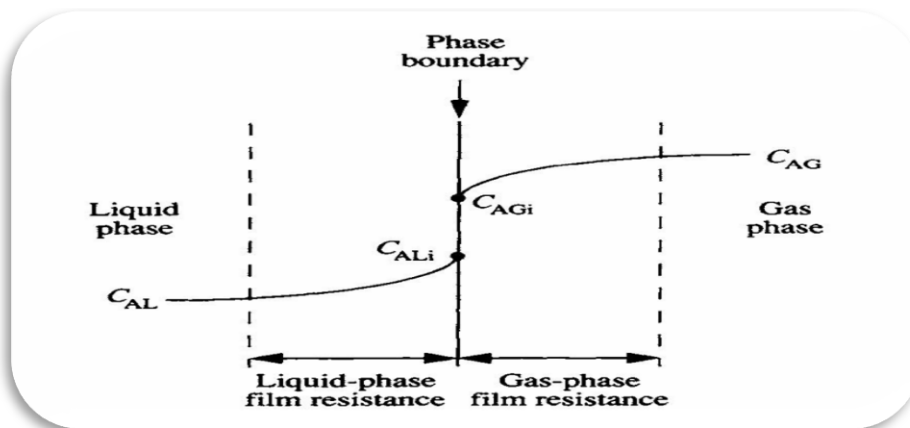


Figura 1.1 Gradientes de concentração para a transferência de massa gás-líquido (adaptado de Doran, 1995).

Da equação 1.1, a taxa de transferência de massa de A através da camada limite gasosa define-se pela equação 1.2:

$$N_{AG} = k_G a (C_{AG} - C_{AGi}) \quad (\text{eq. 1.2})$$

E a taxa de transferência de massa de A através da camada limite líquida é definida pela equação 1.3:

$$N_{AL} = k_L a (C_{ALi} - C_{AL}) \quad (\text{eq. 1.3})$$

Onde k_G é o coeficiente de transferência de massa da fase gasosa e k_L o coeficiente de transferência de massa da fase líquida (Doran, 1995).

Geralmente o fluxo de massa entre um gás e a fase líquida pode ser escrita da seguinte forma (equação 1.4):

$$N_A = K_L a (C^* - C_L) \quad (\text{eq. 1.4})$$

Onde K_L é o coeficiente de transferência de massa global da fase líquida, “a” área interfacial de contacto por unidade de volume disponível para a transferência de massa, C^* é a concentração de saturação do componente a difundir no líquido em equilíbrio com a fase gasosa e C_L é a concentração do componente dissolvido no meio.

O coeficiente de transferência de massa global da fase líquida, K_L , é definido por (equação 1.5):

$$\frac{1}{K_L a} = \frac{1}{m k_G a} + \frac{1}{k_L a} \quad (\text{eq. 1.5})$$

Em que “m” é o factor de distribuição.

Se A é pouco solúvel no líquido, como no caso do O_2 em água, a resistência à transferência de massa da fase líquida é dominante e $k_G a$ é muito maior que $k_L a$. O termo k_G é então desprezável, o que significa que $K_L a$ é aproximadamente igual a $k_L a$ (Doran, 1995).

Para medir experimentalmente valores de K_La a equação equação 1.4 pode ser escrita da seguinte forma (equação 1.6):

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) \quad (\text{eq. 1.6})$$

Onde K_L é o coeficiente de transferência de massa global da fase líquida, “a” é a área interfacial de contacto por unidade de volume disponível para a transferência de massa, C^* é a concentração de saturação do componente a difundir no líquido em equilíbrio com a fase gasosa e C_L é a concentração de gás dissolvido no meio ao longo do tempo t.

1.4.2 Métodos convencionais de aumentar a transferência de oxigénio

A transferência de massa de O_2 , descrita e analisada por meio do coeficiente de transferência de massa, k_La , é controlada pela solubilidade do O_2 nos meios e taxas de difusão e consumo. O k_La é afectado por vários factores tais como as características geométricas e operacionais dos reactores, a composição dos meios, tipo, concentração e morfologia dos microrganismos e propriedades de biocatalizadores (tamanho de partícula, porosidade etc.). Uma das condições essenciais para a optimização da transferência de O_2 é a redução do percurso da difusão de O_2 para os microrganismos ou seja, reduzir a espessura do filme que rodeia as bolhas e células (Cascaval *et al.*, 2006).

Os métodos convencionais para aumentar a transferência de O_2 da fase gasosa para a líquida, envolvem melhoramentos na geometria do biorreactor, tipos de agitadores e de dispersores, aumento da velocidade de agitação, aumento do caudal de arejamento, adição de ar enriquecido com O_2 (Jia *et al.*, 1996; Elibol, 2001; Lee & Kim, 2004) e aumento da pressão parcial de O_2 (Jianlong, 2000).

No entanto estes métodos nem sempre são eficientes nem economicamente viáveis podendo levar a consumos excessivos de energia e à formação de espuma no reactor (Liu & Wu, 2006), assim como a turbulência e o *stress* associados a elevadas

velocidades de agitação e caudais de arejamento são incompatíveis com culturas sensíveis e que apresentem alguma fragilidade (Jianlong, 2000; Cascaval *et al.*, 2006).

Outras soluções têm sido sugeridas envolvendo métodos não convencionais que atingem bons níveis de fornecimento de O₂.

Foram descritas aproximações biológicas ao arejamento dos reactores tais como a manipulação do metabolismo microbiano através de engenharia genética (Elibol & Mavituna, 1998; Elibol, 2001) ou o uso de *Gluconobacter oxydans* co-imobilizada com a alga fotossintética *Chlorella pyrenoidosa* (Jianlong, 2000; Lee & Kim, 2004). No entanto, neste último caso a produção de O₂ é limitada e a co-imobilização poderá causar inibição ou competição pelo substrato (Jianlong, 2000).

Outra alternativa é gerar O₂ quimicamente na fase aquosa através da adição de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) ao meio (Lee & Kim, 2004). Neste método o H₂O₂ é convertido em O₂ pela adição de catalase ou por microrganismos que expressem e produzam catalase, como por exemplo a *Gluconobacter oxydans* (Elibol & Mavituna, 1995). O oxigénio assim produzido está prontamente disponível para consumo. O lado negativo desta solução é a possível toxicidade do H₂O₂ para as células resultando em taxas de crescimento e rendimentos em biomassa menores (Jianlong, 2000; Giridhar & Srivastava, 2000; Liu & Wu, 2006).

1.4.3 Vectores de oxigénio

Outra possibilidade para aumentar o fornecimento limitado de O₂ é aumentar o valor global do coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La, por introdução de outro composto que modifique o meio de cultura de tal forma que este dissolva mais O₂. A adição de uma fase líquida não aquosa pode provocar um aumento significativo da taxa de transferência de O₂ da fase gasosa para o microrganismo sem a necessidade de aumentar a energia fornecida (Rols *et al.*, 1989; Elibol & Mavituna, 1998).

Estes compostos com solubilidades de O₂ maiores que a água são conhecidos por vectores de O₂.

Os vectores de O₂ podem desempenhar um papel importante nos processos fermentativos aeróbios. Os vectores têm sido alvo de bastante atenção em anos

recentes devido às suas capacidades de melhorar o rendimento dos processos e sua não toxicidade para as células. Com o uso de vectores de O₂, as taxas de transferência de O₂ podem ser aumentadas, o consumo de energia pode ser diminuído, evita-se a formação de espuma e o *stress* sobre as células diminui. Como resultado, as fermentações aeróbicas podem ser significativamente melhoradas (Wei & Liu, 1998).

Os vectores de O₂ são líquidos hidrofóbicos que podem ainda actuar como agentes surfactantes e diminuir a tensão superficial da água e aumentar a área interfacial específica (Jia *et al.*, 1997; Jianlong, 2000; Xu *et al.*, 2006).

Os vectores de O₂ são também soluções de baixo custo e baixa perigosidade, o que representa mais uma vantagem da sua aplicação em processos fermentativos (Zhang *et al.*, 2007).

De facto inúmeros investigadores têm usado vectores de O₂ com sucesso e como consequência aumentaram a concentração de biomassa, e assim, a performance de vários sistemas de cultura (Lopes *et al.*, 2008).

A solubilidade de O₂ nestes compostos é cerca de 10 - 20 vezes maior do que na água. Os vectores de O₂ em geral não apresentam toxicidade contra os microrganismos e em alguns casos podem ser usados como fonte de carbono e energia suplementar (Cascavalet *et al.*, 2006; Elibol, 2001).

Os principais vectores de O₂ usados em biotecnologia são hidrocarbonetos e perfluorocarbonetos (PFCs) (Lopes *et al.*, 2008; Rols *et al.*, 1989). Sendo também utilizados outros produtos como óleos vegetais (Rols & Goma, 1991; Lopes *et al.*, 2008) e de silicone (Cascaval *et al.*, 2006), adicionados também muitas vezes para controlo de espuma, ácido butírico (Lima-Costa *et al.*, 1997) e hemoglobina (Lee & Kim, 2004; Xu *et al.*, 2006).

Exemplos de hidrocarbonetos comuns usados como vectores de O₂ incluem n-hexadecano (Giridhar & Srivastava, 2000; Lai *et al.*, 2002; Liu & Wu, 2006), n-dodecano (Lai *et al.*, 2002; Liu & Wu, 2006), n-decano, n-hexano, hexano, nonano, decano, (Menge *et al.*, 2001), n-tetradecano (Lai *et al.*, 2002), n-heptano (Zhang *et al.*, 2007), n-dodecanol (Lima-Costa *et al.*, 1997) e tolueno (Liu & Wu, 2006).

Os perfluorocarbonetos são compostos sintetizados por substituição das moléculas de hidrogénio de hidrocarbonetos por flúor. Exemplos destes compostos são o *Foralkyl* (Martin *et al.*, 1995) e perfluordecalina. Os PFCs têm-se provado estáveis, química e biologicamente inertes e não tóxicos para as células (Elibol & Mavituna, 1995; Elibol & Mavituna, 1998; Elibol, 2001). Estudos com culturas de *Escherichia coli* e *Sacharomyces cerevisiae* com PFCs não tiveram nenhuns efeitos adversos no seu crescimento ou estrutura (King *et al.*, 1990).

Os PFCs estão em geral disponíveis comercialmente. Mas apesar de caros, estes podem ser facilmente recuperados até cerca de 95% do volume utilizado (Elibol & Mavituna, 1995; Elibol, 2001; Menge *et al.*, 2001).

Dos óleos utilizados como vectores de O_2 temos o óleo de soja (Jia *et al.*, 1996; Jia *et al.*, 1997; Lima-Costa *et al.*, 1997), óleo de milho (Lee & Kim, 2004) e compostos de silicone (Elibol & Mavituna, 1995; Lee & Kim, 2004).

Estes compostos não apresentam toxicidade para os microrganismos (Lee & Kim, 2004), mas um elevado nível de óleo tende a aumentar a viscosidade do meio de cultura e assim reduzir o seu coeficiente volumétrico de transferência de massa (Rols & Goma, 1991).

Os hidrocarbonetos são os compostos mais indicados para fermentações de grande escala devido ao seu preço mais reduzido em comparação com outros como a hemoglobina e perfluorocarbonetos (Giridhar & Srivastava, 2000; Xu *et al.*, 2006).

O uso de n-hexadecano e do n-dodecano são de grande potencial para vários processos de fermentação, particularmente naqueles fortemente dependentes da concentração de O_2 . Estes compostos são biologicamente inertes, não são tóxicos para os microrganismos, estão prontamente disponíveis comercialmente e podem ser reutilizados (Jianlong, 2000; Giridhar & Srivastava, 2000).

1.4.4 Modo de acção dos vectores de oxigénio

O coeficiente volumétrico de transferência de O_2 , $k_{L,a}$, é um dos parâmetros mais importantes nos processos fermentativos aeróbicos. Na presença duma só interface gás-líquido, a quantidade de O_2 transferida depende do valor de $k_{L,a}$ e da força motriz devida à diferença entre O_2 dissolvido e às condições saturantes. A transferência de O_2

numa dispersão gás-água é geralmente considerada controlada pelo líquido. A adição da fase do vector permite aumentar significativamente o coeficiente volumétrico de transferência de O_2 . Isto sugere que o vector actua sobre a interface gás-água ou na camada limite da água. No entanto, a adição de líquidos imiscíveis como os vectores de O_2 no meio de fermentação, complica obviamente o sistema do ponto de vista da transferência de O_2 (Rols *et al.*, 1989; Elibol & Mavituna, 1998; Lopes *et al.*, 2008).

Ao usar vectores de O_2 , estão presentes no reactor 4 fases: a fase gasosa, a fase líquida orgânica, uma solução aquosa e uma fase sólida (biomassa). Existirão assim novas áreas interfaciais e a transferência de O_2 das bolhas de gás para as células poderá ser feita através das seguintes 5 vias, ilustradas na Figura 1.2. (Rols *et al.*, 1989; Cascaval *et al.*, 2006).

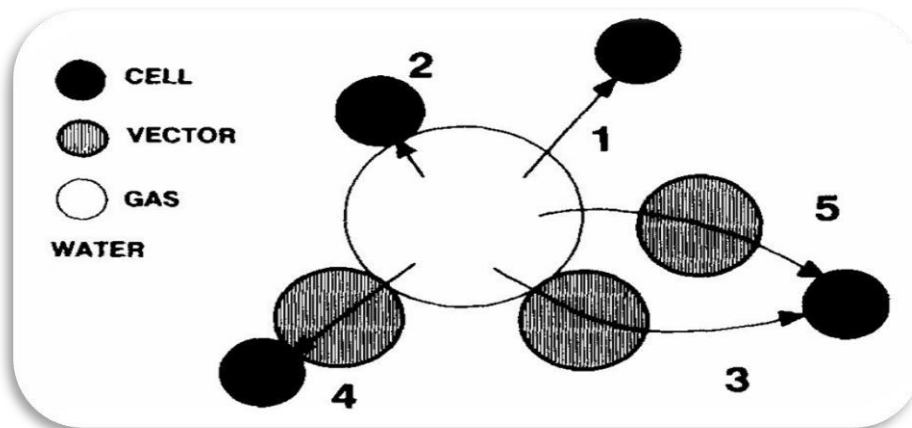


Figura 1.2 Vias possíveis para a transferência de O_2 das bolhas gasosas para os microrganismos na presença de um vector de O_2 . Os diâmetros médios vão de 0,5 a 5 μm para as células, 0,5 a 5 μm para as gotículas de vector de O_2 e 0,5 a 5 mm para as bolhas de gás (adaptado de Rols *et al.*, 1989).

Como se pode ver pela Figura 1.2, a transferência pode ocorrer directamente para as células ou através do vector de O_2 tanto adsorvido ou não à superfície das bolhas (Lopes *et al.*, 2008). As células poderão estar adsorvidas à superfície de bolhas ou às gotículas de vector. De entre os mecanismos de transferência de O_2 presentes e analisados na literatura para estes sistemas, o mais plausível assume que o vector é adsorvido à superfície das bolhas, com a formação ou não de um filme contínuo, e em que a difusão de O_2 do ar para os microrganismos ocorre através do vector de O_2 e depois através da fase aquosa ou directamente para as células adsorvidas às gotículas

de vector ou superfície do filme. As experiências indicaram que a principal resistência à transferência de O₂ é devido à difusão através da camada limite aquosa da interface da fase aquosa do vector, sendo a sua influência negativa contrariada tanto pelo aumento da área interfacial de transferência de O₂ como pela acumulação de O₂ na fase orgânica, que actua como reservatório de O₂. Por esta razão, o coeficiente de transferência de massa de O₂ correspondente ao filme aquoso, k_La, também poderá ser usado para descrever a transferência de O₂ nestes sistemas, sendo "a" a área interfacial gás-líquido (Rols *et al.*, 1989; Cascaval *et al.*, 2006).

O mecanismo implicado no aumento das taxas de transferência de O₂ ao usar hidrocarbonetos ou perfluorcarbonetos é a dispersão (*spreading*) do composto num filme fino na interface gás-líquido. O coeficiente que governa estes fenómenos é o *spreading coefficient*, definido como o espalhamento dum gota de óleo na superfície da água em equilíbrio termodinâmico, expressa pela equação 1.7 (Rols & Goma, 1991):

$$S_p = \sigma_{WG} - (\sigma_{OG} + \sigma_{OW}) \quad (\text{eq. 1.7})$$

Onde, σ_{ij} é tensão interfacial entre os componentes *i* e *j* (dynes/cm); G=gás, O=óleo e W=água;

Quando $S_p < 0$, o óleo irá formar gotículas flutuantes em forma de lente. Quando $S_p > 0$, o óleo irá espalhar-se na superfície da água (Rols & Goma, 1991).

O efeito da adição de vectores de O₂ também terá de ser relacionado com as características do meio. Em comparação com os meios simulados sem a fase sólida, a presença de biomassa afecta a transferência de O₂ pela modificação das características reológicas do meio e pela sua adsorção à superfície das bolhas de ar (Cascaval *et al.*, 2006).

2 Material e Métodos

2.1 Equipamentos

Nesta secção são descritos os principais equipamentos utilizados no decorrer deste trabalho experimental. Na Tabela 2.1 apresenta-se de forma breve a instrumentação, marca e modelo de cada equipamento.

Tabela 2.1 Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Descrição	Instrumentação	Marca, Modelo
Autoclavagem	Autoclave	Uniclave, 77; 87
Centrifugação	Centrífuga	Hettich Zentrifugen, Universal 320 Eppendorf, Centrifuge 5415 D
Cromatografia (HPLC)	Cromatógrafo de HPLC	VWR Hitachi Elite LaChrom
	Detector IR	L-2490
	Bomba	L-2130
	Forno	L-2300
Extracção	Auto-injector	L-2200
	Coluna	Merck KGaA, Purospher STAR NH2
	Banho quente com agitação	Julabo SW22
Fermentação	Biorreactor	Applikon Biotechnology, biorreactor de 3L
	Controlador	Applikon Bio Controller ADI 1010
Incubação	Consola	Applikon Bio Console ADI 1025
	Incubadora orbital	Neifo P Selecta Rotabit
Limpeza	Banho de ultrasons	P Selecta Ultrasons
Pesagem	Balança analítica	Precisa, XB 120 ^a
	Balança digital	Precisa, 2200 C IP65
Potenciometria	Medidor de pH	Crison, pH meter GLP 21; Basic 20
	Medidor de condutividade	Crison, micro CM 2202
Reologia	Viscosímetro	Brookfield, DV-II+ Pro Viscometer
Turbidimetria	Espectrofotómetro	Thermo Electron Corporation, Genesys 10vis
		Genesys 10UV scanning

2.2 Material Biológico e Meios de Cultura

2.2.1 Microrganismo

A estirpe PBC-1 de *Pantoea agglomerans* utilizada neste trabalho foi isolada originalmente no nosso laboratório da superfície de citrinos e é um eficaz agente de controlo biológico pós-colheita em citrinos e pomóideas.

2.2.2 Meios de cultura

Para estabelecer e manter as colónias de *P. agglomerans* foi utilizado o meio de cultura sólido NYDA. O crescimento das bactérias foi feito em meio de cultura líquido NYDB. Nos ensaios de crescimento e produção de biomassa utilizaram-se os meios SAC e meio Alfarroba.

O meio Alfarroba foi preparado antes de cada ensaio a partir de extracto de alfarroba fresco e/ou congelado. A composição dos meios usados no decorrer deste trabalho é apresentada na Tabela 2.2.

Todas as operações de manipulação dos meios foram realizadas de forma a preservar a esterilidade dos mesmos.

Tabela 2.2 Composição dos meios NYDA, NYDB, SAC, Glucose e Alfarroba.

Constituintes	Concentração (g/L)				
	NYDA	NYDB	SAC	Glucose	Meio Alfarroba
Caldo nutriente	8	8	---	---	---
Dextrose	10	10	---	5, 10, ou 15	---
Extracto de levedura	5	5	5	5	5
Agar	15	---	---	---	---
Sacarose	---	---	5	---	---
Extracto de Alfarroba	---	---	---	---	5, 10, 15 ou 20

Procedeu-se a uma repicagem regular de *P. agglomerans* em placas de meio NYDA, seguido de um período de incubação a 26 ± 1 °C durante 24 h. Estas culturas

foram conservadas em frigorífico a 4 °C, em placas invertidas e seladas com papel *Parafilm*.

Todo material utilizado para manipular culturas, assim como as soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Os meios de manutenção, crescimento e produção de biomassa foram autoclavados da mesma forma durante 15 minutos.

2.3 Condições de Crescimento

Os inóculos foram preparados a partir de culturas frescas de *P. agglomerans* PBC-1 repicadas em placas NYDA e incubadas com 24 h de antecedência a 26 ± 1 °C.

A partir de um riscado, suspendeu-se uma ansada de microrganismos em tampão fosfato (TF) esterilizado (pH 7,2), homogeneizou-se por agitação e transferiu-se 50 µl para balões Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio NYDB. Estes foram mantidos numa incubadora a 30 ± 1 °C com agitação orbital de 150 rpm, durante pelo menos 18 h. O pré-inóculo foi centrifugado a 4500 rpm durante 8 minutos e resuspendido o *pellet* em TF. Foi medida a transmitância (T) a 420 nm para determinar a concentração em unidades formadoras de colónia por mL (ufc/mL) presente. A correlação obtida entre %T (420 nm) e concentração de ufc/mL encontra-se no Anexo A (Figura A1).

Foi usado TF para fazer as diluições necessárias de modo a obter inóculos com uma concentração inicial de 1×10^5 ufc/mL para os ensaios em Erlenmeyer e 1×10^6 ufc/mL para os ensaios em biorreactor.

As manipulações de repicagem, inoculação e colheita de amostras foram sempre realizadas em câmara de fluxo laminar e/ou à chama.

2.3.1 Fontes de carbono

Além das fontes de carbono comerciais, como sendo a glucose e sacarose, foram realizados ensaios de crescimento em que se usou resíduos da indústria da alfarroba.

A matéria-prima para obter o extracto de alfarroba usado nas fermentações foi a polpa de alfarroba.

Os resíduos da indústria de processamento de alfarroba foram fornecidos por uma empresa local. As vagens foram recebidas na forma de pequenas partículas (*kibble*) com tamanho aproximado de 0,5 × 0,5 × 0,25 cm e moídas no laboratório.

2.4 Método de Extração de Açúcares a Partir de Alfarroba

Para determinar as condições ótimas de extração de açúcares a partir de vagens de alfarroba, foram testadas três temperaturas e tempos de extração diferentes.

Os extractos foram preparados homogeneizando 15 g de alfarroba moída e 135 mL de água destilada em Erlenmeyers de 500 mL. Os balões foram colocados num banho de água a 40, 60 e a 75 °C durante 1, 2 e 3 horas com agitação de 150 rpm. O extracto bruto assim obtido foi filtrado (\varnothing 0,45 μ m) a quente com bomba de vácuo e centrifugado a 4500 rpm durante 10min. O extracto de alfarroba foi analisado pelo método do DNS para quantificar os açúcares redutores (Manso T. *et al.*, 2007).

2.5 Ensaio de Crescimento com *P. agglomerans*

2.5.1 Ensaio de crescimento em Erlenmeyers

Estudou-se, em balões Erlenmeyer, o uso de extracto de alfarroba como fonte de carbono no crescimento e produção de biomassa de *P. agglomerans* PBC-1.

Foram realizadas fermentações em que o efeito da concentração das fontes de carbono foi estudada usando meio Alfarroba a 5, 10, 15 e 20 g/L (açúcares redutores), e como fonte de nitrogénio usou-se extracto de levedura (Yext) a 5 g/L. Os resultados obtidos foram comparados com os crescimentos usando glucose como fonte de carbono, nas mesmas concentrações. Foi estudado o efeito, em termos de toxicidade, da adição de vectores de O₂ no crescimento de *P. agglomerans* assim como, o crescimento em meios com diferentes pH.

Os ensaios realizaram-se em balões de 250 mL com 50 mL de meio de cultura, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min.

Os balões foram inoculados com células frescas de *P. agglomerans* PBC-1, com concentração inicial de 1×10^5 cfu/mL e incubados a 30 ± 1 °C com agitação orbital de 150 rpm. Foram recolhidas amostras periodicamente a cada 2 h.

A inoculação e recolha de amostras foi feita em câmara de fluxo laminar e/ou à chama de modo a manter as condições de assepsia.

Todos os ensaios em Erlenmeyer foram realizados em triplicado.

2.5.2 Ensaio de crescimento em reactor biológico mecanicamente agitado

Para os ensaios de produção de biomassa utilizou-se um biorreactor de 3 L (*BioBundle System, Applikon Biotechnology*) agitado mecanicamente e equipado com um agitador em hélice.

O arejamento do reactor foi feito através de um dispersor poroso com um fluxo de ar contínuo, esterilizado por uma membrana hidrofóbica *Millipore* de porosidade 0,2 µm e controlado por fluxímetro. Os gases efluentes passam por um condensador arrefecido com água, para minimizar perdas por evaporação, e são filtrados por uma membrana *Millipore* 0,2 µm.

O eléctrodo de pH foi calibrado antes de cada esterilização. A concentração de O₂ dissolvido (percentagem volumétrica) foi monitorizada com uma sonda polarográfica do tipo *Clark (Applikon Biotechnology)*. Após esterilização é necessário polarizar a sonda durante pelo menos 6 h e proceder à sua calibração. A calibração é feita arejando o meio até à saturação e estabelecendo o valor registado como 100% de O₂ dissolvido. A temperatura no reactor foi registada com uma sonda de temperatura e o aquecimento e manutenção da temperatura do meio foi feita por uma camisa de aquecimento termostaticada. A monitorização e controlo dos parâmetros de fermentação foram realizados através dos controladores *Bio Controller ADI 1010* e *Bio Console ADI 1025* e o registo feito com o *software* de aquisição de dados *BioXpert Lite, Applikon Biotechnology*.

O biorreactor foi esterilizado com o meio em autoclave a 121 °C durante 20 min.

O biorreactor foi inoculado com células frescas de *P. agglomerans* PBC-1 com uma concentração inicial de 1×10^6 cfu/mL, num volume útil de 2,5 L de meio Alfarroba 5 g/L (açúcares redutores) + 5 g/L Yext, com pH inicial ajustado a 7.

As fermentações foram realizadas à temperatura de 30 °C, com agitação inicial de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm. Adicionou-se antiespuma à razão de 100 µL/L. Foram recolhidas amostras periodicamente a cada 2 h.

A inoculação e recolha de amostras foram efectuadas à chama de forma a manter as condições de assepsia.

2.6 Parâmetros de Crescimento Celular

Para acompanhar e traçar a curva de crescimento de *P. agglomerans*, procedeu-se a uma avaliação quantitativa da evolução da concentração de células ao longo do tempo. Esta baseou-se na contagem de células viáveis e na análise espectrofotométrica da densidade óptica (DO) da cultura, e na taxa respiratória (TR) das bactérias.

2.6.1 Unidades formadoras de colónia

O número de células viáveis foi estimado pela técnica de contagem em placas. O inóculo obteve-se por diluições sucessivas em tubos de ensaio contendo 5 (diluir 50 µL de amostra) e 4,5 mL (diluir 500 µL de amostra) de tampão fosfato, correspondendo a uma diluição de 100 e 10 vezes, respectivamente. Após cada passo de diluição homogeneizou-se a suspensão por agitação. Aplicou-se um inóculo de 100 µL de suspensão de amostra diluída em cada placa e fez-se o espalhamento com ajuda de um espalhador de vidro. As placas foram devidamente identificadas, invertidas e colocadas a incubar a 26 ± 1 °C durante 24 h. Cada plaqueamento foi feito em duplicado.

Fez-se a contagem das colónias de cada placa e determinou-se a concentração de células em ufc/mL. Para que os resultados fossem considerados significativos as placas contáveis deveriam ter entre 30 a 300 colónias.

As acções de diluição e plaqueamento foram sempre realizadas em câmara de fluxo laminar e/ou à chama.

2.6.2 Densidade celular

O crescimento celular foi seguido por espectrofotometria no visível, medindo a densidade óptica das suspensões celulares no comprimento de onda de 640 nm. Embora este método não permita distinguir entre células viáveis e células mortas e não permitir obter directamente valores absolutos da concentração de células, é especialmente útil por ser rápido, e permitir acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da DO.

O espectrofotómetro foi calibrado com um branco constituído por meio de cultura não inóculado e fixada a absorvância a zero. Antes de cada leitura as amostras foram homogeneizadas por agitação.

2.6.3 Taxa respiratória

A taxa respiratória (TR) é um parâmetro de crescimento celular indirecto que exprime o consumo de oxigénio por unidade de volume útil de biorreactor e unidade de tempo. Determinou-se este valor seguindo a variação da concentração de oxigénio dissolvido (OD), medido a cada 10 segundos, após interrupção do arejamento até se atingir 25% de OD. O valor da taxa respiratória, que é dado pelo declive da recta obtida, representa a variação ao longo do tempo da concentração percentual de oxigénio dissolvido no meio fermentativo e exprime-se em $\mu\text{mol O}_2/\text{L}\cdot\text{min}$.

O cálculo da TR foi realizado considerando que a solubilidade de O_2 em água a 30 °C e à pressão de 1 atm é 251,56 $\mu\text{mol O}_2/\text{L}$ (Doran, 1995).

2.7 Métodos Analíticos

2.7.1 Quantificação dos açúcares redutores - Método do DNS

A quantificação dos açúcares redutores foi efectuada através do método do ácido 3, 5-dinitrossalicílico, vulgarmente conhecido como método do DNS.

Este método baseia-se na redução do ácido 3, 5-dinitrossalicílico (DNS) a 3-amino-5 nitrossalicílico por acção dos açúcares redutores que dá origem a um complexo acastanhado, que é doseado colorimetricamente no comprimento de onda a 540 nm.

A 1 mL de cada amostra foi adicionado 1 mL do reagente DNS. Após agitação, colocou-se num banho a 100 °C durante 5 min. Arrefeceu-se e adicionaram-se 10 mL de água destilada. Agitou-se novamente e procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm.

Para converter os valores de absorvância em concentração de açúcares redutores expressa em miligramas por mililitro recorreu-se a uma recta de calibração.

A curva padrão obtida, relaciona as duas grandezas tendo por base a leitura da absorvância a 540 nm de soluções de glucose, com um intervalo de concentrações de 0 - 1 mg/mL (ver Anexo A - Figura A2). Para as diferentes soluções de glucose o procedimento é o mesmo, substituindo as amostras por 1 mL das soluções.

As amostras recolhidas para quantificação pelo método do DNS foram centrifugadas a 8000 rpm durante 8 minutos e analisou-se o sobrenadante. Cada ensaio foi efectuado em triplicado.

2.7.2 Análise de açúcares por HPLC

Os açúcares foram analisados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) constituído por um sistema cromatográfico *VWR Hitachi Elite LaChrom* munido com um detector IR *L-2490*, uma bomba *L-2130*, forno *L-2300*, auto-injector *L-2200* e uma coluna *Purospher STAR NH2* da *Merck KGaA*. Utilizou-se como eluente uma solução de 75% acetonitrilo e 25% água miliQ. O caudal de operação foi de 1 mL/min e o volume de amostra injectado foi de 20 µL. A temperatura do forno e do detector usada foi de 25 °C.

Todas as amostras recolhidas para serem analisadas por HPLC foram centrifugadas a 4500 rpm durante 15 minutos, filtradas a 0,45 µm de diâmetro de poro e congeladas em tubos eppendorf de 1,5 mL. Antes de analisadas, estas amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm durante 3 minutos e filtradas directamente para

os *vials* do sequenciador automático com filtros de seringa PTFE de 13 mm e 0,22 µm de poro.

Os dados foram analisados recorrendo ao programa de aquisição e integração *EZChrom Elite*, versão 3.1.7 da *Scientific Software, Inc.* com base nas rectas de calibração obtidas previamente para frutose, glucose e sacarose (ver Anexo **A** - Figuras A5 até A7). Para obter estas rectas, prepararam-se cinco soluções padrão destes açúcares com concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 g/L e determinaram-se as áreas correspondentes recorrendo ao software referido, a partir das quais se correlacionou as concentrações dos açúcares presentes. Os tempos de retenção médios para as soluções padrão foram, para a frutose 5,7 minutos, glucose 6,2 minutos e sacarose 8,2 minutos.

2.7.3 Quantificação dos fenóis

A quantidade de fenóis libertada para o meio de cultura foi determinada por espectrofotometria directa a um comprimento de onda de 270 nm (Anselmo *et al.*, 1989). Esta análise UV é baseada na propriedade de absorção máxima a 270 nm, característica dos compostos aromáticos.

A concentração de fenóis foi calculada através da correlação linear entre diferentes diluições de fenol e respectivas absorvâncias, que constituíram a recta padrão utilizada. Esta recta foi obtida por leitura da absorvância a 270 nm de soluções de fenol com um intervalo de concentrações de 0 - 50 µg/mL (ver Anexo **A** - Figura A3). Cada ensaio foi realizado em triplicado.

A leitura das absorvâncias das amostras foi realizada em cuvete de quartzo adequada ao espectrofotómetro, após centrifugação a 4500 rpm durante 10 minutos de forma a remover a biomassa presente.

2.7.4 pH

O valor de pH das amostras, soluções e meios foi medido directamente com um medidor *Crison GLP 21* ou *Crison Basic 2*. Durante as fermentações em biorreactor, o pH foi monitorizado com um eléctrodo de pH próprio e calibrado antes de cada

esterilização. Todos os eléctrodos foram calibrados com soluções tampão *Crison* à temperatura ambiente.

Para ajustar o pH do meio Alfarroba foram utilizadas soluções de ácido acético 0,3 M e de NaOH 0,1 M.

2.7.5 Condutividade

A leitura da condutividade das amostras foi efectuada directamente com um medidor *Crison micro CM 2202*, logo após recolha das mesmas. O medidor foi calibrado com uma solução padrão *Crison* à temperatura ambiente.

2.8 Transferência de Massa de Oxigénio

2.8.1 Método Dinâmico

O coeficiente volumétrico de transferência de massa global - K_La - mede a resistência que uma fase líquida oferece à dispersão das bolhas de ar e à transferência de oxigénio para o meio e conseqüentemente, células. Assim, é importante conhecer a forma como este parâmetro varia em diferentes condições operacionais como agitação, arejamento e natureza do meio. Devido à dificuldade de estimar o K_La em biorreactores através de correlações, os coeficientes volumétricos de transferência de massa para o oxigénio são normalmente determinados experimentalmente (Doran, 1995).

O K_La foi determinado através do método dinâmico, também conhecido por “*gassing-out method*”. O método consiste em duas fases, uma primeira de desoxigenação total do meio contido no biorreactor, através do borbulhamento com azoto e uma segunda fase de arejamento contínuo do meio com ar. Nesta fase, procede-se ao registo periódico do aumento na concentração de oxigénio dissolvido.

Todos os ensaios foram feitos em biorreactor de 3 L, usando um volume útil de 2,5 L. A entrada de ar no reactor foi feita através de um dispersor poroso e os caudais de ar foram controlados por um fluxímetro. A concentração de O_2 dissolvido (% volumétrica) foi monitorizado com uma sonda polarográfica do tipo *Clark* e, registada

minuto a minuto através do *software* de aquisição de dados *BioXpert Lite, Applikon Biotechnology*.

Os diferentes meios estudados foram água, dispersão aquosa de n-hexadecano 0,5 e 1% (v/v) e dispersão aquosa de n-dodecano 0,5, 1 e 5% (v/v). As condições de agitação estudadas foram 100, 150, 200 e 300 rpm com arejamentos de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm (300, 400 e 500 mL/min, respectivamente). Os agitadores testados foram um agitador em hélice e uma turbina Rushton.

Foram determinados os K_{La} dos diferentes meios nas várias combinações de agitação, arejamento e tipo de turbina.

Por aplicação da equação 2.1, é possível determinar o valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio global, K_{La} .

$$\frac{dC_L}{dt} = K_{La} (C_E - C_L) \quad (\text{eq. 2.1})$$

Em que, C_L é a concentração de oxigénio dissolvido no meio; C_E é a concentração de oxigénio saturante a temperatura e pressão constantes, e t é o tempo.

Em condições de oxigenação saturante (100% O_2) e integrando a equação 2.1, esta adquire a forma,

$$\ln(100 - C_L) = -K_{La} \cdot t \quad (\text{eq. 2.2})$$

O valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa é traduzido pelo declive da recta $\ln(100 - C_L)$ vs. t , e é expresso em t^{-1} .

Este método pode ser aplicado a sistemas biológicos *in vivo*, desde que não se proceda à desoxigenação com a corrente de azoto. É também utilizado para estimar o valor do K_{La} no final das fermentações.

2.8.2 Vectores de Oxigénio

Escolheram-se os hidrocarbonetos n-hexadecano e n-dodecano para serem estudados a nível da transferência de O₂ e posteriormente estudar a influência dos vectores de O₂ no crescimento de biomassa de *P. agglomerans*.

Os vectores de oxigénio foram adquiridos comercialmente na Merck. Na Tabela 2.3 estão algumas das propriedades físicas mais relevantes do n-hexadecano e do n-dodecano.

Tabela 2.3 Propriedades dos vectores de oxigénio n-hexadecano e n-dodecano em comparação com a água.

Tipo de Vector de O ₂	Solubilidade de O ₂ (mg/L)	Densidade (20 °C) (kg/dm ³)	Peso Molecular (g/mol)	Fórmula Molecular
n-hexadecano >99%	50,4 (35 °C)	0,773 - 0,774	226,45	C ₁₆ H ₃₄
n-dodecano >99%	54,9 (35 °C)	0,748 - 0,749	170,34	C ₁₂ H ₂₆
Água	≈ 8 (25 °C)	1,000	18,02	H ₂ O

2.9 Caracterização Reológica

A caracterização das propriedades reológicas das suspensões celulares microbianas foi realizada com um viscosímetro *Brookfield DV-II+ Pro Viscometer*.

A viscosidade foi determinada em amostras de 16 mL à temperatura ambiente, utilizando um adaptador UL (*UL Adaptor*) para medições em fluidos de baixa viscosidade. Foram determinados valores de tensão de corte e velocidade de corte para velocidades de *spindle* entre 10 e 200 rpm, com intervalos de 10 rpm. Na Tabela 2.4 encontram-se as principais dimensões do adaptador UL.

As leituras foram feitas logo após a amostra ser colocada no recipiente do adaptador, de modo a evitar a sedimentação das células. O tratamento dos dados foi efectuado recorrendo ao software *Rheocalc* (versão 2.4).

Tabela 2.4 Principais dimensões do adaptador UL.

Comprimento Efectivo do <i>Spindle</i> (mm)	Comprimento Real do <i>Spindle</i> (mm)	Diâmetro (mm)	Diâmetro Interno da Câmara (mm)
92,39	92,74	25,15	27,62

Nota: O comprimento efectivo inclui a correcção para o efeito da extremidade do *spindle* e deve ser usado para os cálculos manuais utilizando equações velocidade de corte/tensão de corte.

O comportamento reológico do caldo fermentativo foi ajustado ao modelo de *Ostwald-de Waele* ou Lei da Potência (equação 2.3):

$$\tau = K\gamma^n$$

(eq. 2.3)

onde, K é o índice de consistência do fluido (Ns^n/m^2), e n é o índice de comportamento do fluido (adimensional).

Quando $n > 1$, o fluido caracteriza-se como dilatante, quando $n = 1$ o fluido é Newtoniano e para $n < 1$, o fluido diz-se pseudoplástico (Doran, 1995).

3 Resultados e Discussão

3.1 Coeficiente Volumétrico de Transferência de Massa

Com a finalidade de estudar as melhores condições de transferência de massa em reactor, determinaram-se os coeficientes volumétricos de transferência de oxigénio para diferentes hidrocarbonetos em solução aquosa, na ausência de células, utilizando o método dinâmico.

Os valores de $K_L a$ foram determinados para a dispersão aquosa de n-hexadecano 0,5 e 1% (v/v) e dispersão aquosa de n-dodecano 0,5, 1 e 5% (v/v) num biorreactor de 3 L agitado mecanicamente e comparou-se com os valores determinados para a água. Foram testadas diferentes condições de operação, variando as velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm. Este parâmetro foi caracterizado nas várias condições operacionais de agitação e arejamento usando um agitador em hélice e uma turbina Rushton. Em todos os ensaios foi usado um dispersor de ar poroso.

3.1.1 Influência do tipo de agitador e da velocidade de agitação no $K_L a$

Os agitadores normalmente usados em fermentações são classificados em axiais e radiais, dependendo do tipo de correntes de convecção que originam. No caso dos agitadores axiais, as correntes de fluido são paralelas ao eixo do agitador. Os agitadores radiais produzem correntes de convecção que se deslocam do agitador para as paredes laterais do biorreactor. Os agitadores em hélice são agitadores de elevada velocidade que promovem o movimento axial do fluido, mas não são apropriados para elevadas viscosidades. Habitualmente, são usados em operações de pequena escala (Atkinson & Mavituna, 1991). As turbinas Rushton são agitadores radiais, que atingem velocidades de rotação moderadamente elevadas e baixa potência consumida. São recomendadas para aplicações em que é importante a combinação da dispersão de gás com a agitação intensa (Atkinson & Mavituna, 1991).

Na Tabela 3.1 encontram-se os valores de K_{La} determinados nos vários meios estudados utilizando um agitador em hélice e uma turbina Rushton a diferentes velocidades de agitação, com um caudal de arejamento de 0,12 vvm.

Tabela 3.1 Valores de K_{La} determinados, pelo método dinâmico, em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice e uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12 vvm.

Arejamento 0,12 vvm							
	Agitação (rpm)	Água	K_{La} (h^{-1})				
			Hexadecano 0,5%	Hexadecano 1%	Dodecano 0,5%	Dodecano 1%	Dodecano 5%
Hélice	100	4,00	4,00	5,10	5,07	4,02	5,12
	150	3,84	4,03	4,71	4,95	4,12	5,13
	200	5,33	4,18	5,18	5,80	4,23	5,83
	300	6,52	5,47	2,60	2,76	3,40	6,38
Rushton	100	3,81	3,61	3,46	3,57	4,47	---
	150	4,00	3,74	3,62	3,94	4,84	---
	200	4,51	5,56	5,33	4,09	5,96	---
	300	5,53	4,51	3,98	8,86	18,74	---

De uma forma geral os valores de K_{La} tendem a aumentar com o aumento da agitação. A excepção a esta tendência é notória para a velocidade de agitação mais elevada de 300 rpm, nomeadamente para o n-hexadecano 1%, n-dodecano 0,5 e 1% (v/v), no caso dos valores obtidos com o agitador em hélice, e para o n-hexadecano 0,5 e 1% (v/v) no caso da turbina Rushton, com os K_{La} a descerem após terem atingido o seu valor máximo.

Apesar dos K_{La} serem semelhantes na maioria das condições testadas para ambos os agitadores, a 300 rpm, a turbina Rushton permitiu obter valores bastante mais elevados com os meios contendo n-dodecano. A 300 rpm obtiveram-se os valores máximos de K_{La} de 8,86 e 18,74 h^{-1} , para n-dodecano 0,5 e 1% (v/v) respectivamente. Enquanto que os valores mais elevados obtidos com o agitador em hélice foram de 6,52 e 6,38 h^{-1} em água e n-dodecano 5% (v/v) respectivamente.

Representando graficamente para o caso do agitador em hélice, podemos verificar pela Figura 3.1 que o K_{La} mantém um aumento gradual com o aumento da

agitação, exceptuando a diminuição verificada para 300 rpm. Para a turbina Rushton também se verifica uma linearidade semelhante com o aumento da agitação exceptuando para a velocidade de 300 rpm, em que se observa um grande aumento dos valores de K_La dos meios com n-dodecano (Figura 3.2).

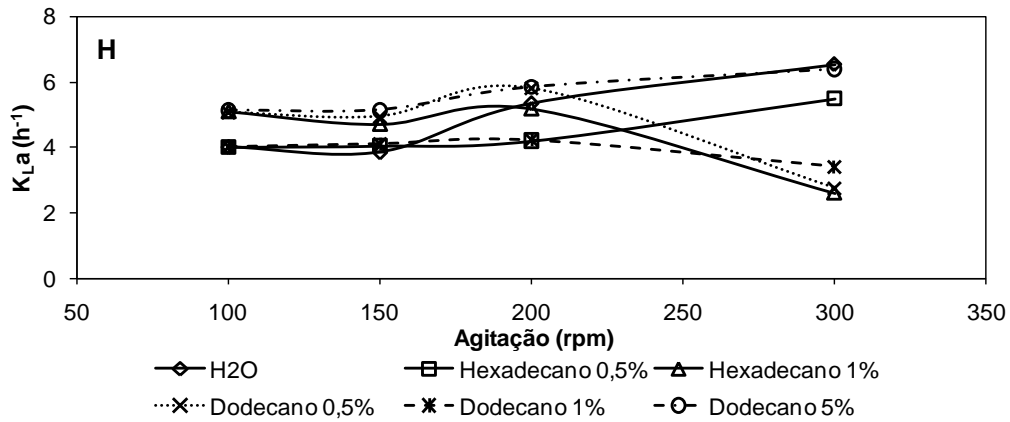


Figura 3.1 Variação dos K_La determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12 vvm.

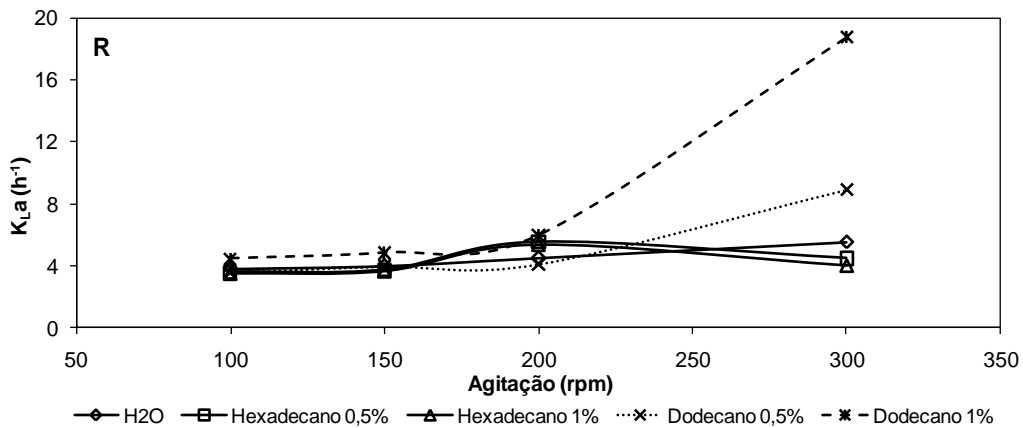


Figura 3.2 Variação dos K_La determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12 vvm.

Na Tabela 3.2 estão registados os valores de K_{La} determinados nos diferentes meios estudados utilizando um agitador em hélice e uma turbina Rushton para diferentes velocidades de agitação e para um caudal de arejamento de 0,16 vvm.

Tabela 3.2 Valores de K_{La} determinados, pelo método dinâmico, em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice e uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,16 vvm.

Arejamento 0,16 vvm							
	Agitação (rpm)	Água	K_{La} (h^{-1})				
			Hexadecano 0,5%	Hexadecano 1%	Dodecano 0,5%	Dodecano 1%	Dodecano 5%
Hélice	100	5,27	4,95	5,27	4,58	4,91	5,76
	150	5,21	4,92	5,38	4,28	5,86	7,24
	200	5,62	5,39	5,68	4,78	7,03	8,31
	300	7,60	6,88	4,39	1,17	11,84	18,71
Rushton	100	5,33	4,10	4,03	4,75	5,85	---
	150	5,47	4,72	4,45	5,23	6,02	---
	200	6,16	5,69	4,87	5,79	6,60	---
	300	7,47	4,85	6,55	10,03	19,00	---

Analisando a Tabela 3.2 continua a verificar-se a tendência dos valores de K_{La} em aumentar com o aumento da velocidade de agitação. Também se continua a verificar uma diminuição do K_{La} para 300 rpm em certos meios, após terem atingido o seu valor máximo, mas desta vez apenas para o n-hexadecano 1% e n-dodecano 0,5% (v/v) no caso do agitador em hélice, e em n-hexadecano 0,5% (v/v) no caso da turbina Rushton. Contudo a 300 rpm também se atingiram os valores máximos de K_{La} de 18,71 h^{-1} em n-dodecano 5% (v/v) com o agitador em hélice e de 19,00 h^{-1} em n-dodecano 1% (v/v) com a turbina Rushton.

Verifica-se que houve um aumento do K_{La} nos meios com n-dodecano em comparação com o caudal de 0,12 vvm. Isto sugere que o aumento do caudal para 0,16 vvm permitiu um aumento na transferência de O_2 .

A representação gráfica dos valores obtidos com o agitador em hélice pode ser vista na Figura 3.3. Verifica-se o mesmo tipo de comportamento, linearidade entre o K_{La} e o aumento da agitação verificado com o caudal de 0,12 vvm, igualmente com o

decréscimo a 300 rpm em alguns meios. Observou-se um aumento significativo para os meios com n-dodecano, sendo evidente que o meio com n-dodecano 5% (v/v) atinge os valores mais elevados em todas as condições de operação. Na Figura 3.4 são apresentados os valores obtidos com uma turbina Rushton e observa-se que a linearidade do K_La com a agitação se mantém parecida com a verificada com o caudal de 0,12 vvm. A descida a 300 rpm neste caso apenas se verifica no meio com n-hexadecano 0,5% (v/v). Continua também bastante evidente o aumento dos K_La dos meios com n-dodecano.

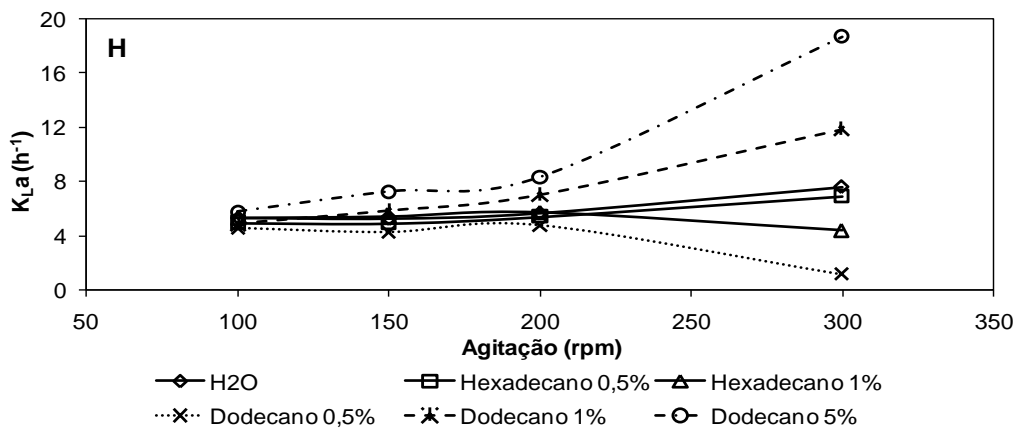


Figura 3.3 Variação dos K_La determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,16 vvm.

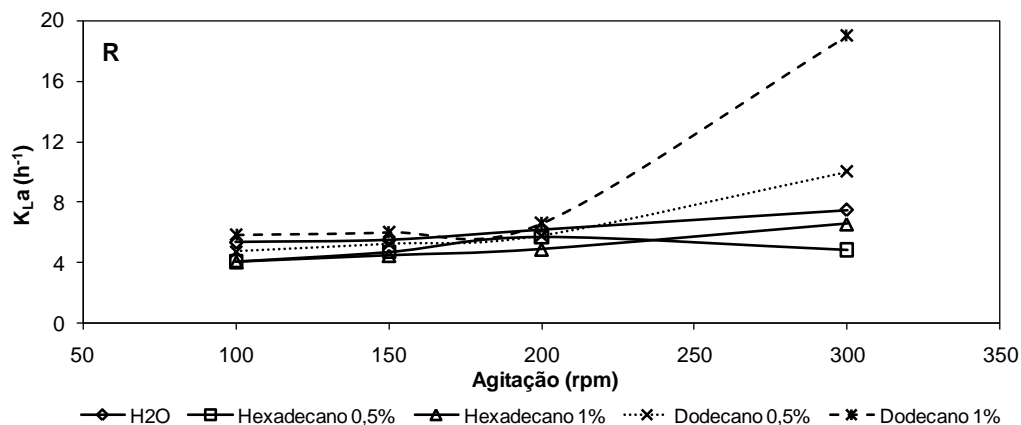


Figura 3.4 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,16 vvm.

Os valores K_{La} determinados nas mesmas condições de operação mas com um caudal de arejamento de 0,20 vvm encontram-se apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Valores de K_{La} determinados, pelo método dinâmico, em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice e uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,20 vvm.

Arejamento 0,20 vvm							
	Agitação (rpm)	Água	K_{La} (h^{-1})				
			Hexadecano 0,5%	Hexadecano 1%	Dodecano 0,5%	Dodecano 1%	Dodecano 5%
Hélice	100	6,55	5,16	5,71	6,05	7,36	8,56
	150	6,76	4,99	6,49	5,75	6,88	9,22
	200	7,24	5,30	7,11	6,22	7,49	10,58
	300	9,86	7,68	5,03	3,61	9,19	13,69
Rushton	100	6,66	5,35	4,78	6,56	6,73	---
	150	6,82	5,58	5,15	6,74	7,21	---
	200	7,53	8,09	5,70	7,61	8,80	---
	300	9,44	6,54	5,78	17,10	33,80	---

Podemos verificar pela análise da Tabela 3.3 que o aumento do caudal para os 0,20 vvm permitiu obter no global os valores de K_{La} mais elevados. Verifica-se também a mesma tendência dos valores de K_{La} em aumentar com o aumento da velocidade de

agitação e a diminuição destes a 300 rpm nos meios n-hexadecano 1% e n-dodecano 0,5% (v/v) para o agitador em hélice e n-hexadecano 0,5% (v/v) para a turbina Rushton.

Os valores de K_{La} mais elevados continuam a verificar-se nos meios com n-dodecano para qualquer dos agitadores usados. No entanto, houve uma ligeira descida destes valores máximos para o caso do agitador em hélice, a 300 rpm, com o dodecano a 1 e 5 % (v/v) relativamente ao caudal de arejamento de 0,16 vvm. A turbina Rushton permitiu atingir um valor máximo de K_{La} de $33,80 \text{ h}^{-1}$ no meio aquoso de n-dodecano 1% (v/v) contra um máximo de $13,69 \text{ h}^{-1}$ atingido com o agitador em hélice em n-dodecano 5% (v/v).

A mesma linearidade entre os valores de K_{La} e a agitação mantém-se para o agitador em hélice (Figura 3.5). A descida a 300 rpm é evidente para os meios n-hexadecano 1% e n-dodecano 0,5% (v/v), assim como continua a destacar-se o meio n-dodecano 5% (v/v) com os valores mais elevados de K_{La} em todas velocidades de agitação. Também se verifica o mesmo tipo de comportamento observado anteriormente para o caso da turbina Rushton (Figura 3.6). A descida dos valores de K_{La} à velocidade de 300 rpm continua a ser evidente nos meios com n-hexadecano enquanto nos meios com n-dodecano os valores de K_{La} continuam a aumentar de forma bastante notória.

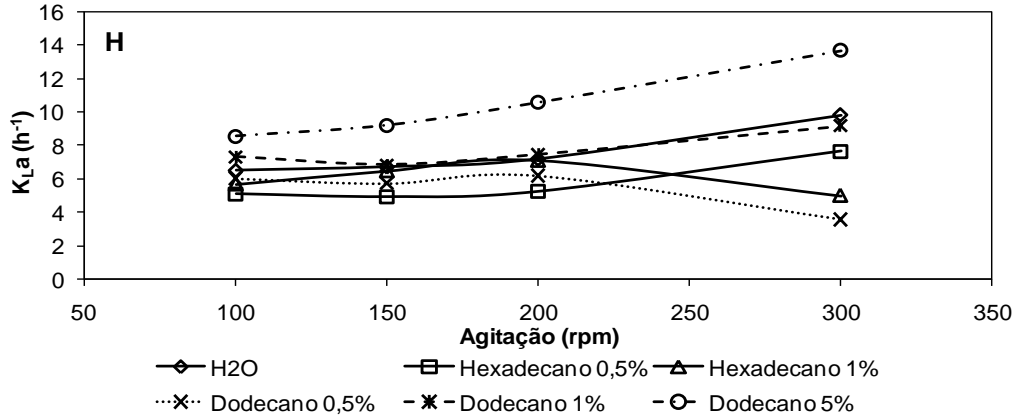


Figura 3.5 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,20 vvm.

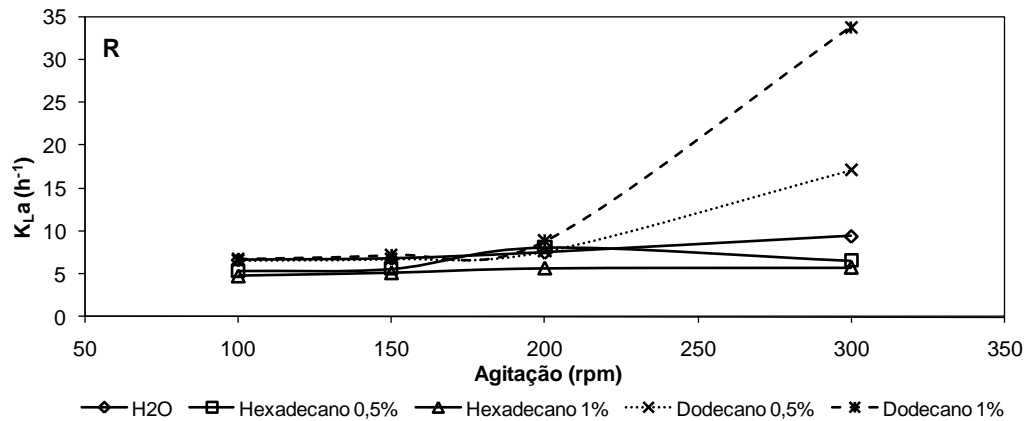


Figura 3.6 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, para velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,20 vvm.

O K_{La} aumentou de uma forma global com o aumento da agitação para ambos os agitadores utilizados. Para os caudais de arejamento testados, observou-se igualmente lineariedade deste coeficiente para as velocidades de agitação de 100, 150 e 200 rpm. A 300 rpm, no caso dos meios aquosos de n-hexadecano, a perda de

linearidade é observada pela descida dos valores de K_{La} , enquanto para os meios com n-dodecano observa-se um aumento dos valores de K_{La} .

Isto poderá ser devido ao facto do agitador em hélice, onde este efeito é mais pronunciado, ao promover o movimento axial do fluido associado à forte agitação induzida, provocar a desestabilização das gotículas formadas pelo vector de oxigénio, desfavorecendo a transferência de massa de oxigénio, visível nos valores de K_{La} obtidos.

Apesar de os valores de K_{La} estarem fortemente dependentes de factores tais como a geometria do biorreactor e composição dos meios usados, estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores (Jia *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2008) no qual o K_{La} apresentou um comportamento semelhante quando determinado igualmente na presença de n-hexadecano e n-dodecano.

Este comportamento não está ainda bem elucidado mas algumas experiências no comportamento reológico deste tipo de emulsões parecem indicar que na região de quebra da linearidade existe um incremento da viscosidade aparente que pode afectar as taxas de transferência de O_2 (Jia *et al.*, 1997; Rols *et al.*, 1989; Rols & Goma, 1991; Jianlong, 2000). Dados experimentais indicam que a adição de n-dodecano aumenta consideravelmente a taxa de transferência de O_2 para o meio e contraria o efeito negativo da elevada viscosidade aparente (Cascaval *et al.*, 2006), o que corrobora a tendência destes resultados.

A concentração de vector de O_2 também influencia fortemente o valor de K_{La} . Para baixas concentrações de vector, o K_{La} aumenta de forma linear, enquanto para concentrações elevadas o K_{La} aumenta de forma mais pronunciada, atingindo valores máximos, como se verificou para o caso do n-dodecano.

3.1.2 Influência do arejamento no K_{La}

Assim como o aumento da velocidade de agitação analisada anteriormente, é de interesse analisar a forma como o arejamento afecta o K_{La} nos diferentes meios. Como seria de esperar, pela análise das tabelas e figuras do ponto 3.1.1, constatou-se que para além do efeito da agitação, os valores de K_{La} determinados aumentaram gradualmente com o aumento do caudal de arejamento de 0,12 até aos 0,20 vvm.

Nas Figuras 3.7 à 3.10 podemos ver as representações gráficas da variação dos $K_{L,a}$ em função do arejamento para as velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm, determinados para os vários meios estudados.

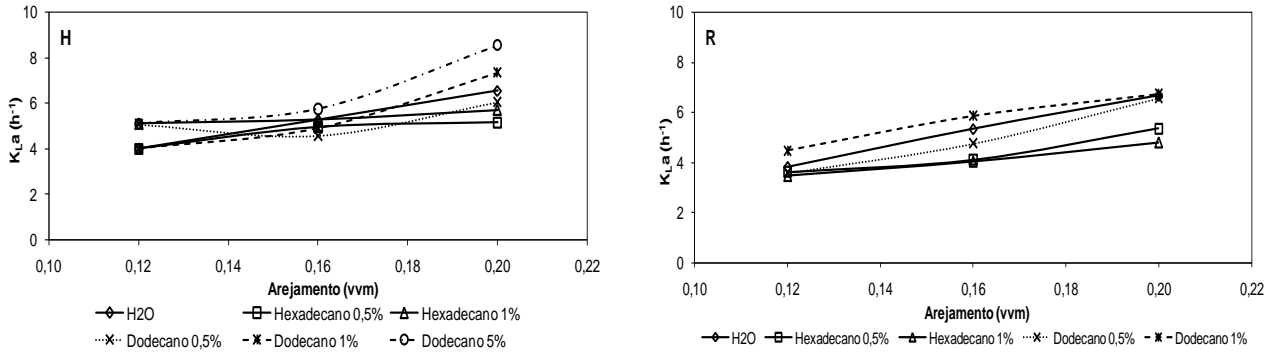


Figura 3.7 Variação dos $K_{L,a}$ determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreator de 3 L com um agitador em hélice (H) e uma turbina Rushton (R), para arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm e agitação de 100 rpm.

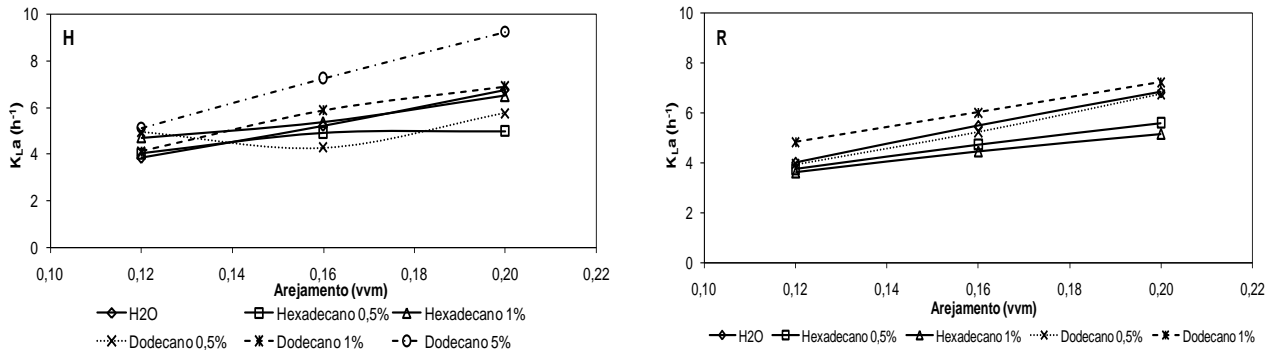


Figura 3.8 Variação dos $K_{L,a}$ determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreator de 3 L com um agitador em hélice (H) e uma turbina Rushton (R), para arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm e agitação de 150 rpm.

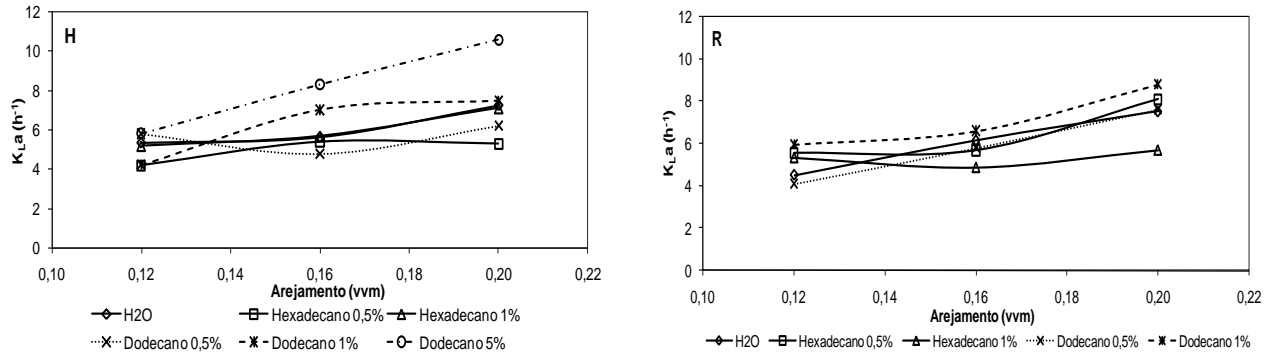


Figura 3.9 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice (H) e uma turbina Rushton (R), para arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm e agitação de 200 rpm.

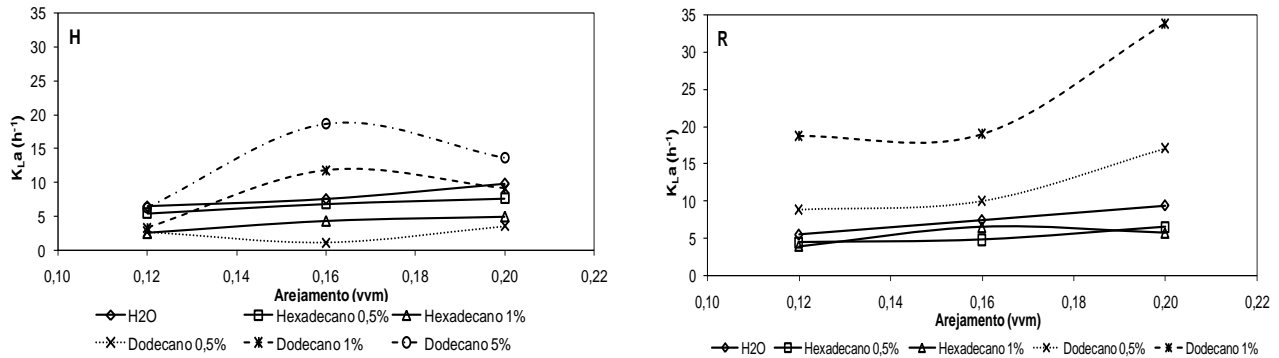


Figura 3.10 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em diferentes meios aquosos em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice (H) e uma turbina Rushton (R), para arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm e agitação de 300 rpm.

Com a análise destas figuras (Figuras 3.7 à 3.10) podemos ver que existe uma forte tendência para a linearidade na variação dos valores de K_{La} com o aumento do caudal de arejamento. Tal como se verificou para a variação do K_{La} em função da agitação, vemos que são os valores obtidos em água que apresentam a maior linearidade em todas as condições de operação testadas, o que torna a água um excelente meio para comparação. Os meios com n-dodecano são os que apresentam valores mais elevados de K_{La} em todos os gráficos correspondentes ao agitador em hélice e turbina Rushton, com a excepção do meio n-dodecano 0,5% (v/v) no caso do agitador em hélice, que apresenta uma diminuição do K_{La} . No caso dos meios com

n-hexadecano, verificamos que estes aumentam de uma forma linear com o caudal de arejamento, apresentando, em quase todos os casos, valores mais baixos relativamente aos obtidos com água.

O agitador em hélice promove um movimento axial do fluido. Neste tipo de fluxo, o fluido é impulsionado de forma descendente até ser reflectido pelo fundo do tanque. O fluido espalha-se pelo fundo e ascende pelas paredes, retornando depois ao agitador. Os agitadores axiais proporcionam fortes correntes verticais dentro dos tanques (Doran, 1995). A turbina Rushton é um agitador que produz um movimento radial do fluido. O líquido movimenta-se radialmente a partir do agitador contra as paredes do vaso, dividindo-se em duas correntes, uma segue em direcção ao topo do vaso, enquanto a outra corrente segue em direcção à base do reactor (Doran, 1995).

Estas diferenças poderão estar na origem do aumento do K_La nos meios com n-dodecano à velocidade de 300 rpm, em todos os caudais de arejamento, com a turbina Rushton, em contraste com os valores menores atingidos com o agitador em hélice.

As instabilidades hidrodinâmicas induzidas pelo aumento da turbulência devido às fortes correntes verticais provocada pela elevada velocidade de agitação e pelas colisões entre bolhas e gotículas de vector sugere que haja interrupção do filme líquido superficial e a remoção das gotículas de vector da superfície das bolhas o que poderá afectar negativamente a transferência de O_2 no agitadore em hélice.

Constata-se que o vector de O_2 que produziu os melhores resultados foi o n-dodecano. Este vector de oxigénio foi o que apresentou melhor comportamento, nas diferentes condições testadas (agitação, arejamento e tipo de agitador), com excepção a 300 rpm, como já foi dito, atingindo os valores máximos de K_La nas concentrações 1 e 5% (v/v).

Os valores de K_La obtidos com o n-hexadecano não foram claros quanto ao seu efeito como vector de oxigénio. Embora se verifique o aumento deste coeficiente com a agitação e o caudal de arejamento, por vezes os valores obtidos são inferiores aos obtidos com água, como se pode observar na Tabela 3.3, para o n-hexadecano a 1% (v/v). Uma possível explicação para a ocorrência destes resultados poderá ser o

n-hexadecano formar com a água uma emulsão heterogénea, com a formação de um filme à superfície, que dificulte e desestabilize a transferência de massa de oxigénio.

Com base nos resultados anteriores, o n-dodecano apresentou melhores condições de transferência de oxigénio do que o n-hexadecano no seio de um biorreactor agitado mecanicamente e com arejamento forçado. Este vector de O₂ apresenta uma promissora potencialidade de utilização como vector de oxigénio em culturas microbianas. Contudo, torna-se necessário verificar o seu nível de toxicidade celular e no futuro a avaliação da segurança alimentar associada à sua aplicação na produção de agentes de controlo biológico.

3.2 Ensaio de Toxicidade dos Vectores de O₂

Foram efectuados ensaios de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 com adição dos vectores de O₂, n-hexadecano e n-dodecano, de forma a analisar os seus efeitos tóxicos na bactéria.

Os ensaios realizaram-se em balões de 250 mL com 50 mL de meio SAC e meio SAC com n-hexadecano e n-dodecano 1% (v/v). Os balões foram inoculados com células frescas de *P. agglomerans*, à concentração de 1×10^5 cfu/mL e incubados a 30 ± 1 °C com agitação orbital de 150 rpm.

O crescimento celular, seguido por plaqueamento e estimativa do número de células viáveis e pela variação da absorvância a 640 nm, encontra-se representado na Figura 3.11. Foram também determinadas as respectivas taxas específicas de crescimento, μ_g , e taxas específicas de morte celular, k_d .

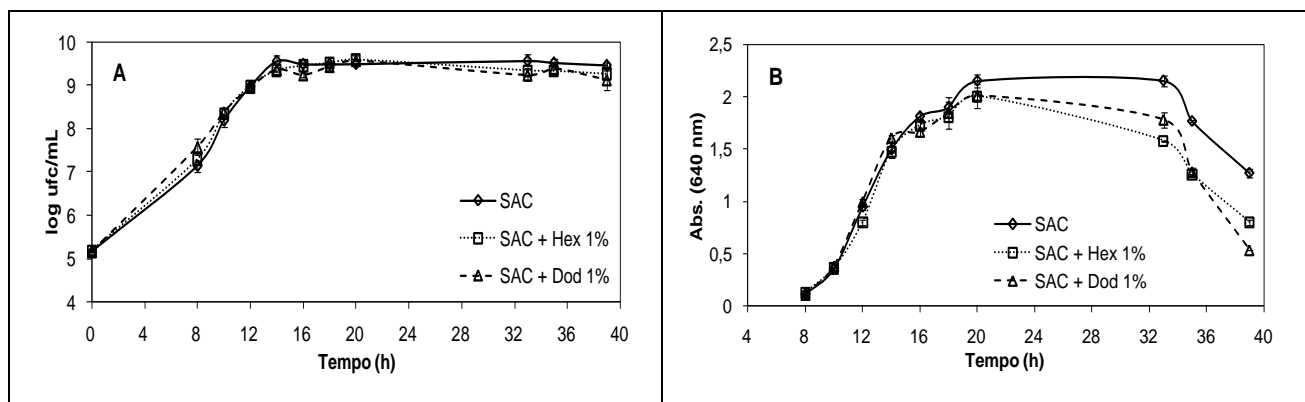


Figura 3.11 Influência da adição de vectores de oxigénio no perfil de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1, expresso em log ufc/mL (**A**) e absorvância a 640 nm (**B**), crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio SAC 5 g/L e meio SAC 5 g/L suplementado com n-hexadecano e n-dodecano 1% (v/v). Valores médios \pm desvio padrão (n=3).

Por observação dos perfis de crescimento celular da Figura 3.11, verifica-se que as curvas de crescimento são semelhantes entre si.

Nos perfis de crescimento expressos em log ufc/mL correspondentes aos meios suplementados com os vectores de O₂, não há qualquer diminuição ou efeito negativo no crescimento de *P. agglomerans* e as curvas não se afastam da curva controlo contendo apenas meio SAC (gráfico **A** da Figura 3.11). Verifica-se ainda um crescimento bastante elevado em todos os meios, atingindo-se concentrações na ordem de 1×10^9 ufc/mL.

Os perfis de crescimento, expressos pelas absorvâncias a 640 nm (gráfico **B** da Figura 3.11), apresentam um comportamento idêntico até ao final da fase exponencial, que ocorre por volta das 20 h de cultura. Após este período, as culturas com os vectores de O₂ apresentam uma diminuição no crescimento em relação ao controlo SAC. Esta queda no crescimento é mais acentuada no meio com n-hexadecano do que no meio com n-dodecano até próximo das 32 h de fermentação, a partir das quais o declínio no meio com n-dodecano é mais pronunciado.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos efectuados com adição de vectores de O₂, em que os autores demonstraram que estes compostos não eram limitantes no crescimento celular (King *et al.*, 1990; Lee & Kim, 2004; Lopes *et al.*, 2008;).

Apesar de não se verificar nenhum efeito adverso com a adição dos vectores de O₂, também não se evidencia nenhum efeito no sentido de aumentar o crescimento causado por um possível aumento da transferência de O₂. Uma possível razão para não se ter observado um aumento do crescimento, influenciado pela transferência de O₂, é o facto da *Pantoea agglomerans* ser uma *Enterobacter*, sendo aeróbia facultativa. Outra razão plausível é, nos balões Erlenmeyer, existir uma baixa razão superfície de líquido/volume de líquido e os vectores não serem dispersos eficientemente no meio, devido a uma deficiente agitação promovida pela agitação orbital, formando assim uma emulsão, o que afecta a transferência de O₂.

Na Tabela 3.4 encontram-se os valores das taxas específicas de crescimento (μ_g), taxas específicas de morte celular (k_d) e concentrações máximas em ufc/mL determinados neste ensaio de crescimento.

Os valores das taxas específicas de crescimento das culturas SAC e SAC + Hex 1% são semelhantes, enquanto que no meio SAC + Dod 1% atinge um máximo de 0,26 h⁻¹. As taxas específicas de morte celular variaram entre 0,13 h⁻¹, para o ensaio em meio SAC + Hex 1% e 0,20 h⁻¹ para o meio SAC + Dod 1%. As concentrações em ufc/mL obtidas foram da mesma ordem de grandeza entre os diferentes meios, chegando ao máximo de 4,0×10⁹ no meio SAC + Hex 1%.

Tabela 3.4 Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g), taxas específicas de morte celular (k_d) e concentrações máximas em ufc/mL determinados no ensaio de toxicidade dos vectores de O₂.

Ensaio	μ_g (h ⁻¹)	k_d (h ⁻¹)	Concentração máxima (ufc/mL)
SAC	0,24	0,14	3,7×10 ⁹
SAC + Hex 1%	0,22	0,13	4,0×10 ⁹
SAC + Dod 1%	0,26	0,20	3,8×10 ⁹

Estes ensaios demonstram que o uso dos vectores de O₂ n-hexadecano e n-dodecano 1% (v/v) não apresenta efeitos inibitórios ou tóxicos para as células e que podem ser adicionados aos meios de crescimento de *P. agglomerans* sem efeitos adversos. Apesar da semelhança dos perfis de crescimento e da concentração máxima

de ufc/mL atingida, a adição do n-dodecano 1% (v/v) destaca-se por atingir a taxa específica de crescimento mais elevada.

Estes resultados, associados aos obtidos com o estudo de transferência de O₂ no ponto 3.1, justificam a escolha do n-dodecano 1% (v/v) para ser usado no estudo de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor.

3.3 Extracção de Açúcares de Sub-Produtos da Indústria da Alfarroba

Realizou-se a extracção de açúcares a partir de sub-produtos da indústria com vista à utilização destes como fonte de carbono, visando a produção de biomassa a baixo custo, factor importante na implementação de um processo de produção de um agente de controlo biológico.

Optou-se pela utilização de sub-produtos da indústria de alfarroba devido a esta ser uma das indústrias predominantes na região do Algarve. O elevado teor em açúcares (40 - 60%), a facilidade de acesso à matéria-prima e o facto de permitir explorar um sub-produto das indústrias locais, constituem uma grande vantagem na escolha da sua utilização.

Para determinar as melhores condições de extracção de açúcares a partir de vagens de alfarroba, foram avaliadas temperaturas e tempos de extracção diferentes (40, 60 e 75 °C durante 1, 2 e 3 horas). A partir do extracto obtido foi quantificado a concentração de açúcares redutores (glucose e frutose) pelo método DNS. As diferentes concentrações de açúcares obtidas pelas diferentes condições de extracção estão representadas na Figura 3.12.

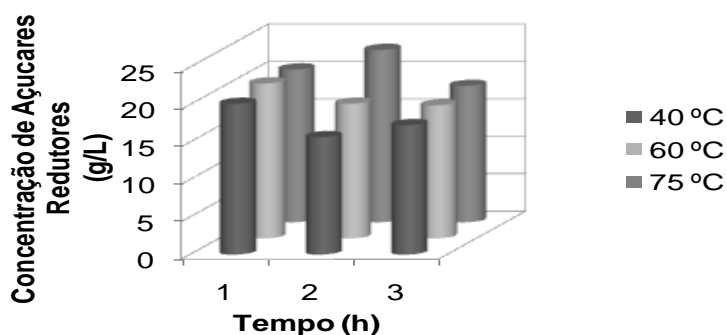


Figura 3.12 Concentração dos açúcares redutores presentes no extracto de alfarroba obtido com diferentes tempos e temperaturas de extracção.

A literatura disponível e os trabalhos preliminares nesta área, sugerem que o processo de extracção de açúcares a partir de alfarroba segue duas etapas: uma de solubilização, durante a qual apenas os açúcares mais facilmente acessíveis são removidos e uma etapa difusional, durante a qual a extracção está dependente da capacidade do processo em permitir a perfusão da água através da polpa. Esta segunda fase está também dependente de factores externos como o pH e a temperatura (Roseiro *et al.*, 1991b).

Pela análise da Figura 3.12 observamos que o tempo de extracção não influenciou o rendimento da extracção, inclusive a quantidade de açúcares extraídos ao fim de 1 h é superior ao obtido após 2 e 3 h. O efeito da temperatura é mais evidente e constata-se que o aumento da temperatura de extracção origina um aumento da quantidade de açúcar extraído. Este efeito está de acordo com os resultados obtidos por Roseiro *et al.*, (1991b) na extracção de açúcares a partir de alfarroba.

As concentrações de açúcares redutores mínimas e máximas variaram entre os 15 e 23 g/L.

Com base nestes resultados optou-se pelas condições de extracção de 2 h a 75 °C, sendo estas as condições que maximizam a extracção dos açúcares redutores.

Todos os extractos utilizados na constituição dos meios Alfarroba foram extraídos nestas condições de extracção e assumindo uma concentração inicial de açúcares redutores de ≈ 20 g/L.

Contudo, o extracto obtido apresentou uma coloração intensa o que dificultou a leitura da densidade óptica através das absorvâncias, nos ensaios subsequentes. Isto poderá ter sido causado pela presença de fenóis. Segundo Roseiro *et al.*, (1991a; 1991b) a presença de fenóis está fortemente dependente da temperatura. O uso de temperaturas elevadas durante a extracção de açúcares leva à solubilização de fenóis, que além de intensificarem a cor, podem ser prejudiciais ao crescimento microbiano no extracto obtido (Roseiro *et al.*, 1991a).

De forma a contornar esta questão, Manso *et al.*, (submetido) procedeu à optimização do processo de extracção a baixas temperaturas.

3.4 Crescimento em Erlenmeyer do Agente de Controlo Biológico em Meio Glucose e Meio Alfarroba

Antes de se proceder ao estudo de crescimento da cultura de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor mecanicamente agitado, efectuaram-se ensaios preliminares em Erlenmeyer de forma a otimizar as condições de crescimento com o meio Alfarroba.

Estudou-se o efeito do extracto de alfarroba como fonte de carbono em comparação com a glucose e extracto de levedura e optimizou-se a concentração de extracto de alfarroba no crescimento de *P. agglomerans* em Erlenmeyer. Foram realizadas fermentações com meio com glucose à concentração de 5, 10 e 15 g/L, com meio apenas com extracto de levedura a 5g/L e ainda com meio Alfarroba a 5, 10 e 15 g/L de açúcares redutores (AçR). O meio Alfarroba foi assim denominado dado que, até este ponto do trabalho, a quantificação de açúcares no extracto de alfarroba foi realizada pelo método DNS, quantificando apenas os açúcares redutores.

Os ensaios realizaram-se em balões de 250 mL com 50 mL de meio, inoculados com células frescas de *P. agglomerans* PBC-1, à concentração inicial de 1×10^5 cfu/mL e incubados a 30 ± 1 °C com agitação orbital de 150 rpm.

Na Figura 3.13 são apresentados os crescimentos do agente de controlo biológico cultivado em Erlenmeyer com glucose (gráfico **A**), extracto de levedura (gráfico **B**) e meio Alfarroba (gráficos **C** e **D**), a diferentes concentrações.

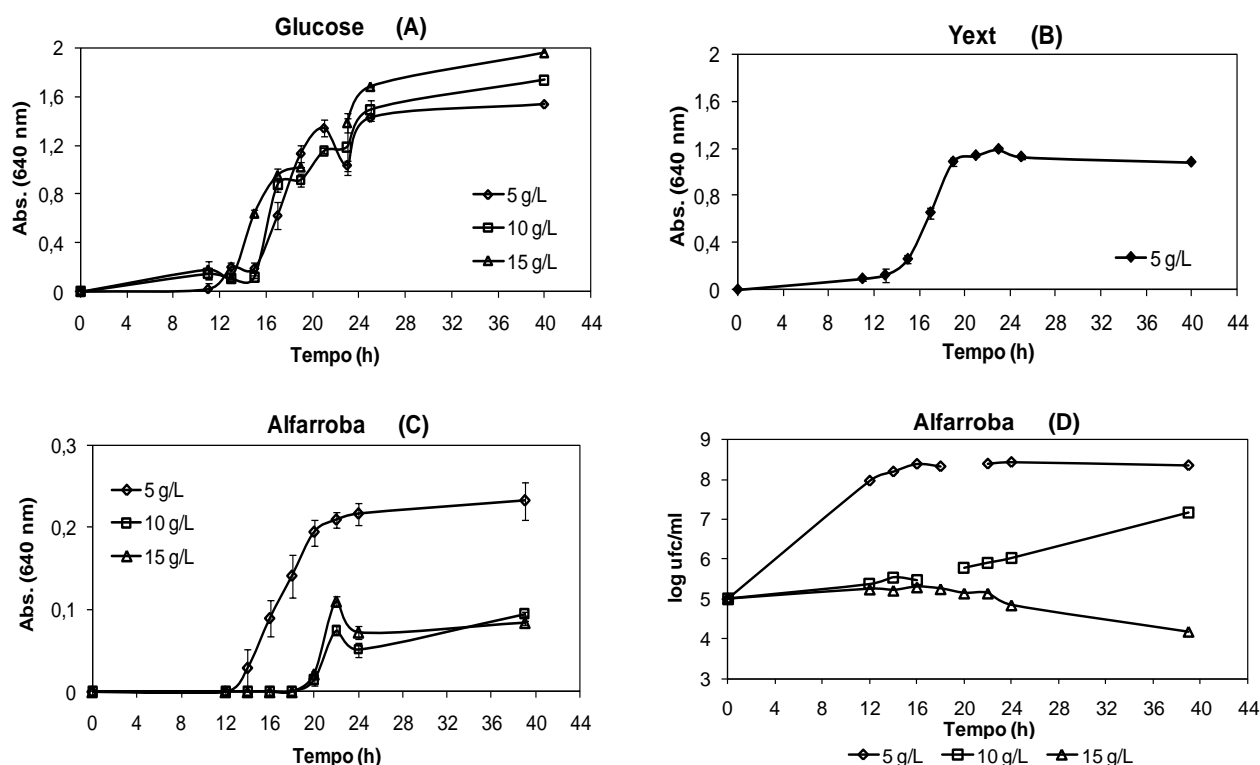


Figura 3.13 Perfis de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm com diferentes concentrações de glucose (A), apenas com extracto de levedura (B) e com diferentes concentrações de meio Alfarroba, expressos em absorvância a 640 nm (C) e expressos em log UFC/mL (D). Valores médios \pm desvio padrão (n=3).

Observando o gráfico A da Figura 3.13, verificamos que as três concentrações de glucose testadas são adequadas ao crescimento de *P. agglomerans*. Na glucose a 5 e 10 g/L a fase de latência é mais prolongada, com uma duração de 15 h, enquanto que a 15 g/L a fase de latência é ligeiramente mais curta, tendo uma duração de 13 h. Os perfis de crescimento nas diferentes concentrações estudadas apresentam-se semelhantes durante a fase exponencial, até próximo das 24 h. A partir desse tempo evidencia-se uma diferenciação no crescimento de *P. agglomerans*, a 5 g/L o crescimento é menor do que a 15 g/L.

O gráfico B da Figura 3.13 representa o crescimento do agente de controlo biológico apenas em extracto de levedura. Verificamos que existe crescimento da bactéria neste meio na ausência de fonte de carbono, no entanto este crescimento é

limitado. A fase de latência tem uma duração de 13 h, seguindo-se a fase exponencial até às 19 h, sendo o crescimento bastante menor em comparação com os crescimentos em glucose.

Na Figura 3.13 **C** são apresentados os perfis de crescimento de *P. agglomerans* crescida em meio com alfarroba. Como seria de esperar, os crescimentos em meio Alfarroba deveriam ter sido semelhantes aos conseguidos em glucose e superiores aos atingidos em extracto de levedura, devido a alfarroba ser uma fonte rica em açúcares. No entanto, tal como se verifica na Figura 3.13, as curvas de crescimento em meio Alfarroba, expressas em absorvância a 640 nm (gráfico **C**), apresentam um crescimento bastante reduzido. Analisando a Figura 3.13 **D**, que apresenta o crescimento de *P. agglomerans* em meio Alfarroba expresso em log ufc/mL, observa-se que houve crescimento celular em todas as concentrações. No meio com 5 g/L de extracto de alfarroba, o crescimento de *P. agglomerans* é elevado, atingindo concentrações na ordem de 1×10^8 ufc/mL, valores que se situam na gama do obtido em produções com fontes de carbono comerciais (Costa *et al.*, 2002). Nos meios a 10 e 15 g/L o crescimento é bastante inferior. Até cerca das 18 h de fermentação os crescimentos em meio Alfarroba a 10 e 15 g/L são semelhantes, atingindo concentrações pouco superiores a 1×10^5 ufc/mL. A partir das 18 h o crescimento a 10 g/L aumenta até ao final da fermentação, enquanto a 15 g/L há uma diminuição no número de células viáveis.

O facto de o crescimento não ser visível através das leituras das absorvâncias (Figura 3.13 **C**), é devido ao procedimento de extracção, desenvolvido neste trabalho, para obtenção do extracto de alfarroba. A extracção realizada a elevada temperatura, 75 °C, além de extrair elevado teor em açúcares, tem a desvantagem de extrair também elevadas quantidades em fenóis, que na preparação e esterilização do meio Alfarroba o escurecem, produzindo uma cor acastanhada escura. Esta coloração poderá ter interferido com a leitura correcta da absorvância, fazendo com que não fosse possível seguir correctamente o crescimento de *P. agglomerans*.

Na Tabela 3.5 podemos observar as taxas específicas de crescimento celular e concentrações máximas em ufc/mL obtidas nestes ensaios. A taxa específica de

crescimento mais elevada conseguida no meio Glucose, foi de $0,20 \text{ h}^{-1}$ na concentração de 5 g/L . No extracto de levedura atingiu-se uma taxa de crescimento semelhante de $0,21 \text{ h}^{-1}$. De todos os ensaios, foi no meio Alfarroba a 5 g/L que se obteve a taxa específica de crescimento mais elevada, $0,25 \text{ h}^{-1}$, não sendo possível calcular para as outras concentrações. O máximo de concentração de biomassa atingido em meio Alfarroba também se verificou no meio na concentração de 5 g/L , onde se conseguiu um crescimento de $2,8 \times 10^8 \text{ ufc/mL}$.

Tabela 3.5 Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g) e concentração máxima em ufc/mL determinados no ensaios de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 150 rpm em glucose, extracto de levedura e meio Alfarroba.

	Glucose (g/L)			Yext (g/L)	Alfarroba (g/L)		
	5	10	15	5	5	10	15
$\mu_g \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,20	0,16	0,15	0,21	0,25	---	---
Concentração máxima (ufc/mL)	---	---	---	---	$2,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$

Na Figura 3.14 é apresentado o perfil de consumo da fonte de carbono por *P. agglomerans* ao longo dos ensaios em que foram usados meios com glucose, obtida por análise em HPLC.

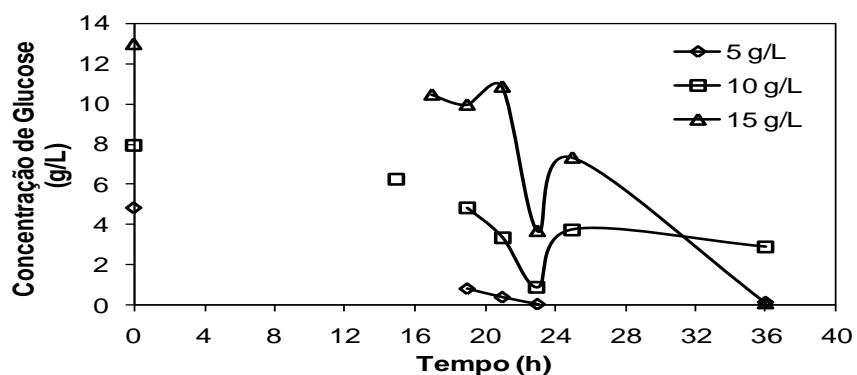


Figura 3.14 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 150 rpm com diferentes concentrações de glucose.

O consumo de glucose decresce mais pronunciadamente entre as 16 e as 24 h de cultura, correspondente à duração da fase exponencial dos perfis de crescimento com as diferentes concentrações de glucose (Figura 3.13 A). No crescimento efectuado em meio com 5 g/L de glucose, o esgotamento desta dá-se às 24 h, o que justifica o menor crescimento observado a partir desse tempo, em comparação com as outras concentrações. Nas concentrações de 10 e 15 g/L o crescimento é prolongado, não se observando esgotamento da fonte de carbono.

Os perfis de consumo de açúcares em meio Alfarroba, foi seguido quantificando os açúcares pelo método DNS e por análise em HPLC.

A Figura 3.15 representa o perfil de consumo dos açúcares redutores pela bactéria PBC-1 em meio Alfarroba, obtido pelo método do DNS.

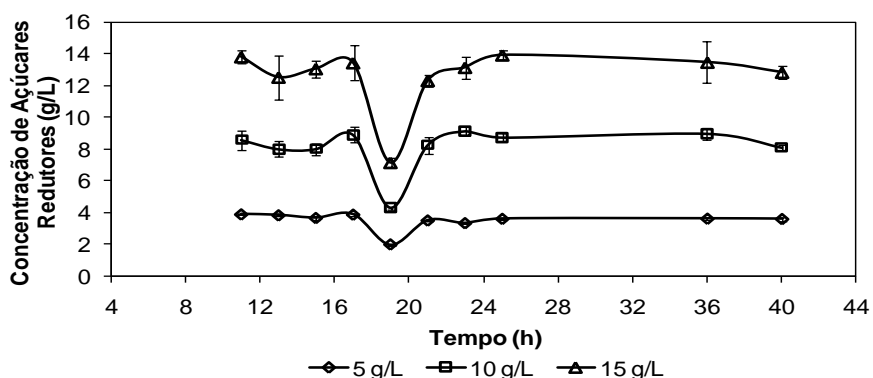


Figura 3.15 Perfil do consumo de açúcares redutores por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm com diferentes concentrações de meio Alfarroba. Valores médios \pm desvio padrão (n=3)

O consumo dos açúcares redutores mantém-se praticamente constante até as 16 h, sofrendo uma diminuição até cerca das 20 h de fermentação. Após as 20 h, observa-se que a concentração de açúcares aumenta ligeiramente mantendo-se depois constante até ao final do ensaio. Uma possível explicação para este comportamento é a conversão de sacarose, açúcar que se encontra em maior concentração no extracto de alfarroba, em frutose e glucose, provocando um aumento da concentração destes açúcares redutores. Esta conversão da sacarose presente no extracto de alfarroba foi

igualmente detectada por Roseiro *et al.*, (1991a) em trabalhos anteriores. Por análise dos perfis, observa-se que o período de maior consumo de açúcares é coincidente com os períodos de maior crescimento (Figura 3.13 C).

Nas Figuras 3.16 à 3.18, são apresentados os perfis de consumo de fonte de carbono de *P. agglomerans* crescida em meio Alfarroba com diferentes concentrações, obtidos por análise em HPLC. Os gráficos A representam os perfis dos açúcares que se encontram em maiores quantidades (frutose, glucose e sacarose) no extracto de alfarroba, que constituem o meio Alfarroba e o gráfico B, o somatório dos diferentes açúcares, da qual resultam os açúcares totais.

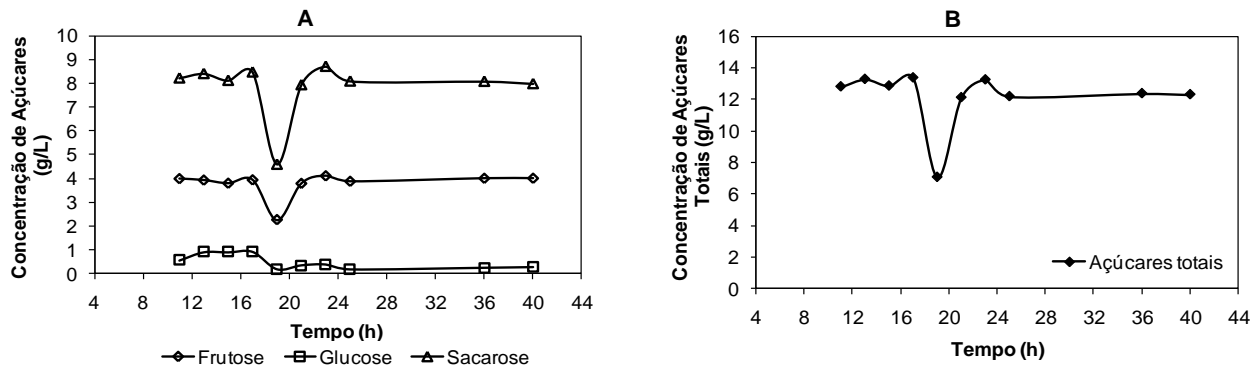


Figura 3.16 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 5 g/L (AçR). O gráfico A representa os perfis dos açúcares frutose, glucose e sacarose, presentes no meio Alfarroba e o gráfico B o perfil dos açúcares totais.

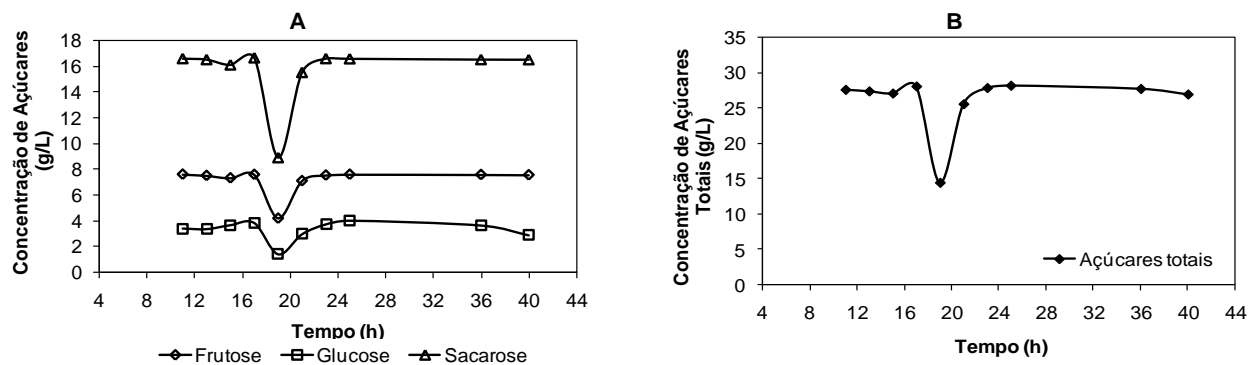


Figura 3.17 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L (AçR). O gráfico **A** representa os perfis dos açúcares frutose, glucose e sacarose, presentes no meio Alfarroba e o gráfico **B** o perfil dos açúcares totais.

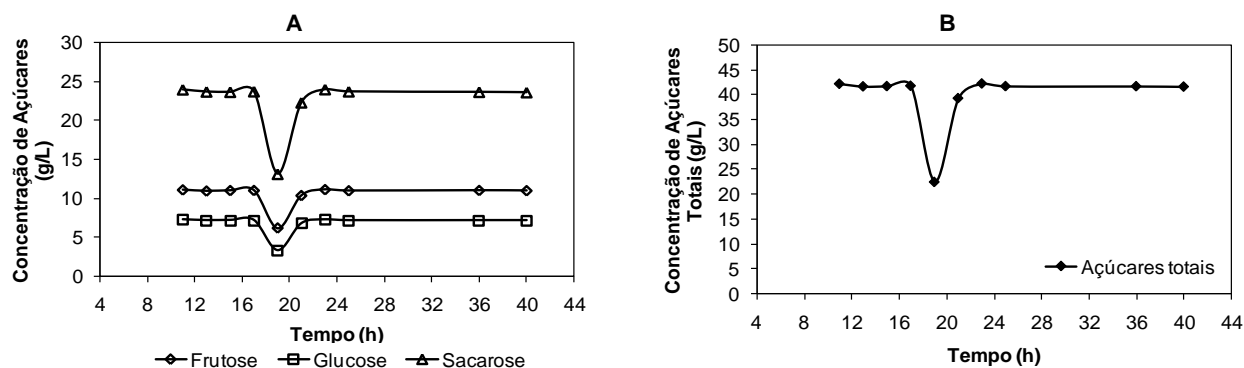


Figura 3.18 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 15 g/L (AçR). O gráfico **A** representa os perfis dos açúcares frutose, glucose e sacarose, presentes no meio Alfarroba e o gráfico **B** o perfil dos açúcares totais.

Pela análise dos gráficos **A** das Figuras 3.16 à 3.18, verifica-se para todas as concentrações avaliadas, um perfil de consumo de açúcares muito semelhante ao obtido pelo método DNS (Figura 3.15). A concentração de açúcares mantém-se constante até as 16 h, a partir das quais se observa uma descida até próximo das 20 h. Como referido para os perfis obtidos pelo método DNS, este consumo é coincidente com os períodos de maior crescimento verificado nos perfis de crescimento expressos em absorvâncias, em meio Alfarroba. Observa-se a mesma subida na concentração de açúcares após as 20 h. A mesma explicação dada anteriormente para esta subida

aplica-se neste caso. O facto da concentração de sacarose se manter elevada após conversão em frutose e glucose sugere ainda que exista conversão de outros polisacáridos presentes no extracto de alfarroba em sacarose.

A análise por HPLC permite uma avaliação mais rigorosa do tipo e concentrações de açúcares presentes no meio Alfarroba, permitindo a quantificação de açúcares redutores e não redutores. Em contraste, o método do DNS apenas permite a quantificação dos açúcares redutores presentes no meio. Observando os gráficos **B** das Figuras 3.16 à 3.18, constatamos que a concentração de açúcares totais é bastante superior ao que inicialmente se supunha considerando apenas a concentração dos açúcares redutores. A presença de sacarose é bastante elevada no extracto de alfarroba, que constitui o meio Alfarroba, disponibilizando uma maior concentração de fonte de carbono às células. Assim, os ensaios de crescimento realizados em meio Alfarroba, com a concentração de 5 g/L de açúcares redutores, tinham na verdade aproximadamente 13 g/L de açúcares totais disponíveis (reduzidos e não reduzidos). O mesmo se passando com os crescimentos do agente de controlo biológico nas concentrações de 10 e 15 g/L de açúcares redutores, tinham disponíveis para consumo aproximadamente 27 g/L e 43 g/L de açúcares totais (sacarose, frutose e glucose) respectivamente.

Embora estes ensaios tenham sido elucidativos de que a *P. agglomerans* cresce em meio Alfarroba 5 g/L com uma taxa específica de crescimento de $0,25 \text{ h}^{-1}$, superior às taxas obtidas em meio com glucose e a biomassa atinge uma concentração elevada de $2,8 \times 10^8$ ufc/mL, os ensaios não foram conclusivos. Não permitiram um estudo satisfatório do comportamento da bactéria em diferentes concentrações de meio Alfarroba, não se conseguindo determinar a concentração óptima de crescimento do PBC-1. Como tal, procederam-se a novos ensaios de crescimento de *P. agglomerans* em meio Alfarroba a diferentes concentrações.

3.5 Ensaio de Crescimento em Meio Alfarroba

Estudou-se o efeito do extracto de alfarroba como fonte de carbono de forma a otimizar a concentração de extracto no crescimento de *P. agglomerans* em Erlenmeyer. Realizaram-se fermentações em meio Alfarroba com concentrações de açúcares totais de 5, 10, 15 e 20 g/L.

Os ensaios realizaram-se em balões de 250 mL com 50 mL de meio, inoculados com células frescas de *P. agglomerans* PBC-1, à concentração inicial de 1×10^5 cfu/mL e incubados a 30 ± 1 °C com agitação orbital de 150 rpm.

Nos ensaios anteriores constatou-se que a cor do meio Alfarroba tinha um efeito negativo no seguimento do crescimento pela variação da absorvância. Assim, com base no método otimizado por Manso *et al.*, (submetido), procedeu-se à extracção dos açúcares da alfarroba a uma temperatura inferior à aplicada inicialmente, não favorecendo a remoção de fenóis e obtendo-se um meio Alfarroba mais claro. Este procedimento permitiu acompanhar o crescimento da bactéria por variação da absorvância a 640 nm.

A Figura 3.19 representa os perfis de crescimento obtidos para *P. agglomerans* crescida em meio Alfarroba em diferentes concentrações. O gráfico **A** representa o perfil de crescimento expresso em log ufc/mL e no gráfico **B** vemos o perfil de crescimento de *P. agglomerans* expresso em absorvância a 640 nm, nas diferentes concentrações de meio Alfarroba.

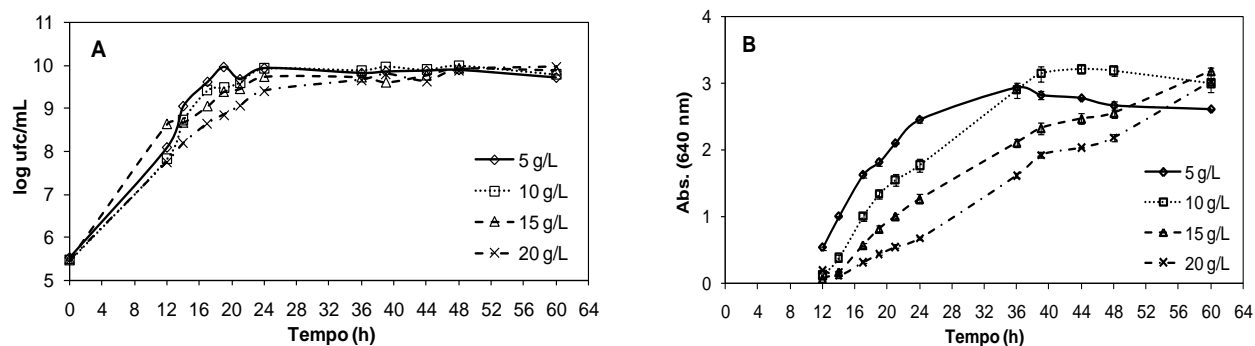


Figura 3.19 Perfis de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1, expressos em log ufc/mL (A) e absorvância a 640 nm (B), crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 5, 10, 15 e 20 g/L. Valores médios \pm desvio padrão (n=3).

Na Figura 3.19 A, observa-se que o crescimento de *P. agglomerans* é semelhante nas diferentes concentrações de alfarroba testadas. No entanto, verifica-se que nas concentrações mais baixas (5 e 10 g/L) o crescimento é ligeiramente superior ao longo da fase exponencial, em comparação com as concentrações de 15 e 20 g/L. Analisando a Figura 3.19 B, observa-se uma fase exponencial com a duração de 24 h para a concentração de 5 g/L, enquanto nas concentrações de 10, 15 e 20 g/L a fase exponencial prolonga-se até às 40 h. Nos perfis obtidos na Figura 3.19 B evidencia-se a diferença no crescimento entre as concentrações estudadas. Até as 36 h de fermentação, o crescimento da bactéria é maior na concentração de 5 g/L, seguida pelas concentrações a 10, 15 e por fim de 20 g/L. Após as 36 h, o crescimento no meio com 5 g/L estabiliza enquanto na cultura a 10 g/L observa-se a estabilização por volta das 40 h de cultura. Nas concentrações de 15 e 20 g/L continua-se a observar crescimento até ao final do ensaio.

Na Tabela 3.6 encontram-se os valores das taxas específicas de crescimento e concentrações máximas em ufc/mL obtidos nas culturas a diferentes concentrações de meio Alfarroba.

Tabela 3.6 Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g) e concentrações máximas em ufc/mL determinados no ensaios de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em diferentes concentrações de meio Alfarroba.

	Meio Alfarroba (g/L)			
	5	10	15	20
μ_g (h^{-1})	0,26	0,24	0,11	0,16
Concentração máxima (ufc/mL)	$7,8 \times 10^9$	$9,6 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9$	$9,3 \times 10^9$

Analisando os valores apresentados na Tabela 3.6, verificamos que estão claramente de acordo com os perfis de crescimento obtidos. As maiores taxas específicas de crescimento verificam-se no meios menos concentrados, com um máximo de $0,26 h^{-1}$ obtido no meio Alfarroba a 5 g/L. As concentrações máximas de ufc/mL são bastante elevadas e da mesma magnitude, registando-se um máximo de $9,6 \times 10^9$ na concentração de 10 g/L.

Foi feita a medição do pH e a quantificação dos fenóis como medidas indirectas de crescimento celular. Nos gráficos **A** e **B** da Figura 3.20 temos, respectivamente, a variação do pH e da concentração de fenóis ao longo do ensaio.

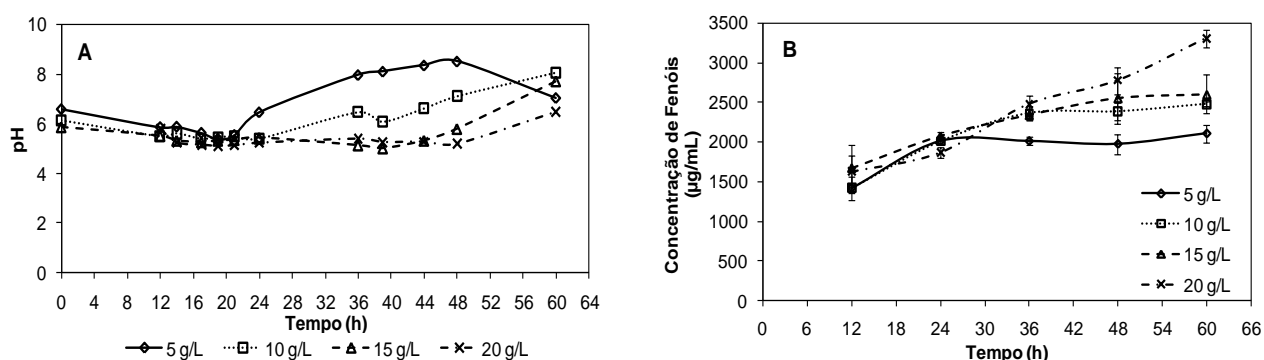


Figura 3.20 Variação do pH (**A**) e da concentração de fenóis (**B**) ao longo do ensaio de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 5, 10, 15 e 20 g/L. Valores médios \pm desvio padrão (n=3).

Observa-se na Figura 3.20 **A**, que o pH decresce ao longo das primeiras 20 h de fermentação para todos os meios. Regista-se uma subida do pH no meio a 5 g/L após

as 24 h, que corresponde aproximadamente ao tempo em que o crescimento de *P. agglomerans* entra em fase estacionária. Da mesma forma se regista um aumento do pH para a concentração 10 g/L, também coincidente com a entrada na fase estacionária. Nos meios 15 e 20 g/L esta subida verifica-se apenas às 48 h de fermentação. A subida dos valores de pH verificada poderá estar relacionada a factores de *stress* celular devido ao esgotamento das fontes de carbono ao longo das fermentações.

Na Figura 3.20 **B** observa-se a variação dos fenóis excretados para o meio ao longo da fermentação. Verifica-se que a concentração de fenóis no meio está relacionada com o aumento do crescimento celular. Os fenóis aumentam para todas as concentrações testadas enquanto se verifica crescimento celular e tendem a manter-se estáveis a partir do momento que o crescimento tende a diminuir. Habitualmente, a formação de fenóis está associada a *stress* ou carência de algum nutriente no meio, o que sugere que o esgotamento da fonte de carbono é responsável pela subida da concentração de fenóis. A concentração dos fenóis oscilou, aproximadamente, entre os 1500 e 3000 µg/mL.

As Figuras 3.21 à 3.24, apresentam os perfis do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* nos meios com diferentes concentrações de açúcares, obtidos por análise em HPLC. Os gráficos **A** representam o consumo da frutose, glucose e sacarose presentes nos meios a diferentes concentrações e os gráficos **B**, o perfil de consumo dos açúcares totais nos meios.

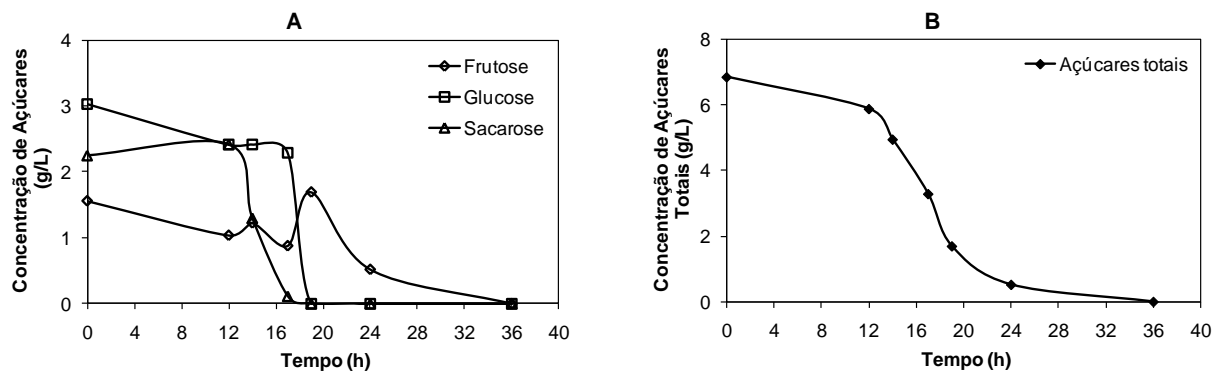


Figura 3.21 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 5 g/L. O gráfico **A** representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico **B** o consumo dos açúcares totais.

Pela análise da Figura 3.21 **A**, verifica-se que houve um consumo acentuado da sacarose e glucose entre as 12 e 20 h, provocando o esgotamento destes açúcares no meio. Estes tempos correspondem à fase exponencial, evidente nos perfis de crescimento da Figura 3.19. Na Figura 3.21 **A**, após o consumo de toda a sacarose e glucose, a bactéria consome a frutose presente no meio até as 36 h, após as quais o seu crescimento decresce (Figura 3.19 **B**). Na Figura 3.21 **B** é apresentado o perfil de consumo dos açúcares totais, observando-se uma nítida diminuição a partir das 12 h, correspondendo à fase de crescimento activo do agente de controlo biológico.

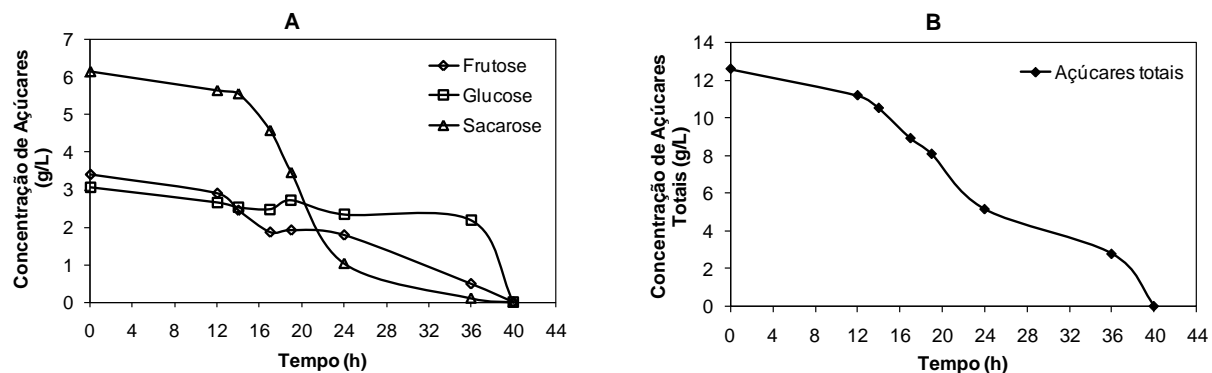


Figura 3.22 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L. O gráfico **A** representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico **B** o consumo dos açúcares totais.

Na Figura 3.22 **A**, verifica-se que entre as 12 e 24 h se dá um maior consumo da sacarose. Depois de consumir quase toda a sacarose, a bactéria consome a frutose e glucose presente no meio até à sua depleção às 40 h, após as quais o seu crescimento decresce (Figura 3.19 **B**). No gráfico **B** da Figura 3.22 podemos observar o esgotamento dos açúcares totais no meio.

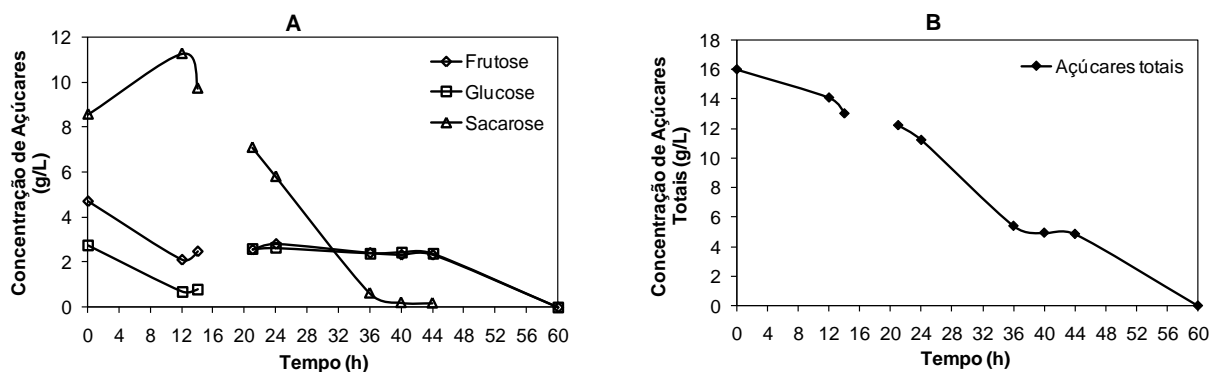


Figura 3.23 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 15 g/L. O gráfico **A** representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico **B** o consumo dos açúcares totais.

Na Figura 3.23 **A**, observa-se o consumo dos diferentes açúcares presentes no extracto de alfarroba, durante a fase exponencial do crescimento de PBC-1 (Figura 3.19). O consumo total da sacarose acontece às 36 h, havendo ainda no meio frutose e glucose. A maior disponibilidade de açúcar presente no meio a 15 g/L permite prolongar o crescimento até ao final do tempo de ensaio (60 h). Na Figura 3.23 **B** é apresentado o perfil de consumo dos açúcares totais.

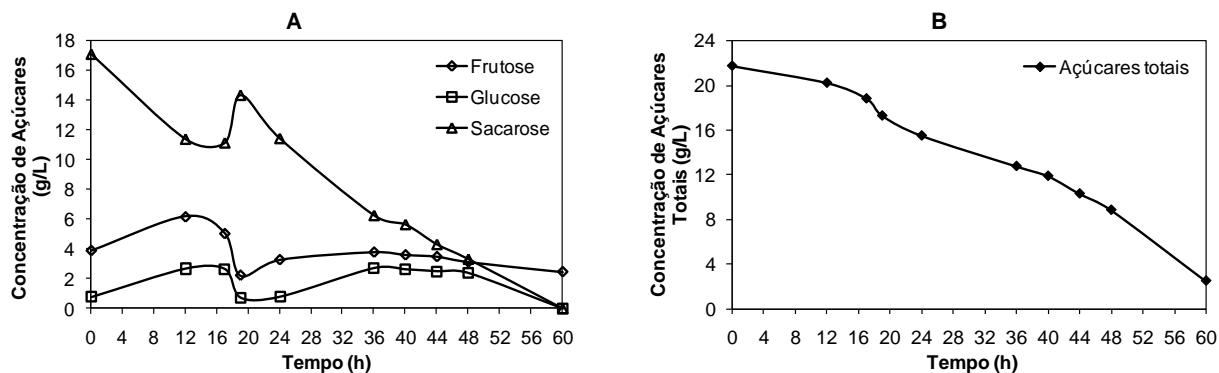


Figura 3.24 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 20 g/L. O gráfico **A** representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico **B** o consumo dos açúcares totais.

Na Figura 3.24 observa-se que não há esgotamento dos diferentes açúcares presentes no meio. Tal como se verificou no meio a 15 g/L, a maior concentração de açúcares presentes no meio a 20 g/L permitiu manter o crescimento até ao final do tempo de ensaio. Estes dados corroboram o perfil de crescimento obtido (Figura 3.19), onde é possível verificar que a bactéria continua a crescer.

Este estudo comparativo em diferentes concentrações de meio Alfarroba, permitiu demonstrar que existe um elevado crescimento em todos os meios estudados. Tendo em conta a taxa de crescimento elevada ($0,24 \text{ h}^{-1}$) e uma concentração máxima na ordem das $1 \times 10^9 \text{ ufc/mL}$, o meio Alfarroba a 10 g/L apresenta-se como favorável a ser usado em biorreactor. Havendo ainda a vantagem de se apresentar como uma solução mais económica devido a ser um meio que necessita de menores quantidades de nutrientes e menor concentração.

3.6 Ensaio de pH

Vários factores influenciam o rendimento em biomassa dos microrganismos, entre os quais, a composição do meio, natureza da fonte de carbono e fonte de nitrogénio, temperatura e pH.

Os ensaios anteriores com meio Alfarroba foram realizados a pH normal do extracto de alfarroba, que é de 5,7. O efeito do pH inicial do meio Alfarroba no crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 foi estudado. Comparou-se o crescimento de *P. agglomerans* em meio Alfarroba a pH normal e a pH 7.

As fermentações foram realizadas em balões de 250 mL com 50 mL de meio Alfarroba 10 g/L, inoculados com células frescas de *P. agglomerans* PBC-1, à concentração inicial de 1×10^5 cfu/mL e incubados a 30 ± 1 °C com agitação orbital de 150 rpm.

Por observação da Figura 3.25 **A**, verifica-se que o perfil de crescimento no meio a pH 7 é superior, ao longo de toda a fermentação, em comparação com o meio a pH normal, 5,7. A fase exponencial em ambas as curvas está entre as 12 e as 20 h, a partir das quais o crescimento estabiliza no meio a pH normal em relação ao pH 7. Observa-se um crescimento elevado no meio a pH 7, atingindo concentrações da ordem de 1×10^9 ufc/mL.

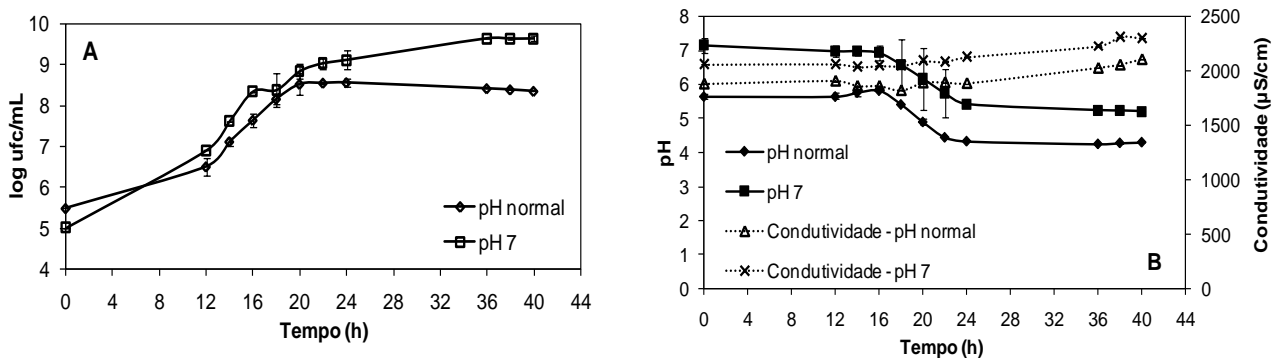


Figura 3.25 Perfil de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L a diferentes pH (**A**); e variação do pH e condutividade ao longo do ensaio (**B**). Valores médios \pm desvio padrão (n=3).

Na Figura 3.25 **B** é apresentada a variação do pH e da condutividade ao longo do ensaio. Observa-se que o pH decresce ao longo da fermentação em ambos os meios até as 24 h de fermentação, mantendo-se depois estável até ao final do tempo de ensaio, coincidente com a fase estacionária do crescimento. No meio a pH 7, o valor de pH decresce até pouco acima do pH 5, enquanto no meio a pH normal, desce até um pouco acima dos 4. Os valores de condutividade mantêm-se bastante estáveis ao longo da fermentação, subindo ligeiramente após as 36 h de crescimento, onde já poderá ocorrer alguma lise celular devido à perda de viabilidade celular. A condutividade é maior no meio a pH 7 do que no meio a pH normal, apesar de em ambos os casos os valores se situarem entre os 2000 e os 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Na Tabela 3.7 observam-se as taxas específicas de crescimento celular e concentrações máximas em ufc/mL obtidas nestes ensaios. O meio a pH 7 permitiu atingir uma taxa crescimento de $0,36 \text{ h}^{-1}$, contra a taxa específica de $0,28 \text{ h}^{-1}$ obtida em meio de pH normal. O máximo de concentração de biomassa foi de $4,3 \times 10^9$ ufc/mL no meio a pH 7, enquanto a pH normal apenas se atingiu $2,2 \times 10^8$.

Tabela 3.7 Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g) e concentrações máximas em ufc/mL determinados no ensaios de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L a diferentes pH.

	pH normal	pH 7
$\mu_g (\text{h}^{-1})$	0,28	0,36
Concentração máxima (ufc/mL)	$2,2 \times 10^8$	$4,3 \times 10^9$

Na Figura 3.26 são apresentados os perfis de consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* ao longo do ensaio, obtidos por análise em HPLC.

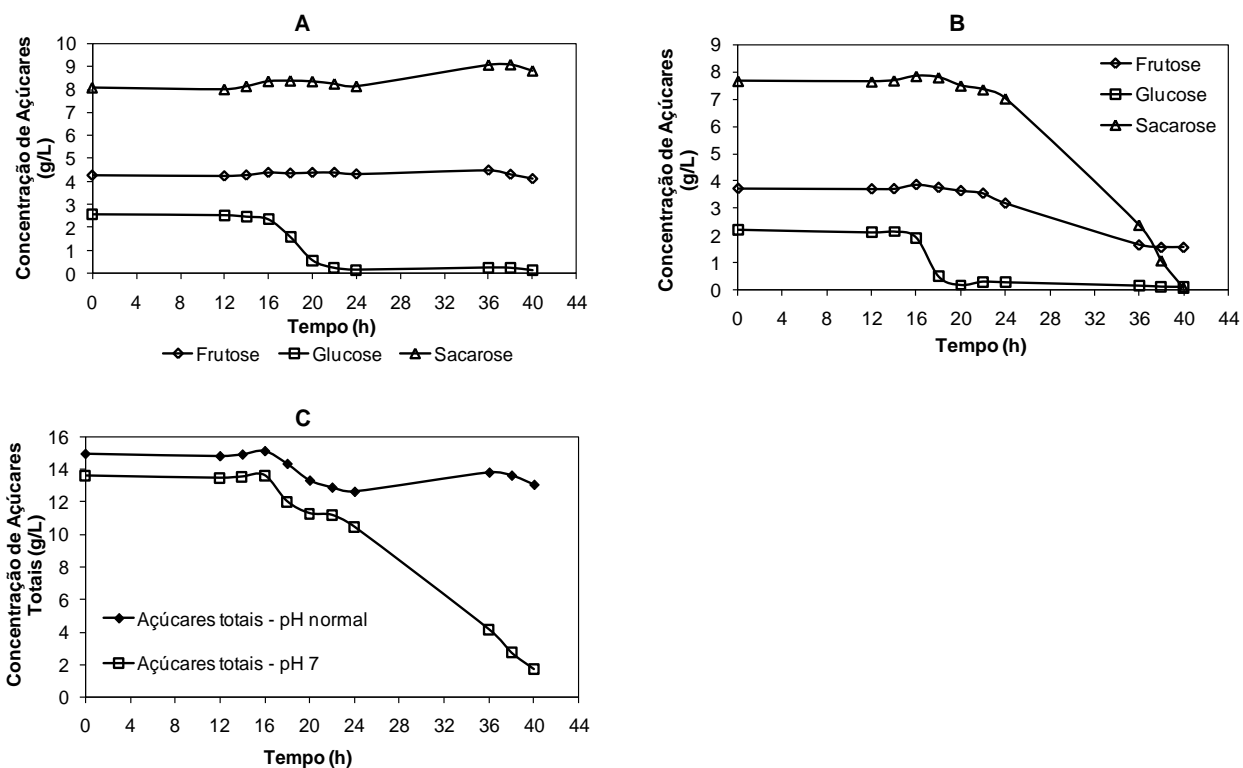


Figura 3.26 Perfis do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em Erlenmeyer a 30 °C e agitação de 150 rpm em meio Alfarroba 10 g/L a diferentes pH. Os gráficos **A** e **B** representam o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba para pH normal e pH 7, respectivamente. O gráfico **C** representa o perfil dos açúcares totais nos dois pH diferentes.

Na Figura 3.26, observa-se que para ambos os pH testados, a glucose foi o açúcar preferencialmente consumido, entre as 16 e 20 h de cultura. Estes tempos correspondem à fase exponencial, evidente no perfil de crescimento da Figura 3.25. No caso do crescimento da PBC-1 a pH normal, os restantes açúcares não foram consumidos, não havendo assim esgotamento da fonte de carbono (Figura 3.26 **A** e **C**). A pH 7, observa-se consumo da sacarose e frutose, esgotando a sacarose ao fim de 40 h de cultura (Figura 3.26 **B** e **C**). Estes dados corroboram o perfil de crescimento obtido (Figura 3.25), onde é possível verificar um ligeiro aumento da biomassa após o final da fase exponencial coincidente com os tempos de consumo da sacarose e frutose.

Estes ensaios permitiram observar um melhoramento claro no crescimento de *P. agglomerans* quando crescida em meio Alfarroba com pH inicial igual a 7 em

contraste com o crescimento a pH normal, 5,7. O ajuste do pH para 7 permitiu atingir uma taxa específica de crescimento maior e também uma maior concentração de ufc/mL. A descida do pH durante a fermentação não atinge valores tão baixos em comparação com o meio a pH normal, o que representa uma vantagem ao manter o pH mais próximo do valor óptimo ao longo do crescimento.

Os ensaios em Erlenmeyer permitiram estudar e otimizar as condições de crescimento de *P. agglomerans* em meio Alfarroba de forma a permitir fazer o *scale-up* para biorreactor. O estudo da concentração óptima de fonte de carbono no meio Alfarroba, o estudo do pH óptimo de crescimento e o estudo de transferência de massa com diferentes vectores de O₂, foi essencial para se prosseguir ao crescimento do agente de controlo biológico *P. agglomerans* em biorreactor.

3.7 Ensaios em Reactor Agitado

Os estudos preliminares apresentados anteriormente permitiram estabelecer condições de crescimento e operação óptimas a serem implementados nos ensaios em biorreactor. Com base nos resultados obtidos foi possível optar por um meio mínimo de produção, sem compromisso da produção de biomassa, estabelecer um valor de pH inicial adequado e escolher um vector de O₂ para ser adicionado ao meio de cultura de modo a aumentar a transferência de O₂ e consequentemente melhorar o rendimento da fermentação.

Os ensaios de produção de biomassa realizaram-se num biorreactor de 3 L agitado mecanicamente e equipado com um agitador em hélice. O arejamento do reactor foi feito através de um dispersor poroso.

O biorreactor foi inóculado com células frescas de *P. agglomerans* PBC-1 com uma concentração inicial de 1×10^6 cfu/mL, num volume útil de 2,5 L.

Num primeiro ensaio foi utilizado meio Alfarroba 10 g/L + 5 g/L Yext, com pH inicial ajustado a 7 e num segundo ensaio comparativo, usou-se o mesmo meio suplementado com n-dodecano 1% (v/v).

As fermentações foram realizadas à temperatura de 30 °C, com agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm.

Em todos os ensaios monitorizou-se o pH, condutividade, O₂ dissolvido, e recolheram-se amostras periodicamente para estabelecer um perfil de crescimento, um perfil de depleção de fonte de carbono, quantificação de fenóis, quantificação de proteína solúvel e caracterização reológica. Determinaram-se ainda os K_La inicial, intermédios e final, assim como as taxas respiratórias.

A Figura 3.27 apresenta os perfis de crescimento expressos em log ufc/mL, correspondentes à fermentação em meio Alfarroba 10 g/L (A) e em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (B).

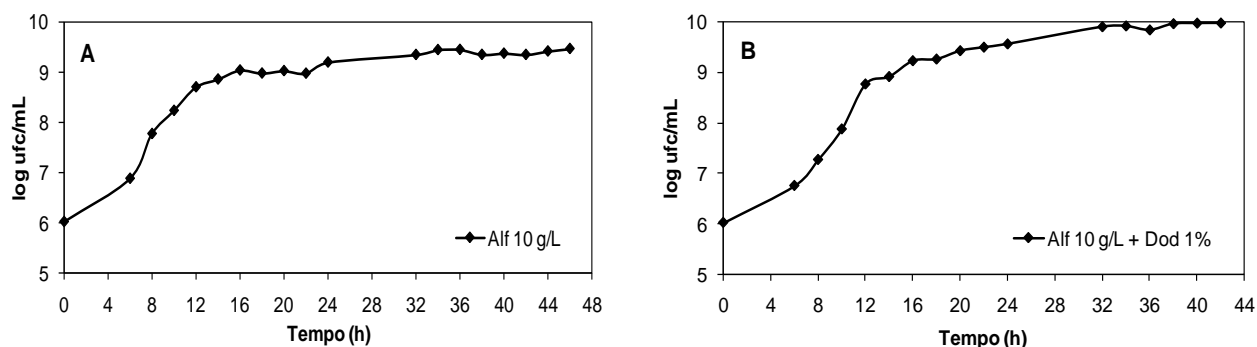


Figura 3.27 Curvas de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L (A) e meio Alfarroba 10g/L + n-dodecano 1% (v/v) (B).

Analisando a Figura 3.27, verifica-se que os perfis de crescimento são similares nas duas fermentações. Ambas as curvas apresentam uma fase exponencial entre as 6 e as 12 h. Após este tempo o crescimento no meio Alfarroba a 10 g/L mantém-se praticamente constante ao longo da fermentação. Por outro lado, no meio suplementado com n-dodecano 1% (v/v) o crescimento celular continua a aumentar

ligeiramente até as 32 h onde estabiliza. Nos dois casos a biomassa mantém-se acima dos 2×10^9 ufc/mL após a fase exponencial.

Foram calculadas as taxas específicas de crescimento e a concentração máxima de biomassa, expressa em ufc/mL, de *P. agglomerans* para cada um dos ensaios (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 Valores das taxas específicas de crescimento (μ_g) e concentrações máximas em ufc/mL determinados nos ensaios de crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v), usando um agitador em hélice.

	Alf	Alf + Dod 1%
μ_g (h^{-1})	0,30	0,33
Concentração máxima (ufc/mL)	$2,9 \times 10^9$	$9,6 \times 10^9$

A maior taxa específica de crescimento celular e a concentração máxima de biomassa foi atingida em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v). Neste meio obteve-se uma taxa de crescimento de $0,33 h^{-1}$ e uma concentração máxima de biomassa de $9,6 \times 10^9$.

Estes resultados são superiores aos alcançados por Costa *et al.*, (2001) com o uso de melaços no crescimento de *P. agglomerans* CPA-2, onde se atingiram valores de biomassa de aproximadamente $4,5 \times 10^9$.

Na Figura 3.28 encontramos os perfis de consumo de açúcares por *P. agglomerans* ao longo do ensaio em meio Alfarroba a 10 g/L, obtidos por análise em HPLC.

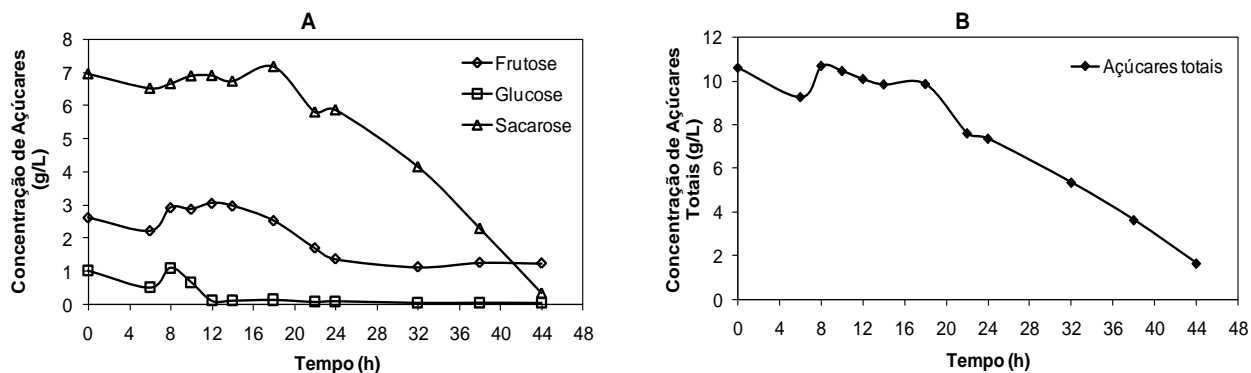


Figura 3.28 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em biorreator de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L usando um agitador em hélice. O gráfico **A** representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico **B** o perfil dos açúcares totais.

Analisando a Figura 3.28 **A**, verifica-se que houve um consumo preferencial da glucose durante a fase exponencial (entre as 6 e 12 h), chegando à depleção deste açúcar. A partir das 12 h observa-se o consumo da frutose e sacarose ainda presentes no meio, havendo esgotamento da sacarose no final do ensaio. Na Figura 3.28 **B**, observa-se o consumo dos açúcares totais, não havendo esgotamento devido à presença de frutose no meio.

Na Figura 3.29 são apresentados os perfis de consumo de fonte de carbono, determinados por HPLC, da *P. agglomerans* crescida em meio Alfarroba a 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v).

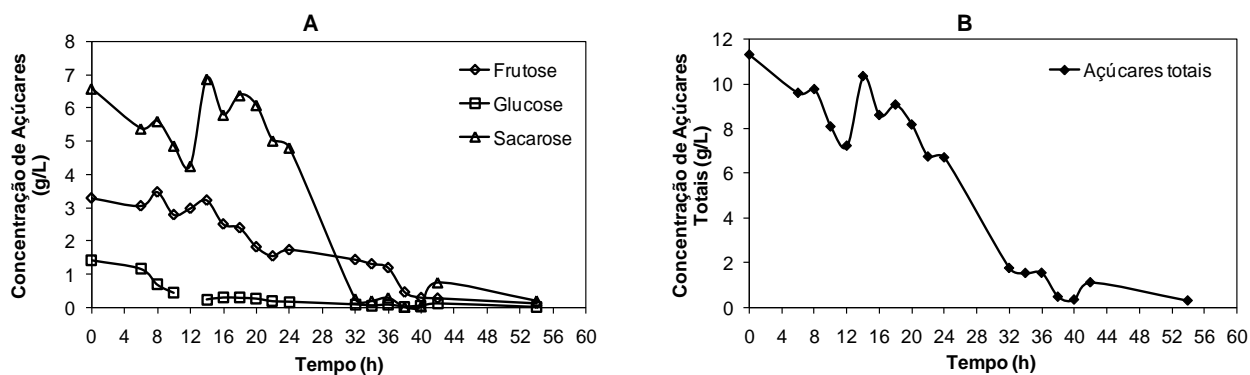


Figura 3.29 Perfil do consumo de fonte de carbono por *P. agglomerans* PBC-1 crescida em biorreator de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) usando um agitador em hélice. O gráfico **A** representa o consumo dos açúcares frutose, glucose e sacarose presentes no meio Alfarroba e o gráfico **B** o perfil dos açúcares totais

Por observação da Figura 3.29 **A**, verifica-se que houve um consumo preferencial da glucose e sacarose ao longo do ciclo de crescimento, sendo primeiro esgotada a glucose, ao fim de aproximadamente 12 h de cultura e a sacarose por volta das 32 h. Estes dados estão de acordo com o perfil de crescimento observado no gráfico **B** da Figura 3.27, no qual a partir das 32 h o crescimento celular ainda se mantém atingindo o seu máximo até ao final do tempo da fermentação. Na Figura 3.29 **B**, observa-se o consumo dos açúcares totais, havendo esgotamento dos açúcares no meio.

A variação do pH e da condutividade ao longo das fermentações em Alfarroba 10 g/L e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v), estão representados na Figura 3.30 **A** e **B**, respectivamente.

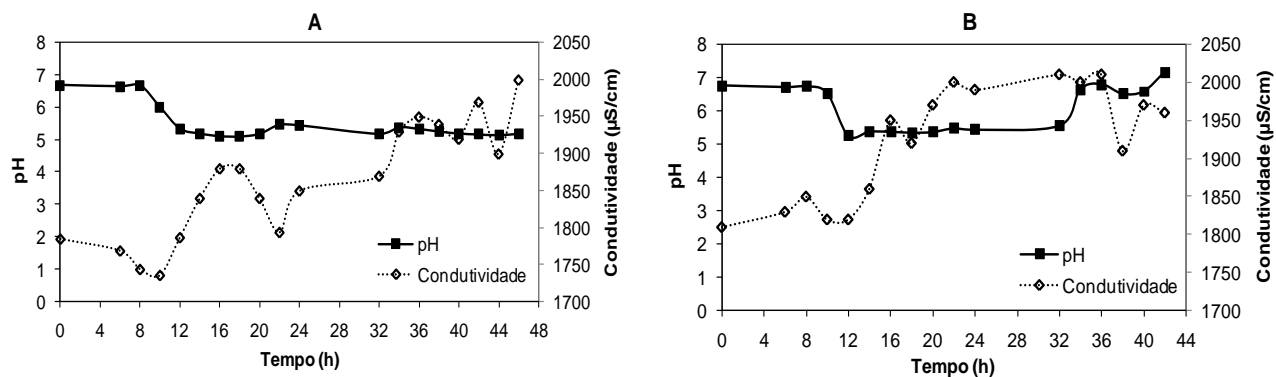


Figura 3.30 Variação do pH e da condutividade ao longo do crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L (A) e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) (B), usando um agitador em hélice.

Observando-se a Figura 3.30, o pH decresce para 5 até ao final da fase exponencial (12 h), em ambos os meios. Na fermentação com meio Alfarroba a 10 g/L, o pH mantém-se neste valor até ao final do ensaio. No caso do meio Alfarroba suplementado com vector de O₂, o pH mantém-se em 5 até às 32 h, após as quais sobe novamente até 7.

Os valores de condutividade seguem um perfil semelhante em ambos os meios, mostrando uma tendência para aumentar após o término da fase exponencial. De um modo geral, a condutividade é maior no meio com n-dodecano 1% (v/v). Em ambos os casos os valores oscilam entre os 1750 e os 2000 µS/cm.

Foi feita a quantificação dos fenóis como medida indirecta de crescimento celular. Nos gráficos A e B da Figura 3.31 temos, a variação da concentração de fenóis ao longo dos ensaios para os meios sem e com vector de O₂, respectivamente.

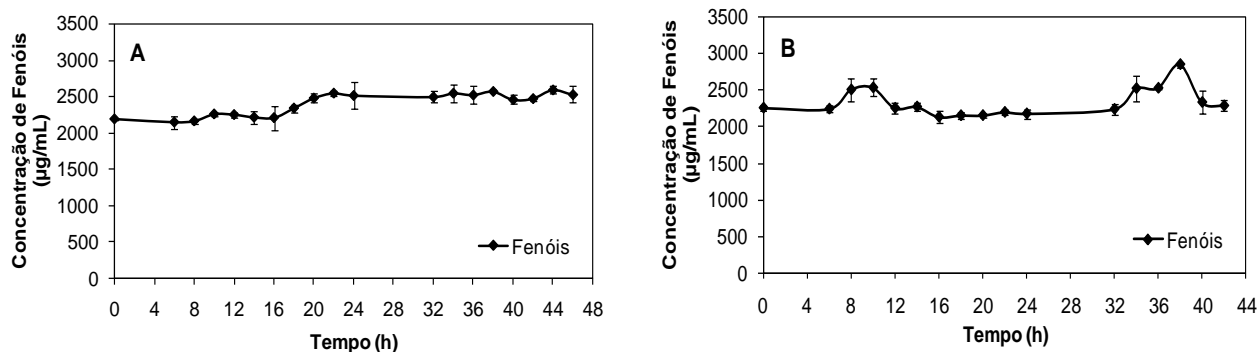


Figura 3.31 Variação da concentração de fenóis ao longo do crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L (A) e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) (B), usando um agitador em hélice. Valores médios \pm erro padrão (n=3).

Observando a Figura 3.31, verificamos que a variação dos fenóis excretados para o meio ao longo das duas fermentações é praticamente igual, havendo um ligeiro aumento na concentração destes no final da fermentação, o que é natural devido à baixa concentração de açúcares presentes no meio e à existência de alguma lise celular, provocada por algumas condições de *stress* impostas à cultura. Para qualquer dos casos a concentração de fenóis situa-se aproximadamente entre os 2000 e 2500 µg/mL.

Um parâmetro importante para seguir o efeito da adição de vector de O₂ ao meio Alfarroba, é a concentração de O₂ dissolvido (% volumétrica) no meio. A Figura 3.32, representa a variação do O₂ dissolvido ao longo das fermentações sem e com n-dodecano 1% (v/v), respectivamente.

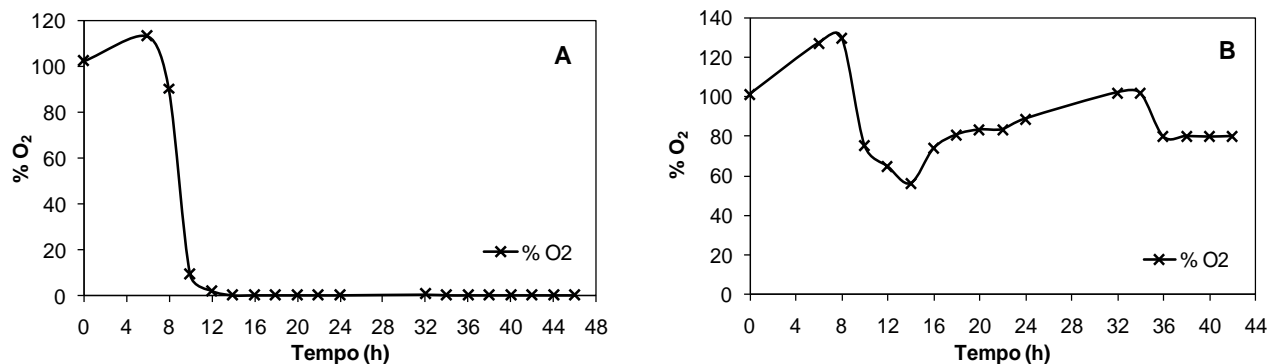


Figura 3.32 Variação do oxigénio dissolvido no meio de cultura ao longo do crescimento de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L (A) e Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) (B), usando um agitador em hélice.

Na Figura 3.32 A pode-se observar que a concentração de O₂ dissolvido no meio decresce rapidamente até atingir um valor mínimo próximo de zero. Esta descida abrupta do O₂ dá-se entre as 6 e as 12 h de fermentação, o que corresponde ao período de maior crescimento celular, na fase exponencial. Verifica-se na Figura 3.32 B que existe igualmente uma descida da percentagem de O₂ dissolvido, coincidente com a fase exponencial, até próximo dos 50% de O₂ dissolvido, subindo ligeiramente depois da fase exponencial e mantendo-se a níveis elevados. É de notar que os valores iniciais de O₂ dissolvido que se observam na Figura 3.32 B são relativamente altos em comparação com a escala de 100% de saturação que normalmente se verifica. Isto dever-se-á a uma calibração da sonda acima dos 100% de O₂ saturante, pelo que na realidade os valores correctos devem ser 20 a 30% mais baixos. Mesmo neste caso, a presença de n-dodecano 1% (v/v) apresenta uma nítida melhoria na transferência de O₂ para o meio, o que representa uma importante vantagem em relação ao meio alfarroba sem vector de O₂.

O efeito da adição do vector de O₂ também foi avaliado pela determinação dos valores de K_La inicial, intermédio e final no meio de cultura, assim como pelo cálculo das taxas respiratórias da bactéria ao longo das fermentações.

A Tabela 3.9 apresenta os diferentes valores de K_La e taxas respiratórias determinados ao longo da fermentação em meio Alfarroba sem vector de O₂.

Tabela 3.9 Valores de K_{La} e taxas respiratórias determinadas ao longo da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L usando um agitador em hélice.

Tempo (h)	K_{La} (h^{-1})	Taxa Respiratória ($\mu\text{mol O}_2/\text{L}\cdot\text{min}$)
0	14,79	---
6	65,54	14,69
8	10,77	16,27
12	4,63	51,07

Como se observa pela análise da Tabela 3.9, o K_{La} subiu consideravelmente até ao início da fase exponencial, a partir da qual verifica-se uma descida abrupta do coeficiente de transferência de O_2 , atingindo o seu valor mínimo no fim da fase exponencial. Esta descida é acompanhada de forma inversamente proporcional com a taxa respiratória que atinge seu valor mais elevado no período de maior crescimento celular. Estes resultados corroboram claramente o perfil de O_2 dissolvido, analisado anteriormente, e o perfil de crescimento celular obtido em meio Alfarroba 10 g/L.

Na Tabela 3.10, podemos observar os diferentes valores de K_{La} e taxas respiratórias determinados ao longo da fermentação em meio Alfarroba suplementado com vector de O_2 .

Tabela 3.10 Valores de K_{La} e taxas respiratórias determinadas ao longo da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) usando um agitador em hélice.

Tempo (h)	K_{La} (h^{-1})	Taxa Respiratória ($\mu\text{mol O}_2/\text{L}\cdot\text{min}$)
0	38,36	---
10	53,64	42,61
12	38,88	56,64
14	30,96	84,82
16	32,04	92,96
18	97,56	110,13
20	191,16	107,48
22	259,20	84,24

24	213,84	98,38
32	452,16	---
34	---	72,91

Pela análise da Tabela 3.10, verificamos que os valores de K_{La} e as taxas respiratórias apresentados são substancialmente maiores em comparação com os da Tabela 3.9. A presença do vector de O_2 permite uma maior transferência de O_2 para o meio, daí os valores mais elevados de K_{La} registados. Isto verifica-se nos resultados obtidos. Podemos observar que na fase exponencial existe uma descida do K_{La} acompanhado de uma subida da taxa respiratória, que se mantém até cerca das 18 h, descendo a partir daí. Como se observa no perfil de O_2 dissolvido da Figura 3.32 **B**, existe uma descida do O_2 até próximo das 14 h, subindo novamente após esse tempo até às 32 h de fermentação, comportamento que se verifica nos valores de K_{La} obtidos nos mesmos tempos.

Por fim, procedeu-se à caracterização reológica das culturas produzidas em reactor biológico.

A caracterização reológica dos meios de fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 crescida em biorreactor foi realizada à temperatura ambiente com um viscosímetro digital programável, com um adaptador acoplado para baixas viscosidades (*UL adapter*). Estudou-se a reologia do meio de cultura em diferentes tempos ao longo das fermentações do agente de biocontrolo com extracto de alfarroba como fonte de carbono, e em fermentações em que foi adicionado ao meio de cultura o vector de oxigénio n-dodecano 1% (v/v). O tratamento dos resultados foi efectuado recorrendo ao software *Rheocalc*.

Com base nos valores da tensão de corte (τ) e da velocidade de corte ($\dot{\gamma}$), construíram-se reogramas das culturas de *P. agglomerans* crescidas em meio Alfarroba e procedeu-se ao ajuste à lei de potência ($\tau = K\dot{\gamma}^n$) de forma a estimar os valores do índice de comportamento do fluido (n) e do índice de consistência do fluido (K). Os

reogramas obtidos e os valores do ajuste à lei de potência podem ser vistos nas Figuras 3.33 e 3.34.

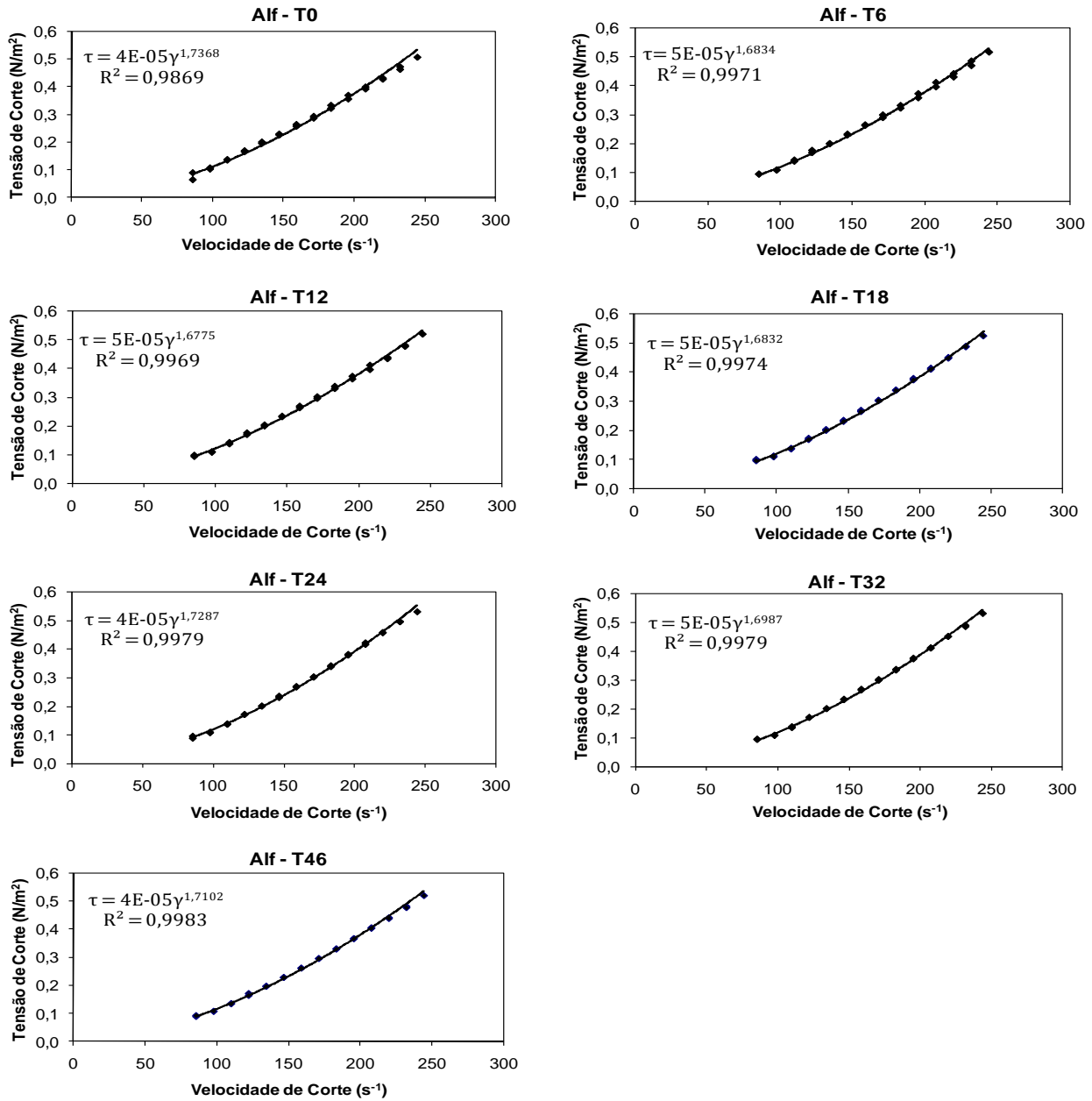


Figura 3.33 Reogramas da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L usando um agitador em hélice.

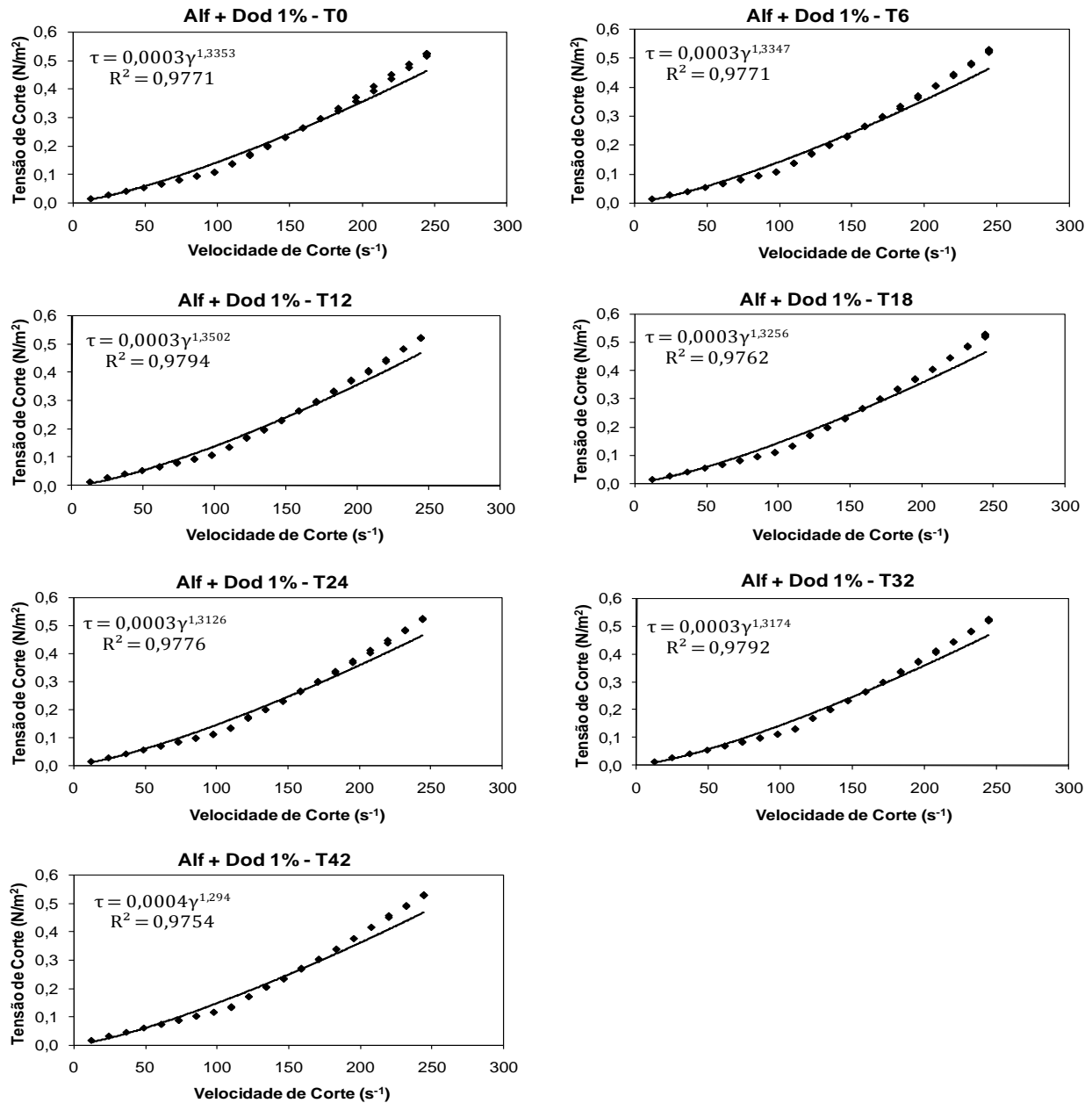


Figura 3.34 Reogramas da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) usando um agitador em hélice.

Verificou-se que para as fermentações, quer na presença ou ausência do vector de oxigénio e em todos os tempos estudados, a tensão de corte aumenta com a velocidade de corte. O mesmo acontece com a viscosidade aparente da cultura, que aumenta com a velocidade de corte (Tabelas 3.11 e 3.12), sendo este um comportamento típico de um fluido dilatante (Doran, 1995). Todos os valores do índice

de comportamento do fluido (n) apresentaram, para qualquer das fermentações ensaiadas, um valor superior a 1 que, de acordo com a Lei de Potência, confirma o comportamento dilatante dos meios.

Tabela 3.11 Valores da viscosidade aparente (μ_a) em função do aumento da velocidade de corte (γ), determinados em diferentes tempos ao longo da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L usando um agitador em hélice.

γ (s ⁻¹)	μ_a (cP)						
	Tempo (h)						
	0	6	12	18	24	32	46
85,61	0,77	1,06	1,11	1,15	1,02	1,09	1,03
97,84	1,11	1,08	1,10	1,12	1,09	1,09	1,09
110,07	1,24	1,27	1,27	1,22	1,23	1,22	1,23
122,30	1,39	1,42	1,42	1,40	1,40	1,39	1,40
134,53	1,50	1,47	1,50	1,49	1,48	1,49	1,47
146,76	1,57	1,57	1,58	1,58	1,56	1,57	1,55
158,99	1,67	1,65	1,68	1,68	1,68	1,67	1,65
171,22	1,72	1,74	1,76	1,76	1,76	1,74	1,73
183,45	1,82	1,80	1,84	1,84	1,84	1,82	1,81
195,68	1,89	1,90	1,90	1,92	1,93	1,90	1,88
207,91	1,92	1,97	1,98	1,98	2,00	1,97	1,96
220,14	1,96	2,00	1,99	2,04	2,07	2,05	2,01
232,37	2,03	2,09	2,06	2,09	2,13	2,11	2,08
244,60	2,07	2,11	2,13	2,14	2,17	2,17	2,14

Tabela 3.12 Valores da viscosidade aparente (μ_a) em função do aumento da velocidade de corte (γ), determinados em diferentes tempos ao longo da fermentação de *P. agglomerans* PBC-1 em biorreactor de 3 L a 30 °C, agitação de 200 rpm e arejamento de 0,20 vvm em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v) usando um agitador em hélice.

γ (s ⁻¹)	μ_a (cP)						
	Tempo (h)						
	0	6	12	18	24	32	46
61,15	1,06	1,09	1,08	1,10	1,14	1,15	1,16
73,38	1,08	1,08	1,10	1,11	1,14	1,16	1,16
85,61	1,09	1,09	1,09	1,11	1,14	1,17	1,17
97,84	1,09	1,09	1,09	1,12	1,14	1,15	1,17
110,07	1,24	1,23	1,22	1,20	1,19	1,18	1,19
122,30	1,39	1,39	1,39	1,40	1,40	1,39	1,39
134,53	1,48	1,48	1,47	1,46	1,47	1,49	1,52
146,76	1,56	1,56	1,55	1,57	1,55	1,58	1,58
158,99	1,65	1,66	1,66	1,67	1,67	1,67	1,68
171,22	1,72	1,74	1,74	1,74	1,74	1,75	1,76
183,45	1,80	1,81	1,82	1,82	1,82	1,83	1,84
195,68	1,89	1,88	1,90	1,89	1,90	1,92	1,92
207,91	1,96	1,93	1,93	1,94	1,97	1,98	2,00
220,14	2,04	1,99	1,99	2,02	2,02	2,02	2,05
232,37	2,09	2,05	2,08	2,12	2,07	2,07	2,12
244,60	2,14	2,12	2,14	2,15	2,13	2,15	2,16
244,60	2,14	2,16	2,14	2,16	2,14	2,15	2,17

Estes resultados sugerem que a utilização do n-dodecano, como vector de oxigénio, nas condições testadas não influi na reologia do caldo fermentativo, como também foi verificado para outras características da cultura, nomeadamente toxicidade celular.

Os ensaios de crescimento em biorreactor permitiram obter resultados bastante positivos em relação à produção de *P. agglomerans* usando meio Alfarroba. Os resultados confirmaram que se obtém um crescimento elevado deste agente de controlo biológico em meio Alfarroba 10 g/L, na ordem de 1×10^9 ufc/mL.

A adição do vector de O₂ n-dodecano 1% (v/v), permitiu melhorar as condições de transferência de O₂ aumentando a produção de *P. agglomerans* nas condições estudadas. Verificou-se que se atingiu o maior crescimento em meio Alfarroba 10 g/L +

n-dodecano 1% (v/v), atingindo-se uma concentração de biomassa de $9,6 \times 10^9$ ufc/mL e uma taxa específica de crescimento de $0,33 \text{ h}^{-1}$.

4 Conclusões e Perspectivas Futuras

4.1 Conclusões

A produção de um agente de controlo biológico em larga escala é determinante para a comercialização do produto. O desenvolvimento de um meio de cultura adequado para obter biomassa de alta qualidade e de baixo custo e a avaliação das condições óptimas de produção em reactor biológico são etapas essenciais da produção biológica.

Dado que a produção comercial de *Pantoea agglomerans* para uso como agente de controlo biológico da pós-colheita requer baixo custo e elevada densidade celular, a optimização das condições nutricionais e de crescimento desta bactéria realizaram-se de forma a minimizar custos e maximizar a densidade celular.

Visando a produção máxima de biomassa a baixo custo, factor importante na implementação de um sistema de controlo biológico, estudou-se a possibilidade de utilizar sub-produtos da indústria, como fonte de carbono, para reduzir os custos de produção.

Foram utilizados sub-produtos da indústria da alfarroba com esse objectivo. Realizaram-se extracções de açúcar de sub-produtos da indústria de alfarroba a diferentes temperaturas e tempo de extracção. Do extracto obtido foi quantificado a concentração de açúcares redutores pelo método DNS. Nas condições de extracção de 2 h a 75 °C, obteve-se um extracto de alfarroba com uma concentração de 20 g/L.

A potencialidade de utilizar este extracto na produção do microrganismo foi avaliada em ensaios de crescimento em Erlenmeyer.

Os perfis de crescimento da cultura crescida com sub-produtos da indústria de alfarroba, assemelharam-se aos observados com glucose e sacarose como fonte de carbono. Atingiram-se taxas específicas de crescimento semelhantes e concentrações máximas de biomassa na ordem de 1×10^9 ufc/mL. Sendo que as concentrações mais elevadas de biomassa, atingidas em Erlenmeyer, verificaram-se nos ensaios de crescimento em meio Alfarroba a diferentes concentrações.

Através do estudo comparativo com fontes de carbono convencionais (glucose e sacarose) e da avaliação do pH óptimo de crescimento, concluiu-se que a melhor concentração de extracto a utilizar é 10 g/L e que o pH óptimo de crescimento é 7.

O estudo de transferência de massa em meios aquosos de n-hexadecano e n-dodecano permitiu escolher o vector de O₂ com capacidade de aumentar a solubilidade de oxigénio no meio, o qual apresentou maior potencial para melhorar as condições de fermentação. Os resultados mostraram que o n-dodecano, nas condições de operação e concentrações testadas, apresentou melhores condições de transferência de oxigénio do que o n-hexadecano em biorreactor agitado mecanicamente e com arejamento forçado.

Os ensaios de produção de biomassa de *P. agglomerans* em biorreactor permitiram obter muito bons resultados usando o meio Alfarroba 10 g/L. O crescimento é bastante elevado, atingindo concentrações na ordem de 1×10^9 ufc/mL.

A adição de n-dodecano 1% (v/v) ao meio Alfarroba 10 g/L mostrou um efeito positivo na produção do agente de biocontrolo *P. agglomerans*. A presença do vector de O₂ permitiu uma maior solubilidade do O₂ no meio de cultura, melhorando significativamente as condições de crescimento da bactéria no biorreactor e aumentando a biomassa atingida.

Em meio Alfarroba 10 g/L + n-dodecano 1% (v/v), atingiu-se uma concentração de biomassa de $9,6 \times 10^9$ ufc/mL e uma taxa específica de crescimento de $0,33 \text{ h}^{-1}$, e na ausência do vector de O₂ a biomassa atingida foi de $2,9 \times 10^9$ ufc/mL com uma taxa de crescimento de $0,30 \text{ h}^{-1}$.

É possível dizer que a generalidade dos objectivos da produção do agente inicialmente propostos foi alcançada e com resultados promissores para a produção e comercialização num futuro próximo deste agente de controlo biológico de doenças de pós-colheita em pomóideas e citrinos.

4.2 Perspectivas para Trabalho Futuro

Os resultados alcançados neste trabalho são bastante promissores, podendo servir de base para o *scale-up* dos processos fermentativos de produção do agente de controlo biológico a uma escala comercial.

Contudo, estes estudos deverão ser desenvolvidos posteriormente de forma mais abrangente permitindo otimizar estes resultados.

Uma pesquisa futura deverá focar na determinação do alcance das condições de operação e em estudos económicos e tecnológicos para a produção em larga escala.

Torna-se necessário verificar:

- A eficácia da *P. agglomerans* produzida em meio Alfarroba contendo o vector de O₂ n-dodecano, para verificar se este hidrocarboneto tem algum efeito nefasto no controlo. Igualmente, verificar se após lavagens do agente existe algum resíduo do hidrocarboneto.

- Estudo do efeito da adição de outras concentrações de vector de O₂.

- Completar o estudo do dimensionamento dos parâmetros cinéticos de produção do agente de biocontrolo, essenciais para um processo de produção em fase semi-industrial e crucial na fase industrial, nomeadamente dos rendimentos e produtividades de biomassa que permitem realizar o estudo de viabilidade económica do processo pré-industrial.

Por outro lado será relevante que seja continuado o estudo de crescimento de *P. agglomerans* em outros meios em que sejam utilizados sub-produtos, assim como completar o estudo referente ao extracto aquoso de alfarroba e o efeito da presença de fenóis nos extractos de alfarroba, com eventual aplicação dos fenóis do extracto como sub-produto de transformação da polpa de alfarroba.

Para finalizar, seria bastante interessante estudar o *scale-up* do processo em instalação piloto, dimensionando a produção do agente nas novas condições.

5 Bibliografia

5.1 Referências Bibliográficas

Anselmo, A. M., J. M. S. Cabral, J. M. Novais (1989) The adsorption of *Fusarium flocciferum* spores on celite particles and their use in the degradation of phenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31: 200

Atkinson, B., Mavituna, F. (1991) "Gas-Liquid Mass Transfer and Mixing" in *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. 2nd ed., Macmillan, Basingstoke.

Avallone, R., M. Plessi, M. Baraldi, and A. Monzani (1997) Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10: 166–172.

Barracosa, P., J. Osório, A. Cravador (2007) Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region. *Scientia Horticulturae*. 114: 250–257.

Barracosa, P., M.B. Lima, A. Cravador (2008) Analysis of genetic diversity in Portuguese *Ceratonia siliqua* L. cultivars using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*. 118: 189–199.

Bengoechea, C., A. Romero, A. Villanueva, G. Moreno, M. Alaiz, F. Millán, A. Guerrero, M.C. Puppo (2007) Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins. *Food Chemistry*. 107: 675–683.

Biner, B., H. Gubbuk, M. Karhan, M. Aksu, M. Pekmezci (2005) Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*. 100: 1453–1455.

Bonaterra, A., M. Mari, L. Casalini, E. Montesinos (2002) Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology*. 84: 93–104.

Bulut, S., M. Elibol, D. Ozer (2004) Effect of different carbon sources on l(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*. 21: 33–37.

Cañamás, T. P., I. Viñas, J. Usall, C. Casals, C. Solsona, N. Teixidó (2007a) Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 49: 86–95.

Cañamás, T. P., I. Viñas, J. Usall, R. Torres, M. Anguera, N. Teixidó (2007b) Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biology and Technology*. 49: 96–106.

Cascaval, D., A.-I. Galaction, E. Folescu, M. Turnea (2006) Comparative study on the effects of n-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for simulated, bacterial and yeasts broths. *Biochemical Engineering Journal*. 31: 56–66.

Costa, E., J. Usall, N. Teixidó, N. Garcia and I. Viñas (2000) Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 793-800.

Costa, E., N. Teixidó, J. Usall, E. Atarés, I. Viñas (2001) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 367–371.

Costa, E., N. Teixidó, J. Usall, E. Atarés, I. Viñas (2002) The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Letters in Applied Microbiology*. 35: 117–120.

Couto, S. R. (2008) Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology Journal*. 3: 859–870.

Dakia, P. A., B. Wathelet, M. Paquot (2006) Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.): seed germ. *Food Chemistry*. 102: 1368–1374.

Doran, P. M. (1995) *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, San Diego.

Elibol, M. (2001) Improvement of antibiotic production by increased oxygen solubility through the addition of perfluorodecalin. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 76 (4): 418-422.

Elibol, M., Mavituna, F. (1996) Use of Perfluorocarbon for Oxygen Supply to Immobilised *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Process Biochemistry*. 31 (5): 507-512.

Elibol, M., Mavituna, F. (1998) A remedy to oxygen limitation problem in antibiotic production: addition of perfluorocarbon. *Biochemical Engineering Journal*. 3 (1): 1-7.

Francés, J., A. Bonaterra, M. C. Moreno, J. Cabrefiga, E. Badosa, E. Montesinos (2005) Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*. 39: 299–307.

Giridhar, R., Srivastava, A.K. (2000) Productivity enhancement in L-sorbose fermentation using oxygen vector. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 537-541.

Janisiewicz, WJ. (1997) Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits. In: *Plant-microbe interactions and biological control*. Boland GJ & Kuykendall LD (Eds). pp: 171-198. Marcel Dekker, New York.

Jia, S., M. Wang, P. Kahar, Y. Park, M. Okabe (1997) Enhancement of Yeast Fermentation by Addition of Oxygen Vectors in Air-Lift Bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84 (2): 176-178.

Jia, S., P. Li, Y. S. Park, M. Okabe (1996) Enhanced Oxygen Transfer in Tower Bioreactor on Addition of Liquid Hydrocarbons. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 82 (2): 191-193.

Jianlong, W. (2000) Enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* using n-dodecane as an oxygen-vector. *Process Biochemistry*. 35: 1079-1083.

King, A. T., J. Bray, B. J. Mulligan and K. C. Lowe (1990) Biocompatibility Assessment of perfluorochemical oils in microbial and plant cell cultures. *Biotechnology Techniques*. 4 (3): 195-200.

Lai, L.-S. T., T.-H. Tsai, T. C. Wang (2002) Application of Oxygen Vectors to *Aspergillus terreus* Cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94 (5): 453-459.

Lee, B.-S., Kim, E.-K. (2004) Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. *Enzyme and Microbial Technology*. 35 (6-7): 639-647.

Lima Costa, M. E., S. Raposo, A. Clemente, M. S. S. Pais, J. M. S. Cabral (1997) Mass transfer studies on *Cynara cardunculus* L. & *Centaurea calcitrapa* suspension cultures. The influence of oxygen vectors.

Liu, Y.S., Wu, J.Y. (2006) Use of n-hexadecane as an oxygen vector to improve *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Journal of Applied Microbiology*. 5: 1364-5072.

Lopes da Silva, T., A. Reis, J. C. Roseiro, C. J. Hewitt (2008) Physiological effects of the addition of n-dodecane as an oxygen vector during steady-state *Bacillus licheniformis* thermophilic fermentations perturbed by a starvation period or a glucose pulse. *Biochemical Engineering Journal*. 42: 208–216.

Manso, T., F. Antunes, C. Nunes, D. Neto, J. Pardão, S. Raposo, M. E. Lima-Costa (2007) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* PBC-1 using by-product from carob industry as carbon source. *Book of Abstracts II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007)*: 723.

Manso, T., C. Nunes, S. Raposo, F. Antunes, M. E. Lima-Costa (submetido) Carob Pod as Raw material to produce the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1

Martin, S., P. Soucaille, J. S. Condoret (1995) Bubble free gaseous transfer in bioreactors using perfluorocarbons. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 13 (6): 293-300.

Mendes, A., P. Guerra, V. Madeira, F. Ruano, T. Lopes da Silva, A. Reis (2007) Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 1209–1215.

Menge, M., J. Mukherjee, T. Scheper (2001) Application of oxygen vectors to *Claviceps purpurea* cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55 (4): 411-416.

Nunes, C., J. Usall, N. Teixidó, E. Fons and I. Viñas (2002a) Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 247-255.

Nunes, C., J. Usall, N. Teixidó and I. Viñas (2002b) Improvement of *Candida sake* biocontrol activity against post-harvest decay by the addition of ammonium molybdate. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 927–935.

Nunes, C., J. Usall, N. Teixidó, I. Viñas (2001) Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology*. 70: 53–61.

Nunes, C., M. Bajji, V. Stepien, T. Manso, R. Torres, J. Usall, M. Haïssam Jijakli (2007) Development and application of a SCAR marker to monitor and quantify populations of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Postharvest Biology and Technology*. 47: 422–428.

Owen, R.W., R. Haubner, W.E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, B. Haber (2003) Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*. 41: 1727–1738.

Petit, M. D., Pinilla, J. M. (1994) Production and Purification of a Sugar Syrup from Carob Pods. *Lebensm.-Wiss u-Technol*. 28: 145-152.

Rizzo, V., F. Tomaselli, A. Gentile, S. La Malfa, E. Maccarone (2004) Rheological Properties and Sugar Composition of Locust Bean Gum from Different Carob Varieties (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 7925–7930.

Rols, J. L., Goma, G. (1991) Enhanced Oxygen Transfer Rates in Fermentation Using Soybean Oil-in-Water Dispersions. *Biotechnology Letters*. 13 (1): 7-12.

Rols, J. L., J.S. Condoret, C. Fonade, and G. Goma (1989) Mechanism of Enhanced Oxygen Transfer in Fermentation Using Emulsified Oxygen-Vectors. *Biotechnology and Bioengineering*. 35: 427-435.

Roseiro, J. C., F. M. Gírio, M. T. Amaral-Collaço (1991a) The Influence of Storage Stability on the use of Carob Pulp Aqueous Extract as Raw Material for Fermentation Processes. *Lebensm. Wiss. u Technol*. 24: 508-512.

Roseiro, J. C., F. M. Gírio, M. T. Amaral-Collaço (1991b) Yield Improvements in Carob Sugar Extraction. *Process Biochemistry*. 26: 179-182.

Santos, M., A. Rodrigues, J. A. Teixeira (2005) Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*. 25: 1–6.

Torres, R., C. Nunes, J. M. García, M. Abadías, I. Viñas, T. Manso, M. Olmo, J. Usall (2007) Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations. *European Journal of Plant Pathology*. 118: 73–83.

Trotel-Aziz, P., M. Couderchet, S. Biagianti, A. Aziz (2007) Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*. 64: 21–32.

Usall, J., J. Smilanick, L. Palou, N. Denis-Arrue, N. Teixidó, R. Torres, I. Viñas (2008) Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 50: 1–7.

Wei, D. zh., Liu, H. (1998) Promotion of L-asparaginase production by using n-dodecane. *Biotechnology Techniques*. 12 (2): 129-131.

Xu, F., Q.-P. Yuan, Y. Zhu (2006) Improved production of lycopene and b-carotene by *Blakeslea trispora* with oxygen-vectors. *Process Biochemistry*. 42: 289–293.

Yousif, A. K., H.M. Alghzawi (1999) Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*. 69: 283-287.

Zhang, J.-G., X.-D. Wang, J.-N. Zhang, D.-Z. Wei (2007) Oxygen Vectors Used for S-Adenosylmethionine Production in Recombinant *Pichia pastoris* with Sorbitol as Supplemental Carbon Source. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 105 (4): 335–340.

Anexos

Anexo A - Curvas de Calibração

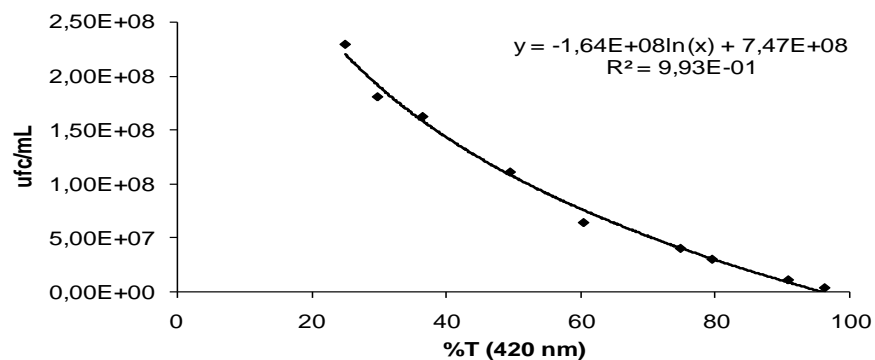


Figura A1 Correlação entre %T (420 nm) e concentração de ufc/mL.



Figura A2 Curva de calibração para quantificação dos açúcares redutores. Valores médios \pm erro padrão, n=3.

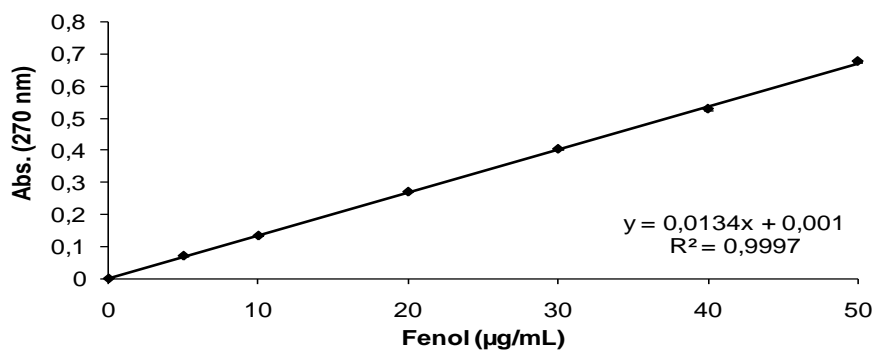


Figura A3 Curva de calibração para quantificação dos fenóis. Valores médios \pm erro padrão, n=3.

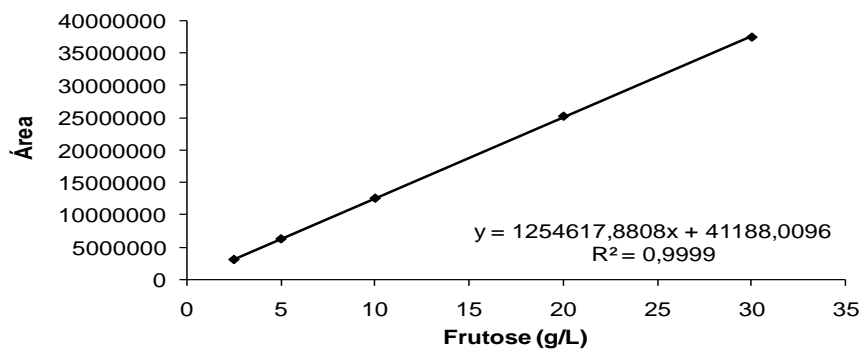


Figura A4 Curva de calibração do padrão de frutose da análise de açúcares por HPLC. Tempo de retenção médio de 5,7 minutos.

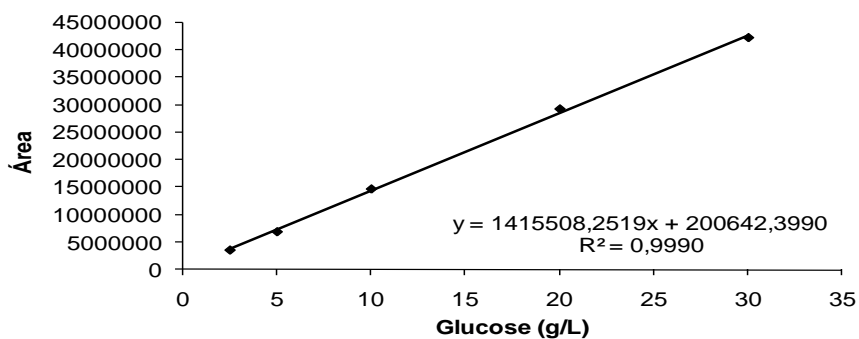


Figura A5 Curva de calibração do padrão de glucose da análise de açúcares por HPLC. Tempo de retenção médio de 6,2 minutos.

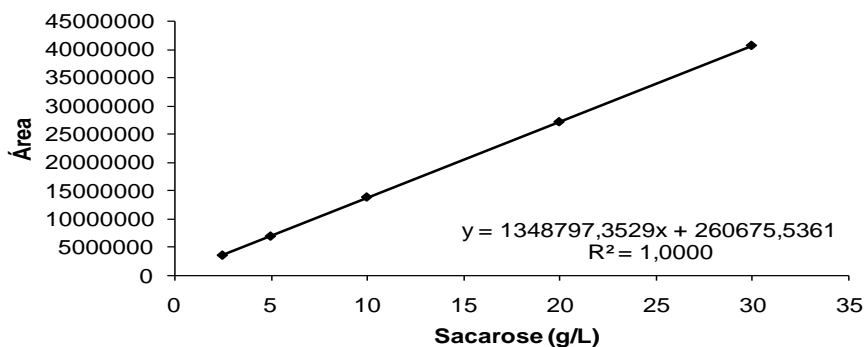


Figura A6 Curva de calibração do padrão de sacarose da análise de açúcares por HPLC. Tempo de retenção médio de 8,2 minutos.

Anexo B - Tabelas e Gráficos Complementares ao Estudo do $K_{L,a}$

Agitador em hélice em água

Tabela B1 Valores de $K_{L,a}$ determinados pelo método dinâmico em água em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{L,a}$ (h^{-1})		
100	4,00	5,27	6,55
150	3,84	5,21	6,76
200	5,33	5,62	7,24
300	6,52	7,60	9,86

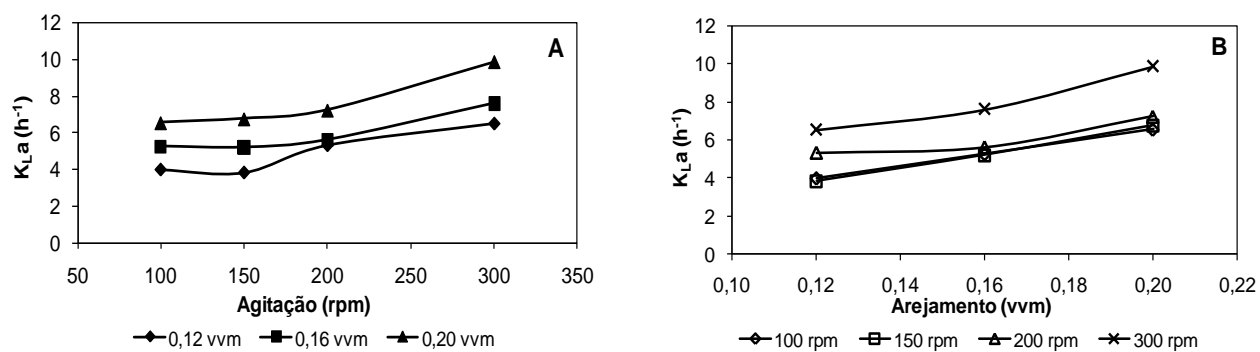


Figura B1 Variação dos $K_{L,a}$ determinados pelo método dinâmico em água em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Agitador em hélice em n-hexadecano 0,5%

Tabela B2 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-hexadecano 0,5% (v/v) em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{La} (h^{-1})$		
100	4,00	4,95	5,16
150	4,03	4,92	4,99
200	4,18	5,39	5,30
300	5,47	6,88	7,68

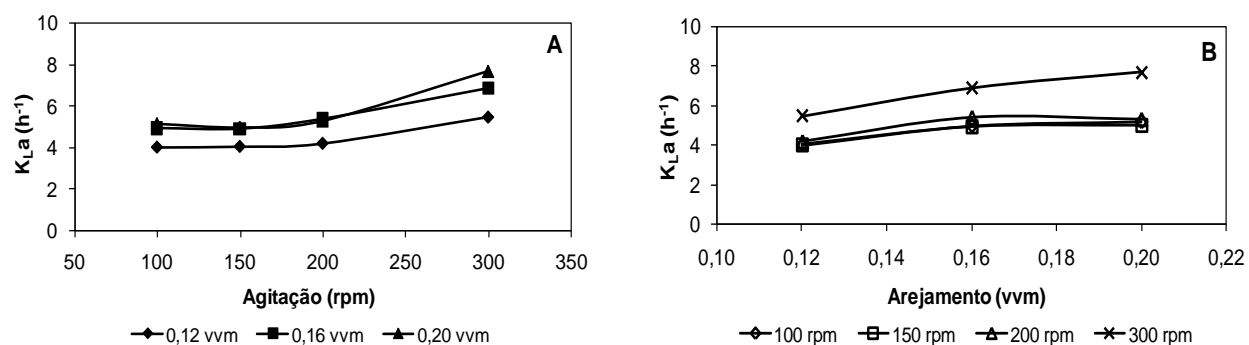


Figura B2 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-hexadecano 0,5% (v/v) em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Agitador em hélice em n-hexadecano 1%

Tabela B3 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-hexadecano 1% (v/v) em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{La} (h^{-1})$		
100	5,10	5,27	5,71
150	4,71	5,38	6,49
200	5,18	5,68	7,11
300	2,60	4,39	5,03

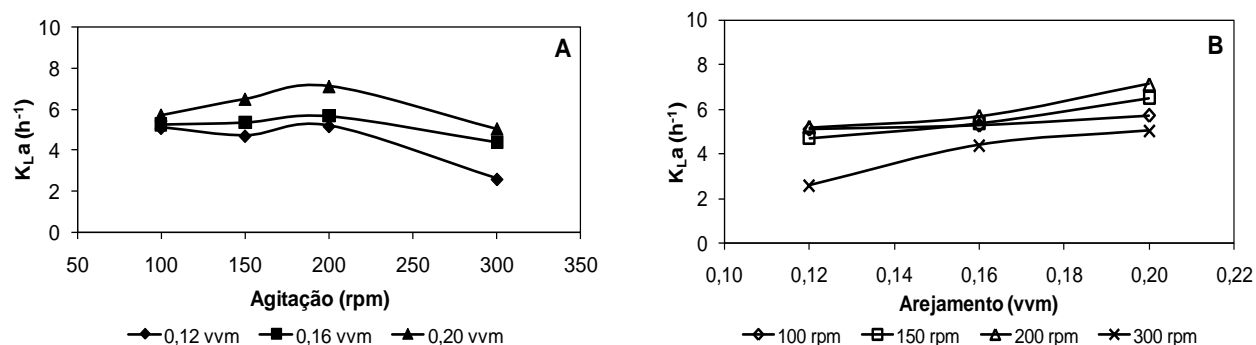


Figura B3 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-hexadecano 1% (v/v) em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Agitador em hélice em n-dodecano 0,5%

Tabela B4 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 0,5% (v/v) em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{La} (h^{-1})$		
100	5,07	4,58	6,05
150	4,95	4,28	5,75
200	5,80	4,78	6,22
300	2,76	1,17	3,61

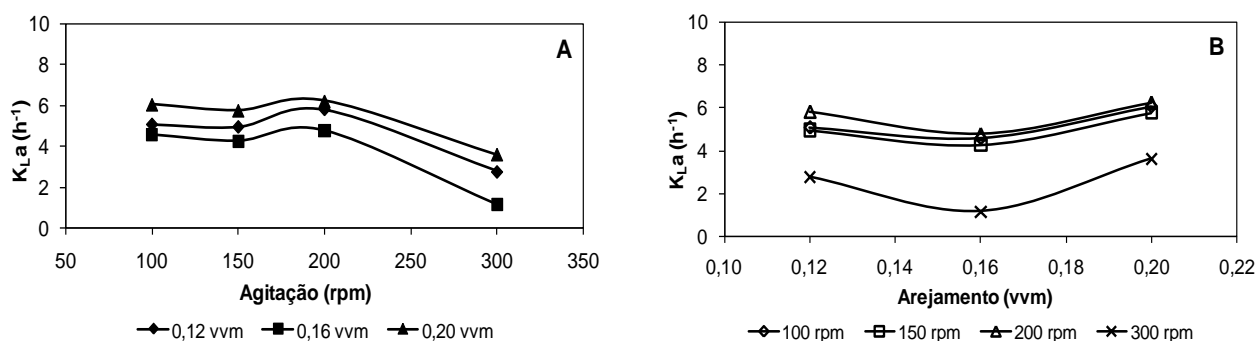


Figura B4 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 0,5% (v/v) em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Agitador em hélice em n-dodecano 1%

Tabela B5 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 1% (v/v) em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{La} (h^{-1})$		
100	4,02	4,91	7,36
150	4,12	5,86	6,88
200	4,23	7,03	7,49
300	3,40	11,84	9,19

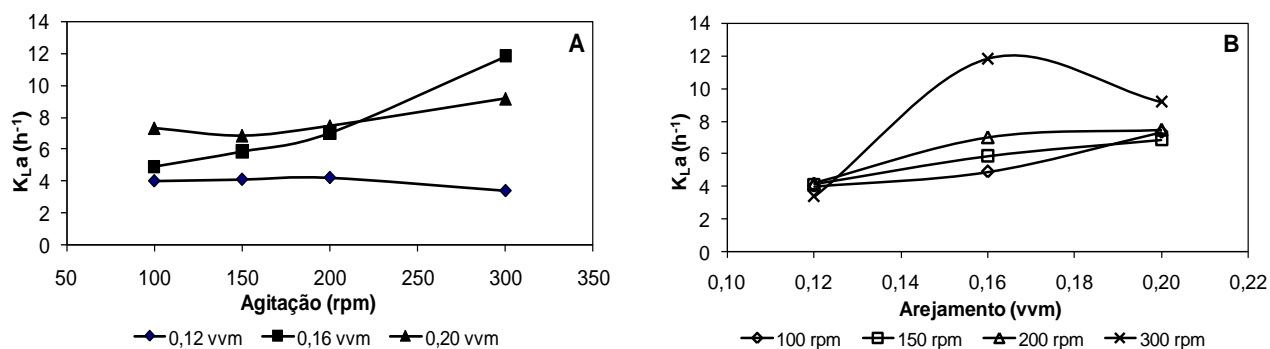


Figura B5 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 1% (v/v) em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Agitador em hélice em n-dodecano 5%

Tabela B6 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 5% (v/v) em biorreactor de 3 L usando um agitador em hélice, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{La} (h^{-1})$		
100	5,12	5,76	8,56
150	5,13	7,24	9,22
200	5,83	8,31	10,58
300	6,38	18,71	13,69

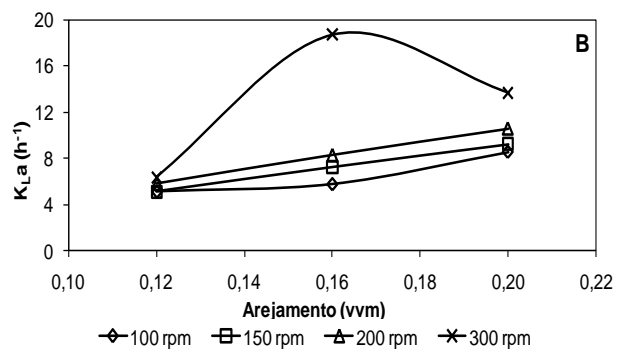
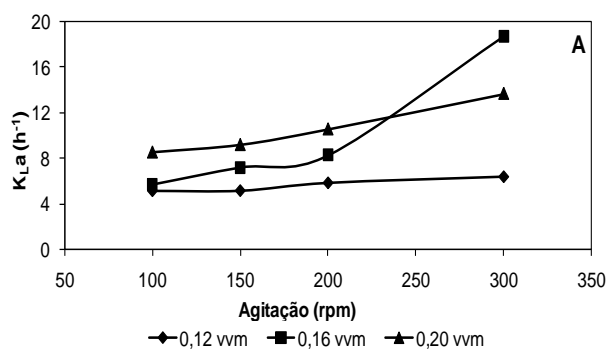


Figura B6 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 5% (v/v) em biorreactor de 3 L com um agitador em hélice, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Turbina Rushton em água

Tabela B7 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em água em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{La} (h^{-1})$		
100	3,81	5,33	6,66
150	4,00	5,47	6,82
200	4,51	6,16	7,53
300	5,53	7,47	9,44

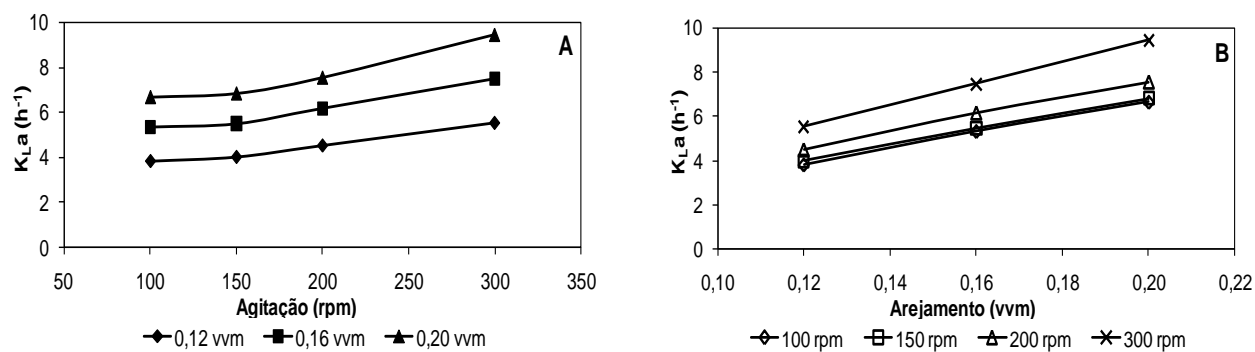


Figura B7 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em água em biorreactor de 3 L com uma turbina Rushton, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Turbina Rushton em n-hexadecano 0,5%

Tabela B8 Valores de $K_{L,a}$ determinados pelo método dinâmico em n-hexadecano 0,5% (v/v) em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{L,a}$ (h^{-1})		
100	3,61	4,10	5,35
150	3,74	4,72	5,58
200	5,56	5,69	8,09
300	4,51	4,85	6,54

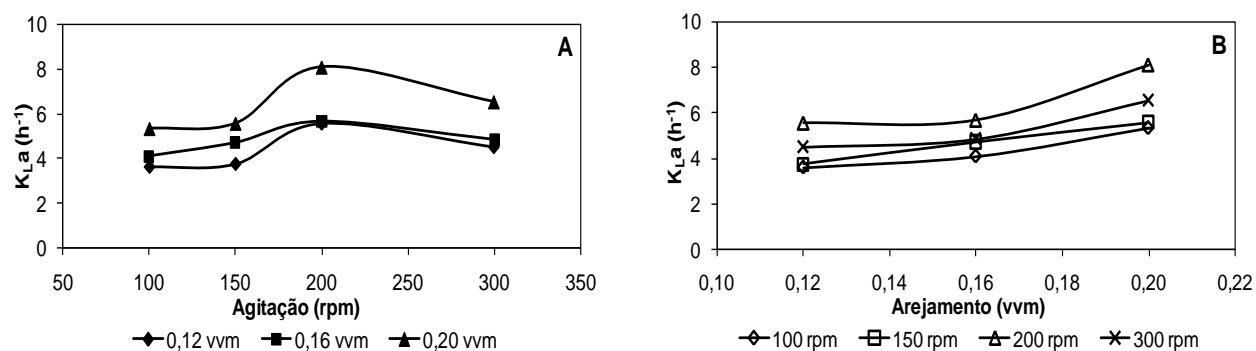


Figura B8 Variação dos $K_{L,a}$ determinados pelo método dinâmico em n-hexadecano 0,5% (v/v) em biorreactor de 3 L com uma turbina Rushton, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Turbina Rushton em n-hexadecano 1%

Tabela B9 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-hexadecano 1% (v/v) em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	K_{La} (h^{-1})		
100	3,46	4,03	4,78
150	3,62	4,45	5,15
200	5,33	4,87	5,70
300	3,98	6,55	5,78

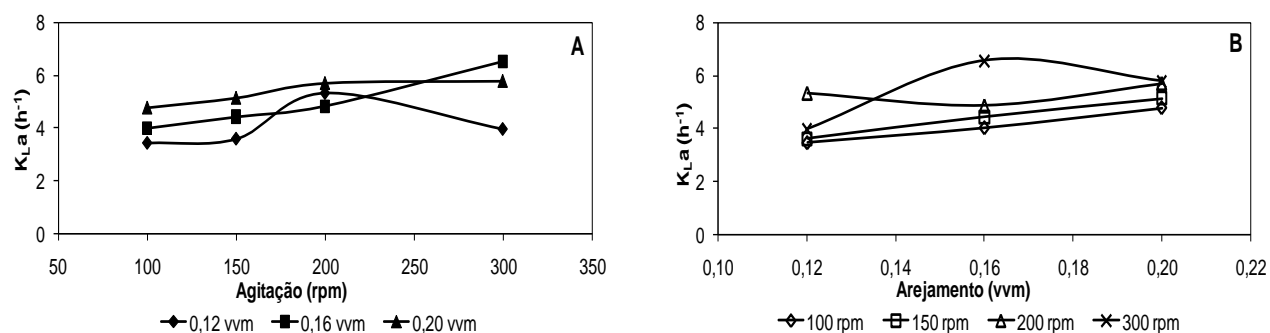


Figura B9 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-hexadecano 1% (v/v) em biorreactor de 3 L com uma turbina Rushton, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Turbina Rushton em n-dodecano 0,5%

Tabela B10 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 0,5% (v/v) em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	$K_{La} (h^{-1})$		
100	3,57	4,75	6,56
150	3,94	5,23	6,74
200	4,09	5,79	7,61
300	8,86	10,03	17,10

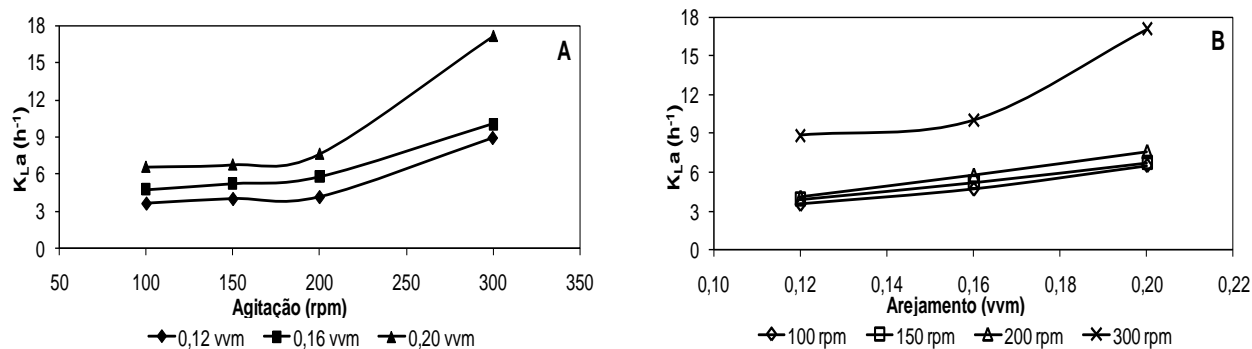


Figura B10 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 0,5% (v/v) em biorreactor de 3 L com uma turbina Rushton, em função da agitação (A) e do arejamento (B).

Turbina Rushton em n-dodecano 1%

Tabela B11 Valores de K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 1% (v/v) em biorreactor de 3 L usando uma turbina Rushton, com velocidades de agitação de 100, 150, 200 e 300 rpm e arejamento de 0,12, 0,16 e 0,20 vvm.

Agitação (rpm)	Arejamento (vvm)		
	0,12	0,16	0,20
	K_{La} (h^{-1})		
100	4,47	5,85	6,73
150	4,84	6,02	7,21
200	5,96	6,60	8,80
300	18,74	19,00	33,80

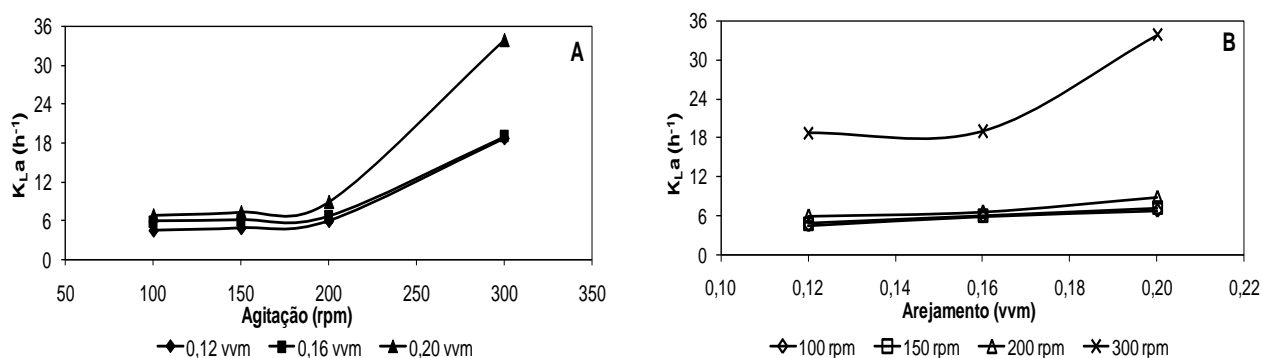


Figura B11 Variação dos K_{La} determinados pelo método dinâmico em n-dodecano 1% (v/v) em biorreactor de 3 L com uma turbina Rushton, em função da agitação (A) e do arejamento (B).