

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química

*Este exemplar corresponde
à retenção final do Tese
Maria Moraes e aprovada
pela comissão julgadora em
17/12/91*

M.H. Santana

ESTUDO DA OXIDAÇÃO DE ETANOL A ÁCIDO ACÉTICO
POR CÉLULAS DO GÊNERO ACETOBACTER LIVRES
E IMOBILIZADAS EM GÉIS HIDROFÍLICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

Ângela Maria Moraes 794
Autora

Profª Dra. Maria Helena Andrade Santana
Orientadora

Campinas
1991

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química

ESTUDO DA OXIDAÇÃO DE ETANOL A ÁCIDO ACÉTICO
POR CÉLULAS DO GÊNERO ACETOBACTER LIVRES
E IMOBILIZADAS EM GÉIS HIDROFÍLICOS

Autora : Ângela Maria Moraes

Tese submetida à comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovado por :



Prof^ª Dra. Maria Helena Andrade Santana



Prof^ª Dra. Sílvia Yuko Eguchi



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Campinas, 17 de Dezembro de 1991.

Ao Paulo, meu grande amor
A Clementina e Tarcílio,
meus grandes amigos

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Maria Helena Andrade Santana, pela valiosa orientação, pela amizade e pelo constante incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Sílvia Yuko Eguchi, pelas excelentes sugestões e por toda a extensa colaboração.

A Álvaro Alberto Araújo, Ricardo C. Ottoni Fernandes, Fernando Luis Neves e Sônia A. Ferraz Campos, pelo inestimável apoio prestado durante a execução do trabalho experimental.

A Eliana Ribeiro da Silva, pela valorosa ajuda.

À Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", pelo apoio, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos colegas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", que tão bem me receberam e tanto me ensinaram. A colaboração e amizade de vocês será sempre lembrada.

A todos os meus familiares e amigos, pelo estímulo e carinho.

A Paulo de Tarso Vieira e Rosa, pelo apoio incansável, pela paciência, pela disposição e por toda a ajuda recebida ao longo de sete anos de deliciosa convivência.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

Objetivou-se, com o presente trabalho, desenvolver uma sistemática de preparação de inóculo celular de concentração adequada, estudar a influência das condições de preparação de um biocatalisador no comportamento do processo de oxidação do etanol a ácido acético e testar o seu desempenho na fermentação contínua.

Dentro deste contexto, realizou-se experimentos envolvendo células do gênero *Acetobacter* livres e imobilizadas em géis hidrofílicos à base de *k*-carragena, alginato de sódio e pectina cítrica. Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados e em biorreator de leito fluidizado trifásico não convencional, de geometria cilíndrico-cônica.

A estrutura porosa dos suportes foi caracterizada através da permeabilidade de leitos constituídos por partículas de gel.

Concluiu-se que tanto a natureza como a preparação da matriz do suporte são muito importantes na atividade e desempenho do biocatalisador. As variáveis envolvidas na imobilização influem conjuntamente no sucesso da fermentação acética, através de fatores físicos, químicos e biológicos. Um compromisso entre elas resultará na otimização do biocatalisador, cujas condições devem ser selecionadas em função da bactéria (muito pequena e pouco resistente à salinidade), aeração (muito intensa), produto (muito ácido) e substrato volátil (etanol).

Os experimentos em biorreator demonstraram uma boa estabilidade do biocatalisador e a necessidade do controle eficiente da evaporação do etanol, devido aos elevados níveis de aeração do processo.

ABSTRACT

In this work, the effects of biocatalysts preparation conditions on the behavior of ethanol oxidation process to acetic acid were studied and a cellular inoculum preparation method was developed.

Experiments involving free and immobilized *Acetobacter* cells in hydrophilic gels containing *k*-carrageenan, sodium alginate or citric pectin on their composition were carried out in shaking flasks and in a non-conventional three-phase fluidized bed reactor.

The porous structure of gels was evaluated by the permeability of beds composed of gel particles.

The kind of support and the matrix preparation conditions affect the biocatalyst activity and stability. Due to physical, chemical and biological factors, the variables involved in the immobilization process simultaneously affect the success of the acetic fermentation.

The choice of the immobilization conditions should take into account the bacteria (being too small and having low salinity resistance), the aeration demanded (too large), the reaction product (too acid) and the volatile substrate (ethanol).

The tests carried out on the bioreactor showed a good mechanical stability of biocatalyst and need of an ethanol evaporation efficient control, due to high aeration levels in the system.

NOMENCLATURA

- A - área da seção transversal do leito
- B - constante
- C - constante
- C_{E_0} - concentração inicial de etanol no meio de cultura, (mol/l)
- C_{OD} - concentração de oxigênio dissolvido, (kmol * m⁻³)
- D - constante
- dp - diâmetro da partícula de gel
- E - constante
- F - constante
- G - constante
- H - constante
- I - constante
- J - constante
- k - permeabilidade do leito
- k_{La} - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
- L - comprimento do leito
- M_P - massa de ácido acético formada por litro de meio de cultura, (g/l)
- m_P - massa de ácido acético produzida durante a fermentação, (g)
- NA - número de moles de ácido acético
- NA_0 - número de moles iniciais de ácido acético
- NA_P - número de moles produzidos de ácido acético
- NE - número de moles de etanol
- NE_0 - número de moles iniciais de etanol
- n_x - número total de células
- P - concentração de ácido acético, (g/l)
- PM_P - peso molecular do ácido acético
- P_0 - concentração inicial de ácido acético, (g/l)
- q - vazão de escoamento do fluido
- Q_{O_2} - taxa de respiração específica, (kmol*kg⁻¹células secas*s⁻¹)
- Tamb - temperatura ambiente
- Te - temperatura de extrusão, (°C)
- Tg - temperatura de gelificação, (°C)
- tg - tempo de gelificação

V_{MI} - volume de meio de cultura, (l)

X - concentração celular, (g/l)

x_E - fração convertida de etanol

$Y_{P/X}$ - rendimento global de ácido acético, (g de ác. acético/ufc)

Letras Gregas

α - constante

ΔG° - energia livre de Gibbs em um estado de referência, (kJ/mol)

ΔP - queda de pressão

ϵ_s - fração do volume do total do reator ocupado pelas partículas

μ - taxa de crescimento específico, (h^{-1})

μ_p - taxa específica de produção de ácido acético, (g ác. acético * mg^{-1} células secas * h^{-1})

ρ - taxa de formação de produto específica, (g ác. acético * g^{-1} células * h^{-1})

ϑ - viscosidade do fluido

ÍNDICE GERAL

Assunto	Página
Resumo	i
Abstract	ii
Nomenclatura	iii
Capítulo 1 - Introdução	01
Capítulo 2 - Revisão da Literatura	05
2.1. Aspectos Microbiológicos e Bioquímicos da Fermentação Acética	05
2.1.1. Generalidades sobre as bactérias acéticas	05
2.1.2. A biossíntese do ácido acético	06
2.1.3. Condições nutricionais para o crescimento celular e para a produção de ácido acético	09
2.2. Conceitos Básicos Sobre Células Imobilizadas	11
2.2.1. Métodos de imobilização	11
2.2.2. Matrizes de suportes para a imobilização de células	14
2.2.3. Vantagens da utilização de células imobilizadas	29
2.3. Fatores Passíveis de Influenciar o Comportamento de Sistemas que Empregam Células Acéticas Imobilizadas em Géis Hidrofílicos	30
2.3.1. Efeito da concentração inicial de células	31
2.3.2. Efeito da concentração de polímero na matriz de imobilização	31
2.3.3. Efeito do processo de gelificação	32
2.3.4. Crescimento celular na matriz	32
2.3.5. Efeito da concentração e do diâmetro das partículas	34
2.3.6. Influência da temperatura	35

2.3.7.	Efeito do pH	35
2.3.8.	Influência do tempo de residência do meio fermentativo	35
2.3.9.	Efeito da concentração de oxigênio	36
2.3.10.	Influência da concentração de etanol	37
2.3.11.	Efeito da concentração de ácido acético	37
2.4.	Reatores para Células Imobilizadas	39
2.4.1.	Reatores de tanques agitados	39
2.4.2.	Reatores de leito fixo	41
2.4.3.	Reatores de leito fluidizado	42
2.4.4.	Reatores de leito circulante	43
Capítulo 3 - Materiais e Métodos		46
3.1.	Microorganismos	46
3.2.	Meios de Cultura	47
3.2.1.	Caldo manitol	47
3.2.2.	Meio de manutenção	47
3.2.3.	Meio de pré-inóculo	48
3.2.4.	Meio de incubação	48
3.3.	Polissacarídeos para a Imobilização Celular	48
3.4.	Sais Gelificantes	49
3.5.	Equipamentos	49
3.6.	Instalações Experimentais.....	50
3.6.1.	Sistema aquecido para a imobilização celular ..	50
3.6.2.	Sistemas de caracterização da estrutura porosa das matrizes de imobilização	51
3.6.3.	Sistema de fermentação em biorreator	51
3.7.	Métodos Analíticos	55
3.7.1.	Determinação da concentração de etanol	55
3.7.2.	Determinação da concentração de ácido acético .	55
3.7.3.	Determinação da concentração de glicose	55
3.7.4.	Determinação da concentração celular	55
3.7.5.	Determinação do pH	56
3.8.	Procedimentos Experimentais	56
3.8.1.	Preparo dos meios de cultura	57
3.8.2.	Preparo do pré-inóculo	57

3.8.3.	Preparo das partículas de gel contendo células imobilizadas	59
3.8.4.	Testes para a seleção da cepa	60
3.8.5.	Método de obtenção da curva de variação da taxa específica de produção de ácido acético com o tempo de fermentação	61
3.8.6.	Testes para a avaliação dos efeitos das concentrações de cloreto de potássio, cloreto de cálcio, etanol e ácido acético no processo fermentativo	61
3.8.7.	Testes para a verificação da influência do polímero e do meio de gelificação na atividade do biocatalisador	64
3.8.8.	Testes para a avaliação do desempenho do biocatalisador, utilizando-se carragena como suporte de imobilização	64
3.8.9.	Testes para a avaliação dos efeitos das variáveis da imobilização na estrutura final do suporte	64
3.8.10.	Testes para a avaliação do efeito da imobilização na respiração celular	65
3.8.11.	Método de cálculo da conversão de etanol e da produção de ácido acético	67
3.8.12.	Cálculo do rendimento global	67
3.8.13.	Testes do sistema de fermentação em biorreator	68
3.8.13.1.	Fermentações com células livres	69
3.8.13.2.	Fermentações com células imobilizadas	69
Capítulo 4 - Resultados e Discussão		71
4.1.	Desenvolvimento e Padronização de Metodologia para a Obtenção do Inóculo Celular	71
4.2.	Fermentações com Células Livres	72
4.2.1.	Verificação da produtividade dos microrganismos utilizados e de suas características fermentativas	72

4.2.2.	Efeito da concentração inicial de etanol no processo fermentativo	76
4.2.3.	Efeito da concentração inicial de ácido acético no processo fermentativo	76
4.2.4.	Efeito das presenças isoladas de cloreto de potássio e de cloreto de cálcio no processo fermentativo	78
4.3.	Experimentos com Células Imobilizadas	80
4.3.1.	Caracterização dos efeitos da imobilização celular no processo fermentativo	80
4.3.1.1.	Influência do tipo de suporte	82
4.3.1.2.	Influência da concentração inicial de células	84
4.3.1.3.	Influência do meio de gelificação	87
4.3.1.4.	Influência do tempo de gelificação, da concentração de polissacarídeo e da concentração de agente gelificante ...	90
4.3.2.	Caracterização de leitos constituídos por partículas de géis hidrofílicos	95
4.3.2.1.	Efeito do tipo de polissacarídeo nos perfis de queda de pressão	101
4.3.2.2.	Efeito da presença de células nos perfis de queda de pressão	101
4.3.2.3.	Influência do meio de gelificação nos perfis de queda de pressão	101
4.3.2.4.	Efeito da concentração do agente gelificante e do tempo de gelificação nos perfis de queda de pressão	103
4.3.2.5.	Efeito da concentração de polímero nos perfis de queda de pressão	103
4.3.3.	Avaliação do processo de gelificação no desempenho global do biocatalisador	104
4.3.4.	Efeito da imobilização na respiração celular... ..	108
4.4.	Testes do Sistema de Fermentação em Biorreatores.....	110
4.6.1.	Fermentações com células livres	110
4.6.2.	Fermentações com células imobilizadas	111

Capítulo 5 - Conclusões e Sugestões	120
5.1. Conclusões	120
5.2. Sugestões	122
Capítulo 6 - Referências Bibliográficas	123
Anexo A	129
Anexo B	131
Anexo C	132
Anexo D	151

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da História, o Homem tem utilizado diversos materiais como catalisadores de muitas reações. O emprego de processos catalíticos homogêneos ou heterogêneos, possibilitando rotas cinéticas mais vantajosas que as térmicas, permite operações industriais mais rápidas, mais seletivas e mais econômicas.

Assim, o estudo dos catalisadores e de seu mecanismo de ação, bem como da cinética das reações catalíticas e do projeto de reatores específicos, é fundamental para o desenvolvimento tecnológico da indústria química.

Tendo em vista estes aspectos, pode-se observar que uma das notáveis características da matéria viva é a sua capacidade no controle eficiente da cinética das reações que ocorrem no interior de suas células. Este controle eficiente e preciso é devido à ação catalítica de algumas proteínas denominadas enzimas.

Desta forma, o emprego de microrganismos como biocatalisadores para a obtenção de determinadas substâncias é bastante visado, uma vez que estes seres têm grande poder de multiplicação e são adaptáveis a variadas situações nutricionais, modificando seu metabolismo de acordo com o suprimento ou a carência de nutrientes no meio, o que permite uma ampla flexibilidade em sua utilização.

Com o objetivo de se reunir as vantagens do emprego de células como biocatalisadores, e a facilidade de separação dos catalisadores inorgânicos utilizados em reações heterogêneas, tem-se estudado meios de se dispor tais microrganismos em uma forma insolúvel ao substrato, ou seja, imobilizados em um suporte sólido. Desta maneira, pode-se obter catalisadores de elevada especificidade ao substrato e que, ao final do processo reativo, podem ser facilmente separados do produto, simplificando as etapas de purificação, com conseqüentes vantagens econômicas.

O ácido acético é de grande importância como insumo na

indústria química, sendo utilizado na fabricação de vários produtos de interesse comercial, tais como o acetato de vinila, acetato de celulose, anidrido acético, anidrido tereftálico, dimetiltereftalato, acetato de amônio e outros. Dele provêm os intermediários para a fabricação de plásticos, detergentes, tintas, borrachas, solventes, fibras têxteis e produtos farmacêuticos. Além disto, o ácido acético tem importantes aplicações na indústria alimentícia, como acidulante, e na conservação de alimentos.

A produção de ácido acético a partir de etanol pode ser feita por via química ou bioquímica. No primeiro caso, os processos são catalíticos e podem ser conduzidos em fase líquida ou vapor, sendo que na fase líquida estão envolvidas duas etapas básicas, a produção de acetaldeído e sua posterior oxidação a ácido acético. Se conduzida em fase vapor, a produção de ácido acético emprega catalisadores de caráter altamente oxidante, como platina e paládio, além de temperaturas superiores a 150°C e, apesar das elevadas conversões obtidas por passe no reator, há desvantagens como perdas por oxidação total, presença de acetaldeído e acetato de etila como subprodutos, além do elevado custo dos materiais catalíticos [1].

A rota bioquímica, em comparação com a química, oferece condições de operação bem mais brandas, como temperaturas em torno de 30°C, além da rota direta e da elevada seletividade da reação, embora os níveis de conversão de etanol por passe no reator sejam mais baixos e exista a necessidade de separação do ácido acético do meio de fermentação.

Os processos de produção de ácido acético a partir de líquidos alcoólicos, por via bioquímica, são conhecidos há cerca de dez mil anos. Romanos e gregos produziam vinagre a partir de vinho exposto ao ar. Até a Idade Média, o vinagre era produzido apenas para consumo local, passando então a ser manufaturado industrialmente em dornas horizontais abertas. Tais processos eram lentos e caracterizavam-se pelo desenvolvimento de um filme bacteriano, que flutuava na superfície do vinho. No século XIX, foram desenvolvidas fermentações mais rápidas. Em 1923, destacou-se o processo que utilizava os chamados geradores. Em

1949, surgiram os processos submersos, aperfeiçoados pela companhia alemã de H. Frings que, assim como aqueles envolvendo os antigos geradores, são utilizados até os dias de hoje, devido ao sabor do produto final [2].

Durante os últimos anos, as vantagens da utilização de biorreatores contendo células imobilizadas viáveis têm sido reconhecidas, originando uma vasta gama de publicações. Diferentes técnicas têm sido empregadas para a imobilização celular e o uso de polissacarídeos para o envolvimento de microrganismos em géis hidrofílicos, como o *k*-carragena, o alginato de sódio e a pectina cítrica, é bastante atrativo, devido à simplicidade e rapidez do método, bem como ao baixo custo dos reagentes de imobilização, favorecendo sua aplicação em larga escala. Em particular para o ácido acético, ainda são poucos os trabalhos com células imobilizadas, os quais tratam da verificação da influência de variáveis operacionais em processos contínuos e de estudos de transferência e demanda de oxigênio pelas células imobilizadas.

Este trabalho insere-se em uma linha de pesquisa voltada para o estudo da produção de ácido acético a partir de etanol, por processos fermentativos, utilizando células do gênero *Acetobacter*. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho é estudar a influência de variáveis envolvidas na preparação do biocatalisador na produção de ácido acético, e verificar o seu desempenho na fermentação contínua. O trabalho envolveu a realização de experimentos com células do gênero *Acetobacter* nas formas livre e imobilizada em géis hidrofílicos.

Inicialmente, foi desenvolvida e padronizada uma metodologia para a preparação de inóculo ativo de elevada densidade celular, que se mostrou fundamental para a imobilização de células viáveis e para a reprodutibilidade dos resultados.

Nos experimentos com células livres, verificou-se o comportamento da fermentação acética em batelada com quatro linhagens de microrganismos, entre as quais selecionou-se a de melhores características cinéticas. Para esta linhagem, determinou-se os efeitos inibidores do etanol e do ácido acético, estabelecendo-se concentrações adequadas destes compostos no meio de cultura. Em etapas posteriores, foram realizados experimentos

para verificar os efeitos do cloreto de potássio e do cloreto de cálcio, utilizados como agentes gelificantes na imobilização das células.

Nos experimentos com células imobilizadas, foram utilizados suportes à base de *k*-carragena, alginato de sódio e pectina cítrica, com duas condições de concentração inicial de células e meio de gelificação. Os melhores resultados foram obtidos com o gel de carragena, com o qual estudou-se a influência do tempo de gelificação e das concentrações de gelificante e de polímero na matriz do gel. A estrutura porosa dos suportes foi caracterizada através da permeabilidade de leitos de géis, obtida através do acompanhamento da variação da queda de pressão ao longo do tempo, durante o escoamento de uma solução aquosa de sacarose a 1,5 %.

Para a realização dos experimentos em biorreator, foi montada uma instalação em escala de bancada. As fermentações foram conduzidas em batelada e em contínuo, com células livres e imobilizadas, verificando-se o desempenho do biocatalisador quanto à conversão do etanol e à estabilidade no processo.

A metodologia utilizada e os resultados obtidos são apresentados nos capítulos subseqüentes.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

Ao longo dos últimos anos, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas visando ao estudo da produção das mais variadas substâncias através da utilização de microrganismos imobilizados em inúmeros suportes. Entre os trabalhos publicados, selecionou-se alguns de forma que se pudesse abordar os seguintes tópicos : i) aspectos microbiológicos e bioquímicos da fermentação acética; ii) conceitos básicos sobre células imobilizadas; iii) fatores passíveis de influenciar o comportamento de sistemas que empregam células acéticas imobilizadas em géis hidrofílicos; iv) reatores para células imobilizadas.

2.1. Aspectos Microbiológicos e Bioquímicos das Fermentação Acética

2.1.1. Generalidades sobre as bactérias acéticas

A transformação do etanol a ácido acético através de bactérias foi inicialmente verificada por Louis Pasteur, sendo então denominada "fermentação acética", e considerada como característica destes microrganismos [3].

Embora existam muitas bactérias produtoras de ácido acético, apenas as pertencentes ao grupo designado de "bactérias acéticas" são empregadas comercialmente.

Segundo diversos autores [2, 3, 4], as bactérias acéticas podem ser classificadas nos gêneros *Gluconobacter* e *Acetobacter*, sendo que o primeiro grupo oxida o etanol somente a ácido acético, e o segundo é capaz de, inicialmente, oxidar o etanol a ácido acético e, posteriormente, em determinadas condições, pode oxidar o ácido acético a dióxido de carbono e água.

Estes microrganismos são polimorfos, podendo ter forma de bastões ou elipses, de dimensões variando de 0,6 a 0,8 μm por 1,0 a 4,0 μm , no caso de células de *Acetobacter*, e de 0,5 a 0,8 μm por

0,9 a 4,2 μm , no caso de *Gluconobacter*, sendo bastante ou levemente curvos. Podem ocorrer isoladamente, em pares ou em cadeias. Têm motilidade ou não, sendo que os membros do gênero *Gluconobacter* podem ou não possuir flagelos polares, enquanto que os do gênero *Acetobacter* podem possuir flagelos peritricos. Estes microrganismos são Gram-negativos ou Gram-variáveis, estritamente aeróbicos e tolerantes a ácidos [4].

Segundo Crueger e Crueger [2], as linhagens empregadas comercialmente na produção de ácido acético pertencem às espécies *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. peroxidans* e *G. oxydans*, além de suas subespécies, sendo que, durante o processo fermentativo, é comum o desenvolvimento de culturas mistas, particularmente no caso de processos de superfície.

2.1.2. A biossíntese do ácido acético

A síntese do ácido acético ocorre devido à oxidação incompleta do etanol contido em soluções aquosas diluídas, em presença de oxigênio, de acordo com a equação básica que se segue [4, 5].



Esta reação ocorre em duas etapas. No primeiro passo, o etanol é transformado em acetaldeído através da enzima álcool-desidrogenase, ligada ao NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) ou ao NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosforilado). Tanto o NAD quanto o NADP agem como aceptores intermediários de hidrogênio, sendo formados durante o processo de respiração, o que torna indispensável a viabilidade celular durante o processo fermentativo. O acetaldeído formado é, então, hidratado e sofre uma nova oxidação, pela ação da enzima acetaldeído-desidrogenase ligada ao NADP, que leva à formação do ácido acético. Este mecanismo pode ser melhor visualizado na Figura 1.

$$\mu = \frac{\alpha}{1 + B (P_0 + C X + D X^2)^2} \quad (2)$$

onde :

μ - taxa de crescimento específico, (h^{-1}).

α , B, C e D - constantes do sistema, de valores maiores que a unidade.

P_0 - concentração inicial de ácido acético, (g/l).

X - concentração celular, (g/l).

Os mesmos autores sugerem que o efeito da concentração do ácido acético sobre a taxa de crescimento específico obedece a seguinte relação :

$$\frac{1}{\mu} = F + G P^2 \quad (3)$$

onde :

F e G - constantes do sistema, de valores maiores que a unidade.

P - concentração de ácido acético, (g/l).

Estes pesquisadores observaram também que graficando-se dados de taxa de crescimento específico contra taxa de formação de produto específica, (ρ), obtém-se curvas parabólicas, as quais podem ser descritas pela seguinte equação, independente da ocorrência de inibição pelo substrato :

$$\rho = H \mu - J \mu^2 \quad (4)$$

onde H e J são constantes do sistema, maiores que a unidade.

Sun e Furusaki [8] observaram que a reação catalisada por células livres de *Acetobacter aceti* obedece à cinética de Michaelis-Menten para reações com um único substrato e, baseados na relação estequiométrica existente entre a produção do ácido acético e o consumo de oxigênio, os autores sugerem a seguinte equação, para concentrações de ácido acético menores que 23 g/l :

$$Q_{O_2} = \frac{0,026 C_{OD}}{0,0175 + C_{OD}} \quad (5)$$

onde :

Q_{O_2} - taxa de respiração específica, ($kmol * kg^{-1} cel. seca * s^{-1}$).

C_{OD} - concentração de oxigênio dissolvido, ($kmol * m^{-3}$).

Além disto, sugerem também que a relação entre a taxa de crescimento específico e a concentração de substrato pode ser expressa na forma de Monod, para concentrações de ácido acético menores que 14 g/l.

$$\mu = \frac{0,424 \text{ } C_{OD}}{0,0337 + C_{OD}} \quad (6)$$

Para concentrações de ácido acético superiores a este valor, os autores propõem a seguinte equação :

$$\mu = \left[\frac{0,424 \text{ } C_{OD}}{0,0337 + C_{OD}} \right] \cdot \left[\frac{1}{1 + 0,013 (P - 14)} \right] \quad (7)$$

Poucos são os trabalhos apresentados na literatura que buscam a modelagem de sistemas que empregam células imobilizadas do gênero *Acetobacter* [5, 8, 9, 10, 11]. Embora os modelos matemáticos empregados por estes autores sejam essencialmente os mesmos sugeridos para células livres, certos fatores, como mudanças fisiológicas causadas pelo processo de imobilização, podem alterar significativamente os valores dos parâmetros inerentes às equações.

2.1.3. Condições nutricionais para o crescimento celular e para a produção de ácido acético

Um aspecto importante na microbiologia da fermentação acética é a determinação dos principais requerimentos nutricionais. A partir da utilização de fermentações submersas, foram desenvolvidas diversas formulações de meios fermentativos, empregando as mais variadas fontes nutricionais, visando ao aumento da produção de ácido acético.

Em um meio sintético, a utilização de sais de amônio pelas bactérias acéticas depende do tipo de fonte de carbono assimilada e, no caso de algumas espécies, da presença de determinados fatores de crescimento [3].

Algumas fontes de carbono recomendadas para o crescimento

destes microrganismos são a glicose, arabinose, manitol e sorbitol. O etanol, o piruvato e o lactato são também utilizados na presença de certos fatores relacionados ao extrato de levedura, triptona e caseína hidrolisada, além de determinadas fontes de nitrogênio [3].

Certas espécies de *Acetobacter*, incapazes de crescer em meios contendo etanol como única fonte de carbono, crescem satisfatoriamente mediante a adição de pequenas quantidades de levedura autolisada, peptona ou extrato de fígado, o que sugere que a atividade promotora de crescimento destas substâncias deve-se a alguns açúcares redutores nelas contidos. Algumas bactérias acéticas, que apresentaram crescimento em meios contendo etanol e glicose, em presença de $\text{CH}_3^{14}\text{CH}_2\text{OH}$, tiveram o ^{14}C do etanol incorporado aos materiais celulares [3].

Algumas linhagens de *Acetobacter* não necessitam da presença de vitaminas quando o meio fermentativo contém glicose [6].

Crueger e Crueger [2] observaram que, para o crescimento ótimo de células de *Acetobacter*, o suprimento de etanol deve estar na faixa de 0,2 a 5 % (v/v).

Segundo Asai [3], a concentração máxima de etanol no meio fermentativo que possibilita a produção de ácido acético varia de 5 a 11 % em volume, dependendo da espécie.

Ghommidh e colaboradores [5] utilizaram, para o cultivo de *Acetobacter aceti*, um caldo fermentativo tamponado contendo etanol na concentração de 40 g/l, além de diversos sais inorgânicos e extrato de levedura, verificando que as limitações no crescimento celular e na produção do ácido acético foram devidas à inibição pelo produto e pelo esgotamento do oxigênio.

Osuga e colaboradores [9], em fermentações contínuas com células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em gel de *k*-carragena, utilizaram um meio de incubação contendo glicose, bacto-peptona, extrato de levedura e ácido acético, nas concentrações de 10 g de cada substância por litro de água destilada, além de 40 ml de etanol, visando ao crescimento das células na matriz do gel. Os mesmos autores propuseram também a utilização de um meio semelhante, contendo apenas 2 g/l de glicose, 2 g/l de extrato de

levedura e 2 g/l de bacto-peptona, além de etanol e ácido acético nas proporções anteriores, de forma a limitar o crescimento celular e permitir a produção de ácido acético.

Sun e Furusaki [10], em fermentações contínuas com *A. aceti* imobilizada em alginato de sódio, empregaram um meio de incubação similar ao proposto por Osuga e colaboradores [9], adicionando apenas 5 g/l de ácido acético e acrescentando 0,5 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Ationu e colaboradores [12] utilizaram um meio fermentativo tamponado, contendo glicose, extrato de levedura e etanol, além de diversos sais inorgânicos, para o crescimento de células de *Acetobacter* e produção de ácido acético.

2.2. Conceitos Básicos Sobre Células Imobilizadas

A utilização de células imobilizadas em processos de larga escala é bastante remota e, embora não fossem conhecidos, os princípios da imobilização já eram amplamente empregados na produção de ácido acético desde os primórdios do século XIX. Neste período, o vinagre era produzido em tanques preenchidos por cavacos de madeira, cerâmica ou carvão, entre outros materiais, sobre os quais eram gotejadas soluções aquosas contendo etanol, propiciando o desenvolvimento de bactérias acéticas na superfície dos suportes [13].

O conceito de células imobilizadas refere-se, então, a microrganismos fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, de tal forma que suas características sejam retidas, possibilitando sua utilização repetida e contínua [14, 15].

2.2.1. Métodos de imobilização

Segundo Hartmeier [16], há seis métodos de imobilização de células viáveis ou não, enzimas ou organelas, os quais podem ser combinados entre si, originando novas técnicas. A Figura 2 ilustra estes métodos.

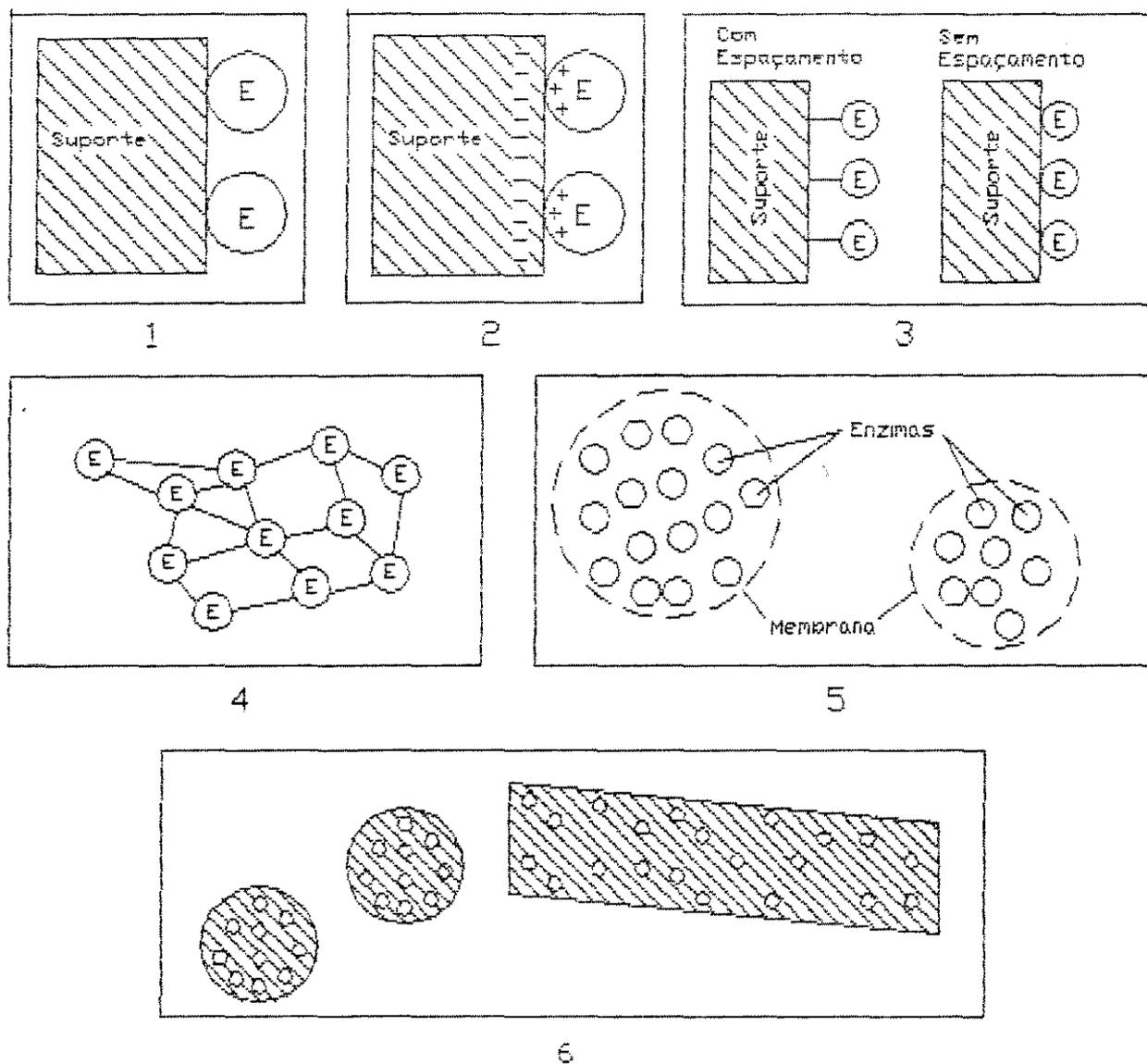


Figura 2 - Métodos de imobilização, adaptados de Hartmeier [16].
 1) Adsorção; 2) Ligação Iônica; 3) Ligação Covalente com e sem Espaçamento; 4) Ligação Cruzada; 5) Confinamento em Membrana; 6) Envolvimento Físico.

Método de Adsorção

Neste caso, a espécie que se deseja imobilizar é ligada à superfície do suporte por forças físicas, como forças de Van der Waals, e por outros tipos de interações, como ligações iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Apesar de simples e rápida, esta técnica apresenta desvantagens devido à relativa fragilidade das forças de adsorção, as quais podem ser rompidas por flutuações na temperatura, no pH e na composição do meio fermentativo.

Método de Ligação Iônica

O método de ligação iônica é baseado na atração eletrostática entre grupos de cargas opostas, presentes no suporte e na espécie que se deseja imobilizar. Este processo é bastante simples, ocorrendo em condições amenas, bastando, normalmente, que se agite as partículas de suporte por um período de tempo na solução ou suspensão que contém o material a ser imobilizado. Outra maneira, é promover o fluxo destas soluções ou suspensões sobre as partículas de suporte contidas em um recipiente.

Embora este método de ligação seja mais estável que a pura adsorção física, ele é susceptível a interferências, especialmente à presença de íons. Para evitar o desligamento do material imobilizado do suporte, deve-se manter a força iônica e o pH adequados.

Método de Ligação Covalente

Na ligação covalente, os átomos são ligados através do compartilhamento de pares eletrônicos, o que pode ser utilizado para se obter fortes ligações entre as espécies de interesse. Este processo é bastante aplicado na imobilização de enzimas, sendo pouco utilizado para células. Uma desvantagem deste método é a tensão à qual se sujeita a enzima, pela intensidade da ligação, o que pode levar a variações consideráveis na conformação enzimática, resultando em perda de parte da atividade catalítica.

Método de Ligação Cruzada

Neste processo, unidades isoladas de células, enzimas ou organelas são ligadas umas às outras através de agentes bi ou multifuncionais, formando, geralmente, agregados insolúveis de

elevado peso molecular. Este método é relativamente simples, tendo no entanto, algumas desvantagens. Geralmente, as partículas obtidas por este método são gelatinosas e pouco resistentes. Quando se emprega substratos de peso molecular elevado e em concentrações reduzidas, o acesso dos mesmos aos sítios ativos é limitado pelas condições desfavoráveis à difusão. Como este método geralmente envolve ligações do tipo covalente, pode ocorrer variação na conformação do material imobilizado, com conseqüente perda de atividade catalítica.

Método de Confinamento em Membrana

Este método tem por objetivo delimitar o espaço no qual o biocatalisador exerce sua atividade, através da utilização de uma membrana semipermeável que permite a difusão de substratos e produtos, retendo a espécie imobilizada em seu interior. As vantagens deste método consistem na boa estabilidade mecânica e química do sistema, além da possibilidade de controle da reação através da difusão seletiva de substratos e produtos.

Método de Envolvimento

Consiste no aprisionamento de células no interior de uma matriz polimérica, geralmente um carboidrato, proteína ou produto sintético, orgânico ou inorgânico. Esta técnica é uma das mais utilizadas entre os métodos de imobilização de células microbianas viáveis, por ser bastante amena. Os poros da matriz formada são de menores dimensões que os microrganismos, que permanecem, então, no interior de sua estrutura, onde se difundem substratos e produtos.

Em alguns casos, apenas o mecanismo do envolvimento é responsável pela inclusão das células. Quando se emprega a pectina ou o carragena, além do envolvimento físico, ocorrem ligações covalentes parciais entre o suporte e as células [17].

2.2.2 Matrizes de suportes para a imobilização de células

A literatura cita a utilização dos mais variados materiais na imobilização celular e, de forma geral, pode-se classificá-los em suportes orgânicos ou inorgânicos. Na Tabela 1, adaptada de Kolot [17], são mostrados os mais comumente utilizados.

Tabela 1 - Tipos de suportes mais utilizados na imobilização de microrganismos, adaptados de Kolot [17].

Compostos Orgânicos			Compostos Inorgânicos	Outros Materiais
A	B	C		
Alginato κ-Carragena Pectina Ágar Celulose	Colágeno Gelatina	Resinas Fenólicas Poliestireno Poliacrilamida Cloroeto de Polivinila Resinas de Troca Iônica	Alumina Sílica Cerâmica Vidro Zircônia Aço Inoxidável	Serragem Celite Bagaço Fragmentos de Madeira Palha

A : Polissacarídeos

B : Proteínas

C : Polímeros Sintéticos

Segundo diversos autores, a seleção do suporte a ser empregado na imobilização de células viáveis envolve a consideração de alguns critérios básicos, entre eles :

- atoxidade;
- não exercer influência negativa no metabolismo celular;
- elevada capacidade de retenção microbiana, de forma que se consiga altas concentrações de células no reator;
- inércia química e bioquímica, para que não ocorra o ataque do microrganismo imobilizado ou do meio onde o biocatalisador está imerso;
- estabilidade na temperatura e pH de operação;
- alta difusividade de reagentes e produtos;
- resistência mecânica adequada às necessidades do processo;
- facilidade de conformação em tamanhos e formas específicas;
- possibilidade de regeneração;
- custo não muito elevado.

Vários autores estudaram a imobilização de células acéticas em variados suportes.

Ationu e colaboradores [12] observaram o desempenho de bactérias acéticas imobilizadas em diversos suportes, durante fermentações conduzidas descontinuamente, em reatores com alimentação gotejante, com reciclo do meio fermentativo, contendo, inicialmente, 40 g de etanol por litro. Os resultados obtidos nestes testes foram avaliados após se alcançar uma população celular estável, podendo ser observados na Tabela 2. Fermentações contínuas realizadas pelos mesmos autores levaram a um aumento significativo na produtividade do ácido acético.

Outros suportes utilizados na imobilização de células viáveis de *Acetobacter* são o óxido de titânio hidratado [18], cerâmica monolítica [5, 11], fibras de polipropileno [19] e géis hidrofílicos [9, 10]. O suprimento de oxigênio para as células foi considerado, em todos os casos, como o fator limitante do processo fermentativo.

Segundo Phillips e Poon [13], uma das técnicas de imobilização de células viáveis mais utilizadas atualmente é a do envolvimento físico, sendo dois os polissacarídeos mais

Tabela 2 - Dados de desempenho obtidos em reatores com alimentação gotejante, adaptados de Ationu e colaboradores [12].

Tipo de Suporte	Tempo de Fer- mentação (h)	Rendimento em Ácido Acético (%)	Produtividade de Ác. Acético (g/lh)
Triângulos de Cerâmica	55 - 60	76,7 - 86,3	0,73 - 0,75
Redes de Nylon	70 - 75	80,5 - 89,1	0,60 - 0,62
Redes de Aço Inoxidável	52 - 60	69,0 - 70,0	0,61 - 0,69
Bagaço	80 - 90	76,7 - 80,5	0,47 - 0,50
Serragem	90 - 96	81,5 - 87,2	0,472 - 0,474
Discos de Cerâmica	90 - 96	76,7 - 79,5	0,42 - 0,46
Partículas Irregulares de Cerâmica	94 - 96	57,5 - 66,1	0,32 - 0,36
Espuma de Poliéter	105 - 120	38,3 - 47,0	0,17 - 0,23
Palha	120 - 144	40,3 - 44,1	0,16 - 0,18

freqüentemente empregados : celulose e seus derivados, e substâncias formadoras de géis hidrofílicos, geralmente extraídas de algas marinhas, como o ágar, o alginato e o carragena, ou de frutos cítricos, que é o caso da pectina. A formação de gel hidrofílico ocorre quando soluções aquosas diluídas destes polímeros são resfriadas ou submetidas à presença de determinados íons, que promovem o processo de gelificação.

Pradella [15], em ensaios realizados para a seleção da melhor matriz de imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizou o comportamento e a manipulação de alguns carboidratos segundo diversos critérios, como pode ser avaliado na Tabela 3.

A utilização de géis hidrofílicos apresenta-se, então, bastante promissora, pois polissacarídeos como o ágar, o alginato e o carragena apresentam a característica peculiar de manter, no interior da matriz, um ambiente físico similar ao encontrado em uma célula microbiana, conferindo, então, estabilidade a células e enzimas [13]. Além desta vantagem, tanto o carragena como o alginato e a pectina são considerados como praticamente inertes, sendo utilizados na indústria alimentícia como espessantes.

Carragena

O carragena, cuja estrutura pode ser observada na Figura 3, é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas, como as dos gêneros *Chondrus*, *Gigartina* e *Eucheuma*. Os carragenas, de modo geral, são constituídos de unidades alternadas de β -D-galactose e de 3,3-anidro- α -galactose, sendo conhecidos vários tipos, dependendo da quantidade de sulfato contido no polímero [13].

O *k*-carragena, contendo apenas um sulfato para cada dissacarídeo, forma géis rígidos, o *ι*-carragena, mais sulfatado, forma matrizes flexíveis e o *λ*-carragena não se gelifica. A fração *k*-carragena, em concentrações da ordem de 0,3 % (m/m), forma hidrogel termicamente reversível em presença de sais de potássio, amônia, rubídio e césio. A fração *ι*-carragena forma gel em contato com cátions bivalentes, como cálcio e magnésio [13].

A base teórica para o fenômeno de gelificação dos carragenas

Tabela 3 - Observações verificadas por Pradella [15] em ensaios realizados para a seleção da matriz de imobilização.

Matriz	Ágar	Alginato	Carragena	Pectina
Critério				
1	fácil, a 40°C	fácil, a 25°C	razoável, a 40°C	fácil, a 25°C
2	moderadas	brandas	moderadas	brandas
3	rompida	rompimento superficial	intacta	intacta
4	alta	baixa	razoável	razoável

Critérios :

- 1 - Manipulação do gel, no preparo.
- 2 - Condições físicas e químicas necessárias à preparação do gel, face à manutenção da viabilidade microbiana.
- 3 - Aspecto físico das partículas de gel, depois de ocorrida a fermentação.
- 4 - Produtividade de etanol.

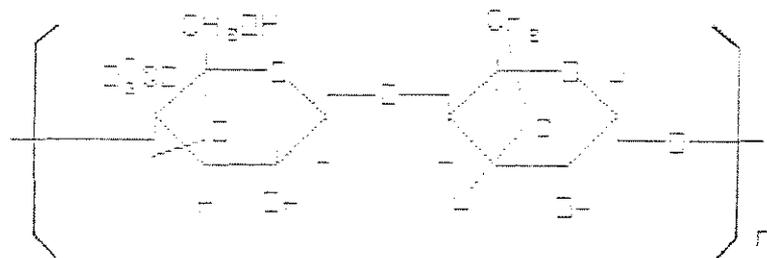


Figura 3 - Estrutura idealizada dos carragenas.

foi sugerida por Glicksman [20] como sendo devida à formação de uma estrutura em dupla hélice, provocada pela interligação das cadeias poliméricas, como pode ser verificado na Figura 4.

A temperaturas maiores que o ponto de fusão do gel, as cadeias de carragena em solução apresentam-se emaranhadas aleatoriamente. Quando sujeitas a um resfriamento, formam uma rede polimérica tridimensional, onde hélices duplas formam os chamados pontos de junção nas cadeias (gel I). Um resfriamento adicional leva à agregação destes pontos de junção, por atrações cooperativas, formando um gel de estrutura tridimensional (gel II). O papel desempenhado por cátions como o potássio, durante o processo de gelificação não foi ainda determinado.

O *k*-carragena é considerado por muitos autores como uma eficiente matriz de imobilização [15, 17, 21, 22, 23, 24].

Osuga e colaboradores [9] avaliaram o desempenho de células acéticas imobilizadas em *k*-carragena, observando um bom desenvolvimento das mesmas no interior da matriz e uma taxa máxima de produção de ácido acético de 40 mg/(ml.h), durante fermentações conduzidas continuamente.

Kolot [17] observou que as células imobilizadas em *k*-carragena exibem grande atividade metabólica, pois este gel promove um efeito estabilizador que se deve, provavelmente, à presença dos íons metálicos utilizados na gelificação, os quais são passíveis de sofrer reações de oxi-redução, podendo ativar as proteínas contidas na membrana celular, responsáveis pela excreção de produtos.

Tosa e colaboradores [21] avaliaram diferentes condições de gelificação de *k*-carragena, utilizando íons metálicos, amins, derivados de aminoácidos e solventes orgânicos miscíveis em água como indutores para a gelificação, concluindo que tanto a atividade como o rendimento das enzimas e microrganismos testados apresentaram-se mais elevados quando se empregou o cloreto de potássio como agente gelificante.

A literatura fornece diversos dados relativos às condições que propiciam a obtenção de biocatalisadores contendo a espécie ativa imobilizada em géis de carragena, os quais podem ser

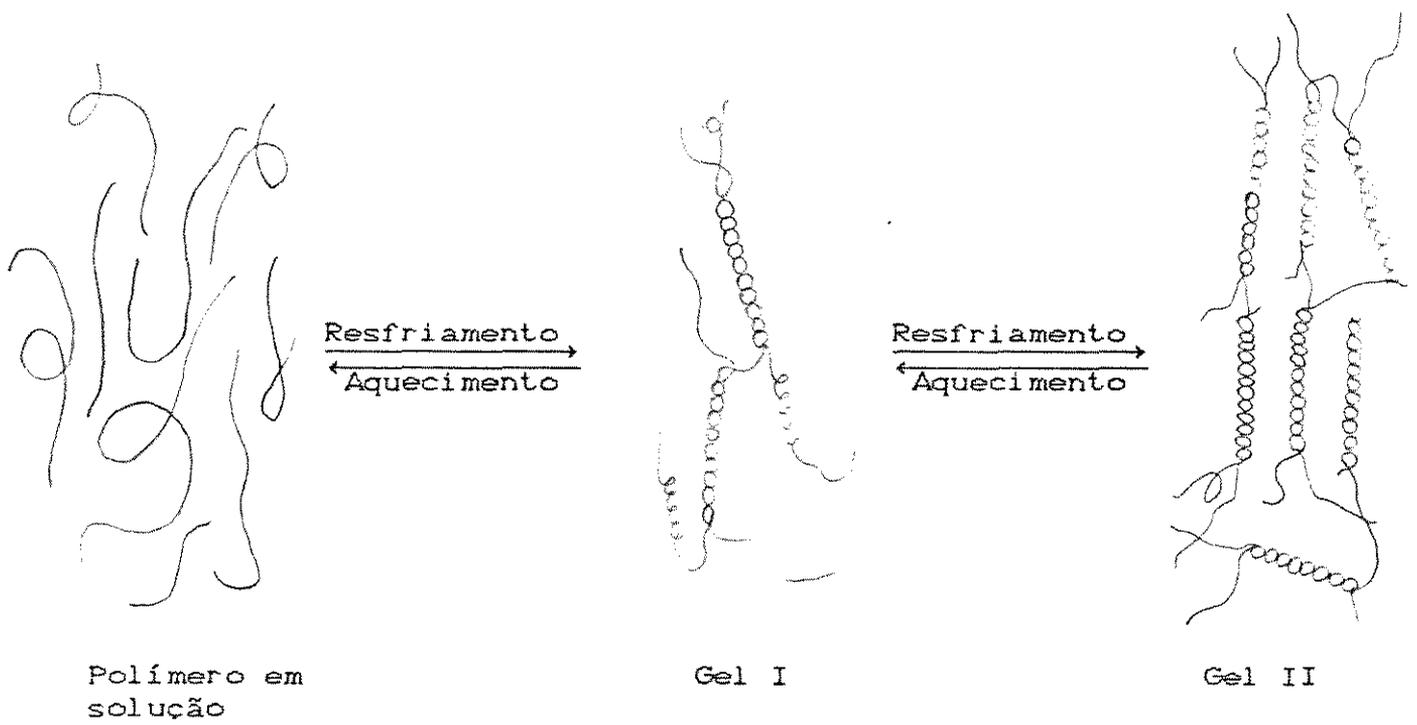


Figura 4 - Mecanismo de gelificação proposto para os carragenas, segundo Glicksman [20].

observados na Tabela 4.

Certas propriedades físicas do gel de *k*-carragena, como coeficientes de difusão de nutrientes e coeficientes de partição de algumas substâncias, foram medidas por diversos autores.

Nguyen e Luong [25] avaliaram as características da difusão da glicose em esferas de gel de *k*-carragena. Os dados experimentais indicaram uma relação inversa entre a difusividade da glicose e a concentração da suspensão polimérica utilizada na preparação do gel. Para géis contendo 3 % (m/v) de *k*-carragena, o coeficiente de difusão teve seu valor diminuído de $4,8 \times 10^{-6}$ para $3,8 \times 10^{-6}$ cm²/s ao se elevar a concentração inicial da solução de glicose de 6,5 para 65 g/l, a 30°C.

Wada e colaboradores [24] avaliaram os coeficientes de partição de glicose e etanol, a 30°C, em géis contendo 4 % de *k*-carragena, obtendo valores de 0,86 e 0,67, respectivamente.

Como regra geral, os géis de *k*-carragena apresentam baixa resistência mecânica, especialmente à abrasão, o que pode ser contornado pela utilização de agentes bifuncionais, como o glutaraldeído e a hexametilenodiamina, após a interrupção da etapa de gelificação em soluções contendo cloreto de potássio. Este tratamento adicional confere ao gel maior rigidez, reforçando a estrutura da matriz através de ligações cruzadas [13, 21, 26]. No entanto, diversos autores [9, 21, 22, 27] operaram sistemas fermentativos continuamente, sem empregar a técnica de enrigecimento adicional, com elevada estabilidade mecânica do gel de carragena por períodos de até 3 meses.

Alginato

O alginato é um polissacarídeo encontrado em muitas espécies de algas marrons, entre elas a *Macrocystis pyrifera*, nas quais é importante constituinte da parede celular. É formado por um copolímero linear de unidades de ácido β -D-(1+4) manopirano silurônico (Man) e ácido α -L-(1+4) gulopirano silurônico (Gul). Os monômeros são arranjados ao longo da cadeia polimérica como segmentos alternados de Man, Gul e copolímeros de Man e Gul [15].

Este polissacarídeo forma sais hidrossolúveis com cátions monovalentes e aminas de baixo peso molecular [15].

Tabela 4 - Condições de preparação do gel de carragena, segundo diversos autores.

Espécie Imobilizada	Conc. de Carragena (% m/v)	Conc. de KCl (M)	Informações Adicionais	Ref.
<i>A. aceti</i>	3,0	0,2682	Te = 35 °C Tg = 20 °C	9
<i>Sacch. cerevisiae</i>	3,5	0,2682	Te = 40 °C Tg = Tamb. tg = 15 a 18 h em geladeira	15
Células e Enzimas	0,05 a 20	1×10^{-4}	Te = 37 a 50 °C	17
Células e Enzimas	3,4	0,10	Te = 40 °C	21
<i>Sacch. cerevisiae</i>	4,41	0,2682	Te = 37 °C Tg = 20 °C	23,24
—	3,0	0,2682	Tg = 4 °C tg = 12 h Presença de CaCl ₂ durante a gelificação.	25
<i>Sacch. cerevisiae</i>	3,92	0,2682	Te = 37 °C Tg = 20 °C	27
<i>Strep. clavigerus</i>	2,0	1,00	Te = 35 °C tg = 10 min	28
<i>Coryn. glutamicum</i>	2,0 a 5,0	0,30	Te = 45 °C tg = 1 h	29

Te : Temperatura de extrusão

Tg : Temperatura de gelificação

tg : Tempo de gelificação

Tamb. : Temperatura ambiente

A gelificação deste polímero, cujo princípio pode ser observado na Figura 5, ocorre quando uma solução de seu sal hidrossolúvel, normalmente o alginato de sódio, é tratada com cátions bivalentes como o Ca^{++} , processando-se o deslocamento do Na^+ pelo Ca^{++} , o que provoca o surgimento de ligações cruzadas entre as estruturas lineares alinhadas do alginato. Assim, as moléculas do polissacarídeo formam uma rede polimérica que precipita como uma matriz gelatinosa rígida e termoestável, contendo cerca de 60 % de água em seu interior, a qual pode ser observada na Figura 6 [13, 15].

Como as características estruturais do gel formado dependem da ação do cálcio, substâncias que possam formar complexos estáveis com este íon tendem a enfraquecer a matriz, como agentes quelantes, destacando-se os fosfatos, normalmente presentes no meio fermentativo [13, 14, 29, 30]. A prevenção deste tipo de problema pode ser feita utilizando-se sais de bário e estrôncio como agentes gelificantes [13], ou pela adição de pequenas quantidades do íon cálcio ao meio fermentativo [10, 14, 29, 30, 31], o que pode acarretar em um efeito negativo no metabolismo celular.

Ogbonna e colaboradores [31] observaram que os fatores que mais afetam a estabilidade mecânica do gel de alginato durante um processo fermentativo são a concentração inicial de células na matriz, a duração do período de gelificação em uma solução contendo cloreto de cálcio e a concentração de alginato de sódio utilizada na imobilização.

Pode-se observar na Tabela 5 diversas condições de imobilização de células em matrizes de alginato de sódio, sugeridas pela literatura.

Tanaka e colaboradores [32] sugerem um método de imobilização que previne a liberação de células de *Saccharomyces* sp no meio fermentativo, através do envolvimento dos microrganismos em fibras de alginato contendo duas camadas consecutivas do gel, de maneira que as células restrinjam-se à camada interna. Não foi observado o desprendimento celular no meio fermentativo mesmo após 300 horas de fermentação.

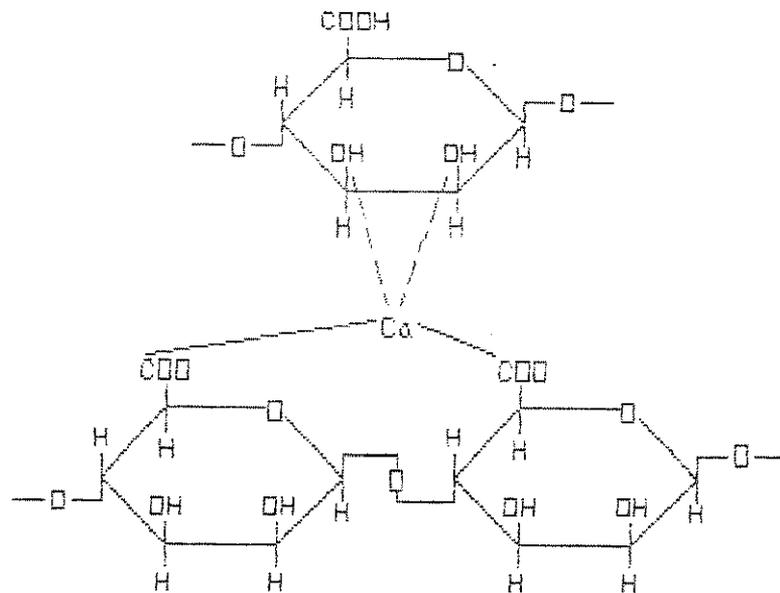


Figura 5- Provável mecanismo de ligação dos alginatos com os íons cálcio.

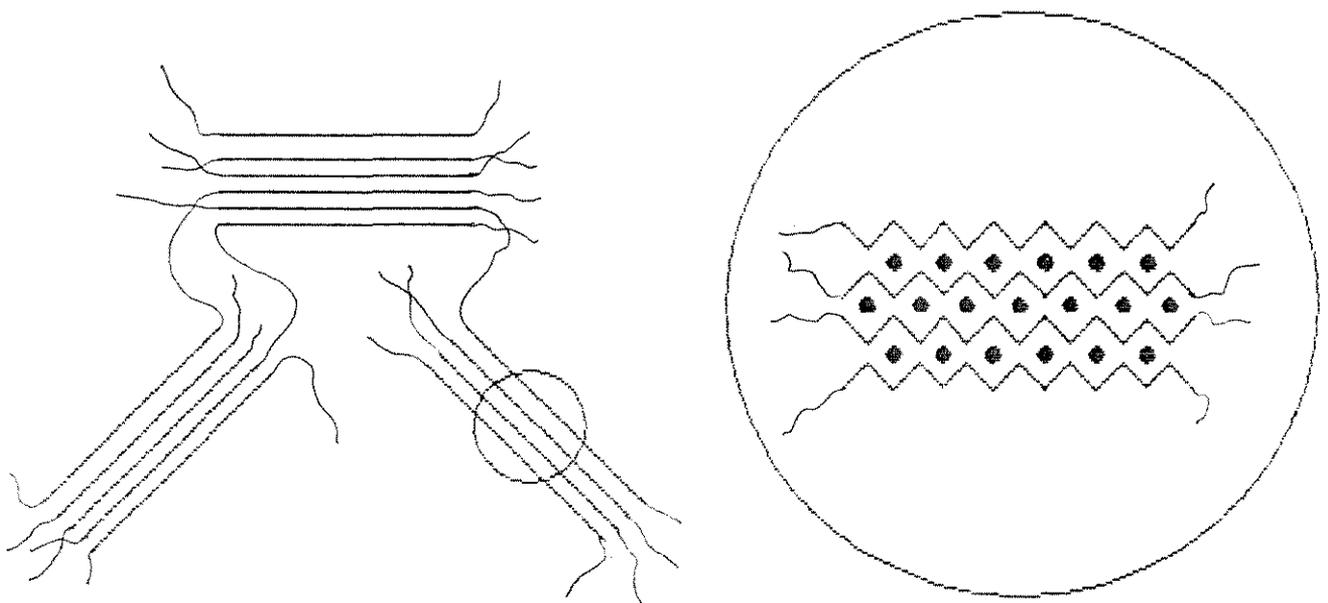


Figura 6 - Representação esquemática das ligações cruzadas no gel de alginato de cálcio. As fitas poliméricas formam agregados, nos quais ocorrem interstícios, onde estão coordenados íons de cálcio.

Tabela 5 - Condições de imobilização de células em alginato de sódio, segundo diversos autores.

Microrganismo	Conc. de alginato (%)	Conc. de CaCl_2 (M)	Informações Adicionais	Ref.
<i>Acetobacter aceti</i>	2,0	0,2	-	10
<i>Sacch. uvarum</i>	2,0	0,10	Tg = 30°C tg = 2 h	29
	1,0	0,08	Tg = 30°C tg = 2 h	29
	1,0	0,10	Tg = 20°C tg = 25 min	29
<i>Zymom. mobilis</i>	1,67	0,36	tg = 30 min	30
<i>Sacch. sp.</i>	0,5 a 2,0	0,10	Tg = Tamb tg = 1 h	32
<i>Sacch. cerevisiae</i>	1,5 a 2,0	0,45	tg = 5 h	33

Te : Temperatura de extrusão

Tg : Temperatura de gelificação

tg : Tempo de gelificação

Tamb. : Temperatura ambiente

Cheetham e colaboradores [29] avaliaram a resistência mecânica e a difusão de sacarose em partículas de alginato de cálcio contidas em uma coluna, constatando que o gel é bastante resistente à compressão e à abrasão. A taxa de difusão da sacarose para o interior das partículas apresentou-se mais elevada para concentrações de alginato e de íons Ca^{++} reduzidas.

Sun e Furusaki [10] imobilizaram células de *Acetobacter aceti* em alginato de cálcio e operaram continuamente um biorreator a 30°C por até 230 horas, observando o surgimento de células suspensas após cerca de 30 horas de fermentação.

Pectina

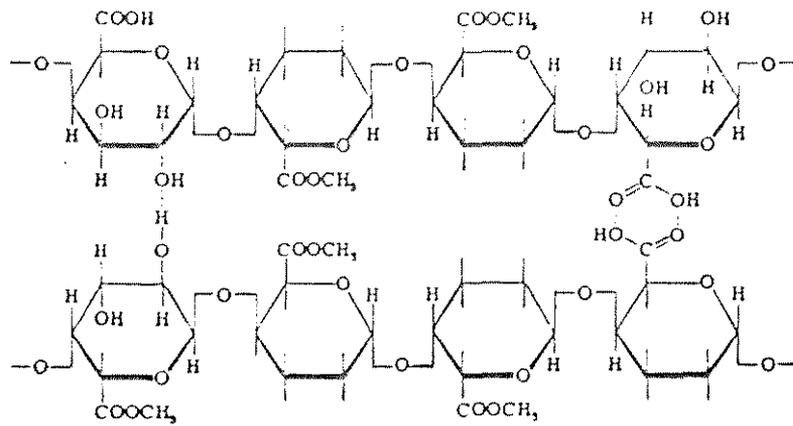
A pectina é um colóide natural encontrado em quantidades variáveis em todas as frutas e em algumas raízes, tubérculos e outros vegetais, principalmente em tecidos pouco rijos, como no albedo das frutas cítricas. Como o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de pectina, a utilização deste polissacarídeo como matriz de imobilização é bastante atrativa.

A pectina é composta principalmente por cadeias de ácido poligalacturônico de pesos moleculares variados. Alguns dos grupos carboxi são esterificados com álcool metílico, alguns são neutralizados com cátions e alguns são ácidos livres. A distribuição dos grupos ésteres ao longo da cadeia é também variável. Pequenas quantidades de acetatos ou outros grupos podem estar ligados à molécula [34].

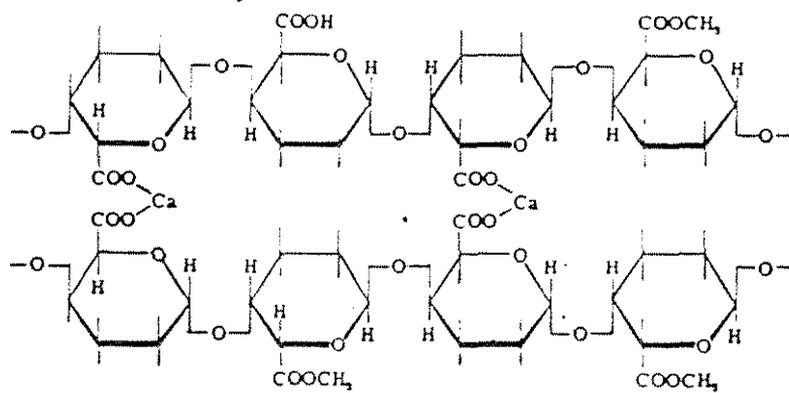
As pectinas podem ser classificadas de acordo com o seu grau de esterificação [34]. Assim, aquelas que têm em sua composição quantidades superiores a 7 % em grupos metóxi requerem a presença de açúcares e ácidos para que ocorra o processo de gelificação. As pectinas com baixo grau de esterificação, por sua vez, requerem a presença de certos cátions, onde o cálcio é um dos mais freqüentemente utilizados.

Os mecanismos de gelificação das pectinas de alto e baixo grau de esterificação podem ser observados na Figura 7.

Para as pectinas de alto grau de esterificação, a gelificação é causada pela formação de pontes de hidrogênio entre um grupo carboxila livre e um grupo hidroxila de outra molécula. Desta



A



B

Figura 7 - Mecanismos de gelificação da pectina. A) Gel de pectina de alto grau de esterificação; B) Gel de pectina de baixo grau de esterificação.

forma, o açúcar atua como um agente desidratante, e a presença do ácido reduz o pH, favorecendo a gelificação.

O mecanismo de gelificação de pectinas de baixo grau de esterificação envolve a interligação de moléculas por cátions bivalentes, formando uma rede de estrutura tridimensional, através da formação de sais com os grupos carboxila. Tanto o mecanismo de gelificação como a estrutura do gel de pectina são bastante similares aos observados no gel de alginato de cálcio.

Pulitano [14] avaliou a utilização de pectina cítrica como agente de imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*, considerando-a eficiente, embora o seu emprego possa ser limitado pela elevada exigência de íons Ca^{++} no meio fermentativo.

2.2.3. Vantagens da utilização de células imobilizadas

Diversos autores mencionam as vantagens do emprego de células imobilizadas em contraste com sistemas que envolvem células livres [9, 10, 13, 14, 16, 17, 26, 35, 36].

Um critério vital em processos industriais é o alto rendimento por unidade de espaço e de tempo, expresso por produtividades volumétricas elevadas, além do fato de se poder conduzir as fermentações de maneira contínua [16, 36]. A imobilização possibilita que se alcance e mantenha grande atividade biocatalítica em um volume reduzido, o que leva ao abrandamento das condições às quais os substratos e produtos se submetem, através da redução do tempo de exposição dos mesmos ao meio fermentativo [16].

A utilização de células imobilizadas favorece o emprego de volumes reativos menores e de vazões mais elevadas, sem que ocorra o arraste total dos microrganismos para fora do reator, pois a densidade celular é mais alta que no caso de fermentações com células livres, o que conduz a plantas industriais mais reduzidas, com sensível economia de investimentos [13, 14, 17, 35].

Trabalhando-se com vazões maiores que a taxa de crescimento de certos microrganismos contaminantes, pode-se contornar os problemas de infecção [14, 26].

Outra vantagem bastante significativa é que não há a necessidade de remoção ou reciclo de células [13, 14].

Muitos sistemas que empregam células imobilizadas podem ser descritos através dos tratamentos hidrodinâmicos e teóricos relativos à catálise heterogênea, favorecendo o projeto industrial e o controle do processo [13, 36].

2.3. Fatores Passíveis de Influenciar o Comportamento de Sistemas que Empregam Células Acéticas Imobilizadas em Géis Hidrofílicos

Os fatores que afetam a atividade de sistemas que empregam células imobilizadas podem ser classificados em três grupos básicos : transferência de massa, fisiologia celular e materiais e métodos utilizados na imobilização. Tais fatores podem afetar a atividade direta ou indiretamente, de maneira isolada ou conjunta, estando, na maioria das vezes, interligados. Na Figura 8, são mostradas esquematicamente estas interligações.

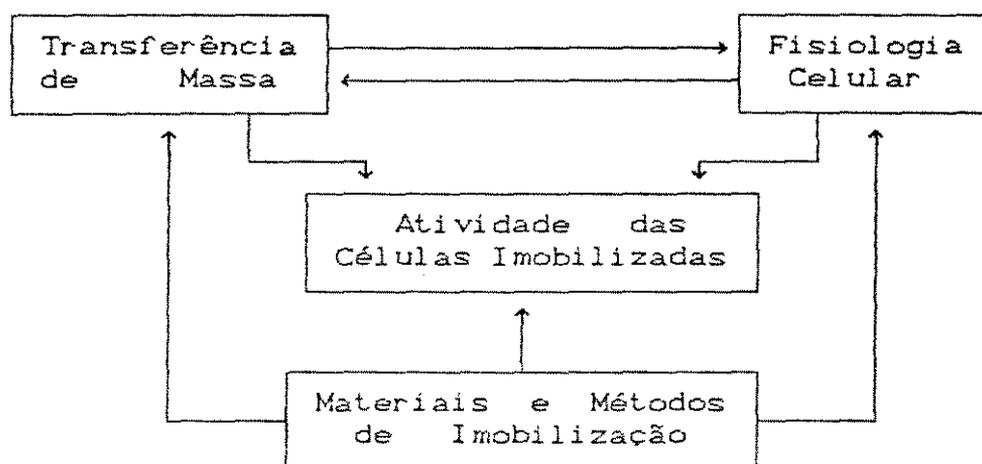


Figura 8 - Fatores que afetam a atividade de sistemas que empregam células imobilizadas [37].

2.3.1. Efeito da concentração inicial de células

Segundo Vieth e Venkatsubramanian [36], a atividade catalítica máxima das células é retida após a imobilização, quando as mesmas estão no estado fisiológico propício. Isto corresponde a uma ótima indução da atividade enzimática relacionada à seqüência reacional desejada, a qual, por sua vez, corresponde à máxima taxa de síntese do produto durante a fermentação.

Uma vez imobilizadas, as células devem ser mantidas em um estado viável, sem que haja excessiva reprodução, favorecendo a transformação do substrato no produto desejado e não em massa celular adicional, o que evita a liberação de microrganismos no meio fermentativo e previne a integridade mecânica do suporte [36].

Osuga e colaboradores [9] utilizaram *k*-carragena para imobilizar *Acetobacter aceti*, obtendo partículas que continham cerca de 10^7 células em um mililitro de gel.

2.3.2. Influência da concentração de polímero na matriz de imobilização

Scott e colaboradores [28] testaram o efeito de diferentes concentrações de carragena na demanda de oxigênio no meio fermentativo, em presença de células livres e imobilizadas de *Streptomyces clavuligerus*, observando a diminuição da taxa de demanda com o aumento da fração de carragena.

Cheetham e colaboradores [29], utilizando células de *Sacharomyces uvarum*, variaram a concentração de alginato de sódio na matriz de imobilização, de 0,5 a 2,5 % (m/v), observando que o aumento do percentual deste carboidrato leva à diminuição da taxa de desprendimento celular.

Ogbonna e colaboradores [31] observaram a estabilidade mecânica de partículas de alginato de sódio de diferentes concentrações, onde foram imobilizadas células de *Saccharomyces cerevisiae*. Os géis contendo 0,5 % (m/v) apresentaram-se muito

frágeis, enquanto que outros, contendo de 1 a 2 % em sua composição, apresentaram-se bastante íntegros.

Kim e Ryu [38] observaram que as difusividades efetivas de glicose e de oxigênio diminuem significativamente com o aumento da concentração de *k*-carragena no gel de imobilização, enquanto que a resistência mecânica apresenta uma tendência a aumentar com a elevação do percentual de polímero.

Furui e Yamashita [39] observaram que os coeficientes de difusão efetivos de diversos compostos em géis de carragena são menores que em soluções aquosas, diminuindo exponencialmente com o aumento da concentração de polímero na matriz.

2.3.3. Efeito do processo de gelificação

Nesta etapa, os fatores que mais afetam a estabilidade mecânica e a atividade do biocatalisador são a concentração da solução gelificante e o tempo durante o qual a matriz de imobilização é exposta a esta solução.

Scott e colaboradores [28] avaliaram o tempo de exposição de células de *Streptomyces clavuligerus*, imobilizadas em gel de *k*-carragena, a soluções 1,0 M em KCl e observaram que, após 60 minutos, o consumo de oxigênio diminuiu substancialmente, aproximando-se de zero.

Cheetham e colaboradores [29], imobilizando células em géis de alginato de sódio, observaram que o aumento da concentração da solução de CaCl_2 provoca a diminuição da taxa de desprendimento celular da matriz.

Ogbonna e colaboradores [31] estudaram o efeito da concentração da solução de CaCl_2 na resistência mecânica de esferas de alginato de sódio, observando um aumento na fragilidade do gel com a diminuição da concentração do referido sal, embora a relação existente entre estas variáveis não fosse linear.

2.3.4. Crescimento celular na matriz

Segundo Lima e colaboradores [40], na construção de um

gráfico global do crescimento microbiano em meio líquido, em cultura descontínua, pode-se observar que a curva representativa deste crescimento apresenta várias fases, as quais estão representadas na Figura 9.

O crescimento celular em um suporte segue, normalmente, o mesmo padrão verificado em células livres. Em fermentações contínuas, o crescimento exponencial pode ser prolongado consideravelmente, enquanto que a fase estacionária pode ser induzida pela limitação de um dado nutriente [13].

Osuga e colaboradores [9] imobilizaram células de *Acetobacter aceti* em partículas de gel de *k*-carragena e observaram que o crescimento microbiano ocorre mais intensamente nas regiões próximas à superfície do gel, originando colônias similares às observadas em meios contendo ágar, em placas de Petri, enquanto que, na parte central, não foram encontradas colônias, uma vez que as células permaneceram na mesma condição verificada imediatamente após a imobilização.

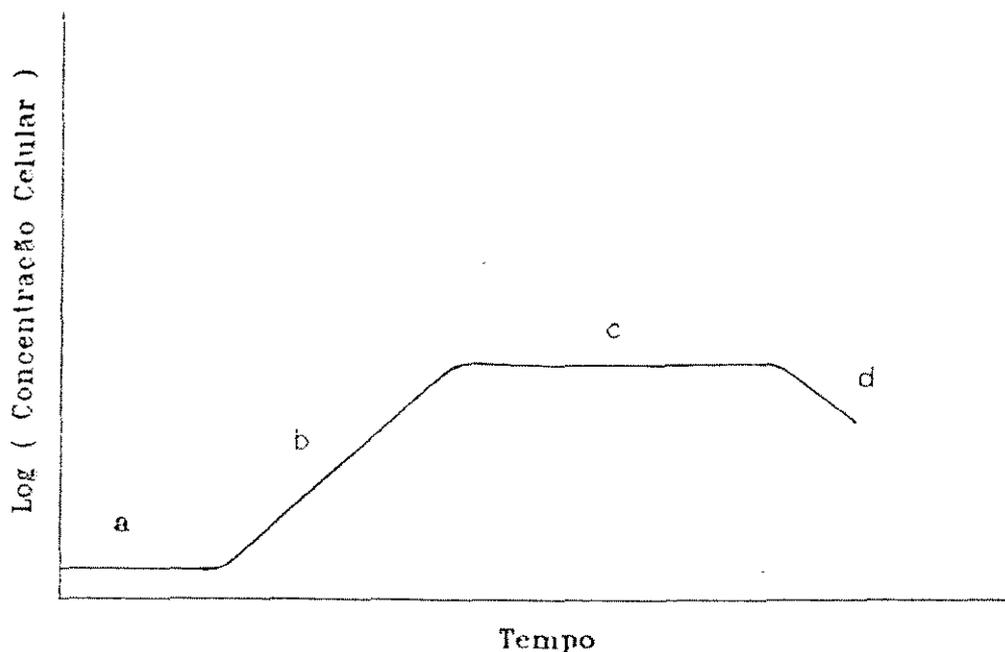


Figura 9 - Fases da curva de crescimento microbiano : a) fase de latência; b) fase de crescimento exponencial; c) fase estacionária; d) fase de declínio.

Vários autores [9, 10, 23, 27, 31] constataram maior crescimento celular em camadas próximas à superfície das partículas, ao realizarem a imobilização de microrganismos viáveis em géis de carragena e alginato de sódio.

2.3.5. Efeito da concentração e do diâmetro das partículas

O diâmetro da partícula é muito importante quando há a necessidade de suspensão do biocatalisador em determinados reatores, além de influenciar a queda de pressão em leitos fixos e afetar o seu desempenho em uma dada condição experimental.

Osuga e colaboradores [9], imobilizando células de *Acetobacter aceti* em gel de κ -carragena, obtiveram taxas de produção de ácido acético mais elevadas ao empregarem menores concentrações de partículas de gel no reator. Tal resultado foi atribuído à maior limitação do transporte de oxigênio quando se emprega altas frações de sólidos.

Sun e Furusaki [10], utilizando células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em esferas de alginato de sódio, estudaram experimentalmente e através de simulações numéricas o efeito da concentração e do diâmetro das partículas, e propuseram uma correlação para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, k_{La} , dada pela seguinte equação :

$$k_{La} = I dp^{0,41} \exp \left[-1,1 \varepsilon_s \right] \quad (8)$$

onde :

I - constante do sistema.

dp - diâmetro da partícula de gel.

ε_s - fração do volume total do reator ocupado pelas partículas.

Os dados experimentais e os cálculos teóricos indicaram que tanto as células imobilizadas como as células livres, que se desprenderam do gel, contribuíram para a produção do ácido acético. As células suspensas apresentaram um desempenho relevante quando se utilizava partículas de maiores dimensões ou baixa

fração volumétrica de sólidos, enquanto que as células imobilizadas destacaram-se quando se empregou partículas de pequeno diâmetro e elevadas frações de sólidos.

2.3.6. Influência da temperatura

Osuga e colaboradores [9] estudaram a influência da temperatura no crescimento de *A. aceti* K 1006 e na produção de ácido acético em processos contínuos, observando que as taxas de crescimento microbiano a 30°C e a 34°C apresentaram-se bastante próximas, assim como as concentrações celulares máximas obtidas. A produção de ácido acético, no entanto, foi mais rápida e alcançou níveis mais elevados a 34°C.

2.3.7. Efeito do pH

Yasui e colaboradores [41] investigaram o efeito do pH na taxa de respiração específica de células de *Acetobacter aceti* K 1001, observando que os microrganismos submersos apresentaram maior atividade respiratória em valores de pH próximos de 7.

2.3.8. Influência do tempo de residência do meio fermentativo

Osuga e colaboradores [9] avaliaram a influência do tempo de residência na taxa de produção de ácido acético por *A. aceti* IP 5866 imobilizadas em *k*-carragena. Os autores concluíram que variações de 2 a 4,5 horas praticamente não alteraram as taxas de conversão.

A operação contínua de um biorreator empregando bactérias acéticas livres e imobilizadas em alginato de sódio, simultaneamente, mostrou que, apesar do acentuado decréscimo na produtividade de ácido acético verificado a taxas de diluição superiores a 0,25 h⁻¹ para células livres, a produtividade das células imobilizadas foi pouco afetada pela taxa de diluição [10].

2.3.9. Efeito da concentração de oxigênio

As células acéticas são estritamente aeróbicas. Assim, a demanda de oxigênio é ligada às atividades metabólicas, envolvendo o crescimento e a manutenção celular, além dos processos de biossíntese.

Ghommidh e Navarro [5] observaram que, em reatores de leito fixo contendo células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em cerâmica, o aumento da pressão parcial de oxigênio de 0,115 a 1,0 atm resultou na elevação da produtividade de ácido acético, de 2,7 para 10,4 g/(l h).

Osuga e colaboradores [9] avaliaram a influência da pressão parcial de oxigênio no crescimento celular e na produção de ácido acético, utilizando células livres e imobilizadas em κ -carragena. Os autores utilizaram razões de suprimento de oxigênio puro de 0,533 vvm e de 0,67 vvm para o ar, observando que a efetividade do oxigênio no crescimento celular é mais importante quando se envolve células imobilizadas, e que sua influência na produção de ácido acético é consideravelmente maior quando da presença de células livres no meio fermentativo.

Yasui e colaboradores [41] observaram o efeito da pressão parcial de oxigênio, de 0,0 a 0,21 atm, na taxa de respiração específica de células de *Acetobacter aceti* livres e submersas. Os autores sugerem que esta taxa atinge um máximo no valor de pressão parcial de oxigênio de 0,04 atm, a partir do qual permanece praticamente constante.

Park e colaboradores [42] testaram o efeito da concentração de oxigênio dissolvido na produção de ácido acético por células de *Acetobacter aceti*. Os autores observaram que a concentração de oxigênio dissolvido ótima para os processos de respiração celular e de oxidação do etanol encontra-se na faixa de 3 a 7 ppm, quando não há ácido acético no meio fermentativo. Quando na presença de 45 a 65 g/l de ácido acético, a concentração ótima de oxigênio dissolvido localiza-se em torno de 1 ppm, sendo que, acima destas concentrações de ácido acético, o efeito inibitório do oxigênio dissolvido é bastante acentuado.

2.3.10. Influência da concentração de etanol

Diversos autores observaram a influência da concentração de etanol no crescimento celular e na produção de ácido acético por bactérias.

Park e colaboradores [42] avaliaram a influência desta variável na taxa de oxidação do etanol por células de *Acetobacter aceti*, observando um pequeno efeito inibitório para concentrações inferiores a 40 g/l. Acima deste valor, no entanto, na taxa de oxidação do etanol decai linearmente com sua concentração no meio fermentativo.

Ghommidh e Navarro [11], por outro lado, sugerem que concentrações de etanol de 0 a 54 g/l têm pouco efeito no crescimento celular.

Nanba e colaboradores [43] observaram que variando-se a concentração de etanol de 0,5 a 6 g/l no meio fermentativo, ocorre um aumento na taxa de crescimento específico de células de *Acetobacter* sp., a qual se mantém constante até concentrações de etanol de 30 g/l. Entretanto, os autores verificaram que não ocorre crescimento celular quando são empregadas concentrações de etanol superiores a 40 g/l. A fase de latência de crescimento também é afetada pela concentração inicial de etanol no meio fermentativo, sendo prolongada de acordo com o aumento desta.

Mori e Terui [44] avaliaram a inibição por etanol em culturas de *Acetobacter rancens*, na presença de diversas concentrações de extrato de levedura. Os autores constataram que o valor máximo da taxa de crescimento específico foi observado com concentrações de etanol na faixa de 5 a 10 ml/l, enquanto que a taxa específica máxima de produção de ácido acético foi obtida em concentrações de etanol na faixa de 20 a 30 ml/l. Os autores observaram também que o aumento da concentração de extrato de levedura conduziu a maiores rendimentos celulares para concentrações iniciais de etanol no meio de cultura mais elevadas.

2.3.11. Efeito da concentração de ácido acético

Sun e Furusaki [10] estudaram o efeito da concentração de ácido acético nas taxas específicas de crescimento e de respiração de células de *Acetobacter aceti* livres no meio fermentativo, observando a inibição destes processos a concentrações de ácido acético superiores a 14 g/l e 19 g/l, respectivamente.

Ghommidh e Navarro [11] constataram, em fermentações contínuas com células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em cerâmica, que ocorre um decréscimo na taxa de produção de ácido acético a concentrações superiores a 34 g/l desta substância. A taxa de crescimento contínuo de células livres foi também bastante afetada por sua presença.

Park e colaboradores [42] observaram que elevações na concentração de ácido acético diminuem significativamente a taxa de oxidação do etanol, sendo constatadas inibições de cerca de 70 % ao se utilizar 60 g/l de ácido acético no meio fermentativo.

Nanba e colaboradores [43] sugerem que concentrações de até 10 g/l de ácido acético podem acelerar as taxas de crescimento de microrganismos *Acetobacter*, reduzindo a fase de latência. No entanto, concentrações de ácido acético entre 30 e 50 g/l inibem significativamente o crescimento celular, o qual é praticamente nulo no extremo superior desta faixa.

Mori e colaboradores [45] avaliaram a inibição pelo produto em fermentações acéticas submersas com *Acetobacter rancens*. Foram observadas fases logarítmicas relativamente longas, em ensaios onde a concentração inicial de etanol variou de 1,3 a 33 g/l. Um repentino aumento no valor da taxa específica de crescimento foi observado em culturas onde se adicionou inicialmente mais que 17,6 g/l de ácido acético. Para concentrações iniciais de ácido acético na faixa de 17,6 a 33,2 g/l, os autores observaram uma divisão da fase logarítmica em duas. Este aumento na taxa específica de crescimento foi considerado como o resultado da adaptação das células ao ácido acético, depois de expostas ao produto por um longo tempo, enquanto se desenvolviam a uma velocidade constante, durante a primeira fase de crescimento. Os autores observaram também que a presença de extrato de levedura diminuiu a inibição pelo produto, além do fato de que o

crescimento celular apresentou-se mais sensível ao ácido acético que a respiração.

2.4. Reatores para Células Imobilizadas

O projeto de reatores para células imobilizadas é análogo ao utilizado na catálise química heterogênea, com a diferença de que se emprega a cinética bioquímica [13].

A seleção da configuração geométrica e do modelo de operação (contínuo ou descontínuo) de um biorreator é uma tarefa difícil, devido ao fato de que muitos fatores particulares do processo, os quais normalmente são interdependentes, estão envolvidos nesta escolha, como o tipo de suporte utilizado na imobilização e a demanda de oxigênio [37].

Nesta seção, são descritos alguns biorreatores cujas geometrias são mais frequentemente utilizadas, as quais podem ser observadas na Figura 10.

Além das geometrias descritas nas seções seguintes, a literatura cita diversas outras formas de reatores utilizados para reações com células imobilizadas, as quais podem também ser obtidas pela combinação de vários tipos entre si.

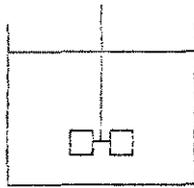
2.4.1. Reatores de tanques agitados

Os reatores de tanques agitados descontínuos são, geralmente, os mais utilizados com células livres em solução, onde o substrato é introduzido no reator juntamente com as células. A descarga ocorre quando se alcança o grau de conversão desejado.

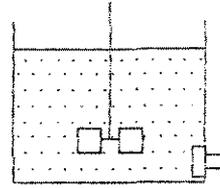
A concepção de um reator descontínuo agitado é bastante simples, consistindo de um tanque e de um agitador mecânico, o que favorece uma boa mistura e o fácil controle das condições operacionais [46].

No entanto, parte dos processos que envolvem células imobilizadas são operados continuamente. Se comparado ao processo em batelada, o contínuo é mais adequado, pois facilita a operação automática e favorece o controle de qualidade do produto obtido.

1 - Reatores Descontínuos de Tanques Agitados

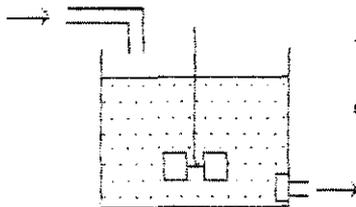


Para Espécie Ativa Solúvel

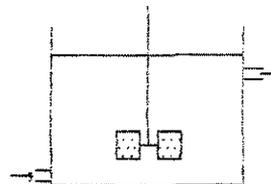


Para Espécie Ativa Imobilizada

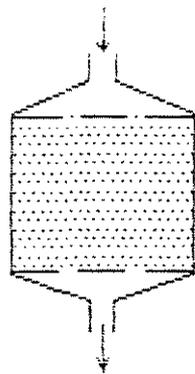
2 - Reatores Contínuos



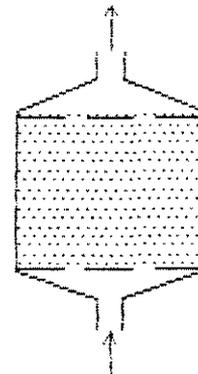
Tanque Agitado com Filtro na Saída



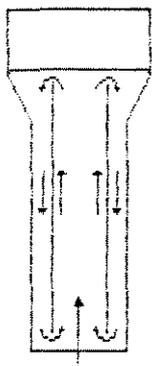
Tanque Agitado com a Espécie Ativa Imobilizada nas Pás



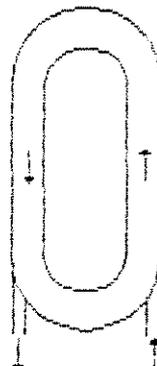
Reator de Leito Fixo



Reator de Leito Fluidizado



Reator Tipo 'Airlift'



Reator Anelar

Figura 10 - Geometrias mais comuns de biorreatores, adaptado de Zanin [46].

O reator contínuo agitado consiste de um tanque provido de entrada de substrato e saída de produto, sendo que o biocatalisador permanece retido em seu interior. O grau de conversão pode ser controlado por variáveis como volume do reator, tempo de residência do substrato e concentração do biocatalisador, entre outras [46].

Contudo, o emprego de células imobilizadas em reatores agitados não é muito recomendado, principalmente devido ao desgaste mecânico a que se sujeita o suporte, causado pelo atrito com o agitador, o que se agrava no caso da utilização de géis hidrofílicos [37].

2.4.2. Reatores de leito fixo

Os reatores de leito fixo consistem de uma coluna preenchida por partículas de biocatalisador que não se movimentam, sendo utilizados, na maioria dos casos, em processos contínuos.

Tais reatores são adequados para reações com cinética de Michaelis-Menten, devido às elevadas concentrações celulares por unidade de volume, se comparadas às obtidas em tanques agitados contínuos. No entanto, sua utilização depende de diversos fatores, como tipo de suporte empregado na imobilização. Segundo Fonseca e colaboradores [37], no caso de reatores recheados com partículas de gel, a compressão destas, causada pela própria altura do leito e pela pressão originada pelo escoamento do fluido, é um inconveniente severo que diminui o espaço intersticial entre as partículas, com conseqüente aumento na queda de pressão ao longo do leito. A compactação do leito pode também reduzir drasticamente a atividade das células imobilizadas, devido à diminuição da área superficial específica das partículas.

Estes reatores podem também apresentar desvantagens quando operações trifásicas estão envolvidas, pois o contato gás-líquido é restrito e a liberação de gás é lenta, levando à sua estagnação ao longo do leito e dificultando a distribuição do líquido, com conseqüente diminuição da taxa de reação [37].

2.4.3. Reatores de leito fluidizado

Em contraste com os reatores de leito fixo, os reatores de leito fluidizado são apenas parcialmente preenchidos pelas partículas de biocatalisador. O meio de fluidização pode ser composto por uma fase líquida, por uma fase gasosa, ou ambas, escoando de maneira vertical e ascendente, o que provoca a separação e movimentação das partículas, levando, normalmente, à expansão longitudinal do leito [46].

Estes reatores proporcionam boas propriedades de mistura e de transferência de massa. Na operação trifásica, o contato gás-líquido e a remoção de gás são facilitados, não ocorrendo os problemas de obstrução e elevadas quedas de pressão no leito, comuns nos reatores de leito fixo que, por outro lado, podem apresentar maior densidade celular.

A diferença de densidade entre o líquido e o sólido (para partículas de mesmo tamanho) é um dos fatores determinantes no desempenho destes reatores, pois com o seu aumento, a facilidade da fluidização decresce. Uma maior diferença entre as densidades do sólido e do líquido permite a utilização de maiores velocidades de fluidização, sem que haja o arraste das partículas, o que permite o processamento de maior volume de substrato em menor tempo [46].

Embora a imobilização de células viáveis em géis hidrofílicos seja uma das técnicas mais comuns e os custos de bombeamento do líquido sejam diminuídos, a diferença entre a densidade do meio fermentativo e a partícula de gel é, geralmente, muito pequena, o que resulta em menores taxas de transferência de massa. Além disto, a estabilidade operacional é prejudicada, devido à pequena diferença entre a velocidade mínima de fluidização e a velocidade terminal das partículas [37].

Sun e Furusaki [10] sugerem a utilização de um reator de leito fluidizado trifásico para a produção contínua de ácido acético, empregando células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em gel de alginato. O reator, feito de policarbonato transparente, apresenta 44 mm de diâmetro interno e 200 ml de volume efetivo de

reação, sendo utilizado um filtro de vidro esférico de 15 mm de diâmetro como dispersor de gás. O reator era mantido em um banho termostático, para que a temperatura se mantivesse constante em 30°C. Maiores detalhes do reator podem ser observados na Figura 11. Experimentalmente, os autores observaram que o estado estacionário pôde ser mantido durante mais de 30 dias.

2.4.4. Reatores de leito circulante

Neste caso, o conteúdo do reator movimenta-se dentro de um circuito fechado, o que é obtido através da instalação de um condutor, que dirige o fluxo, o qual, por sua vez, pode ser produzido por propulsores mecânicos, pela injeção de gases ou de líquidos. Outra maneira de se conseguir este tipo de movimentação é através da construção do biorreator em geometria anelar. Tais reatores proporcionam boa mistura e aeração. As diversas designações destes reatores, como "airlift", indicam o meio pelo qual a circulação é obtida [16]. Na maioria das vezes, as células imobilizadas circulam pelo reator juntamente com o substrato.

A utilização destes reatores é bastante adequada para biocatalisadores imobilizados em partículas de gel, uma vez que as mesmas são facilmente movimentadas pelo fluxo de líquido, devido a sua baixa densidade [47].

Industrialmente, os reatores de leito circulante são bastante empregados, pois são de construção e operação simples, envolvendo baixo consumo de potência [37].

Osuga e colaboradores [9] utilizaram um reator de leito circulante, de capacidade total de 250 ml e de 150 ml de volume de trabalho, para a incubação e produção contínuas de ácido acético, empregando células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em gel de *k*-carragena. Um diagrama esquemático deste reator pode ser observado na Figura 12.

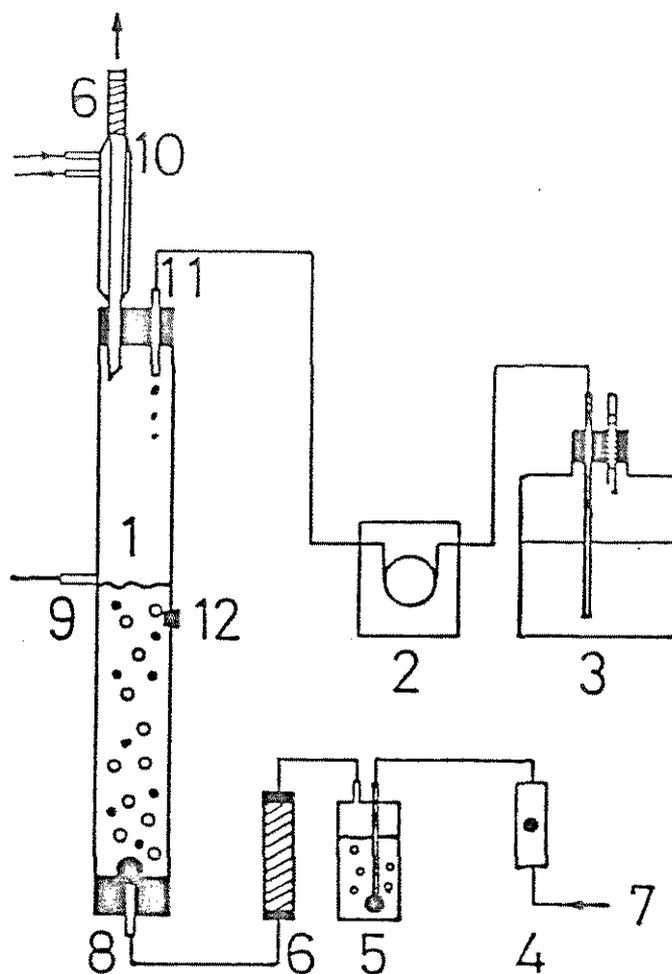


Figura 11 - Instalação experimental utilizada por Sun e Furusaki [10]. 1) Reator; 2) Bomba peristáltica; 3) Reservatório de meio de cultura; 4) Rotâmetro; 5) Umidificador; 6) Filtro de algodão; 7) Cilindro de oxigênio e/ou compressor de ar; 8) Dispersor de gás; 9) Saída de meio fermentado; 10) Condensador; 11) Entrada de meio de cultura; 12) Poço para eletrodo de oxigênio.

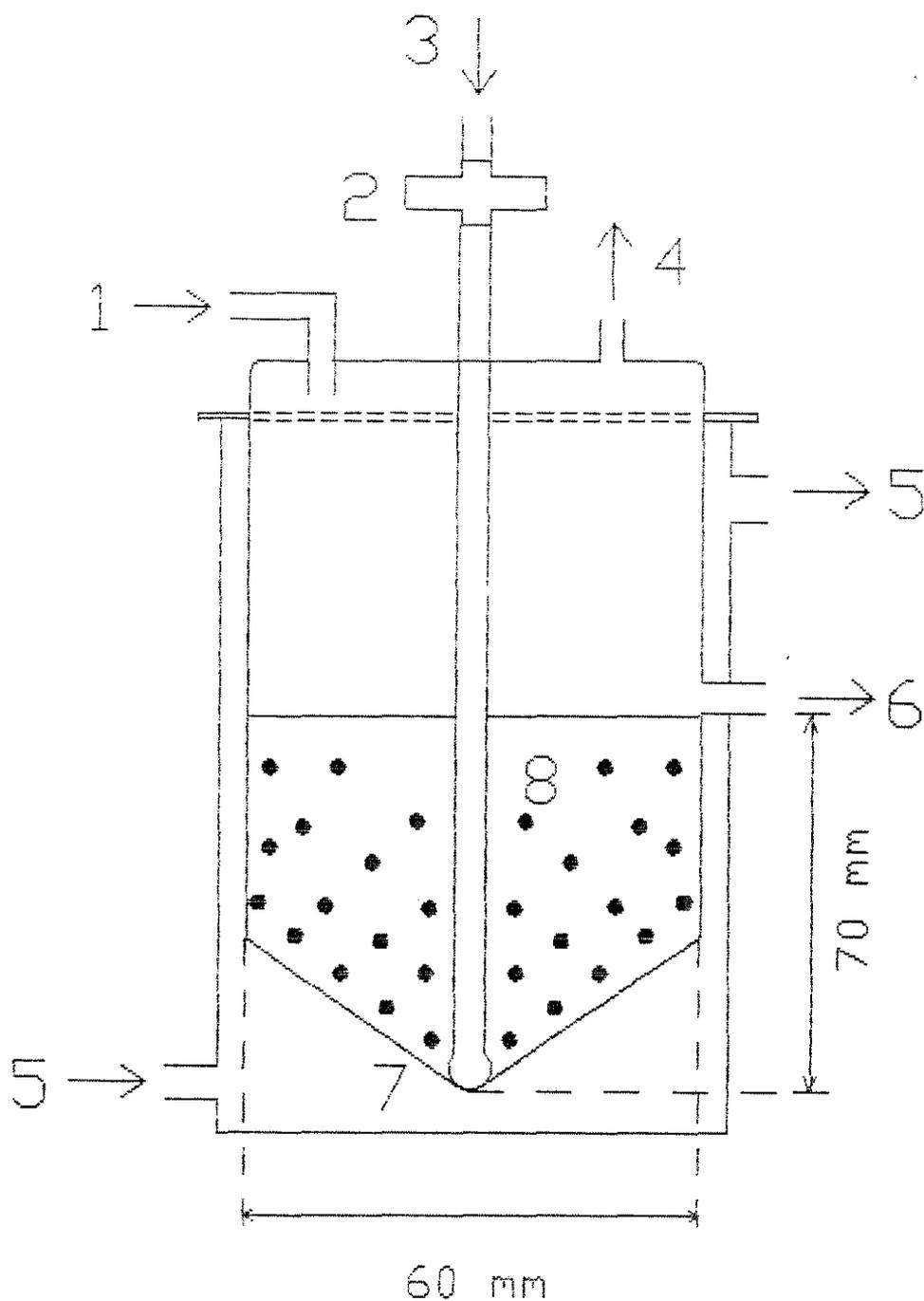


Figura 12 - Esquema do reator empregado por Osuga e colaboradores [9]. 1) Alimentação de meio; 2) Filtro; 3) Entrada de gás; 4) Saída de gás; 5) Água termostatizada; 6) Saída do meio fermentado; 7) Esfera de vidro sinterizado para a distribuição de gás; 8) Partículas de gel.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, serão apresentados os principais materiais e equipamentos, e a descrição da metodologia experimental utilizada no desenvolvimento deste trabalho.

3.1. Microorganismos

Utilizou-se quatro cepas distintas de microorganismos durante os experimentos.

As linhagens foram mantidas liofilizadas e em estoque na Coleção de Culturas Tropical, da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", com o objetivo de se iniciar cada experimento com um inóculo de características semelhantes. Este fato não seria possível com culturas estoque de *Acetobacter* mantidas através de repiques tradicionais, devido à alta toxicidade do ácido acético produzido pelas próprias células, modificando suas características microbiológicas e fisiológicas com o decorrer das transferências, dificultando a obtenção de resultados reprodutíveis.

Assim, as culturas foram mantidas em lotes de ampolas da coleção de serviços, CCT, contendo elevado volume de suspensão celular de alta densidade, e em ampolas da coleção de serviços, FTPT, contendo menor número de células que a anterior.

As linhagens dos microorganismos liofilizados e seus respectivos códigos de identificação e equivalência em outras coleções podem ser encontrados na Tabela 6.

A cepa *Acetobacter* sp., CCT 2013, foi isolada de caqui em decomposição, pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello".

Tabela 6 - Linhagens e códigos de identificação dos microrganismos utilizados.

Microrganismo	Códigos de Identificação
<i>Acetobacter aceti</i>	CCT 1724, DSM 2002, NCIB 8554
<i>Acetobacter aceti</i>	CCT 0190, CIP 58.66
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CCT 1706, NCIMB 6249
<i>Acetobacter</i> sp.	CCT 2013

DSM : Deutsche Sammlug von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Alemanha)

NCIB : National Collection of Industrial Bacteria (Reino Unido)

NCIB : National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Reino Unido)

CIP : Collection of the Institut Pasteur (França)

3.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados têm suas composições descritas como se segue.

3.2.1. Caldo manitol

Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Bacto-peptona (Difco)	3,0 g
D-manitol (Difco)	25,0 g
Ágar bacteriológico (Difco)	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml

3.2.2. Meio de manutenção

Extrato de levedura (Difco)	10,0 g
Bacto-peptona (Difco)	10,0 g

Glicose (Reagen)	10,0 g
Ágar bacteriológico (Difco)	20,0 g
Etanol a 95 % (Ecibra)	30,0 ml
Ácido acético a 99,8 % (Merck)	10,0 ml
Água destilada	1000,0 ml

3.2.3. Meio de pré-inóculo

Extrato de levedura (Difco)	10,0 g
Peptona bacteriológica (Difco)	10,0 g
Glicose (Reagen)	10,0 g
Etanol a 95 % (Ecibra)	20,0 ml
Ácido acético a 99,8 % (Merck)	10,0 ml
Água destilada	1000,0 ml

3.2.4. Meio de incubação

Extrato de levedura (Difco)	10,0 g
Peptona bacteriológica (Difco)	10,0 g
Glicose (Reagen)	10,0 g
Etanol a 95 % (Ecibra)	40,0 ml
Ácido acético a 99,8 % (Merck)	10,0 ml
Água destilada	1000,0 ml

3.3. Polissacarídeos para a Imobilização Celular

Os polissacarídeos utilizados como suportes na imobilização das células foram :

- 1) *k*-carragena : tipo I, código G:1250, fornecido pela Hércules do Brasil Produtos Químicos Ltda.
- 2) Alginato de sódio : lote AWK 3647, produzido pela Wako Pure Chemical Ind. Ltd.
- 3) Pectina cítrica : tipo LMP 8002, código 6628, fornecida pela Braspectina S/A.

3.4. Sais Gelificantes

Os sais gelificantes foram específicos para os polissacarídeos utilizados :

- 1) Cloreto de potássio (KCl), de marca Ecibra, para a gelificação do k-carragena.
- 2) Cloreto de cálcio bi-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), de marca Synth, para a gelificação do alginato de sódio e da pectina cítrica.

3.5. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram :

- # espectrofotômetro modelo Spectronic 70, Bausch & Lomb.
- # cromatógrafo modelo 37-D, com detector de ionização de chama, da Instrumentos Científicos C.G. Ltda.
- # coluna cromatográfica PAC 2626, da Instrumentos Científicos C.G. Ltda.
- # integrador processador modelo CG200, da Instrumentos Científicos C.G. Ltda.
- # autoclave horizontal, marca Sociedade Fabbe Ltda.
- # mesa rotatória com controle de temperatura, de marca Superohm.
- # câmara de fluxo laminar, modelo VLFS-18-M, marca Veco.
- # balança analítica, marca Sauter.
- # balança semi-analítica modelo B600, Micronal.
- # transformador variador de voltagem tipo ATV-215-M, da Sociedade Técnica Paulista Ltda.
- # banho-maria ultratermostático, modelo 111, da Fanem Ltda.
- # circulador de temperatura constante modelo 8000, marca Poly Science.
- # medidor de pH modelo 1500, Ingold.
- # compressor de ar modelo Schulz Dentalcompressor, da Metalúrgica Schulz S. A.
- # estufa para B.O.D., da Fanem.
- # bomba peristáltica Masterflex, com variação de velocidade de 5 a 600 rpm e vazão de 0,3 a 2,28 l/min, para mangueiras de 0,9 cm de

diâmetro interno.

medidor de oxigênio dissolvido modelo 53, da Yellow Springs Instrument Co.

registrador modelo RB102, da ECB Equipamentos Científicos do Brasil.

biorreator cilíndrico-cônico de vidro Pyrex, de capacidade máxima igual a 250 ml.

coluna de vidro cilíndrica, de capacidade máxima igual a 1540 ml.

3.6. Instalações Experimentais

As instalações experimentais constam basicamente do sistema aquecido para a imobilização celular, do sistema de caracterização indireta das matrizes de imobilização e do sistema de fermentação em reator de leito circulante, cujas montagens são descritas a seguir.

3.6.1. Sistema aquecido para a imobilização celular

Na etapa de confecção das partículas de gel contendo células imobilizadas, utilizando-se seringa hipodérmica, freqüentemente ocorrem entupimentos, além das dificuldades relativas à extrusão. Este fato ocorre principalmente quando a matriz de carragena está envolvida, devido à elevada viscosidade da suspensão polimérica a temperaturas menores que 40°C.

Com o intuito de facilitar e acelerar o processo de extrusão, desenvolveu-se um sistema que permitiu o aquecimento da seringa durante a confecção das partículas, possibilitando que se realizasse esta etapa em intervalos de tempo de cerca de 10 minutos.

O sistema em questão consta de uma seringa cirúrgica de vidro, de 50 ml de capacidade, envolvida por uma fita aquecedora de amianto. Sobre a fita, dispôs-se um tecido de gaze para o isolamento térmico e uma proteção plástica.

À fita aquecedora, ligou-se um transformador-variador de

voltagem, o que permitiu que se mantivesse a temperatura de cerca de 38°C no interior da seringa.

3.6.2. Sistema de caracterização da estrutura porosa das matrizes de imobilização

A caracterização da estrutura porosa das matrizes de gel utilizadas na imobilização foi feita indiretamente, através da permeabilidade dos seus leitos.

A montagem experimental em escala de bancada está esquematizada na Figura 13, sendo constituída de uma coluna de vidro, com altura de 40 cm e diâmetro interno igual a 7 cm, à qual se acoplou uma bomba peristáltica de vazão constante e um manômetro de tubo em "U", utilizando como fluido manométrico mercúrio.

O leito de partículas foi mantido fixo através de duas placas porosas de sustentação, constituídas de esferas de vidro de cerca de 1,5 mm de diâmetro artificialmente consolidadas com 5 % em peso de cola Araldite. Uma solução de sacarose, de concentração conhecida, era alimentada continuamente na parte inferior da coluna.

Através deste sistema, foi possível obter-se dados de variação de queda de pressão desenvolvida ao longo do tempo.

3.6.3. Sistema de fermentação em biorreator

Na Figura 14, pode-se observar um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado nos testes de fermentação em biorreator.

A montagem consta de um biorreator de geometria cilíndrico-cônica, o qual pode ser visualizado em detalhes na Figura 15. O projeto deste reator foi baseado no equipamento utilizado por Osuga e colaboradores [9], ao qual foram adicionadas algumas modificações, como a abertura de um poço para termômetro.

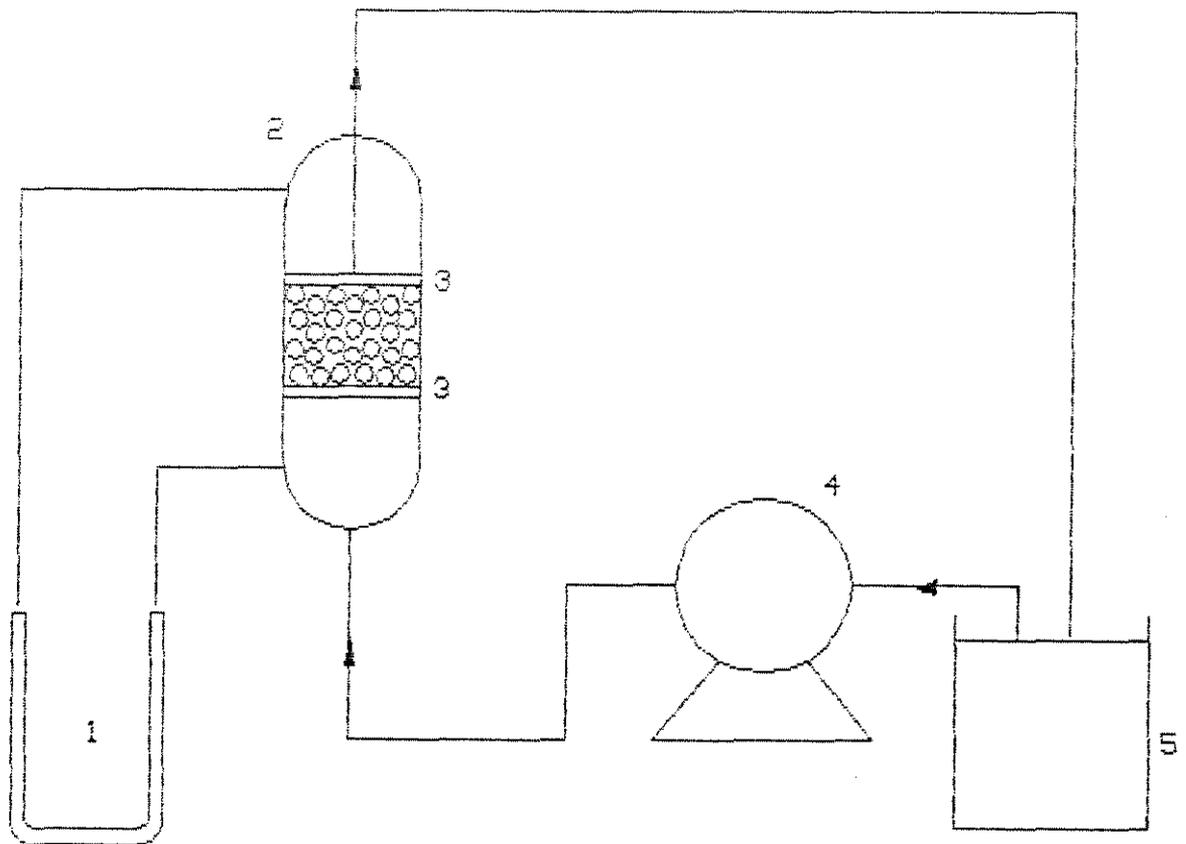


Figura 13 - Representação esquemática do sistema de medida de variação de queda de pressão ao longo do tempo para leitos constituídos por partículas de gel. 1) Manômetro de tubo em "U"; 2) Coluna de vidro parcialmente preenchida por partículas de gel; 3) Placa distribuidora; 4) Bomba peristáltica de vazão constante; 5) Reservatório da solução de sacarose.

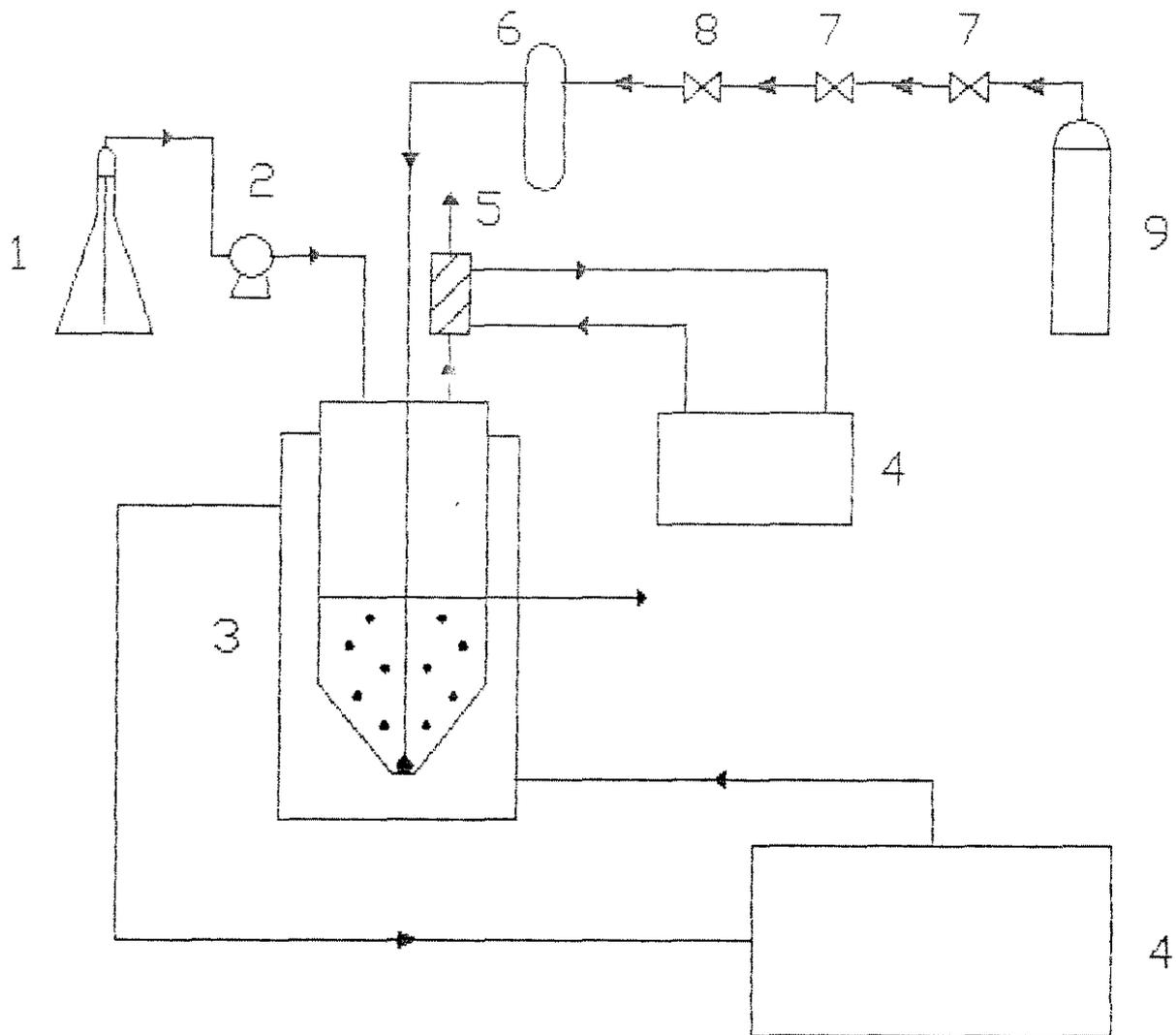


Figura 14 - Representação esquemática do sistema de fermentação em biorreator. 1) Reservatório de meio de cultura; 2) Bomba peristáltica; 3) Biorreator; 4) Banho termostático; 5) Condensador; 6) Capilar indicador da vazão de gás; 7) Válvula reguladora de pressão; 8) Válvula reguladora de vazão; 9) Torpedo de oxigênio ou compressor odontológico.

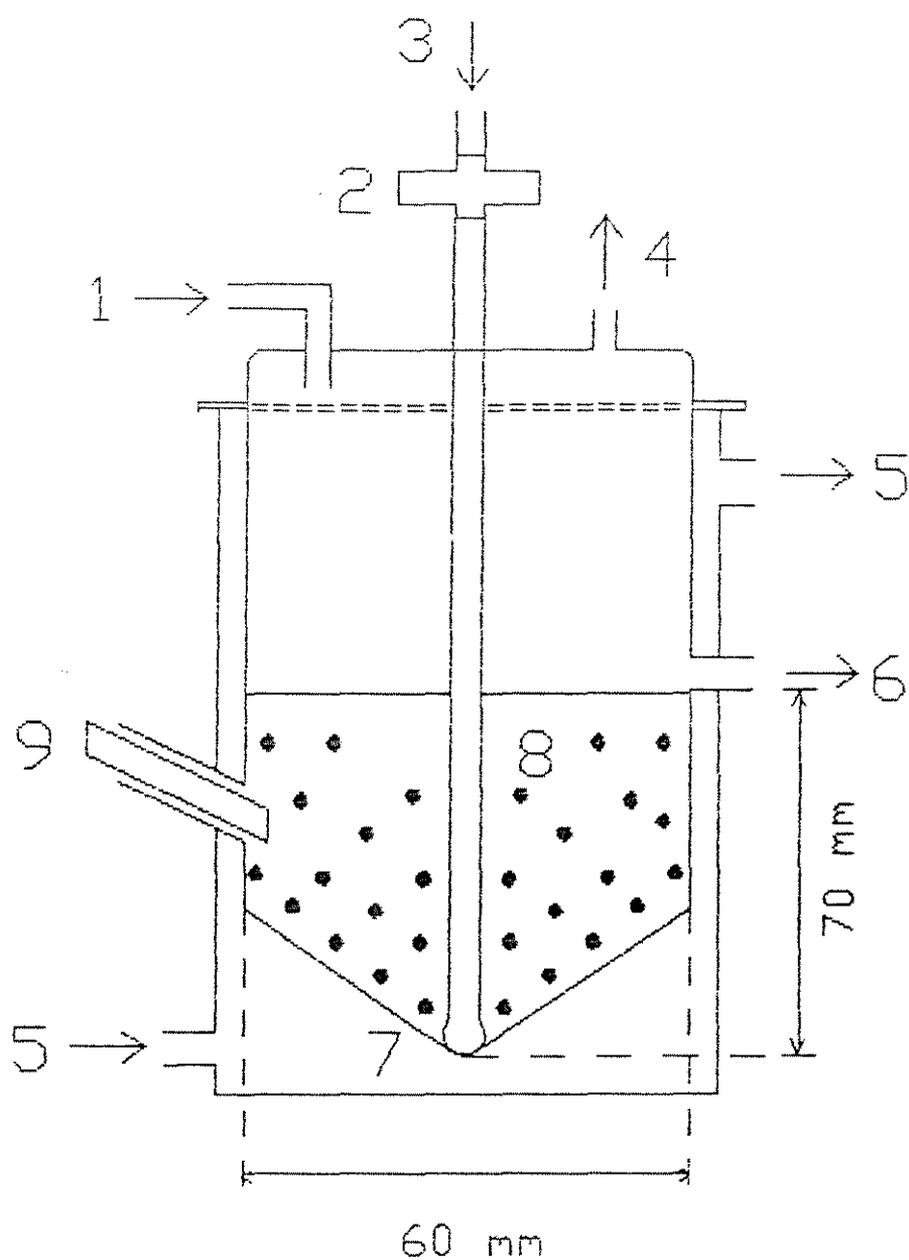


Figura 15 - Esquema detalhado do biorreator utilizado.
 1) Alimentação de meio de cultura; 2) Filtro;
 3) Entrada de gás; 4) Saída de gás; 5) Água termostatzada;
 6) Saída do meio fermentado; 7) Placa de vidro porosa para a distribuição de gás;
 8) Partículas de gel; 9) Poço para termômetro.

3.7. Métodos Analíticos

3.7.1. Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa. As amostras foram previamente preparadas segundo a descrição que se segue : a 0,5 ml de amostra, adicionou-se 0,5 ml de uma solução aquosa a 0,09 % (v/v) em ácido clorídrico e 4,0 ml de água destilada. As condições de análise foram as seguintes :

Temperatura do detector : 175°C

Temperatura da coluna : 145°C

Temperatura do vaporizador : 180°C

Vazão de ar : 300 ml/min

Vazão de nitrogênio : 30 ml/min

Vazão de hidrogênio : 34 ml/min

3.7.2. Determinação da concentração de ácido acético

A análise do ácido acético foi feita por cromatografia gasosa e por titulação com uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 0,10 N, utilizando-se também fenolftaleína como indicador. As determinações cromatográficas foram feitas nas mesmas condições empregadas para a análise do etanol.

3.7.3. Determinação da concentração de glicose

A glicose presente no meio de cultura foi determinada como açúcares redutores totais, através do método espectrofotométrico adaptado de Somogyi [15], descrito no Anexo A.

3.7.4. Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi realizada por dois métodos distintos : contagem de colônias em placas de Petri e medida da absorbância de soluções [40]. No primeiro caso, semeava-se uma alíquota de 0,1 ml de amostra, convenientemente

diluída, na superfície de meio de manutenção contido em placas de Petri. Após incubação por 72 a 96 horas em estufa a 30°C, contava-se as colônias crescidas com o auxílio de uma lupa. Os resultados eram obtidos em termos de unidades formadoras de colônias por mililitro de solução, ufc/ml, considerando-se que cada célula viável originava uma colônia.

No caso de células contidas em meio líquido, as diluições foram feitas em solução estéril de NaCl a 0,25 % (m/v). Os géis de carragena contendo células imobilizadas passavam por uma etapa de solubilização preliminar, para que os microrganismos fossem liberados em solução. Para tal, procedia-se à diluição de cerca de 0,2 g de esferas de gel em um tubo de ensaio contendo 10,0 ml de solução estéril de NaCl a 1 % (m/v). Subseqüentemente, tal suspensão era submetida, por 7 minutos, à temperatura de 45°C, em um banho termostático. Após este período, a suspensão era homogeneizada em agitador de tubos, obtendo-se uma solução bastante viscosa, a qual era, então, convenientemente diluída em solução estéril de NaCl a 0,25 % (m/v) e inoculada em placas de Petri contendo meio de manutenção.

A determinação da concentração celular pela medida da absorvância das soluções foi feita diluindo-se a amostra de 5 a 10 vezes em água destilada, de maneira a se trabalhar na faixa linear aplicável ao método. A absorvância foi lida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm. Os valores foram convertidos em biomassa através de uma curva que correlacionava massa celular seca com a absorvância das respectivas soluções microbianas. No Anexo B, encontra-se a descrição detalhada do método de obtenção da massa celular seca.

3.7.5. Determinação do pH

O pH das amostras foi medido diretamente pelo uso de um pHmetro.

3.8. Procedimentos Experimentais

3.8.1. Preparo dos meios de cultura

Os reagentes sólidos dos meios de cultura (D-manitol, extrato de levedura, peptona, glicose e ágar) foram solubilizados em água destilada, nas proporções citadas no item 3.2 deste capítulo, após o que foram tratadas termicamente em autoclave a 121 °C, por 15 minutos. O etanol foi adicionado aos meios de cultura após a esterilização dos mesmos, depois que estes tivessem alcançado a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi adotado para a adição do ácido acético.

No preparo do meio de incubação para os testes referentes à verificação do efeito isolado do cloreto de potássio e do cloreto de cálcio na fermentação com células livres, adicionou-se estes sais de modo que se atingisse concentrações finais de até 0,05 M dos mesmos no meio fermentativo. A esterilização foi feita nas mesmas condições citadas anteriormente.

3.8.2. Preparo do pré-inóculo

Com o objetivo de obter suspensões microbianas de densidade celular elevada, indispensável na fase de imobilização, foram desenvolvidos diversos procedimentos, os quais estão descritos a seguir. Nestes experimentos, partia-se sempre da cultura liofilizada para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Procedimento A

- 1) Reativação da cultura liofilizada contida em ampola tipo FTPT, em tubo de ensaio contendo 5,0 ml de caldo manitol, em estufa a 30 °C, por 48 horas.
- 2) Repicagem da cultura reativada em tubo de ensaio inclinado, contendo meio de manutenção, e incubação em estufa a 30 °C, por 24 horas.
- 3) Inoculação de uma alçada da cultura em tubo de ensaio contendo 10,0 ml de meio de pré-inóculo e incubação em estufa a 30 °C por 96 horas.
- 4) Transferência de todo o volume da cultura crescida para

erlenmeyer de 250 ml de capacidade, contendo 50 ml de meio de incubação. Incubação em mesa rotativa a 30°C e 100 rpm, por 40 horas.

Procedimento B

1) Reativação da cultura liofilizada contida em ampola tipo FTPT, em tubo de ensaio contendo 5,0 ml de caldo manitol, em estufa a 30°C, por 72 horas.

2) Repicagem da cultura reativada em 70 ml de meio de manutenção inclinado, contido em frasco de diluição para análise de leite de 170 ml de capacidade. Incubação em estufa a 30°C, por 72 horas.

3) Raspagem da cultura crescida em superfície e suspensão das células em 70 ml de meio de incubação. Transferência do material para erlenmeyer de 250 ml de capacidade e incubação em mesa rotativa a 30°C e 150 rpm, por 48 horas.

4) Adição de 50 ml de meio de incubação. Incubação em mesa rotativa a 30°C e 150 rpm, por 24 horas.

Procedimento C

1) Reativação da cultura liofilizada contida em ampola tipo FTPT, em tubo de ensaio contendo 5,0 ml de caldo manitol, em estufa a 30°C, por 72 horas. No caso de utilização de ampola tipo CCT, a reativação é conduzida empregando-se 10 ml de caldo manitol, distribuídos em dois tubos de ensaio.

2) Repicagem em 50 placas de Petri contendo meio de manutenção. Incubação em estufa a 30°C, por 72 horas.

3) Raspagem das colônias crescidas em superfície e suspensão das mesmas em 50 ml de meio de incubação. Transferência deste material para erlenmeyer de 250 ml de capacidade e incubação em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm, por 36 horas.

Procedimento D

1) Reativação da cultura liofilizada contida em ampola tipo FTPT, em tubo de ensaio contendo 5,0 ml de caldo manitol. Incubação em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm por 48 a 50 horas. No caso da utilização de cultura contida em ampola tipo CCT, a reativação é

conduzida empregando-se 10,0 ml de caldo manitol, distribuídos em dois tubos de ensaio.

2) Repicagem em 50 placas de Petri contendo meio de manutenção. Incubação em estufa a 30°C, por 72 horas.

3) Raspagem das colônias crescidas em superfície e suspensão das mesmas em 50 ml de meio de incubação. Transferência deste material para erlenmeyer de 250 ml de capacidade e incubação em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm, por 27 horas.

Procedimento E

No caso da utilização de elevados volumes de pré-inóculo, os aumentos de volume foram obtidos através da adição diária de 100 ml de meio de incubação fresco à cultura crescida em erlenmeyer de 250 ml de capacidade, obtida através do procedimento D, e da distribuição desta suspensão celular em dois novos frascos, os quais eram mantidos em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm por 24 horas, quando se adicionava novamente o meio de incubação fresco, repetindo-se esta operação até que o volume de suspensão celular necessário fosse alcançado.

3.8.3. Preparo das partículas de gel contendo células imobilizadas

O processo de imobilização de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 envolveu três etapas básicas: a obtenção da suspensão polimérica a ser misturada ao pré-inóculo, extrusão da suspensão resultante desta mistura em solução contendo sal gelificante e gelificação das partículas.

Na primeira etapa, pesava-se uma determinada massa de polissacarídeo, de 0,51 a 1,13 g, à qual se adicionavam 18 ml de água destilada estéril. Mediante agitação e aquecimento até 80°C, obtinha-se uma suspensão homogênea. A temperatura da suspensão polimérica era reduzida a 40°C, no caso de géis de carragena, a 35°C para a suspensão de alginato e a 30°C para os géis de pectina. Paralelamente, o pré-inóculo era termostaticado a 35°C. Misturava-se, então, 6 ml de pré-inóculo à suspensão polimérica, e

homogeneizava-se com bastão de vidro.

Na etapa subsequente, procedia-se à confecção das partículas, gotejando-se a suspensão obtida através de uma seringa hipodérmica de 50 ml de capacidade, munida de uma agulha de 1 mm de diâmetro interno, em 200 ml de uma solução aquosa estéril contendo o sal gelificante, sendo este cloreto de potássio para a matriz de carragena, nas concentrações de 0,10, 0,50 e 1,00 M, ou de cloreto de cálcio, a 1,00 M, no caso de se utilizar pectina ou alginato de sódio.

Com este procedimento, obtinha-se partículas aproximadamente esféricas de cerca de 3 mm de diâmetro, as quais eram mantidas imersas em solução de gelificante por períodos de tempo de 10 minutos a 20 horas, a 10°C, em geladeira.

Imediatamente antes de sua utilização, as partículas eram separadas da solução onde estavam imersas, por filtração, sendo em seguida lavadas com 200 ml de água destilada a 10°C, para a remoção do excesso de gelificante.

Todas as etapas eram realizadas assepticamente.

3.8.4. Testes para a seleção da cepa

A determinação da produtividade das cepas de CCT 0190, CCT 1706, CCT 1724 e CCT 2013, ao longo do tempo, foi feita de acordo com a descrição que se segue. Para cada cepa testada, partindo-se de um inóculo celular obtido segundo o procedimento B descrito neste capítulo, inoculou-se um frasco tipo fernbach de 2,8 l de capacidade, contendo 400 ml de meio de incubação, com 100 ml de suspensão microbiana, com o intuito de se obter uma boa aeração durante o cultivo. Cada frasco foi devidamente tampado com um rodilhão de algodão estéril. Os experimentos foram conduzidos em mesa rotativa a 30°C e 150 rpm, por 185 horas, onde se acompanhou as variações de concentração celular, por leitura da absorbância, e de ácido acético, por titulação potenciométrica.

O critério de seleção da cepa foi baseado nas curvas obtidas ao se graficar a taxa de produção específica de ácido acético versus o tempo de fermentação, considerando-se que a linhagem que

se apresentasse, por maior tempo, produzindo ácido acético a taxas específicas razoavelmente elevadas, seria a mais adequada.

3.8.5. Método de obtenção da curva de variação da taxa específica de produção de ácido acético com o tempo de fermentação

A taxa específica de produção de ácido acético, μ_p , para cada cepa testada foi obtida calculando-se o valor da derivada da curva de síntese de produto, em pontos discretos, e de sua subsequente divisão pelo valor da concentração celular correspondente a este ponto, obtido da curva traçada para o crescimento celular. Repetindo-se este procedimento para diversos tempos de fermentação, obtém-se a curva de variação da taxa específica de produção de ácido acético com o tempo.

3.8.6. Testes para a avaliação do efeito das concentrações de cloreto de potássio, cloreto de cálcio, etanol e ácido acético no processo fermentativo

Os ensaios para a determinação do efeito isolado da presença destes compostos sobre a produção de ácido acético por células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 foram conduzidos em erlenmeyers de 250 ml de capacidade, contendo 45 ml de meio fermentativo inoculados com 5 ml de suspensão celular, obtida segundo o procedimento D, descrito neste capítulo.

Os meios fermentativos apresentavam a composição básica do meio de incubação, ao qual se adicionou ou subtraiu os compostos citados, variando-se suas concentrações, em cada frasco, de acordo com as Tabelas 7 a 10.

Todos os ensaios foram conduzidos em mesa rotativa a 200 rpm e 30°C, sendo interrompidos após 72 horas. Antes e após as fermentações, retirou-se amostras para a determinação das concentrações de ácido acético.

Tabela 7 - Composição do meio fermentativo. Variação da concentração de cloreto de potássio no meio de incubação.

Ensaio	1	2	3	4	5	6
Conc. de KCl (mM)	0,0	10	20	30	40	50

Tabela 8 - Composição do meio fermentativo. Variação da concentração de etanol no meio de incubação.

Ensaio	Conc. de Etanol (g/l)
1	2,5
2	10,4
3	18,3
4	26,2
5	34,1
6	42,0
7	49,9
8	57,8
9	65,7
10	81,5

Tabela 9 - Composição do meio fermentativo. Variação da concentração de cloreto de cálcio no meio de incubação.

Ensaio	1	2	3	4	5	6
Conc. de CaCl_2 (mM)	0,0	10	20	30	40	50

Tabela 10 - Composição do meio fermentativo. Variação da concentração de ácido acético no meio de incubação.

Ensaio	Conc. de Ác. Acético (g/l)
1	3,2
2	8,3
3	12,7
4	17,7
5	22,8
6	27,9
7	33,4
8	42,8
9	63,5
10	83,3

3.8.7. Testes para a verificação da influência do polímero e do meio de gelificação na atividade do biocatalisador

Tais experimentos foram realizados utilizando-se massas de 1,02 g de carragena ou pectina cítrica, e de 0,51 g de alginato de sódio, o que corresponde a 4,25 % e 2,13 % (m/v), respectivamente. A confecção das partículas de gel foi feita segundo o procedimento descrito no item 3.8.3 deste capítulo. Para os testes de avaliação da atividade dos biocatalisadores, inoculou-se frascos erlenmeyers de 250 ml de capacidade, contendo 60 ml de meio de incubação, com 15 ml de partículas de gel. As fermentações foram conduzidas em mesa rotativa a 180 rpm e 30°C, por 212 horas. No decorrer das fermentações, avaliou-se as concentrações de ácido acético. Paralelamente, foi conduzida uma fermentação com bactérias livres em solução, com a mesma concentração celular inicial que os ensaios envolvendo géis.

3.8.8. Testes para a avaliação do desempenho do biocatalisador, utilizando-se carragena como suporte de imobilização

Os ensaios subseqüentes, onde foram utilizados géis de carragena, foram conduzidos em erlenmeyers de 250 ml de capacidade, contendo 40 ml de meio de incubação inoculados com 10 ml de partículas de biocatalisador. As fermentações foram realizadas em mesa rotativa a 200 rpm e 30°C.

3.8.9. Testes para a avaliação dos efeitos das variáveis da imobilização na estrutura final do suporte

Estes ensaios foram conduzidos utilizando-se a montagem experimental descrita no item 3.6.2 deste capítulo, tendo-se como base o fato de que o escoamento de soluções aquosas de sacarose através de leitos de géis fragiliza as partículas pelo acesso deste açúcar ao interior das mesmas, fragilizando suas estruturas e tornando-as mais susceptíveis à deformação. Assim, leitos

constituídos de partículas de géis podem ser caracterizados através das permeabilidades atingidas em estado estacionário, uma vez que o inverso da permeabilidade representa a resistência ao escoamento no meio poroso.

Os géis testados foram obtidos segundo a metodologia descrita no item 3.8.3 deste capítulo, utilizando-se células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 não viáveis.

O empacotamento do leito de partículas submetidas à caracterização foi feito colocando-se um volume adequado (50 ml) de pellets de gel, de composição definida, no interior da coluna. A solução de sacarose, a 1,5 % (m/v), era alimentada continuamente na parte inferior da coluna com uma vazão inicial muito baixa, a qual era mantida até que a coluna estivesse completamente cheia. Este procedimento inicial minimizava a formação de bolhas de ar no interior do leito. Em seguida, a vazão era regulada para 16,13 ml/s e os dados de queda de pressão eram coletados ao longo do tempo, por cerca de 150 minutos.

A determinação da permeabilidade do leito era obtida após a estabilização da deformação, aplicando-se a lei de Darcy. A queda de pressão relativa ao sistema sem partículas de gel era descontada do valor total. Para o escoamento a vazão constante, a queda de pressão é uma função da permeabilidade do leito :

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{\vartheta}{k} \frac{q}{A} \quad (9)$$

onde :

ΔP : queda de pressão

ϑ : viscosidade do fluido

q : vazão de escoamento do fluido

L : comprimento do leito

k : permeabilidade do leito

A : área da secção transversal do leito

3.8.10. Testes para a avaliação do efeito da imobilização na respiração celular

As taxas de respiração celular foram medidas a 30°C,

utilizando-se um eletrodo polarográfico para a determinação do consumo de oxigênio, segundo a técnica desenvolvida por Paz [48].

As amostras, contendo células livres ou imobilizadas, foram adicionadas às soluções-teste previamente aeradas e termostatizadas contidas na cubeta de medida. As taxas de consumo de oxigênio foram medidas em cubeta fechada, imediatamente após a imobilização celular, incluindo-se a etapa de gelificação, de modo que o crescimento microbiano fosse desprezível neste intervalo de tempo.

O cálculo da taxa específica máxima de respiração celular foi feito tomando-se o valor máximo da derivada da curva de decréscimo percentual de concentração de oxigênio dissolvido em solução ao longo do tempo. Este valor foi obtido através da inclinação do trecho linear da curva citada, sendo dividido pela massa total de células presentes em solução. Na Figura 16, são apresentadas as curvas típicas de consumo de oxigênio obtidas para células livres e imobilizadas.

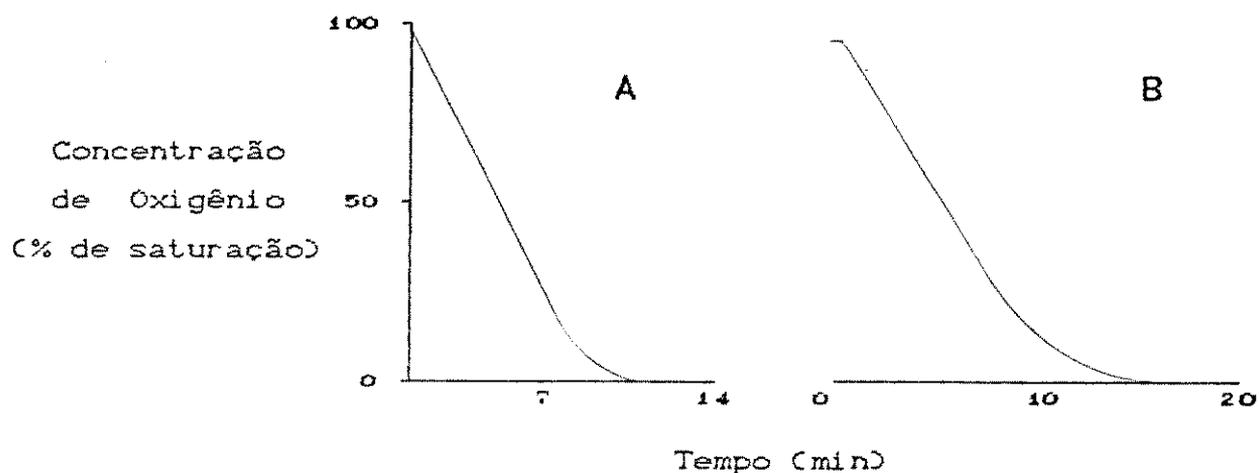


Figura 43 - Curvas típicas de consumo de oxigênio por células livres (A) e imobilizadas em carragena (B), a 30°C.

3.8.11. Método de cálculo da conversão de etanol e da produção de ácido acético

A fração convertida, x_E , de etanol, ou simplesmente conversão, foi definida como a fração de reagente convertida em ácido acético. Como a oxidação de um mol de etanol origina um mol de ácido acético [5], tem-se que :

$$NA_P = NE_O - NE \quad (10)$$

onde :

NA_P - número de moles produzidos de ácido acético.

NE_O - número de moles iniciais de etanol.

NE - número de moles de etanol, em um determinado tempo.

Assim,

$$x_E = \frac{NA_P}{NE_O} \quad (11)$$

ou

$$x_E = \frac{NA - NA_O}{NE_O} \quad (12)$$

onde :

NA - número de moles de ácido acético, em um determinado tempo.

NA_O - número de moles iniciais de ácido acético.

Para se obter a conversão percentual de etanol, basta que se multiplique x_E por 100 %.

3.8.12. Cálculo do rendimento global

O rendimento global, $Y_{P/X}$, foi definido como a razão entre a massa de ácido acético formado, m_P , e o número de células totais, entre livres e imobilizadas, n_X , presentes no sistema composto por 40 ml de meio de incubação e 10 ml de partículas de gel, ou por 50 ml de meio de incubação inoculado, no caso de fermentações com células livres.

- Cálculo da massa de ácido acético formado :

A massa de ácido acético formado por litro de meio de incubação, M_P , pode ser calculada pela seguinte relação :

$$M_P = x_E * C_{E_0} * PM_P \quad (13)$$

onde :

x_E - fração de etanol convertido.

C_{E_0} - concentração inicial de etanol no meio de cultura (mol/l).

PM_P - peso molecular do ácido acético.

Corrigindo-se o valor calculado para o volume de meio presente durante a fermentação, obtém-se :

$$m_P = VMI * M_P \quad (14)$$

com :

$VMI = 40 * 10^{-3}$ l, para sistemas com células imobilizadas,

ou

$VMI = 50 * 10^{-3}$ l, para sistemas apenas com células livres.

- Cálculo do número total de células presentes no sistema

Como a densidade dos géis obtidos é bastante próxima da unidade, não sofrendo variações significativas durante os ensaios, o número total de células em sistemas com microrganismos imobilizados é dado por :

$$n_x = C_i * 10 \text{ g gel} + C_s * 40 \text{ ml} \quad (15)$$

onde :

C_i - concentração de células imobilizadas (ufc/g gel).

C_s - concentração de células suspensas no meio de cultura (ufc/ml).

Para ensaios envolvendo apenas células livres em solução :

$$n_x = C_s * 50 \text{ ml} \quad (16)$$

3.8.13. Testes do sistema de fermentação em biorreator

O sistema de fermentação em biorreator foi testado nas condições experimentais descritas como se segue. Nestes ensaios, foi adicionado o antiespumante industrial FG10, para evitar perdas do meio de cultura pela produção de espuma.

3.8.13.1. Fermentações com células livres

Para a avaliação do efeito da pressão parcial de oxigênio no processo fermentativo, inoculou-se biorreatores de geometria descrita neste capítulo, contendo 140 ml de meio de incubação, com 10 ml de suspensão de *Acetobacter aceti* CCT 1724. A concentração inicial de células nos biorreatores foi de 3×10^7 ufc/ml. Um dos reatores foi alimentado com oxigênio puro, outro com ar comprimido. Em ambos os casos, a vazão dos gases foi mantida em 230 ml/min, e a temperatura de reação, em 34°C. Paralelamente foi conduzida uma fermentação em mesa rotativa a 180 rpm e 34°C, em erlenmeyer de 250 ml de capacidade, contendo a mesma quantidade de meio inoculado.

3.8.13.2. Fermentações com células imobilizadas

Em uma etapa preliminar, foram conduzidos alguns ensaios em biorreator utilizando-se uma rotina experimental semelhante à adotada por Osuga e colaboradores [9], para os microrganismos *A. aceti* CCT 0190, *A. pasteurianus* CCT 1706 e *A. aceti* CCT 1724, cujos inóculos foram obtidos segundo o procedimento A descrito neste capítulo, da ordem de 10^5 ufc/ml. A imobilização celular envolveu matrizes contendo 3,0 % (m/v) de *k*-carragena, de marca Sigma, tipo III-C1263, gelificadas em solução de KCl a 2,0 % (m/v), a 10°C por 20 horas. Subseqüentemente à etapa de imobilização, inoculou-se o biorreator, contendo 137 ml de meio de incubação, com 13 ml de partículas de gel. As fermentações foram conduzidas nas seguintes condições :

- Vazão de alimentação de oxigênio = 230 ml/min.
- Vazão de alimentação de meio de incubação = 137 ml/h.
- Temperaturas de reação = 30 e 34°C, para cada cepa.

Estas condições foram mantidas por 72 horas, e a partir deste período, o meio de incubação foi substituído por um meio de produção, à vazão de 54 ml/h, contendo 0,2 % (m/v) de glicose, 0,2 % (m/v) de peptona e 0,2 % (m/v) de extrato de levedura, além de 1,0 % (v/v) de ácido acético e de 4,0 % (v/v) de etanol a 95 %.

Em testes subseqüentes, imobilizou-se células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 (inóculo de $2,8 \times 10^7$ ufc/ml) em matrizes contendo 4,3 % (m/v) de *k*-carragena de marca Hércules do Brasil, gelificadas em solução aquosa de KCl a 1,0 M, por 10 minutos. O biorreator, contendo 137 ml de meio de incubação foi inoculado com 13 ml de partículas de gel. A fermentação foi conduzida em descontínuo, com vazão de alimentação de oxigênio de 230 ml/min e temperatura de 30°C, até que se observasse o desprendimento de células da matriz, detectado através da turvação do meio de cultivo, segundo a indicação de Sun e Furusaki [10]. A partir deste momento, alimentou-se o sistema com o meio de produção cuja composição foi descrita anteriormente, a uma vazão de 58 ml/h, por 60 horas, mantendo-se as outras condições constantes.

Em um ensaio adicional, inoculou-se o biorreator, contendo 180 ml de meio de incubação, com 20 ml de partículas de gel de *k*-carragena, de marca Hércules do Brasil, a 3,6 % (m/v), preparadas a partir de um inóculo de 3×10^7 ufc/ml. A matriz foi gelificada em solução aquosa de KCl a 1,0 M, a 10°C, por 10 minutos. Paralelamente a este ensaio, foi conduzida uma fermentação em biorreator idêntico, com células livres, na mesma concentração microbiana que o experimento envolvendo células imobilizadas. As condições experimentais destas fermentações descontínuas são descritas como se segue :

- Vazão de alimentação de oxigênio = 307 ml/min.
- Temperatura de reação = 30°C.

No decorrer deste experimento, acompanhou-se a variação de concentração de células livres em ambos os reatores, bem como as variações de concentração de glicose, etanol e ácido acético.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento e Padronização de Metodologia para a Obtenção do Inóculo Celular

Uma das etapas de maior dificuldade durante o desenvolvimento do trabalho experimental foi a obtenção de um inóculo microbiano que apresentasse concentração celular adequada aos ensaios que se pretendia realizar.

Em experimentos preliminares, utilizou-se o procedimento A, descrito no item 3.8.2 do capítulo "Materiais e Métodos" deste trabalho, para a obtenção do inóculo celular. Tal procedimento foi baseado no trabalho de Osuga e colaboradores [9] e, através dele, obteve-se, neste trabalho, inóculos com concentrações celulares da ordem de 10^4 a 10^5 ufc/ml, que se mostraram insatisfatórios tanto aos processos de imobilização como aos de fermentação, por conduzirem a fases adaptativas "lag" excessivamente longas. Desta forma, tornou-se primordial a obtenção de inóculos mais concentrados e que conduzissem a fases "lag" mais curtas.

Com o objetivo de se preparar suspensões celulares mais densas, sem a necessidade de centrifugação, e de acelerar a etapa de preparação do inóculo, foram introduzidas as modificações descritas como procedimentos B, C e D, no capítulo 2 deste trabalho. Tais alterações, constando principalmente de repiques das culturas na superfície do meio de manutenção, conduziram a inóculos mais concentrados, pois a quantidade de oxigênio disponível para o crescimento microbiano é bastante grande para cultivos em superfície, favorecendo a reprodução de células aeróbicas, como as de *Acetobacter*. Os resultados obtidos com as metodologias citadas podem ser observados na Tabela 11. Os limites inferiores e superiores das concentrações celulares obtidas referem-se a inóculos resultantes de ampolas tipo FTPT e CCT, respectivamente.

Tabela 11 - Concentrações celulares e tempos dispendidos na preparação do inóculos, segundo os procedimentos A, B, C, D e E.

Procedimento	Tempo (h)	Concentração Celular (ufc/ml)
A	208	da ordem de $10^4 - 10^5$
B	216	da ordem de 10^6
C	180	da ordem de $10^7 - 10^8$
D	147	da ordem de $10^7 - 10^9$
E	171	da ordem de 10^6

Utilizando-se os procedimentos B e E para a obtenção de inóculo, observou-se uma sensível redução na fase de adaptação microbiana durante as fermentações, se comparada às alcançadas com as outras metodologias. Tal fato deve-se, provavelmente, às sucessivas adições de meio de cultivo às suspensões microbianas, provocando uma exposição gradativa e mais prolongada das mesmas a elevadas concentrações de ácido acético. Desta forma, foi possível obter inóculos mais adaptados ao ácido acético, capazes de suportar condições experimentais mais drásticas, ainda que os mesmos não se apresentassem tão concentrados ao final do pré-cultivo.

O procedimento D apresentou-se bastante reprodutível, sendo, então adotado quando se necessitava de um volume de até 50 ml de inóculo celular, enquanto que o procedimento E foi utilizado quando se requeria volumes de até 100 ml de suspensão celular.

4.2. Fermentações com Células Livres

4.2.1. Verificação da produtividade dos microrganismos utilizados e de suas características fermentativas

Após a inoculação dos meios fermentativos com as cepas a

serem testadas, isoladamente, retirou-se amostras periódicas do caldo fermentado. As variações ao longo do tempo das concentrações celulares e de ácido acético podem ser avaliadas pelas curvas representadas nas Figuras 17 a 20.

Pode-se observar, em todos os casos, uma forte associação entre o crescimento da população bacteriana e a produção de ácido acético. Nota-se também, nas fermentações com todos os microrganismos, a presença de duas fases logarítmicas distintas tanto para o crescimento celular, como para a produção de ácido acético.

Por um certo período de tempo, durante a primeira fase de crescimento, as células se reproduziram a uma velocidade aproximadamente constante, após o que são notados os efeitos inibitórios da presença de ácido acético no meio de cultura, pela diminuição nas taxas específicas de produção de ácido acético. O final da primeira fase de crescimento expressa a adaptação das células às elevadas concentrações de ácido acético no meio de cultura. Após este período, há um novo aumento nas taxas de crescimento celular e de síntese de ácido acético.

Estes resultados são similares aos obtidos por Mori e colaboradores [45], que observaram perfis semelhantes nas curvas de crescimento celular de *Acetobacter rancens* ao longo do tempo, para concentrações iniciais de ácido acético superiores a 17,6 g/l.

A produtividade dos microrganismos testados foi avaliada com base nas curvas de variação das taxas específicas de formação de ácido acético ao longo do tempo, as quais podem ser observadas no Anexo C, nas Figuras A1 a A4. Selecionou-se a cepa *Acetobacter acetii* CCT 1724 para os experimentos posteriores, por esta linhagem apresentar, durante o maior intervalo de tempo, menores decréscimos nas taxas específicas de produção de ácido acético, indicando uma síntese de produto satisfatoriamente estável ao longo do tempo, embora não se tenha alcançado, com esta cepa, os maiores valores absolutos de μ_p , se comparado aos obtidos com os outros microrganismos.

No Anexo D, pode-se observar a morfologia das células e das

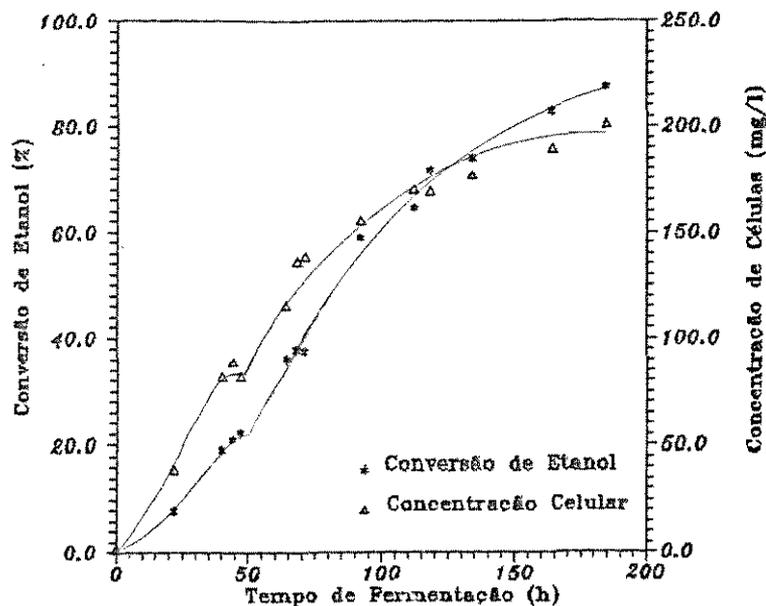


Figura 17 - Curvas de crescimento celular e de produção de ácido acético para *Acetobacter aceti* CCT 0190 cultivado em frasco, a 180 rpm e 30°C. Concentração inicial de células : $5,3 \times 10^5$ ufc/ml.

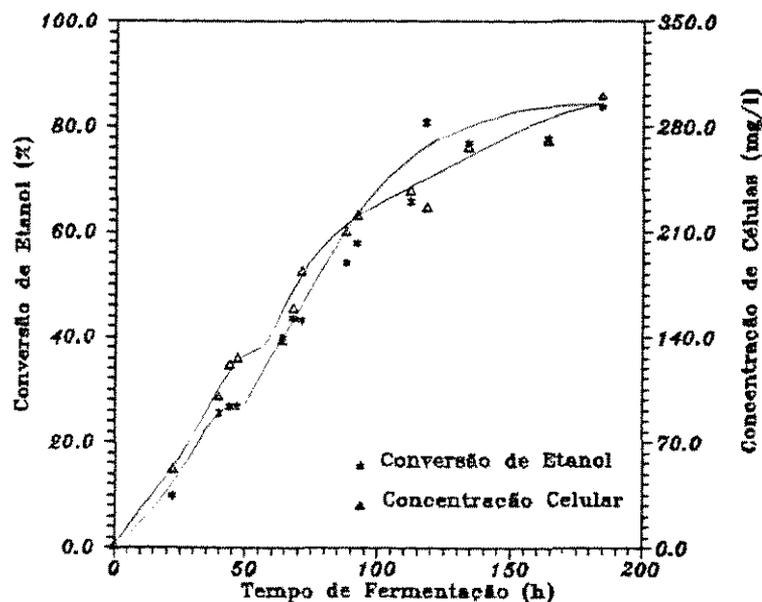


Figura 18 - Curvas de crescimento celular e de produção de ácido acético para *Acetobacter pasteurianus* CCT 1706 cultivado em frasco, a 180 rpm e 30°C. Concentração inicial de células : $5,9 \times 10^5$ ufc/ml.

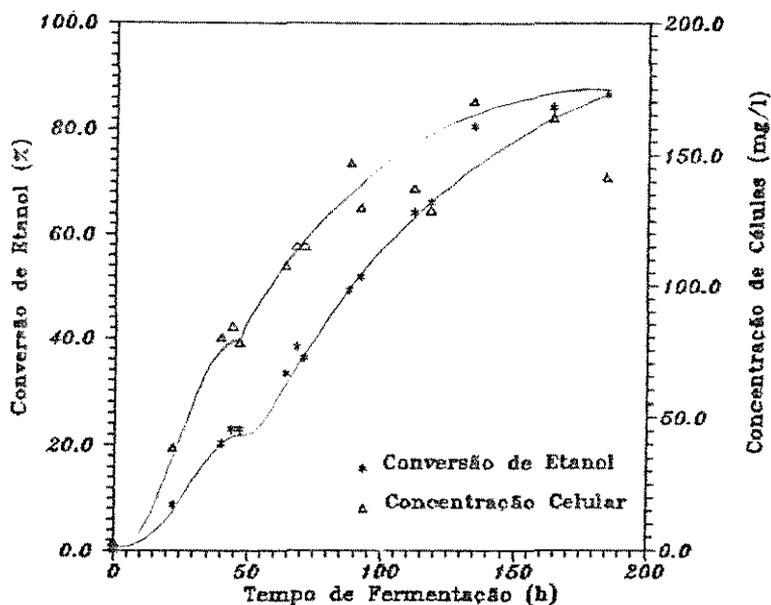


Figura 19 - Curvas de crescimento celular e de produção de ácido acético para *Acetobacter aceti* CCT 1724 cultivado em frasco, a 180 rpm e 30°C. Concentração inicial de células : $1,1 \times 10^6$ ufc/ml.

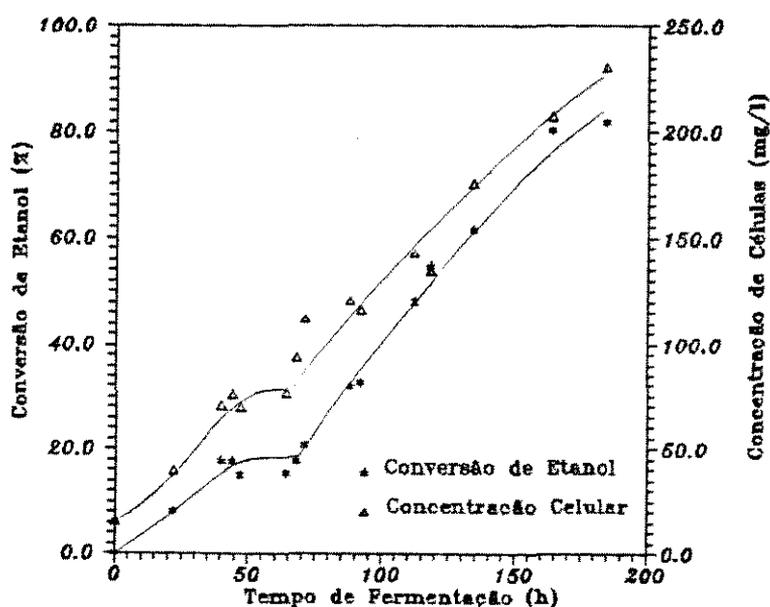


Figura 20 - Curvas de crescimento celular e de produção de ácido acético para *Acetobacter* sp. CCT 2013 cultivado em frasco, a 180 rpm e 30°C. Concentração inicial de células : $4,9 \times 10^5$ ufc/ml.

colônias obtidas com a cepa CCT 1724. Esta linhagem apresenta, logo após a etapa de reativação da ampola liofilizada, coloração rósea para o teste de Gram sendo, portanto, Gram-negativa, como se pode avaliar na Figura F1. Depois de cerca de 200 horas em meio de incubação, as células podem apresentar um resultado positivo para o teste de Gram, tornando-se roxas. Esta variação não é incomum para as células de *Acetobacter* [4]. Na Figura F2, observa-se que as colônias formadas são aproximadamente circulares e de coloração bege. As células isoladas, por sua vez, têm a forma aproximada de bastonetes cocóides, ocorrendo geralmente aos pares.

4.2.2. Efeito da concentração inicial de etanol no processo fermentativo

A Figura 21 mostra as variações de produção de ácido acético em função de diferentes níveis de concentrações iniciais de etanol no meio de incubação, para fermentações em erlenmeyers com *Acetobacter aceti* CCT 1724, conforme procedimento descrito no item 3.8.6 deste trabalho.

A faixa ótima de concentrações iniciais de etanol para a produção de ácido acético localiza-se entre 10,4 a 34,1 g/l. A partir da concentração inicial de etanol de 34,1 g/l, há um nítido decréscimo na produção de ácido acético, a qual se estabiliza em um valor mínimo para concentrações superiores a 57,8 g/l.

Mori e Terui [44] obtiveram resultados similares, observando que as taxas específicas máximas de produção de ácido acético para *Acetobacter rancens* foram verificadas na faixa de concentrações de etanol compreendida entre 20 e 30 ml/l.

4.2.3. Efeito da concentração inicial de ácido acético no processo fermentativo

A Figura 22 mostra as variações de produção de ácido acético em função de diferentes níveis de concentrações iniciais deste composto no meio de incubação, para fermentações em erlenmeyers com *Acetobacter aceti* CCT 1724, conforme procedimento descrito no

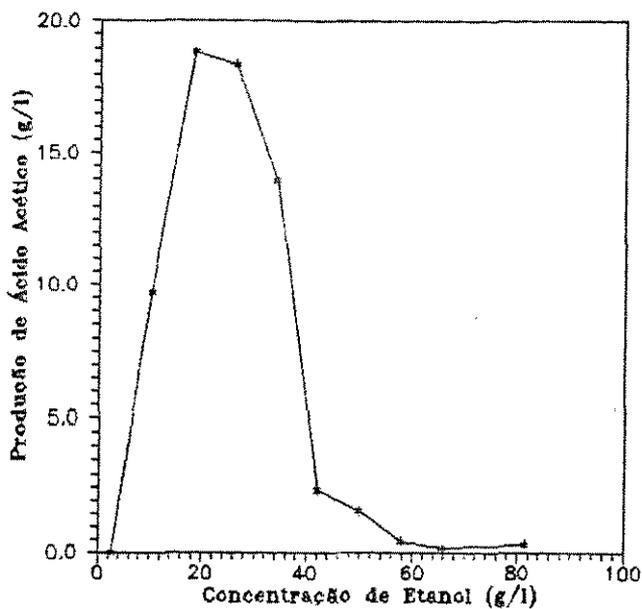


Figura 21 - Efeito da concentração inicial de etanol sobre a produção de ácido acético por *Acetobacter aceti* CCT 1724, para fermentações em frascos a 200 rpm e 30°C.

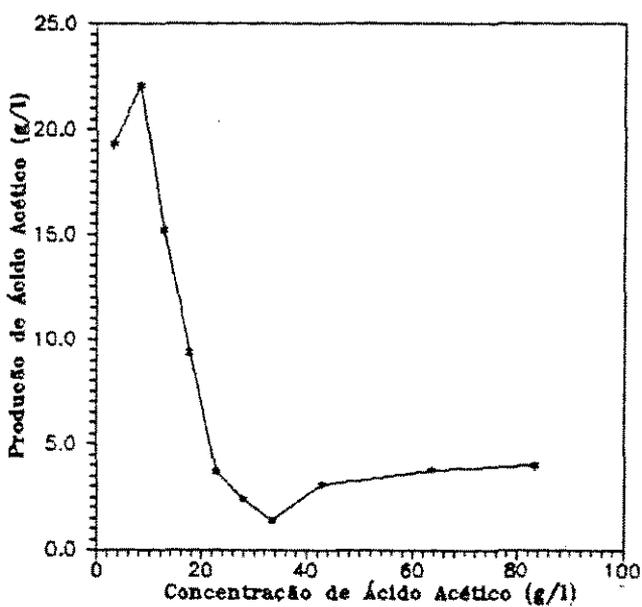


Figura 22 - Efeito da concentração inicial de ácido acético sobre a sua produção por *Acetobacter aceti* CCT 1724, para fermentações em frasco, a 30°C e 200 rpm.

item 3.8.6 deste trabalho.

Os dados experimentais indicam que a produção de ácido acético é crescente para concentrações iniciais de até 8,3 g/l deste composto em solução. Para concentrações superiores a esta, a síntese de ácido acético decresce significativamente, permanecendo estável em valores próximos a 3 g/l, o que caracteriza uma forte inibição de sua produção pela presença de elevadas concentrações de ácido acético.

Assim, a inibição pelo ácido acético é bem maior que a observada por etanol, o que indica que esta cepa não é adaptada à presença de elevadas concentrações de produto no meio de cultivo testado.

4.2.4. Efeito das presenças isoladas de cloreto de potássio e de cloreto de cálcio no processo fermentativo

Diversos autores sugerem a suplementação do meio fermentativo com o sal gelificante empregado na confecção dos pellets contendo células imobilizadas, para garantir a estabilidade química e a integridade mecânica do gel formado [8, 10, 14, 30]. As quantidades adicionadas são bastante variáveis, alcançando amplas faixas, como 0,5 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (3,4 mM para o alginato de cálcio [30] e 11,1 g/l de CaCl_2 (200 mM para a pectina cítrica [14]).

As curvas apresentadas nas Figuras 23 e 24 mostram as variações de produção de ácido acético em função de diferentes concentrações iniciais de cloreto de potássio e de cloreto de cálcio no meio de incubação, para fermentações em erlenmeyers com *Acetobacter aceti* CCT 1724, conforme procedimento descrito no item 3.8.6 deste trabalho. Os resultados obtidos indicam que o efeito inibitório dos íons potássio é bem menor que os dos íons cálcio na produção de ácido acético, para concentrações maiores que 20 mM destes sais no meio fermentativo. No intervalo de concentrações de cloreto de cálcio de 0,0 a 20 mM, este sal funciona, aparentemente, como um ativador, aumentando a produção de ácido acético.

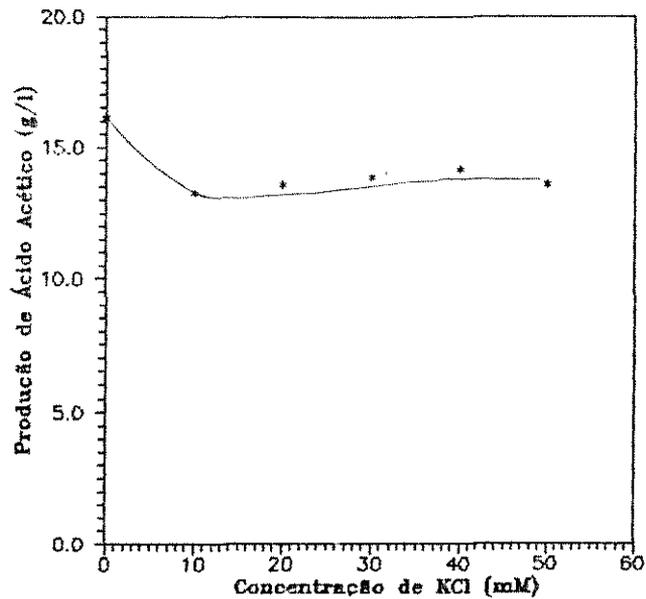


Figura 23 - Influência da concentração inicial de cloreto de potássio na produção de ácido acético por *Acetobacter aceti* CCT 1724, para fermentações em frascos agitados a 200 rpm e a 30°C.

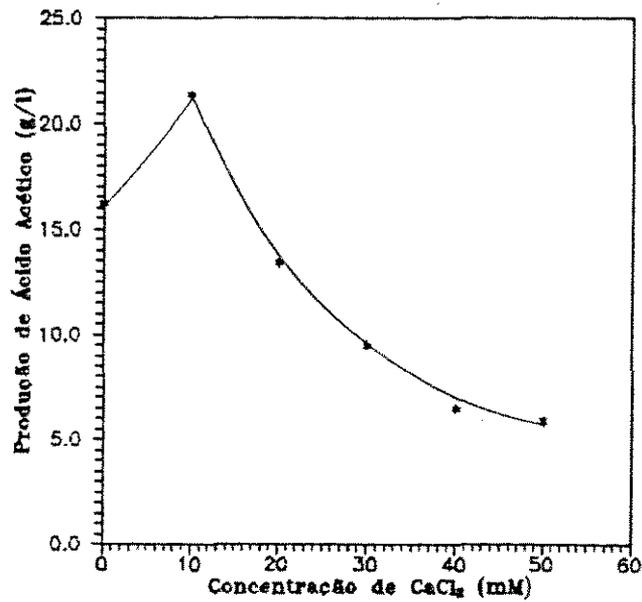


Figura 24 - Influência da concentração inicial de cloreto de cálcio na produção de ácido acético por *Acetobacter aceti* CCT 1724, para fermentações em frascos agitados, a 200 rpm e 30°C.

4.3. Experimentos com Células Imobilizadas

4.3.1. Caracterização dos efeitos da imobilização celular no processo fermentativo

O conhecimento da influência das variáveis envolvidas na imobilização celular é de fundamental importância para a preparação de um biocatalisador que apresente um bom desempenho, e embora alguns tipos de polissacarídeos tenham sido extensivamente utilizados para este fim, há pouca uniformidade nas condições de imobilização citadas pela literatura. Dentre as diversas variáveis que têm efeito comprovado na formação da matriz deste tipo de suporte, e na atividade do biocatalisador, testou-se as que estão relacionadas nos itens que se seguem.

Como regra geral, tanto as fermentações com células livres ou imobilizadas em géis hidrofílicos apresentaram uma longa fase logarítmica, como pode ser observado na Figura 25, com a divisão desta fase de crescimento em duas etapas. Muitas vezes, no entanto, não é possível a observação deste tipo de perfil, devido ao número restrito de pontos experimentais. O atraso da fermentação conduzida com células imobilizadas em relação às livres em solução pode ser explicado pelos efeitos de transferência de massa intrapartícula.

Durante a fermentação, as partículas passaram de transparentes para opacas e esbranquiçadas, havendo o desprendimento de células do gel, verificado através de turvação do meio, avaliações microscópicas e contagem de células viáveis, realizadas em amostras do sobrenadante.

A produção de ácido acético foi portanto, resultante do trabalho de células livres e imobilizadas. Osuga e colaboradores [9] e Sun e Furusaki [10] fizeram observações similares, notando a presença simultânea de células suspensas e imobilizadas em reatores operando continuamente, com células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em matrizes de *k*-carragena e de alginato, respectivamente.

No Anexo D, nas Figuras F3 a F5, pode-se observar claramente

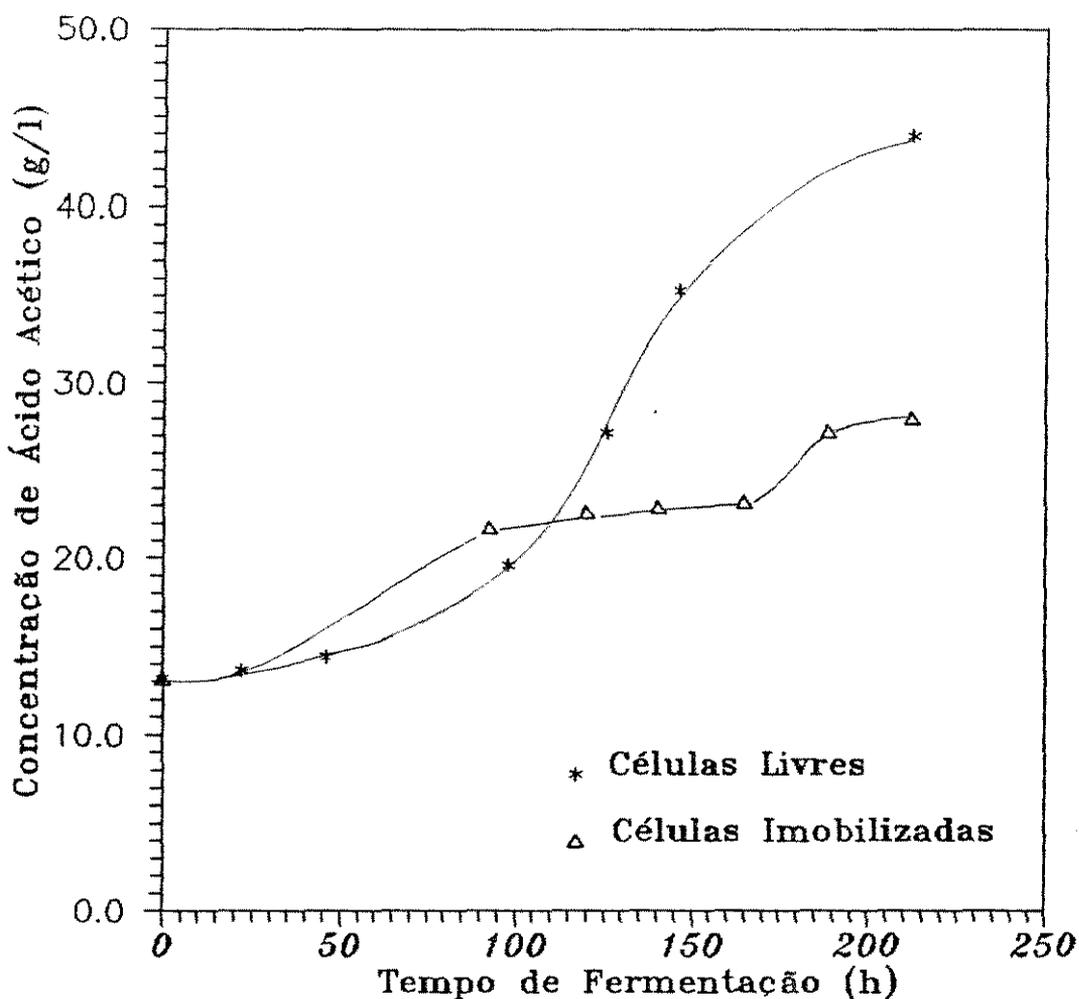


Figura 25 - Comportamento típico das fermentações conduzidas em frascos com células livres ou imobilizadas de *Acetobacter aceti* CCT 1724. Concentração do inóculo celular : $1,8 \times 10^6$ ufc/ml. Células imobilizadas em matrizes contendo 4,25 % de carragena, gelificadas em solução de KCl a 1,0 M, por 10 minutos.

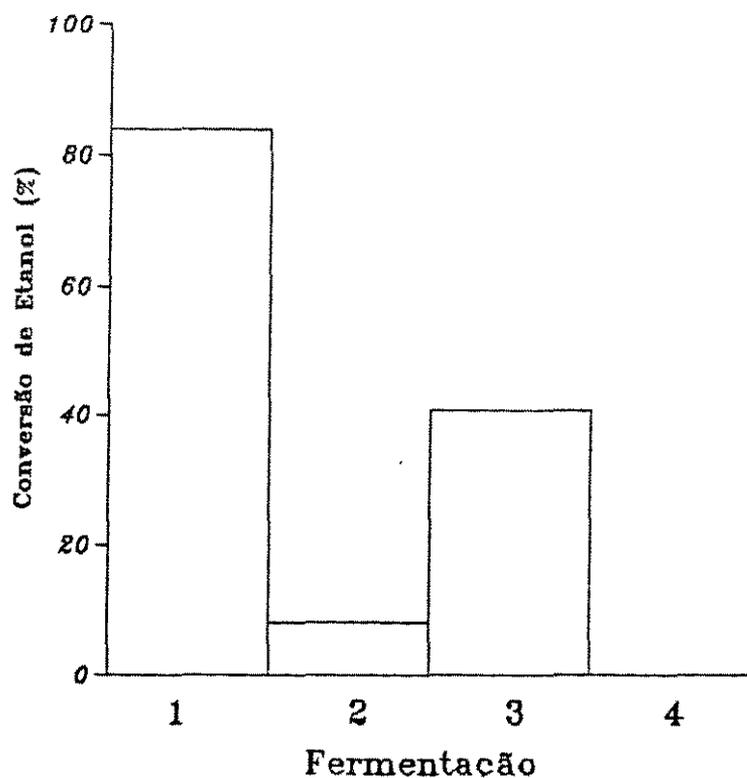
o crescimento bacteriano nas regiões periféricas e na superfície do gel, com a formação de pequenas colônias após cerca de 100 horas de incubação em mesa rotativa a 30°C e 200 rpm. Este tipo de crescimento foi verificado por diversos autores [9, 10, 23, 24, 32, 31, 48], sendo devido à maior disponibilidade de nutrientes, principalmente, de oxigênio, nestas regiões. Desta forma, nas partes centrais não ocorre o desenvolvimento de colônias tão robustas como as encontradas nas proximidades da superfície da partícula.

A redução do coeficiente de difusão de diversas substâncias para o interior de partículas de gel foi estudada por alguns pesquisadores [25, 28, 39], sendo mais acentuada quanto maior a concentração de polissacarídeo. Este comportamento é justificado pela diminuição do tamanho dos poros com o aumento da concentração de polímero, limitando a difusão de substratos e produtos.

4.3.1.1. Influência do tipo de suporte

A aplicabilidade consagrada de diversos polímeros naturais e sintéticos como matrizes para a imobilização de células viáveis motivou o estudo da utilização de géis hidrofílicos à base de *k*-carragena, pectina cítrica e alginato de sódio. Os experimentos foram conduzidos segundo as condições descritas nos itens 3.8.3 e 3.8.7 do capítulo de "Materiais e Métodos" deste trabalho, utilizando-se percentuais de pectina e carragena de 4,25 % e de 2,13 % para o alginato de sódio (concentração total de polissacarídeo na matriz), uma vez que, com estas composições, obtém-se suspensões de polímeros de viscosidades semelhantes. A concentração do inóculo empregado foi de $1,6 \times 10^6$ ufc/ml.

Como pode ser visto na Figura 26, os efeitos da imobilização na atividade biocatalítica dos microrganismos são bem mais acentuados para os géis de pectina e alginato que para o gel de carragena. Isto se deve, provavelmente, à inibição causada pelos íons cálcio presentes obrigatoriamente nas matrizes dos géis de pectina e alginato, uma vez que os efeitos inibidores dos agentes de gelificação foram comprovados experimentalmente com células



Fermentação	Suporte	Concentração de polímero (%)
1	—	—
2	Pectina Cítrica	4,25
3	k-Carragena	4,25
4	Alginato de Cálcio	2,13

Figura 26 - Influência do tipo de polissacarídeo empregado como suporte de imobilização na conversão de etanol a ácido acético por células de *Acetobacter aceti* CCT 1724, após 212 horas de fermentação em frasco, a 180 rpm e 30°C. Concentração do inóculo : $1,6 \times 10^6$ ufc/ml.

livres, sendo mais brandos no caso dos íons potássio, para concentrações acima de 20 mM.

Outro possível motivo para estas variações nas atividades biocatalíticas é a provável diferença entre as estruturas porosas das matrizes formadas, das quais dependem a difusão dos substratos e a facilidade de desprendimento das células do gel.

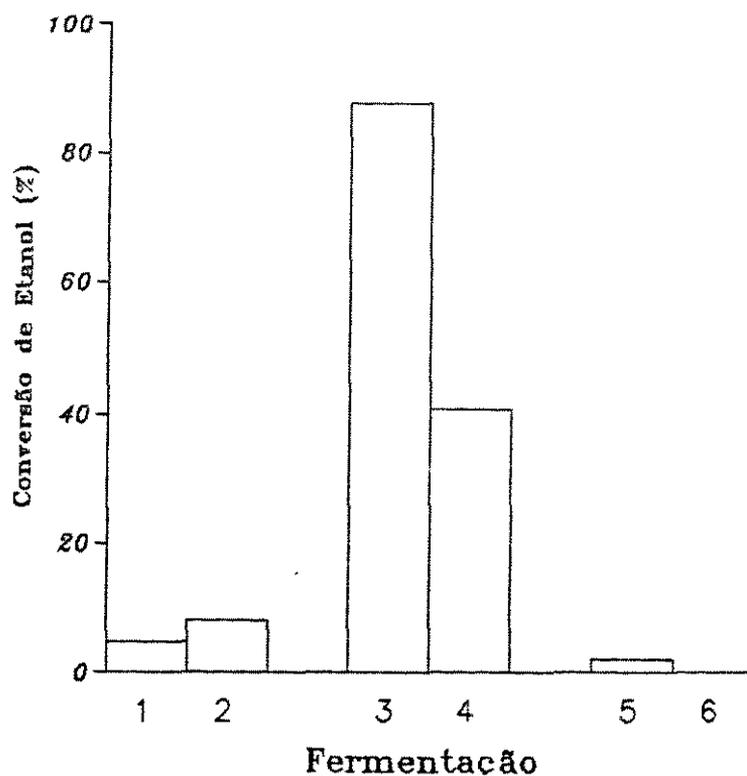
Comparando-se o desempenho das células nos vários géis, obtidos com concentrações de gelificante de 1,0 M e tempo de gelificação de 10 minutos, pode-se observar que o suporte de carragena ofereceu melhores condições para o crescimento das células de *Acetobacter aceti* em seu interior, e que o sistema é bastante sensível à salinidade. Suportes de pectina e alginato, se gelificados em condições mais brandas, provavelmente permitirão melhor crescimento das células em suas matrizes.

4.3.1.2. Influência da concentração inicial de células

A concentração celular é um fator determinante na imobilização de células de *Acetobacter aceti*. Somente a partir de concentrações iniciais da ordem de 10^6 ufc/ml é que se obteve tempos razoáveis de "lag" no processo e um bom crescimento microbiano nos diferentes géis.

Os resultados apresentados nas Figuras 27 e 28 foram obtidos com concentrações de células da ordem de 10^6 ufc/ml, inóculo diluído, e 10^7 ufc/ml, inóculo concentrado. Observando-se a produção de ácido acético com o tempo, verifica-se que, para o gel de carragena, a estrutura porosa não limita o suprimento de oxigênio e de nutrientes para as células. As diferenças dos níveis de conversão nas 212 horas de fermentação foram devidas às mais prolongadas fases "lag" para o inóculo diluído, e às elevadas taxas de evaporação do etanol ao longo do experimento.

Para o suporte de pectina, no entanto, os baixos valores de conversão de etanol obtidos, praticamente dentro do erro experimental, não permitiram conclusões desta natureza, embora a conversão de ácido acético tenha sido ligeiramente superior no caso do inóculo diluído, quando comparado ao concentrado.



Fermentação	Suporte	Inóculo	Concentração de polímero (%)
1	Pectina	Concentrado	4,25
2	Pectina	Diluído	4,25
3	Carragena	Concentrado	4,25
4	Carragena	Diluído	4,25
5	Alginato	Concentrado	2,13
6	Alginato	Diluído	2,13

Figura 27 - Influência da concentração do inóculo empregado na imobilização de *Acetobacter aceti* CCT 1724, em géis de pectina, carragena e alginato, na conversão de etanol a ácido acético, após 212 horas de fermentação em frasco, a 180 rpm e 30°C. Inóculo concentrado : $1,6 \times 10^7$ ufc/ml; inóculo diluído : $1,6 \times 10^6$ ufc/ml.

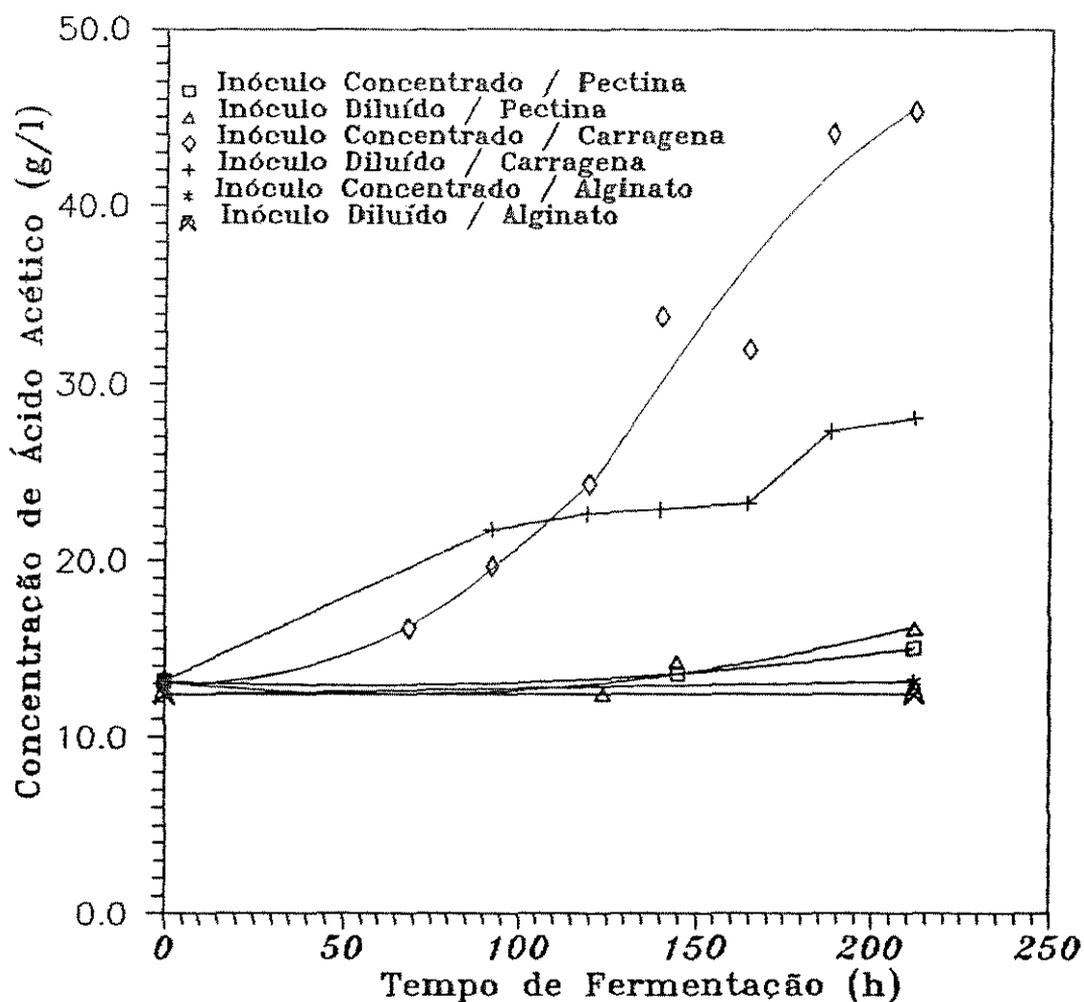


Figura 28 - Influência da concentração do inóculo no perfil de conversão de etanol a ácido acético por células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 imobilizadas em diferentes géis hidrofílicos. Fermentações conduzidas em frascos, a 180 rpm e 30°C. Concentrações de polissacarídeos: pectina = 4,25 %, carragena = 4,25 % e alginato de sódio = 2,13 %. Concentrações celulares: inóculo concentrado = $1,6 \times 10^7$ ufc/ml, inóculo diluído = $1,6 \times 10^6$ ufc/ml.

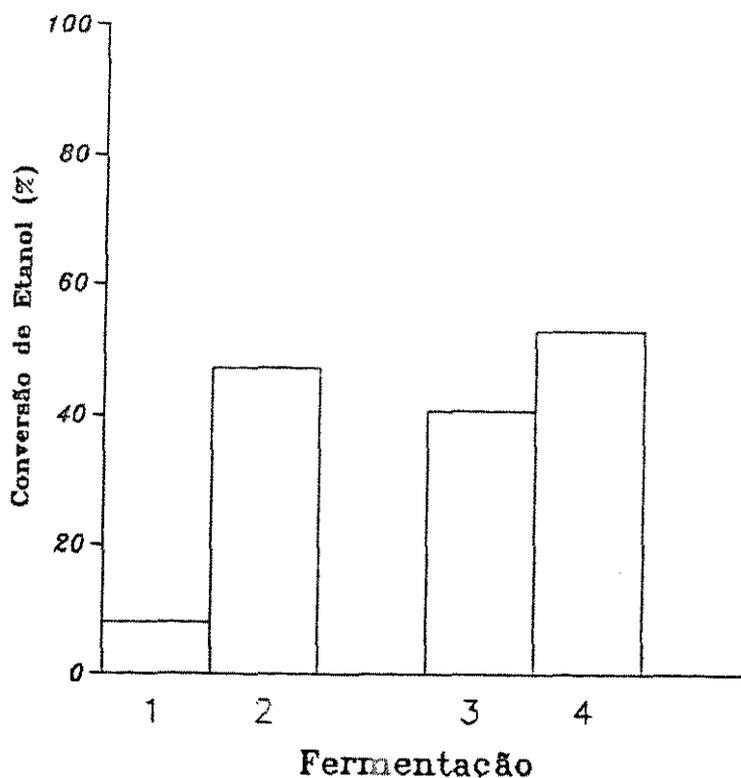
O suporte de alginato de sódio não permitiu o crescimento significativo das células em suas matrizes, provavelmente devido às condições agressivas da etapa de preparação.

Assim, nos experimentos subseqüentes, empregou-se inóculos com concentrações celulares superiores a 1×10^7 ufc/ml, a fim de se evitar longas fermentações, onde inevitavelmente haveria acentuada perda de substrato por evaporação do etanol.

4.3.1.3. Influência do meio de gelificação

O meio de gelificação tem um efeito marcante na estrutura do suporte, o que resulta em apreciável influência na atividade do biocatalisador. Para o teste dos efeitos do meio de gelificação, solubilizou-se o agente gelificante em água destilada ou em meio de incubação, de modo que ambas as soluções tivessem concentrações finais de 1,0 M em cloreto de potássio ou cloreto de cálcio. Tais ensaios tiveram por objetivo proporcionar às células um ambiente menos hostil durante a etapa de gelificação, mantendo-se o mesmo efeito do agente gelificante, de forma que as extensas fases "lag" de crescimento celular e produção de ácido acético observadas durante o processo fermentativo fossem reduzidas. Os experimentos foram conduzidos segundo as condições descritas nos itens 3.8.3 e 3.8.7 do capítulo de "Materiais e Métodos" deste trabalho.

Dos resultados apresentados nas Figuras 29 e 30, pode-se observar os maiores valores de conversão de etanol obtidos nos experimentos onde o agente gelificante foi diluído em meio de incubação. Durante os ensaios, observou-se que o crescimento das células no gel foi bastante acentuado, bem como a liberação de microrganismos no meio de cultura. Assim, pelo perfil das curvas de produção de ácido acético com o tempo, observa-se que houve maior contribuição das células livres em relação às imobilizadas, sem redução aparente da extensão da fase "lag". Embora o crescimento celular tenha sido favorecido nestas condições de gelificação, a estabilidade das matrizes obtidas é bastante baixa, resultando em grande fragmentação dos géis, o que torna sua utilização pouco adequada. Desta forma, nos experimentos



Fermentação	Suporte	Gelificante
1	Pectina	CaCl ₂ / Água
2	Pectina	CaCl ₂ / Meio de Cultura
3	Carragena	KCl / Água
4	Carragena	KCl / Meio de Cultura

Figura 29 - Influência do tipo de diluente do agente gelificante na conversão de etanol a ácido acético após 212 horas de fermentação em frasco, a 180 rpm e 30°C, por células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 imobilizadas em géis de carragena e pectina, contendo 4,25 % de polímero. Concentração do inóculo celular : $1,8 \times 10^6$ ufc/ml.

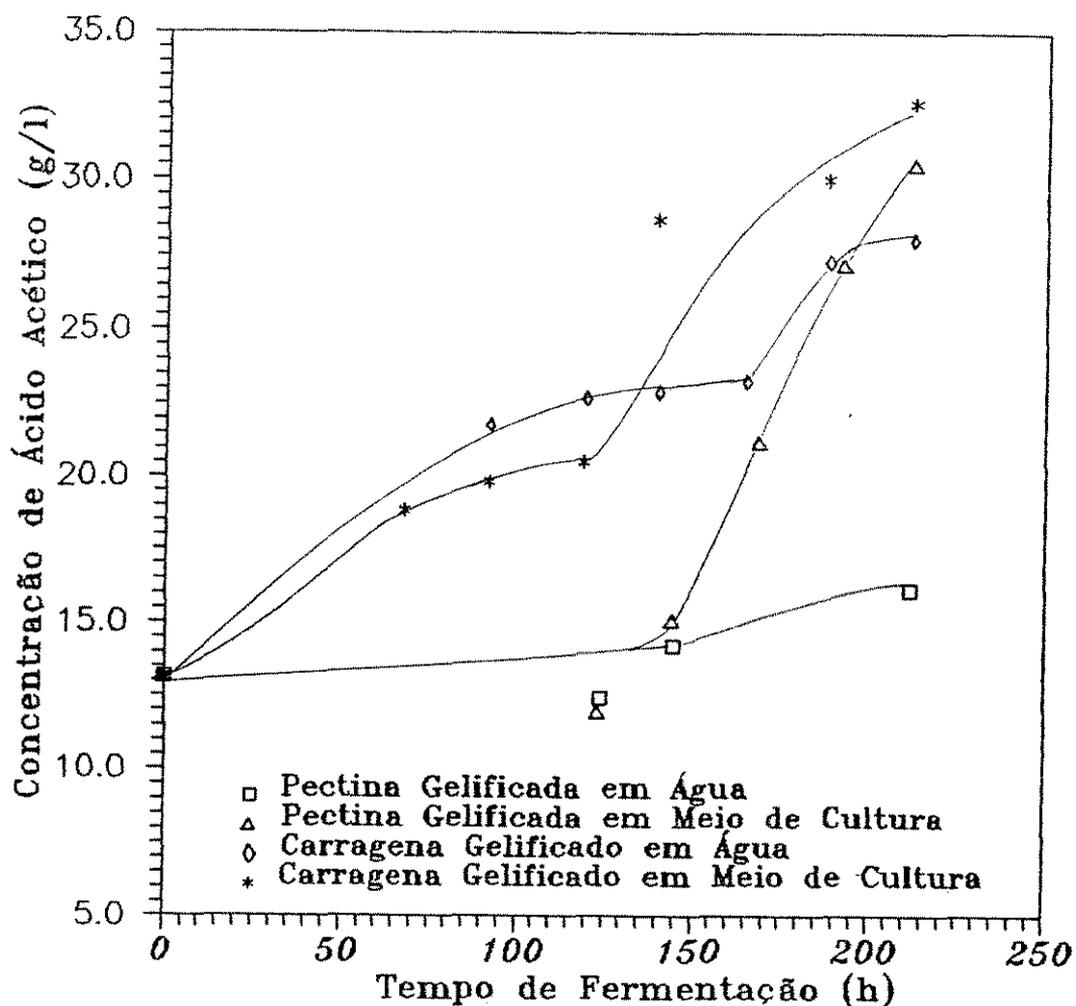


Figura 30 - Influência do tipo de diluente do agente gelificante no perfil de conversão de etanol a ácido acético, após 212 horas de fermentação em frasco, a 180 rpm e 30°C, por células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 imobilizadas em géis de carragena e pectina, contendo 4,25 % de polímero. Concentração do inóculo celular : $1,8 \times 10^6$ ufc/ml.

conduzidos posteriormente, optou-se pela diluição do agente gelificante em água destilada.

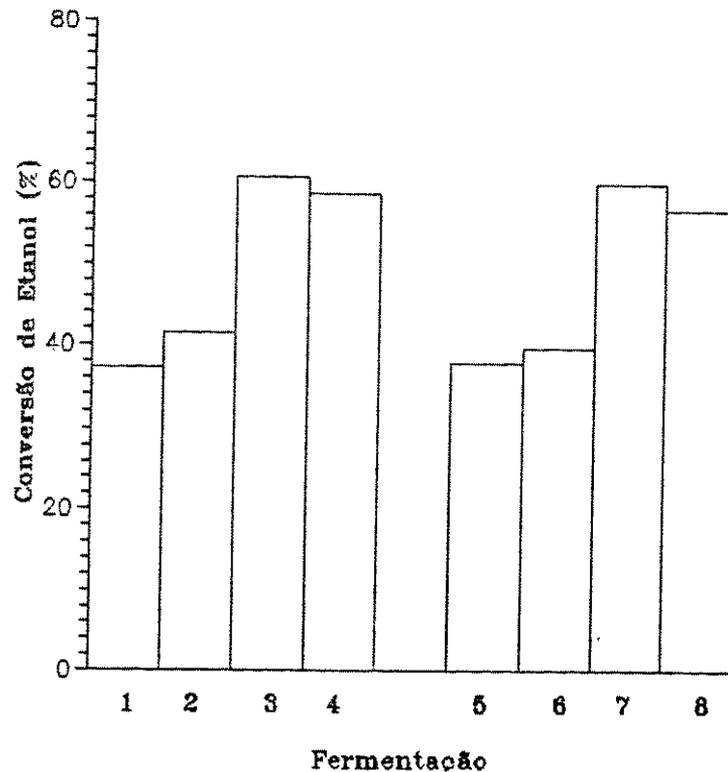
4.3.1.4. Influência do tempo de gelificação, da concentração de polissacarídeo e da concentração do agente gelificante

Cheetham e colaboradores [29], imobilizando células de *Saccharomyces uvarum* em géis de alginato de cálcio, observaram a influência da concentração de polissacarídeo e a existência de uma relação tempo de gelificação-concentração de gelificante no processo de formação da matriz polimérica. Com géis de carragena, pode-se observar o mesmo fenômeno. Processos rápidos de gelificação, da ordem de minutos, envolvem elevadas concentrações de KCl, enquanto que, para soluções de gelificante mais diluídas, é necessário um maior tempo para que a reação se complete. Quando a gelificação ocorre apenas parcialmente, a região central da partícula tende a permanecer mais fluida que a sua superfície.

Desta forma, com o intuito de se avaliar os efeitos destas variáveis na atividade dos biocatalisadores formados, testou-se diferentes condições de gelificação, obtendo-se as curvas de variação de conversão de etanol com o tempo expressas pelas Figuras A5 a A12, no Anexo C. As condições de realização dos experimentos são citadas nos itens 3.8.3 e 3.8.8, utilizando-se concentrações de 3,63 e 4,71 % de carragena na matriz, uma vez que, nesta faixa, existe uma diferença significativa nas viscosidades das suspensões poliméricas obtidas.

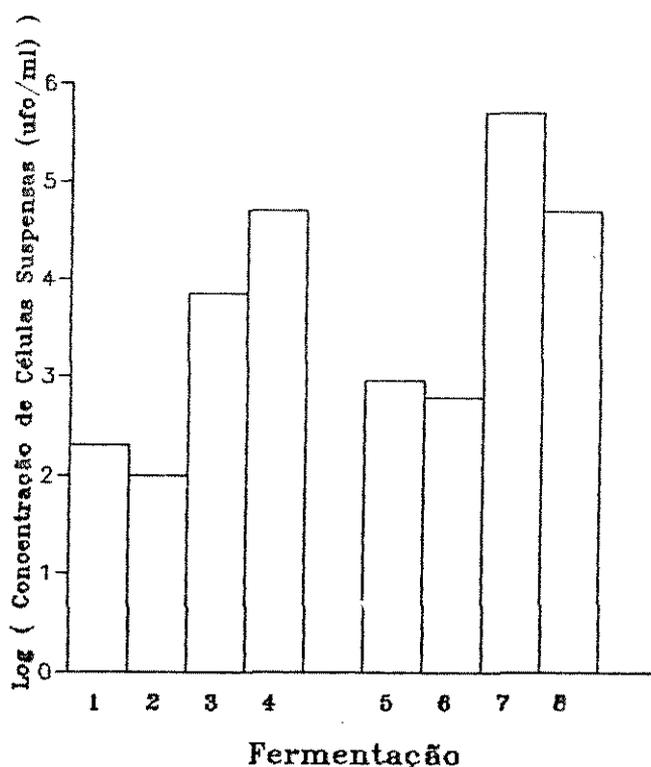
A análise dos resultados, os quais podem ser observados nas Figuras 31 e 32, foi feita em relação à conversão de etanol e à concentração de células livres, que se desprenderam do gel, ao final do ensaio.

Para uma mesma concentração de gelificante e um mesmo tempo de gelificação, variando-se a concentração de polímero, observa-se que os perfis de produção de ácido acético são pouco diferenciados, quase sempre havendo um retardo nas primeiras horas para os géis contendo maior massa de polissacarídeo. Assim, ao



Fermentação	Concentração de Carragena (%)	Concentração de KCl (M)	Tempo de Gelificação
1	3,63	1,00	10 minutos
2	3,63	1,00	60 minutos
3	3,63	0,10	14 horas
4	3,63	0,10	20 horas
5	4,71	1,00	10 minutos
6	4,71	1,00	60 minutos
7	4,71	0,10	14 horas
8	4,71	0,10	20 horas

Figura 31 - Influência da concentração de carragena, do tempo de gelificação e da concentração da solução de KCl na conversão de etanol por células de *A. aceti* CCT 1724 imobilizadas, após 119 horas de fermentação conduzida em frasco, a 200 rpm e 30°C.



Fermentação	Concentração de Carragena (%)	Concentração de KCl (M)	Tempo de Gelificação
1	3,63	1,00	10 minutos
2	3,63	1,00	60 minutos
3	3,63	0,10	14 horas
4	3,63	0,10	20 horas
5	4,71	1,00	10 minutos
6	4,71	1,00	60 minutos
7	4,71	0,10	14 horas
8	4,71	0,10	20 horas

Figura 32 - Influência da concentração de carragena, do tempo de gelificação e da concentração da solução de KCl na liberação de células de *A. aceti* CCT 1724 de matrizes gelificadas em distintas condições, após 119 horas de fermentação conduzida em frasco, a 200 rpm e 30°C.

final de 119 horas de fermentação, praticamente não se observa variação na conversão de etanol com a concentração de polímero. A liberação de células no meio fermentativo, no entanto, foi um pouco mais acentuada para géis contendo maiores concentrações de polímero, devido ao fato de que maiores quantidades de polímero originam géis com diferentes características estruturais.

Avaliando-se o efeito dos diferentes tipos de gelificação na conversão de etanol obtida ao final de 119 horas de fermentação, as matrizes gelificadas de maneira rápida apresentam valores menores, possivelmente devido à diferença estrutural existente entre estas e as gelificadas lentamente, com diferentes distribuições de tamanhos e quantidades de poros.

Embora haja uma sensível diferença entre os valores de conversão de etanol para as gelificações rápidas e lentas, mantendo-se fixa a concentração do polímero, não se observa variações apreciáveis da conversão com o tempo de gelificação, para a mesma concentração de KCl, apesar dos perfis das curvas serem um pouco distintos.

Para os biocatalisadores gelificados lentamente (em soluções contendo KCl na concentração de 0,1 MD, ao final do período de fermentação, observou-se um maior nível de liberação de células, se comparado ao obtido com matrizes gelificadas de maneira rápida. Experimentalmente, observou-se também uma maior fragmentação destas matrizes, o que conduz à diminuição nos efeitos de transferência de massa.

A variação do tempo de gelificação para o processo rápido, envolvendo concentrações de KCl de 1,0 M, praticamente não influencia a liberação de células e a conversão final de etanol. A liberação celular, para matrizes gelificadas lentamente, é, no entanto, afetada por esta variável.

Assim, pode-se estabelecer que as variáveis que mais afetam o sistema são a concentração do agente gelificante e a concentração de polímero. A variação da concentração de polímero influi diretamente na estrutura final da matriz, pouco afetando a viabilidade celular. A concentração de gelificante, no entanto, afeta estes dois parâmetros de maneira bastante marcada.

Para se avaliar apenas o efeito da concentração de polímero na estrutura da matriz, realizou-se um experimento onde o percentual de carragena variou em uma faixa mais ampla, entre 1,5 e 4,5 %, mantendo-se a concentração do gelificante e o tempo de gelificação em 0,5 M e 2 horas, respectivamente, de maneira a submeter as células a efeitos deletérios equivalentes durante o processo de gelificação.

A confecção de matrizes de carragena contendo 1,5 % de polímero resultou em partículas sem formato definido, similares a pequenas placas pouco espessas que, quando lavadas com água estéril para a retirada do excesso de gelificante, eram rompidas, dando origem a uma suspensão bastante viscosa e homogênea. Assim, a imobilização utilizando géis com esta composição e nestas condições não é adequada a processos que envolvam células retidas em matrizes rígidas, por resultar em um suporte pouco estável.

Para as matrizes restantes, obteve-se os resultados, em termos de concentração final de células livres e imobilizadas, que podem ser avaliados na Tabela 12.

Embora alguns autores não recomendem a enumeração de células viáveis contidas em partículas de gel [47], devido à dificuldade de se separar as mesmas da matriz, a técnica desenvolvida no decorrer deste trabalho mostrou-se adequada aos propósitos de se obter contagens comparativas entre biocatalisadores contendo células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 imobilizadas em *k*-carragena. Em testes preliminares, observou-se que, submetendo-se uma suspensão de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724, de concentração conhecida, às mesmas condições utilizadas durante a técnica de enumeração microbiana no gel, obtinha-se uma diferença de cerca de 10 % entre as duas determinações, indicando que, ao processo de dissolução das partículas, associa-se uma parcela do efeito deletério observado, embora este valor seja pouco significativo.

A conversão de etanol em ácido acético diminuiu com o aumento do percentual de polímero, provavelmente devido aos efeitos de transferência de massa das substâncias dissolvidas no meio de cultura para o interior da partícula e da difusão dos produtos

formados na matriz para o meio fermentativo.

Como pode ser observado na Figura 33, construída a partir dos dados da Tabela 12, a capacidade de retenção de células no interior do gel é mais elevada para matrizes que contenham maior percentual de polímero. A liberação de células no meio de cultura, por outro lado, é bastante acentuada para o gel contendo 2,25 % de carragena em sua composição, permanecendo praticamente constante para as matrizes restantes. Este fato pode ser explicado pela baixa estabilidade desta matriz durante o processo fermentativo, onde se observou excessiva fragmentação das partículas, ocasionando o aumento de sua área superficial e, conseqüentemente, uma maior remoção das células crescidas na superfície do gel.

Embora a conversão de etanol tenha diminuído com o aumento do percentual de polímero, o rendimento global específico, $Y_{p/x}$, foi mais elevado para a matriz contendo 3,75 % em carragena, indicando que as células estariam metabolicamente mais ativas nesta matriz.

Assim, concentrações de polímero na faixa de 3 a 4 % originam matrizes com as estruturas mais adequadas, onde se alcança razoável retenção celular, alto rendimento global e baixo desprendimento microbiano.

4.3.2. Caracterização de leitos constituídos por partículas de géis hidrofílicos

No sentido de se verificar a influência da estrutura das matrizes testadas na estabilidade do biocatalisador, foi feita a caracterização de leitos constituídos por partículas de géis, uma vez que os métodos convencionais utilizados na catálise química não são aplicáveis a estes suportes. Desta forma, com a metodologia aplicada, é possível se caracterizar global e indiretamente a estrutura porosa destas matrizes. Devido a sua própria natureza, os géis possuem baixa resistência mecânica, e o acesso de determinadas substâncias, como a sacarose, ao seu interior, fragiliza algumas de suas estruturas, tornando-os mais susceptíveis à deformação e, conseqüentemente, alterando a permeabilidade do meio poroso.

Tabela 12 - Resultados dos testes de fermentação em frascos, a 200 rpm e 30°C por 87 horas com células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 imobilizadas em géis de carragena, onde se variou a concentração de polímero na matriz, mantendo-se a concentração de KCl em 0,5 M e o tempo de gelificação em 2 horas. Concentração do inóculo celular : 1×10^7 ufc/ml.

Conc. de carragena (% m/v)	Concentração final de células		Células Totais (ufc)	Conversão de Etanol (%)
	Gel (ufg/g gel)	Suspensas (ufc/ml)		
0,00	—	$1,3 \times 10^7$	$6,5 \times 10^8$	41,33
2,25	$1,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$	44,25
3,00	$2,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	40,61
3,75	$2,1 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$	39,86
4,50	$4,7 \times 10^5$	$7,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^8$	38,78

Total de células = Concentração de células imobilizadas * 10 g +
Concentração de células suspensas * 40 ml.

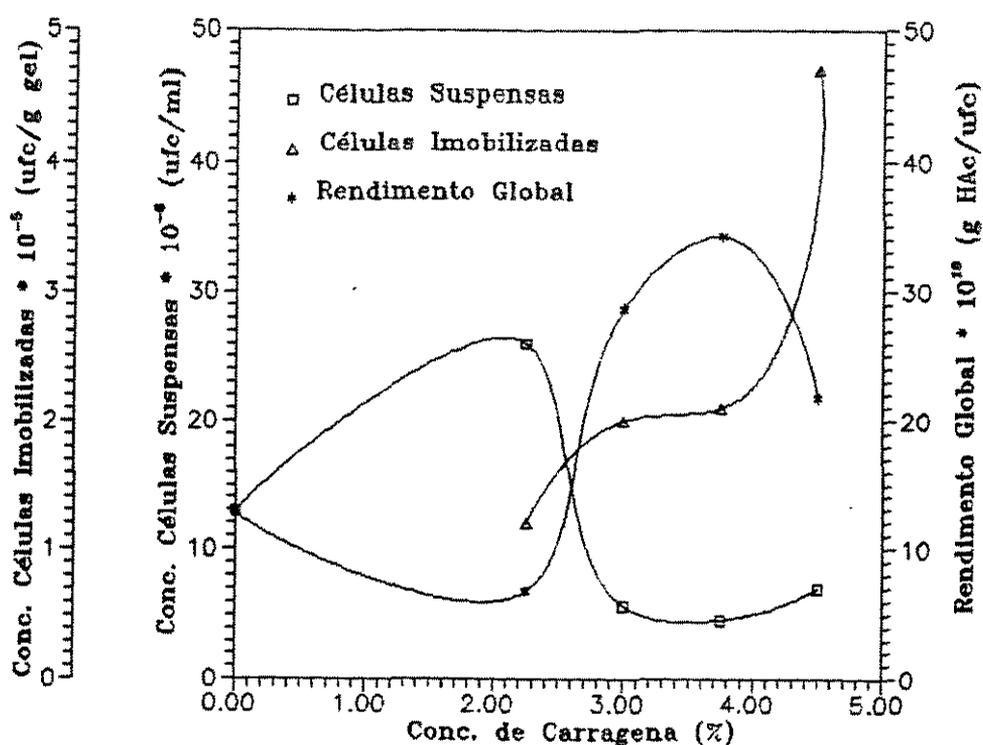


Figura 33 - Influência da concentração de polímero no rendimento global específico (Y_p/x), na retenção de células nas partículas de gel de carragena e no desprendimento de células das matrizes gelificadas por 2 horas em solução de KCl a 0,5 M, ao final de 87 h de fermentação em frascos agitados a 200 rpm e 30°C. Concentração do inóculo celular : 1×10^7 ufc/ml.

A permeabilidade final do leito de partículas pode ser obtida através da aplicação da lei de Darcy ao sistema, depois que se tiver alcançado o estado estacionário, descontando-se a perda de carga relativa à coluna sem partículas, a qual foi de 400 N/m^2 para o escoamento da solução de sacarose a 1,5 %, a uma vazão de 16,13 ml/s. Assim, quanto menor a permeabilidade do leito, maior a resistência ao escoamento da solução.

Inicialmente, realizou-se alguns experimentos visando-se o desenvolvimento de uma metodologia experimental adequada, onde as partículas submetidas à caracterização eram dispostas em uma coluna de vidro, de maneira a formar um leito fixo, através do qual se escoava uma solução de sacarose. A escolha da sacarose teve por base o fato de que o sistema em questão apresentou-se mais sensível a este composto que à glicose ou ao etanol, apresentando variações mais significativas da queda de pressão desenvolvida e em menores tempos de teste. Variáveis como volume de gel, tempo de ensaio, vazão e concentração da solução de sacarose tiveram seus níveis de teste padronizados em uma etapa preliminar de calibração, tendo como critérios a preservação da estabilidade do leito e a sensibilidade nas medidas de queda de pressão.

Para leitos de mesma porosidade e trabalhando-se a uma mesma vazão de solução de sacarose, observou-se que o volume de partículas de gel não influencia substancialmente o perfil de variação da queda de pressão, como ilustra a Figura A13, que pode ser observada no Anexo C. Desta forma, optou-se pelo emprego de um volume de partículas de 50 ml, resultando em um leito de 1,7 cm de altura.

Os resultados obtidos indicaram que a sensibilidade do leito à deformação depende principalmente da concentração da solução de sacarose, como indica a Figura A14, no Anexo C. Assim, a concentração da solução deve ser inferior a 2 % (m/v), para evitar o colapso do leito. A vazão da solução de sacarose, dentro da faixa testada, por outro lado, pouco influenciou nos perfis de deformação do leito, como mostra a Figura A15, no Anexo C.

O tempo de teste, considerado como o período no qual as

variações nos valores de queda de pressão tornaram-se aproximadamente constantes, foi limitado em 150 minutos, uma vez que se verificou experimentalmente que este intervalo era suficiente para que as condições previamente estabelecidas fossem satisfatoriamente atingidas.

A presença do leito fixo de partículas de gel resultou nos comportamentos típicos apresentados na Figura 34. Para um mesmo gel, de acordo com a vazão e a concentração da solução de sacarose, a queda de pressão no leito aumentava gradativamente, até atingir um valor aproximadamente constante (curva a) ou alcançar um máximo absoluto (curva b), onde se observava a rompimento das partículas e o colapso do leito, caracterizado pela diminuição abrupta da queda de pressão. Estas observações evidenciam a distribuição da sacarose entre a solução e o gel, e o seu efeito na fragilização das partículas, como sugerido por Cheetham e colaboradores [29].

Com os dados obtidos, pode-se sugerir a ocorrência de dois tipos distintos de escoamento : um, externo às partículas que compõem o meio poroso, e outro, intrapartícula. No início do experimento, pequenas quedas de pressão estão envolvidas e o escoamento é, preferencialmente, externo às partículas. Com o aumento da queda de pressão, a parcela relativa ao escoamento intrapartícula também aumenta, devido ao desenvolvimento de caminhos preferenciais ocasionados por modificações na estrutura porosa dos géis. Assim, matrizes com poros maiores tendem a originar leitos mais permeáveis, por serem mais facilmente deformáveis, desde que a análise seja feita para leitos estáveis, sem que ocorra o seu colapso.

Quando ocorre a estabilização da queda de pressão, as contribuições para o escoamento total do fluxo interno e externo à partícula permanecem inalteradas, indicando uma conseqüente estabilização das macro e micro estruturas que compõem o meio poroso.

O sistema foi testado em ensaios com partículas de gel preparadas em diversas condições, obtendo-se perfis distintos de queda de pressão em função do tempo, indicando que a concentração

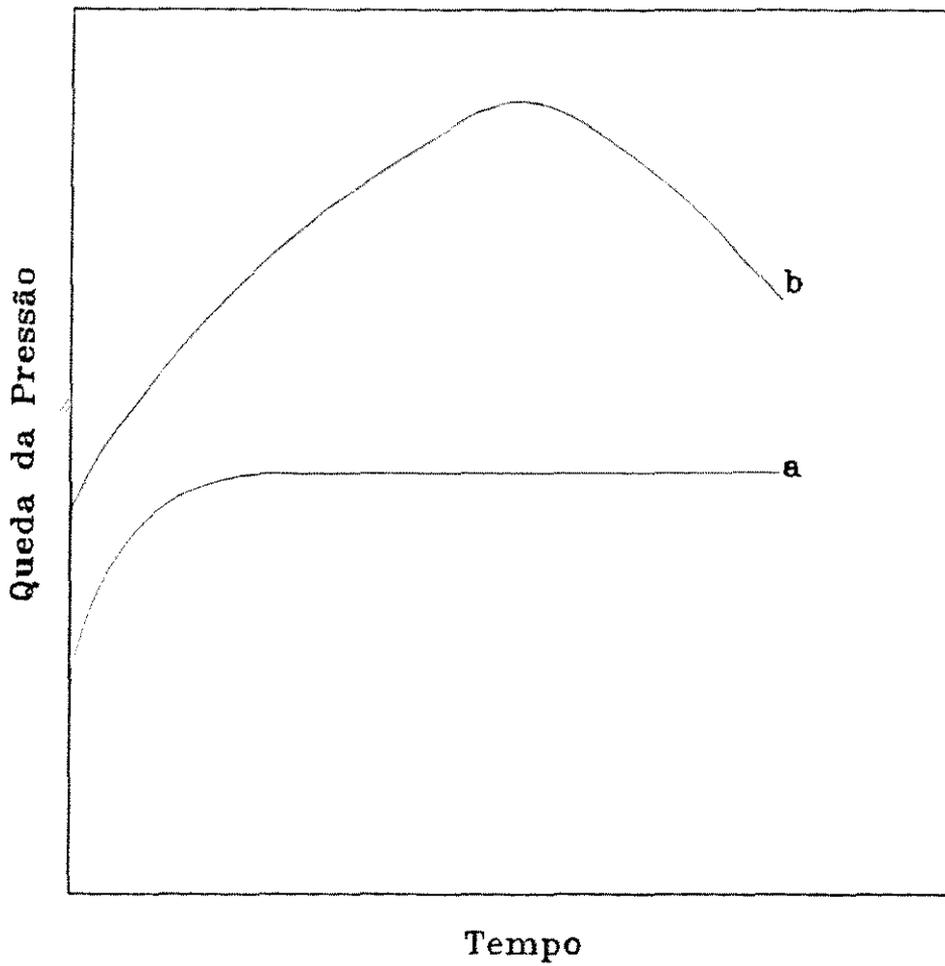


Figura 34 - Comportamento típico dos perfis de queda de pressão obtidos em função do tempo.

de polímero, o tempo de gelificação e a concentração de gelificante são variáveis importantes na formação da estrutura porosa dos géis, como se pode observar na Tabela 13 e nas Figuras A16 a A21, no Anexo C.

4.3.2.1. Efeito do tipo de polissacarídeo nos perfis de queda de pressão

Na Figura A16, no Anexo C, pode-se avaliar a influência do tipo de polímero empregado na confecção de partículas de géis, do ponto de vista da resistência oferecida ao escoamento da solução de sacarose. Pode-se notar que os géis de alginato e de pectina, nas condições testadas, apresentam características bastante semelhantes, o que indica que suas estruturas internas são equivalentes. O mesmo não se observa para o gel de carragena, que apresenta, ao longo de toda a curva, valores mais elevados de queda de pressão, caracterizando maior resistência ao escoamento e, conseqüentemente, maior deformação das partículas.

4.3.2.2. Efeito da presença de células nos perfis de queda de pressão

Testes utilizando-se géis de carragena contendo ou não células de *Acetobacter* immobilizadas em seu interior foram conduzidos e seus resultados podem ser observados na Figura A17, no Anexo C.

Embora os microrganismos não estivessem viáveis, houve, uma estabilização mais rápida dos processos deformativos no caso de géis contendo células em seu interior, além do fato de se constatar maiores valores de permeabilidades para estes leitos.

4.3.2.3. Influência do meio de gelificação nos perfis de queda de pressão

A presença de meio de incubação juntamente com o agente gelificante na etapa de gelificação da matriz de carragena tem um

Tabela 13 - Permeabilidades dos leitos obtidos com partículas de gel de carragena, pectina e alginato de cálcio, depois de estabilizado o processo de deformação.

Polímero	Concentração de polímero (% m/v)	Concentração de gelificante (CM)	Tempo de gelificação (min)	Permeabilidade $\times 10^{11}$ (m ²)
carragena	4,25	1,0	10	2,299
carragena	4,25	1,0	60	1,370
carragena	4,25	0,5	120	2,588
carragena	4,25	0,1	840	2,908
carragena	4,25	0,1	1200	3,314
carragena	2,63	1,0	10	4,191
carragena	2,13	1,0	10	6,785
carragena	4,25	1,0**	10	1,926
carragena	4,25*	1,0	10	1,296
pectina	4,25	1,0	10	2,767
alginato	2,13	1,0	10	2,688

* ausência de células

** KCl diluído em meio de cultura

efeito marcante nas características finais do suporte, como já foi comprovado anteriormente ao se testar a atividade do biocatalisador.

Na Figura A18, no Anexo C, estão representadas as curvas de queda de pressão obtidas para partículas gelificadas em presença ou não de meio de cultura. Pode-se observar que as perdas de carga desenvolvidas ao longo do tempo foram bem maiores quando da gelificação em presença de meio de cultura, o que vem a confirmar a menor resistência mecânica destes géis. Tal fato pode ser explicado pela provável formação de estruturas mais frágeis, devido à complexa interação química envolvendo o polímero e os componentes do meio fermentativo.

4.3.2.4. Efeito da concentração do agente gelificante e do tempo de gelificação nos perfis de queda de pressão

Para os géis caracterizados, a resistência das partículas ao escoamento aumenta com a elevação do tempo de gelificação em solução a 1,0 M, como se observa na Figura A19, no Anexo C. Desta forma, matrizes mais extensivamente polimerizadas apresentam uma tendência crescente à deformação, o que é ilustrado, na mesma figura, pela acentuada elevação dos valores de queda de pressão ao longo do tempo. Assim, o escoamento intrapartícula da solução de sacarose representa uma parcela significativa do escoamento global para os géis mais rígidos, aumentando os valores de queda de pressão no sistema.

Para gelificações em solução de KCl a 0,1 M, observa-se que, para o tempo de 14 horas, há uma tendência ao colapso do leito, causado pela perda acentuada da forma inicial das partículas. Este comportamento é ilustrado pela intersecção das curvas da Figura A20 do Anexo C e pelo aumento crescente da perda de carga com o tempo, para a matriz gelificada por 14 horas.

4.3.2.5. Efeito da concentração de polímero nos perfis de queda de pressão

Na Figura A21, no Anexo C, pode-se observar a influência da concentração de polímero em géis de carragena gelificados por 10 minutos em solução de KCl a 1,0 M. Quanto maior a concentração de polímero, maior a perda de carga desenvolvida no leito de partículas. Tal resultado indica que, para partículas menos rígidas, ou seja, que contenham menor concentração de carragena, os valores finais de permeabilidades são maiores devido à maior contribuição do escoamento da solução de sacarose através do interior das partículas, e não somente ao redor das mesmas, o que evidencia diferentes distribuições e tamanhos de poros.

A permeabilidade é, então, um método adequado para se estudar a estrutura porosa de matrizes de gel, variando com as diferentes condições de preparação dos suportes.

4.3.3. Avaliação do processo de gelificação no desempenho global do biocatalisador

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, pode-se observar que, no processo de imobilização, o percentual de polímero na matriz afeta apenas a estrutura do suporte, não influenciando substancialmente na viabilidade celular. O tipo de gelificação, rápido ou lento, no entanto, pode afetar a ambas.

Assim, a avaliação conjunta do efeito da estrutura da matriz e da viabilidade celular, medida logo após o término do processo de imobilização, no desempenho do biocatalisador pode ser feita variando-se o tipo de gelificação a que é submetido o suporte, mantendo-se a concentração de polímero constante.

Desta forma, realizou-se um conjunto de experimentos onde se utilizou 4,25 % de carragena para a confecção de cada gel, nas mesmas condições descritas nos itens 3.8.3 e 3.8.8, e testou-se gelificações em soluções de KCl 1,0 M, 0,5 M e 0,1 M, com tempos de exposição de 10 minutos, 2 horas e 14 horas, respectivamente. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 14 e 15, para um inóculo de concentração igual a $1,0 \times 10^8$ ufc/ml e tempo de fermentação igual a 72 horas. Concomitantemente a estes ensaios,

realizou-se uma fermentação com células livres, com a mesma concentração inicial de microrganismos daquelas envolvendo bactérias imobilizadas.

A avaliação do desempenho dos biocatalisadores, em termos da permeabilidade dos leitos dos géis utilizados nestes ensaios, pode ser feita na Figura 35.

Dos resultados apresentados na Tabela 14, pode-se observar que a viabilidade celular diminui imediatamente após o processo de imobilização. Se não houvesse efeito deletério sobre os microrganismos, a concentração celular permaneceria em torno de $2,4 \times 10^7$ ufc/g de gel. Desta forma, o dano causado às células pelo processo de gelificação, embora existente, é aproximadamente igual para todos os géis, sendo um pouco mais acentuado para concentrações de KCl de 0,5 M e 2 horas de tempo de gelificação.

Após a fermentação, como se pode observar na Tabela 15, as bactérias apresentaram um desenvolvimento significativamente melhor nas matrizes gelificadas de maneira mais rápida. A liberação de células, no entanto, foi mais acentuada na matriz gelificada lentamente, o que evidencia diferenças estruturais entre as matrizes.

A fermentação com células livres em solução conduziu a conversões de etanol em ácido acético um pouco mais elevadas, embora tenha sido muito próxima da obtida por células imobilizadas de maneira lenta. As células imobilizadas em KCl 0,5 M, por 2 horas, por sua vez, apresentaram a conversão mais baixa, devido aos efeitos de transferência de massa.

A Figura 35 indica que há uma faixa intermediária ótima de condições de gelificação, onde pode-se obter um biocatalisador com elevado desempenho, representado pelo rendimento global alcançado por células livres e imobilizadas, com elevada retenção celular na matriz e estrutura porosa adequada, expressa pelos valores de permeabilidade obtidos nestas condições. Não se pode, no entanto, garantir que para uma mesma permeabilidade, obtida em condições de preparação diferentes das utilizadas, se obtenha o mesmo desempenho do biocatalisador.

Tabela 14 - Dados de concentrações iniciais de células imobilizadas em géis de carragena, contendo 4,25 % em polímero, imediatamente após a gelificação em diferentes condições, para um inóculo de concentração igual a 1×10^8 ufc/ml.

Conc. KCl (M)	Conc. Celular (ufc/g gel)
1,0	$5,3 \times 10^6$
0,5	$2,9 \times 10^6$
0,1	$4,8 \times 10^6$

Tabela 15 - Resultados obtidos, em termos de concentração celular e de conversão total de etanol, para células imobilizadas em diferentes concentrações de KCl, em distintos tempos de gelificação, em matrizes contendo 4,25 % de carragena, após 72 horas de fermentação.

Ensaio	Fração de Células Retidas na Matriz (%)	Total de Células (ufc)	Conversão de Etanol (%)
Gel/KCl 1,0M	8	$2,0 \times 10^9$	38,81
Gel/KCl 0,5M	24	$6,9 \times 10^8$	31,54
Gel/KCl 0,1M	1	$2,3 \times 10^9$	52,79
Cél. Livres	—	$2,0 \times 10^9$	54,93

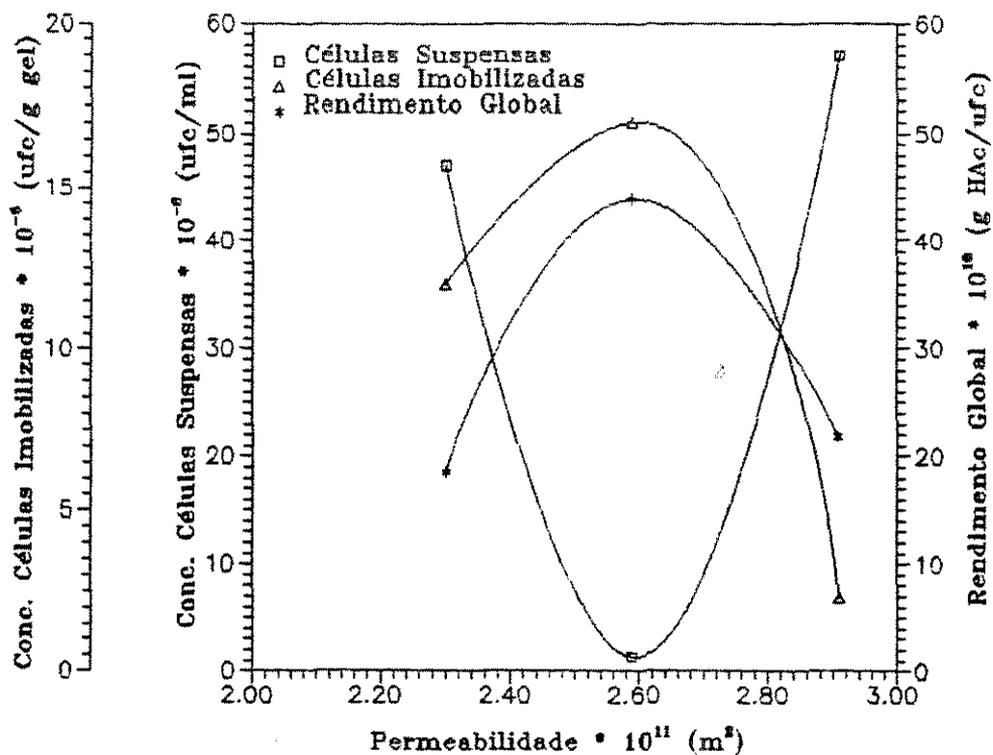


Figura 35 - Influência do tipo de gelificação, expresso pelos valores de permeabilidade de leitos constituídos por partículas de gel de carragena, no rendimento global, na retenção e no desprendimento de células das matrizes, ao final de 72 horas de fermentação em frascos agitados, a 200 rpm e 30°C. Concentração do inóculo : $1 \cdot 10^8$ ufc/ml.

4.3.4. Efeito da imobilização na respiração celular

A verificação desta influência foi feita em relação às duas variáveis mais relevantes no processo de imobilização de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 em géis de carragena : concentração de gelificante e concentração de polímero.

Suspensões de células livres foram caracterizadas, apresentando taxas lineares de consumo de oxigênio através de extensas faixas de concentrações de oxigênio dissolvido no meio. Apenas a baixos percentuais de saturação é que as taxas de consumo de oxigênio foram reduzidas. Ensaio conduzidos com células imobilizadas, contendo a mesma quantidade de biomassa que um experimento onde foram utilizadas células livres, apresentaram faixas um pouco menores onde as taxas de consumo de oxigênio foram lineares, indicando uma limitação no suprimento de oxigênio, além de menores valores das taxas iniciais de respiração microbiana.

Comportamentos similares foram observados por Scott e colaboradores [28], para células de *Streptomyces clavuligerus* imobilizadas em géis de *k*-carragena. Os autores sugerem que a taxa de difusão externa de oxigênio do meio para a partícula, juntamente com a taxa de difusão intrapartícula, possa não ser tão elevada de maneira a suprir as células com uma concentração de oxigênio suficiente para permitir que a respiração celular ocorra em sua taxa máxima.

De maneira a reduzir os efeitos de transferência de oxigênio no interior das partículas, utilizou-se concentrações de *k*-carragena nas matrizes razoavelmente baixas, de 3,0 %, para que se pudesse avaliar o efeito líquido dos diferentes processos de gelificação na respiração celular. Géis contendo 4,5 % em carragena foram também utilizados, para se avaliar o efeito do percentual de polissacarídeo na transferência de oxigênio.

Na Tabela 16, estão representados os resultados obtidos para os processos de gelificação rápida e lenta, bem como o efeito da concentração de polímero na taxa de respiração celular.

Apesar do número restrito de pontos, observou-se que, para todos os géis testados, a redução na taxa máxima de respiração

Tabela 16 - Taxas de respiração específica de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724, em meio de incubação a 30°C, livres e imobilizadas em diferentes géis de *k*-carragena.

Ensaio	Concentração de <i>k</i> -Carragena (%)	Condições de Gelificação	R_{O_2} (Redução no percentual de saturação $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de células secas)
1	3	$C_{\text{kcl}} = 1,0 \text{ M}$ $tg = 10 \text{ min}$	$10,15 \times 10^{-2}$
2	3	$C_{\text{kcl}} = 0,1 \text{ M}$ $tg = 20 \text{ h}$	$9,99 \times 10^{-2}$
3	4,5	$C_{\text{kcl}} = 1,0 \text{ M}$ $tg = 10 \text{ min}$	$9,25 \times 10^{-2}$
4	Células Livres	—	$11,10 \times 10^{-2}$

onde :

C_{kcl} - Concentração de KCl na solução gelificante.

R_{O_2} - Taxa de respiração específica em meio de incubação, a 30°C.

microbiana foi muito baixa se comparada à de células livres nas mesmas condições. A máxima diferença obtida foi de 17 % para o gel contendo 4,5 % de polímero.

Estas reduções, no entanto, podem ser devidas tanto aos problemas de difusão do oxigênio discutidos anteriormente, como ao efeito deletérico do processo de imobilização sobre os microrganismos, pois a exposição das células a soluções aquosas contendo elevadas concentrações de cloreto de potássio, mesmo que por períodos curtos, afeta significativamente a taxa de respiração microbiana. Experimentalmente, observou-se uma redução de 42 % na taxa de consumo de oxigênio por células livres em solução aquosa de KCl a 1,0 M, quando comparada à respiração de células suspensas em água destilada, nas mesmas condições. Esta redução, no entanto, pode ser também devida ao decréscimo no nível de oxigênio disponível para as células na solução contendo cloreto de potássio, pois a solubilidade do oxigênio em soluções a 1,0 M em KCl é de apenas 74 % da obtida em água destilada [28].

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho discordam dos alcançados por Scott e colaboradores [28], que observaram decréscimos superiores a 60 % na taxa de consumo de oxigênio por células imobilizadas em relação a células livres de *Streptomyces clavuligerus*, sendo que esta redução era mais acentuada quanto maior a concentração de *k*-carragena utilizada.

4.4. Testes do Sistema de Fermentação em Biorreatores

Nestes ensaios, utilizou-se a instalação experimental e as condições descritas no capítulo de "Materiais e Métodos" deste trabalho.

4.4.1. Fermentações com células livres

Com a finalidade de se testar a influência da pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa no processo fermentativo, inoculou-se dois biorreatores de geometria cilíndrico-cônica e um frasco erlenmeyer com culturas crescidas de *Acetobacter aceti* CCT

1724.

Os resultados destas fermentações podem ser observados na Figura 36. Apesar do número restrito de pontos, as tendências de comportamento indicam que a aeração com ar atmosférico conduz a melhores resultados que a com oxigênio puro. Um dos possíveis motivos para as baixas conversões de etanol alcançadas no biorreator alimentado com oxigênio puro é a oxidação total do ácido acético produzido a gás carbônico e água, através do próprio metabolismo celular, uma vez que a taxa de evaporação do etanol é bastante elevada, fazendo com que sua concentração no meio de cultura seja reduzida. Nestas condições, o ácido acético provavelmente seria utilizado como fonte de carbono, substituindo o etanol.

4.4.2. Fermentações com células imobilizadas

Experimentos preliminares envolvendo células de *Acetobacter aceti* CCT 0190, *Acetobacter pasteurianus* CCT 1706 e *Acetobacter aceti* CCT 1724 imobilizadas em matrizes de *k*-carragena Sigma, e conduzidos segundo as condições propostas por Osuga e colaboradores [9], não conduziram a resultados satisfatórios, pois não se observou turvação alguma do meio de incubação durante os ensaios, caracterizando pouco crescimento celular, além do fato de se obter, no máximo, 5 % de conversão de etanol a ácido acético, mesmo após 15 dias de fermentação contínua. Desta maneira, concluiu-se que tanto a ordem de grandeza do inóculo (10^5 ufc/ml) como o próprio processo de imobilização celular contribuíram para estes resultados, fazendo-se mister estudá-los melhor.

A imobilização de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 em matrizes de *k*-carragena de marca Hércules do Brasil, para inóculos de ordem de grandeza superior a 10^6 ufc/ml, por outro lado, conduziu a resultados bastante razoáveis para fermentações em frascos agitados, como citado em outras partes deste trabalho. Com base nestas observações, conduziu-se uma fermentação descontínua em biorreator, nas condições descritas no item 3.8.13.2 do capítulo de "Materiais e Métodos", com células de *Acetobacter*

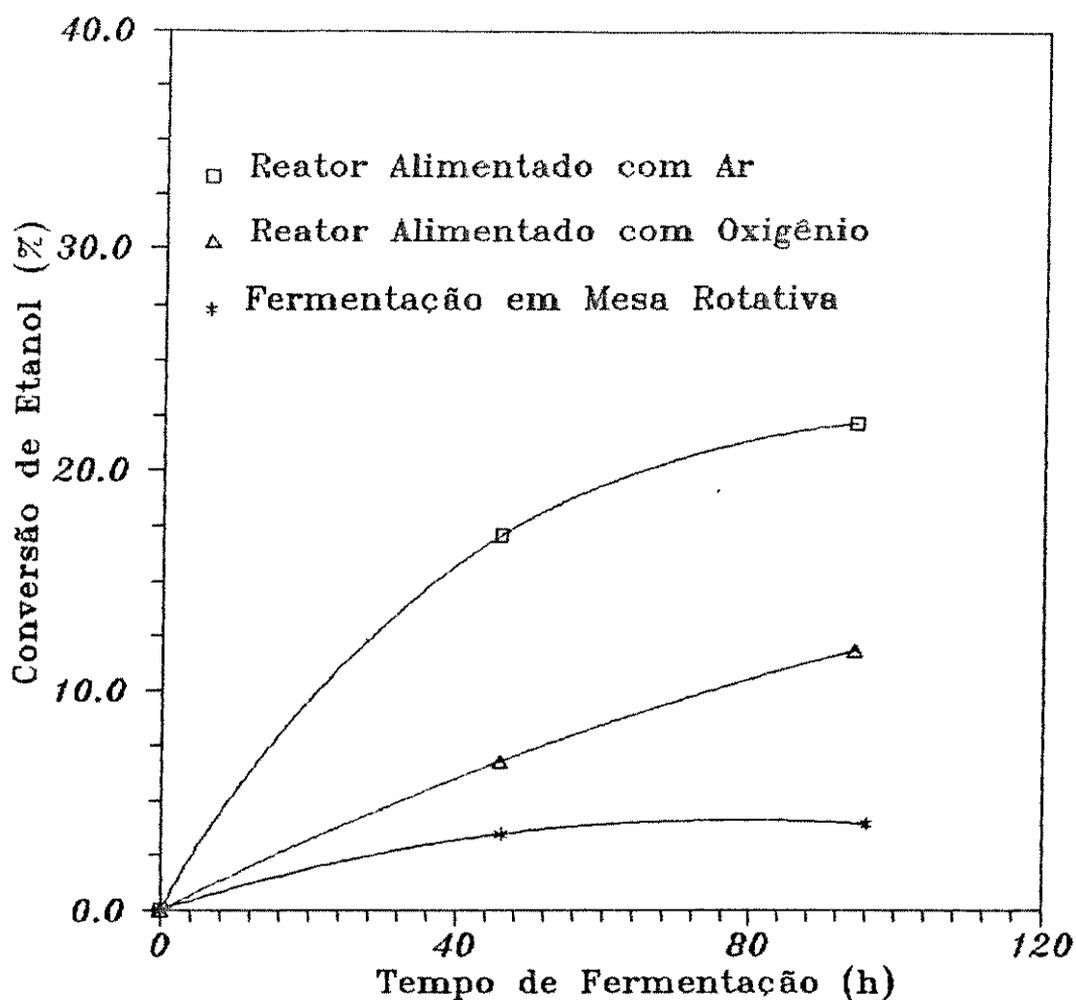


Figura 36 - Variação da conversão de etanol com o tempo para fermentações com células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 livres, em biorreatores nas seguintes condições : vazão de alimentação de oxigênio ou de ar atmosférico: igual a 230 ml/min e temperatura de 34°C, e em frascos agitados, a 180 rpm e 34°C. Concentração celular inicial : 3×10^7 ufc/ml.

aceti CCT 1724 imobilizadas em géis tendo *k*-carragena de marca Hércules do Brasil em sua composição, aguardando-se que o processo de desprendimento de células da matriz tivesse início, de acordo com o procedimento adotado por Sun e Furusaki [10]. Este período de incubação no gel durou 183 horas, sendo considerado muito longo. A partir deste momento, alimentou-se continuamente o sistema com o meio de produção, por 60 horas, não se observando, no entanto, conversão apreciável de etanol durante este período, como indica a Figura 37.

Durante o longo período de incubação, observou-se grande evaporação do meio de cultura, com conseqüente evaporação do etanol, e negligível turvação do meio, provavelmente pela escassez de água, componente essencial à reprodução e desenvolvimento das atividades celulares. Embora o meio de produção fosse suprido continuamente após este período, provavelmente as células estavam por demais esgotadas para retomar prontamente suas atividades.

Os últimos ensaios realizados em biorreatores, cujas condições experimentais são citadas no item 3.8.13.2 do capítulo de "Materiais e Métodos" deste trabalho, conduziram aos resultados expressos pelas Figuras 38 a 41.

A liberação de células do gel fez-se presente neste ensaio após cerca de 65 horas de incubação, como se pode observar na Figura 38. Este período está dentro da faixa sugerida por Sun e Furusaki [10], de aproximadamente 2 a 4 dias.

A análise da variação da concentração de glicose com o tempo para estas duas fermentações indica que a sua taxa de consumo é mais elevada para o sistema com microrganismos imobilizados, depois de verificada a liberação das partículas do gel, como indicado pela Figura 39.

Embora a evaporação dos componentes do meio de incubação tenha diminuído, a taxa de perda de etanol continuou bastante elevada, como sugerido pela Figura 40, apesar da presença do condensador. É indicada, então, a utilização de um umidificador, a fim de que os gases já entrem saturados no reator.

As conversões de etanol a ácido acético, nos períodos finais da fermentação, foram um pouco mais elevadas para as células

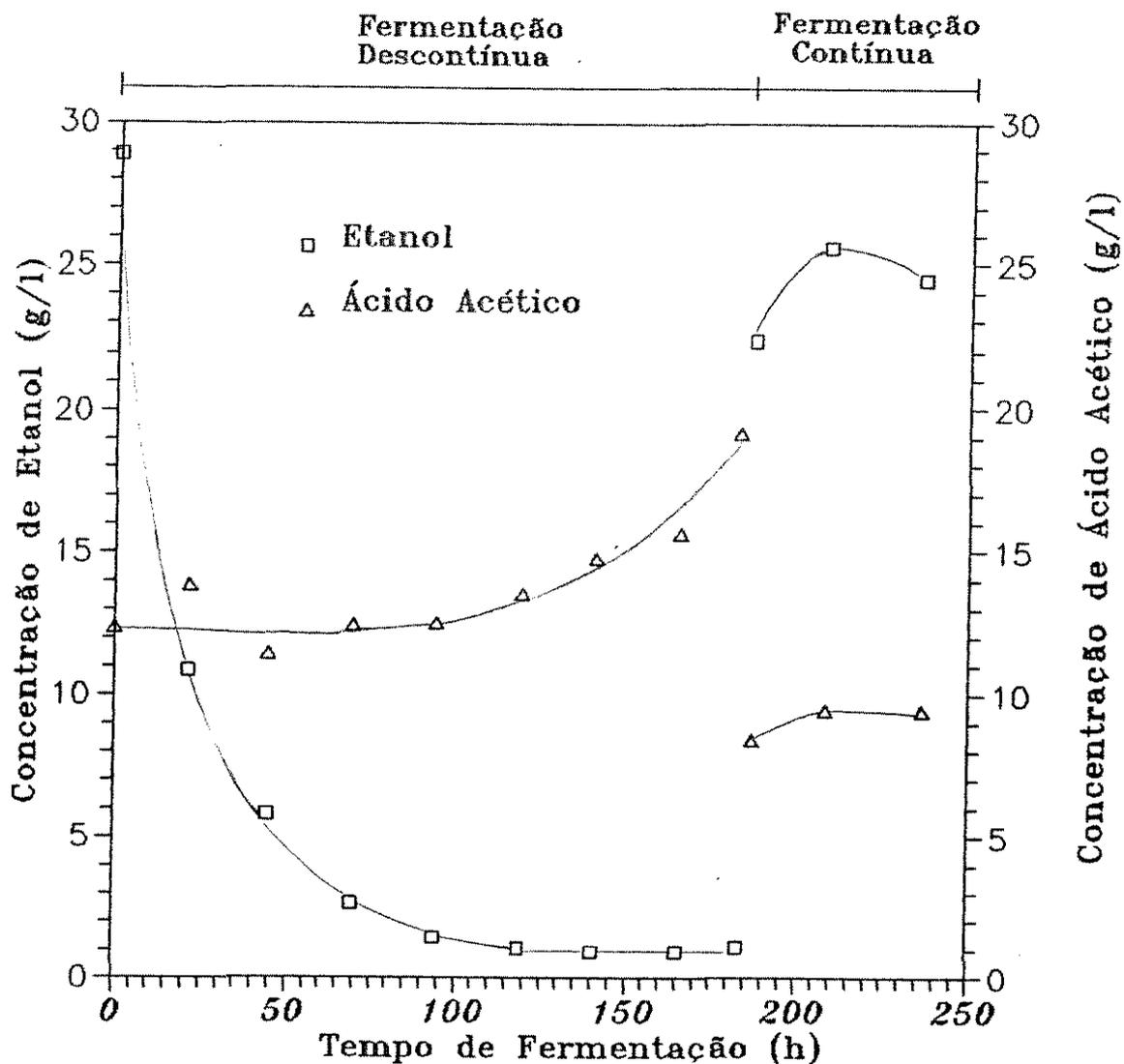


Figura 37 - Variação das concentrações de etanol e de ácido acético durante fermentações com células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 imobilizadas em matrizes de *k*-carragena a 4,3 %, em biorreator, nas seguintes condições : temperatura de 30°C, vazão de alimentação de oxigênio de 230 ml/min, volume de reação de 150 ml. Concentração do inóculo celular : $2,8 \times 10^7$ ufc/ml.

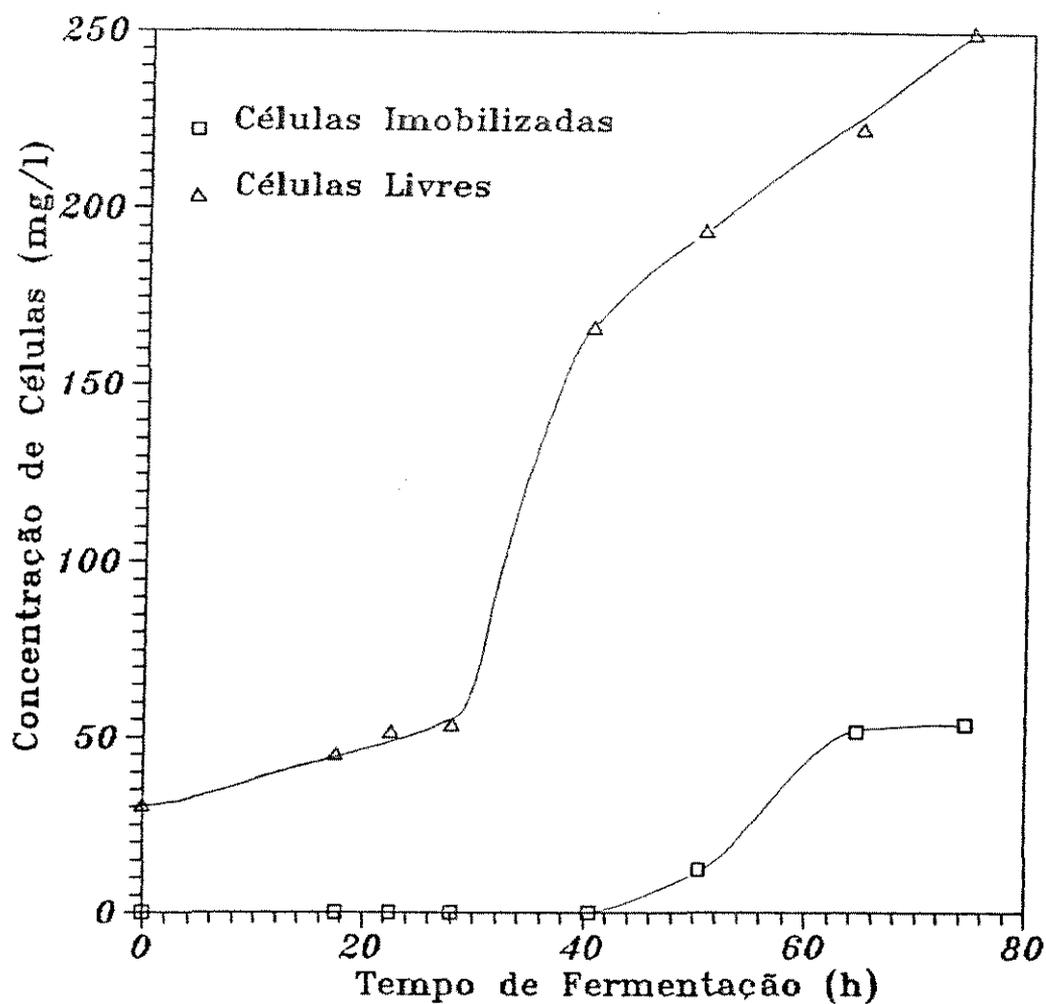


Figura 38 - Variação da concentração de células suspensas no meio de cultura com o tempo para fermentações em biorreatores com células livres e imobilizadas em matriz de *k*-carragena a 3,6 %. Condições dos ensaios: vazão de entrada de ar = 307 ml/min, temperatura de 30°C, volume de reação de 200 ml, concentração do inóculo celular : 3×10^7 ufc/ml.

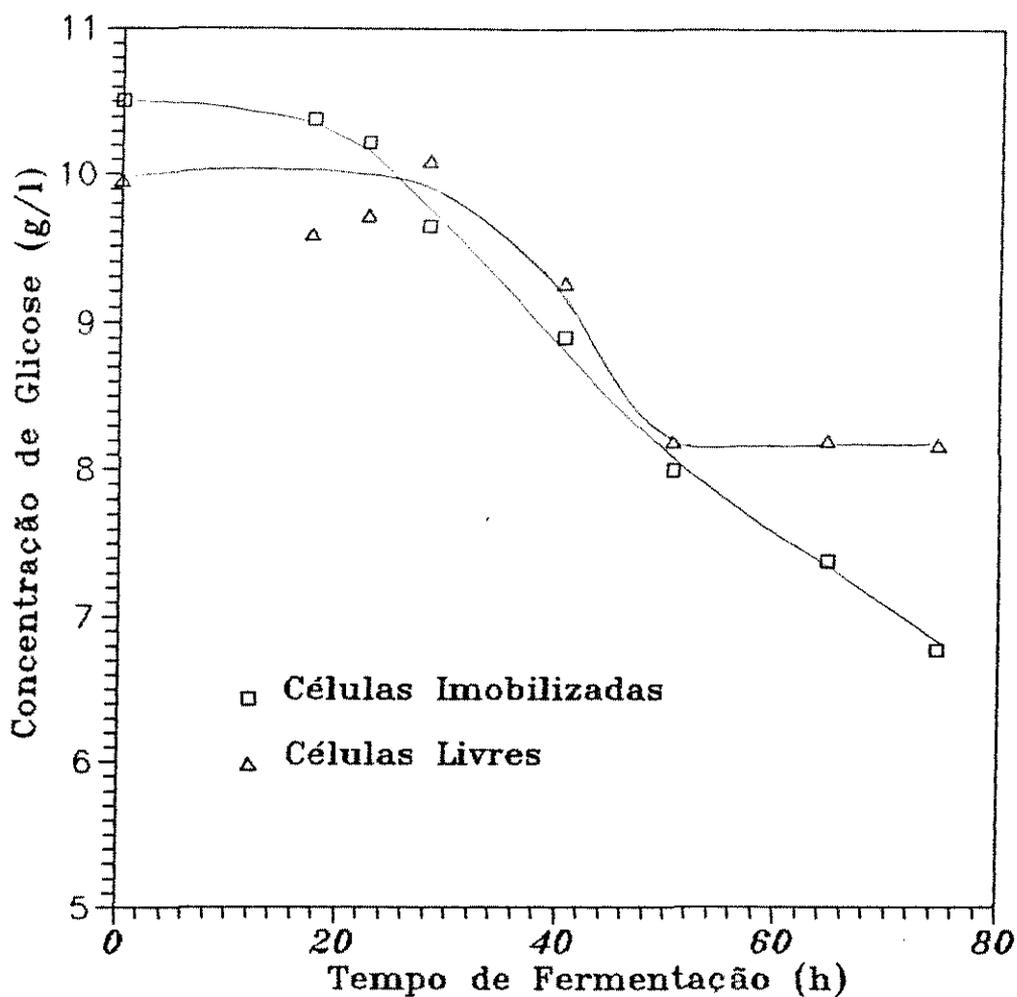


Figura 39 - Variação da concentração de glicose no meio de cultivo com o tempo para fermentações em biorreatores com células livres e imobilizadas em matriz contendo 3,6 % de *k*-carragena. Condições experimentais : vazão de entrada de ar de 307 ml/min, temperatura de 30°C, volume de reação de 200 ml, concentração do inóculo celular : 3×10^7 ufc/ml.

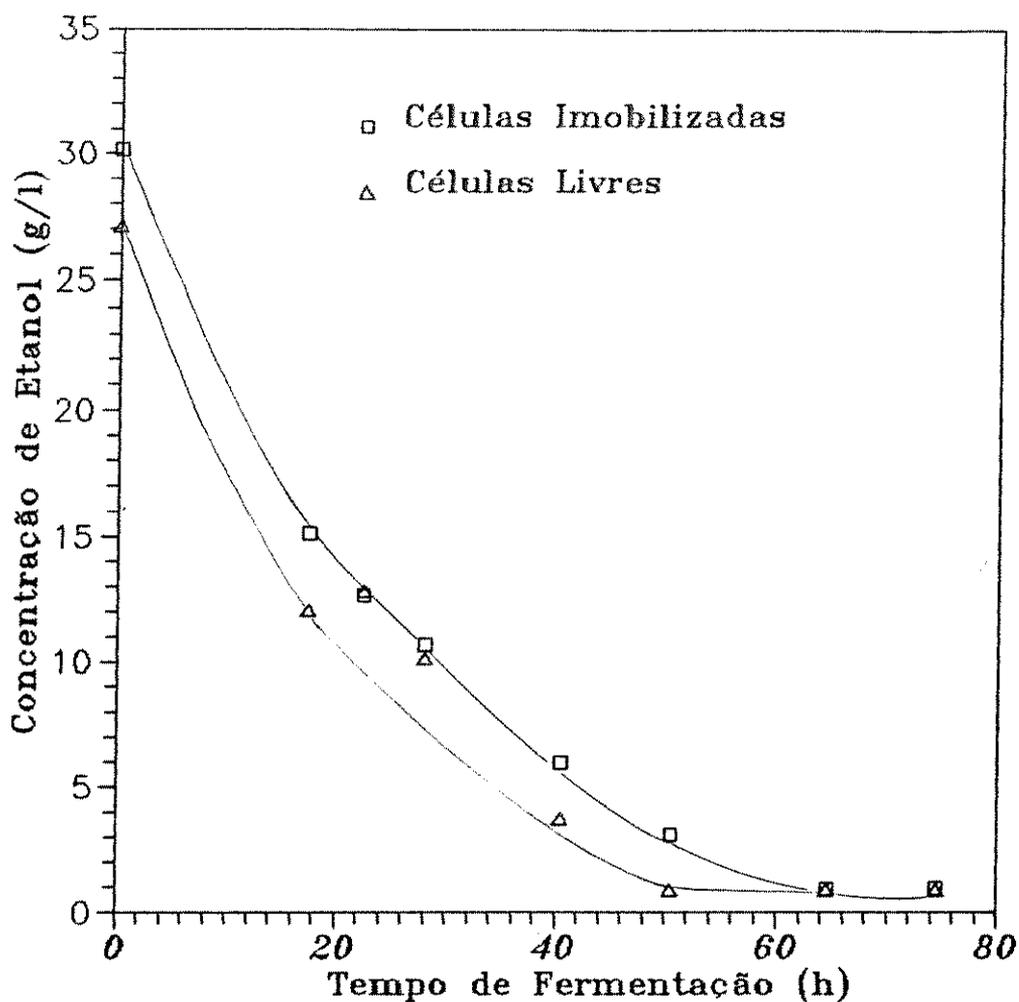


Figura 40 - Variação da concentração de etanol no meio de cultura com o tempo para fermentações em biorreatores com células livres e imobilizadas em matriz contendo 3,6 % de *k*-carragena. Condições experimentais : vazão de alimentação de ar = 307 ml/min, temperatura de 30°C, volume de reação de 200 ml, concentração do inóculo celular : 3×10^7 ufc/ml.

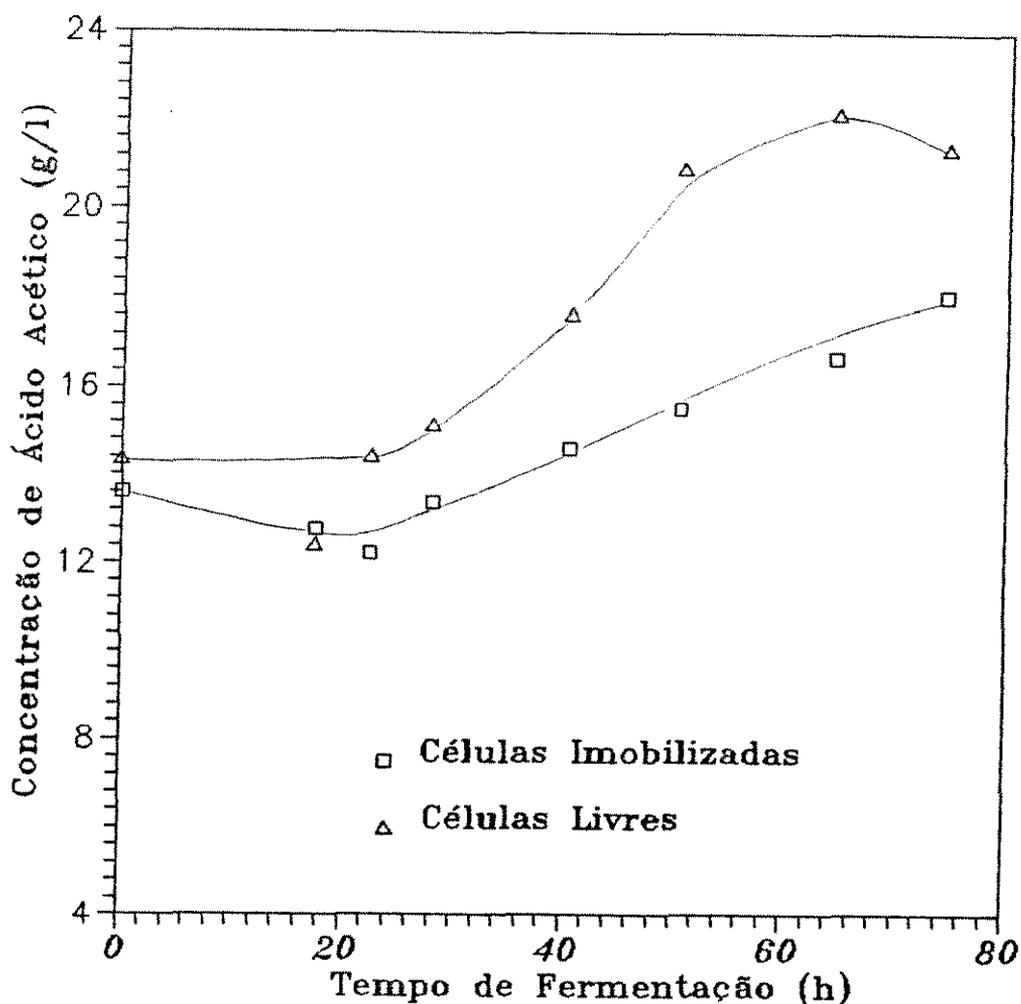


Figura 41 - Variação da concentração de ácido acético no meio de cultura com o tempo para fermentações em biorreatores com células livres e imobilizadas em matriz contendo 3,6 % de *k*-carragena. Condições experimentais : vazão de entrada de ar = 307 ml/min, temperatura de 30°C, volume de reação de 200 ml, concentração do inóculo celular : 3×10^7 ufc/ml.

livres, como se pode constatar na Figura 41. No entanto, para sistemas que contem com o suprimento contínuo de meio de cultivo, a utilização de células imobilizadas trará maiores vantagens, desde que sejam respeitadas as condições mínimas de sobrevivência destes organismos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. Conclusões

- A sistemática desenvolvida para a preparação de inóculo com concentração celular superior a 10^7 ufc/ml, e em tempo reduzido, mostrou-se bastante reprodutível.

- A ordem de grandeza da concentração do inóculo celular é muito importante em fermentações acéticas, sobretudo com células imobilizadas, influenciando fortemente variáveis como a extensão das fases de adaptação de crescimento celular e de produção de ácido acético.

- Todas as quatro linhagens testadas de células do gênero *Acetobacter* foram capazes de oxidar eficientemente o etanol contido no meio de incubação a ácido acético. A linhagem CCT 1724, no entanto, permaneceu, na segunda fase logarítmica de crescimento, em sua taxa específica máxima de produção de ácido acético durante um intervalo de tempo mais prolongado, resultando em maior rendimento global para esta cepa.

- A produção de ácido acético por células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 em meio de incubação é fortemente inibida por concentrações de etanol, ácido acético e cloreto de cálcio superiores a 34,1 g/l, 8,3 g/l e 1,5 g/l, respectivamente, sendo pouco inibida pela presença de cloreto de potássio.

- Em sistemas envolvendo células imobilizadas, a produção de ácido acético foi resultante da contribuição simultânea de microrganismos livres e imobilizados.

- Tanto a natureza do gel como a estrutura da matriz do suporte, resultantes das condições de imobilização celular, são de fundamental importância na atividade e desempenho do biocatalisador no processo, afetando substancialmente os perfis de

crescimento bacteriano e de produção de ácido acético.

- A caracterização de leitos constituídos por partículas de géis hidrofílicos propicia a avaliação da influência das variáveis de preparação da matriz na estrutura porosa dos suportes pertencentes a esta classe de maneira satisfatória.

- A matriz de suporte mais adequada para a imobilização de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 foi a de *k*-carragena, por proporcionar o melhor crescimento deste microrganismo.

- As condições de imobilização devem ser definidas tendo-se em vista variáveis como o crescimento celular no gel, desprendimento de células da matriz, atividade microbiana e estabilidade do biocatalisador.

- Neste trabalho cobriu-se uma ampla faixa de condições de preparação do biocatalisador, conseguindo-se reduzi-la para as condições mais favoráveis ao desempenho das células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 imobilizadas em gel de *k*-carragena.

- Os resultados experimentais mostraram que os maiores níveis de retenção de células no gel e de rendimento global de ácido acético ($Y_{P/X}$) situaram-se entre os extremos das condições de gelificação (1,0 M e 0,1 M em KCl). Estas condições corresponderam a permeabilidades em torno de $2,6 \times 10^{-11} \text{ m}^2$. A melhor faixa de concentrações de polímero situou-se entre 3 e 4 %, para a concentração de 0,5 M de agente gelificante.

- As taxas máximas de respiração celular são pouco afetadas pelo processo de imobilização.

- O sistema de fermentação em biorreator de leito fluidizado trifásico não-convencional mostrou-se adequado para a operação com células imobilizadas em géis hidrofílicos. Este tipo de reator oferece a possibilidade de obtenção de elevadas taxas de transferência de oxigênio, sendo promissor para a fermentação acética. A excessiva evaporação do etanol, no entanto, constituiu-se em um problema que deve ser adequadamente contornado.

5.2. Sugestões

Para dar continuidade aos estudos realizados neste trabalho, sugere-se :

- A aplicação de técnicas de programação estatística de experimentos para a otimização de um biocatalisador aplicável a processos contínuos, embora as melhores condições de preparação do biocatalisador estejam restritas a uma estreita faixa.

- O aperfeiçoamento da técnica de avaliação da estrutura porosa do biocatalisador através de medidas da permeabilidade de leitos de géis.

- A realização de experimentos para a verificação do desempenho de biocatalisadores que apresentem a mesma permeabilidade, porém preparados em condições distintas.

- Contornar o problema de evaporação excessiva do etanol através de um umidificador dos gases de alimentação, de um sistema de condensação mais potente na saída do reator e da instalação de um distribuidor de gases mais eficiente, de forma que se possa trabalhar a menores vazões de gás.

- A realização de um estudo aprofundado da transferência de oxigênio no reator, garantindo o seu suprimento de maneira eficiente para células estritamente aeróbicas, como é o caso do *Acetobacter*.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Santana, M. H. A. - Estudo da Oxidação Catalítica do Etanol a Ácido Acético em Fase Vapor. Dissertação de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Eng. Mecânica da UNICAMP, Campinas, 1988.
- 2 - Crueger, W. e Crueger, A. - Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology. Editora Science Tech. Inc., Madison, 1984.
- 3 - Asai, T. - Acetic Acid Bacteria : Classification and Biochemical Activities. Editora University Park Press, Baltimore, 1968.
- 4 - Krieg, R. e Holt, J. G. - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1, Editora Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
- 5 - Ghommidh, C.; Navarro, J. M. e Durand, G. - A Study of Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter* Cells : Oxygen Transfer. Biotechnology and Bioengineering, Volume 24, 1982.
- 6 - Ebner, H. e Follmann, H. - Acetic Acid : Biotechnology : A Comprehensive Treatise in 8 Volumes, Volume 3, Editora verlag Chemil, Weinheim, 1983.
- 7 - Mori, A. e Terui, G. - Kinetic Studies on Submerged Acetic Acid Fermentation II : Process Kinetics. Journal of Ferment. Technol., Volume 50, nº 2, 1972.

-
- 8 - Sun, Y. e Furusaki, S. - Effects of Producty Inhibition on Continuous Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter aceti* : Theoretical Calculations. Journal of Ferment. and Bioeng., Volume 70, nº 3, 1990.
- 9 - Osuga, J.; Mori, A. e Kato, J. - Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter aceti* Cells Entrapped in a κ -Carrageenan Gel. Journal of Ferment. Technol., Volume 62, nº 2, 1984.
- 10 - Sun, Y. e Furusaki, S. - Continuous Production of Acetic acid Using Immobilized *Acetobacter aceti* in a Three-Phase Fluidized Bed Biorreactor. Journal of Ferment. and Bioeng., Volume 69, nº 2, 1990.
- 11 - Ghommidh, C.; Navarro, J. M. e Durand, G. - A Study of Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter* Cells : Oxygen Tranfer. Biotechnology and Bioengineering, Volume 24, 1982.
- 12 - Ationu, A.; Patterson, J. D. E.; Todd, J. R. e Wood, B. J. B. - Production of Acetic Acid in Packed Bed Fermenters. Biotechnology Letters, Volume 10, nº 9, 1988.
- 13 - Phillips, C. R. e Poon, Y. C. - Immobilization of Cells. Editora Springer-Verlag, Berlim, 1988.
- 14 - Pulitano, V. M. S. E. - Produção Contínua de Etanol em Reator de Alta Produtividade Utilizando Levedura Imobilizada em Pectina Cítrica. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós- Graduação em Eng. Química da UFSCAR, São Carlos, 1990.
- 15 - Pradella, J. G. C. - Estudo da Fermentação Alcoólica Contínua de Melão de Cana-de-Açúcar com Células Imobilizadas. Dissertação de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Escola Politécnica da USP, São Paulo, 1987.

-
- 16 - Hartmeier, W. - Immobilized Biocatalysts : An Introduction. Editora Springer-Verlag, Berlim, 1988.
- 17 - Kolot, F. B. - Microbial Carriers : Strategy for Selection. Process Biochemistry, Agosto/Setembro, 1981.
- 18 - Kennedy, J. F. - Facile Methods for the Immobilization of Microbial Cells Without Disruption of their Life Processes. Immobilized Microbial Cells, ACS Symposium Series 106, Editado por K. Venkatsubramanian, Washington, 1979.
- 19 - Okuhara, A. - Vinegar Production with *Acetobacter* Grown on a Fibrous Support. Journal of Ferment. Technol., Volume 63, nº 1, 1985.
- 20 - Glicksman, M. - Food Hydrocolloids. Volume 2, Editora CRC Press Inc., Flórida, 1983.
- 21 - Tosa, T. et alii - Immobilization of Enzymes and Microbial Cells Using Carrageenan as Matrix. Biotechnology and Bioengineering, Volume 21, 1979.
- 22 - Wada, M.; Uchida, T.; Kato, J. e Chibata, I. - Continuous Production of L-Isoleucine Using Immobilized Growing *Serratia marcescens* Cells. Biotechnology and Bioengineering, Volume 22, 1980.
- 23 - Wada, M.; Kato, J. e Chibata, I. - Electron Microscopic Observation of Immobilized Growing Yeast Cells. Journal of Ferment. Technol., Volume 58, nº 4, 1980.
- 24 - Wada, M.; Kato, J. e Chibata, I. - Continuous Production of Etanol in High Concentration Using Immobilized Growing

- Yeast Cells. Journal of Appl. Microbiol. Biotechnol., Volume 11, 1981.
- 25 - Nguyen, A. L. e Luong, J. H. T. - Diffusion in κ -Carrageenan Gel Beads. Biotechnology and Bioengineering, Volume 28, 1986.
- 26 - Nuñez, M. J. e Lema, J. M. - Cell Immobilization : Application to Alcohol Production. Enzyme Microb. Technol., Volume 9, 1987.
- 27 - Wada, M.; Kato, J. e Chibata, I. - Continuous Production of Etanol Using Immobilized Growing Yeast Cells. European Journal of Appl. Microbiol. Biotechnol., Volume 10, 1980.
- 28 - Scott, R. I.; Wills, S. J. e Bucke, C. - Oxygen Uptake by κ -Carrageenan Entrapped *Streptomyces clavuligerus*. Enzyme Microb. Technol., Volume 10, 1988.
- 29 - Cheetham, P. S. J.; Blunt, K. W. e Christopher, B. - Physical Studies on Cell Immbilization using Calcium Alginate Gels. Biotechnology and Bioengineering, Volume 21, 1979.
- 30 - Bajpai, P. K.; Wallace, J. B. e Margarits, A. - Effects of Calcium Chloride Concentration on Ethanol Production and Growth of Immobilized *Zymomonas mobilis*. Journal of Ferment. Technol., Volume 10, nº 9, 1988.
- 31 - Ogbonna, J. C.; Amano, Y. e Nakamura, K. - Elucidation af Optimun Conditions for Immobilization of Viable Cells by Using Calcium Alginate. Journal of Ferment. and Bioeng., Volume 70, nº 3, 1990.
- 32 - Tanaka, H.; Irie, S. e Ochi, H. - A Novel Immobilization Method for Prevention of Cell Leakage from the Gel Matrix. Journal of Ferment. and Bioeng., Volume 68, nº 3, 1989.

-
- 33 - Fukushima, Y.; Okamura, K.; Imai, K. e Motai, H. - A New Immobilization Technique of Whole Cells and Enzymes with Colloidal Silica and Alginate. Biotechnology and Bioengineering, Volume 32, 1988.
- 34 - Glicksman, M. - Gum Technology in the Food Industry. Editora Academic Press, New York, 1969.
- 35 - Durand, G. e Navarro, J. M. - Immobilized Microbial Cells. Process Biochemistry, Setembro, 1978.
- 36 - Vieth, W. R. e Venkatsubramanian, K. - Immobilized Microbial Cells in Complex Biocatalysis. Immobilized Microbial Cells, ACS Symposium Series 106, Editado por K. Venkatsubramanian, Washington, 1979.
- 37 - Fonseca, M. M.; Black, G. M. e Webb, C. - Reactor Configuration for Immobilised Cells. Process Engineering Aspects of Immobilised Cell Systems, Editado por C. Webb, G. M. Black e B. Atkinson, Warwickshire, 1986.
- 38 - Kim, H. S. e Ryu, D. D. Y. - Continuous Glutamate Production Using an Immobilized Whole Cell System. Biotechnology and Bioengineering, Volume 24, 1982.
- 39 - Furui, M. e Yamashita, K. - Diffusion Coefficients of Solutes in Immobilized Cell Catalysts. Journal of Ferment. Technol., Volume 63, nº 2, 1985.
- 40 - Lima, U. A.; Aquarone, E. e Borzani, W. - Biotecnologia: Tecnologia das Fermentações, Volume 1, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.
- 41 - Yasui, Y.; Suneya, Y. e Mori, A. - Behavior of Acetic Acid Bacteria Grown in Surface Culture toward Oxygen. Journal of Ferment. Technol., Volume 56, nº 4, 1978.

-
- 42 - Park, Y. S. et alii - Effects of Dissolved Oxygen and Acetic Acid Concentrations on Acetic Acid Production in Continuous Culture of *Acetobacter aceti*. Journal of Ferment. and Bioeng., Volume 68, nº 2, 1989.
- 43 - Nanba, A.; Tamura, A. e Nagai, S. - Synergistic Effects of Acetic Acid and Ethanol on the Growth of *Acetobacter* sp. Journal of Ferment. Technol., Volume 62, nº 6, 1984.
- 44 - Zanin, G. M. - Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada. Dissertação de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Eng. de Alimentos da UNICAMP, Campinas, 1989.
- 45 - Webb, C. - Biomass Hold-Up in Immobilised Cell Reactor. Process Engineering Aspects of Immobilised Cell Systems, Editado por C. Webb, G. M. Black e B. Atkinson, Warwickshire, 1986.

ANEXO A

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A determinação da concentração de glicose foi realizada pelo método colorimétrico de Somogyi [15].

O método de Somogyi emprega três soluções de reagentes, a saber :

- Solução 1

NaHCO_3	20 g
$\text{NaKC}_7\text{H}_4\text{O}_6$	15 g
Na_2CO_3	30 g
Na_2SO_4	180 g
H_2O q.s.p.	1 l

- Solução 2

Em 100 ml de solução a 40 g/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dissolve-se, a frio, 46 g de Na_2SO_4 . Completa-se o volume para 200 ml com água destilada.

- Solução 3

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 g
H_2SO_4 (d = 1,84)	42 ml
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 g
H_2O q.s.p.	1 l

A dosagem foi feita transferindo-se 1 ml da amostra convenientemente diluída e filtrada com membrana com abertura de $0,22 \mu\text{m}$ para um tubo de ensaio. Misturou-se, separadamente, 4 porções da solução 1 para uma parte da solução 2. Adicionou-se 1 ml desta solução em cada tubo com amostra e ferveu-se por 15 minutos. Resfriou-se à temperatura ambiente, em uma cuba com água, e adicionou-se 2 ml da solução 3 em cada tubo de ensaio. Agitou-se, para que ocorresse a liberação de gases e completou-se

o volume para 25 ml, em proveta. Uma prova em branco era preparada paralelamente, utilizando-se 1 ml de água destilada ao invés de amostra. Fazia-se então a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 570 nm, onde o valor zero da escala era referente à leitura da prova em branco.

A calibração das soluções reagentes foi feita previamente, a partir de soluções de glicose diluídas em água destilada, cujas faixas de concentração procuravam cobrir aquela onde o método é aplicável, ou seja, de 20 a 200 mg/l.

ANEXO B

DETERMINAÇÃO DA MASSA CELULAR SECA

A turvação que apresenta um tubo de ensaio contendo uma cultura em crescimento é provocada pela absorção ou reflexão da luz, sendo, até certo ponto, proporcional à concentração de células presentes na suspensão.

A relação entre a massa seca celular e a absorbância para os sistemas estudados foi estabelecida segundo a seqüência de procedimentos descrita a seguir.

Um volume de 20 ml de inóculo celular obtido de acordo com o procedimento D citado neste trabalho foi adicionado a 80 ml de meio de incubação. A suspensão resultante foi dividida em dois frascos erlenmeyers de 250 ml de capacidade, os quais foram incubados em mesa rotativa a 200 rpm e 30°C, por 48 horas.

Após este período, um volume total conhecido da cultura obtida foi filtrado, através de uma membrana Millipore de massa determinada previamente e de abertura igual a 0,22 μ m, sob vácuo de 25 in Hg.

A torta resultante foi lavada com igual volume de solução aquosa de NaCl a 0,23 % (m/v), e com o mesmo volume em água destilada. A membrana foi, então, posta a secar em estufa a 110°C, por 12 horas, e resfriada em dessecador por 12 horas. Após este período, efetuou-se a pesagem repetindo-se a etapa de secagem e resfriamento em dessecador até que se alcançasse peso constante. Paralelamente, determinou-se a perda de massa de uma membrana virgem nas mesmas condições e comparou-se com a do sistema envolvendo células secas.

Uma parcela da suspensão celular idêntica à submetida a este tratamento foi seqüencialmente diluída e a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm. Desta forma, relacionou-se massa celular seca com valores de absorbância.

ANEXO C

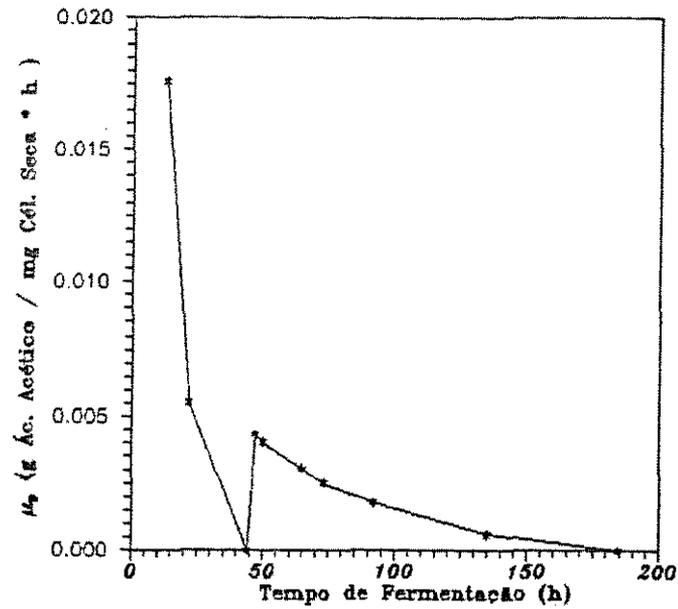


Figura A1 - Variação das taxas específicas de produção de ácido acético com o tempo para cultivo de *Acetobacter aceti* CCT 0190 em frasco, a 180 rpm e 30°C.

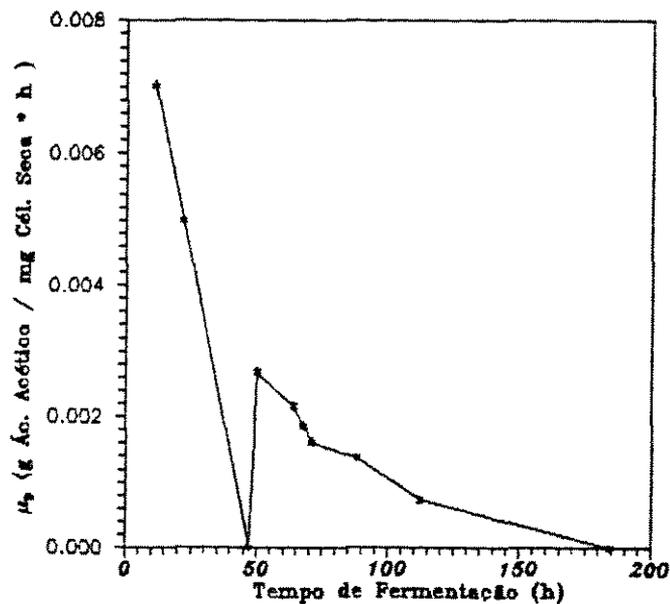


Figura A2 - Variação das taxas específicas de produção de ácido acético com o tempo para cultivo de *Acetobacter pasteurianus* CCT 1706 em frasco, a 180 rpm e 30°C.

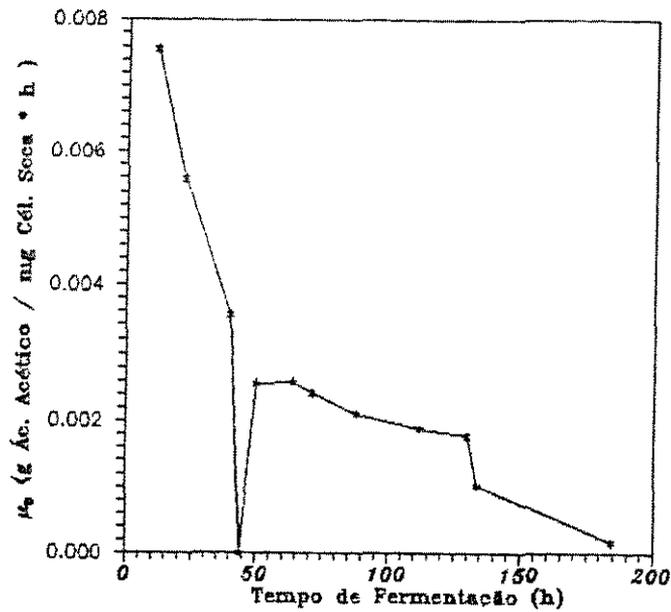


Figura A3 - Variação das taxas específicas de produção de ácido acético com o tempo para cultivo de *Acetobacter aceti* CCT 1724 em frasco, a 180 rpm e 30°C.

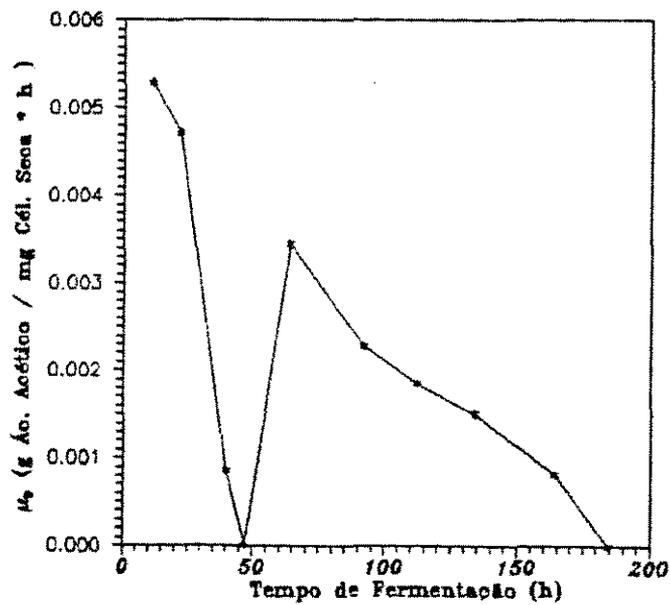


Figura A4 - Variação das taxas específicas de produção de ácido acético com o tempo para cultivo de *Acetobacter* sp. CCT 2013 em frasco, a 180 rpm e 30°C.

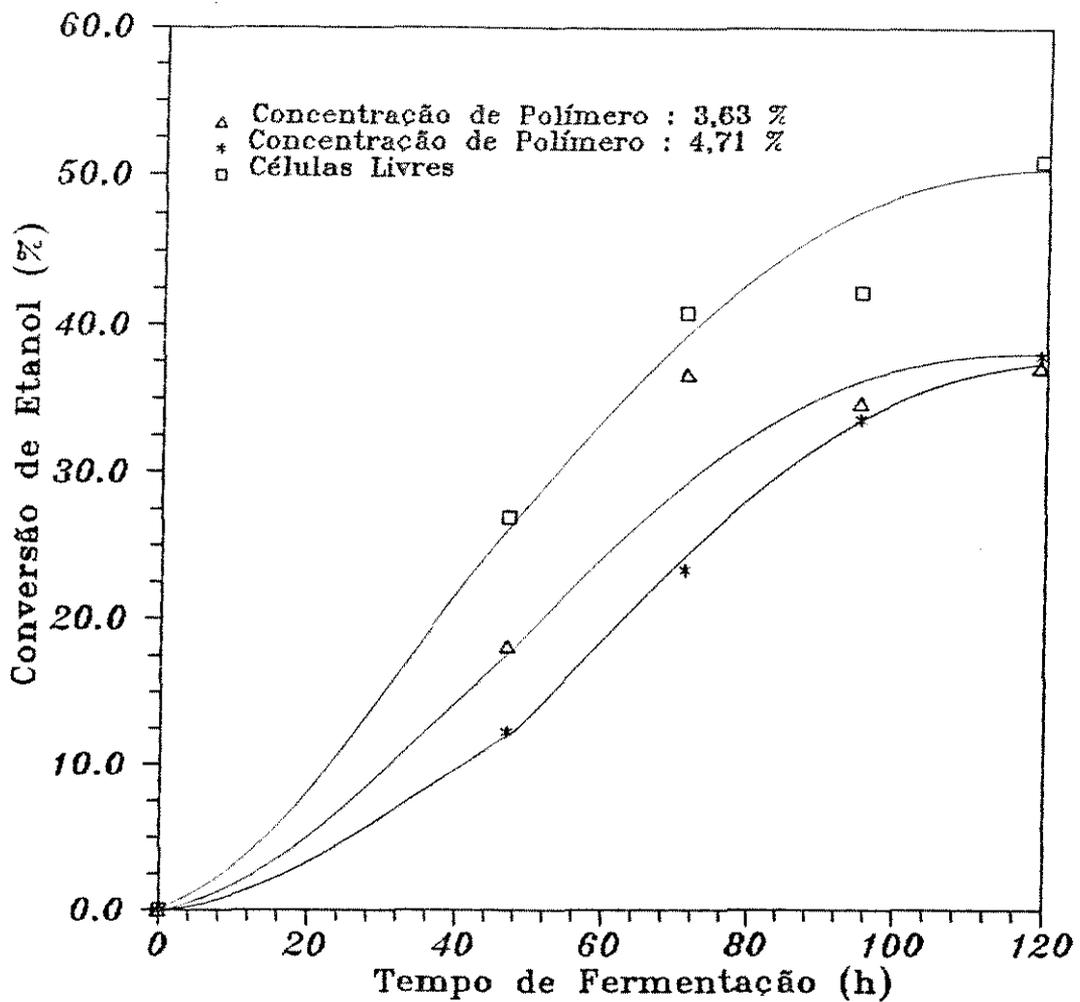


Figura A5 - Influência da concentração de polímero na conversão de etanol a ácido acético por células de *A. aceti* CCT 1724 imobilizadas em géis de carragena, utilizando-se concentrações de KCl de 1,0 M e tempos de gelificação de 10 min. Fermentações conduzidas em frascos, a 200 rpm e 30°C.

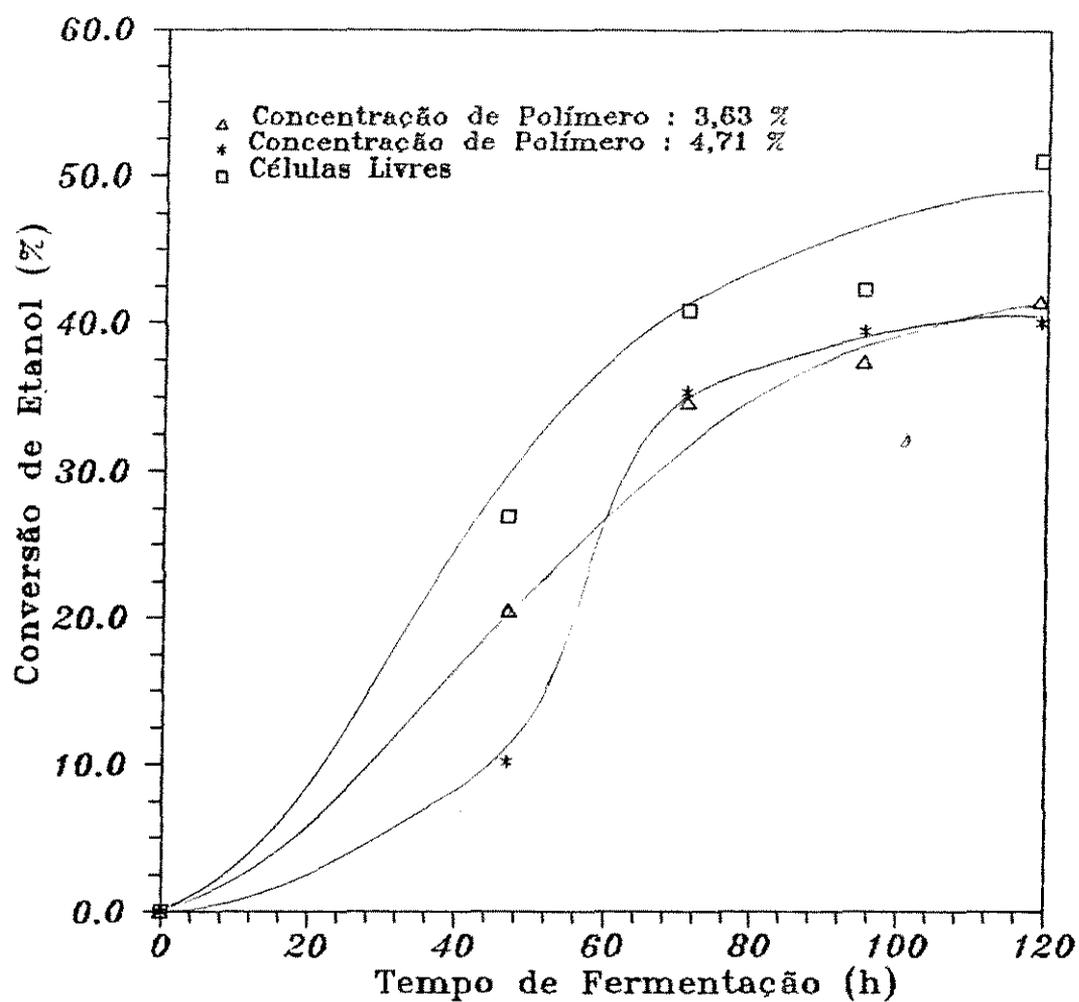


Figura A5 - Influência da concentração de polímero na conversão de etanol a ácido acético por células de *A. aceti* CCT 1724 imobilizadas em géis de carragena, utilizando-se concentrações de KCl de 1,0 M e tempos de gelificação de 60 min. Fermentações conduzidas em frascos, a 200 rpm e 30°C.

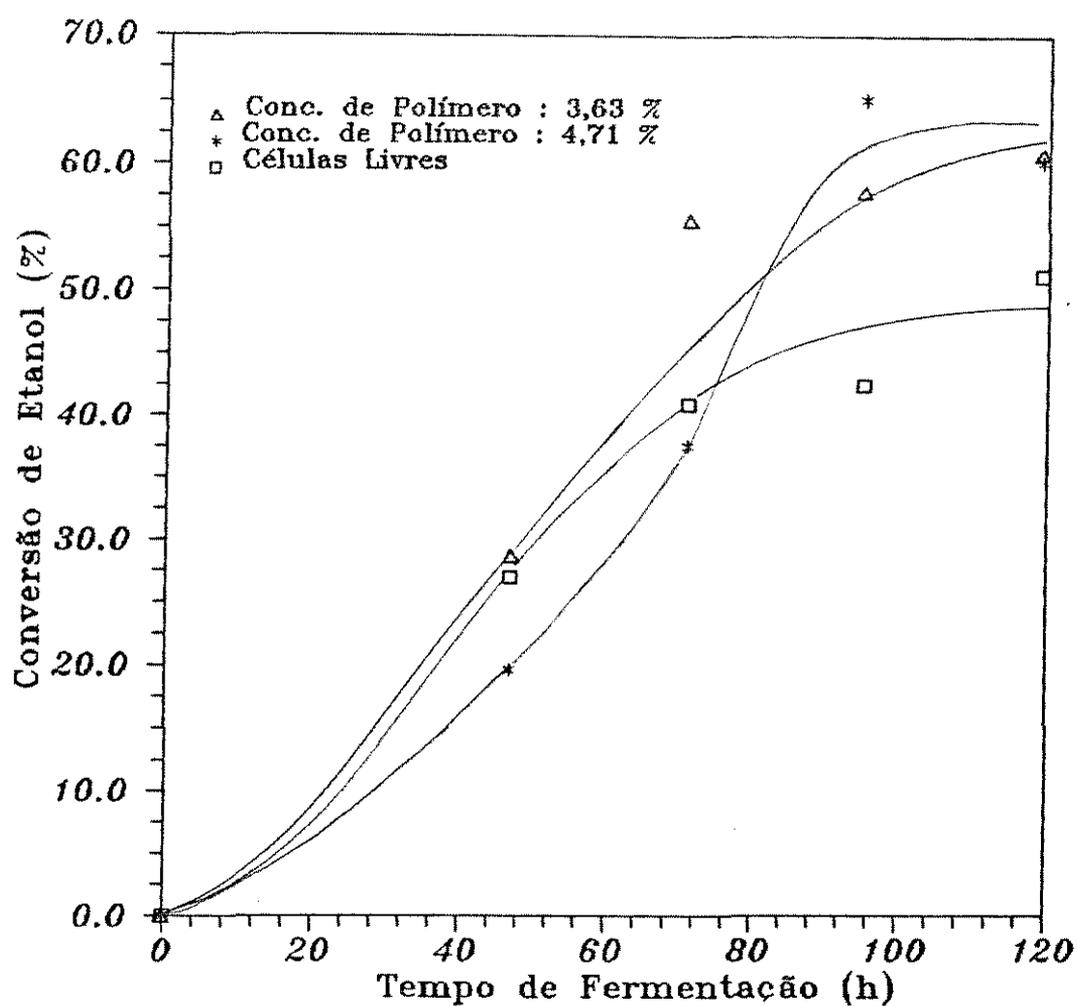


Figura A7 - Influência da concentração de polímero na conversão de etanol a ácido acético por células de *A. aceti* CCT 1724 imobilizadas em géis de carragena, utilizando-se concentrações de KCl de 0,10 M e tempos de gelificação de 14 h. Fermentações conduzidas em frascos, a 200 rpm e 30°C.

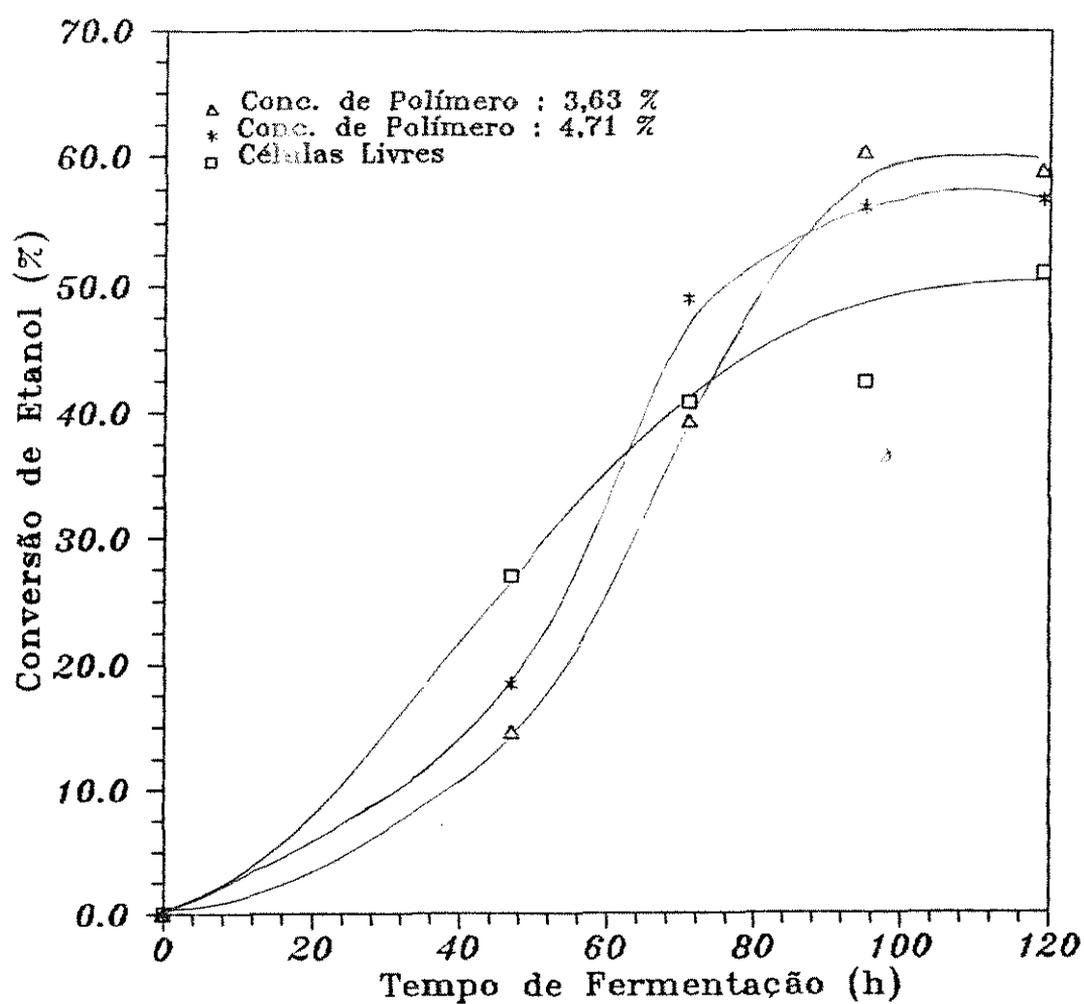


Figura A8 - Influência da concentração de polímero na conversão de etanol a ácido acético por células de *A. acetii* CCT 1724 imobilizadas em géis de carragena, utilizando-se concentrações de KCl de 0,10 M e tempos de gelificação de 20 h. Fermentações conduzidas em frascos, a 200 rpm e 30°C.

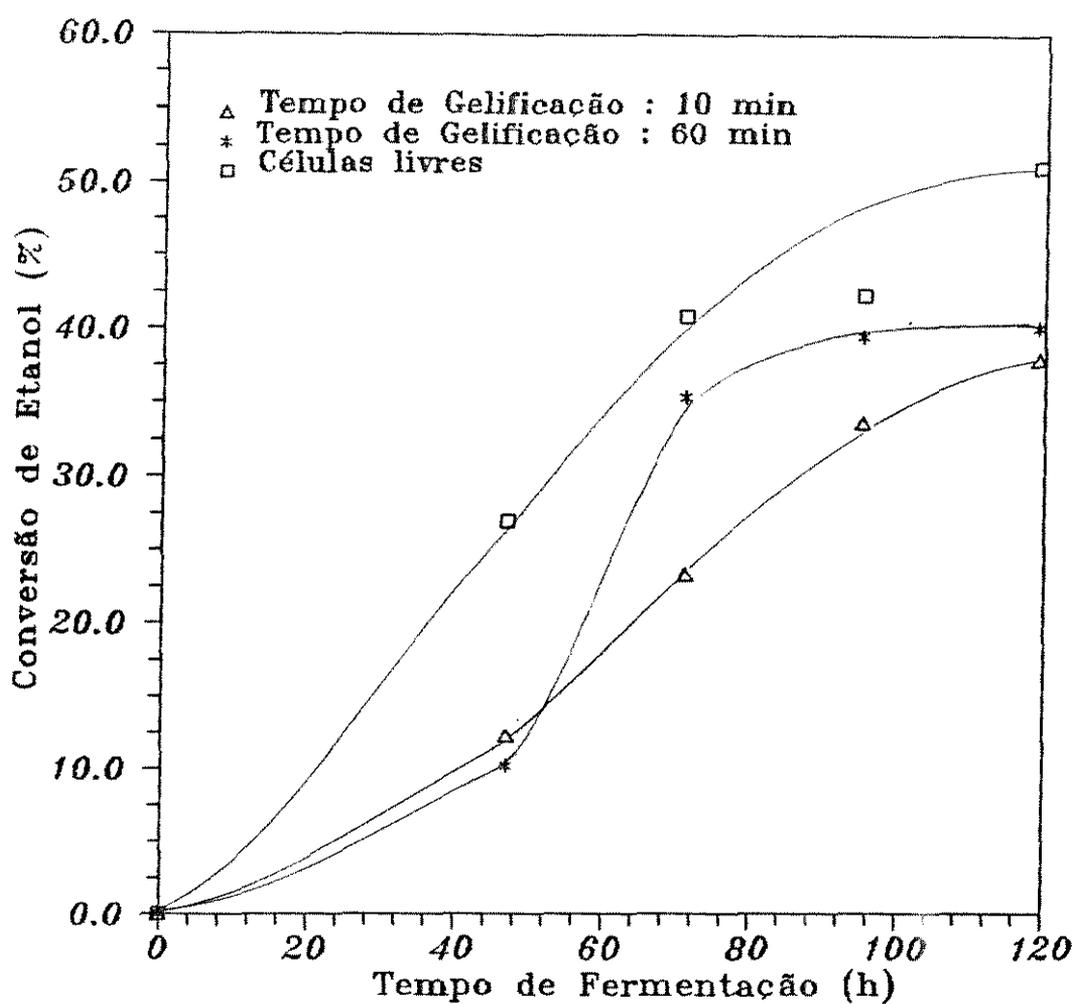


Figura A9 - Influência do tempo de gelificação na conversão de etanol por células de *A. aceti* CCT 1724 immobilizadas em géis contendo 4,71 % de carragena, utilizando-se soluções de KCl de concentração 1,0 M. Fermentações conduzidas em frascos, a 200 rpm e 30°C.

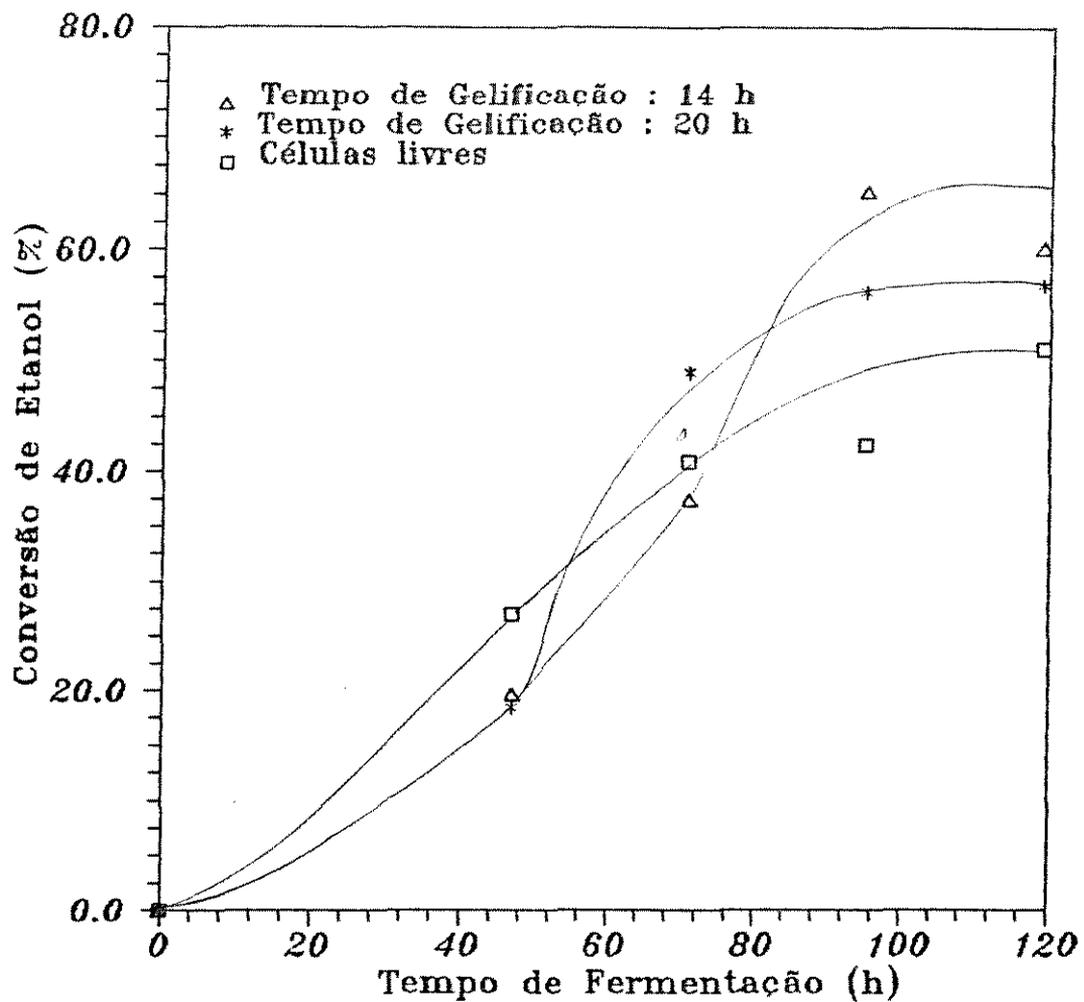


Figura A10 - Influência do tempo de gelificação na conversão de etanol por células de *A. aceti* CCT 1724 imobilizadas em géis contendo 4,71 % de carragena, utilizando-se soluções de KCl de concentração 0,10 M. Fermentações conduzidas em frascos, a 200 rpm e 30°C.

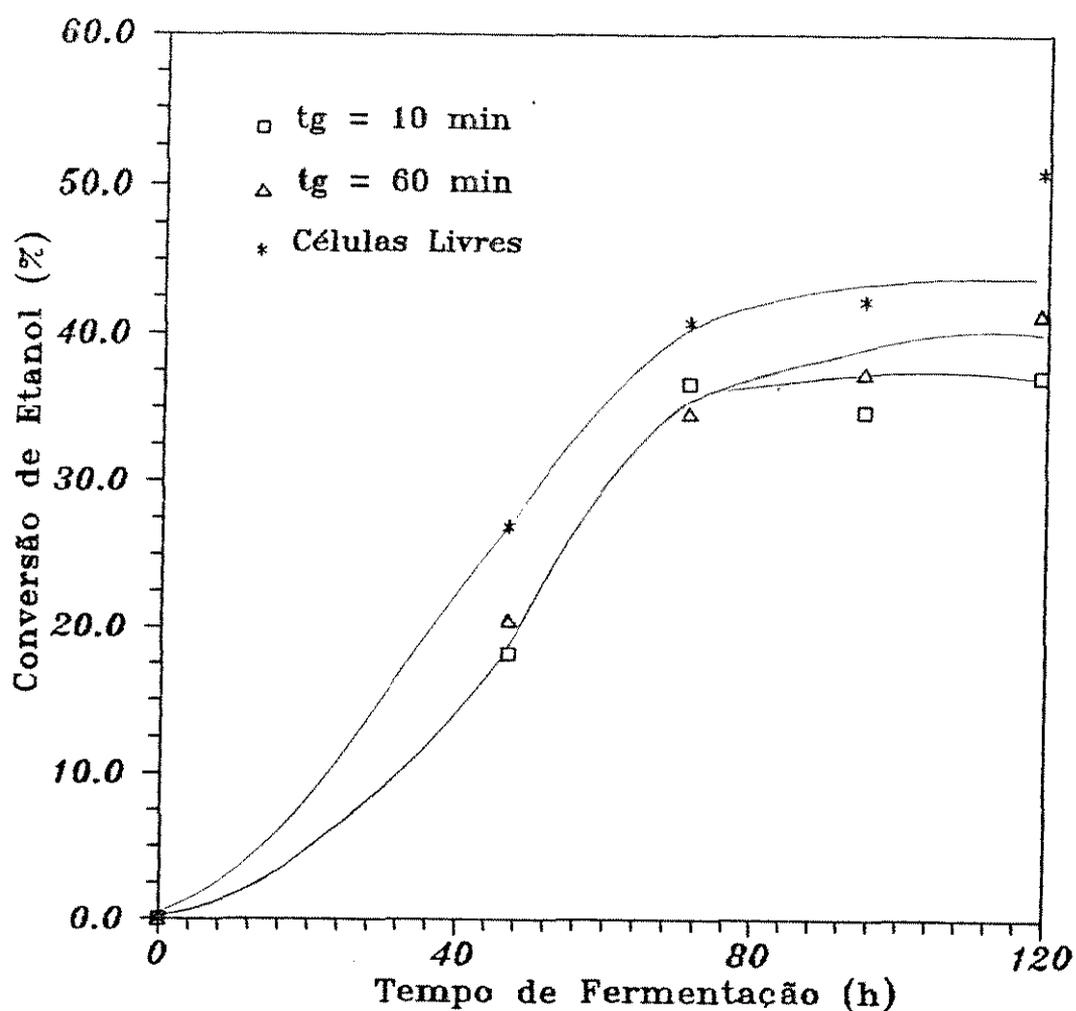


Figura A11 - Influência do tempo de gelificação na conversão de etanol por células de *A. aceti* CCT 1724 immobilizadas em géis contendo 3,63 % de carragena, utilizando-se soluções de KCl de concentração 1,0 M. Fermentações conduzidas em frascos, a 200 rpm e 30°C.

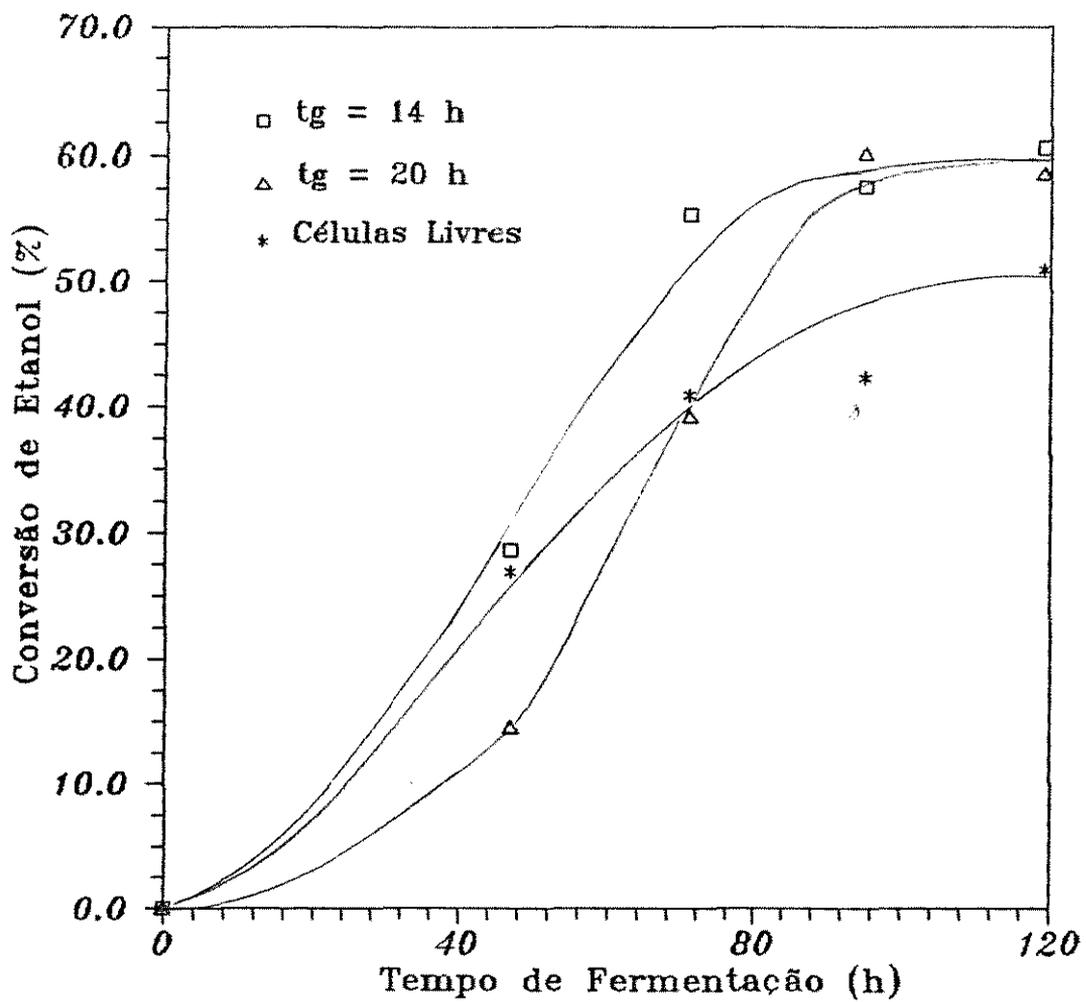


Figura A12 - Influência do tempo de gelificação na conversão de etanol por células de *A. aceti* CCT 1724 immobilizadas em géis contendo 3,63 % de carragena, utilizando-se soluções de KCl de concentração 0,10 M. Fermentações conduzidas em frascos, a 200 rpm e 30°C.

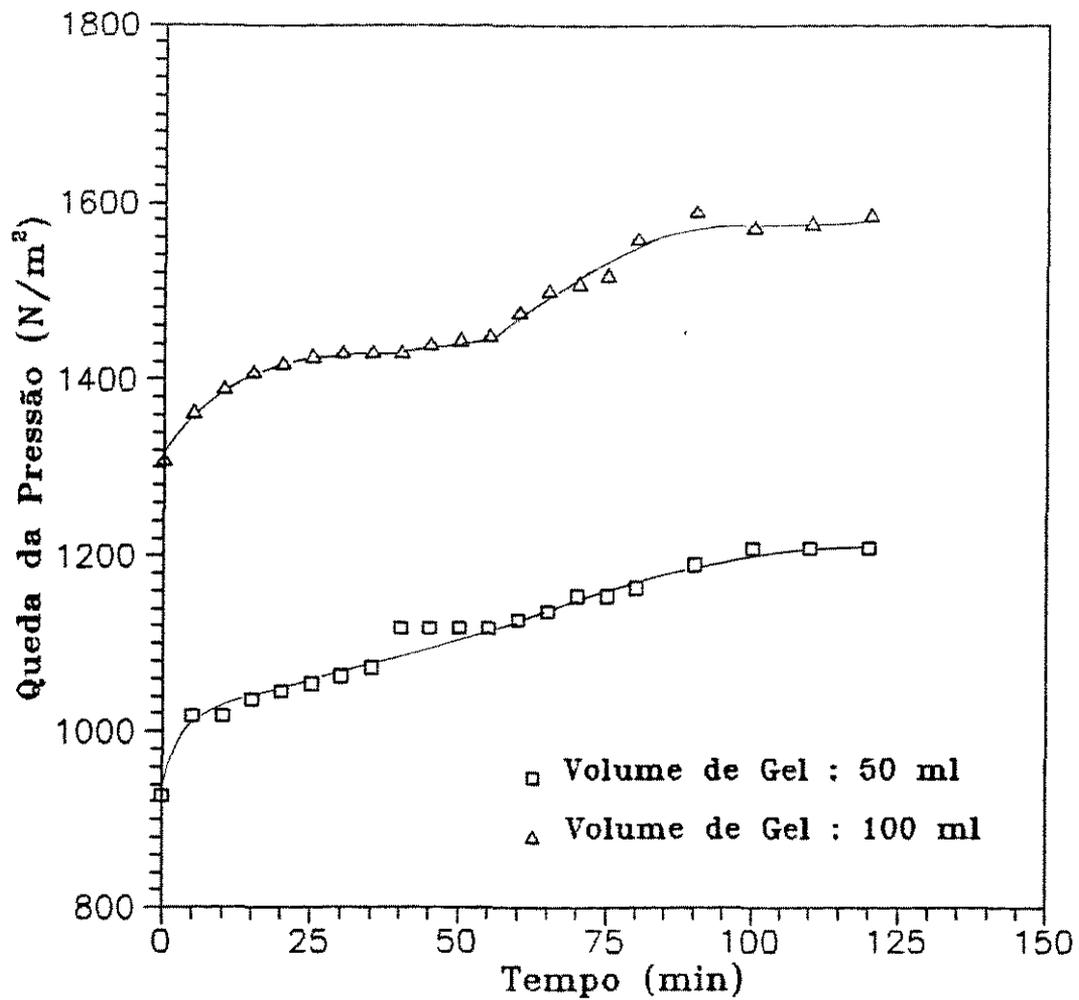


Figura A13 - Influência do volume de partículas de gel no perfil de queda de pressão do sistema. Concentração de carragena : 2,13 %; concentração de KCl : 1,0 M; tempo de gelificação : 10 minutos; vazão da solução de sacarose : 16,13 ml/s.

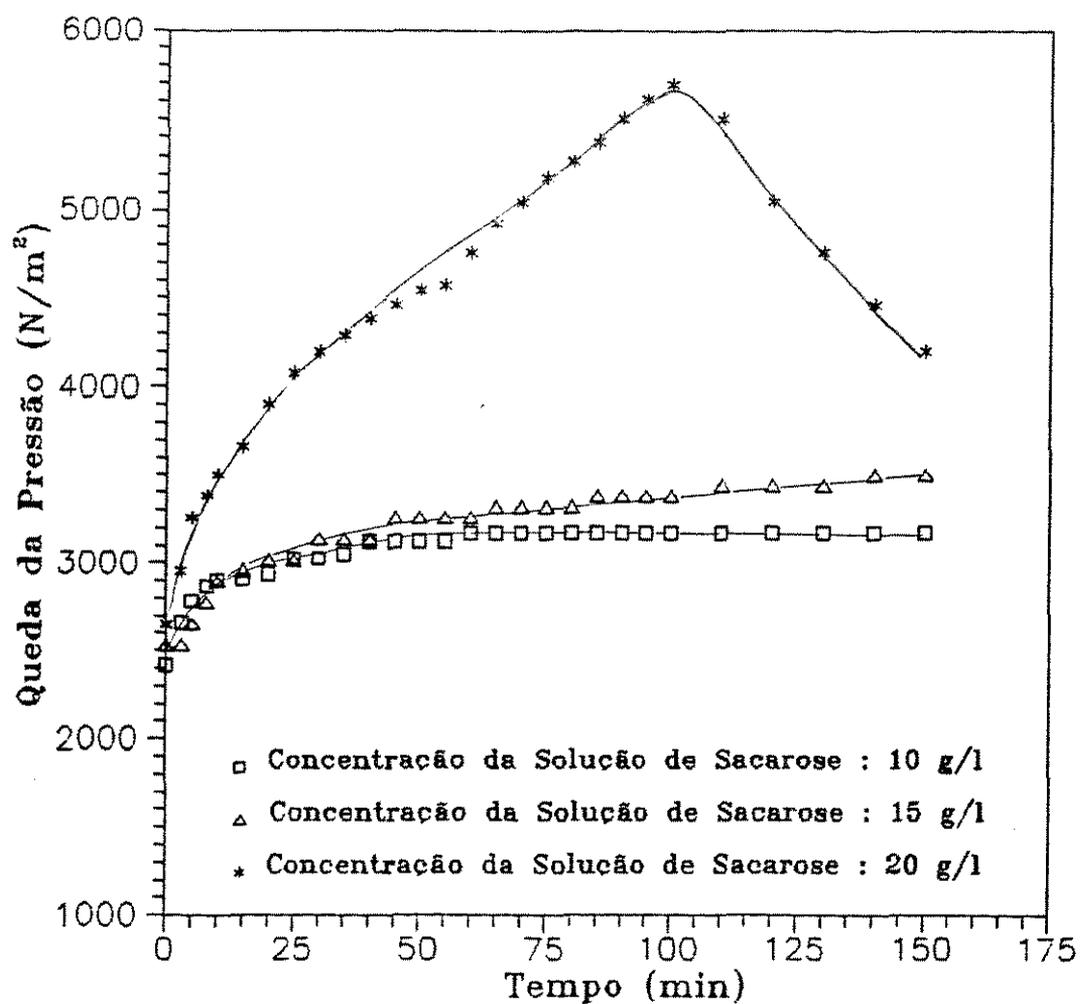


Figura A14 - Influência da concentração de sacarose no perfil de queda de pressão do sistema. Concentração de carragena : 4,25 %; concentração de KCl : 1,0 M; tempo de gelificação : 10 minutos; vazão da solução de sacarose : 16,13 ml/s; porosidade do leito : 0,24.

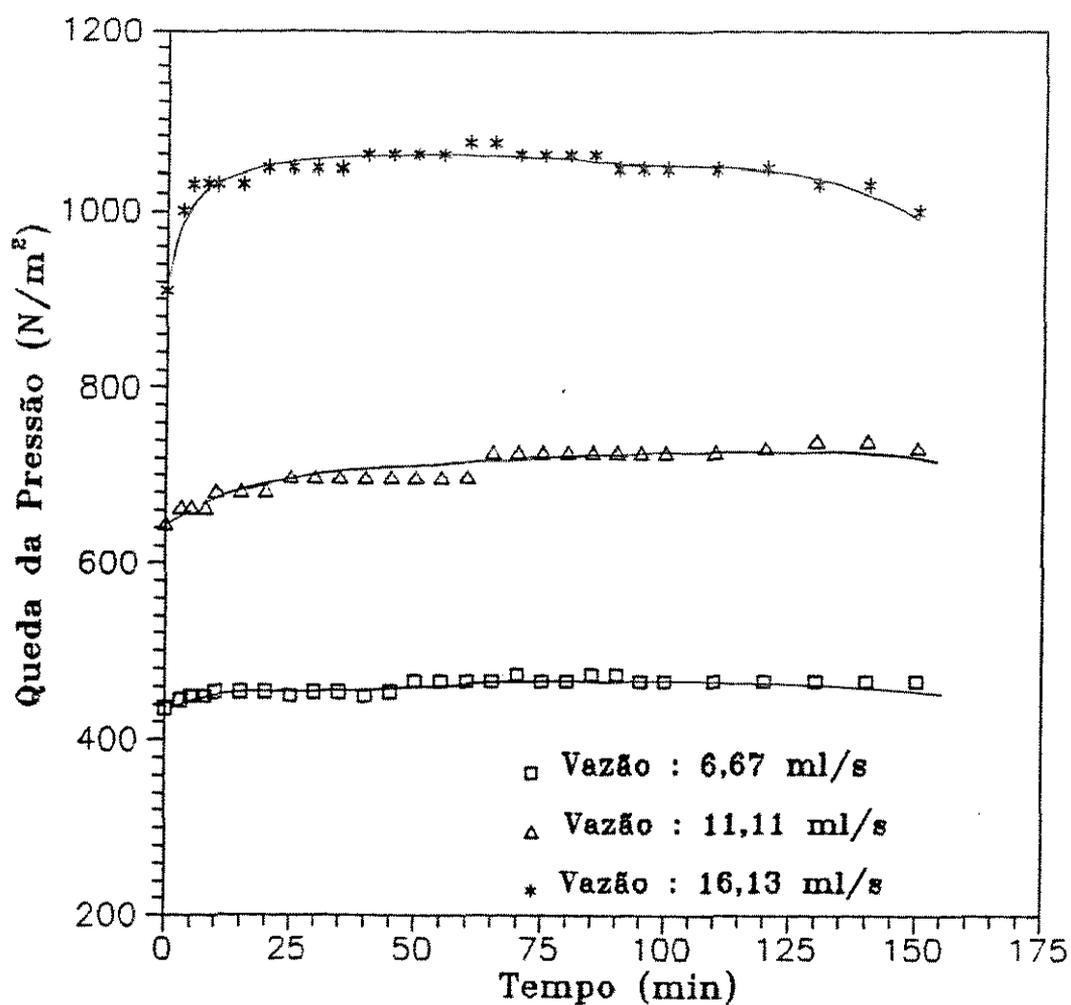


Figura A15 - Influência da vazão de operação na deformação do leito. Concentração de polímero: 2,13 %; concentração de KCl : 1,0 M; tempo de gelificação : 60 minutos; concentração de sacarose : 10 g/l; porosidade : 0,24. Gel isento de suspensão celular

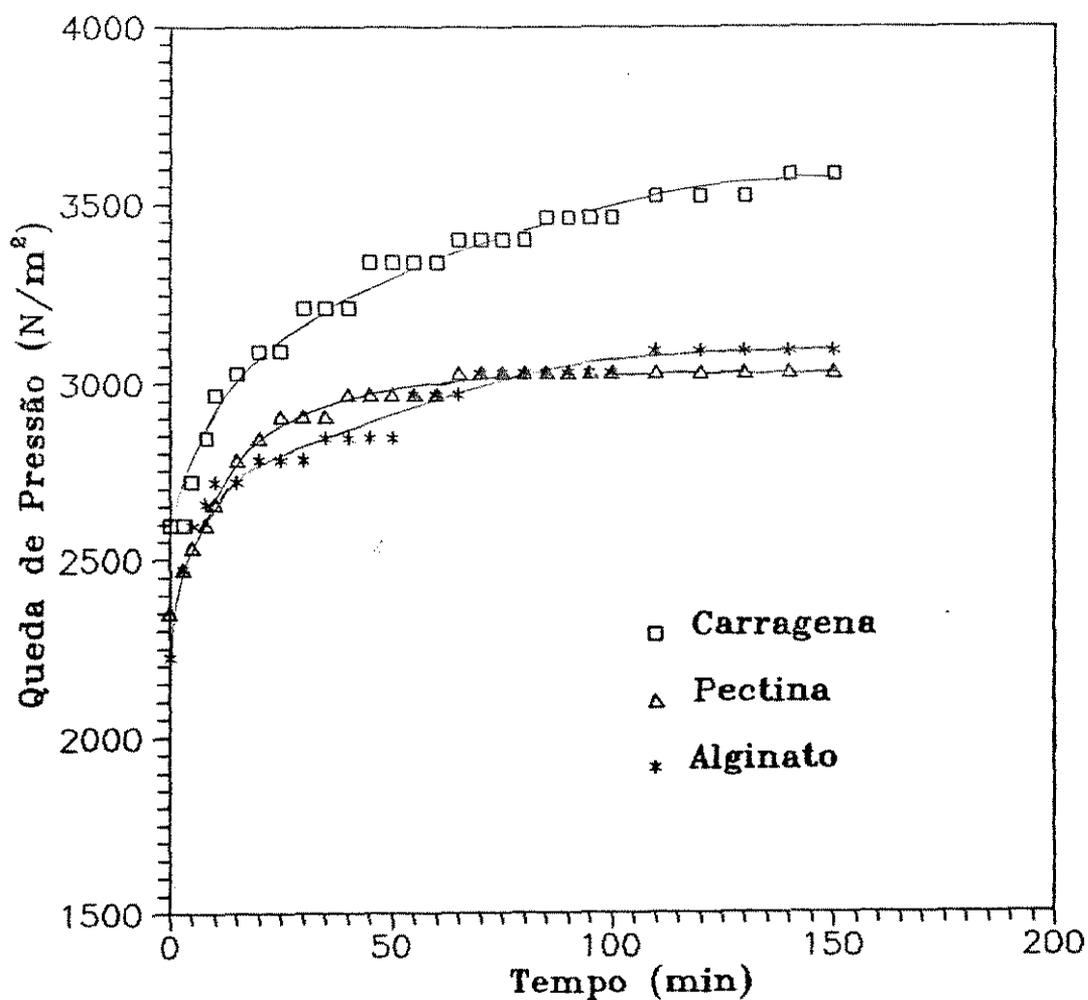


Figura A16 - Perfis de queda de pressão obtidos para sistemas com géis de carragena, pectina e alginato de cálcio. Condições de preparação dos géis : concentração de polímero de 4,25 % (m/v) para o carragena e a pectina e de 2,13 % (m/v) para o alginato; concentração de gelificante de 1,0 M; tempo de gelificação de 10 min. Porosidade do leito : 0,24. Vazão da solução de sacarose a 1,5 % (m/v) : 16,13 ml/s.

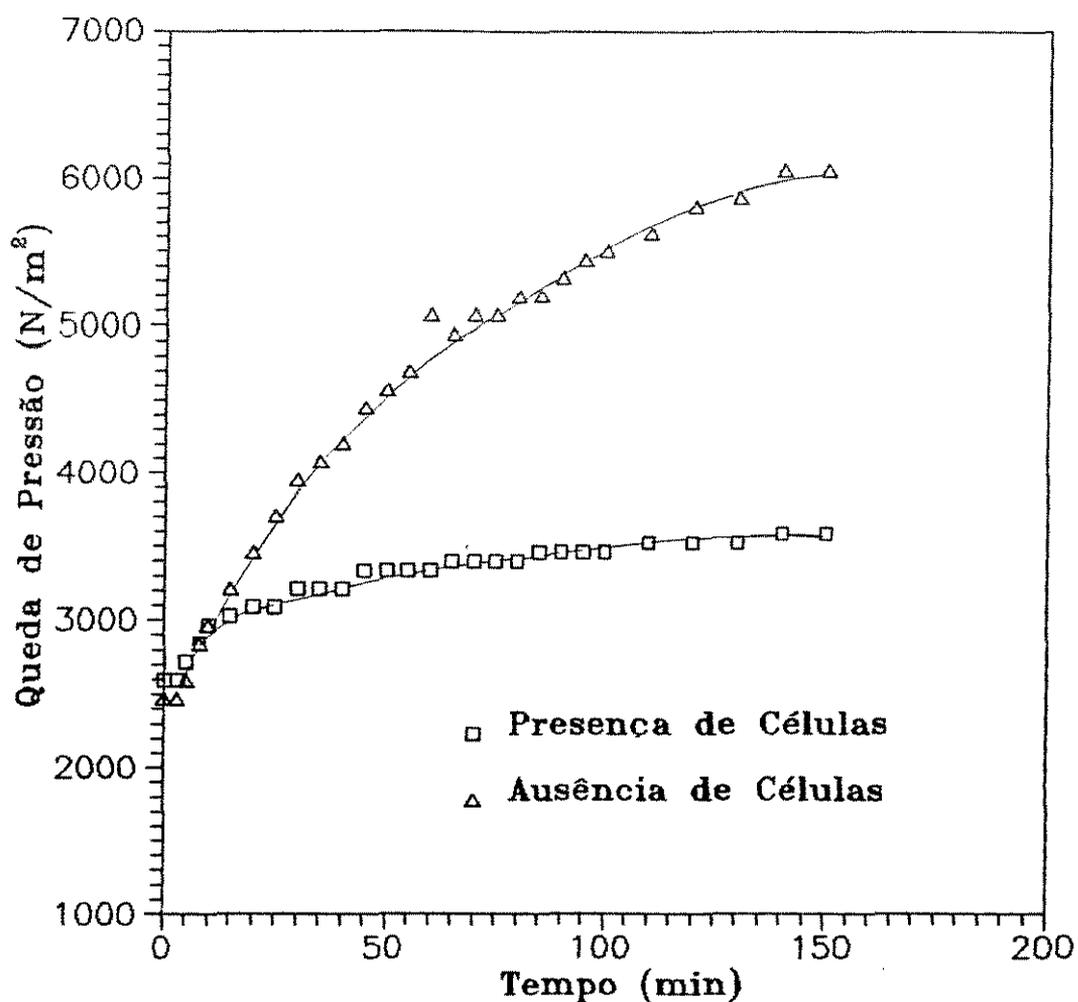


Figura A17 - Perfis de queda de pressão para sistemas com partículas contendo ou não células immobilizadas. Condições de operação e preparação dos géis : concentração de carragena : 4,25 % (m/v); concentração de gelificante : 1,0 M; tempo de gelificação = 10 min; porosidade do leito : 0,24; vazão da solução de sacarose a 1,5 % (m/v) : 18,13 ml/s.

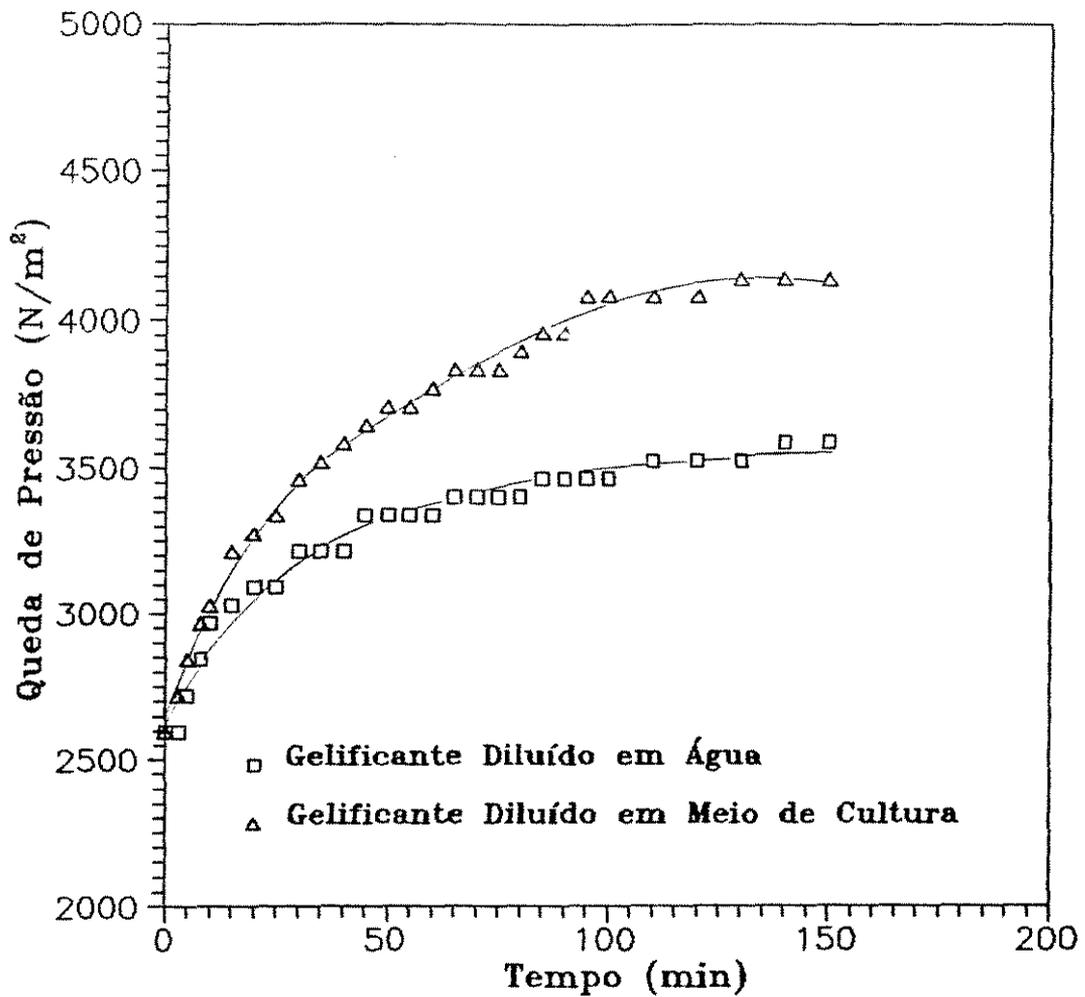


Figura A18 - Influência da presença de meio de cultura na solução de gelificação no perfil de queda de pressão do sistema. Condições de preparação dos géis : concentração de carragena = 4,25 %; tempo de gelificação = 10 min; concentração de KCl = 1,0 M. Porosidade do leito : 0,24. Vazão da solução de sacarose a 1,5 % (m/v) : 16,13 ml/s.

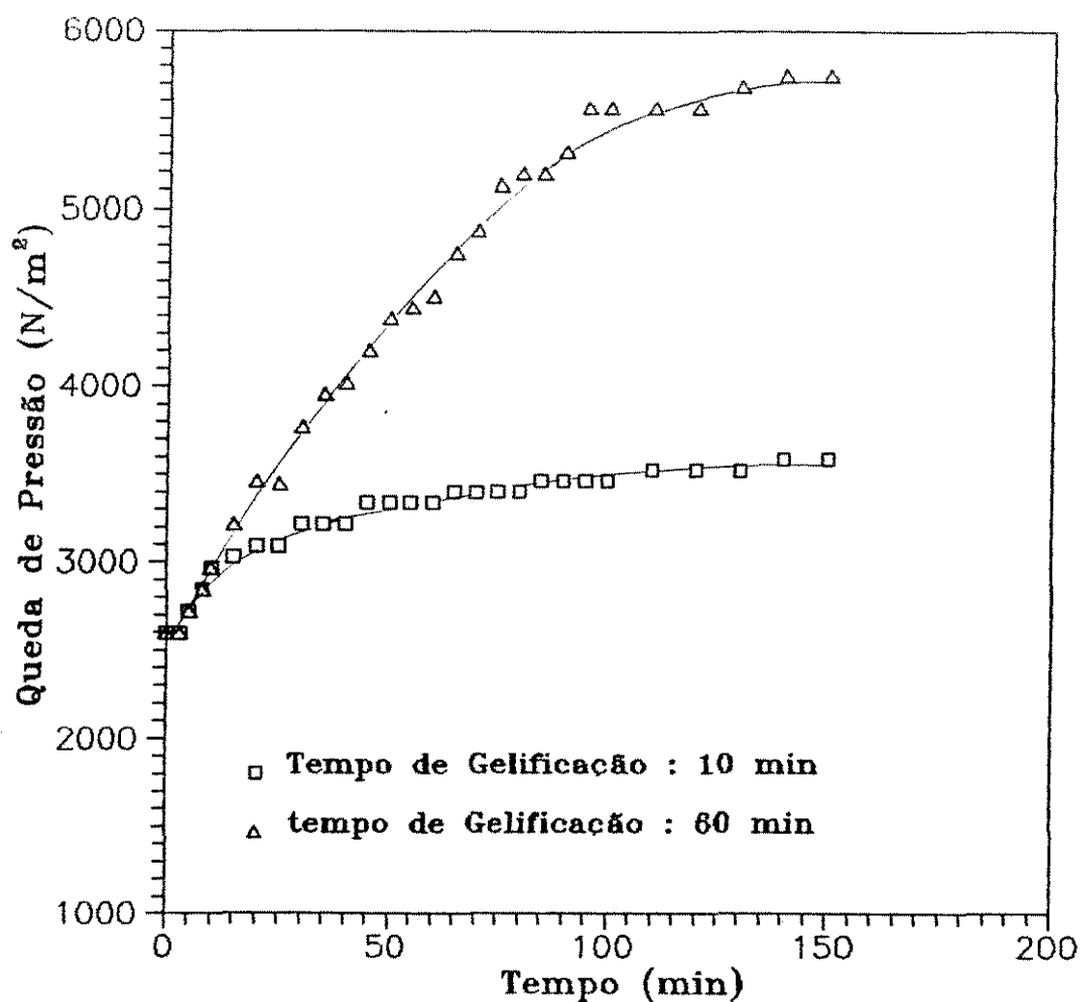


Figura A19 - Influência do tempo de gelificação no perfil de queda de pressão do sistema, para gelificação em solução de KCl a 1,0 M de matrizes contendo 4,25 % (m/v) de carragena. Porosidade do leito : 0,24. Vazão da solução de sacarose a 1,5 % (m/v) : 16,13 ml/s.

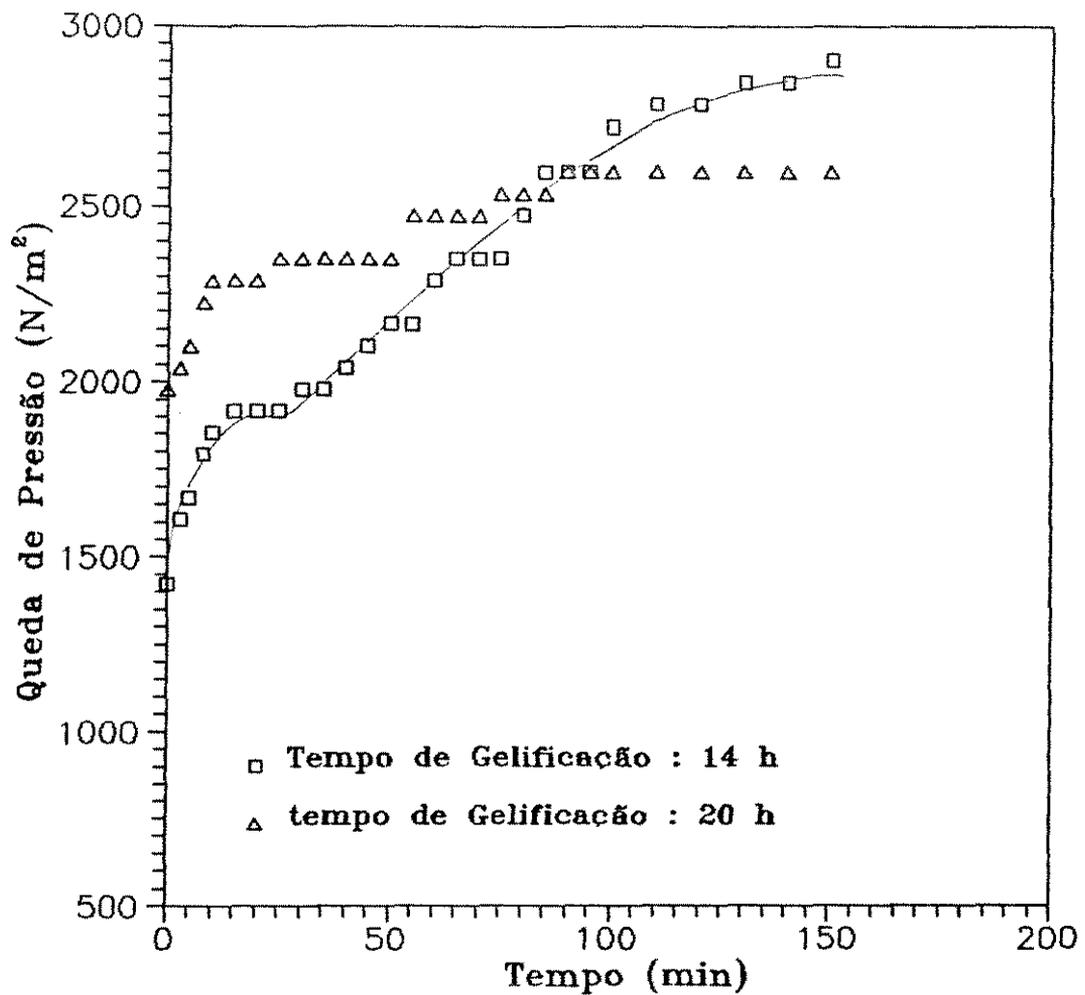


Figura A20 - Influência do tempo de gelificação no perfil de queda de pressão do sistema, para gelificação em solução de KCl a 0,1 M de matrizes contendo 4,25 % (m/v) de carragena. Porosidade do leito : 0,24. Vazão da solução de sacarose a 1,5 % (m/v) : 18,13 ml/s.

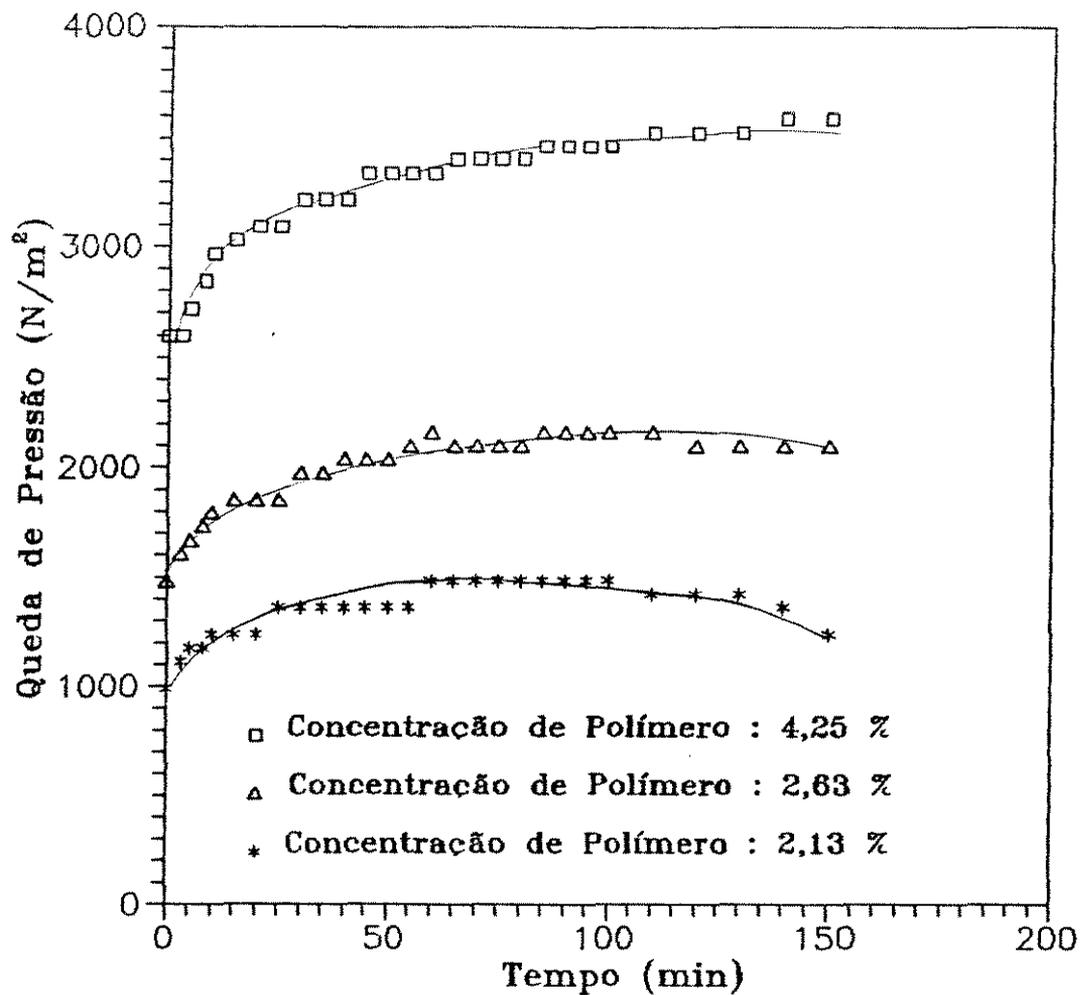


Figura A21 - Influência da concentração de carragena no perfil de queda de pressão do sistema, para matrizes gelificadas em solução de KCl a 1,0 M, por 10 min. Porosidade do leito : 0,24. Vazão da solução de sacarose a 1,5 % : 16,13 ml/s.

ANEXO D

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas em microscópio ótico modelo M150, de marca Reichert-Jung, acoplado ao sistema fotográfico automático Photostar, da mesma marca.

As partículas de gel foram submetidas à presença do corante safranina por 20 segundos, após o que foram lavadas com água destilada para a remoção do excesso. Este procedimento, desenvolvido por Paz [48], acentuou o contraste existente entre as matrizes de gel e as colônias, facilitando sua observação.

A foto envolvendo colônias crescidas na superfície de meio de manutenção foi obtida em microscópio estereoscópico Olympus, modelo SZ-TR-BR-SIT.



Figura F1 - Morfologia de células livres de *Acetobacter aceti* CCT 1724, submetidas à coloração de Gram, após 90 horas de cultivo em frasco agitado, em meio de incubação, a 30°C e 200 rpm. Aumento : 1130 vezes.

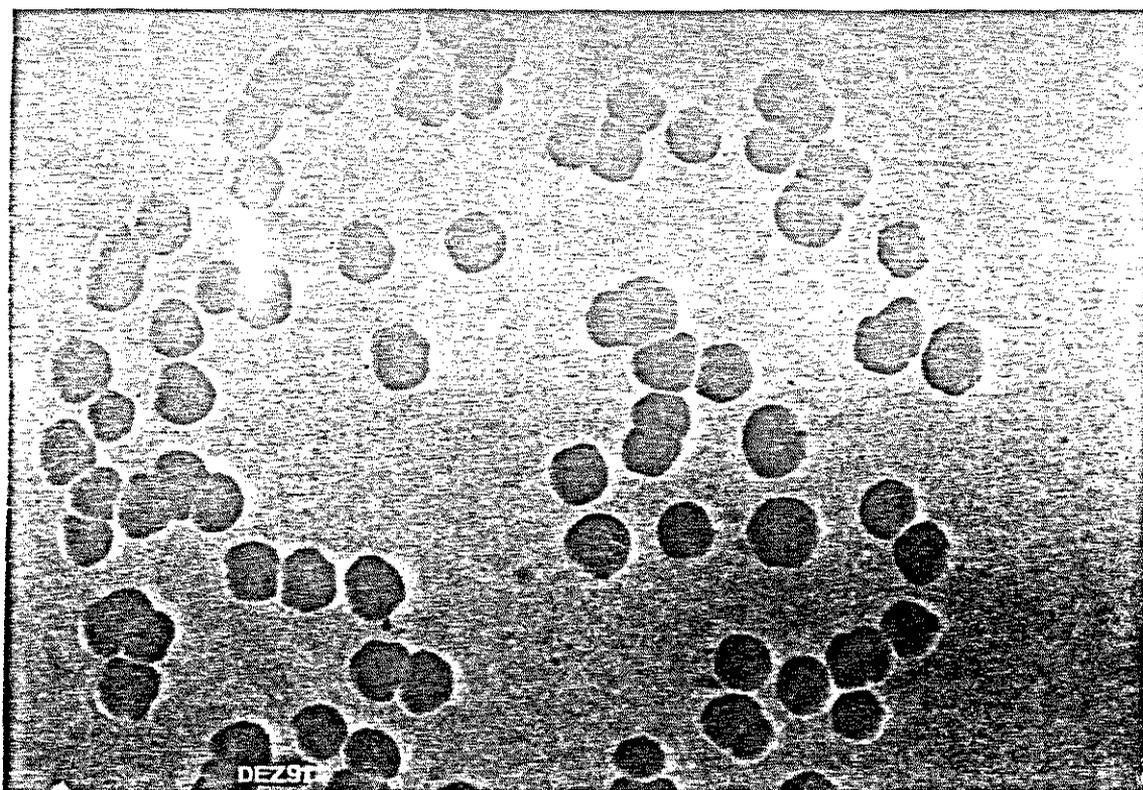


Figura F2 - Morfologia das colônias formadas com o crescimento de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724, em meio de manutenção, após 90 horas de incubação estável em estufa a 30°C. Aumento : 25 vezes.

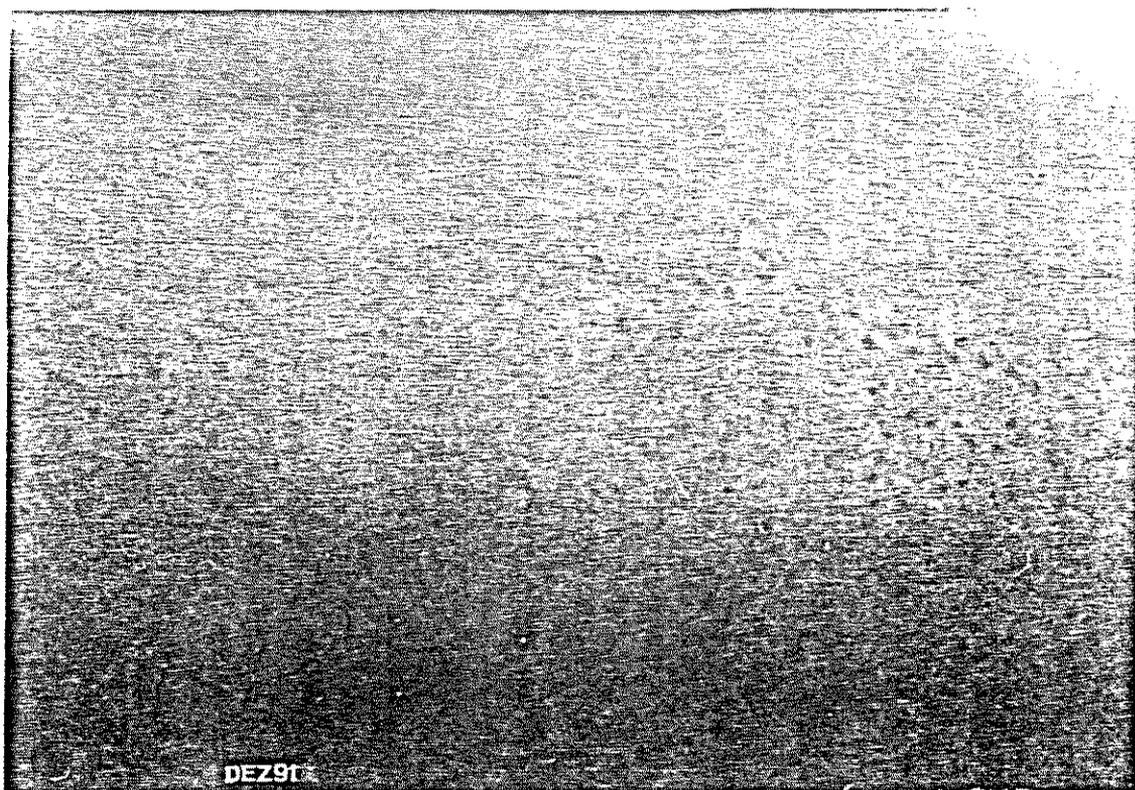


Figura F3 - Crescimento de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 na superfície de uma partícula de carragena contendo 4,25 % de polímero e gelificada em solução de KCl a 0,5 M por duas horas, após incubação em frasco agitado a 200 rpm, a 30°C, por 90 horas. Concentração do inóculo : 1×10^8 ufc/ml. Aumento : 113 vezes.

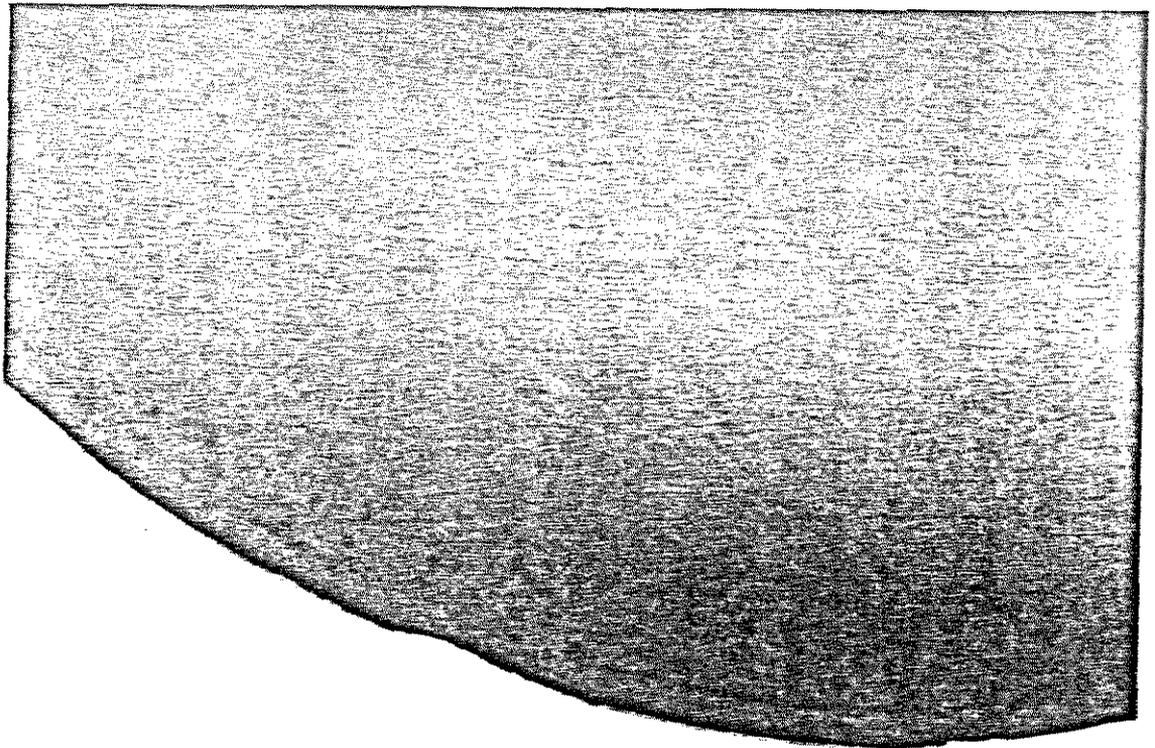


Figura F4 - Células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 immobilizadas. Corte transversal de uma partícula de gel contendo 4,24 % em carragena, gelificada em solução de KCl a 0,5 M por duas horas, e incubada por 90 horas em frasco agitado. Detalhe da presença de colônias desigualmente distribuídas entre a região periférica e o centro da partícula. Concentração do inóculo : 1×10^8 ufc/ml. Aumento : 113 vezes.



Figura F5 - Células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 immobilizadas. Destaque das colônias presentes na região periférica de uma partícula de gel de carragena a 4,25 %, gelificada em solução de KCl a 0,5 M por duas horas. Foto obtida após 90 horas de crescimento em meio de incubação contido em frasco, sob agitação de 200 rpm e a 30 °C. Aumento : 1130 vezes.