

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA  
NUM REATOR TRIFÁSICO DE LEITO FLUIDIZADO CIRCULANTE  
NA OXIDAÇÃO DO ETANOL A ÁCIDO ACÉTICO  
COM CÉLULAS IMOBILIZADAS DE ACETOBACTER S.P.

EDUARDO DAVID DABDOUB PAZ  
Engenheiro Químico

Prof. Dra. MARIA HELENA A. SANTANA  
Orientadora

*Esta versão corresponde  
a redação final da Tese  
de Mestrado defendida pelo  
Eng.º Eduardo D.D. Paz e aprovada  
pelo Conselho Julgador em  
08/07/92.*

TESE DE MESTRADO  
Campinas, SP - 1992

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Desenvolvimento de Processos Químicos

ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM REATOR TRIFÁSICO DE  
LEITO FLUIDIZADO CIRCULANTE NA OXIDAÇÃO DO ETANOL A ÁCIDO  
ACÉTICO COM CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *ACETOBACTER* SP.

Autor: Eduardo David Dabdoub Paz.

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

Aprovada por:



Prof. Dra. Maria Helena A. Santana



Prof. Dra. Iracema de Oliveira Moraes



Prof. Dra. Sylvia Yuko Eguchi

Junho 1992

Campinas - SP - Brasil

DEDICATÓRIA

A Martha, meu eterno amor, pelo  
filho que vem.

Aos meus pais, fonte inesgotá-  
vel de sabedoria.

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria Helena A Santana pela ajuda, apoio, compreensão e vontade de ensinar.

À Dra. Silvia Y. Eguchi pelo interesse e colaboração prestados na elaboração do trabalho.

À Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pela oportunidade que me deu de aumentar meus conhecimentos.

À Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" pelo treinamento e apoio na realização deste trabalho.

Ao Alfredo, à Sônia e à Ângela pela colaboração dada.

À Martha, a minha querida esposa, por toda a sua imprescindível ajuda.

Aos meus pais pelo amor e compreensão que sempre encontrei neles.

A Deus por tudo.

## ÍNDICE GERAL

ASSUNTO	PÁGINA
RESUMO	i
SUMMARY	iii
NOMENCLATURA	v
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Histórico	5
2.2 Processo com Células Livres e Inibição pelo Produto e Substrato	5
2.3 Variáveis na Preparação do Biocatalisador e Coeficiente de Difusão	7
2.4 Coeficiente Volumétrico de Transferência de Massa	10
2.5 Processo com Células Imobilizadas	13
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Equipamentos	15
3.2 Materiais	16
3.3 Microrganismo	16
3.4 Meios de Cultura	17
3.4.1 Meios Crioprotetores	17
3.4.2 Meios para a Determinação das Faixas de Tolerância ao Etanol, Ácido Acético e Cloreto de Cálcio pelo Acetobacter s.p. FTPT 2026	18
3.4.3 Meios de Manutenção, Crescimento e Fermentação	19
3.5 Procedimentos Experimentais	20
3.5.1 Purificação da Cepa	20
3.5.2 Preparação do Inóculo	20
3.5.3 Liofilização	23
3.5.4 Preparação dos Biocatalisadores	24

3.5.5	Determinação da Curva de Calibração da Absorvância em Função da Concentração Celular	25
3.5.6	Seleção dos Meios de Preservação das Cepas	27
3.5.7.	Seleção das Cepas	27
3.5.8	Seleção do Meio de Fermentação	28
3.5.9	Determinação da Densidade das Partículas e Massa Celular no Gel	28
3.5.10	Conteúdo de Gás e Fração Sólido - Líquido	29
3.5.11	Experimentos com Traçador	30
3.5.12	Determinação do Consumo de oxigênio	30
3.6	Montagem Experimental	31
3.7	Métodos Analíticos	35
3.7.1	Determinação da Concentração de Ácido Acético	35
3.7.2	Determinação da Concentração de Etanol	35
3.7.3	Determinação da Concentração Celular	36
3.7.4	Determinação do pH	36
3.7.5	Determinação do Oxigênio Dissolvido	36
3.8	Métodos de Análise dos Dados	37
3.8.1	Distribuição dos Tempos de Residência	37
3.8.2	Determinação dos Parâmetros Cinéticos	38
3.8.3	Determinação da Taxa Específica de Respiração	40
3.8.4	Determinação do Coeficiente de Difusão	41
3.8.5	Coeficiente Volumétrico de Transferência de Massa	43
3.8.6	Determinação da Produtividade de Células Imobilizadas	44
4 -	RESULTADOS E DISCUSÃO	45
4.1	Seleção da Cepa	45
4.2	Escolha do Meio de Fermentação	49
4.3	Preservação da Cepa	53
4.4	Inibição pelo produto e/ou Substrato na Taxa Específica de Respiração	59

4.5	Taxas Específicas de respiração de Células Livres em Função da Concentração de $CaCl_2$	63
4.6	Taxas Específicas de Respiração de Células Imobilizadas em Função das Variáveis de imobilização	63
4.7	Densidade das Partículas e Massa Celular no Gel	71
4.8	Coefficiente de Difusão	71
4.9	Distribuição dos Tempos de Residência no Reator	73
4.10	Corridas em Batelada	78
4.11	Localização do Eletrodo de Oxigênio Dissolvido	81
4.12	Fermentação em Contínuo com Células Livres e Imobilizadas em Dois Biocatalisadores Diferentes	83
4.12.1	Parâmetros Cinéticos Intrínsecos	83
4.12.2	Resposta do Sistema a uma Perturbação Degrau na Vazão de Alimentação	85
4.12.3	Produtividade em Função da Taxa de Diluição	87
4.12.4	Coefficiente Volumétrico de Transferência de Massa em Função da Taxa de Diluição	92
5	- CONCLUSÕES E SUGESTÕES	95
5.1	Conclusões	95
5.2	Sugestões	96
6	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

## RESUMO

Este trabalho tem como objetivo o estudo cinético e de transferência de oxigênio no processo de oxidação do etanol a ácido acético com células imobilizadas, em reator de leito fluidizado circulante.

Dentro deste contexto foram realizados experimentos com células do gênero Acetobacter, livres e imobilizadas por envolvimento em gel hidrofílico à base de alginato de sódio.

O estudo envolveu uma etapa preliminar, na qual foi feita a escolha de uma linhagem de Acetobacter, meio de fermentação e de preservação da cepa e o estabelecimento de condições favoráveis para os experimentos posteriores. O comportamento cinético do crescimento celular e consumo de oxigênio foi estudado na fermentação contínua com células livres em concentrações não inibidoras de etanol e ácido acético. Equações cinéticas do tipo de Monod e Michaelis - Menten foram propostos para as taxas específicas de crescimento e respiração celular respectivamente.

A transferência de oxigênio foi estudada na fermentação contínua com células imobilizadas, utilizando biocatalisador preparado em condições favoráveis à sua atividade. Foram usados dois níveis de densidades das partículas, e sendo as mais densas preparadas adicionando  $\alpha$  - alumina à solução de alginato de sódio.

O desempenho dos biocatalisadores no processo foi analisado através dos seguintes parâmetros: taxa específica de respiração, difusão de oxigênio, coeficiente volumétrico de transferência de massa e produtividade.

Estes parâmetros foram determinados com o sistema contínuo no estado estacionário ou no recipiente de medida do consumo de oxigênio, e comparados para os dois biocatalisadores constituídos de alginato e  $\alpha$ - alumina + alginato.

O comportamento de mistura do reator foi

caracterizado através da determinação da distribuição de tempos de residência do fluido no reator.

Concluiu-se que o processo com células imobilizadas em alginato +  $\alpha$ -alumina conduz a maiores produtividades em ácido acético, apesar das limitações difusionais impostas pelo uso de células imobilizadas. As partículas mais densas contendo alginato e  $\alpha$ -alumina exercem um efeito importante na fluidodinâmica e aumentam a transferência de oxigênio para a fase líquida; isto reflete numa maior produtividade de ácido acético, devido a que o oxigênio é o substrato limitante do processo.

## SUMMARY

The objective of this work is the study of the kinetic and oxygen transfer in the oxidation of ethanol to acetic acid by immobilized cells, in a circulating three phase fluidized bed bioreactor.

In this context experiences with Acetobacter cells, free and immobilized by entrapment in sodium alginate were done.

In the first phase of the study, a strain of Acetobacter and a fermentation medium were chosen, conservation of the strain and the determination of the conditions for the experiences were also determined. The kinetic behavior of the cell growth and the oxygen consumption were studied in the continuous fermentation with free cells using non inhibitory concentrations of ethanol and acetic acid. Kinetics equations of the Monod and Michaelis - Menten type were proposed for the specific growth and respiration rates, respectively.

The oxygen transfer was studied in the continuous fermentation with immobilized cells, using a biocatalyst prepared in good conditions for its activity. There were used two different kinds of particles, the denser ones were prepared adding  $\alpha$ - alumina to the sodium alginate solution.

The performance of the biocatalyst was analyzed in terms of specific respiration rate, oxygen diffusivity, volumetric mass transfer coefficient and productivity.

These parameters were determined with the continuous system in the steady state or in the batch assembly for the determination of the oxygen uptake rate, and were compared for the two biocatalist composed of alginate with and without  $\alpha$ - alumina.

The mixture characteristics of the reactor was found through the determination of the residence time distribution of the fluid in the reactor.

With immobilized cells we got greater productivities of acetic acid, in spite of the diffusivity limitations. The denser particles, alginate with  $\alpha$ - alumina, have an important effect in the fluidodynamic behavior, causing an increase of the oxygen transfer to the liquid phase, this is reflected by a higher acetic acid production rate, because in this process oxygen is the limiting substrate.

NOMENCLATURA

$C^*$	Concentração de saturação do oxigênio no meio líquido, (mM).
$C_i$	Concentração de oxigênio em um tempo qualquer, (mM).
$C_{AHC}$	Concentração de ácido acético, (g/l).
$C_{do}$	Concentração de oxigênio dissolvido, (mM).
$d_p$	Diâmetro de partícula, (m).
$D_{O_2}$	Coefficiente de difusão do oxigênio no meio líquido, ( $m^2 s^{-1}$ ).
$D_{eff}$	Coefficiente de difusão efetivo do oxigênio, ( $m^2 s^{-1}$ ).
$D$	Taxa de diluição, ( $s^{-1}$ ).
$F$	Vazão de alimentação, ( $m^3 s^{-1}$ ).
$g$	Constante gravitacional, ( $m s^{-2}$ ).
$h_a$	Altura líquido aerado, (m).
$h_r$	Altura líquido repouso, (m).
$K_L a$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio, ( $s^{-1}$ ).
$K_L^*$	Coefficiente de transferência de massa externo ( $m s^{-1}$ ).
$K_L$	Coefficiente de transferência de massa, ( $m s^{-1}$ ).
$K_m$	Constante de Michaelis - Mentem, (mM).
$K_s$	Constante de Monod, (mM).

OUR <sub>máx</sub>	Taxa máxima de consumo de oxigênio, (mM s <sup>-1</sup> ).
OUR <sub>máx obs</sub>	Taxa máxima de consumo de oxigênio observado, (mM s <sup>-1</sup> ).
OUR <sub>Led</sub>	Taxa máxima de consumo de Oxigênio de células imobilizadas, livres de efeitos difusivos, (mM s <sup>-1</sup> ).
P <sub>i</sub>	Taxa de produção das células imobilizadas, (Kg m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ).
PL	Taxa de produção das células livres, (Kg m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ).
P	Taxa de produção total, (Kg m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ).
Q	Área da curva concentração contra tempo, (Kg m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ).
Q <sub>O2</sub>	Taxa específica de respiração de células suspensas (mM g <sup>-1</sup> massa seca s <sup>-1</sup> ).
Q <sub>O2i</sub>	Taxa específica de respiração de células imobilizadas, (mM g <sup>-1</sup> massa seca s <sup>-1</sup> ).
Q <sub>O2 máx</sub>	Taxa específica máxima de respiração celular, (mM g <sup>-1</sup> massa seca s <sup>-1</sup> ).
Q <sub>O2L</sub>	Taxa de respiração específica das células livres, (mM g <sup>-1</sup> massa seca s <sup>-1</sup> ).
Q <sub>O2t</sub>	Taxa de respiração específica total, (mM g <sup>-1</sup> massa seca s <sup>-1</sup> ).
R	Raio da partícula (m).
Ra	Número de Rayleigh, (-).
Sh	Número de Sherwood, (-).
t	Tempo de residência, (s).
t <sub>i</sub>	Tempo qualquer, (s).

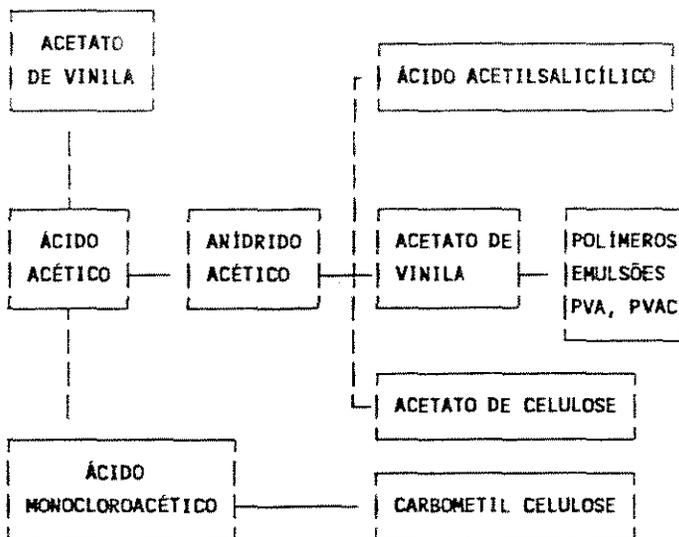
$V_R$	Volume do reator, (ml).
$V_S$	Volume do sólido, (ml).
$V_G$	Volume do gás, (ml).
$V_L$	Volume do líquido, (ml).
$X$	Concentração celular, (g/l).
$X_L$	Concentração de células livres, (g/l).
$B$	Parâmetro de saturação,
$b$	Espessura do filme, (m).
$DTR$	Função distribuição dos tempos de residência, ( $s^{-1}$ ).
$E_S$	Conteúdo de Sólido, (-).
$E_L$	Conteúdo de líquido, (-).
$E_G$	Conteúdo de gás, (-).
$N$	Fator de efetividade, (-).
$\mu_{máx}$	Taxa específica máxima de crescimento, ( $s^{-1}$ ).
$\mu_L$	Taxa específica de crescimento de células livres, ( $s^{-1}$ ).
$\underline{v}_L$	Viscosidade do meio líquido, (Cp).
$\rho$	Densidade, (Kg, $m^3$ ).
$\rho_p$	Densidade das partículas, (Kg $m^{-3}$ ).
$\rho_{H_2O}$	Densidade da água, (kg $m^{-3}$ ).
$\phi$	Módulo de Thiele, (-)

## 1.- INTRODUÇÃO

O ácido acético é atualmente de grande importância na indústria química, como intermediário na produção de derivados acéticos utilizados na fabricação de uma enorme gama de produtos, tais como vernizes, tintas, adesivos, fibras têxteis, detergentes e herbicidas.

Além disso, tem importantes aplicações na indústria alimentícia como acidulante e na conservação de alimentos.

### DERIVADOS DO ÁCIDO ACÉTICO



O ácido acético é um líquido sem cor como a água, com odor forte e irrita a pele. A 16.75 °C solidifica-se, adquirindo um aspecto igual que o gelo, por isto chama-se o de ácido acético glacial. Não aumenta de volume ao solidificar-se.

O ácido acético ferve a 118.1 °C. A sua densidade relativa a 15 °C é 1.0553.

Os processos desenvolvidos para a produção de ácido



foram implantadas para a obtenção de ácido acético glacial a partir de melaços diluídos. A perspectiva econômica destas usinas depende do preço do ácido acético no mercado mundial e dos custos operacionais do processo, que poderão tornar-se mais baixos se melhorias importantes no processo forem realizadas. Em função das constantes instabilidades do mercado mundial do petróleo, as possibilidades de que estas usinas combinadas tenham sucesso são cada vez maiores.

O ácido acético é o principal componente do vinagre (4% peso/volume), que só é obtido por via bioquímica. O processo mais eficiente e produtivo é a fermentação submersa; normalmente obtém-se rendimentos acima de 95%, as produtividades são em torno de 1.0g  $AH_C$ /l. h. para concentrações de 100 g  $AH_C$ /l. e de 1.7 g  $AH_C$ /l. h. para concentrações de 50 g  $AH_C$ /l. h. O processo Frings detém 75% do mercado mundial de vinagre. As razões principais para seu sucesso são: a bactéria acética usada, o meio de fermentação e o sistema de transferência de massa.

A imobilização de células possui algumas vantagens sobre os processos tradicionais, tais como a possibilidade de manutenção de elevadas concentrações celulares dentro dos biorreatores, obtenção de elevadas produtividades, o repetido uso do biocatalisador e a flexibilidade de permitir o funcionamento contínuo e estável dos biorreatores sem problemas de lavagem de células.

Para que a imobilização de células se torne um processo economicamente viável, terão que ser melhorados o processo de preparação dos biocatalisadores, de modo a preservar a atividade dos componentes celulares, e a transferência de massa no sistema heterogêneo.

Fatores de natureza física, química e biológica influenciam no desempenho do biocatalisador no processo fermentativo, como consequência da preparação. Quando se imobilizam células, sobretudo células viáveis, a transferência de nutrientes e produtos para e dos biocatalisadores poderá tornar-se o processo limitante da reação. No caso de uma fermentação aeróbia, o problema é ainda mais crítico, devido à baixa solubilidade do oxigênio nos meios líquidos.

A taxa de transferência de oxigênio depende de: etapas envolvidas no processo, mecanismo limitante do

transporte, conteúdo de gás, conteúdo de sólidos, velocidade superficial do gás, tamanho das partículas, fluidodinâmica do reator, e as características de mistura entre as fases gasosa e líquida.

A demanda total ou taxa de consumo de oxigênio depende de: taxa específica de consumo de oxigênio, estado fisiológico das células, concentração celular, volume de partículas e volume do reator,

Neste trabalho, que consiste na obtenção do ácido acético por via bioquímica com células imobilizadas, analisamos a cinética da reação representada pela taxa específica de consumo de oxigênio junto à transferência de massa caracterizados pelo coeficiente volumétrico de transferência de massa  $K_L a$ . Também foram analisados os fatores de preparação do biocatalisador que influenciam na sua atividade, assim como os efeitos de inibição do etanol e ácido acético na taxa específica de respiração.

Um conjunto de experimentos iniciais em descontínuo permitiu a seleção da linhagem de *Acetobacter s.p.* e do meio de preservação da cepa e de fermentação usados neste trabalho.

O estudo envolveu experimentos em operação contínua e descontínua, com células livres e imobilizadas.

A fermentação contínua foi conduzida em biorreator, constituído de colunas de bolhas com células livres e um de leito fluidizado circulante com células imobilizadas. As partículas de biocatalisador foram preparadas por envolvimento das células em gel à base de alginato de sódio. A adição de  $\alpha$ - alumina à solução aquosa de alginato de sódio na imobilização das células, permitiu a preparação de partículas mais densas que aquelas obtidas somente com alginato e a verificação da influência da densidade na transferência de oxigênio.

## 2. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - HISTÓRICO

Em 1648 Glauber mostrou que podia obter-se o ácido acético pelo aquecimento da madeira na ausência de ar. No ano de 1702 E. Stahl descreveu a descomposição dos acetatos com ácido sulfúrico concentrado com o que pôde obter-se ácido acético concentrado. Lavoisier em 1790 comprovou definitivamente a necessidade do oxigênio na fermentação acética.

Pasteur entre 1864 e 1868 demonstrou a necessidade da presença de um ser vivo para a consecução da transformação do álcool em vinagre.

A composição do ácido acético foi estabelecida em 1814 por Berzelius.

O ácido acético concentrado não teve importância até que N. Grünstein e F. Hoechst conseguiram em 1911 - 1913 obter o ácido acético partindo do acetileno através do acetaldeído que era oxidado. Este método de fabricação se empregava já no ano de 1917.(2)

### 2.2. PROCESSO COM CÉLULAS LIVRES E INIBIÇÃO PELO PRODUTO E SUBSTRATO

O primeiro equipamento comercial para a fermentação acética pelo processo submerso, foi descrito por Hromatka; a patente básica (3) enfatiza a necessidade de aeração ininterrupta do caldo de fermentação com bolhas muito pequenas, como uma condição necessária para a produção de altas concentrações de ácido acético.

Hromatka e Exner (4) fizeram experiências extensivas sobre o dano causado ao Acetobacter devido à interrupção da aeração como função de algumas variáveis. O dano aumenta acentuadamente com o aumento das concentrações totais (concentração etanol em % Vol / Vol + concentração do ácido acético em % Peso / volume) para iguais períodos de interrupção.

Experiências com  $^{14}\text{C}$  - etanol e Acetobacter Rancens mostraram que o consumo de oxigênio correspondia ao valor teórico da oxidação do etanol (5). Esta relação estequiométrica entre a oxidação do etanol, o consumo de oxigênio e a formação de ácido acético, foi confirmada também por Ghommidh (6).

Vera e Wang (7) encontraram que a formação de ácido acético segue a cinética de crescimento até uma concentração de ácido de 30 g/l, enquanto que um modelo cinético misto é necessário para concentrações entre 40 a 70 g/l, nas quais a formação de ácido acético depende da taxa de crescimento e da concentração celular.

A taxa específica de crescimento do A. Aceti aumenta acentuadamente com a taxa de aeração para uma concentração de ácido acético de 2 % (8). Para uma concentração maior de ácido acético de 5 %, a dependência da taxa de crescimento na aeração torna-se muito pequena.

Mori e Terui (9) trabalharam com fermentação contínua com A. Rancens. A taxa específica de crescimento mostrou-se fortemente dependente das concentrações de ácido acético e etanol. Esta aumentou de 0.05 h<sup>-1</sup> para 60 g/l de ácido acético a 0.4 h<sup>-1</sup> para uma concentração de 25 g/l de ácido acético.

Hromatka e Ebner (10) encontraram formações específicas de produto de 21 g AHc / g (peso seco) h. a 10% de concentração total, contra 15 gAHc / g (peso seco) h encontrada por Mori e Terui (9) a 7 % de concentração total. A atividade respiratória do microorganismo usado por Hromatka e Ebner é em torno de 7750 ml O<sub>2</sub> / g.h. e independente da concentração de ácido acético até 72 g/l. A linhagem usada por Mori e Terui (9) apresentou uma atividade respiratória de 3160 ml O<sub>2</sub> / g. h. e uma forte dependência da concentração de ácido acético.

Mori e colaboradores (11) encontraram que a taxa específica de crescimento era função da concentração inicial de ácido acético para A. Rancens. No entanto, inoculações sucessivas desta bactéria na fase exponencial de crescimento permitiram a adaptação e o desaparecimento desta dependência.

De acordo com Hromatka e Ebner (12) concentrações de etanol acima de 6 % volume/ volume reduzem a taxa específica de crescimento.

Namba e colaboradores (13) mostraram que concentrações menores que 10 g/l de ácido acético aceleram a taxa específica de crescimento, especialmente para baixas concentrações de etanol. Acima de uma concentração de ácido de 20 g/l, o crescimento é severamente inibido; e praticamente nenhum crescimento foi observado com 40 a 50 g/l independentemente da concentração de etanol entre 5 a 75 g/l.

Hijikata e Terui (14) observaram que o extrato de leveduras facilitava a produção de ácido acético por células de Acetobacter.

Y.S. Park e colaboradores (15) estudaram o efeito do oxigênio dissolvido e a concentração de ácido acético na produção de ácido acético por Acetobacter Aceti num quimioestato. A concentração ótima do oxigênio dissolvido foi de 3 - 7 ppm para o consumo do oxigênio na oxidação do etanol e 2 - 15 ppm para as atividades das enzimas álcool desidrogenase e acetaldeído desidrogenase. Isto sugere que as etapas chaves sensíveis ao oxigênio dissolvido não são as reações de oxidação enzimática, mas o mecanismo de transferência de elétrons na oxidação do etanol. A concentração ótima do oxigênio para uma produção de ácido acético acima de 45 g/l numa cultura contínua, foi de 1-3 ppm. As taxas específicas de crescimento e de produção de ácido acético foram inibidas acentuadamente para concentrações de ácido acima de 45 g/l.

### 2.3.- VARIÁVEIS NA PREPARAÇÃO DO BIOCATALISADOR E COEFICIENTE DE DIFUSÃO

Cheetham e colaboradores (16) trabalharam com colunas recheadas de partículas de alginato de cálcio e observaram que eram muito resistentes à compressão durante a passagem de soluções concentradas de sacarose para elevadas vazões, porém, se as partículas tivessem sido preparadas usando baixas concentrações de alginato ou de cloreto de cálcio acontecia a compressão e conseqüentemente a redução da vazão de saída da coluna e aumento da pressão.

Scott e colaboradores (17) estudaram as taxas de consumo de oxigênio de células de Streptomyces Clavuligerus livres e imobilizados em k - carragena. Foi observado ~~que o consumo de oxigênio pelas células imobilizadas era~~ somente 50% do consumo com células livres. As variáveis que contribuem para esta redução no consumo de oxigênio incluem a presença de k - carragena, limitações internas à difusão do oxigênio, a temperatura de preparação das partículas com células imobilizadas e a presença de íons. Exposição prolongada das células imobilizadas em K Cl resultou numa diminuição da taxa específica de respiração.

An - Luc Nguyen e Luong (18), usando um recipiente com boa agitação e temperatura controlada, determinaram as características difusionais de vários solutos em partículas esféricas de k - carragena. O coeficiente de difusão da glicose é afetado pela concentração de glicose e pela temperatura. Em todos os casos, a difusividade obtida foi notavelmente menor que aquela da glicose em água pura. Os dados experimentais indicam uma relação inversa entre a difusividade e a concentração do polímero usado na imobilização. Eletrólitos como K Cl e Ca Cl<sub>2</sub> aumentam o coeficiente de difusão.

Hideo Tanaka e colaboradores (19) mediram as características difusionais de alguns substratos nas partículas de alginato de Cálcio em soluções agitadas. Os valores do coeficiente de difusão para substratos com peso molecular menor que  $2 \times 10^4$  são muito próximos daqueles na água pura. A difusão destes substratos, nas partículas, não foi afetada pelas concentrações do polímero e do CaCl<sub>2</sub> usados na imobilização.

J.M. Hannoun e G. Stephanopoulos (20) determinaram as difusividades da glicose e do etanol para membranas de alginato de cálcio com e sem células. As difusividades diminuem com o aumento da concentração do polímero e são comparáveis com aquelas obtidas em água para uma membrana com 2% de alginato. As concentrações de glicose e etanol não tem nenhum efeito nos respectivos coeficientes de difusão. A presença de 20% de células mortas não tem efeito nas difusividades.

Tem sido observado por vários pesquisadores que a taxa específica de respiração de pellets de fungos diminui com o aumento das suas dimensões (21).

R. Renneberg e colaboradores (22) observaram que géis com maior conteúdo de água apresentavam maiores coeficientes de difusão do oxigênio.

Yan Sun e colaboradores (23) verificaram que o coeficiente de difusão efetivo do oxigênio em partículas de alginato de cálcio, diminui com o aumento da concentração de células imobilizadas. Eles encontraram que o coeficiente de difusão efetivo do oxigênio em partículas de alginato variava entre 55 a 86 % daquele obtido em água pura. Adlercreutz (24), Hiemstra e colaboradores (25) encontraram que a difusividade do oxigênio em alginato de Bário e Cálcio era 77 e 25 % daquela obtida em água pura, respectivamente.

Adlercreutz (24) tem mostrado a dependência do fator de efetividade das partículas de alginato de cálcio em função da densidade celular e tamanho das partículas. O fator de efetividade aumenta ao diminuirmos o diâmetro das partículas e a quantidade de biomassa celular.

C.S. Ho e Lu-Kwang Ju (26) encontraram que o coeficiente de difusão e solubilidade do oxigênio diminuem com o aumento da concentração celular nos meios de fermentação.

Vários pesquisadores observaram uma diminuição no coeficiente de difusão do oxigênio com o aumento da concentração celular (27 - 31).

Estudos de simulação (32) têm mostrado que, para minimizar a resistência à difusão do oxigênio, as células devem ser imobilizadas em partículas menores que 0.2 mm de diâmetro.

#### 2.4. COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA E MEDIDA DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO.

K. Koide e colaboradores (33) estudaram o conteúdo de gás  $E$  e o coeficiente volumétrico de transferência de massa  $K_L a$  num reator de bolhas tipo Air - lift com paredes concêntricas e com dispersão do gás pelo anulo e pelo eixo central. Eles mostraram que  $E$  e  $K_L a$  aumentaram com o aumento da velocidade do gás e com a capacidade do líquido de formar espuma, enquanto as dimensões da coluna têm efeito muito pequeno sobre ambos. Foi observado também que para a mesma velocidade do gás, o  $K_L a$  é menor para a coluna de bolhas, do que para a coluna com dispersão. Neste último tipo de coluna, o  $K_L a$  é maior quando a dispersão do gás é feita no anulo ao invés de no centro do tubo.

V. R. Dhanuka e J.B. Stepanek (34) determinaram o coeficiente volumétrico de transferência de massa  $K_L a$  e a área interfacial  $a$ , num reator trifásico de leito fluidizado. Eles observaram que o tamanho das partículas tem um efeito acentuado na área interfacial e portanto no  $K_L a$ , enquanto que o  $K_L$  variou muito pouco nos leitos de diferentes diâmetros de partículas. O  $K_L a$  e  $a$  aumentaram com a velocidade superficial do gás para os três diferentes diâmetros de partículas. Não houve efeito da velocidade do líquido no  $K_L a$  nem em  $a$  para as partículas maiores, enquanto que para as menores, estes parâmetros aumentaram com a velocidade do líquido. Os resultados indicam que uma elevada melhoria na taxa de transferência do oxigênio pode ser atingida usando-se partículas relativamente grandes embora exista uma redução na taxa de reação superficial devido à redução da área superficial da partícula.

K. Akita e F. Yoshida (35) estudaram os efeitos das propriedades físicas do líquido no conteúdo de gás e no coeficiente volumétrico de transferência de massa  $K_L a$ . O conteúdo de gás varia com a densidade e viscosidade do líquido, tensão superficial e a velocidade do gás; junto a estas variáveis foi determinado que a difusividade na fase líquida e o diâmetro da coluna afetam o  $K_L a$ . Estes mesmos autores (36), com dados experimentais da distribuição de tamanho das bolhas e conteúdo de gás, calcularam a área específica interfacial gás - líquido numa coluna de bolhas; o coeficiente de transferência de massa  $K_L$  foi

calculado a partir dos dados de  $a$  e de  $K_L$  a para a absorção do oxigênio em vários líquidos com propriedades físicas diferentes.

P.H. Calderbank e M.B. Moo-Young (37) concluíram que quando uma fase dispersa está em suspensão ou em ascensão ou queda livre sob a influência da gravidade, os coeficientes de transferência de massa e calor são quase completamente independentes da energia mecânica dissipada no sistema. Para as dispersões gás-líquido, a dissipação de energia mecânica aumenta a área interfacial gás-líquido e a transferência de massa, embora pouco efeito no coeficiente  $K_L$  possa ser conseguido. A correlação abaixo determinada pelos autores,

$$Sh = \frac{K_L \, dp}{D_{O_2}} = 2.0 + 0.31 \, Ra^{1/3} \quad (1)$$

$$\frac{K_L \, dp}{D_{O_2}} = 2.0 + 0.31 \left[ \frac{dp^3 \, \Delta \rho \, g}{v_L \, D_{O_2}} \right] \quad (2)$$

mostra a importante influência da diferença de densidade entre as fases dispersa suspensa e a fase contínua no coeficiente de transferência de massa, o que significa que quando esta diferença de densidades é pequena as taxas de transferência são muito baixas.

H. Taguchi e A. Humphrey (38) propuseram o método dinâmico para a medida do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio  $K_L a$ , que consiste no acompanhamento da concentração de oxigênio dissolvido durante uma breve interrupção na aeração do sistema. Estes mesmos autores observaram que para fermentações contínuas com células livres, o  $K_L a$  aumentava a com a taxa de diluição.

Y. Kang e colaboradores (39) aumentaram as taxas de transferência de oxigênio das bolhas de ar até meios líquidos viscosos pelo uso de quebradores de bolhas flutuantes. Os resultados mostram que o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio pode ser aumentado entre 20 -

25 %. Este coeficiente apresenta um valor máximo com relação à razão de volume entre os quebradores de bolhas flutuantes e as partículas sólidas fluidizadas. Este coeficiente aumenta com as vazões de líquido e gás e tamanho das partículas fluidizadas, enquanto que diminui com o aumento da viscosidade do líquido.

Y. Bando e colaboradores (40) estudaram as características do escoamento num leito fluidizado trifásico com tubo concêntrico usando ar, solução aquosa de sulfato de sódio e partículas de nylon (2.5 mm de diâmetro). O conteúdo de gás diminui com o aumento da concentração do sólido. Quando a razão entre o diâmetro do tubo concêntrico e o diâmetro externo da coluna foi 0.6, a taxa máxima de escoamento de líquido foi obtida. Quando esta razão foi fixada, o conteúdo de gás diminuiu com o aumento da concentração do sólido e com a diminuição do diâmetro da coluna. As taxas de circulação de sólido e do gás dependem da taxa de aeração do líquido. A área específica interfacial gás - líquido foi maior na seção anular que na seção interior. Foi observado que na seção interior, as bolhas grandes são quebradas pelas partículas sólidas em bolhas pequenas.

Y. Sun e colaboradores (41) estudaram o comportamento do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio num biorreator trifásico de leito fluidizado usando partículas de alginato de cálcio como a fase sólida. Para partículas de baixa densidade, observou-se que o coeficiente  $K_L a$ , no leito fluidizado trifásico, foi menor que aquele em colunas de bolhas, independentemente do diâmetro das partículas. O valor do  $K_L a$  diminuiu com partículas menores e com o aumento da concentração de sólidos na suspensão líquida. Tudo isto indica que existe um diâmetro e concentração de partículas ótimo para o uso em biorreatores.

Y. Sun e S. Furusaki (42) determinaram que as partículas de alginato de cálcio não têm efeito na quebra de bolhas, e a diminuição no  $K_L a$  com o do diâmetro da partícula foi causada pela redução do  $K_L$ . A concentração de partículas aumentou o diâmetro médio das bolhas não afetou o  $K_L$ . Assim, a diminuição no  $K_L a$  com o aumento da concentração de partículas foi atribuída à correspondente redução na área interfacial.

J. Votruba e colaboradores (43) observaram que a

frequência de contato do eletrodo de oxigênio dissolvido com bolhas é influenciado pela posição do eletrodo no recipiente em relação à corrente gasosa. As leituras de oxigênio dissolvido não são influenciadas quando a dispersão de ar não atinge diretamente a membrana e a superfície do cátodo é protegida pelo corpo do eletrodo. Este efeito é especialmente importante em reatores do tipo coluna.

## 2.5.- PROCESSO COM CÉLULAS IMOBILIZADAS

Osuga e colaboradores (44) trabalharam com células de Acetobacter Aceti immobilizadas em k-carragena e determinaram que o oxigênio era o fator limitante do aumento do número de células e da produtividade. Eles mostraram que, para tempos de residência de 2.0 a 4.5 horas, a taxa de produção do ácido acético permanecia constante. Por outro lado, o reator tinha uma elevada produção no estado estacionário pela colaboração entre as células livres liberadas do gel e aquelas contidas na partícula.

Okuhara (45) trabalhou com Acetobacter immobilizado em fibras de polipropileno. A fermentação foi feita num sistema fechado pela recirculação do meio e do ar, entre o reator e um tanque de armazenamento, até que todo o substrato fosse convertido em ácido acético. A produtividade (g ácido / l(fermentador). h) foi muito alto e chegou a ser aproximadamente 25 vezes maior do que na cultura submersa.

Kennedy e colaboradores (46) converteram soluções diluídas de etanol em ácido acético com Acetobacter immobilizado num óxido de Titânio IV.

C. Ghommidh e colaboradores (6) immobilizaram células de Acetobacter por adsorção sobre suportes cerâmicos de elevada área interfacial num reator de vazão pulsante. A elevada capacidade de transferência de oxigênio do reator permitiu taxas de produção de até 10.4 g/l.h; Usando um modelo matemático que incorpora os coeficientes de transferência de massa interno e externo, foi mostrado que a transferência de oxigênio no filme microbiano controlava a produtividade do reator. Estes mesmos autores (47) observaram oscilações na concentração de ácido, após mudanças em degrau na taxa de diluição.

Y. S. Park e colaboradores (48) observaram que a taxa de produção de ácido acético era altamente favorecida por uma cultura de elevada concentração celular. As células eram recirculadas através de um módulo de filtros ociosos de fibras, e uma elevada taxa de produção de 120 g/l.h (com concentrações de ácido de 40 g/l), numa taxa de diluição de 4 h<sup>-1</sup>, foi encontrada. A elevada concentração de células viáveis foi mantida através do uso de um meio rico em extrato de leveduras e controlando a concentração de oxigênio dissolvido num nível ótimo.

Y. Sun e S. Furusaki (49), operando em contínuo com um reator trifásico de leito fluidizado com células imobilizadas em alginato de cálcio, mostraram, que as células livres e imobilizadas contribuem para a formação de ácido acético. Ao contrário do que acontece na fermentação com células livres, onde a produtividade diminui para taxas de diluição acima de 0.25 h<sup>-1</sup>, a produtividade foi pouco afetada pela taxa de diluição com células imobilizadas. Cálculos teóricos mostraram que existe um conteúdo ótimo e tamanho do gel para elevadas taxas de diluição, devido à dependência do coeficiente volumétrico de transferência de massa  $K_L a$  com o conteúdo de sólidos e o diâmetro das partículas.

### 3. - MATERIAIS E MÉTODOS

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

#### 3.1. - EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados foram:

- Eletrodo polarográfico de oxigênio dissolvido e um conjunto (indicador, registrador e recipientes) para a medida da taxa de respiração.
- Banho termostático, para controlar a temperatura a  $30^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ .
- Banho termostático, para o controle da temperatura a  $5^{\circ}\text{C}$ .
- Espectrofotômetro
- Compressor de Ar, sem lubrificação a óleo.
- Bomba peristáltica, com duplo cabeçote de alimentação.
- Cromatógrafo de ionização de chama.
- Dois reatores de vidro, encamisados, com fundo cônico (desenhados no laboratório).
- Agitador de frascos.
- Estufa Bacteriológica.
- Autoclave.
- Bomba de vácuo.
- Filtros millipore.
- Condensadores e Umidificadores de vidro.
- Manômetros de coluna líquida.

- Balanças analítica e semi-analítica
- Seringa com agulha hipodérmica, agitadores magnéticos, vidraria de laboratório e estufa para secagem do material esterilizado.

### 3.2. - MATERIAIS

Os materiais usados foram todos de grau analítico, e destinados à preparação de meios de cultura e imobilização das células. Estes materiais encontram-se listados abaixo, com os seus respectivos fabricantes.

- |   |  |
|---|--|
| - Glicose anidra                                  | , Ecibra                                     |
| - Peptona bacteriológica                          | , Difco                                      |
| - Extrato de leveduras                            | , Difco                                      |
| - Etanol 95 % e 99.9 %                            | , Ecibra                                     |
| - Ácido acético                                   | , Ecibra                                     |
| - Ca Cl <sub>2</sub>                              | , Ecibra                                     |
| - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | , Ecibra                                     |
| - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | , Ecibra                                     |
| - Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O            | , Ecibra                                     |
| - Na OH   | , Ecibra                                     |
| - Ágar  | , Difco                                      |
| - Alginato de Sódio                               | , Wako Pure<br>, Chemicals Co.               |
| - α - alumina                                     | , Cetebra (Cerâmica<br>, Técnica Brasileira) |
| - (Água destilada).                               |  |

### 3.3 - MICROORGANISMO

Foram utilizadas quatro cepas mistas isoladas pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", FTPTAT, classificadas como FTPT 2023, 2024, 2025, e 2026 e duas cepas de coleções internacionais (ATCC 2374 e IP 5866) fornecidas pela coleção de culturas FTPTAT com códigos FTPT 1724 e FTPT 190.

### 3.4 - MEIOS DE CULTURA

Meios de cultura de composições variadas, foram testados nas várias etapas, desde a purificação até o cultivo das cepas.

Para a preservação das cepas foram testados os meios crioprotetores designados por A, B, C, e D, sugeridos pela FTPTAT.

Com o meio de indicação de ácido, foi verificada a capacidade das cepas mistas para produzirem ácido. O crescimento das cepas foi feito em placas de Petri e o aparecimento de um halo ao redor da colônia indica a formação de ácido.

Os meios Pre e Y-G indicados na literatura (44) e (6) e o meio tese foram usados para a comparação do cultivo das cepas FTPT 1724 e FTPT 2026 purificada.

Os meios 1 a 7 foram baseados no trabalho de Y. Sun e S. Furusaki (49), e as variações introduzidas objetivaram a verificação da tolerância da linhagem FTPT 2026 ao etanol, ácido acético e cloreto de cálcio, para a seleção dos níveis de concentração destes componentes no meio de fermentação.

O meio, sugerido no trabalho de Y. Sun e S. Furusaki, foi modificado aumentando a concentração de etanol e cloreto de cálcio, sendo usado em todos os experimentos no biorreator.

#### 3.4.1 - MEIOS CRIOPROTETORES

A -	Água destilada	
B -	Skim Milk	10%
	- Inositol	10%
C -	Sacarose	14%
	- Peptona	14%
D -	Skim Milk	10%
	- Sacarose	14%

3.4.2 - MEIOS PARA A DETERMINAÇÃO DAS FAIXAS DE TOLERÂNCIA AO ETANOL ÁCIDO ACÉTICO E CLORETO DE CÁLCIO PELO ACETOBACTER s.p. FTPT 2026

- |     |        |                                      |
|-----|--------|--------------------------------------|
| 1.- | 10.0g  | glicose                              |
|     | 10.0g  | extrato de leveduras                 |
|     | 10.0g  | peptona bacteriológica               |
|     | 40.0ml | etanol 99.9 %                        |
|     | 10.0ml | ácido acético                        |
|     | 1.0lt  | água destilada                       |
| 2.- | 10.0g  | glicose                              |
|     | 10.0g  | extrato de leveduras                 |
|     | 10.0g  | peptona bacteriológica               |
|     | 40.0ml | etanol 99.9 %                        |
|     | 5.0ml  | ácido acético                        |
|     | 1.0g   | Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O |
|     | 1.0lt  | água destilada                       |
| 3.- | 10.0g  | glicose                              |
|     | 10.0g  | extrato de leveduras                 |
|     | 10.0g  | peptona bacteriológica               |
|     | 40.0ml | etanol 99.9 %                        |
|     | 10.0ml | ácido acético                        |
|     | 1.0g   | Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O |
|     | 1.0lt  | água destilada                       |
| 4.- | 10.0g  | glicose                              |
|     | 10.0g  | extrato de leveduras                 |
|     | 10.0g  | peptona bacteriológica               |
|     | 40.0ml | etanol 99.9 %                        |
|     | 5.0ml  | ácido acético                        |
|     | 1.0lt  | água destilada                       |
| 5.- | 10.0g  | glicose                              |
|     | 10.0g  | extrato de leveduras                 |
|     | 10.0g  | peptona bacteriológica               |
|     | 60.0ml | etanol 99.9 %                        |
|     | 5.0ml  | ácido acético                        |
|     | 1.0lt  | água destilada                       |
| 6.- | 10.0g  | glicose                              |
|     | 10.0g  | extrato de leveduras                 |
|     | 10.0g  | peptona bacteriológica               |
|     | 60.0ml | etanol 99.9 %                        |

10.0ml ácido acético  
 1.0lt água destilada

7.- 10.0g glicose  
 10.0g extrato de leveduras  
 10.0g peptona bacteriológica  
 80.0ml etanol 99.9 %  
 10.0ml ácido acético  
 1.0lt água destilada

3.4.3.- MEIOS DE MANUTENÇÃO, CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO

A'- Meio de Manutenção

5.0g extrato de levedura  
 3.0g peptona bacteriológica  
 25.0g glicose  
 1.0lt água destilada

B'- Meio de Manutenção ágar (MMA)

10.0 glicose  
 10.0g extrato de leveduras  
 10.0g peptona bacteriológica  
 50.0ml etanol 95%  
 10.0ml ácido acético  
 20.0g ágar  
 1.0lt água destilada

C'- Meio de indicação de ácido

10.0g extrato de levedura  
 4.0g peptona bacteriológica  
 60.0g glicose  
 10.0g Ca CO<sub>3</sub> precipitado  
 20.0g ágar  
 50.0ml etanol 95%  
 1.0lt água destilada

D'- Meio Pre

10.0g glicose  
 10.0g extrato de leveduras  
 10.0g peptona bacteriológica

20.0ml	etanol 95%
10.0ml	ácido acético
1.0lt	água destilada

#### E' - - Meio Y-G

5.0g	extrato de leveduras
20.0g	glicose
0.26g	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
0.27g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0.05g	$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
10.0ml	ácido acético
50.0ml	etanol 95%
1.0lt	água destilada

#### F' - Meio de Crescimento, fermentação ou tese

10.0g	glicose
10.0g	extrato de leveduras
10.0g	peptona bacteriológica
50.0ml	etanol 95%
5.0ml	ácido acético
1.0g	$\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.0lt	água destilada

### 3.5 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.5.1 - PURIFICAÇÃO DA CEPA

A cepa mista FTPT 2026 foi purificada pelo método de estrias de esgotamento. Um esquema das etapas desta técnica é apresentada na Figura 1.

#### 3.5.2 - PREPARAÇÃO DO INÓCULO

A preparação do inóculo foi feita mediante modificações introduzidas no procedimento utilizado por Moraes (50), e envolveu as seguintes etapas:

1.- Parte-se de ampola liofilizada na FTPTAT, reativa-

se a cultura com 0.1 a 0.2ml de água destilada estéril por 15 minutos.

- 2.- Passa-se esta suspensão para um tubo de ensaio contendo 7.0ml de meio de manutenção.
- 3.- Coloca-se no agitador de frascos a 30 °C e 180 rpm, por 24 horas.
- 4.- Passa-se 0.4ml da suspensão celular para cada uma das dez placas de Petri que contém meio de manutenção ágar.
- 5.- Incubar em estufa a 30 °C por 36 horas.
- 6.- Raspar as placas e fazer uma suspensão celular em 100.0ml em meio de crescimento.
- 7.- Colocar os 100.0ml de suspensão celular no agitador de frascos, por 24 horas, a 30 °C e 180 rpm.
- 8.- O inóculo, com uma concentração de  $10^7$  -  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/ml, está pronto para a imobilização ou para a inoculação do reator.

Na figura 2, são apresentadas esquematicamente as várias etapas deste procedimento.

## ISOLAMENTO

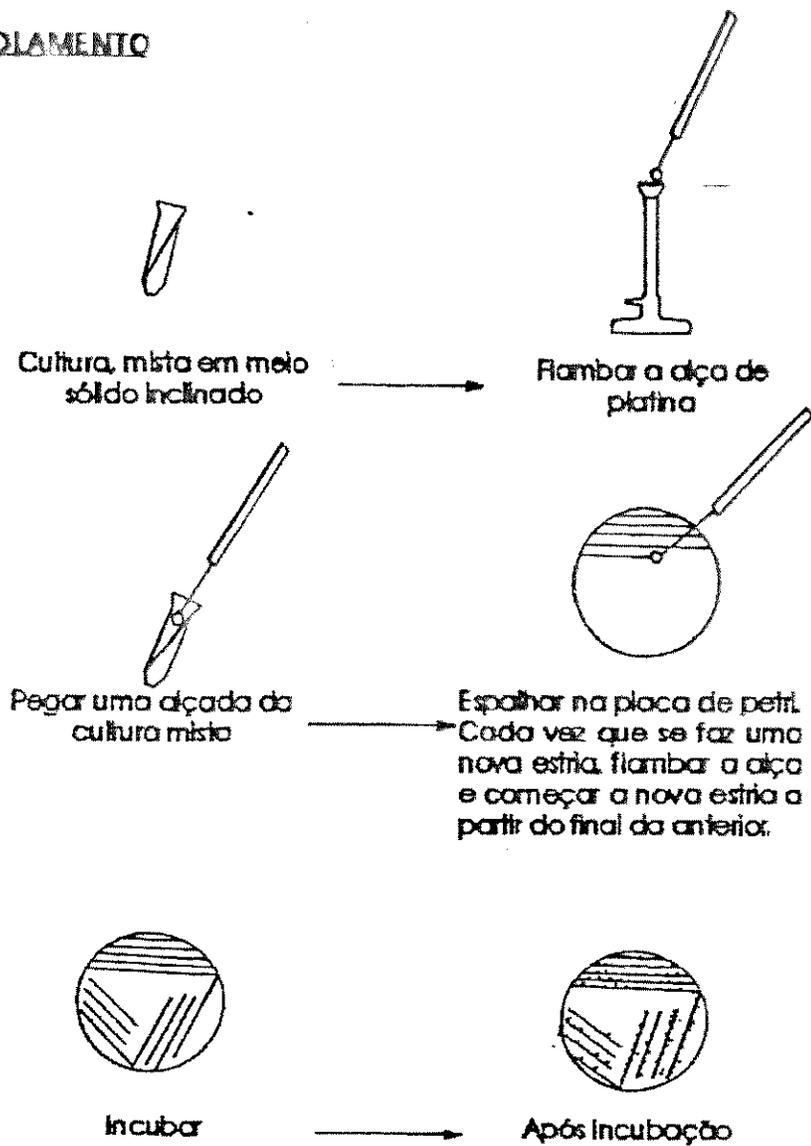


Figura 1. Esquema do método de estrias de esgotamento para a purificação da cepa.

## PREPARAÇÃO DO INÓCULO

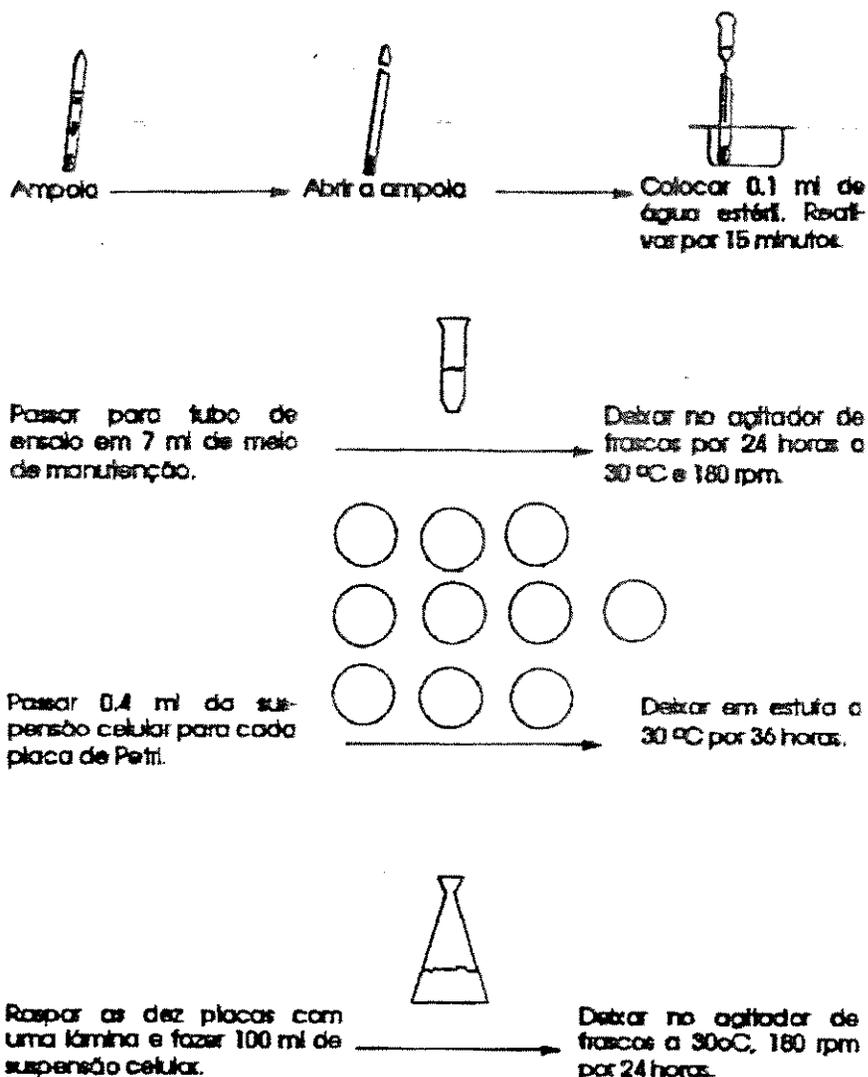


Figura 2. Sistemática de preparação do inóculo

### 3.5.3 LIOFILIZAÇÃO

As cepas utilizadas usadas neste trabalho, foram liofilizadas nos meios crioprotetores, de acordo com o procedimento esquematizado na Figura 3.

## LIQFILIZAÇÃO

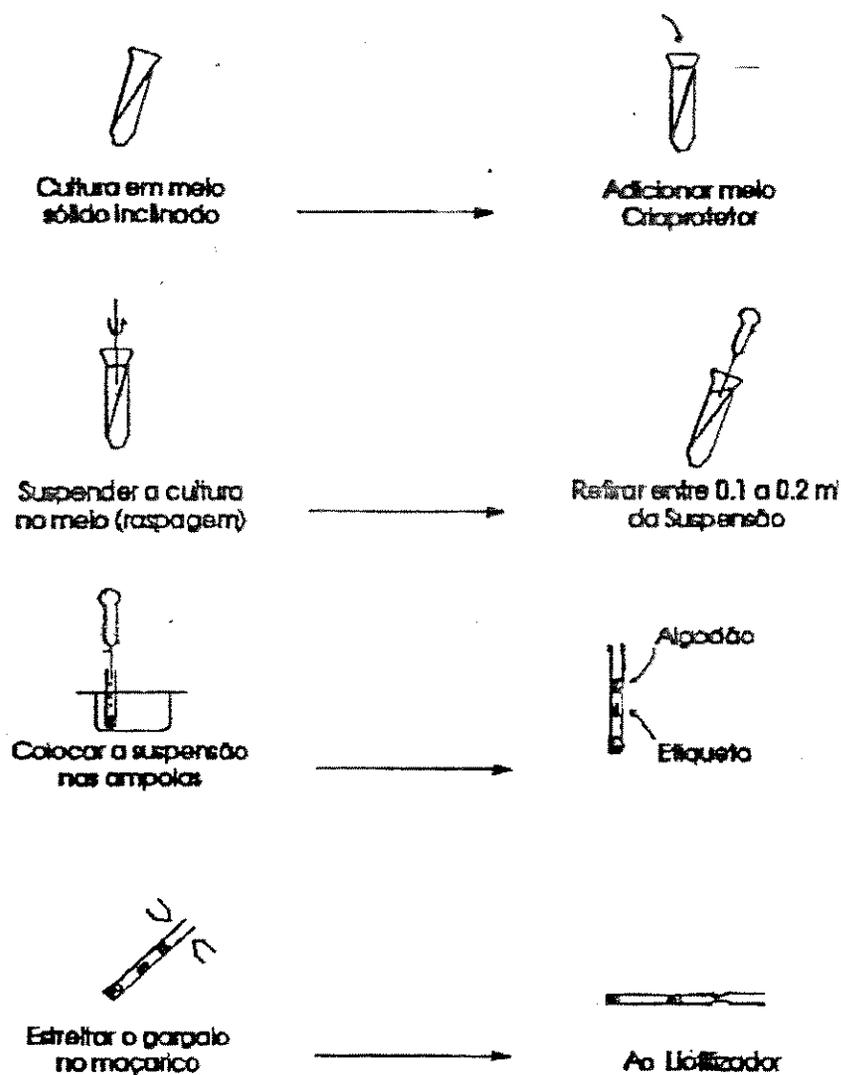


Figura 3. Etapas da técnica de liofilização das cepas.

### 3.5.4 PREPARAÇÃO DOS BIOCATALISADORES

Os biocatalisadores foram preparados immobilizando as células microbianas por envolvimento em gel hidrofílico à base de alginato de sódio.

Em algumas amostras, adicionou-se  $\alpha$ - alumina à solução de gel, com o objetivo de obter-se partículas mais densas

A preparação foi feita de acordo com as seguintes etapas:

- 1.- Preparar solução de alginato ou alginato +  $\alpha$  - alumina, colocando 4% (peso/volume) de alginato em água destilada ou 2% alginato + 2%  $\alpha$ - alumina até que o alginato tenha dissolvido, deixar, repousar e autoclavar por 15 min. a 120 °C.
- 2.- Preparar solução 0.2M de Ca Cl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O.
- 3.- Misturar uma parte da solução de alginato 4 % ou alginato 2%  $\alpha$ - alumina 2% com uma parte de suspensão celular.
- 4.- Extrudar a mistura com a seringa, através de agulha hipodérmica, e gotejar na solução de Ca Cl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.2M.
- 5.- Deixar na solução gelificante por aproximadamente 20 min. (se o biocatalisador for usado no reator).
- 6.- Filtrar e lavar as partículas com água estéril.
- 7.- Inocular o reator.

Um esquema das etapas deste procedimento é apresentado na Figura 4.

#### 3.5.5 - DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ABSORVÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

Filtraram-se 10ml da suspensão celular preparada conforme item 3.5.2 em filtro millipore 0,43 $\mu$ ; o precipitado lavou-se com água destilada três vezes, logo se colocou o papel filtro num vidro de relógio em estufa a 105 °C por duas horas; após isto, pesou-se o papel de filtro e foi colocado no secador, após quatro horas, pesou-se novamente, repetindo este procedimento até que o peso do filtro mais precipitado seja constante. A massa

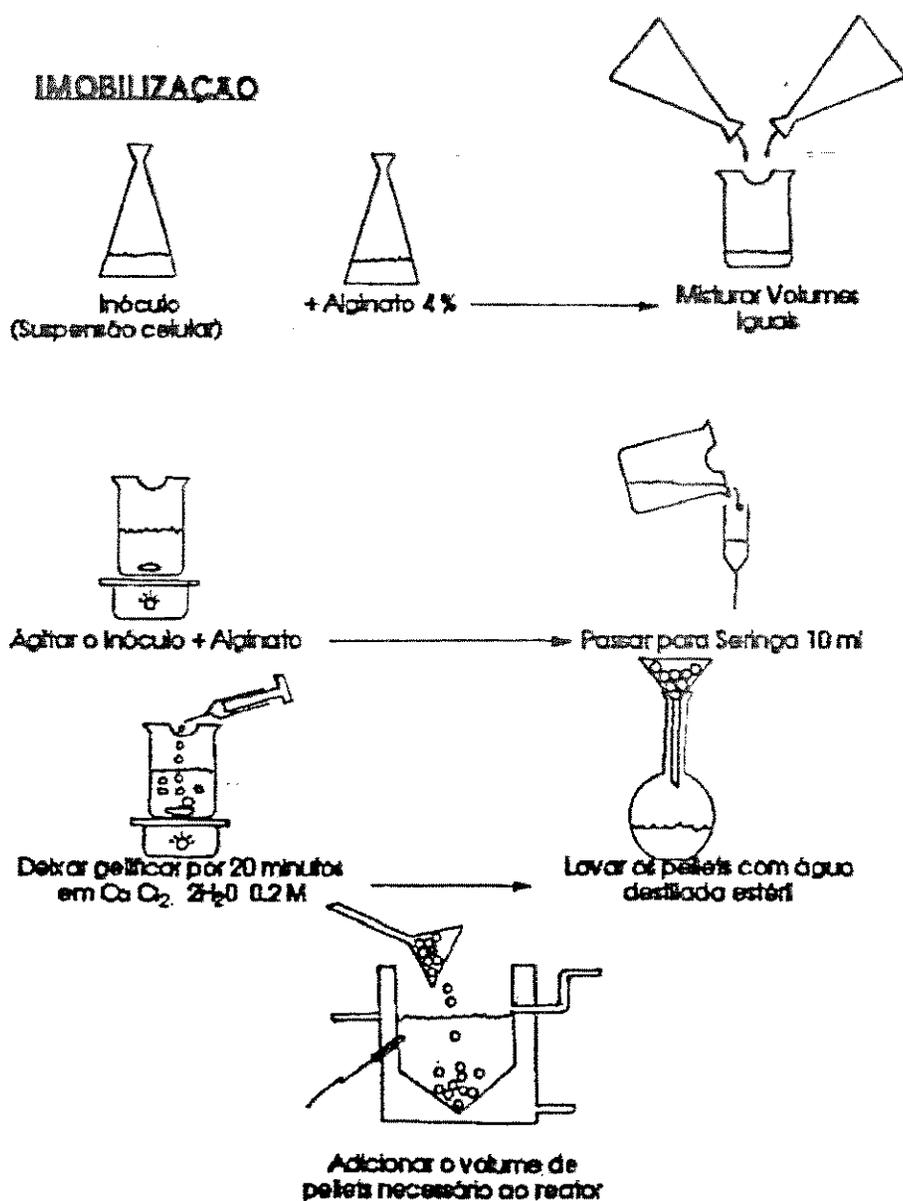


Figura 4 - Esquema das etapas do procedimento usado na preparação dos biocatalisadores.

celular contida em 10ml de suspensão celular é a diferença entre o peso do papel filtro seco e o papel de filtro mais o precipitado.

Com a suspensão celular prepararam-se suspensões com diferente concentração celular através de diluição em água destilada, mediuse a absorvância a 600nm para as diferentes suspensões, obtendo-se assim valores de absorvância contra concentração celular.

### 3.5.6 SELEÇÃO DOS MEIOS DE PRESERVAÇÃO DAS CEPAS

A seleção do meio de preservação das cepas foi através da liofilização da cultura 190 FTPT (IP 5866) nos quatro meios crioprotetores denominados A, B, C, e D. Antes e oito dias após a liofilização determinou-se a viabilidade celular através de contagens de colônias em placas de Petri. O critério de escolha do meio crioprotetor foi preservação da viabilidade celular após a liofilização.

### 3.5.7 SELEÇÃO DE CEPAS

As culturas mistas de Acetobacter foram inicialmente crescidas no meio indicador de ácido e comprovou-se que eram produtoras de ácido acético.

Com seis cepas FTPT 1724, 190, 2023, 2024, 2025, 2026 foram feitas fermentações em frascos agitados contendo 100.0ml do meio de fermentação YG, à temperatura de 30 °C e à velocidade de agitação de 180 rotações por minuto. Escolhemos para continuar o trabalho a cultura que produziu mais ácido em 24 horas.

As linhagens FTPT 1724 e 2026 purificada foram posteriormente comparadas quanto à capacidade de produção, nos meios tese; Pre e YG nas mesmas condições de fermentação citadas anteriormente.

### 3.5.8 SELEÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

O meio mais adequado para a fermentação do etanol, foi selecionado a partir dos meios de cultura 1 a 7, descritos no item 3.4.2, usando-se a linhagem FTPT 2026 purificada.

As fermentações foram conduzidas em frascos erlenmeyers, em agitador recíproco operando à 180 batidas por minuto à temperatura de 30 °C

### 3.5.9 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DAS PARTÍCULAS E MASSA CELULAR NO GEL

A medida da densidade das partículas sem células e com células antes e depois da fermentação, foram feitas usando-se picnômetro com volume de 10ml.

Neste método determina-se inicialmente a massa do picnômetro cheio de água  $P_2$ , e a sua temperatura  $T$ . A seguir uma determinada massa de partículas,  $P_1$ , é adicionada ao picnômetro cheio d'água e, por último, determinamos a massa do picnômetro com água e partículas  $P_3$ . Com a temperatura  $T$  encontramos em tabelas o valor da densidade d'água.

O volume ocupado pelo sólido dentro do picnômetro é dado por:

$$V_s = \frac{P_1 + P_2 - P_3}{\rho_{H_2O}(T)} \quad (3)$$

A massa específica das partículas é dada por:

$$\rho_p = \frac{P_1}{V_s} \quad (4)$$

A massa celular no gel é determinada pela diferença entre os pesos das partículas secas com e sem células.

### 3.5.10 CONTEÚDO DE GÁS E FRAÇÃO SÓLIDO - LÍQUIDO

O conteúdo de gás no reator foi determinado pela relação entre a diferença das alturas do líquido aerado com o líquido em repouso e a altura do líquido aerado. O volume de gás determinou-se pela diferença entre o volume de líquido no reator aerado e o volume do líquido em repouso.

$$E_G = \frac{h_a - h_r}{h_a} \quad (5)$$

- h<sub>a</sub> - altura líquido aerado, (m)
- h<sub>r</sub> - altura de repouso, (m)
- E<sub>G</sub> - conteúdo de gás, (-)

Tendo o volume de gás contido no reator nas condições de operação e o volume de sólido adicionado, determinamos o volume de líquido:

$$V_L = 1 - (V_s + V_G) \quad (6)$$

A fração sólido líquido é dada por:

$$E_{S/L} = \frac{V_{\text{sólido}}}{V_{\text{líquido}} + V_{\text{sólido}}} \quad (7)$$

O diâmetro das partículas é o diâmetro médio de Sauter, foi determinado por classificação em peneiras. O diâmetro médio das partículas também foi determinado através de medidas com ajuda do microscópio.

Os conteúdos de gás, líquido e sólido, são dados

pela equação:

$$E_z = \frac{V_z}{V_L + V_G + V_S} \quad (8)$$

$z$  - pode ser gás, líquido ou sólido.

### 3.5.11 EXPERIMENTOS COM TRAÇADOR

Com a finalidade de determinar as características de mistura do reator, levou-se a cabo uma experiência de estímulo - resposta usando ácido acético como traçador. Usamos uma função impulso como estímulo, através da adição de uma determinada quantidade de ácido acético (10ml) glacial. A experiência foi levada a cabo com o mesmo meio de fermentação e temperatura que nas fermentações em contínuo.

A resposta do sistema mediu-se através da variação da concentração de ácido à saída do reator. Nestas experiências o reator foi usado sem células com e sem partículas de alginato. As condições de operação para o reator de bolhas foram: taxa de aeração 4.5 vvm, vazão de alimentação do meio 480 ml/h. Para o reator trifásico foram: taxa de aeração 4.5 vvm, conteúdo de sólido 0.1098 e vazão de alimentação de meio 510 ml/h.

### 3.5.12 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

As amostras de células livres ou imobilizadas foram adicionadas ao meio de fermentação previamente saturado com oxigênio, até completar o volume de 6 ml. As taxas de consumo de oxigênio foram medidas em cuvetas fechadas pelo eletrodo e sua proteção. As medidas com células imobilizadas foram feitas imediatamente após a preparação dos biocatalizadores. A resposta do sistema foi acompanhada através do indicador e registrador.

### 3.6 MONTAGEM E OPERAÇÃO DA INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL

A Figura 5 é um desenho da montagem experimental para a medida da taxa de respiração e a operação contínua do biorreator. O reator é de vidro com 60 mm de diâmetro e 265 ml de volume de reação efetivo; uma placa porosa de vidro foi utilizado como distribuidor de gás. O meio líquido foi continuamente alimentado ao reator por uma bomba peristáltica a partir de um tanque de armazenamento de 14 litros. O distribuidor de líquido foi instalado na região acima do reator. O eletrodo de oxigênio foi instalado 5 cm acima do fundo, formando 45° para cima com a horizontal. O ar foi fornecido através de um filtro de algodão estéril, um filtro millipore e dois umidificadores, desde um compressor de ar sem óleo na lubrificação. A vazão de ar foi medida através de medidores de vazão do tipo capilar calibrados previamente. A temperatura no reator e nos recipientes de medida do consumo de oxigênio foi mantida em 30 °C com água de um banho termostático. Um condensador de refluxo colocado na saída dos gases evitava o arraste acentuado de etanol e água do reator.

A Figura 6 mostra uma fotografia da montagem experimental, e a Figura 7 apresenta o reator usado.

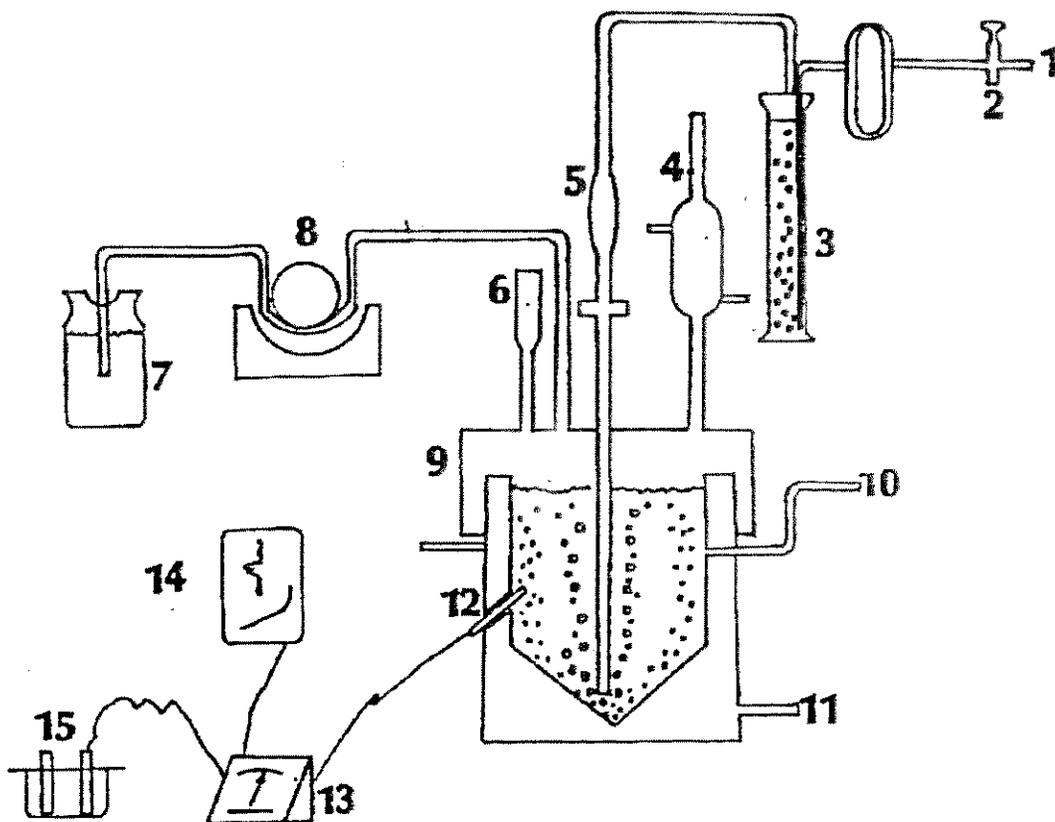


Figura 5 - Montagem Experimental - 1- Ar do compressor; 2- Oxigênio do cilindro; 3- Umidificador; 4- Condensador; 5- Filtros de ar; 6- Antiespumante; 7- Tanque de alimentação; 8- Bomba peristáltica; 9- Reator; 10- Saída do produto; 11- Água com temperatura controlada; 12- Eletrodo de oxigênio; 13- Monitor de oxigênio; 14- Registrador; 15- Conjunto para a medida da taxa de respiração.

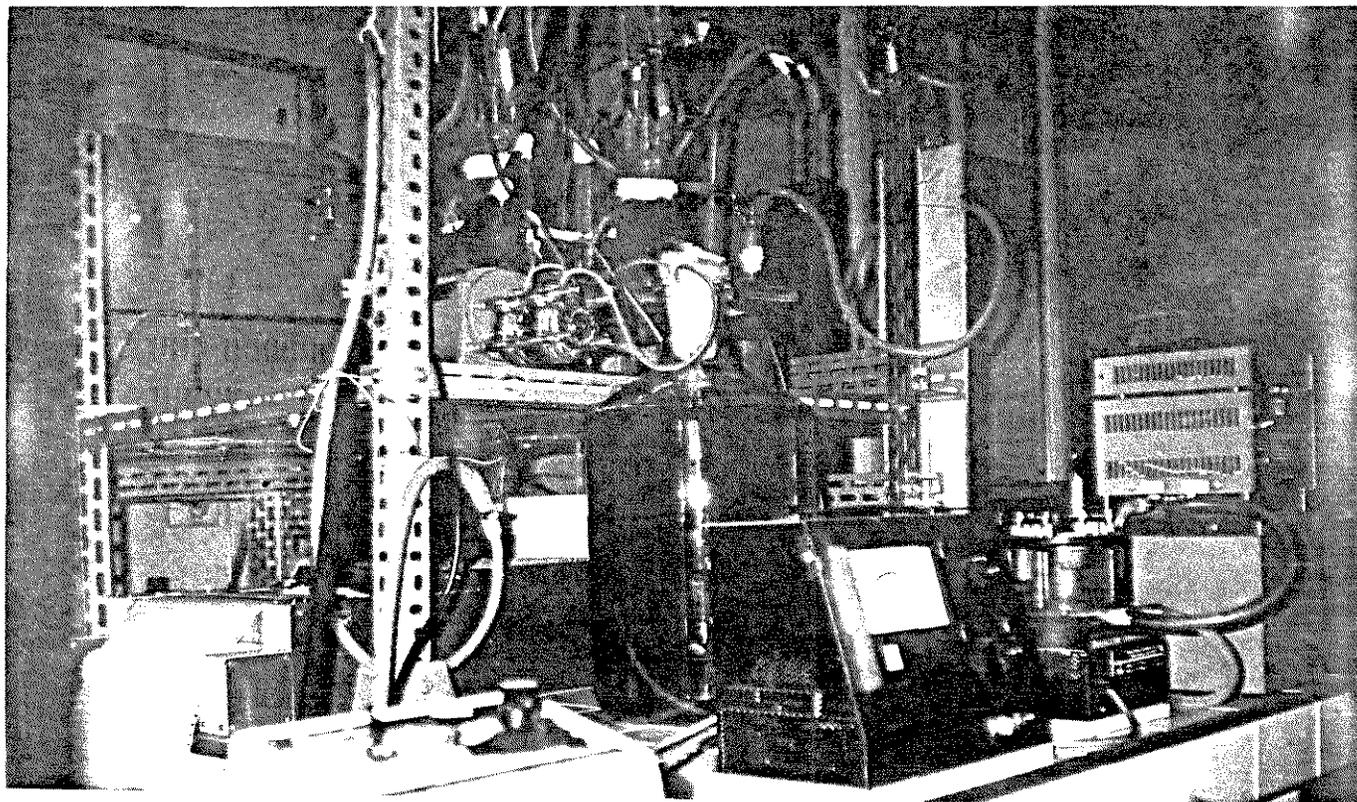


Figura 6 - Montagem experimental utilizada para coleta dos dados cinéticos e de transferência de massa.



Figura 7 - Reator de leito fluidizado trifásico com a localização do eletrodo para medida do oxigênio dissolvido.

Nas primeiras experiências não se usou nenhum anti-espumante com o que a espuma subia prejudicando a boa operação do reator, pois o nível variava e por outra parte a espuma arrastava as partículas as quais ficavam grudadas nas paredes do reator, o que prejudicava a produção de ácido com células imobilizadas. Usamos azeite de oliva (que é rico em ácido oléico) com o que o problema da espuma foi resolvido. Usou-se 3 ml do anti-espumante cada 24 horas.

Os experimentos foram feitos sempre com dois reatores iguais, operando em paralelo, contendo um deles células livres e o outro células imobilizadas.

Nas fermentações contínuas destinadas à coleta de dados cinéticos e de transferência de massa foram usadas as seguintes condições operacionais: taxa de aeração 4.5 vvm, faixa de taxas de diluição 0.045 a 0.4 h<sup>-1</sup>. Nas fermentações com células imobilizadas o conteúdo de sólidos usados foi de 0.11 nos experimentos em contínuo e 0.122 nos experimentos em descontínuo.

### 3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.7.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÁCIDO ACÉTICO

A análise do ácido acético foi feita por titulação com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0.1N usando solução de fenolftaleína 0,25% como indicador.

#### 3.7.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL

A concentração do etanol foi determinada por cromatográfico de ionização de chama. O volume das amostras foi 3 $\mu$ L, e as condições de operação do cromatóforo foram: temperatura da coluna porapak-Q, 150 °C, temperatura do injetor, 200 °C e temperatura do detector 250 °C. O gás de arraste foi o nitrogênio.

### 3.7.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A determinação da concentração de células livres no meio de fermentação foi feita por dois métodos distintos: contagem de colônias em placas de Petri e medida da absorvância de soluções. No primeiro caso, semea-se uma alíquota de 0.1 ml de amostra, convenientemente diluída, na superfície do meio de manutenção contido em placa de Petri. Após incubação por 36 ou 48 horas em estufa a 30 °C, conta-se as colônias crescidas. Os resultados eram expressos em termos de unidades formadoras de colônias por mililitro de solução, UFC/ml, considerando-se que cada célula viável originava uma colônia.

A determinação da concentração celular pela medida da absorvância foi feita utilizando-se a seguinte equação linear obtida dos dados experimentais coletados conforme procedimento descrito no item 3.5.5

$$X = 0.6 AB + 0.02 \quad (9)$$

AB = Absorvância da suspensão celular a 600nm

A concentração de células nas partículas de biocatalisador foi determinada através do procedimento descrito no item 3.5.9

### 3.7.4 DETERMINAÇÃO DO pH

O pH das amostras foi medido diretamente através de um pHmetro. As propriedades tamponantes dos meios de cultura usados, mantinham o pH praticamente constante, no valor de 2.8, durante toda a fermentação.

### 3.7.5 DETERMINAÇÃO DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO

A concentração do oxigênio dissolvido foi medida utilizando um eletrodo polarográfico, à temperatura de 30 °C. Os resultados foram lidos como porcentagem da

concentração de saturação do oxigênio no meio líquido. A concentração de saturação do oxigênio dissolvido foi obtido de tabelas a 30 °C e 716mmHg para a água e adotou-se o mesmo valor para o meio de fermentação.

### 3.8 MÉTODOS DE ANÁLISE DOS DADOS

#### 3.8.1 DISTRIBUIÇÃO DOS TEMPOS DE RESIDÊNCIA

A distribuição dos tempos de residência (DTR), é a fração de fluido na corrente de saída que esteve no reator por um tempo entre  $t$  e  $t + dt$ .

É desejável caracterizar uma distribuição por algum valor numérico. Assim, para uma curva de concentração ( $C$ ) em função do tempo, a média da distribuição é dada por:

$$t = \frac{\sum t_i \quad c_i \quad \Delta t_i}{c_i \quad \Delta t_i} \quad (10)$$

Considerando o CSTR ideal, um modelo matemático do processo de mistura existe, com o qual poderemos determinar a DTR, dada pela equação:

$$DTR = \frac{F}{V_R} e^{-Ft/V_R} \quad (11)$$

Para determinar a DTR experimentalmente uma vez tenhamos a curva de concentração de ácido - tempo, determinamos a área sob a curva  $c$  em função de  $t$

$$Q = \sum c \quad \Delta t \quad (12)$$

que dá a quantidade total de traçador introduzido. Para encontrar  $DTR$ , a área debaixo a curva deve ser igual a 1, assim:

$$DTR = \frac{C}{Q} \quad (13)$$

### 3.8.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

A produtividade do ácido acético na fermentação contínua com células livres,  $P_L$ , foi calculada pela seguinte equação:

$$P_L = D (C_{AHCS} - C_{AHCE}) \quad (14)$$

Devido à relação estequiométrica existente entre a produção de ácido acético e o consumo de oxigênio, tem-se:

$$Q_{O_2L} = \frac{P_L}{60 E_L X_L} \quad (15)$$

onde  $Q_{O_2L}$  é a taxa específica de respiração de células livres,  $E_L$  a fração de líquido no reator e  $X_L$  a concentração de células.

De um balanço de massa no estado estacionário para células livres, obtém-se:

$$\mu_L = \frac{D}{E_L} \quad (16)$$

onde  $\mu_L$  é a taxa específica de crescimento das células livres.

A taxa específica de crescimento e a taxa específica de respiração, foram relacionadas com a concentração de oxigênio dissolvido  $C_{do}$ , através das equações de Monod e Michaelis - Menten respectivamente:

$$\mu_L = \frac{\mu_{m\acute{a}x} C_{do}}{K_s + C_{do}} \quad (17)$$

$$Q_{o_2L} = \frac{Q_{o_2m\acute{a}x} C_{do}}{K_m + C_{do}} \quad (18)$$

onde:  $K_s$  - constante de Saturação  
 $K_m$  - constante de Michaelis  
 $\mu_{m\acute{a}x}$  - taxa específica máxima de crescimento  
 $Q_{o_2L}$  - taxa específica máxima de respiração de células livres

Invertendo as equações (17) e (18) obtemos:

$$\frac{1}{\mu_L} = \frac{K_s}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{C_{do}} + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (19)$$

$$\frac{1}{Q_{o_2L}} = \frac{K_m}{Q_{o_2m\acute{a}x}} + \frac{1}{C_{do}} + \frac{1}{Q_{o_2m\acute{a}x}} \quad (20)$$

Os parâmetros cinéticos  $K_s$  e  $K_m$ ,  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $Q_{o_2L}$  foram obtidos através do ajuste de equações lineares aos dados experimentais obtidos isentos de qualquer tipo de inibição.

### 3.8.3 - DETERMINAÇÃO DA TAXA ESPECÍFICA DE RESPIRAÇÃO

A taxa de consumo de oxigênio foi determinada da inclinação da curva de concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, ou usando a equação de Michaelis:

$$\frac{dC_{do}}{dt} (C_{do} + K_m) = - OUR_{m\acute{a}x} dt \quad (21)$$

Integrando desde  $C_{do1}$  para  $t_1$  até  $C_{do2}$  para  $t_2$ :

$$C_{do1} - C_{do2} = OUR_{m\acute{a}x}(t_2 - t_1) - K_m \ln(C_{do1}/C_{do2}) \quad (22)$$

Para  $C_{do1} = 2 C_{do2}$

$$C_{do1} = 2 OUR_{m\acute{a}x} (t_2 - t_1) - 2K_m \ln 2 \quad (23)$$

A constante de Michaelis,  $K_m$ , e  $OUR_{m\acute{a}x}$  podem ser estimadas através do ajuste pelo método dos mínimos quadrados dos valores de  $C_{do1}$  em função do tempo  $(t_2 - t_1)$ .

A taxa máxima de consumo de oxigênio (ou taxa específica de respiração  $Q_{o2\ m\acute{a}x}$ ) é dada por:

$$Q_{o2\ m\acute{a}x} = \frac{OUR_{m\acute{a}x}}{X} \quad (24)$$

### 3.8.4 - DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO

O coeficiente de difusão foi calculado usando o conceito do fator de efetividade. Usaram-se as curvas do consumo do oxigênio dissolvido em função do tempo para determinar a taxa da reação.

O fator de efetividade é a razão entre a taxa da reação observada e aquela obtida na ausência de efeitos difusionais.

$$N = \frac{\text{OUR}_{\text{máx obs}}}{\text{OUR}_{\text{led}}} \quad (25)$$

onde:  $\text{OUR}_{\text{máx obs}}$  - taxa máxima de consumo de oxigênio de células imobilizadas, observada.

$\text{OUR}_{\text{led}}$  - taxa máxima de consumo de oxigênio de células imobilizadas, livres de efeitos difusivos.

Os efeitos de transferência de massa foram desprezados depois do cálculo da espessura do Filme  $b$ . De acordo à teoria do Filme, a espessura do Filme é dada por:

$$b = \frac{D_{O_2}}{K_L^*} \quad (26)$$

onde:  $D_{O_2}$  - Difusividade do oxigênio em água à 30°C.

$K_L^*$  - Coeficiente de transferência de massa externa

O valor de  $K_L^*$  pode ser calculado pelo procedimento usado por Harriot (51)

O primeiro passo é calcular o valor mínimo de  $K_L$  usando a equação (2). O coeficiente de transferência de massa externa  $K_L^*$  usualmente é dado por  $4.75 K_L$ . Uma vez determinamos  $K_L^*$ , entramos na equação (26) e se  $b \leq 1 \times 10^{-3}$  cm, os efeitos de transferência de massa externa podem ser desprezados.

O parâmetro de saturação é dado por:

$$B = \frac{C^*}{K_m} \quad (27)$$

O módulo de Thiele é calculado a partir da equação integrada do balanço de massa desprezando os efeitos de curvatura da partícula (52). Esta simplificação foi usada pela observação ao microscópio de que as células viáveis crescem somente muito próximas à superfície da partícula, como pode ser visto na Figura 24 do Capítulo 4. O módulo de Thiele em função do fator de efetividade é dado por:

$$\phi = \frac{1}{N} \frac{1+B}{B} \sqrt{2} (B - \ln(1+B))^{1/2} \quad (28)$$

O coeficiente de difusão efetivo,  $D_{eff}$ , é encontrado usando a definição do módulo de Thiele.

$$D_{eff} = \frac{O_{URm\acute{a}x} R^2}{K_m \phi^2} \quad (29)$$

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos intrínsecos de células imobilizadas, utilizaram-se os dados para as partículas de 0.1 mm de diâmetro e procedeu-se para calcular OUR máx e Km segundo item 3.8.3.

### 3.8.5 - COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA

No estado estacionário, a transferência e o consumo de oxigênio estão balanceados:

$$\text{Consumo total de oxigênio} = Q_{O_2t} \times X = \text{transferência de oxigênio} = K_L a (C^* - C_{do})$$

$$K_L a = \frac{Q_{O_2t} \times X}{(C^* - C_{do})} \quad (30)$$

onde:  $Q_{O_2t}$  = respiração das células livres e imobilizadas

A taxa total de respiração é relacionada com a produtividade total P, pela seguinte expressão:

$$Q_{O_2t} \times X = \frac{P}{60 E_L} \quad (31)$$

Portanto das equações (30) e (31)

$$K_L a = \frac{P}{60 E_L (C^* - C_{do})} \quad (32)$$

# Enhancement of the Oxygen Transfer in a Circulating Three-Phase Fluidized Bed Bioreactor

EDUARDO D. DABDOUB PAZ,<sup>1</sup>

MARIA HELENA A. SANTANA,\*<sup>1</sup> AND SILVIA Y. EGUCHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Development of Biotechnological Process,  
Chemical Engineering School, UNICAMP, Campinas, Brazil;  
and <sup>2</sup>Tropical Culture Collection, Fundacao Tropical de Pesquisas  
e Tecnologia "Andre Tosello," Campinas, Brazil

## ABSTRACT

The addition of  $\alpha$ -alumina to the aqueous solution of sodium alginate for immobilization of viable cells allows the production of denser particles than the ones obtained with sodium alginate alone. This biocatalyst was used in the continuous oxidation of ethanol to acetic acid, by a strain of *Acetobacter* isolated from an ethanol plant. The continuous fermentation was carried out in a circulating three-phase fluidized bed bioreactor.

Denser particles allow a greater oxygen transfer, resulting in increased volumetric production rate of acetic acid, because oxygen is usually the limiting factor of this process. The performance of the biocatalyst was analyzed in terms of respiration rate, oxygen diffusivity, volumetric mass-transfer coefficient, and global productivity.

**Index Entries:** Immobilized cells; mass transfer; *Acetobacter*.

## NOMENCLATURE

$C^*$	Saturated dissolved oxygen concentration in liquid medium ( $\text{kmol m}^{-3}$ )
$C_{do}$	Dissolved oxygen concentration in liquid medium, ( $\text{kmol m}^{-3}$ )

\*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

$C_{\text{HAc}1}, C_{\text{HAc}2}$	Initial and final acetic acid concentrations (kmol/mL)
$D$	Dilution rate, $\text{h}^{-1}$
$D_{\text{eff}}$	Oxygen effective intraparticle diffusion coefficient, ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$g$	Gravitational constant ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$K_L$	Mass-transfer coefficient ( $\text{m}/\text{s}$ )
$K_{L}a$	Volumetric mass-transfer coefficient ( $\text{s}^{-1}$ )
$K_m$	Michaelis-Menten constant ( $\text{kmol}/\text{m}^{-3}$ )
$Pr$	Total acetic acid production rate ( $\text{g}/\text{L}\cdot\text{h}$ )
$Q_{\text{O}_2}$	Specific respiration rate ( $\text{kmol}/\text{kg}[\text{dry wt}]\text{h}$ )
$Q_{\text{O}_2 \text{ actual}}$	Actual specific respiration rate of immobilized cells for 1.7 mm diameter particles ( $\text{kmol}/\text{kg}[\text{dry wt}]\text{h}$ )
$Q_{\text{O}_2 \text{ free of diffusion limitations}}$	Specific respiration rate, in the absence of diffusion resistance, of immobilized cells for 0.1 mm diameter particles ( $\text{kmol}/\text{kg}[\text{dry wt}]\text{h}$ )
$R$	Particle radius (m)
$X$	Total cell concentration ( $\text{g}/\text{L}$ )
$\beta$	Saturation parameter
$\epsilon L$	Liquid holdup
$\phi$	Thiele modulus
$\eta$	Effectiveness factor

## INTRODUCTION

The immobilization of cells presents several advantages in the fermentation process. However, a primary limitation in these systems is the oxygen mass transfer, caused by diffusional resistances, especially when cells with high respiration activity are involved.

*Acetobacter* sp. is very sensitive to oxygen deficiency, and cells can undergo complete inhibition when aeration is not sufficient. Therefore, under these conditions, one may not expect a higher acetic acid productivity in submerged vinegar fermentation by using an immobilized cell process, instead of the free cell process (1). In order to conduct an aerobic high-cell-density culture successfully, it is necessary to supply a large amount of dissolved oxygen to the culture (2). Therefore, efforts must be made to improve the oxygen transfer in the system.

The entrapping supports for whole cells are usually polymeric gels (e.g., calcium alginate) that are very light, presenting a density near to that of water. Sun et al. (3) found that the mass-transfer coefficient,  $K_L a$ , in a three-phase fluidized bed reactor of Ca-alginate beads was lower than that in bubble columns for all particle diameters tested. The main reason was the low density of the beads.

Ostergaard (4) reported that in a bed containing 6-mm glass beads, the volumetric mass-transfer coefficient was greater than that in bubble columns. However, 1-mm particle beds gave lower coefficients when

compared to the bubble columns. Fan and Newcomer (5) suggested that larger and denser particles should break the bubbles more easily than the smaller and lighter ones, resulting in a greater interfacial area. Osuga et al. (6) used a fluidized bed reactor for the study of acetic acid production, using immobilized whole cells, and Black et al. (7) proposed a system that allowed a circulating mixing strain of low-density particles, in order to improve mass transfer. This study aims to show the feasibility of the process and to examine the effect of biocatalysts of higher density than those used by Sun et al. (1) in a circulating fluidized bed bioreactor.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms

The microorganism used in this study was an acetic acid bacteria isolated from a sugar and alcohol production mill, at the cane juice extraction point. The cells were obtained from the Tropical Culture Collection (Brazil) as *Acetobacter* sp. FTPT 2026.

### Materials

The alginate was purchased from Wako Pure Chemicals Co. (Japan). Other reagents were of analytical grade.

### Culture Media

Maintenance broth (A): 5 g yeast extract, 3 g peptone, 25 g glucose, 1 L distilled water.

Propagation medium (B): 10 g yeast extract, 10 g peptone, 10 g glucose, 50 mL ethanol, 10 mL acetic acid, 20 g agar, 1 L distilled water.

Fermentation medium (C): 10 g yeast extract, 10 g peptone, 10 g glucose, 50 mL ethanol and 5 mL acetic acid, 1 L distilled water.

Ethanol and acetic acid were added after media autoclaving.

### Preculture

A lyophilized ampule was rehydrated with 0.1 mL of sterile distilled water for 15 min. This suspension was transferred to 5 mL of maintenance broth A and was incubated on a reciprocal shaker at 30°C, 180 strokes/min for 24 h. Then, 0.5 mL of this culture was inoculated onto the surface of ten Petri dishes containing propagation agar medium B. The dishes were incubated at 30°C for 36 h. The Petri dishes were carefully scraped, and the grown cells were suspended in 100 mL of the fermentation medium C. This cellular suspension was incubated in a 500-mL conical flask, under reciprocal shaking (180 strokes/min) at 30°C for 24 h. The dense

cellular broth obtained was used as seed culture for the following experiments. This cultivation methodology was based on the work of Moraes (8), and it ensures an *Acetobacter* cell concentration of about  $10^7$  CFU/mL, enough to maintain high cell viability after immobilization.

### Immobilization of the Bacteria

The seed culture collected after 24 h of aerated cultivation was mixed, under room temperature, with either sterile 4% Na-alginate or 2%  $\alpha$ -alumina + 2% Na-alginate, in a ratio of 1:1. The mixture was dropped into a solution of  $\text{CaCl}_2$  from a height of 5 cm, using a 30-mL syringe supplied with a needle. Calcium alginate gel beads obtained by this method had about 1.7 mm diameter and entrapped approx  $10^7$  CFU/g gel of living cells.

### Analyses

Dissolved oxygen concentration was measured with a polarographic oxygen sensor, YSI model 5300, which was connected to an oxygen monitor and a chart recorder. Acetic acid was estimated by titration with a 0.1N NaOH solution using phenolphthalein as the indicator. The medium optical density was measured at 600 nm and converted into cell mass concentration using a calibration curve.

### Experimental Setup

Figure 1 shows the sketch of the experimental setup for the respiration rate measurement and the continuous operation of the bioreactor. The reactor was made of glass with 60 mm inner diameter and 265 mL of effective reaction volume. A porous flat plate was fixed at the end of the aeration tube, placed close to the bottom of the reactor. This setup promoted a circulating particle movement that is also indicated in Fig. 1. The liquid medium was continuously supplied to the reactor by a peristaltic pump from a 14-L storage tank. The oxygen sensor was installed 5 cm above the bottom, forming a  $45^\circ$  angle upward with the horizontal line as shown in Fig. 1, number 12. Aeration was carried out by an odontological compressor. The air was passed through two humidifiers, a cotton filter, a millipore membrane filter, and a capillary flowmeter. The reactor was placed in a  $30^\circ\text{C}$  water bath controlled by a thermostat. This water bath was also connected to the oxygen bath assembly (YSI 5301). By protecting the electrode membrane from direct contact with the air bubbles in the reactor, it was possible to make the readings with minimum oscillation.

### Measurement of Oxygen Uptake Rates

Samples of either immobilized or free cells were added to an aerated fermentation medium in the electrode vessel (of 10 mL) to give a final vol

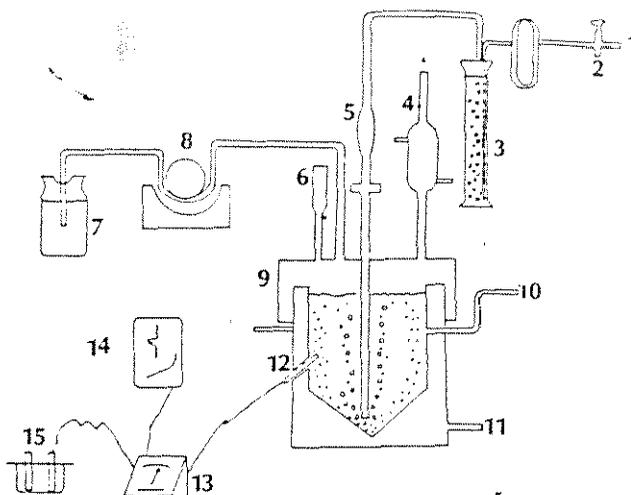


Fig. 1. Experimental setup: 1. air from compressor; 2. oxygen from cylinder; 3. humidifier; 4. condenser; 5. air filters; 6. antifoam; 7. medium tank; 8. peristaltic pump; 9. reactor; 10. product exit; 11. thermostatted water; 12. oxygen electrode; 13. monitor; 14. chart recorder; 15. bath assemble.

of 6 mL. Oxygen uptake rates were measured in the closed vessel as indicated in Fig. 1. Measurements were made with immobilized cells immediately after the gel beads had been prepared, to avoid any physiological changes in the biocatalyst.

### Diffusivity Calculations

The oxygen diffusivity in gel beads was estimated using the effectiveness factor.

$$\eta = Q_{O_2 \text{ actual}} / Q_{O_2 \text{ free of diffusion limitation}} \quad (1)$$

$$\phi = 1/\eta [(1 + \beta) / \beta] \sqrt{2 [\beta - \ln(1 + \beta)]^{1/2}} \quad (2)$$

$$\beta = C^* / K_m \quad (3)$$

$$D_{\text{eff}} = R^2 Q_{O_2 \text{ free of diff. limitation}} / (9 K_m \phi^2) \quad (4)$$

### Production Rate Calculation

$$Pr = D (C_{\text{HAc}2} - C_{\text{HAc}1}) \quad (5)$$

### Volumetric Mass-Transfer Coefficient Calculation

$$K_{La} = Q_{O_2} X / (C^* - C_{do}) = Pr / [60 \epsilon L (C^* - C_{do})] \quad (6)$$

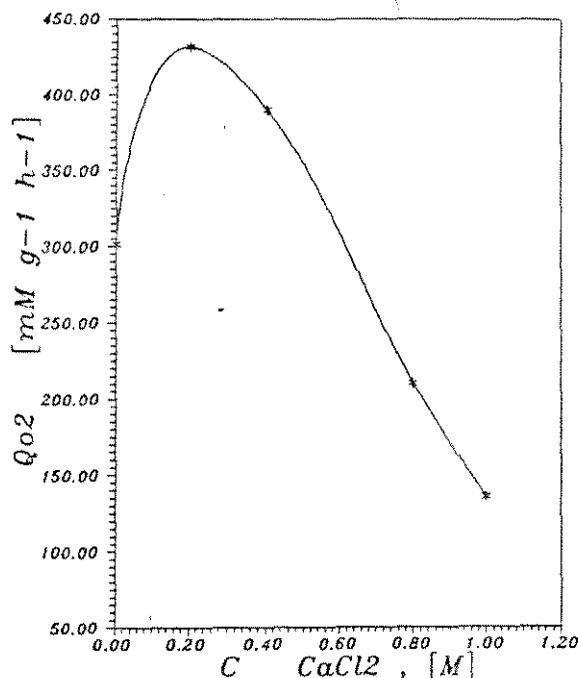


Fig. 2. Oxygen uptake rates for free cells as a function of calcium chloride concentration.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of Gel Preparation Variables on the Activity of the Biocatalyst

The effect of  $CaCl_2$  on the oxygen uptake rate by free cells was studied. Figure 2 shows that there is an increase in the respiration rate for concentrations of  $CaCl_2$  between 0.0 and 0.2M. After this, the respiration rate begins to decrease for higher  $CaCl_2$  concentrations. The inhibition of respiration by the electrolyte is drastic at concentrations higher than 0.4M. Its physiological meaning cannot be explained by these data. However, it is important to observe that it might be preferable to use a lower concentration (ca. 0.2M) of  $CaCl_2$  in the gelification step because of the obtention of a more active biocatalyst, although there may be a decrease in the mechanical strength of the bead with lower concentrations of the electrolyte in the gelification solution.

Table 1 shows that as the time of gelling increases, the specific respiration rate decreases. The maximum reduction in the oxygen uptake rate for the alginate beads exposed to 0.2M solution, by 20 and 1200 min, was about 30%. A similar pattern was observed for the  $\alpha$ -alumina + alginate, where the maximum decrease in the oxygen uptake rate was 24%. The

Table 1  
Specific Oxygen Uptake Rates as a Function of the Time of Gelification  
and the  $\text{CaCl}_2$  Concentration for Immobilization of Cells  
in Alginate and  $\alpha$ -Alumina + Alginate<sup>a</sup>

Gelification time, min	$\text{CaCl}_2$ concentration, M	$Q_{O_2}$ , mM/g·h	
		Alginate	$\alpha$ -Alumina + Alginate
20	0.2	365.33	306.80
40	0.2	337.50	273.35
1200	0.2	281.25	233.44
1200	0.5	247.50	202.95
1200	1.0	247.50	202.95

<sup>a</sup>Cell concentration was  $X = 0.075$  g/g gel.

Table 2  
Specific Oxygen Uptake Rates as a Function of the Time of Gelification  
and the  $\text{CaCl}_2$  Concentration for Immobilization of Cells  
in Alginate and  $\alpha$ -Alumina + Alginate<sup>a</sup>

Gelification time, min	$\text{CaCl}_2$ concentration, M	$Q_{O_2}$ , mM/g·h	
		Alginate	$\alpha$ -Alumina + Alginate
20	0.2	9.04	7.55
40	0.2	8.72	7.15
1200	0.2	0.87	0.72
1200	0.5	0.83	0.69
1200	1.0	0.75	0.62

<sup>a</sup>Cell concentration was  $X = 3.7$  g/g gel.

depletion of oxygen is slower in this biocatalyst, and even after 1200 min of exposure, there is more oxygen available than in the previous case. The oxygen uptake rate by the immobilized cells also diminished as the concentration of  $\text{CaCl}_2$  used in the gelling increases.

As can be seen in Fig. 2, the specific respiration rate of free cells is 301.6 mM/g h, thus being lower than the values found for the immobilized cells (0.2M  $\text{CaCl}_2$  solution for 20 and 40 min). The cell mass concentrations are the same for both experiments. In spite of the diffusion limitations, the specific respiration rates under immobilized cell conditions were higher (for  $\text{CaCl}_2$  concentrations  $< 0.2\text{M}$ ) than those observed for free cells. This might be because of physiological changes in the cell.

The increase in the amount of the immobilized cells is followed by a sharp decrease in the specific oxygen uptake rate, as can be observed by comparing Table 1 ( $X = 0.075$  g/g gel) and Table 2 ( $X = 3.7$  g/g gel). The

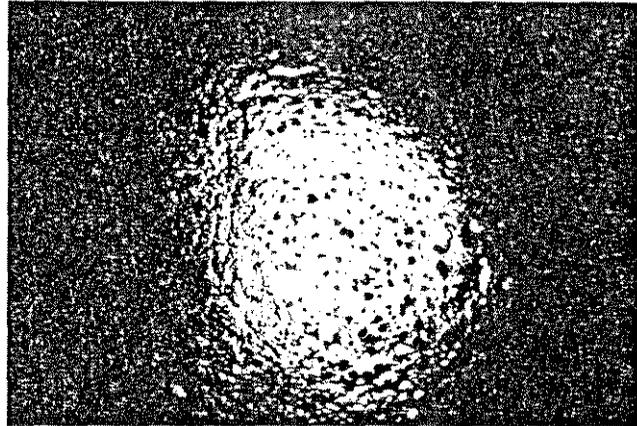


Fig. 3. Photomicrograph of an  $\alpha$ -alumina + alginate bead, stained with saphranine, with a light microscope.

oxygen uptake rate decreases from ca. 300 mM/g·h to <10 mM/g·h. As can be observed from Tables 1 and 2, the oxygen permeation rate was always ca. 18% lower in the presence of  $\alpha$ -alumina.

The photomicrograph (magnification 500 $\times$ ) of Fig. 3 was taken with a light microscope after properly staining the bead with saphranine. It shows a great number of *Acetobacter* microcolonies on the surface of an  $\alpha$ -alumina + alginate gel bead.

### Oxygen Diffusivity

From the slopes of the curves that relate the depleted oxygen concentration with time, the effectiveness factor for the 1.7 mm diameter particle can be calculated. The kinetic parameters used in the equations were calculated previously by Dabdoub (9). The diffusivity of oxygen in the alginate particles was found to be  $4.566 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s, and for the  $\alpha$ -alumina + alginate particles, the oxygen diffusivity was  $3.592 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s. Thus, the presence of  $\alpha$ -alumina does not affect the oxygen diffusivity. These values are approx 98% lower than the oxygen diffusivity in pure water at 30°C.

### Continuous Acetic Acid Production in the Bioreactor

The continuous cultivations were carried out using free and entrapped cells in alginate with the presence or absence of  $\alpha$ -alumina. Figure 4 shows production rate vs dilution rate for the three systems. Free cells present the typical behavior, where production rate increases with dilution rate up to the washout point. Under immobilization conditions, both free and immobilized cells contributed to the overall production either in the presence or absence of  $\alpha$ -alumina. The level reached after the washout of free

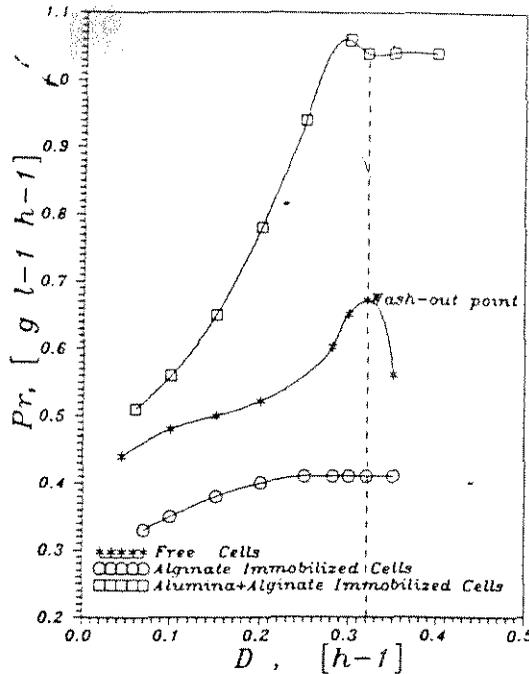


Fig. 4. Acetic acid production rate as a function of the dilution rate. Aeration rate: 4.5 vvm. Solid fraction: 0.11. Particle diameter: 1.7 mm. Alginate particles density: 1038 kg/m<sup>3</sup>.  $\alpha$ -Alumina + alginate particles density: 1270 kg/m<sup>3</sup>.

cells indicates the maximum contribution of immobilized cells. The sharp decrease observed under low dilution rates ( $<0.3 \text{ h}^{-1}$ ) for entrapment with  $\alpha$ -alumina + alginate reflects directly on the respiratory inhibition caused by the high acetic acid concentration.

Figures 5 and 6 show the behavior of dissolved oxygen and cell mass concentration for the three systems tested. Immobilized systems showed a small variation in the dissolved oxygen concentration regardless of the dilution rates, indicating the effective contribution of immobilized cells, whereas the free cellular system showed a sharp increase in  $C_{do}$  as the cellular level dropped, when the dilution rate reached the washout point. Figure 6 indicates a gradual decrease in cell mass concentration with increasing dilution rates, reaching a minimum for the immobilized systems, which indicates the actual contribution of immobilized cells to the suspended mass cell concentration in the system.

As can be observed from Figs. 4, 5, and 6, the contribution of immobilized cells to the production rate is greater in the  $\alpha$ -alumina + alginate system, for dilution rates  $>0.1 \text{ h}^{-1}$ . For free cell systems, an increase in dilution rates is followed by an increase in the volumetric oxygen mass-transfer coefficients (1,6). According to the surface renewal theory,  $K_L$  depends on  $Deff^{1/2}$ , and the diffusivity increases as cell concentration

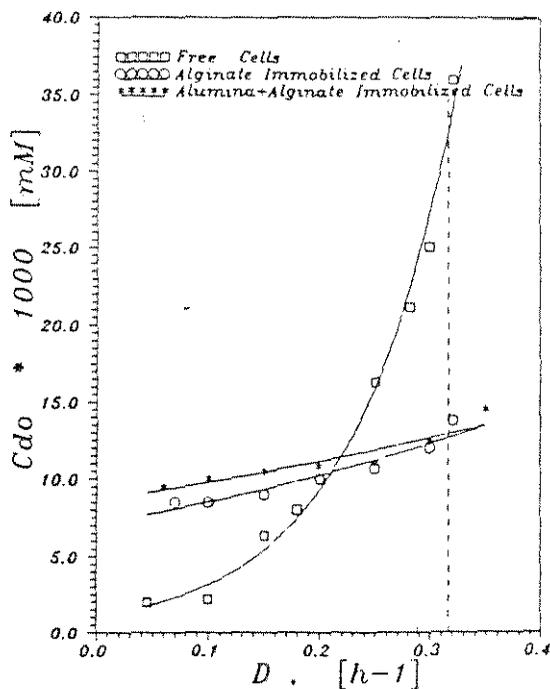


Fig. 5. Dissolved oxygen concentration as a function of the dilution rate. Experimental conditions: the same as in Fig. 4.

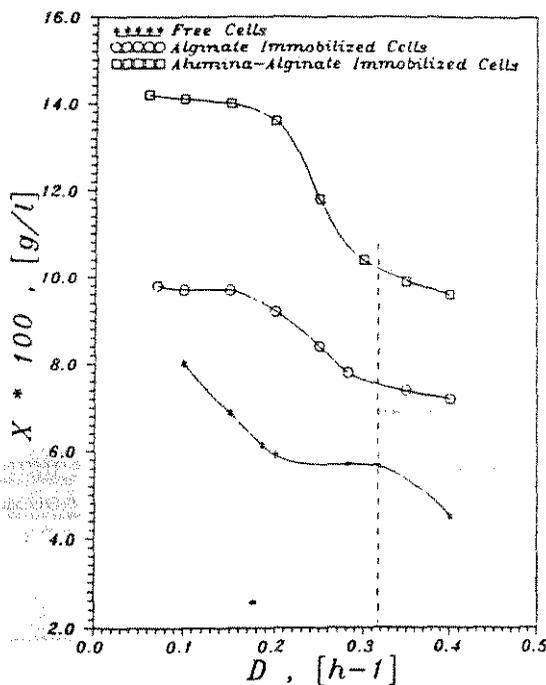


Fig. 6. Biomass concentration as a function of the dilution rate. Experimental conditions: the same as in Fig. 4.

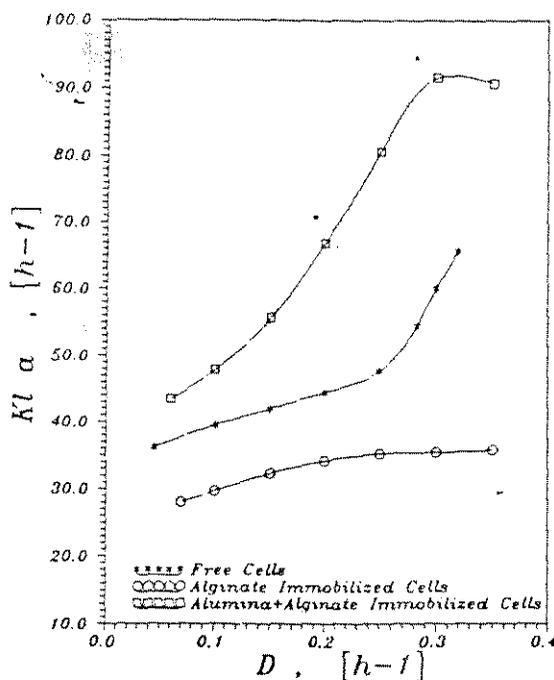


Fig. 7. Volumetric oxygen-transfer coefficient as a function of the dilution rate. Experimental conditions: the same as in Fig. 4.

decreases (10–12). This behavior is confirmed by the results in Fig. 7. Denser particles seem to promote greater interfacial areas and mass-transfer coefficients, so that the volumetric mass-transfer coefficient increase with higher solid density. This fact is reflected by the higher production rates observed for the  $\alpha$ -alumina + alginate particles.

## CONCLUSIONS

The activity of alginate gels biocatalysts depends on the preparation variables, as the gelification time and the concentration of electrolyte and viable cells. The gelification time must be as short as possible. The  $\text{CaCl}_2$  concentration must be kept lower than 0.2M, and the immobilized biomass should be enough to ensure activity and stability for long times.

Particles with  $\alpha$ -alumina present similar oxygen uptake rates and diffusivities as systems containing alginate alone. The productivity of  $\alpha$ -alumina systems was greater because of better gas-liquid mass-transfer characteristics. Once mass transfer is improved inside the reactor, the denser particles become more active than the lighter ones, mainly because of the greater availability of oxygen.

The addition of  $\alpha$ -alumina allowed a better performance of the system for the acetic acid production. It would be interesting to use this kind of immobilization in other reactors and with other microorganisms.

## REFERENCES

1. Sun, Y. and Furuzaki, S. (1990), *J. Ferment. and Bioeng.* 69, 2, 102-110.
2. Park, Y. S., Ohthake, H., Toda, K., Fukaya, M., Okumura, H., and Kawamura, Y. (1988), *Biotech. Biotech.* 33, 918-923.
3. Sun, Y., Nozawa, T., and Furusaki, S. (1988), *J. Chem. Eng. Japan* 21, 1, 15-20.
4. Ostergaard, K. (1978), *AIChE J. Symp. Series* 74, 82, 176.
5. Fan, L. T. and Newcomer, M. P. (1981), *Adv. Biotechnol. (Proc. Int. Ferment. Symp. 6th)* 1, 643.
6. Osuga, J., Mori, A., and Kato, J. (1984), *J. Ferment. Technol.* 62, 2, 139-149.
7. Black, C. D., Webb, C., Mathews, T., Atkinson, B. (1984), *Biotech. Bioeng.* 26, 134-141.
8. Moraes, A. M. (1991), "Estudo da oxidacao de Etanol a Acido Acético por células imobilizadas do Género *Acetobacter* Livres e imobilizadas em Geis Hidrofilicos," Master Thesis, State University of Campinas (Unicamp/FEQ), Brazil.
9. Dabdoub Paz, E.D. (1992), "Estudo da transferencia de Oxigénio num reator de leito Fluidizado Trifásico no processo de oxidacao de Etanol a Acido Acético por Células imobilizadas de *Acetobacter sp.*," Master Thesis, State University of Campinas (Unicamp/FEQ), Brazil.
10. Omuna, M., Omura, T., Umita, T., and Aizawa, J. (1985), *Biotech. Bioeng.* 27, 1523.
11. Furui, S. and Yamashita, K. (1985), *J. Ferment. Technol.* 63, 167.
12. Furusaki, S. and Seki, M. (1985), *J. Chem. Eng. Japan* 18, 389.

onde: P - Produtividade total de ácido acético.  
 $C_{do}$  - Concentração oxigênio dissolvido.  
 $C^*$  - Concentração de saturação do oxigênio no meio usado, 0.2115(mM)  
 Peso molecular do ácido acético, 60 (g g $mol^{-1}$ )

Para termos  $K_L a$  na unidade de (h $^{-1}$ ) usamos a equação:

$$K_L a = \frac{1000 P}{60 E_L (C^* - C_{do})} \quad (33)$$

### 3.8.6 - DETERMINAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DAS CÉLULAS IMOBILIZADAS

A produtividade total do ácido acético é:

$$P = P_i + P_L \quad (34)$$

onde:  $P_i$  e  $P_L$  são as produtividades das células imobilizadas e suspensas respectivamente.

Calculando produtividade das células suspensas através da equação (15), temos que:

$$P_i = P - 60 E_L Q_{O_2L} X_L \quad (35)$$

O fator  $60 E_L Q_{O_2L}$  foi considerado constante para as células suspensas na análise dos dados das fermentações com partículas de alginato e alginato - alumina + alginato. Esta consideração permite estimar a contribuição das células imobilizadas, para a produção de ácido acético conhecendo-se a produtividade total e a concentração de células livres.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SELEÇÃO DA CEPA

A tabela 1 mostra os resultados obtidos para as várias linhagens puras e mistas em 24 horas de fermentação no meio YG.. Observa-se que as culturas mistas produzem mais ácido do que as culturas puras.

Tabela 1 - Conversão de etanol e produção de ácido acético em 24 horas de fermentação no meio de cultura YG.

Cultura	Conversão (%)	Produção (g/l <sup>-1</sup> )
1724 (pura)	0.0	0.00
190 (pura)	0.73	0.35
2023 (mista)	28.30	13.55
2024 (mista)	16.70	8.00
2025 (mista)	26.00	12.45
2026 (mista)	63.80	30.55

Dentre as cepas mistas a 2026 foi a que apresentou o melhor desempenho. Esta cepa foi então purificada com o objetivo de comparar a sua capacidade de produção com uma cepa pura 1724 em três meios diferentes. Embora o desempenho da cepa 190 pura tenha sido um pouco melhor, optou-se pela comparação com a 1724 pelo maior conhecimento e disponibilidade de dados desta cepa na literatura.

Os meios de fermentação usados foram os meios Tese, Pre e YG. As figuras 8, 9 e 10 mostram que a cepa isolada 2026 é altamente oxidativa, obtendo-se com ela maiores conversões em menores tempos do que com a cultura 1724, embora ela não oxida o etanol tão rápido quanto a cultura 2026 mista como pode ser visto na tabela 1. Comparando-se os resultados obtidos com o meio YG na Figura 8 e tabela 1

cultura pura foi de 0.4%, enquanto que para a cultura mista foi 63.8%. Embora os melhores resultados tenham sido obtidos com culturas mistas nos experimentos subsequentes deste trabalho usou-se sempre a cultura pura para ter-se maior confiabilidade nos resultados, já que as culturas mistas variam muito facilmente as suas propriedades. Pelo decréscimo das conversões de etanol mostradas nas figuras 9 e 10 pode-se prever que a cultura 2026 oxida rapidamente o ácido acético a dióxido de carbono e água na ausência de etanol, após 70 horas de fermentação.

Nas figuras 8 e 10 pode-se observar que a linhagem 2026 é muito mais eficiente nos meios YG e tese, mais ricos em etanol, dando maiores conversões para o mesmo tempo de fermentação. Já a linhagem 1724 apresentou suas maiores conversões no meio Pre que é mais pobre em etanol.

Comparando-se os melhores resultados para ambas as cepas verifica-se a superioridade da 2026 especialmente no meio tese com conversões máximas em torno de 85%.

Assim, em base nestas comparações, escolheu-se a cepa 2026 para continuar com o trabalho.

Observou-se que as bactérias acéticas são polimorfas e Gram variáveis de acordo à etapa de vida em que se encontram e ao tipo de meio em que estejam crescendo. Assim, quando jovens e em um meio contendo ácido acético, são Gram negativas com forma de bastonetes, e formam colônias circulares, como mostram as Figuras 11 e 12.

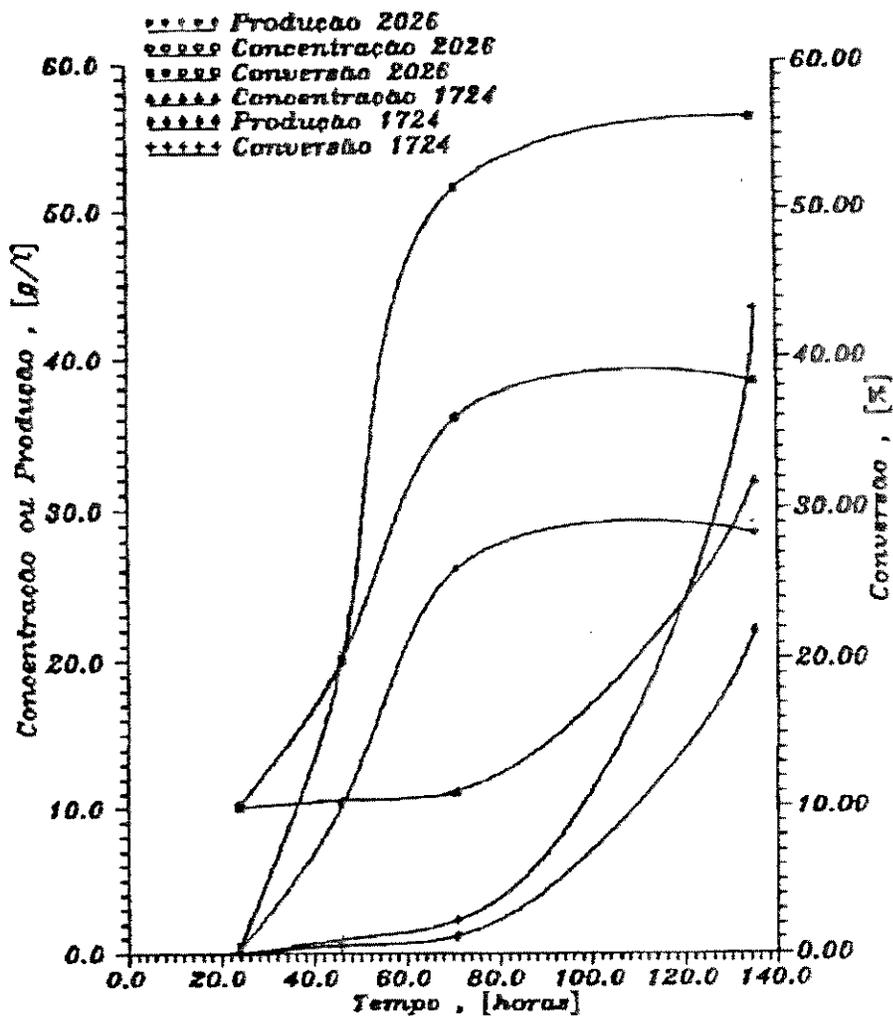


Figura 8 - Comparação da capacidade de produção de ácido acético das cepas FTPT 2026 e 1724 no meio YG. As fermentações foram feitas em frascos agitados a 180 rotações por minuto e 30 graus Celcius.

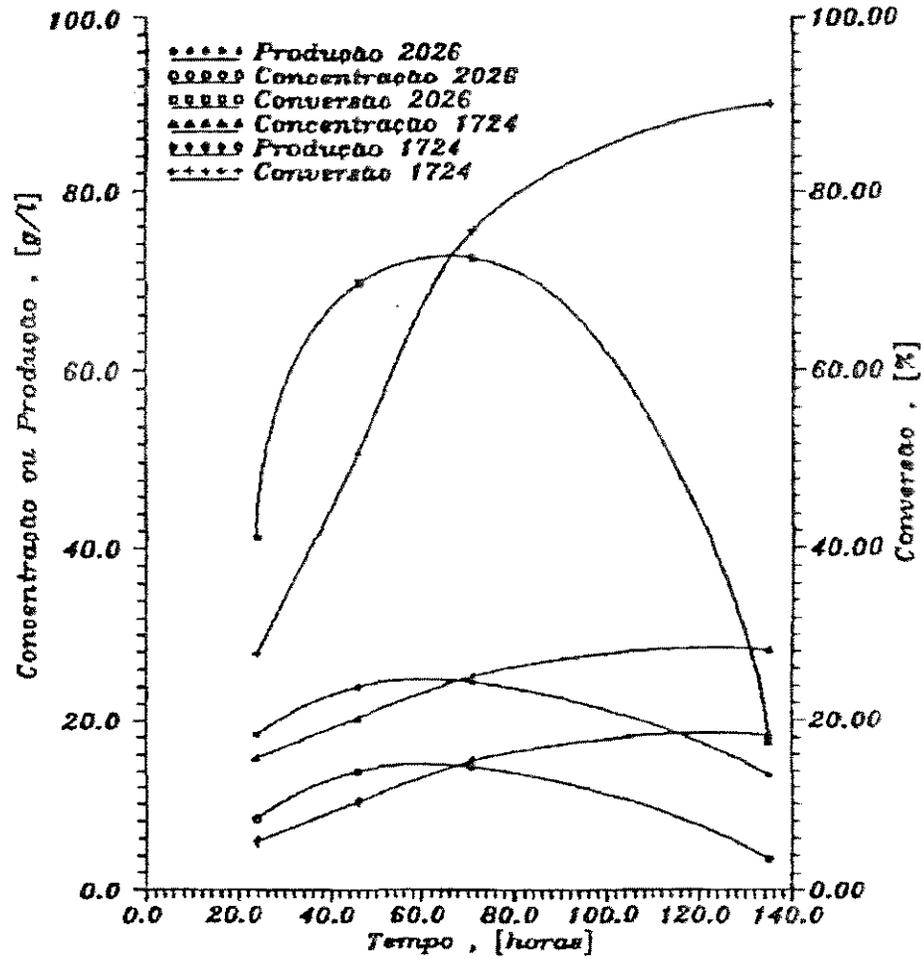


Figura 9 - Fermentações no meio PRE

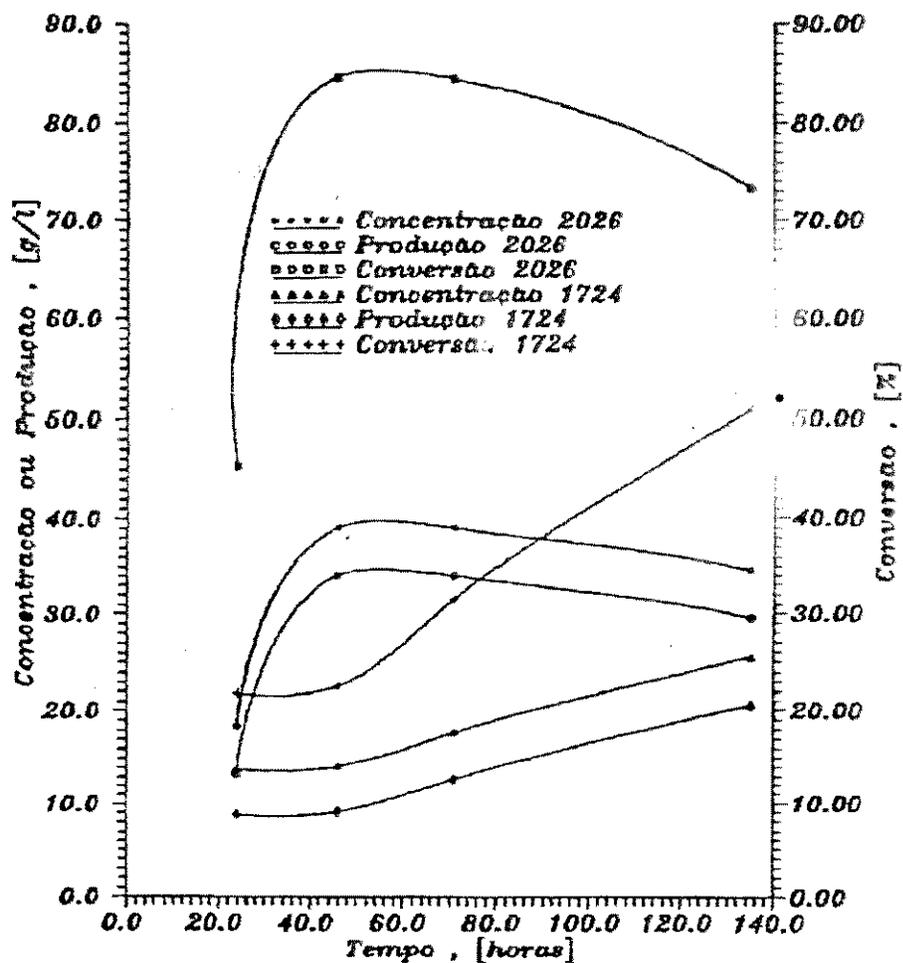


Figura 10 - Fermentações no meio TESE

#### 4.2 ESCOLHA DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

Com a cepa 2026 purificada, foram testados sete diferentes meios com os mesmos componentes do meio tese, porém apresentando variações nas concentrações de etanol, ácido acético e cloreto de cálcio.

Os resultados comparativos são mostrados nas figuras 13, 14, 15, 16 e 17.

A influência da concentração do ácido acético foi observada comparando-se os resultados obtidos com os meios 1 e 4 como mostrado na Figura 13. Com o meio 4 obteve-se conversão e produção um pouco maior de ácido acético no final da fermentação, isto deve-se à concentração inicial de ácido que no meio 1 foi de 1% e no meio 4 foi de 0.5%. Assim, no meio 1, houve uma leve inibição pelo produto, mas como mostram os resultados, a inibição só é notória quando a concentração de ácido atinge os 35 g/l, que corresponde à produção de 25 g/l no meio 1 e 30 g/l no meio 4.

Assim, no final da fermentação, com o meio 4 houve maior conversão e produção. Portanto, é melhor partir com um meio com baixa concentração de ácido, embora os riscos de contaminação sejam maiores.

Ao compararmos os meios 1 e 3, os quais diferem só na concentração de cloreto de Cálcio, observa-se que o  $\text{Ca Cl}_2$  tem um efeito inibitório na produção de ácido acético, pois a presença de 1.0 g/l de  $\text{Ca Cl}_2$  baixou a conversão 15.4% para 71 horas de fermentação, embora que para o meio 3 obteve-se maior conversão em 144 horas de fermentação, pois neste tempo no meio 1 já tinha começado a oxidação total enquanto que no meio 3 atingia-se a máxima concentração de ácido, o que mostra uma fase de latência mais prolongada no meio 3.

Comparando o meio 2 com o meio 4, que diferem só na adição de 1.0 g/l de  $\text{Ca Cl}_2$  ao meio 2 observa-se na figura 15 que com este meio obteve-se uma conversão um pouco maior; portanto, este caso apresenta uma tendência diferente do caso dos meios 1 e 3 onde vimos que, aumentando 1.0 g/l de  $\text{Ca Cl}_2$  ao meio, inibia-se a oxidação do etanol. Esta diferença talvez se explica pelo efeito que o ácido acético e o cloreto de cálcio possam ter juntos na taxa de oxidação, já que no caso 1-3, com concentrações de 10 g/l de ácido e 1.0 g/l  $\text{Ca Cl}_2$ , houve inibição, enquanto que no caso 2 - 4, com 5 g/l de ácido e 1.0 g/l de  $\text{Ca Cl}_2$ , houve um certo benefício.

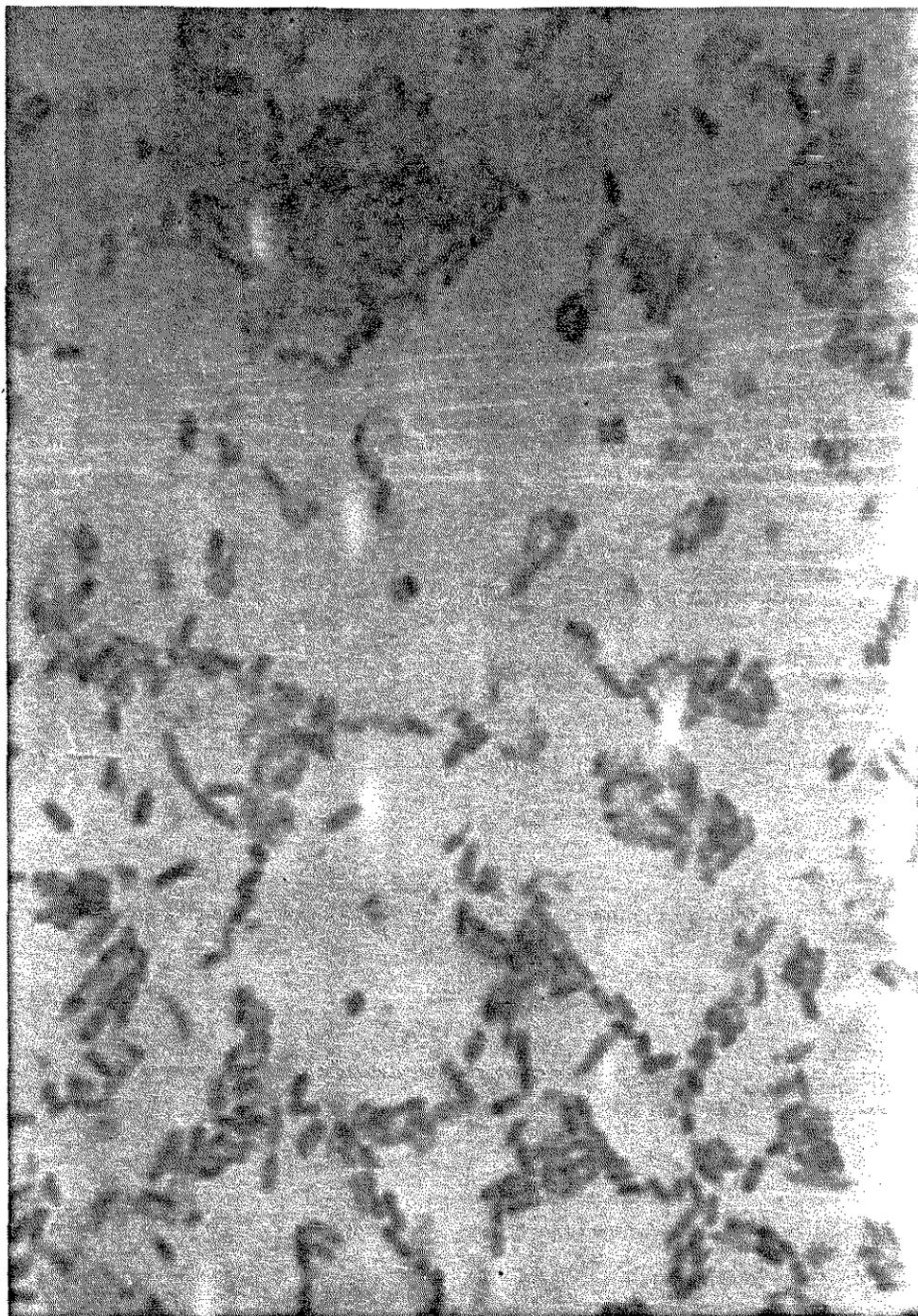


FIGURA 11 - Morfologia de células de Acetobacter s.p. FTPT 2026, submetidas à coloração de Gram após 36 horas de cultivo em meio MMA, a 30°C. Ampliação 200 vezes

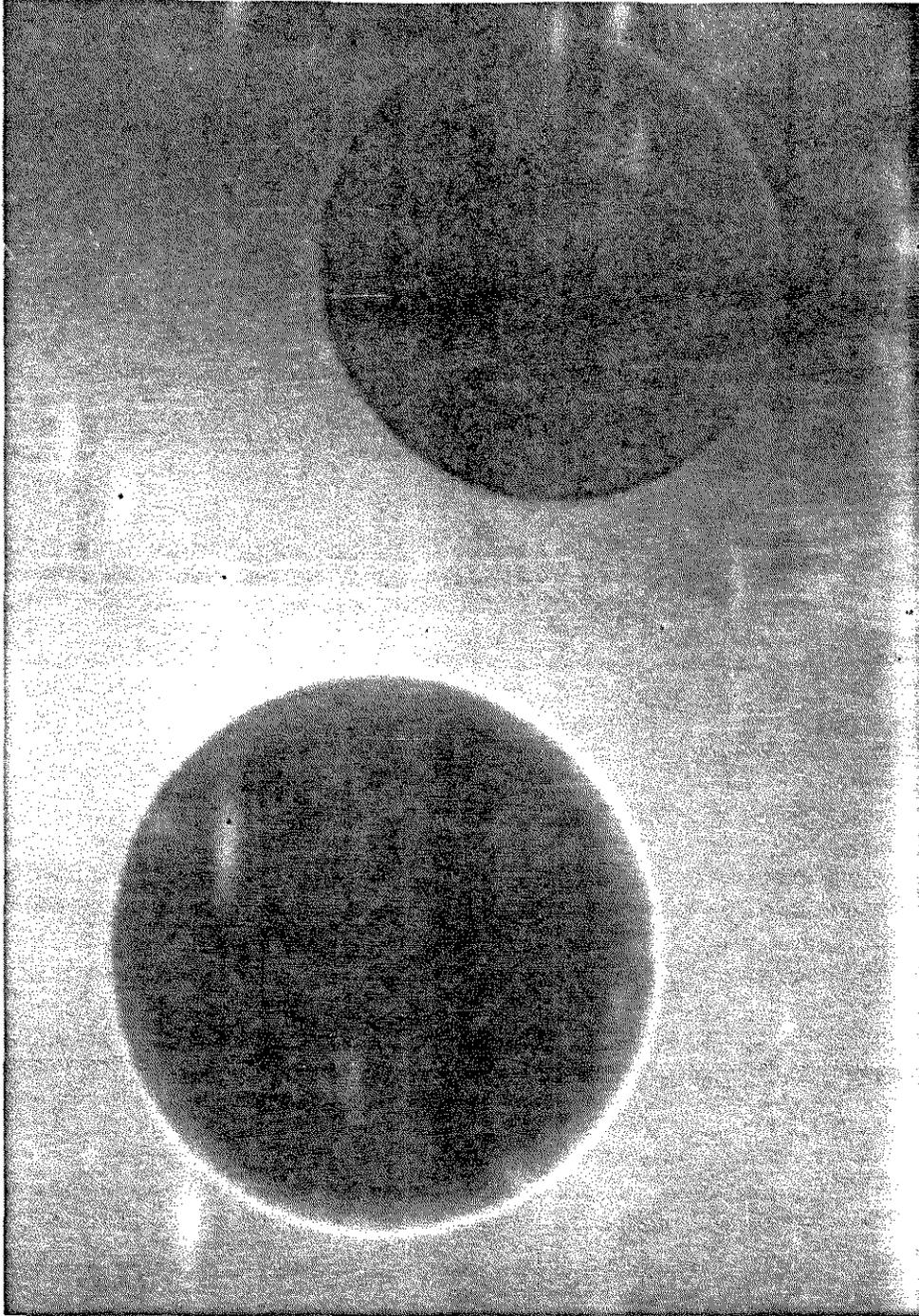


Figura 12 - Morfologia das colônias formadas com o crescimento de células de Acetobacter s.p. FTPT 2026 em meio MMA após 36 horas de incubação estável em estufa a 30°C. Ampliação de 100 vezes.

A influência da concentração de etanol foi avaliada a dois níveis de concentração de ácido acético: 5 g/l nos meios 4 e 5 e 10 g/l nos meios 1, 6 e 7.

Comparando os meios 4 e 5 na Figura 16, vemos que, ao aumentarmos 50% a concentração inicial de etanol, de 31,6 g/l a 47.4 g/l, houve uma redução na taxa de produção de ácido; a conversão com o meio 5 foi 27.5% menor que com o meio 4 para 71 horas de fermentação.

Comparando os meios 1, 6 e 7 observa-se na Figura 17 que, ao aumentarmos a concentração inicial de etanol, aumentam também os efeitos inibidores pelo substrato, sendo a fermentação mais demorada e os níveis de conversão muito baixos para concentrações acima de 47.4 g/l de etanol, com o que o processo torna-se desvantajoso.

Analisando comparativamente as Figuras 13 a 17 com a Figura 10 observamos que os melhores resultados foram obtidos com o meio tese. Este meio foi selecionado para os experimentos subsequentes.

#### 4.3 - PRESERVAÇÃO DA CEPA

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos com o cultivo das células preservadas por liofilização nos vários meios crioprotetores A, B, C e D.

**Tabela 2** - Viabilidade celular após oito dias da liofilização.

Tabela 2 Meio	Viabilidade Celular (UFC/ml)
A	$1.8 \times 10^6$
B	$8.0 \times 10^7$
C	$4.0 \times 10^7$
D	$2.0 \times 10^6$

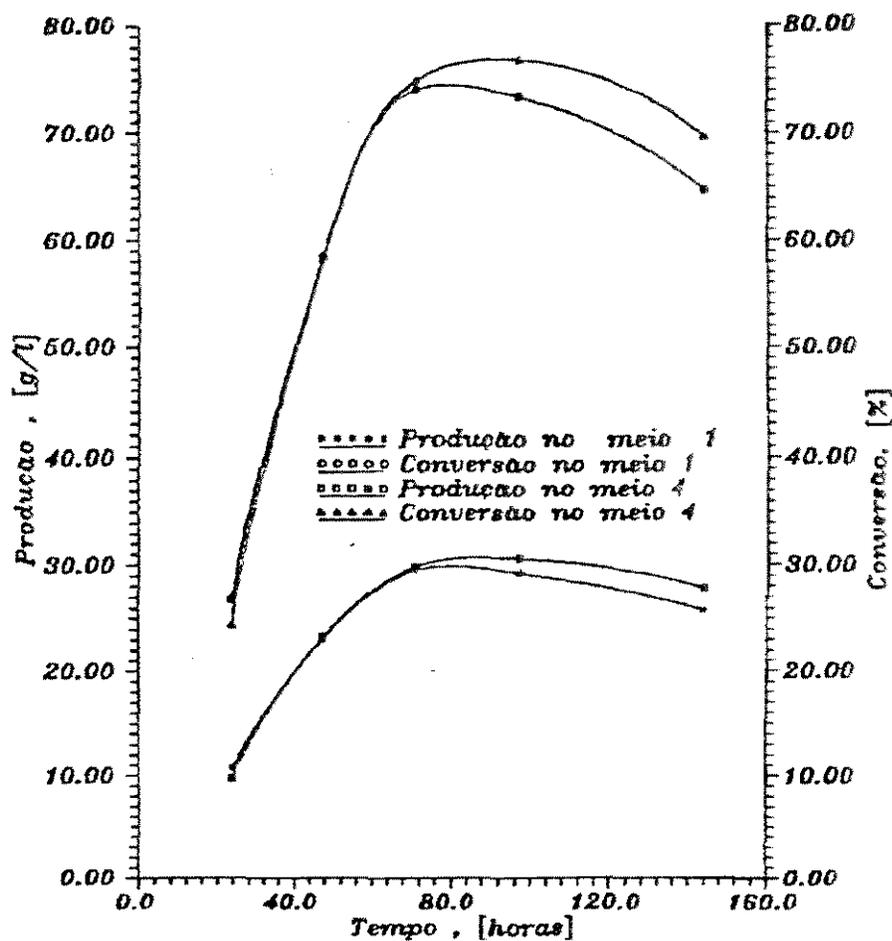


Figura 13 - Fermentação em frascos agitados a 180 rotações por minuto e 30 graus célcus com a cepa FTPT 2026 nos meios 1 e 4. A concentração inicial de ácido acético no meio 1 é 10 g/l e no meio 4 é 5 g/l.

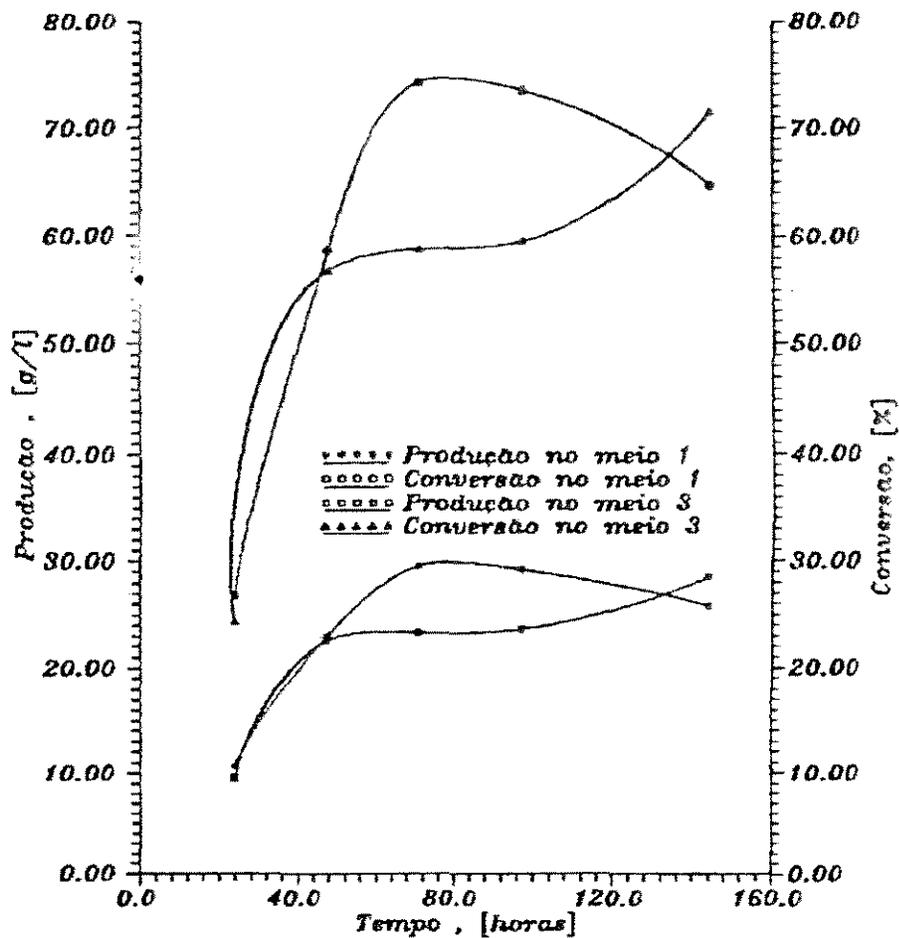


Figura 14 - Fermentação nos meios 1 e 3 com a cepa FTPT 2026, para a escolha do meio. O meio 1 não contém cloreto de cálcio, o meio 3 contém 1.0 g/l do eletrólito.

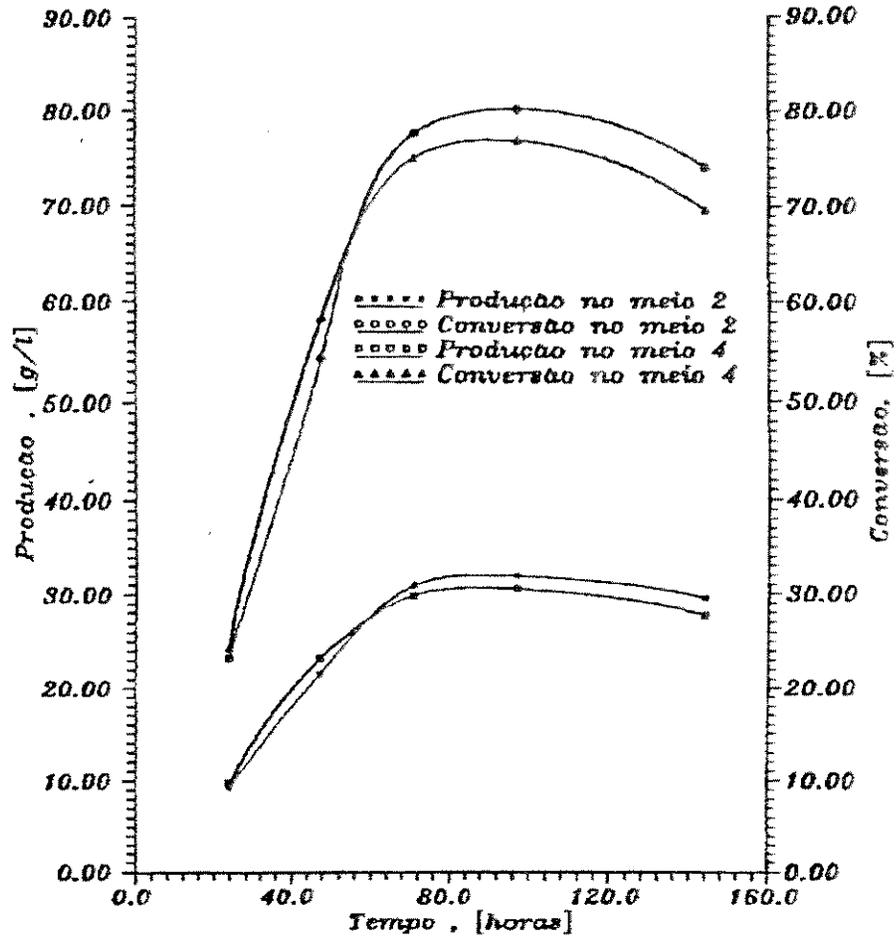


Figura 15 - Fermentação nos meios 2 e 4 com a cepa FTPT 2026 para a escolha do meio. O meio 2 contém 1.0 g/l de Cloreto de cálcio e o meio 4 não contém o eletrólito. Concentração inicial de etanol e ácido acético são as mesmas para os dois meios.

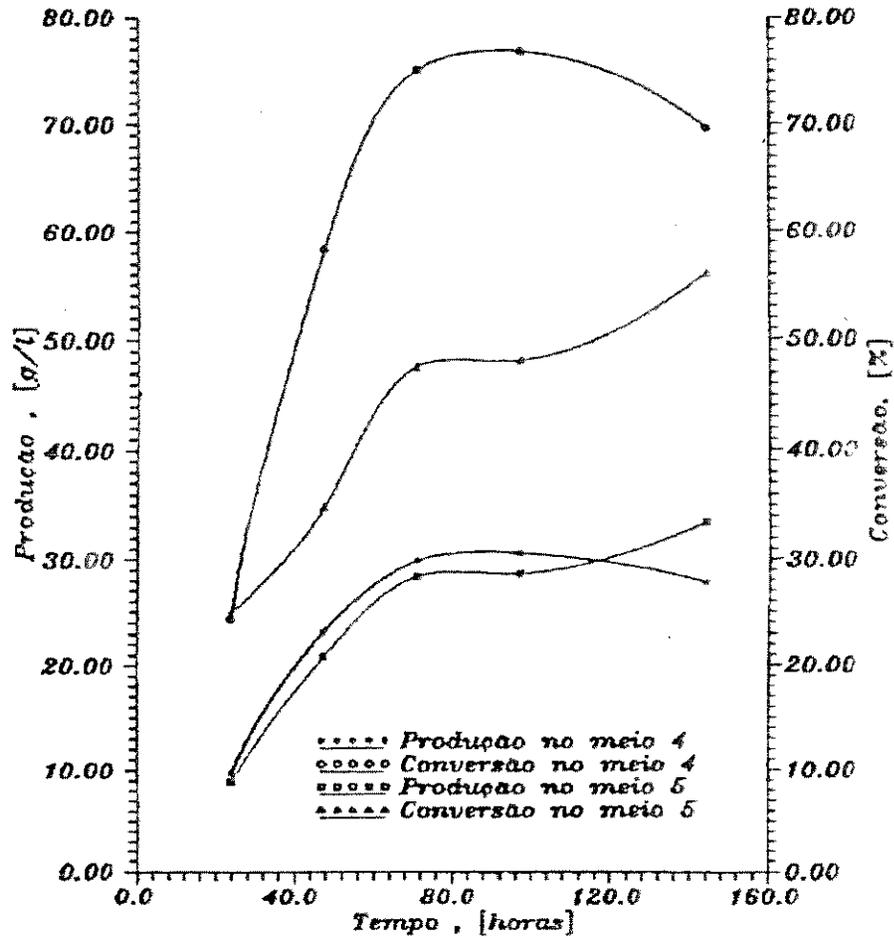


Figura 16 - Fermentação nos meios 4 e 5 com a cepa FTPT 2026 para a escolha do meio. A concentração inicial do etanol é de 47.4 g/l no meio 5 e de 31.6 g/l no meio 4. A concentração inicial de ácido acético é de 5g/l nos dois meios.

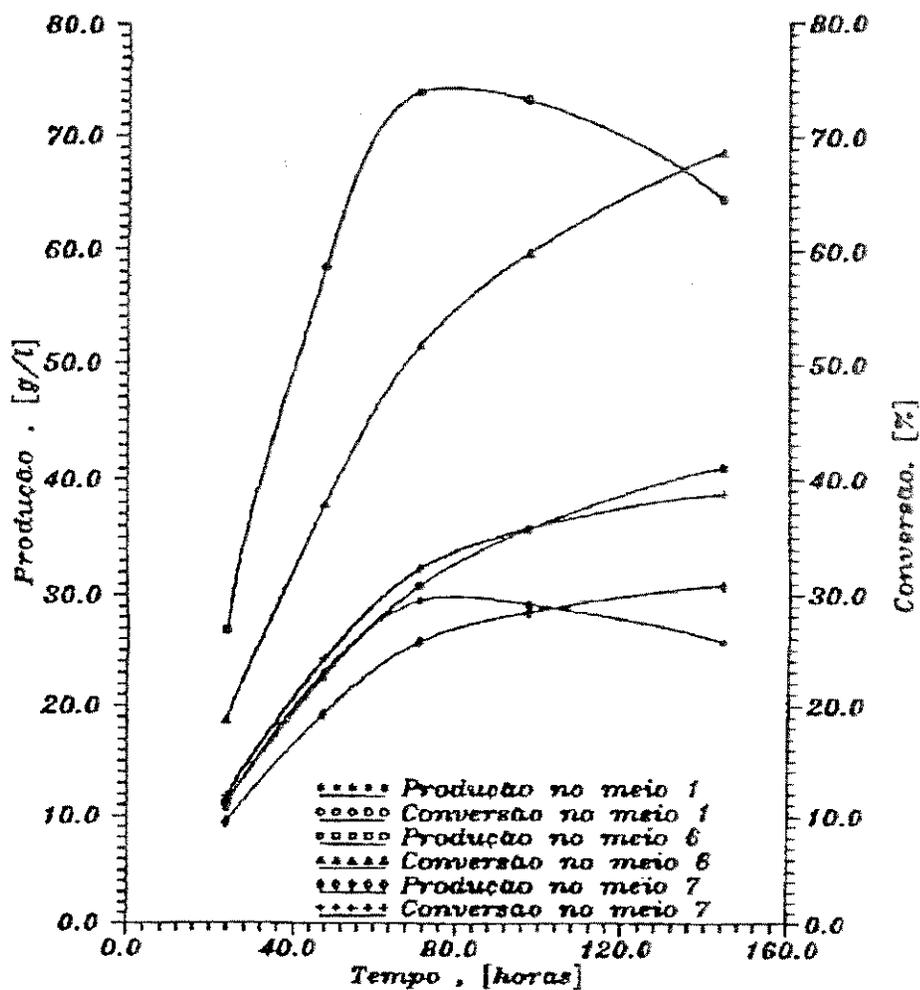


Figura 17 - Fermentação nos meios 1, 6 e 7 com a cepa FTPT 2026 para a escolha do meio. A concentração inicial de etanol é 31.6 g/l no meio 1, 47.4 g/l no meio 6 e 63.2 g/l no meio 7. A concentração inicial de ácido acético para os três meios é 10 g/l.

Observa-se que com os meios B, C e D não houve muita variação na viabilidade celular em relação ao valor inicial,  $2 \times 10^8$  UFC/ml, enquanto que com o meio A a redução da viabilidade foi significativa.

Com estes resultados escolhemos o meio crioprotetor D, para a preservação da cepa FTPT 2026, e liofilizamos suficiente material para todo o trabalho.

#### 4.4 - INIBIÇÃO PELO PRODUTO E/OU SUBSTRATO NA TAXA ESPECÍFICA DE RESPIRAÇÃO

A figura 18 mostra que o ácido acético é um forte inibidor da taxa de respiração específica da bactéria acética usada. A partir de aproximadamente 14.2 g/l, a inibição torna-se notória e acima de 35 g/l de ácido acético, o consumo de oxigênio é muito baixo, tornando-se imperceptível para concentrações acima de 73 g/l. Nesta mesma figura, vê-se que o etanol também é um inibidor da taxa de respiração específica, embora o feito não seja tão grande. Até 100 g/l de etanol a inibição não é muito forte e para a concentração de 100.8 g/l de etanol e 1.6 g/l ácido acético, a taxa de respiração específica é 324.89 mM/g.h, 7% maior que a taxa de respiração para a concentração de 30.4 g/l etanol e 5.8 g/l ácido acético, o que indica que o fator principal da inibição na fermentação acética é a concentração do produto. Assim, concluímos que a bactéria usada tem uma boa tolerância ao etanol, apresentando pouca inibição para elevadas concentrações do álcool, o que é devido a que esta bactéria está adaptada a elevadas concentrações de etanol pois foi isolada de uma usina de álcool, no entanto o ácido acético a inibe facilmente. Resultados semelhantes foram obtidos por Y. Sun e S. Furusaki (49) para a linhagem Acetobacter aceti IAM 1802 para a qual os efeitos inibidores pelo ácido acético na taxa de respiração acentuaram-se a partir de 19 g/l de ácido.

As figuras 19 e 20 mostram o consumo de oxigênio em função do tempo para diferentes concentrações de etanol e ácido acético, para a mesma concentração celular. Nota-se que, ao aumentarmos a concentração total, tanto de etanol como de ácido acético, o consumo torna-se mais lento, o que indica a presença de inibição na taxa de respiração.

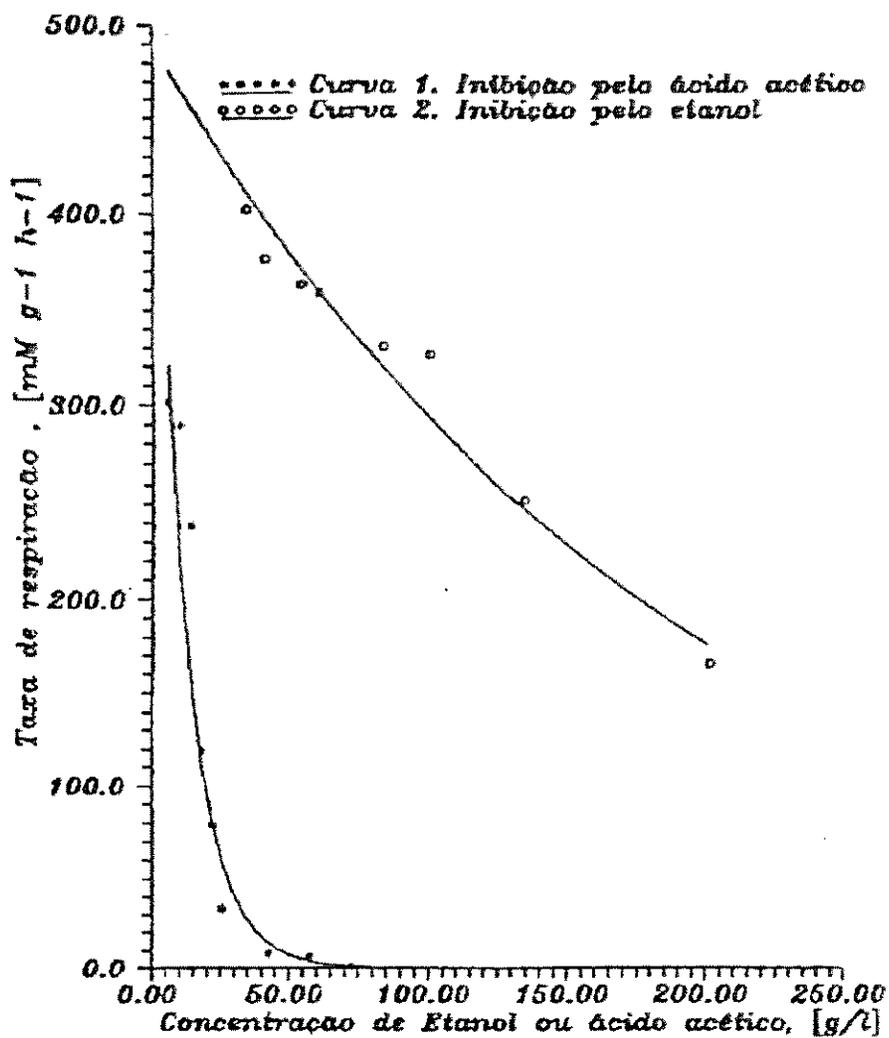


Figura 18 - Taxa específica de respiração em função da concentração do ácido acético ou etanol. Na curva 1 o etanol foi fixado em 30.4 g/l e na curva 2 o ácido acético foi fixado em 1.6 g/l.

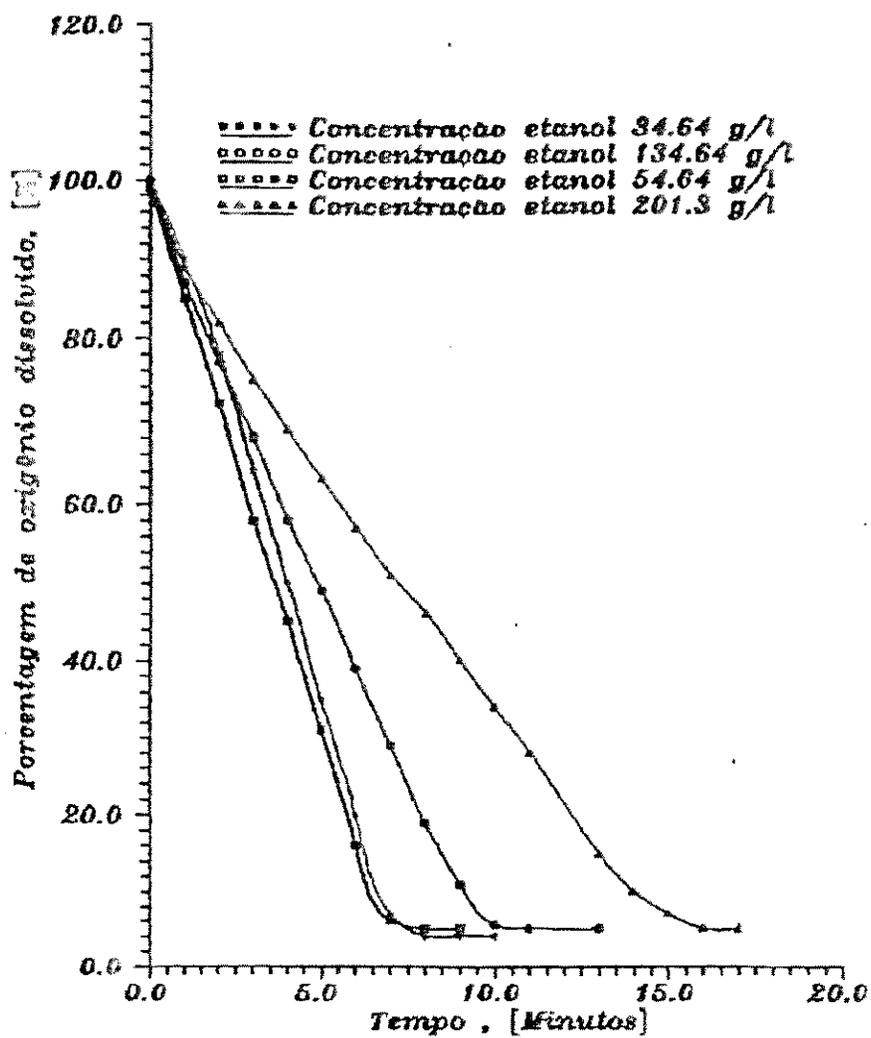


Figura 19 - Consumo de oxigênio em função do tempo para diferentes concentrações de etanol. Concentração de ácido acético de 1.6 g/l.

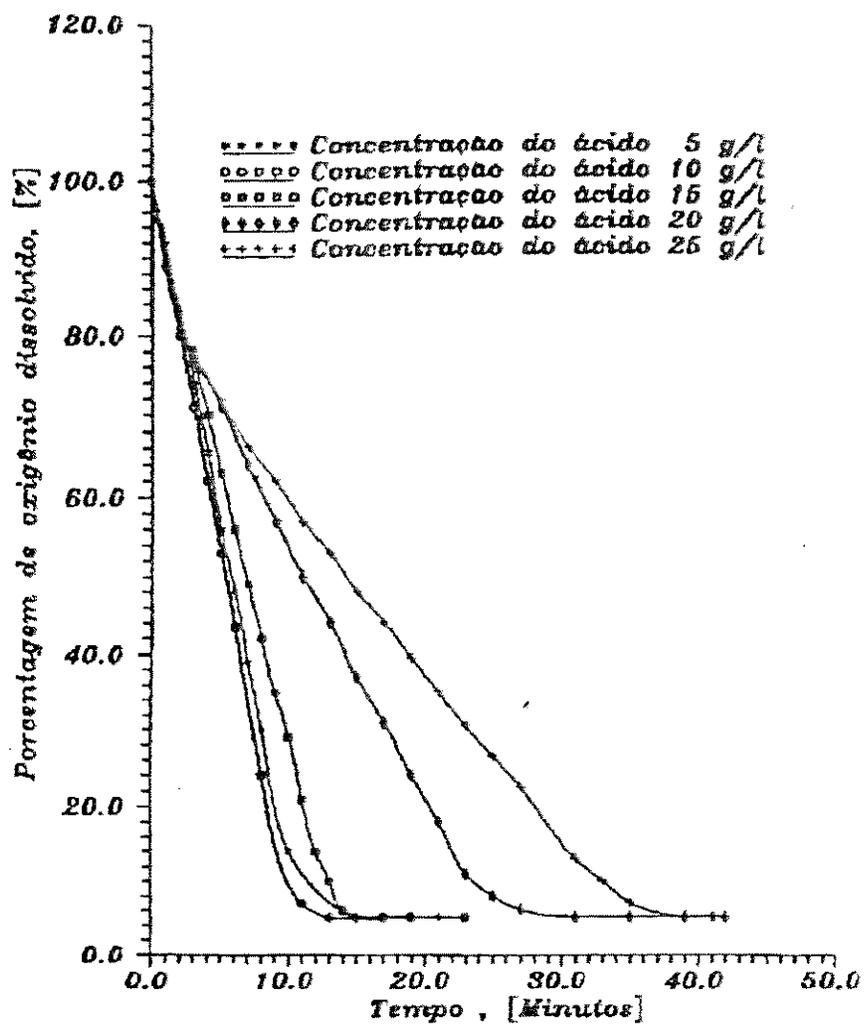


Figura 20 - Consumo de oxigênio em função do tempo para diferentes concentrações de ácido acético. Concentração de etanol de 30.4 g/l.

#### 4.5 - TAXAS ESPECÍFICAS DE RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS LIVRES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Ca Cl<sub>2</sub>

Nas figuras 14 e 15 observou-se que a concentração do eletrólito Ca Cl<sub>2</sub> poderia inibir ou favorecer as conversões na fermentação acética, em função da concentração de ácido. Para baixas concentrações de ácido acético o efeito poderia ser benéfico. Com o objetivo de determinar o efeito do Ca Cl<sub>2</sub> na taxa de respiração de células para baixas concentrações de ácido e determinar uma concentração adequada do gelificante no processo de imobilização, determinou-se a taxa específica de respiração de células livres em função da concentração do Ca Cl<sub>2</sub> para o meio de fermentação Tese.

A figura 21 mostra que há um aumento na taxa de respiração específica para concentrações de Ca Cl<sub>2</sub> entre 0.0 e 0.2M, após isto, a taxa de respiração começa a diminuir. A inibição à taxa de respiração específica pelo eletrólito é acentuada quando as concentrações são maiores do que 0.4M. O consumo de oxigênio é somente 35% para as células num meio de concentração 1.0M Ca Cl<sub>2</sub> comparado com um meio isento do eletrólito. O uso de concentrações de Ca Cl<sub>2</sub> em torno de 0.2M na gelificação, conduz a biocatalisadores mais ativos apesar da perda na resistência mecânica das partículas.

#### 4.6 - TAXAS ESPECÍFICAS DE RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS DE IMOBILIZAÇÃO

Nestes experimentos, a concentração de sólidos foi fixada em 4% (p/v) e a temperatura em 10 °C, enquanto o tempo de gelificação, a concentração de Ca Cl<sub>2</sub> e a concentração celular foram variadas. A temperatura de gelificação foi fixada em 10 °C para diminuir a atividade metabólica das células.

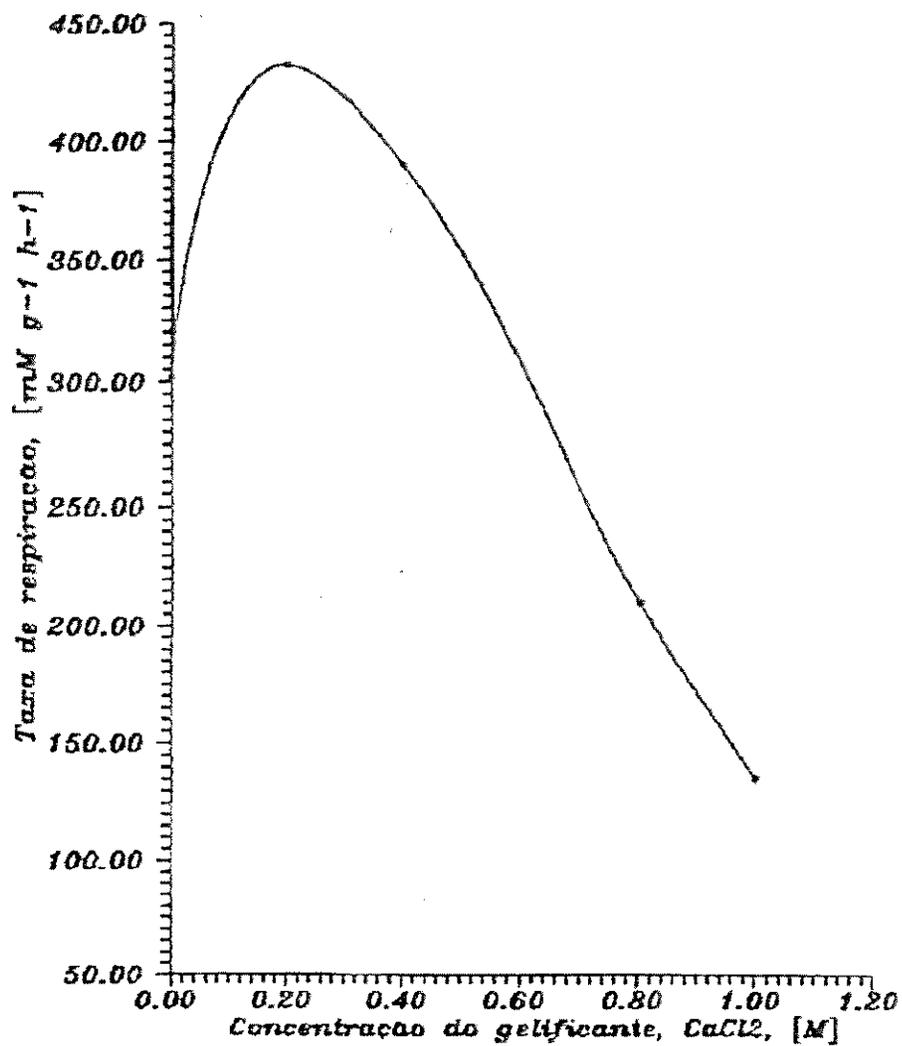


Figura 21 - Taxa específica de respiração de células livres em função da concentração do cloreto de cálcio no meio teste.

A tabela 3 mostra que ao aumentar o tempo de gelificação, a taxa específica de respiração diminui. A redução pode provavelmente ser devida à falta de nutrientes, especialmente oxigênio. A máxima redução na taxa de consumo de oxigênio para as partículas de alginato expostas a uma solução 0.2M de Ca Cl<sub>2</sub> por 20 minutos a 20 horas, é cerca de 30%.

**Tabela 3** - Taxa de consumo específico de oxigênio em função do tempo de gelificação e a concentração de Ca Cl<sub>2</sub> para as células imobilizadas em alginato e  $\alpha$ - alumina + alginato. A concentração celular é X = 0.075 g de massa seca /Kg gel.

Tempo de Gelificação	Ca Cl <sub>2</sub>	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>
	Concentração (M)	Alginato (mM / g.h)	$\alpha$ - alumina + alginato (mM / g .h)
20 min	0.2	365.33	306.8
40 min	0.2	337.50	273.35
20 hs	0.2	255.73	233.44
	0.5	247.5	202.95
	1.0	247.5	202.95

Para as partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato, a máxima diminuição na taxa de consumo específico de oxigênio é 24%, isto deve-se a que com este biocatalisador o esgotamento do oxigênio é mais lento; assim depois de 20 horas de exposição há mais oxigênio disponível para as células vivas, então o dano é menor.

A taxa de consumo específico de oxigênio das células imobilizadas diminui com o aumento da concentração de Ca Cl<sub>2</sub> usada na gelificação. A máxima diminuição para as partículas de alginato é 3 % e 13% para as partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato.

Da figura 21 vê-se que a taxa de respiração específica de células livres no meio Tese sem  $\text{CaCl}_2$  é 301.6 mM/g.h, desta forma, menor que os valores encontrados para as células imobilizadas numa solução de 0.2M de  $\text{CaCl}_2$  por 20 ou 40 minutos. Indiferente às limitações difusionais, a taxa específica de respiração observada para as células imobilizadas foi maior que para as células livres. Isto pode ser devido a uma mudança fisiológica causada pelo eletrólito.

As tabelas 3 e 4 mostram que quando se aumenta a quantidade de células imobilizada há uma diminuição acentuada na taxa de consumo específico de oxigênio. Isto é devido a que as limitações difusionais foram aumentadas ao redor das células devido ao excesso de biomassa; assim menos células viáveis existirão dentro do biocatalisador.

Tabela 4 - Taxa de Consumo específico de oxigênio como função do tempo de gelificação e a concentração de  $\text{CaCl}_2$  para as células imobilizadas em alginato e  $\alpha$ -alumina + alginato. A concentração celular é  $X = 3.7$  g (ps) / Kg. gel.

Tempo de gelificação	Concentração de $\text{CaCl}_2$ (M)	$Q_{O_2}$ Alginato (mM / g.h)	$Q_{O_2}$ $\alpha$ -alumina + alginato (mM / g. h)
20 min	0.2	9.04	7.55
40 min	0.2	8.72	7.15
20 hs	0.2	0.874	0.72
	0.5	0.83	0.69
	1.0	0.75	0.62

O consumo de oxigênio para as partículas de  $\alpha$ -alumina + alginato é menor que para as partículas de alginato. As células imobilizadas em partículas de  $\alpha$ -alumina + alginato consomem o oxigênio 18% mais lentamente

que as células imobilizadas em partículas de alginato. Possivelmente, este efeito pode ser atribuído à presença de poros menores nas partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato, reduzindo desta forma a difusividade do oxigênio, ou a algum efeito negativo da  $\alpha$ - alumina sobre a viabilidade celular

A Figura 22 mostra a fotografia de uma partícula corada com safranina onde pode-se observar o número elevado de microcolônias de Acetobacter crescidas na superfície da partícula de  $\alpha$ - alumina + alginato, o que mostra ser possível imobilizar o Acetobacter em este tipo de material e ter um bom crescimento celular.

A figura 23 apresenta em mais detalhe as microcolônias formadas na superfície da partícula, e a figura 24 mostra que as bactérias crescem mais acentuadamente na superfície da partícula.

Destas fotografias, observa-se que as microcolônias não crescem em toda a superfície do gel e sim em certos pontos localizados, o que leva a acreditar que estas microcolônias crescem só nos poros da partícula devido à presença de células mães dentro destes poros. Não há microcolônias em toda a superfície do gel devido a que o atrito a que estão submetidas não permite a sua formação, a não ser nos poros onde as células estão em contato com outras células que se encontram dentro do gel servindo assim de âncora para as células que estão na superfície.

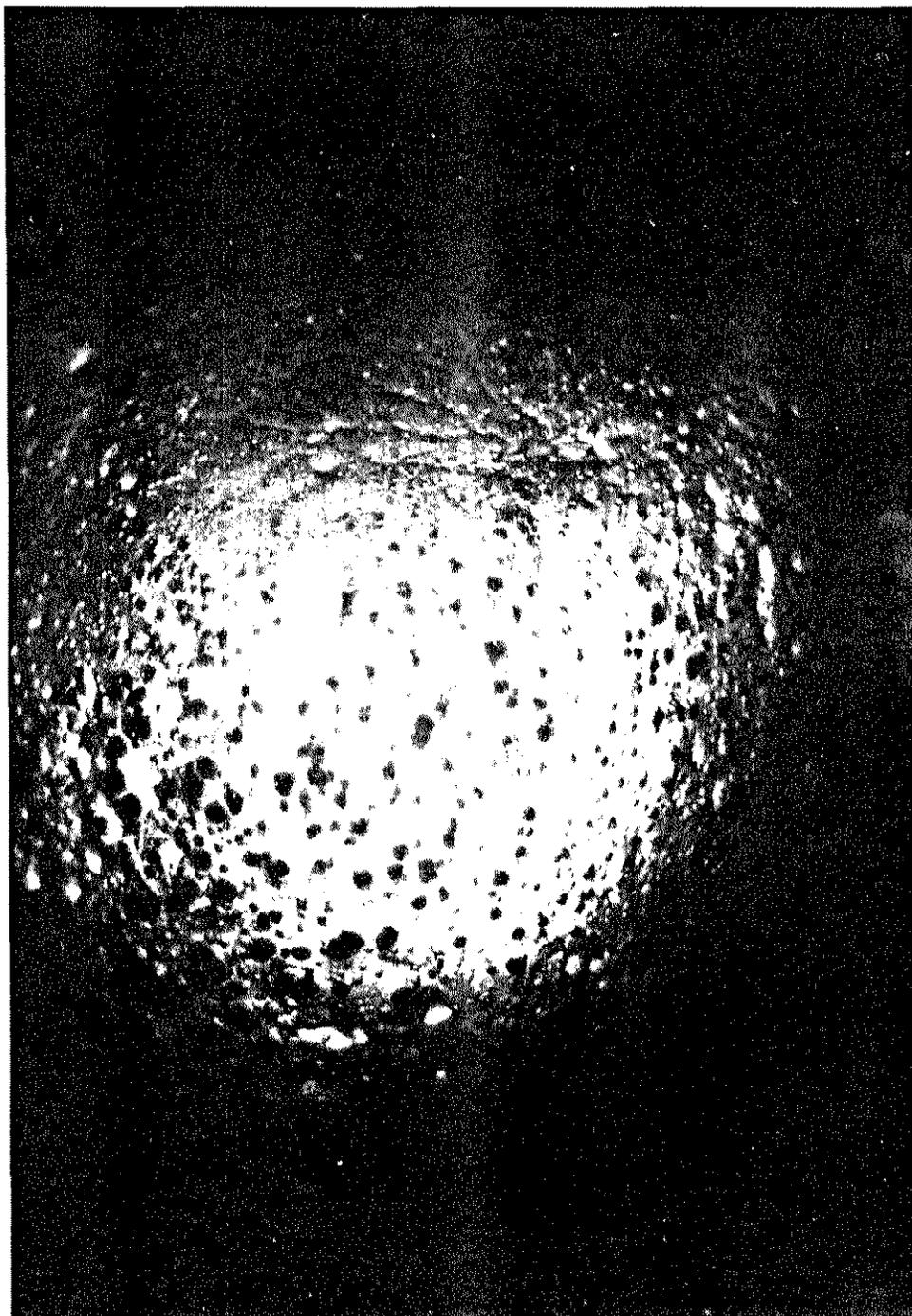


Figura 22 - Crescimento de células de *Acetobacter* s.p. FTPT 2026 na superfície de uma partícula de gel de alginato +  $\alpha$ -alumina após 48 horas de fermentação contínua, a 30°C. Ampliação 100 vezes.



Figura 23 - Detalhe das microcolonias de Acetobacter formadas na superfície da partícula de alginato +  $\alpha$ - alumina. A Fotografia foi feita utilizando partículas previamente coradas com safranina. Ampliação: 200 vezes.

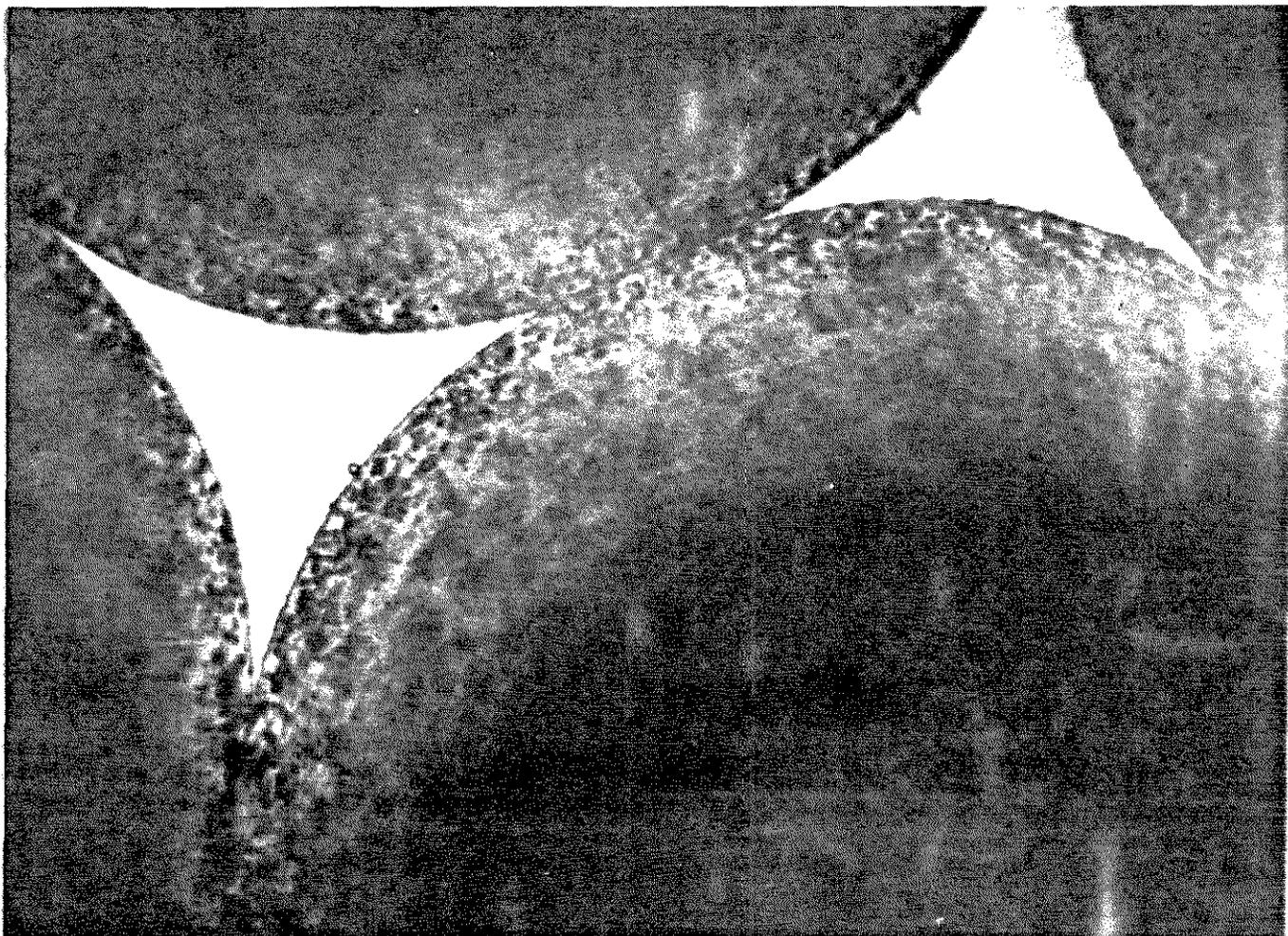


Figura 24 - Corte transversal das partículas de biocatalisador após 48 horas de fermentação. Detalhe da forma esférica das partículas e da concentração das colônias na região periférica. Ampliação: 100 vezes.

#### 4.7 - DENSIDADE DAS PARTÍCULAS E MASSA CELULAR NO GEL

A densidade das partículas de alginato determinada pelo método do picnômetro foi de  $1030 \text{ kg/m}^3$ , enquanto que a densidade das partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato foi de  $1270 \text{ kg/m}^3$ . Em concordância com estes resultados Adlercreutz (24) encontrou que a densidade das partículas de alginato 2% peso/volume é  $1027 \text{ kg/m}^3$ , valor semelhante ao encontrado.

A concentração celular no gel de alginato foi de 10 g massa seca/L de gel, e 12 g massa seca/L de gel nas partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato. Y. Sun e S. Furusaki; (49) encontraram que a concentração celular no gel de alginato por eles usado, foi de 24.9 g massa seca/L de gel, portanto maior que o valor que encontramos. Isto deve-se provavelmente ao tipo de alginato de sódio, à concentração de alginato e do eletrólito usados. Estes fatores influenciam na porosidade das partículas que determina a máxima quantidade de células que poderá estar imobilizada.

#### 4.8 COEFICIENTE DE DIFUSÃO

Das figuras 25 e 26 determinamos as taxas de respiração das células imobilizadas a partir da inclinação das curvas e calculamos o fator de efetividade para as partículas de 1.7 mm de diâmetro que foram usadas na operação contínua do biorreator.

Os valores usados no cálculo da espessura do filme foram:

$\rho$   $1030 \text{ kg / m}^3$  para as partículas de alginato ou  $1270 \text{ kg / m}^3$  para as partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato

$\rho$  (água a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) =  $995.67 \text{ kg/m}^3$   
 $v_L$  (água a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) =  $0.801 \times 10^{-3} \text{ Kg / m.s}$

$$D_{O_2} \text{ (água a } 30 \text{ } ^\circ\text{C)} = 2.74 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$$

$$d_p \text{ (diâmetro partícula)} = 0.0017 \text{ m ou } 0.0001 \text{ m}$$

A espessura do filme é desprezada pois  $b \leq 1 \times 10^{-3}$  cm. Os parâmetros cinéticos intrínsecos de células imobilizadas são dados por:

$$\text{OUR}_{\text{led}} = 1.20674 \text{ mg/L.min} \quad K_m = 3.74416 \times 10^{-4} \text{ mM}$$

As taxas de respiração em partículas de alginato e alginato  $\alpha$ - alumina de 1.7 mm de diâmetro são:

$$\text{OUR}_{\text{alginato}} = 0.74448 \text{ mg / L. min}$$

$$\text{OUR}_{\alpha\text{-alumina}} = 0.609404 \text{ mg / L.min}$$

Com estes valores encontramos  $N$ ,  $B$ ,  $\phi$  e por último,  $De_{\text{eff}}$ .

Para células em partículas de alginato de 1.7 mm, com efeitos difusivos, a taxa específica de respiração foi igual a aquela das células livres, enquanto que para células em partículas de 0.1 mm, sem efeitos difusivos, a taxa específica de respiração foi 38.3% maior que aquela para células livres. Estes resultados mostram que as células imobilizadas são mais ativas que as células livres. É provável que ocorra mudanças no metabolismo celular.

O fator de efetividade para as partículas de alginato de 1.7 mm de diâmetro foi de  $N = 0.6169$ , enquanto que para as partículas de  $\alpha$  alumina + alginato foi de  $N=0.505$ .

A difusividade do oxigênio nas partículas de alginato é  $4.567 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  e  $3.592 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  para as partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato. Assim, a presença de  $\alpha$ - alumina diminui a difusividade de oxigênio e isto pode ser devido à presença de poros menores nestas partículas.

Estes valores representam 1.6% para o alginato e 1.3% para a  $\alpha$ - alumina + alginato, em relação à

difusividade do oxigênio na água pura a 30°C. Estes valores são menores que aqueles encontrados por Y. Sun e S. Furuşaki, (23), entre 55 a 86%, e Hiemstra e colaboradores (25), 25% da água pura. Esta diferença evidencia a relação entre o coeficiente de difusão e as variáveis de preparação dos biocatalisadores, ~~tais como o tipo e~~ concentração do alginato de sódio, concentração celular e de cloreto de cálcio, tempo e temperatura de gelificação. A determinação da difusividade torna-se importante, devido à controversia entre os valores apresentados na literatura para géis hidrofílicos.

#### 4.9 - DISTRIBUIÇÃO DOS TEMPOS DE RESIDÊNCIA NO REATOR

As figuras 27 e 28 mostram as curvas teórica e experimental para a distribuição dos tempos de residência do fluido no reator.

Observa-se pelas figuras que o reator apresenta comportamento de mistura perfeita pois os resultados teóricos (para o CSTR ideal) e experimentais coincidem. O tempo de residência calculado, considerando-se a vazão de alimentação e o volume do reator, coincidiu com o tempo de residência obtido a partir da função de distribuição dos tempos de residência *DTR*. A máxima diferença foi de 10.1%.

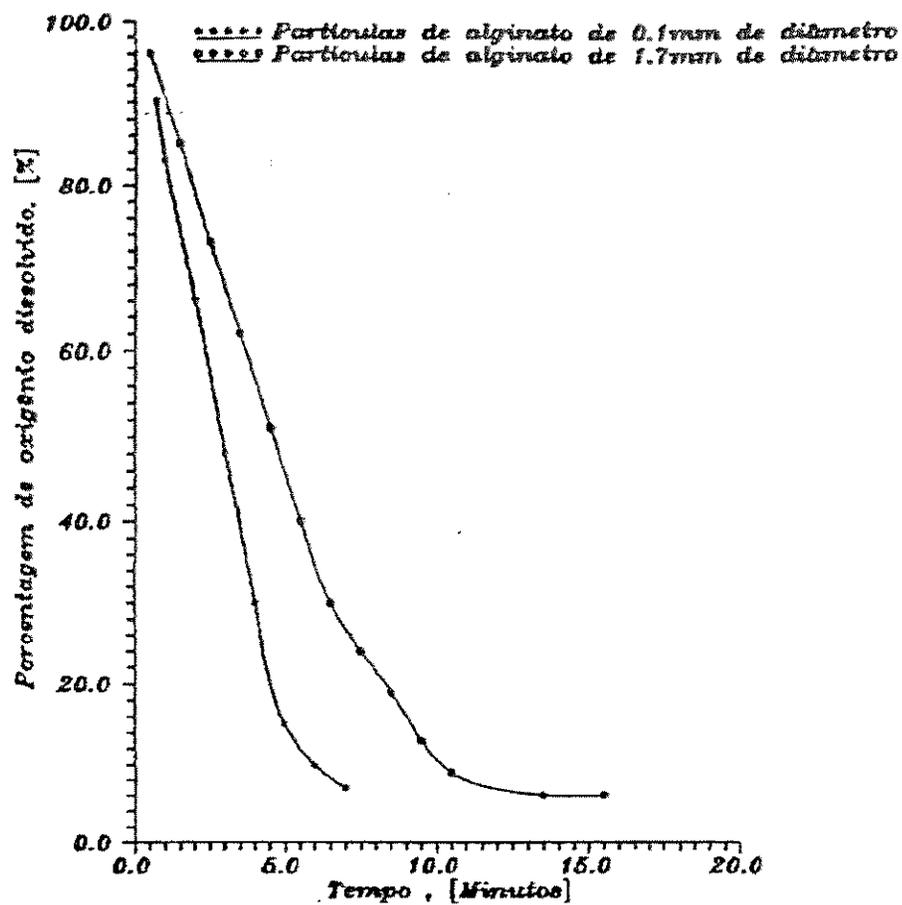


Figura 25 - Consumo de oxigênio dissolvido por células imobilizadas em função do tempo, para a determinação do coeficiente de difusão em partículas de alginato.

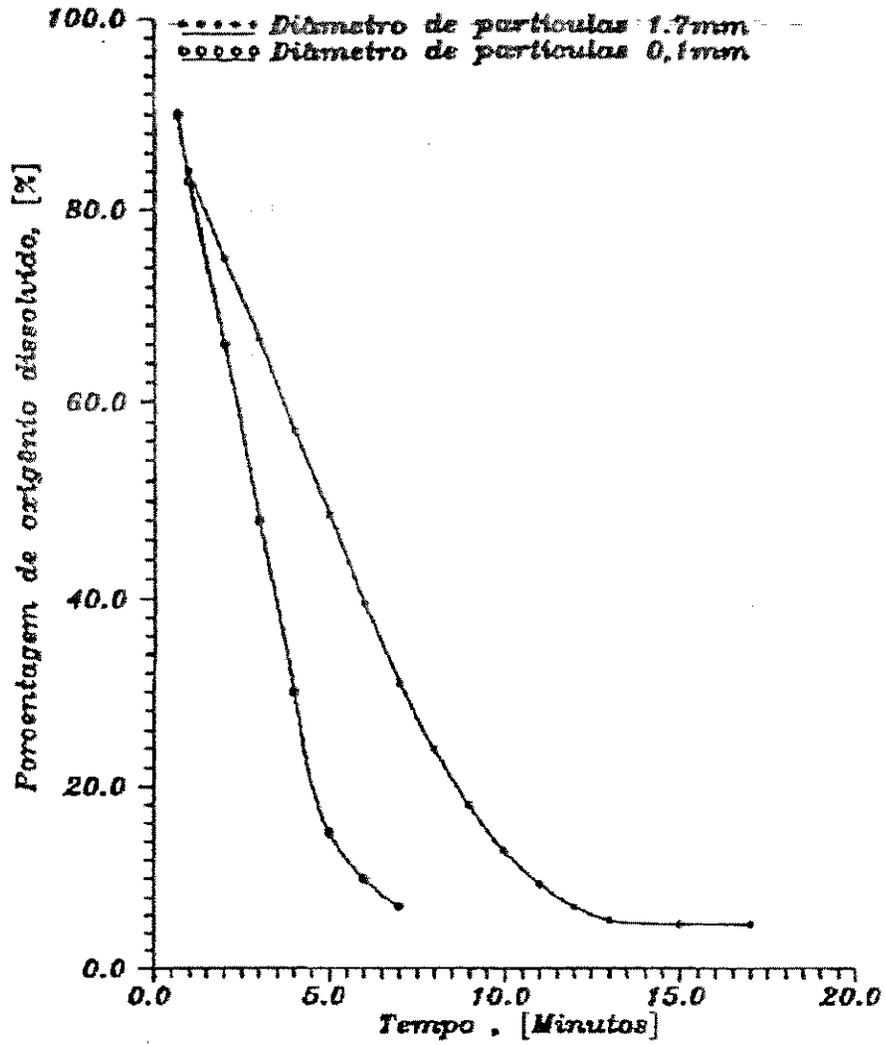


Figura 26 - Consumo de oxigênio dissolvido por células immobilizadas em partículas de - alumina + alginato de diâmetros diferentes, para a determinação do coeficiente de difusão.

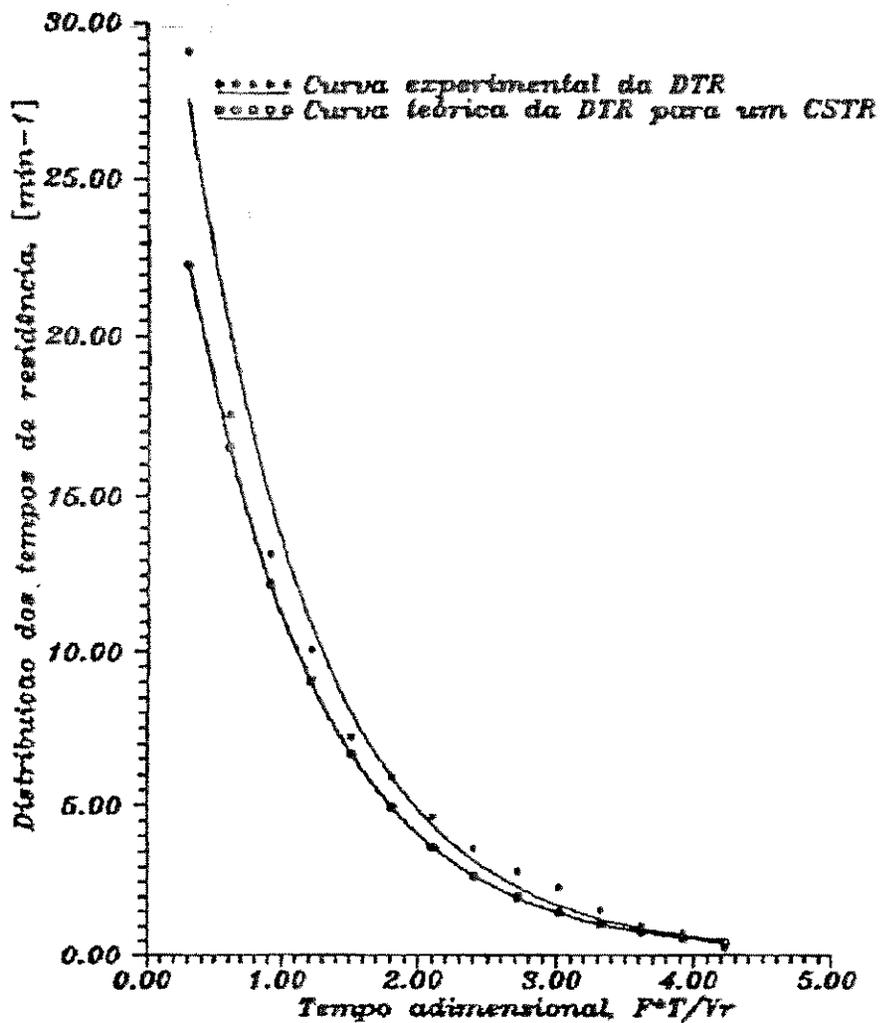


Figura 27 - Distribuição de tempos de residência para o reator de bolhas sem células. Tempo de residência teórico de 33.12 min, tempo de residência experimental de 36.86 min. Volume do reator  $V_r = 265$  ml, vazão específica de ar de 4.5 vvm.

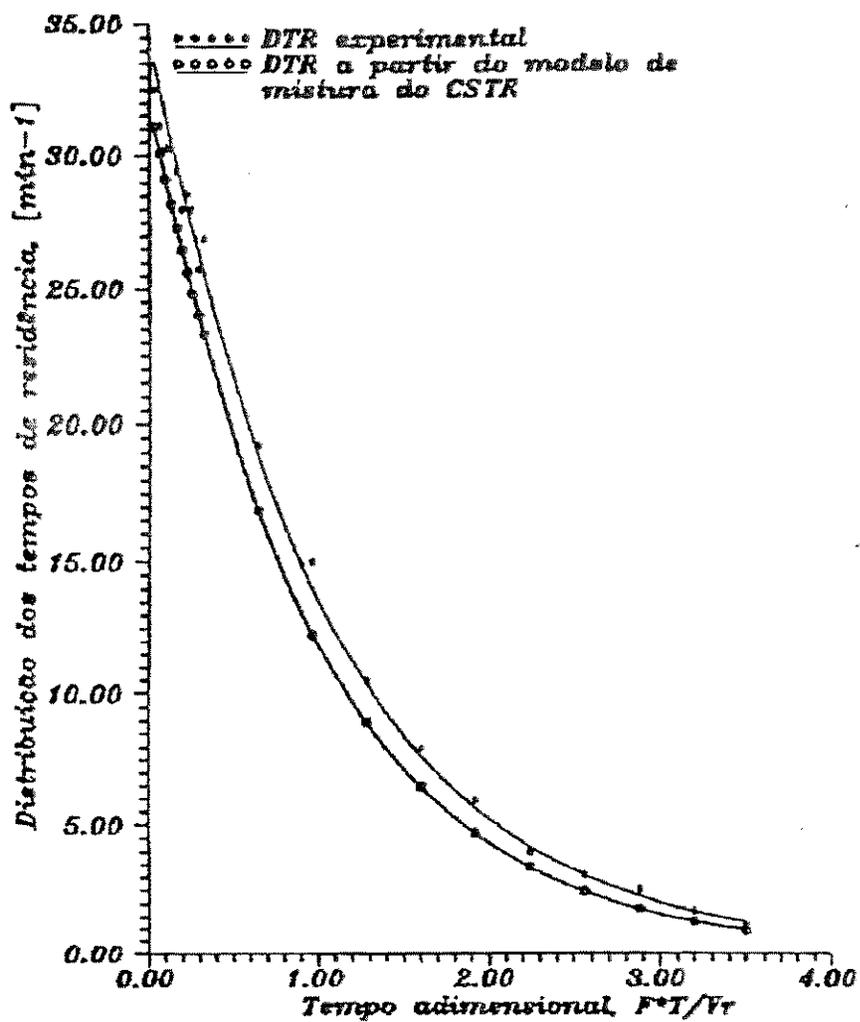


Figura 28 - Distribuição de tempos de residência para o reator trifásico. Vazão específica de ar de 4.5 vvm, volume do reator 265 ml, conteúdo de sólido de 0.1098. Partículas de alginato. Tempo de residência teórico de 31,176 min, tempo de residência experimental de 32.06 min.

#### 4. 10 - CORRIDAS EM BATELADA

As figuras 29 e 30 mostram os resultados dos primeiros resultados conduzidos em batelada.

A figura 29 mostra que, com células imobilizadas, obteve-se os valores máximos de conversão em torno de 30 % em 49 horas de fermentação e através de um balanço de massa de etanol encontrou-se que 30 g/l ou 75% da quantidade inicial de etanol tinha evaporado em 42 horas.

Com células livres, figura 30, observou-se a mesma tendência, mas a conversão foi mais rápida e não houve portanto a mesma evaporação de etanol. Os valores máximos de conversão estiveram em torno de 50% em aproximadamente 45 horas de fermentação.

Nestas corridas observa-se que os efeitos de transferência de massa têm um papel muito importante pois há uma maior taxa de conversão com células livres, isto porque as células imobilizadas têm maior dificuldade de obter oxigênio para oxidar o etanol.

A figura 30 mostra que quando a concentração de etanol aproximou-se a zero, a concentração de ácido acético atingiu seu máximo valor; após isto, a concentração de ácido diminuiu, o que mostra que não houve maiores conversões devido à falta de etanol. Com as células imobilizadas, como mostra a figura 29, a concentração de ácido atingiu seu máximo após que o etanol tinha-se esgotado no meio; isto é devido provavelmente à absorção de substrato pelo gel que só é liberado após a sua conversão e que demora a passar para o meio líquido devido aos efeitos difusivos impostos pela fase sólida no produto.

Estes experimentos foram os primeiros conduzidos em biorreator, e foram importantes principalmente para indicar o nível de evaporação do etanol e a necessidade da instalação de condensadores maiores com circulação de água a baixa temperatura (5 °C), bem como de umidificadores para a saturação do ar antes da entrada no reator.

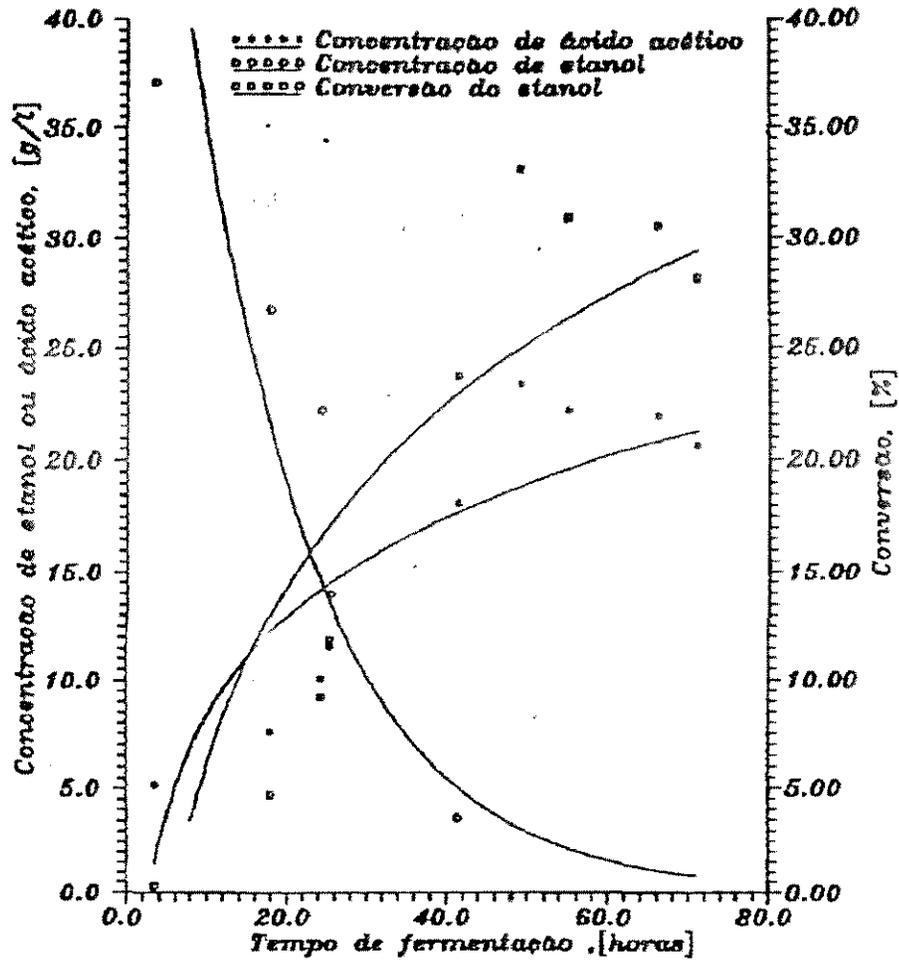


Figura 29 - Fermentação em batelada com células imobilizadas em alginato. Fração sólido - líquido 0,122, diâmetro das partículas 1,7 mm, vazão específica de ar 2,6 vvm, volume do reator 150 ml.

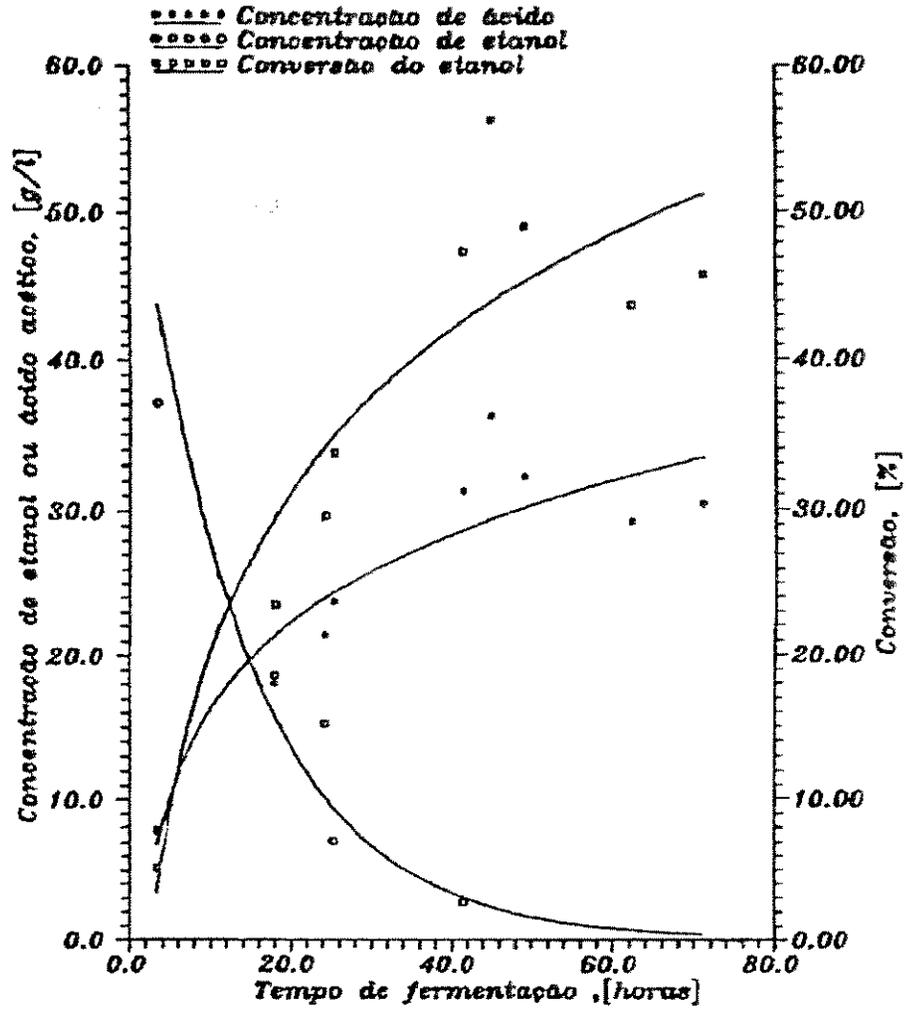


Figura 30 - Fermentação em tabelada no reator, com células livres. Vazão específica de ar de 2,6 vvm, volume de reação 150 ml.

#### 4.11 - LOCALIZAÇÃO DO ELETRODO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO

A colocação do eletrodo em relação ao fluxo de ar mostrou-se fundamental para uma boa medida. O corpo do eletrodo deverá proteger a membrana do contato com as bolhas de ar para evitar oscilações nas medidas.

A figura 31 mostra duas medidas de concentração de oxigênio dissolvido para duas posições diferentes do eletrodo. Quando o eletrodo foi colocado 5 cm acima do fundo do reator formando 45° para baixo com a horizontal houve muita oscilação na leitura. Quando o eletrodo foi colocado 5 cm acima do fundo do reator formando 45° para cima com a horizontal, não houve oscilações na medida. Adotou-se esta segunda posição para todos os experimentos em biorreator.

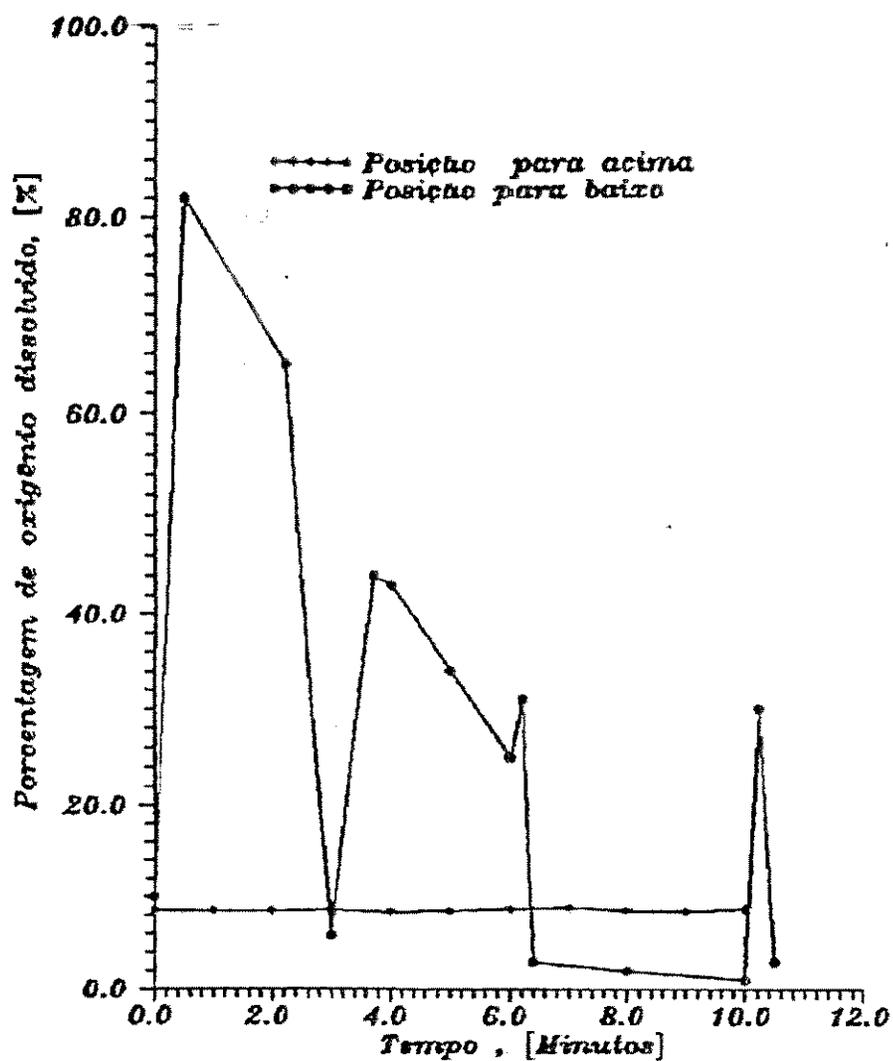


Figura 31 - Oxigênio dissolvido no meio em função do tempo, para diferentes posições do eletrodo.

#### 4.12 - FERMENTAÇÕES EM CONTÍNUO COM CÉLULAS IMOBILIZADAS EM DOIS BIOCATALIZADORES DIFERENTES

##### 4.12.1 - PARÂMETROS CINÉTICOS INTRÍNSECOS

A figura 32 é um gráfico Lineweaver - Burk que mostra a relação linear entre os inversos das taxas específicas de crescimento e respiração celular com o inverso da concentração de oxigênio dissolvido. Estes dados foram usados para a determinação das taxas específicas de crescimento e respiração determinadas de acordo ao item 3.8.2. Desta figura podemos observar que o consumo de oxigênio ou produção de ácido acético está associado à taxa de crescimento na faixa de concentrações não inibidoras de ácido acético utilizadas. Isto concluímos ao observar que as retas para as taxas específicas de respiração e de crescimento são paralelas.

Os valores para os parâmetros cinéticos intrínsecos de células livres das equações de Michaelis e Mentem e para a equação de Monod estimados são:

$$\begin{aligned}\mu_{\text{máx}} &= 0.438 \text{ (h}^{-1}\text{)} \\ K_s &= 1.13 \times 10^{-2} \text{ (mM)} \\ Q_{O_2 \text{ máx}} &= 0.2315 \text{ (gmol / g.h)} \\ K_m &= 5.253 \times 10^{-3} \text{ (mM)}\end{aligned}$$

Mori e Terui (9) encontraram taxas específicas máximas de crescimentos e respiração de  $0.345 \text{ h}^{-1}$  e  $0.173 \text{ gmol/g.h}$  respectivamente, para uma faixa de concentrações de ácido acético entre 0 - 36 g/l. Y. Sun e S. Furusaki (49) determinaram em contínuo as taxas específicas máximas de crescimento e respiração na faixa de concentrações de ácido acético de 5 a 14 g/l, os valores encontrados foram  $0.424 \text{ h}^{-1}$  para a taxa específica máxima de crescimento e  $0.206 \text{ gmol/g.h}$  para a taxa específica máxima de respiração. Estes resultados são muito próximos daqueles encontrados neste trabalho, no qual se trabalhou numa faixa de concentrações de 5 - 14 g/l, embora a cepa utilizada seja diferente.

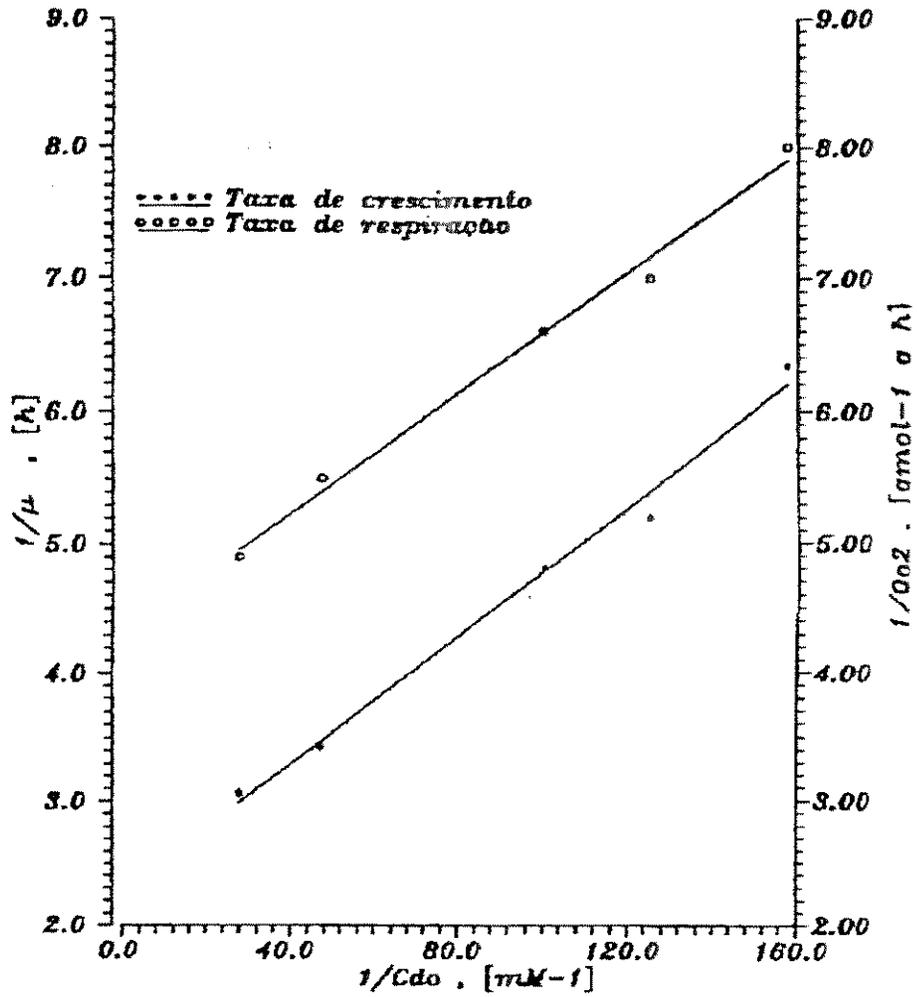


Figura 32 - Determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos a partir das fermentações em contínuo com células livres.

#### 4.12.2 - RESPOSTA DO SISTEMA A UMA PERTURBAÇÃO DEGRAU NA VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO.

Quando se muda a vazão de alimentação para um novo valor decorre um determinado tempo até que a concentração de ácido acético e etanol atinjam um valor constante como mostra a figura 33.

Assim, quando se passa de uma taxa de diluição de  $D=0.026 \text{ h}^{-1}$  a  $D=0.1 \text{ h}^{-1}$  com células imobilizadas em alginato, primeiramente a concentração de etanol aumenta e a de ácido diminui devido a que existe uma maior eliminação das células em suspensão. Ao mesmo tempo, aumenta a concentração de oxigênio dissolvido que tem como efeito aumentar a taxa de consumo de etanol e a taxa de crescimento celular. Assim, as concentrações de ácido acético e etanol voltam a subir e diminuir respectivamente até atingir um valor relativamente constante depois de 40 horas. Após passado este tempo a leitura feita corresponde ao estado estacionário, se nenhuma outra perturbação for imposta ao sistema.

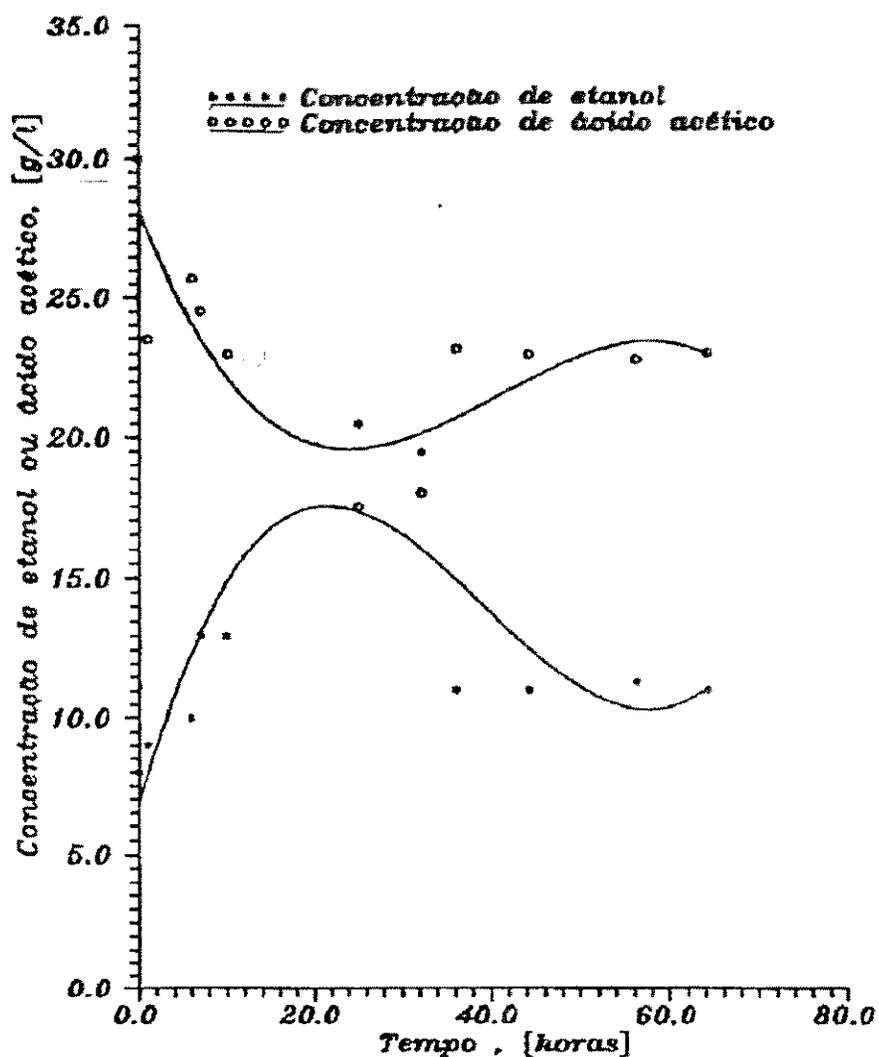


Figura 33 - Resposta do sistema a uma perturbação degrau na vazão de alimentação. Taxa de diluição inicial de  $0.026 \text{ h}^{-1}$  passou para  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . Células imobilizadas em alginato. Fração de sólidos de 0.11, diâmetro de partículas de 1.7 mm. Taxa de aeração de 2.6 vvm.

#### 4.12.3 - PRODUTIVIDADE EM FUNÇÃO DA TAXA DE DILUIÇÃO

A operação contínua do biorreator foi realizada com células livres, com células imobilizadas em alginato e  $\alpha$ -alumina + alginato.

Os parâmetros de operação calculados foram: densidade de partículas de alginato  $1030 \text{ kg/m}^3$ , densidade de partículas de  $\alpha$ -alumina + alginato  $1270 \text{ kg/m}^3$ . Para o sistema com partículas de alginato:

$$E_L = 0,88893, \quad E_S = 0.1098, \quad E_G = 8. \times 10^{-4}$$

Para o reator com partículas de  $\alpha$ -alumina + alginato temos:

$$E_L = 0.7212, \quad E_S = 0.0891, \quad E_G = 0, 1897$$

Para o reator de bolhas temos:

$$E_L = 0,9686, \quad E_G = 0.0314$$

A figura 34 mostra que para as células livres, a produtividade aumenta com o aumento da taxa de diluição, atingindo um máximo de  $0.67 \text{ g/l h}$  à taxa de diluição de  $0.317 \text{ h}^{-1}$ . Aumentando mais a taxa de diluição, diminui acentuadamente a produtividade. Isto não acontece com as células imobilizadas em alginato ou em  $\alpha$ -alumina + alginato. Para as partículas de alginato, a produtividade permanece constante em toda a faixa de taxas de diluição estudada. O mesmo se observa para as partículas de  $\alpha$ -alumina + alginato, desde que a taxa de diluição seja maior que  $0.3 \text{ h}^{-1}$ . Quando a taxa de diluição for menor que  $0.3 \text{ h}^{-1}$  a produtividade diminuiu, embora uma maior concentração celular estivesse presente no biorreator e a concentração de oxigênio dissolvido permanecesse aproximadamente constante para todas as taxas de diluição. A razão principal da menor produtividade foi a elevada concentração de ácido acético no meio, que é um forte inibidor da taxa específica de respiração.

A figura 35 mostra que há um aumento na concentração de oxigênio dissolvido com o aumento da taxa de diluição para as células livres, devido à rápida diminuição na concentração de biomassa no reator como é mostrado na figura 36, havendo portanto mais oxigênio disponível no meio. Nesta situação, as taxas de crescimento específico e de respiração podem atingir seus valores máximos e isto é observado pela máxima produtividade a  $0.317 \text{ h}^{-1}$ ; aumentando mais a taxa de diluição ocorre a lavagem de células. Para o sistema com células imobilizadas em alginato e  $\alpha$ -alumina + alginato, a concentração de oxigênio dissolvido varia muito pouco com a taxa de diluição e são aproximadamente iguais.

A figura 36 mostra que uma elevada concentração de células foi mantida no reator com células imobilizadas independentemente da vazão de líquido. Isto não acontece com células livres devido aos efeitos de lavagem das células do reator.

Das figuras 34, 35 e 36 vemos que a contribuição das células imobilizadas à taxa de produção no sistema  $\alpha$ -alumina + alginato é maior que a contribuição das células imobilizadas no sistema de alginato. Para  $D = 0.35 \text{ h}^{-1}$  a primeira é 36.5% maior que a segunda, isto pode ser devido à maior disponibilidade de nutrientes e independentemente da limitação difusional no sistema  $\alpha$ -alumina + alginato. Para baixas taxas de diluição,  $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$ , a contribuição à taxa de produção pelas células imobilizadas nos dois sistemas é a mesma, devido à inibição do produto nas células imobilizadas em  $\alpha$ -alumina + alginato.

Da figura 34 podemos observar a semelhança nas características fluidodinâmicas dos reatores com células livres e imobilizadas, pela proximidade dos valores da taxa de diluição na qual ocorre a lavagem de células livres no reator. Este mesmo efeito não foi observado nas fermentações com alginato devido à menor produção de ácido acético.

Embora a bactéria acética utilizada neste trabalho seja um pouco mais ativa que a bactéria acética usada por Y. Sun e S. Furusaki (49), encontramos produtividades menores para as células imobilizadas em alginato, a razão principal foi que o biocatalizador usado neste trabalho tem menos atividade devido à baixa quantidade de células

imobilizadas em virtude da estrutura porosa do gel, como foi observado no item 4.7. A biomassa imobilizada no gel de alginato foi somente 10 g massa seca / L gel contra 24.9 g massa seca / L gel encontrada pelos autores acima mencionados. A baixa porosidade do gel também justifica porque tenhamos encontrado um baixo coeficiente de difusão com este biocatalisador.

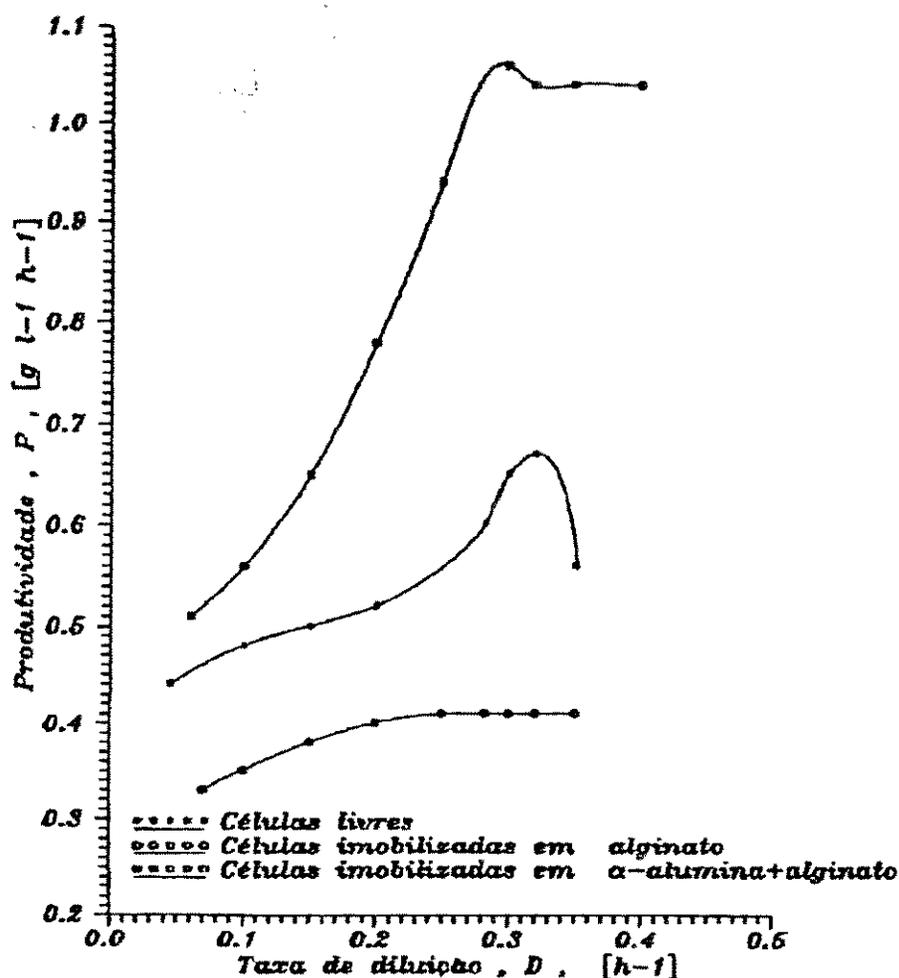


Figura 34 - Produtividade em função da taxa de diluição. Taxa de aeração 4.5 vvm. Fração de sólidos de 0.11. Tamanho das partículas é 1.77 mm de diâmetro. Densidade das partículas de alginato 1030 Kg/m<sup>3</sup>, densidade das partículas de α-alumina 1270 Kg/m<sup>3</sup>.

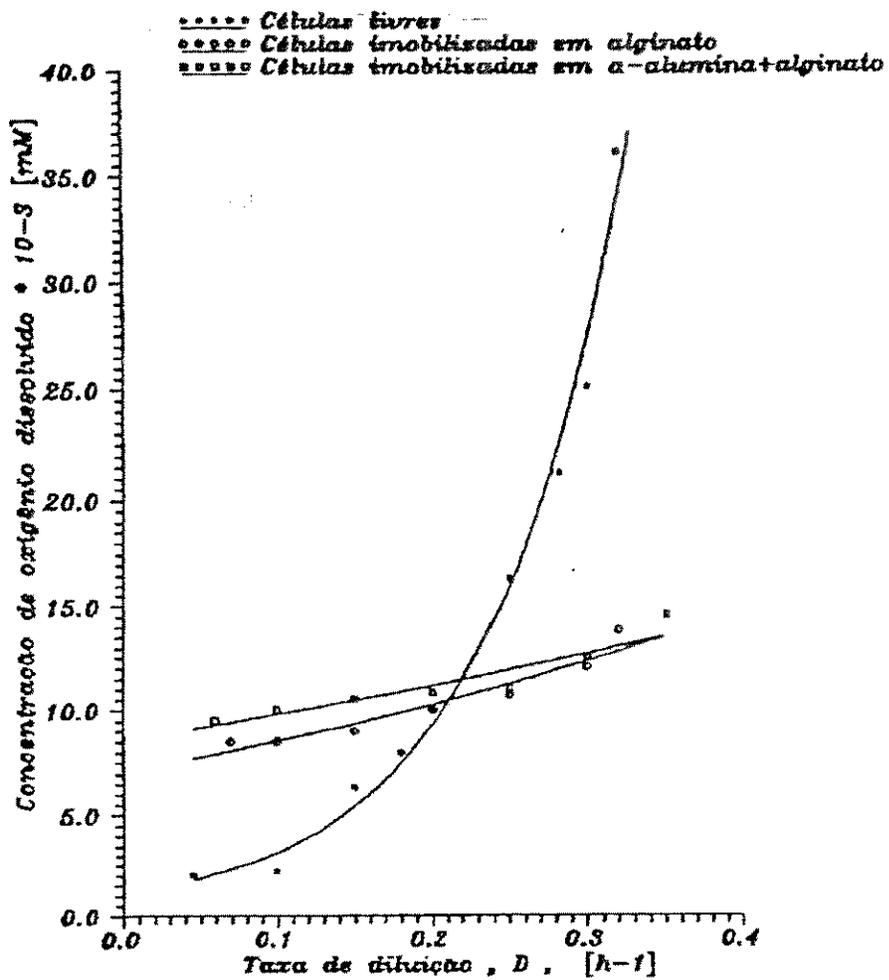


Figura 35 - Concentração de oxigênio dissolvido em função da taxa de diluição. As condições são as mesmas que na figura 34.

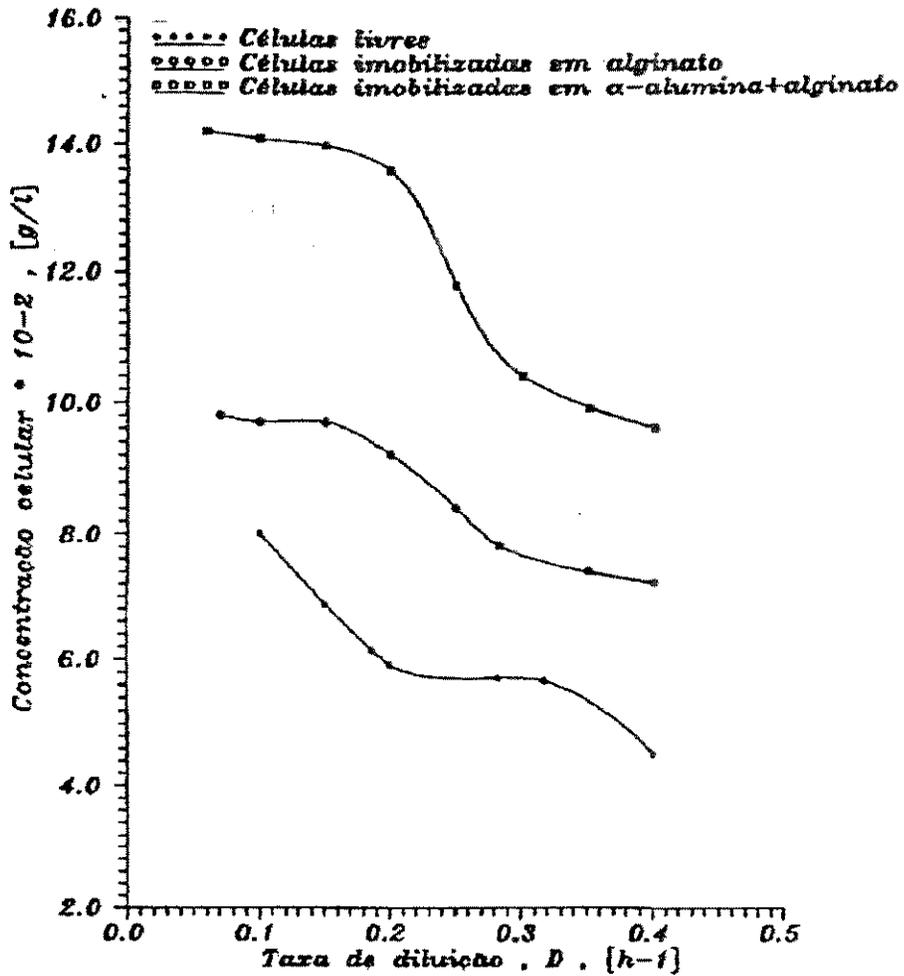


Figura 36 - Concentração de biomassa em função da taxa de diluição. As condições são as mesmas que para a figura 34.

#### 4.12.4 - COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM FUNÇÃO DA TAXA DE DILUIÇÃO

Tem sido mostrado que para as células livres (27, 53, 54), quando a taxa de diluição aumenta, o coeficiente volumétrico de transferência de massa também aumenta, já que de acordo com a teoria da superfície de renovação, o coeficiente de transferência de massa é proporcional à raiz quadrada da difusividade e esta aumenta com a taxa de diluição. Encontramos este comportamento para o sistema com células livres como é mostrado na figura 37.

Para as células imobilizadas em alginato houve pouca variação no  $K_L a$  com a taxa de diluição. O mesmo não foi observado para o sistema - alumina + alginato onde o  $K_L a$  aumentou para baixas taxas de diluição. Isto é devido à inibição pelo ácido acético que diminui a taxa específica de respiração. Assim aumentando a taxa de diluição, diminuimos a inibição pelo ácido, com o que aumenta o  $K_L a$ , pois este foi calculado em base à taxa específica de respiração, até que chega um valor de taxa de diluição a partir do qual o  $K_L a$  tende a permanecer constante.

A figura 37 mostra que o  $K_L a$  para o sistema - alumina + alginato é muito maior que para o sistema de alginato, entre 31% para  $D = 0.07 \text{ h}^{-1}$  e 62% para  $D = 0.31 \text{ h}^{-1}$ ; o primeiro tem partículas 23% mais densas que o segundo. As partículas mais densas aumentam o coeficiente volumétrico de transferência de massa através de dois mecanismos: As partículas mais densas quebram as bolhas de gás mais facilmente, o que aumenta a área interfacial. O número de Sherwood é dado pelas equações (1) e (2), que mostram a importância que tem a diferença de densidade entre as fases sólida e líquida no coeficiente de transferência de massa,  $K_L a$ .

Assim, partículas mais densas promovem maiores áreas interfaciais e coeficientes de transferência de massa; por isto, o coeficiente volumétrico de transferência de massa aumenta com o aumento da densidade da fase sólida, isto é observado pelas maiores produtividades para as partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato.

V. R. Dhanuka e J. B. Stepanek (34) encontraram que a taxa de diluição não tem nenhum efeito no  $K_L a$  para partículas grandes, acima de 2 mm de diâmetro, enquanto que para as menores este valor aumenta com o aumento da velocidade do líquido. Nós observamos que existe uma leve influência da taxa de diluição no coeficiente  $K_L a$  para as partículas de alginato de 1.7 mm.

Y. Sun e colaboradores (41) encontraram que o coeficiente  $K_L a$  num leito fluidizado trifásico foi menor que aquele em colunas de bolhas, este resultado é característico de partículas com baixa densidade, pois estas não tem nenhum efeito na quebra das bolhas. Com partículas mais densas, o coeficiente  $K_L a$  num leito fluidizado trifásico foi sempre maior que aquele em colunas de bolhas como mostram os resultados da figura 37.

Ao compararmos os resultados para células livres encontramos que as produtividades obtidas por Y. Sun e S. Furusaki (49) são maiores. Isto deve-se à maior transferência de massa no reator usado por estes autores. A causa principal é o tipo de distribuidor de gás utilizado. Enquanto o nosso distribuidor é uma placa de vidro poroso plana que permite a coalescência das bolhas de ar, o distribuidor usado por Y. Sun e S. Furusaki (49) é uma esfera de vidro poroso que tem muita influência na área interfacial e portanto no coeficiente volumétrico de transferência de massa. Embora tenhamos estas diferenças em reatores de escala laboratorial, dificilmente as teríamos na escala industrial pois os reatores usados são muito grandes e portanto o efeito do distribuidor de gás; quando localizado num determinado ponto do reator; na área interfacial e no coeficiente  $K_L a$  é desprezível. Portanto o reator usado neste trabalho apresentaria menos problemas quando se desejar fazer a ampliação da escala.

## 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 - CONCLUSÕES

A cepa utilizada neste trabalho, que foi isolada de uma usina de álcool (55), apresenta elevada tolerância ao etanol e pouca ao ácido acético. Isto é devido a que já é uma cepa adaptada a elevadas concentrações de etanol.

A composição do meio crioprotetor afeta significativamente a viabilidade celular do Acetobacter durante a sua preservação.

Quando se preparam partículas de biocatalisador, é muito importante considerar as variáveis que influenciam na sua atividade. As variáveis mais importantes são: tempo de gelificação, concentração do eletrólito, quantidade de biomassa imobilizada e concentração do gel. O tempo de gelificação deve ser o menor possível, a concentração de Ca Cl<sub>2</sub> menor que 0.2 M e a quantidade de células imobilizadas deve ser baixa para reduzir as limitações difusionais e assegurar a sua atividade e estabilidade.

Neste trabalho não usamos o biocatalisador por mais de 30 dias consecutivos, mais quando se prepararam biocatalisadores com elevada concentração celular estes não foram tão ativos nem tiveram atividade prolongada que aqueles preparados com baixa concentração celular;

O coeficiente de difusão do oxigênio nas partículas de  $\alpha$ - alumina + alginato é 21% mais baixo que aquele em partículas de alginato. Apesar disto, a produtividade obtida com este primeiro biocatalisador é maior devido à melhoria na transferência de massa externa provocada pelo aumento da densidade das partículas. Assim, dentro do reator o biocatalisador contendo  $\alpha$ - alumina + alginato é mais ativo que o alginato. Portanto, a contribuição para a produtividade total por parte das células imobilizadas é bem mais elevado para o primeiro caso, graças à maior disponibilidade de oxigênio.

## 5.2 - SUGESTÕES

- Estudar a adaptação da cepa a maiores concentrações de ácido acético através de fermentações em batelada alimentada.

- Determinar a concentração celular ótima para a imobilização, que conduza a biocatalizadores mais ativos e estáveis.

- Estudar a separação do ácido acético à medida que este vai sendo produzido no sentido de reduzir os efeitos inibidores e permitir a obtenção de maiores produtividades utilizando o biocatalisador contendo  $\alpha$ - alumina + alginato.

- Utilizar biorreatores que proporcionem maiores taxas de transferência de massa. Uma possibilidade seria um sistema com recirculação somente da fase líquida ou um biorreator com pratos perfurados.

- A partir dos dados obtidos experimentalmente neste trabalho poderia-se modelar os sistemas com células imobilizadas em alginato e/ou  $\alpha$ - alumina + alginato através do uso de um modelo que considere no balanço de massa a taxa da reação junto as etapas de transferência de massa. Se o modelo se ajusta às condições experimentais poderia-se simular outras condições de trabalho com boa exatidão.

**6 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS**

- 1.- Conselho Nacional do Petróleo - Alcool-química, 1<sup>a</sup>. edição, Brasília 1980.
- 2.- Allgeier, R.J. Nickol, G.B. e Conner, H.A  
"Food. Prod. Dev. 8 (6), 50 - 53,56. 1974.
- 3.- Hromatka, O. e Ebner, H., U.S. Pat. 2.707.683,  
May 3, 1956.
- 4.- Hromatka, O. e Exner, W, Enzymologia 25,37-  
51,1962.
- 5.- Mori, A. e Terui, G, J. Ferment. Technol., 50  
(8), 510 - 517, 1972.
- 6.- Ghommidh, G., Navarro, J. M. e Duran, G.  
Biotechnol. Bioeng, 24, 605 - 617, 1982
- 7.- Vera F.. M. e Wang, D.I.C., Am. Chem, Soc.  
Meet, Chicago, Aug 28- Sept 2, 1977.
- 8.- Alian, A., Robotnova, I.L., Nikolaev, P.I. e  
Ivanov, V.A "Mikrobiologiya, 32 (4), 703 -  
710, 1963.
- 9.- Mori, A. e Terui, G., J. Ferment Technol., 50  
(2), 70 -78, 1972.
- 10.- Hromatka, O. e Ebner, H., Enzymologia, 13,  
369, 1949.
- 11.- Mori, A., Yoshikawa, H. e Terui, G., J.  
Ferment. Technol 50 (8) 518 - 527, 1972.
- 12.- Hromatka, O. e Ebner, H., Ind. Eng. Chem, 51,  
1279 - 1280, 1959,
- 13.- Akira Namba, A. Tamura, e S. Nagai., J.  
Ferment. Technol., Vol 62, N<sup>o</sup> 6, 501 - 505 -  
1984.
- 14.- Hiji kata, Y. e Terui, G., J. Ferment Technol,  
50, 13 - 20, 1972.

- 15.- Y.S. Park et alii, J. Ferment. and Bioeng., Vol 68, N<sup>o</sup> 2, 96 - 101, 1989.
- 16.- P.S.J. Cheetham, K.W. Blunt e C. Bucke., Biotechnol. Bioeng., Vol XXI, 2155 - 2168, 1979.
- 17.- R.J. Scott, S. J. Wills e C. Bucke, Enz. Microb. technol., Vol. 10, 151 -155,1988.
- 18.- An- Luc Nguyen and J. H. T. Luong, Biotechnol. Bioeng., Vol XXVIII, 1261 -1267,1986,
- 19.- H. Tanaka, M. Matsumura e I. A. Veliky, Biotechnol. Bioeng., Vol. XXVI 53 - 58, 1984.
- 20.- B. J. M. Hannoun e G. Stephanopoulos, Biotechnol. Bioeng., Vol XXVIII, 829 - 835, 1986.
- 21.- S. Aiba e K. Kobayashi, Biotechnol. Bioeng., Vol XIII, 583 - 588, 1971.
- 22.- R. Renneberg, K. Sonomoto, S. Katoh e A. Tanaka, App. Microb. and Biotechnol, 28,1-7, 1988.
- 23.- Y.Sun, S. Furusaki, A. Yamauchi e K. Ichimura, Biotechnol. Bioeng., Vol 34, 55-58, 1989.
- 24.- P. Adlercreutz, Biotechnol. Bioeng., Vol XXVIII, 223 - 232,1986.
- 25.- H. Hiemstra, L. Dikhuizen e W. Harder, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18,189,1983,
- 26.- C.S. Ho e Lu- Kwong Ju, Biotechnol. Bioeng., Vol 32, 313 - 325, 1988.
- 27.- M. Omuna, T. Omura, T. Umita e J. Aizawa, Biotechnol. Bioeng. 27,1523,1985.
- 28.- T. Matsunaga, I. Karube, e S. Suzuki, Biotechnol. Bioeng. 22,2607, 1980.
- 29.- J. Klein e P. Schara, Appl. Biochem. Biotechnol. 6,91, 1981.

- 30.- M. Furui e K. Yamashita J. Ferment. Technol, 63,167,1985.
- 31.- S. Furusaki, e M. Seki, J. Chem. Eng. Jpn., 18, 389,1985.
- 32.- K. Toda e J. K. Sato., J. Ferment. Technol. 63, 251 - 258, 1985.
- 33.- K. Koide, H. Sato e S. Iwamoto, J. Chem. Eng. Jpn., Vol 16,407 - 425,1983.
- 34.- V.R. Dhanuka e J.B. Stepanek., AIChE Journal, Vol 26, 1029 1038,1980.
- 35.- K. Akita e F. Yoshida., Ind. Eng. Chem. Process. Des. Develop., Vol 12, 76-80, 1973.
- 36.- K. Akita e F. Yoshida, Ind. Eng. Chem. Process. Des. Develop., Vol. 13, 84 - 90, 1974.
- 37.- P.H. Calderbank e M.B. Moo - Young., Chem. Eng. Sci. Vol 16, 39-54,1961.
- 38.- H. Taguchi e A.E. Humphrey, Hakko Kogaku Zasshi, 44, 12,881, 1966.
- 39.- Y. Kang, L.T. Fan, B.T. Min, e S.D. Kim, Biotechnol. Bioeng., Vol 37, 580 - 586, 1991.
- 40.- Y. Bando et alii, J. Chem. Eng. Jpn., Vol 23, 587 - 592,1990.
- 41.- Y. Sun, T. Nozawa e S. Furusaki, J. Chem. Eng. Jpn., Vol 21,15 - 20,1988.
- 42.- Y. Sun, e S. Furusaki, J. Chem. Eng. Jpn, Vol 24, 20 - 24, 1988.
- 43.- J. Votruba, M. Sobotka e A. Prokop, Biotechnol Bioeng. Vol. xx, 917 - 920,1978.
- 44.- J. Osuga, A Mori e J. Kato, J. Ferment. Technol., 62, 139 - 149, 1984.
- 45.- A. Okuhara. J. Ferment. Technol, 63, 57-60, 1985.
- 46.- J.F. Kennedy et al, Enzyme Microb. Technol, 2,

209,1980.

- 47.- G. Ghommidh e J. M. Navarro. Biotechnol. Bioeng., 24, 1991, 1982.
- 48.- Y.S. Park et alii J. Ferment. and Bieng., Vol. 68, 315, 1989.
- 49.- Y. Sun e S. Furusaki. J. Ferment. Bioeng. Vol. 69,102,1990.
- 50.- Ângela Moraes, Tese de Mestrado, FEQ. UNICAMP, 1991.
- 51.- P. Harriot, AICHE Journal, 8,93,1962.
- 52.- J. E. Bailey D. F. Ollis. Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition. Mc. Graw Hill, p. 213-214, 1984.
- 53.- S. Furui; K. Yamashita. J. Ferne. Technol., 63, 167,1985.
- 54.- S. Furusaki, M. Seki. J. Chem. Eng. Jpn., 18, 389,1985.
- 55.- Alfredo Hitoshi Maeda. Tese de Mestrado em elaboração. FEA, UNICAMP, 1992.