

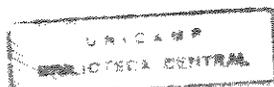
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
QUÍMICOS

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES
CONSTITUÍDOS DE CÉLULAS AERÓBIAS VIÁVEIS IMOBILIZADAS EM
PARTÍCULAS DE ALGINATO DE DENSIDADE VARIADA**

AUTOR: ÁLVARO ALBERTO DE ARAÚJO
ORIENTADOR: PROFA. DRA. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.

JULHO / 1995
CAMPINAS - SP - BRASIL



IDADE	BC
CHAMADA:	TIUNICAMP
	Ar15p
Es.	
MBO BC/	32111
OC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
ECO	39.11.00
TA	18/12/97
CPD	

CM-00102683-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Ar15p Araújo, Álvaro Alberto de
Preparação e caracterização de biocatalisadores
constituídos de células aeróbias viáveis imobilizadas em
partículas de alginato de densidade variada / Álvaro
Alberto de Araújo.--Campinas, SP: [s.n.], 1995.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Alginatos. 2. Ácido acético. 3. Células imobilizadas.
4. Microbiologia - Síntese. 5. Reatores fluidizados. I.
Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Titulo.

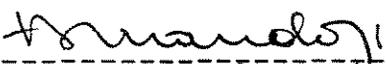
Tese defendida e aprovada em 19 de julho de 1995, pela
banca examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana



Profa. Dra. Gisella Maria Zanin



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Esta versão corresponde à redação final da Tese de Mestrado defendida por Álvaro Alberto de Araújo e aprovada pela comissão julgadora em 19/07/95.



Prof.^a Dr.^a Maria Helena Andrade Santana

Aos meus pais, Álvaro e
Maria Helena

Sumário

Assunto	Página
Nomenclatura	v
Resumo	viii
Capítulo 1 - Introdução.....	01
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica.....	04
2.1 Características gerais dos processos com células imobilizadas.....	05
2.2 Imobilização de células em géis hidrofílicos.....	07
2.3 Aspectos gerais da fermentação acética.....	10
2.3.1 Bactérias acéticas.....	10
2.3.1.1 Classificação.....	10
2.3.1.2 Metabolismo.....	11
2.3.1.2.1 Oxidação das fontes de carbono	11
2.3.1.2.2 Oxidação do acetato.....	11
2.3.1.2.3 Necessidades nutricionais.....	12
2.3.1.3 Considerações sobre linhagens de bactérias acéticas.....	12
2.3.2 Processos convencionais.....	13
2.3.2.1 O processo d'Orléans.....	13
2.3.2.2 O processo rápido.....	13
2.3.2.3 Fermentação submersa.....	14
2.3.3 Imobilização em suportes sólidos.....	14
2.3.4 Imobilização em géis hidrofílicos.....	16
2.4 Transferência de massa nos processos.....	19
2.4.1 Transferência de massa em dispersões gás-líquido	19

2.4.2	Transferência de massa e retenção de gás em sistemas trifásicos.....	20
2.4.2.1	Coefficiente de transferência de massa e fração sólido-líquido.....	20
2.4.2.2	Retenção de gás.....	21
2.4.3	Medida da concentração de oxigênio dissolvido..	22
Capítulo 3	- Materiais e Métodos.....	23
3.1	Microorganismo.....	23
3.2	Meios de cultura.....	23
3.2.1	Meio de manutenção.....	24
3.2.2	Meio de propagação.....	24
3.2.3	Meio de fermentação.....	24
3.3	Polissacarídeo para a imobilização.....	25
3.4	Material inerte para aumentar a densidade das partículas de gel.....	25
3.5	Sal gelificante.....	25
3.6	Equipamentos.....	25
3.7	Instalações experimentais.....	26
3.7.1	Sistema para imobilização de células.....	26
3.7.2	Sistema de fermentação contínua em biorreator...	28
3.8	Métodos analíticos.....	30
3.8.1	Determinação da concentração de ácido acético...	30
3.8.2	Determinação da concentração celular.....	30
3.8.3	Determinação do pH.....	31
3.8.4	Determinação do oxigênio dissolvido.....	31
3.9	Procedimentos experimentais.....	31
3.9.1	Preparação dos meios de cultura.....	31
3.9.2	Preparação das placas de Petri.....	32
3.9.3	Preparação do pré-inóculo.....	32
3.9.4	Preparação de biocatalisador convencional.....	33
3.9.5	Preparação de biocatalisador de densidade variada.....	34

3.9.6	Determinação da velocidade terminal de queda das partículas de gel.....	35
3.9.7	Determinação da massa específica das partículas de gel.....	35
3.9.8	Construção da curva de calibração de absorbância em função da concentração celular.....	36
3.9.9	Determinação da massa celular contida nas partículas de biocatalisador.....	37
3.9.10	Avaliação dos efeitos da razão entre as vazões das soluções de alginato de sódio na preparação dos biocatalisadores de densidade variada.....	38
3.9.11	Determinação da taxa específica de consumo de oxigênio pelas células imobilizadas.....	38
3.9.12	Determinação do conteúdo de gás, de líquido e da fração sólido-líquido no biorreator.....	39
3.9.13	Cálculo da produtividade de ácido acético e coeficiente de transferência de massa.....	40
3.9.14	Fermentações em biorreator de leito fluidizado.	42
3.9.14.1	Fermentação com células livres.....	42
3.9.14.2	Fermentação com células imobilizadas..	42
3.10	Experimentos preliminares.....	43
Capítulo 4	- Resultados e Discussão.....	44
4.1	Resultados dos ensaios preliminares.....	44
4.2	Caracterização da morfologia da linhagem de <i>Acetobacter</i> sp. CCT 2026.....	48
4.3	Resultados relativos à preparação e caracterização da partícula de biocatalisador de densidade variada...	50
4.3.1	Influência da razão entre as vazões de solução de alginato.....	50
4.3.2	Influência da concentração de α -alumina.....	51
4.3.3	Fotomicrografias das partículas de biocatalisador.....	52
4.3.4	Massa celular nas partículas de biocatalisador..	56

4.4 Fermentações contínuas em biorreator de leito fluidizado.....	57
4.4.1 Estabelecimento do estado estacionário.....	57
4.4.2 Fermentação com células livres.....	59
4.4.3 Fermentação contínua com células imobilizadas...	62
4.4.3.1 Perfis de produtividade e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	62
4.4.3.2 Influência da velocidade terminal de queda das partículas na produtividade...	67
4.4.3.3 Influência da fração sólido-líquido.....	69
4.5 Proposição de uma correlação empírica para o coeficiente de transferência de oxigênio gás-líquido..	72
4.6 Predição da produtividade de ácido acético.....	75
Capítulo 5 - Conclusões e Sugestões.....	84
5.1 Conclusões.....	84
5.2 Sugestões.....	87
Referências Bibliográficas.....	88
Abstract.....	98

Nomenclatura

C	Concentração de oxigênio no gel (Kmol/m^3)
C_c	Concentração celular ($\text{Kg célula seca/m}^3$)
C^*	Concentração de saturação do oxigênio dissolvido no meio líquido (Kmol/m^3)
C_{O_2}	Concentração de oxigênio dissolvido (Kmol/m^3)
$C_{\text{HAc}1}$	Concentração de ácido acético inicial (g/L)
$C_{\text{HAc}2}$	Concentração de ácido acético final (g/L)
C_p	Capacidade calorífica da fase contínua
D	Taxa de diluição (1/h)
D_e	Coefficiente de difusão efetivo do oxigênio intrapartícula (m^2/h)
D_L	Coefficiente de difusão da fase dispersa (m^2/h)
d_p	Diâmetro da partícula (mm)
g	Aceleração da gravidade (cm/s^2)
h_a	Altura do líquido aerado (cm)
h_r	Altura do líquido em repouso (cm)
h_c	Coefficiente de transferência de calor da fase contínua
K_L	Coefficiente de transferência de massa da fase contínua
$K_{L,a}$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio gás-líquido (1/h)
K_m	Constante de Michaelis - Menten (Kmol/m^3)
P_{il}	Taxa de produção pelas células livres estimada (g/L.h)
P_{ig}	Taxa de produção pelas células imobilizadas (g/L.h)
P_{it}	Taxa de produção total predita (g/L.h)
Pr	Produtividade de ácido acético (g/L.h)

P_r	Número de Prandtl = $C_p \mu_c / \lambda$ (-)
Q_{O_2}	Taxa específica de respiração celular (Kmol/Kg célula seca . s)
Q_{O_2i}	Taxa específica de respiração das células imobilizadas (Kmol/Kg célula seca . s)
Q_{O_2l}	Taxa específica de respiração das células livres (Kmol/Kg célula seca . s);
Q_{O_2m}	Taxa específica de respiração máxima das células livres (Kmol/Kg célula seca . s)
r	Coordenada espacial (m)
R	Raio da partícula de gel (m)
R_e	Raio da partícula onde a concentração de oxigênio é nula (m)
Re_p	Número de Reynolds da partícula = $\rho_{H_2O} v_t d_p / \mu_{H_2O}$ (-)
Sc	Número de Schmidt = $\mu_c / \rho_c D_L$ (-)
V_G	Volume de gás no reator (mL)
V_L	Volume de líquido (mL)
V_R	Volume reacional (mL)
V_S	Volume de sólido (mL)
v_t	Velocidade terminal de queda da partícula (cm/s)
x	Raio adimensional (-)
X	Concentração celular (Kg célula seca/cm ³)
Y	Concentração de oxigênio adimensional (-)
ϵ_G	Conteúdo de gás (-)
ϵ_L	Conteúdo de líquido (-)
ϵ_S	Conteúdo de sólido (-)
$\epsilon_{s/L}$	Fração sólido-líquido (-)
$\Delta\rho$	Diferença de massa específica entre a fase dispersa e a fase contínua (g/cm ³)
λ	Condutividade térmica da fase contínua

μ_c	Viscosidade da fase contínua
μ_{H_2O}	Viscosidade da água (g/cm . s)
ρ_c	Massa específica da fase contínua (g/cm ³)
ρ_p	Massa específica da partícula (g/cm ³)
ρ_{H_2O}	Massa específica da água (g/cm ³)

subscritos

e: valores no R_e

g: gel

i: fermentação com células imobilizada

l: líquido

S: sólido

Resumo

No presente trabalho foram preparadas e caracterizadas partículas de biocatalisador constituídas de células aeróbias viáveis imobilizadas em alginato de densidades variadas. Como sistema modelo de células aeróbias viáveis foi usado uma linhagem de células do gênero *Acetobacter* altamente produtora de ácido acético.

Os suportes de alginato de densidades variadas foram preparados mediante a adição de diferentes quantidades de α -alumina (material inerte) à matriz do gel. Para assegurar a mesma distribuição de células no biocatalisador preparado, a α -alumina foi confinada em uma região no núcleo das partículas, a qual foi recoberta por uma suspensão concentrada de células em solução de alginato. As partículas com essa configuração e de diâmetros aproximadamente uniformes foram obtidas através de extrusão simultânea de duas soluções de gel de diferentes concentrações, em um ejetor constituído de dois tubos capilares concêntricos.

As partículas de biocatalisador foram caracterizadas em função da concentração inicial de células viáveis imobilizadas, estimada através da taxa específica de respiração celular; da densidade das partículas, determinada através da velocidade terminal de queda das mesmas e do seu desempenho no processo de oxidação do etanol a ácido acético em reator de leito fluidizado. O desempenho do biocatalisador foi analisado através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio gás-líquido, $K_L a$, e da produtividade de ácido acético, P_r , ambos determinados no estado estacionário, com o sistema operando em contínuo.

Para caracterizar os efeitos da densidade das partículas na transferência de oxigênio gás-líquido, propõe-se uma correlação empírica entre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio gás-líquido, a fração sólido-líquido, $\epsilon_{s/L}$, e o número de Reynolds da partícula, R_{ep} .

Um modelo matemático simplificado para a predição da produtividade de ácido acético é proposto, considerando a transferência de oxigênio gás-líquido como a etapa limitante do processo.

As partículas de biocatalisador apresentaram-se estáveis no processo contínuo em biorreator de leito fluidizado. Partículas mais densas promoveram maiores taxas de transferência de oxigênio da fase gasosa para o meio líquido e, por conseguinte, maiores produtividades de ácido acético.

Os resultados obtidos demonstram a potencialidade de biocatalisador preparado com partículas mais densas de gel de alginato para o uso em processos com células aeróbias viáveis.

Capítulo 1

Introdução

O emprego de células imobilizadas em processos fermentativos contínuos apresenta algumas vantagens em relação aos processos submersos, tais como a possibilidade de manutenção de elevadas concentrações celulares nos biorreatores, obtenção de elevadas produtividades, uso repetido do biocatalisador e possibilidade de operação sem que ocorra a lavagem de células do processo.

Dentre os vários suportes usados, destacam-se os géis hidrofílicos, pela simplicidade com que as células podem ser oclusas nestes suportes e pelas condições amenas que oferecem para o crescimento celular na sua matriz. O alginato, em particular, além dessas vantagens apresenta uma grande facilidade no manuseio e preparação de matrizes sólidas.

A grande limitação da imobilização de células em géis é a resistência difusional ao transporte de nutrientes para o interior da partícula. Por esse motivo, células estritamente aeróbias, que necessitam de grande quantidade de oxigênio, são encontradas viáveis somente em regiões muito próximas à superfície das partículas de gel.

Os processos que utilizam células aeróbias imobilizadas em géis hidrofílicos são normalmente conduzidos em equipamentos que promovem uma transferência de oxigênio eficiente no sistema. Biorreatores de leito móvel, tais como os de leito fluidizado, promovem uma boa aeração do sistema, evitando danos causados pela agitação mecânica aos suportes frágeis de gel. No entanto, a baixa densidade das partículas de gel, aproximadamente igual à da água,

impede a operação dos biorreatores com partículas de géis a taxas de aeração elevadas. Uma alternativa para contornar esse problema é a imobilização das células em partículas mais densas de gel.

Por outro lado, resultados experimentais com outros suportes sólidos, citados na literatura, mostram que a transferência de oxigênio da fase gasosa para o meio líquido é beneficiada pelo aumento da densidade das partículas.

Dentro desse contexto, partículas mais densas de gel aparecem como suportes muito promissores para a imobilização de células aeróbias viáveis, com potenciais benefícios para processos conduzidos em biorreatores de leito fluidizado.

Essas razões motivaram o desenvolvimento deste trabalho, cujo objetivo geral é implementar uma metodologia de preparação de partículas de biocatalisador constituídas de células aeróbias viáveis imobilizadas em partículas de gel de alginato de densidades variadas, caracterizar propriedades do biocatalisador e o seu desempenho em processo fermentativo conduzido em biorreator de leito fluidizado.

Para atingir esse objetivo, foi empregada uma linhagem de células do gênero *Acetobacter*, altamente produtora de ácido acético, para utilização como sistema modelo de células aeróbias imobilizadas em um processo onde a transferência de oxigênio é a etapa limitante.

A preparação e caracterização de propriedades do biocatalisador tiveram os seguintes objetivos específicos:

- implementar uma metodologia simples e reprodutível para a obtenção de partículas de gel de densidades variadas;
- assegurar a mesma distribuição de células no biocatalisador, para que somente o efeito da densidade das partículas pudesse ser analisado;
- determinar a taxa específica inicial de respiração celular, como propriedade que caracteriza a concentração inicial de células imobilizadas;

- determinar a velocidade terminal de queda das partículas de gel em água, como medida indireta da densidade das mesmas.

A caracterização do desempenho do biocatalisador no processo fermentativo contínuo, conduzido em biorreator de leito fluidizado, teve como objetivos específicos:

- delinear regimes operacionais úteis em função da densidade das partículas no processo contínuo de oxidação do etanol a ácido acético;

- identificar os perfis de produtividade e transferência de oxigênio na fermentação contínua em função da taxa de diluição, para partículas de biocatalisador de várias densidades;

- correlacionar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio gás-líquido com a fração sólido-líquido no reator, e com o número de Reynolds da partícula;

- propor um modelo matemático simplificado para descrever o processo difusão-reação e prever a produtividade global de ácido acético.

A metodologia utilizada na coleta e análise dos dados, bem como os resultados obtidos, são apresentados nos capítulos subsequentes.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

A primeira parte desse capítulo tem como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica da imobilização de células microbianas em géis hidrofílicos. Não se pretende analisar a vasta gama de processos que utilizam células imobilizadas em géis hidrofílicos como suportes, mas apresentar os principais fatores que afetam a imobilização de células nesses suportes.

Neste trabalho foram considerados como sistema modelo, as células de *Acetobacter* e a fermentação acética. Por esse motivo, nessa revisão bibliográfica enfocou-se os seguintes aspectos gerais: fermentação acética, imobilização de células de *Acetobacter* em suportes sólidos, e características dos processos com células acéticas imobilizadas em géis hidrofílicos.

Finalmente, na última parte deste capítulo são apresentados resultados de estudos de transferência de massa em sistemas gás-líquido e gás-líquido-sólido.

2.1 Características gerais dos processos com células imobilizadas

O cultivo contínuo com células imobilizadas é caracterizado pela coexistência de células livres e imobilizadas. Uma análise da curva de produtividade em função da taxa de diluição mostra a presença de uma região de máxima produtividade, após a qual a produtividade cai até permanecer constante com a taxa de diluição. A existência do máximo é devida à presença de células livres no sistema, coexistindo com as células imobilizadas. Para taxas de diluição maiores que a da lavagem das células livres, a constância da produtividade deve-se à contribuição máxima das células imobilizadas. A Figura 2.1 ilustra a coexistência e a contribuição das células livres e imobilizadas para a produtividade global.

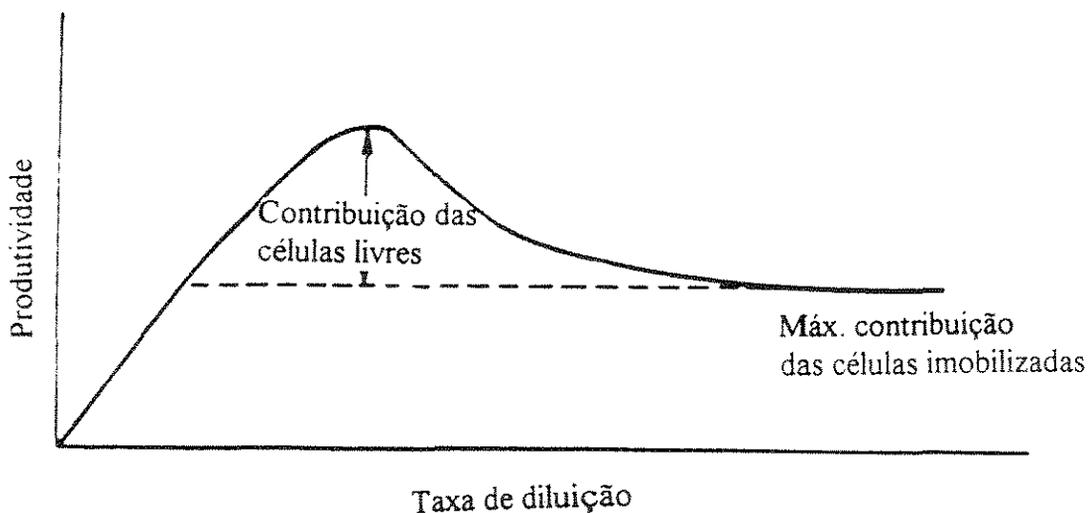


Figura 2.1 - Perfil ilustrativo da produtividade versus taxa de diluição (Webb, Black e Atkinson, 1986).

Um outro aspecto muito importante na fermentação com células imobilizadas é a retenção de biomassa na partícula. Células viáveis quando imobilizadas em suportes porosos crescem no seu interior, e um excesso de biomassa ocupa a parte externa formando uma camada ao redor da partícula. A espessura da camada externa é controlada pelas condições fluidodinâmicas do biorreator. Nesses casos, a agitação, o movimento das partículas no fermentador e as interações entre elas exercem um papel importante na retenção de células na partícula. Na maioria dos casos, quando o microorganismo apresenta uma elevada taxa de crescimento na partícula, observa-se o desprendimento de células da partícula e mesmo na região de altas taxas de diluição, a produtividade global é uma função da presença de células suspensas e de células imobilizadas.

2.2 Imobilização de células em géis hidrofílicos

Segundo Sun, Nozawa e Furusaki (1988), os suportes para imobilização de células são geralmente géis hidrofílicos tais como: alginato de sódio, κ -carragena e outras resinas.

Ogbonna, Amano e Nakamura (1989) investigaram diferentes fatores que influenciam a estabilidade de partículas de gel de alginato de cálcio contendo células viáveis imobilizadas. Segundo eles, o alginato de sódio tem sido amplamente utilizado para a imobilização de células viáveis, mas não há uma uniformidade nas condições de imobilização. Encontraram, entre outros fatores, que a população inicial de células por partícula de gel, o período de solidificação ou gelificação em solução de cloreto de cálcio, e a concentração de alginato de sódio usada para a imobilização celular são os fatores mais importantes que afetam a estabilidade de partículas de gel durante a fermentação. A estabilidade das partículas foi determinada através do monitoramento do tempo de solubilização das partículas em solução tampão citrato 0,2 M, em pH 5. Concluíram que, usando uma população celular inicial em torno de 10^5 células de *Saccharomyces cerevisiae* por mL de solução de alginato de sódio 2% (p/v), e solidificando as partículas por pelo menos 22 horas em solução de cloreto de cálcio 0,2 M após a imobilização, a porcentagem de partículas que apresentou fissura durante o processo fermentativo foi altamente reduzida. Essas fissuras desenvolvidas nas partículas de gel durante a fermentação podiam ser atribuídas aos métodos e condições de imobilização. O número de células viáveis permaneceu mais ou menos constante até 25 horas de gelificação, e a estocagem das partículas de gel em solução de cloreto de cálcio 0,2 M a 4°C por 5 semanas não resultou em uma redução significativa na viabilidade celular. Os mesmos autores verificaram que, sem a adição de cloreto de cálcio no meio fermentativo virgem, as partículas foram estáveis por 9 fermentações consecutivas (em batelada), num período total de 1 mês. Por último, verificaram, também, que as fissuras no gel não

foram devidas às perdas de Ca^{2+} do gel e sim devido ao CO_2 resultante do metabolismo celular.

Paz, Santana e Eguchi (1993) verificaram o efeito da concentração de cloreto de cálcio na atividade de biocatalisador constituído de alginato e células de *Acetobacter*. Obtiveram biocatalisador mais ativo quando empregaram uma concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de 0,2 M.

Muitos trabalhos para a produção de substâncias úteis por células imobilizadas em matrizes poliméricas têm sido publicados. Embora a fácil separação das células do produto seja considerada um dos méritos importantes dos sistemas com células imobilizadas, tal vantagem não tem sido totalmente aproveitada devido à fácil liberação de células que ocorre da matriz polimérica para o meio fermentativo. No caso de partículas de alginato produzidas pelo método de imobilização convencional, as células são homoganeamente distribuídas no gel. As células na superfície e próximas a ela podem facilmente liberarem-se das partículas para o meio e, subseqüentemente, crescerem muito rapidamente num meio mais rico em oxigênio do que nas partículas. Tanaka, Irie e Ochi (1989) desenvolveram, então, um novo método de imobilização, o qual impedia a liberação de células da matriz polimérica para o meio. As células foram imobilizadas em fibras de dupla camada de alginato. As células foram restritas apenas a camada interna, enquanto que a camada externa ajudava a impedir a liberação de células. As condições de imobilização utilizadas foram: concentração de alginato: 2 % (p/v); concentração de CaCl_2 : 0,1 M; tempo de gelificação: 1 h à temperatura ambiente. As vazões das soluções poliméricas externas e internas, na preparação das fibras, foram de 3,8 mL/min e 1,9 mL/min, respectivamente. As fibras eram obtidas após o bombeamento de 10 mL de solução interna. Verificaram que, quando este sistema foi testado em fermentação contínua, a produção normal de etanol, a partir de glicose com células de *Saccharomyces* sp. foi mantida por 300 horas sem a liberação de células da matriz polimérica. Entretanto, na segunda fermentação em batelada, o CO_2

produzido não pôde se difundir da fibra e eventualmente, levou à ruptura da mesma.

Jamuna et al. (1992) efetuaram um estudo do tipo planejamento fatorial completo, determinando as concentrações ótimas de alginato de sódio (% peso), cloreto de cálcio (M) e células de levedura (% peso), além do tempo de gelificação (h) para o aumento de estabilidade do gel. Todos estes parâmetros, exceto a concentração celular, tiveram um forte efeito na estabilidade das partículas. Entretanto, a concentração celular não pode ser ignorada, devido à sua importância na fermentação. As faixas das variáveis pesquisadas foram: concentração de alginato: 1 a 3 %; concentração de CaCl_2 : 0,05 a 1 M; concentração celular: 2,5 a 12,5 %; tempo de gelificação: 2 a 20 horas. A melhor situação encontrada para a estabilidade das partículas de gel e conversão na fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* foi: concentração de alginato: 2,782 %; concentração de CaCl_2 : 0,877 M; concentração celular: 7,25 %; tempo de gelificação: 14,8 horas.

Moraes (1991) desenvolveu uma sistemática de preparação de inóculo ativo de elevada concentração celular, que se mostrou fundamental para a imobilização de células viáveis de *Acetobacter* em géis hidrofílicos. Estudou a influência das condições de preparação de um biocatalisador ativo e testou seu desempenho na fermentação contínua, utilizando um biorreator de leito fluidizado trifásico não convencional, de geometria cilíndrico-cônica. Foram testados suportes à base de κ -carragena, alginato de sódio e pectina cítrica, com duas concentrações iniciais de células (10^5 e 10^7 UFC/mL) e meio de gelificação diluído em água destilada ou em meio de fermentação. Obteve melhores resultados de conversão de etanol a ácido acético com o gel de carragena, verificando que somente a partir de concentrações iniciais de células da ordem de 10^6 UFC/mL se obtém um bom crescimento microbiano nos géis. Empregando o meio de gelificação diluído em água, a pesquisadora obteve menor fragmentação dos géis.

Pode-se observar, por estes trabalhos citados, que a obtenção de biocatalisadores ativos de células microbianas imobilizadas em géis hidrofílicos depende principalmente da concentração de células viáveis e das variáveis de preparação das partículas de gel.

2.3 Aspectos gerais da fermentação acética

2.3.1 Bactérias acéticas

2.3.1.1 Classificação

As bactérias acéticas caracterizam-se pela capacidade de oxidarem o etanol a ácido acético em pH ácido. Estas bactérias estritamente aeróbias se apresentam ao microscópio sob a forma de pequenos bastonetes gram negativo, geralmente agrupadas em pares e às vezes em cadeia. Dependendo da idade, as células podem também, apresentar um resultado positivo para o teste de gram, tornando-se roxas (Krieg e Holt, 1984). O tamanho delas varia de 0,5 a 0,8 μm de largura e 0,9 a 4,2 μm de comprimento. Existem as espécies imóveis, outras móveis com flagelos peritríquicos. Algumas espécies são pigmentadas e produzem às vezes celulose e polissacarídeos.

As primeiras tentativas de classificação foram de Hansen (1894). Visser't Hooft (1925) foi o primeiro a propor uma classificação baseada em critérios bioquímicos. Asai (1934,1935) propôs a criação de 2 gêneros: *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

Frateur (1950) teve o mérito de reduzir bastante o número de espécies. Ele propôs a subdivisão do gênero *Acetobacter* em quatro grupos bioquímicos: peroxydans, oxidans, mesoxydans, suboydans.

Após, Leifson (1954) distinguiu dentre as bactérias acéticas aquelas que têm flagelos peritríquicos e oxidam o acetato, denominando-as *Acetobacter*, daquelas que têm o flagelo monotríquico, *Acetomonas*. Carr e Shimwell (1961) propuseram substituir *Acetomonas* por *Gluconobacter*.

As experiências de hibridação de Gillis e De Ley (1980) mostraram que na realidade, os 2 gêneros deveriam ser reagrupados na mesma família das *Acetobacteriaceae*. A 9ª edição do manual Bergey reteve esta proposição.

2.3.1.2 Metabolismo

2.3.1.2.1 Oxidação das fontes de carbono

A particularidade das bactérias acéticas é a capacidade de oxidar uma grande variedade de substratos e de acumular quase integralmente os produtos no meio.

As bactérias acéticas possuem as enzimas desidrogenases muito ativas situadas nas suas membranas (Matsushita et al., 1985) e intimamente ligadas à cadeia citocrômica.

Além das enzimas na membrana, as bactérias acéticas possuem a enzima álcool-desidrogenase e acetaldeído-desidrogenase ligadas ao NAD⁺ e ao NADP⁺ (King e Cheldeling, 1952), que levam à formação do ácido acético.

2.3.1.2.2 Oxidação do acetato

As bactérias do gênero *Gluconobacter* não podem oxidar o acetato pois elas não possuem o ciclo tricarbóxico. Já as bactérias do gênero *Acetobacter* possuem todas as enzimas do ciclo tricarbóxico (Rao, 1955) e, portanto, podem reoxidar o acetato. Algumas espécies de *Acetobacter* possuem também as enzimas do ciclo glioxílico (Leisinger, 1965); elas podem, então, utilizar o etanol como única fonte de carbono no meio de Hoyer (1898).

As bactérias do gênero *Acetobacter* (Divies, 1972) oxidam o etanol a ácido acético e, em seguida, oxidam o acetato pois o etanol se esgotou do meio de cultura. O etanol inibe as enzimas de oxidação do acetato, e o ácido acético inibe sua própria oxidação para concentrações superiores a 14 g/L de ácido, num pH igual a 3.

2.3.1.2.3 Necessidades nutricionais

As necessidades das bactérias acéticas dependem estritamente da fonte de carbono.

As bactérias que realizam a fermentação acética a partir do álcool são susceptíveis a se desenvolverem num meio mineral com duas fontes de carbono; a glicose e o etanol. Mas, com os substratos utilizados na indústria, as necessidades nutricionais são mais complexas e o crescimento das bactérias necessita da adição de extrato de levedura (Divies, 1970)

Estas bactérias utilizam o oxigênio numa relação estequiométrica para a oxidação do etanol, sendo requerido um mol de oxigênio para produzir um mol de ácido acético, com uma produção insignificante de gás carbônico e apenas traços de produtos secundários.

2.3.1.3 Considerações sobre linhagens de bactérias acéticas

As indústrias utilizam linhagens que não são provenientes de culturas puras. Experiências de laboratório, freqüentemente, mostraram a dificuldade de conservar as características dessas linhagens para se efetuar a fermentação. A explicação desta variabilidade ainda continua sendo pesquisada.

Assim, a sociedade FRINGS achou mais prático inocular os Acetadores numa fábrica por uma linhagem já adaptada a altas concentrações de ácido acético e mantida em cultura contínua numa planta piloto.

Recentemente, Paz (1992) usou uma cultura de *Acetobacter* sp. isolada de uma usina de álcool e açúcar. A linhagem está depositada na Coleção de Culturas Tropical da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" (Campinas, S.P., Brasil) com o código de identificação: CCT 2026. Essa linhagem permitiu se trabalhar com uma concentração de etanol, no meio de fermentação, mais elevada que a usual e mostrou-se boa produtora de ácido acético. No

entanto, o pesquisador verificou fortes efeitos inibitórios na taxa de respiração celular para valores de concentração de ácido acético a partir de 14 g/L.

2.3.2 Processos convencionais

O primeiro processo para a produção de ácido acético colocado em operação pelo homem consistiu na conversão espontânea do vinho em vinagre, sob a ação de bactérias encontradas em frutas, deixando o vinho em contato com o ar. Posteriormente, outros processos surgiram com o intuito de melhorar a produção de ácido acético dentre os quais, destacam-se o processo d'Orléans e o processo rápido de Frings.

2.3.2.1 O processo d'Orléans

No processo d'Orléans, o meio a ser acidificado é simplesmente armazenado em tonéis até 3/4 do volume total. Após o desenvolvimento da cultura "mãe", o etanol presente no meio é transformado em ácido acético; renova-se 2/3 do meio acidificado, tomando-se o cuidado de manter a camada microbiana que se desenvolve na superfície. Estudando este processo, Pasteur (1868) demonstrou o papel de microorganismos nessa transformação.

Uma característica observada nos processos fermentativos com células acéticas é a formação de película durante o crescimento da cultura.

2.3.2.2 O processo rápido

Esse processo foi proposto por Boeehaave (1732) e aperfeiçoado em seguida por Kastner, Schuzenbach e Hamen em 1824 (Mitchell, 1926). Neste processo, o meio alcoólico percola sobre cavacos de madeira. As bactérias acéticas se desenvolvem na superfície da madeira e encontram as condições de aeração

satisfatórias para oxidar o etanol. O meio líquido é reciclado até o esgotamento do etanol.

Frings (1932) melhorou o processo, introduzindo uma aeração forçada e um controle de temperatura.

2.3.2.3 Fermentação submersa

Hromatka e Ebner (1949, 1951, 1959) e Hromatka, Kastner e Ebner (1951) mostraram que a fermentação acética era conduzida com bom desempenho em um meio líquido bem aerado. A produtividade obtida foi de 21 gramas de ácido acético por grama de bactéria e por hora, a 30°C. Observaram que interrupções da oxigenação ocasionam uma severa destruição das células e que a falta de etanol no meio ocasiona uma parada irreversível do processo. Os estudos relativos ao desenvolvimento desse processo conduziram a operação de um reator adaptado denominado Acetador de Frings (Ebner, 1967), que funciona hoje em muitas instalações industriais.

Outras sociedades propuseram, também, reatores adaptados à indústria de vinagre utilizando o processo submerso, tais como: VOGELBUSCH GESELLSCHAFT mb.H. (1977), CHEMAP A. G. (PROCESS ENGINEERING Co. S. A., 1977) e a sociedade CHANSARD.

2.3.3 Imobilização em suportes sólidos

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

Kennedy et al. (1980) imobilizaram células acéticas em partículas de titânio por adsorção, e obtiveram uma produtividade de 5 g/L.h, utilizando um reator de leito fluidizado.

Ghommidh, Navarro e Messing (1982) obtiveram desempenhos semelhantes empregando a adsorção das células de *Acetobacter aceti* em suporte cerâmico de Cordierite. Realizaram, também, estudos de inibição do processo pelo ácido acético num biorreator de leito fixo e fluxo pulsado. Em estudos preliminares, com células livres,

mostraram que a produção de ácido acético não é totalmente dependente da taxa de crescimento microbiano e a produção continua a ocorrer, até mesmo, após o crescimento cessar. Estes pesquisadores demonstraram que, a altas taxas de diluição, a difusão do oxigênio no filme bacteriano foi a etapa limitante. Entretanto, a baixas taxas de diluição, efeitos de inibição na taxa de produção foram observados devido às concentrações de ácido acético produzido. A baixas taxas de diluição, perdas por evaporação do etanol foram significativas, devido ao longo tempo de residência do meio no reator.

Ghomidh, Cutayar e Navarro (1986) afirmaram que as partículas cerâmicas contendo células bacterianas imobilizadas devem ser densas o suficiente para circularem rapidamente no reator, permitindo uma melhor transferência de massa no sistema. Verificaram que, à medida que se aumentava a taxa de diluição, a concentração de ácido acético no estado estacionário diminuía, devido ao menor número de células presentes no reator. Para as taxas de diluição de 0,001/h e 0,07/h, as concentrações de ácido acético foram de 89g/L e 13g/L, respectivamente. Esses autores verificaram, também, a relação estequiométrica existente entre o consumo de etanol e produção de ácido acético.

Mamba, Kimura e Nagai (1985) fixaram bactérias acéticas em fibras de polipropileno, as quais permitiam a difusão do oxigênio no seu interior; mas, nesse caso, as produtividades obtidas foram baixas (0,2 g/L.h).

Bar, Gainer e Kirwan (1986) estudaram o comportamento de células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em suporte de troca iônica de celulose. Definiram o comportamento adsorptivo destas células com várias resinas de troca iônica. Essas resinas mostraram ser suportes promissores para a imobilização de células.

2.3.4 Imobilização em géis hidrofílicos

Vários autores realizaram a imobilização de células acéticas em géis hidrofílicos, tais como, Osuga, Mori e Kato (1984), Sun e Furusaki (1990), Fumi et al. (1992), Moraes (1991) e Paz (1992).

Osuga, Mori e Kato (1984) imobilizaram células acéticas por oclusão em matriz de gel de κ -carragena. As partículas foram incubadas num biorreator de leite fluidizado com boa aeração, operando em regime contínuo. Verificaram que, após 2 dias, o número de células no gel alcançava 100 vezes o número inicial. O oxigênio foi o fator limitante para o aumento do número de células e, por conseguinte, para o aumento da produção. Eles observaram, tanto por microscopia ótica quanto eletrônica, que colônias de bactérias foram formadas e constituíram uma camada densa próxima à superfície do gel. Durante a fermentação, as células foram gradualmente liberadas do gel para o meio através de crateras na superfície do gel. Concluíram que, tanto as células no gel quanto as liberadas contribuem para a produção total de ácido acético.

Sun e Furusaki (1990) operando em contínuo um biorreator de leite fluidizado trifásico, usando células de *Acetobacter aceti* imobilizadas em alginato de cálcio, mostraram que tanto as células imobilizadas quanto as liberadas do gel contribuem para a produção de ácido acético. Concluíram que a produtividade foi pouco afetada pela taxa de diluição na fermentação empregando células imobilizadas. Esses autores propuseram modelos teóricos para o processo contínuo e verificaram que os modelos concordam aproximadamente com os resultados experimentais obtidos. Os resultados experimentais e/ou cálculos teóricos, baseados em modelos cinéticos, mostraram que as células liberadas do gel foram importantes na produção de ácido acético, principalmente quando a fração sólido-líquido foi pequena e/ou quando o diâmetro das partículas de gel foi grande. Realizaram, também, cálculos teóricos que mostraram que uma fração sólido-líquido ótima e/ou tamanho de partícula ótima existem a altas taxas de diluição, devido ao fato

do $K_L a$ depender da fração sólido-líquido e do diâmetro da partícula, de acordo com a correlação para o $K_L a$ obtida por eles.

Fumi et al. (1992) investigaram alguns fatores que afetam o consumo de oxigênio pelas células bacterianas do gênero *Acetobacter* imobilizadas em alginato de cálcio, tais como: concentração de alginato, tamanho das partículas, densidade celular no gel e imobilização em fibras de dupla camada ou em partículas convencionais. Trabalharam com concentrações de alginato de 2, 3 e 4 %, tendo as partículas 1,5; 2,5 e 2,5 mm de diâmetro, respectivamente. A densidade celular no gel variou desde 10^5 até 10^9 células por mL de gel.

Os resultados mostraram que as taxas máximas de consumo de oxigênio e desprendimento de células estão relacionadas com a concentração de alginato e com a concentração celular no gel.

Taxas de consumo de oxigênio menores foram obtidas em partículas com concentrações de alginato de 3 e 4 %. Isto pode ser devido ao fato da porosidade das partículas de gel diminuir com o aumento da concentração de alginato, e ao diâmetro diferente das partículas. Observaram também, o aumento na liberação de células da matriz quando utilizaram uma solução 4 % de alginato.

A taxa de consumo de oxigênio pelas células imobilizadas pareceu ser dependente da densidade celular, pois aumentando-se a concentração celular até 10^8 células/mL de gel, a taxa de consumo de oxigênio aumentou. Para densidade celular maior que 10^8 , a taxa permaneceu constante, devido à limitação de oxigênio no meio.

Concentrações de alginato diferente não afetam a viabilidade celular, porém estocagem longa em soluções 0,5 M CaCl_2 a 4°C reduz o número de células viáveis.

A imobilização das células em fibras de dupla camada de alginato não interferiu na viabilidade celular nem na taxa de consumo de oxigênio, e estas fibras impediram a liberação de células da matriz polimérica.

Paz, Santana e Eguchi (1993), usando a linhagem de *Acetobacter* CCT 2026, conduziram fermentações em contínuo com

células livres e células imobilizadas em alginato. Verificaram também, no sistema com células imobilizadas, que tanto as células imobilizadas quanto as liberadas do gel contribuíram para a produção global. Esses autores estudaram a cinética de consumo do oxigênio, a transferência de massa em reator de leito fluidizado e as características de mistura nesse biorreator. Observaram que a adição de pequena quantidade de α -alumina à matriz de gel, aumentou significativamente a produção de ácido acético e que o biorreator apresentou um comportamento de mistura perfeita.

2.4 Transferência de massa nos processos

2.4.1 Transferência de massa em dispersões gás-líquido

Calderbank e Moo-Young (1961) desenvolveram técnicas para medir a área interfacial em dispersões gás-líquido. Foi possível, assim, obterem coeficientes de transferência de massa na fase líquida nas dispersões gás-líquido. Os resultados obtidos foram comparados com outros dados da literatura para transferência de calor e massa em dispersões líquido-líquido e gás-sólido, nas quais as fases dispersas estão livres para moverem-se sob ação da gravidade.

Os dados foram correlacionados pela seguinte equação:

$$K_L (S_c)^{2/3} = \frac{h_c}{C_p \rho_c} (P_r)^{2/3} = 0,31 \left(\frac{\Delta \rho \mu_c g}{\rho_c^2} \right)^{1/3}$$

Para bolhas de gás maiores, que não se comportam como esferas rígidas, os autores propuseram a seguinte correlação:

$$K_L (S_c)^{1/2} = 0,42 \left(\frac{\Delta \rho \mu_c g}{\rho_c^2} \right)^{1/3}$$

Em ambas, o coeficiente de transferência de massa aumenta com a diferença entre as massas específicas da fase dispersa e da fase contínua.

Ho e Ju (1988) estudaram os efeitos da presença de microorganismos vivos sobre o coeficiente de difusão e a solubilidade do oxigênio no meio de fermentação. Ambos decrescem com o aumento da concentração de células no meio de fermentação.

2.4.2 Transferência de massa e retenção de gás em sistemas trifásicos

2.4.2.1 Coeficiente de transferência de massa e fração sólido-líquido

Os vários estudos de transferência de massa, realizados em leitos fluidizados trifásicos com esferas de vidro, cerâmica, sílica e metais mostraram que partículas maiores e mais densas quebram as bolhas de gás mais facilmente que as menores e mais leves (Fan e Newcomer, 1981). Estudos de transferência de massa com partículas de baixa densidade foram feitos utilizando géis hidrofílicos.

Sun, Nozawa e Furusaki (1988) estudaram o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio gás-líquido, $K_L a$, usando como fase sólida partículas de alginato de cálcio. Os resultados mostraram que o $K_L a$ foi menor que em colunas de bolhas, independente do diâmetro das partículas de gel. Além disso, observaram que o comportamento fluidodinâmico, de mistura e da transferência de massa gás-líquido entre as fases líquida e gasosa diferiram daquelas encontradas em leitos convencionais de partículas mais densas. Os autores concluíram que em sistemas como esse, o fato do $K_L a$ ser menor que em colunas de bolhas é uma característica de partículas de baixa densidade, tais como as de géis. Por outro lado, o $K_L a$ aumentou para a operação com partículas de diâmetro maior e com menores frações sólido-líquido.

Em trabalho posterior, Sun e Furusaki (1988) mostraram que as partículas de alginato não tiveram nenhum efeito sobre a quebra das bolhas de ar. A diminuição do $K_L a$ com o diâmetro das partículas é causada pela redução do coeficiente de transferência de massa na fase líquida, K_L . Em consequência da aderência das partículas menores de gel à superfície das bolhas, diminuindo a área interfacial gás-líquido. O valor de K_L não foi afetado pela fração sólido-líquido, $\epsilon_{s/L}$. O efeito da quantidade de sólidos no sistema

foi atribuído à redução do espaço vazio para as bolhas emergirem no sistema, responsável pela coalescência das bolhas.

Os efeitos da difusão intrapartícula foram considerados por Sun e Furusaki (1989). Nesse caso, os valores de $K_L a$ obtidos foram de 5 a 20 % maiores quando comparados com o obtido no trabalho anterior, nas mesmas condições. Os autores concluíram que a difusão intrapartícula exerce influência marcante no $K_L a$ e que a transferência de massa líquido-sólido poderia ser desprezada quando comparada à difusão intrapartícula, isto é, a concentração de oxigênio na superfície do gel é igual à do seio da fase líquida.

Paz (1992) mediu o $K_L a$ para a transferência de oxigênio em biorreator trifásico com partículas de gel. O $K_L a$ aumentou com a taxa de diluição e valores mais elevados foram obtidos com partículas de gel contendo alumina.

2.4.2.2 Retenção de gás

Bly e Worden (1990) examinaram os efeitos de alguns parâmetros na retenção de gás num biorreator de leito fluidizado trifásico. Os resultados experimentais mostraram que a retenção de gás é fortemente afetada pela velocidade superficial do líquido, tamanho e densidade das partículas, concentração de eletrólitos no meio, tipo de dispersor de gás e temperatura. Observações quantitativas e qualitativas foram feitas utilizando partículas de vidro e partículas de gel de baixa densidade. Verificaram que o grau de coalescência das bolhas e o modo de fluidização foram altamente dependentes de cada sistema. O sistema com partículas de baixa densidade comportou-se de modo muito diferente quando comparado ao sistema com partículas de vidro. Mais notavelmente, a coalescência de bolhas foi observada sob muitas condições operacionais para o sistema com partículas de gel. O grau de coalescência foi dependente, principalmente, do diâmetro da partícula e tipo de líquido, até mesmo utilizando-se uma solução 0,2 M de CaCl_2 , considerada não-coalescente, a coalescência das

bolhas esteve presente. Outra diferença entre os sistemas com partículas de vidro em relação aos com partículas de gel foi o modo de fluidização. As partículas de vidro foram fluidizadas principalmente pela ascensão do líquido; a vazão de gás não ajudou na fluidização da fase sólida. As partículas de gel, por outro lado, foram parcialmente fluidizadas pela fase gasosa.

2.4.3 Medida da concentração de oxigênio dissolvido

Eiki e Osono (1990) estimaram a concentração de oxigênio dissolvido num fermentador como uma função do tipo de Michaelis-Menten. Segundo eles, medidas diretas com um eletrodo de oxigênio fornecem apenas um valor no meio ambiente do sensor, sem fornecer valor representativo indicando o ambiente todo do fermentador.

Martinez, Galindo e Salvador (1989) determinaram a influência da posição do distribuidor de gás na determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em fermentadores convencionais de quatro diferentes tamanhos. Concluíram que a influência da posição do distribuidor no K_La é mais evidente à medida que o tamanho dos tanques aumentou. A fim de avaliarem, também, se a posição do eletrodo de oxigênio tinha algum efeito nos valores de K_La , fizeram algumas determinações num tanque de 0,416 m de diâmetro. A posição do eletrodo foi variada em termos de altura e obtiveram valores semelhantes de K_La . Concluíram que o tempo de mistura é muito pequeno em comparação com o tempo requerido para medidas de K_La , portanto, poderia ser assumido que a tensão do oxigênio era uniforme em todo o tanque e que a posição do eletrodo não afetou as medidas de K_La de maneira significativa.

Paz (1992) estudou uma melhor posição da localização do eletrodo de oxigênio num biorreator de leito fluidizado circulante, a fim de que as medidas não sofressem interferências. Obteve poucas oscilações nas medidas de concentração de oxigênio dissolvido quando o eletrodo foi colocado 5 cm acima do fundo, formando um ângulo de 45° com a horizontal.

Capítulo 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 Microorganismo

A linhagem do microorganismo usada foi uma linhagem de bactéria acética, isolada de uma usina de álcool e açúcar, no ponto de extração do caldo de cana-de-açúcar. Essa linhagem foi isolada pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" (Campinas, S.P., Brasil), FTPTAT, tendo a seguinte nomenclatura e o respectivo código de identificação: *Acetobacter* sp. CCT 2026. Essa linhagem foi mantida e estocada em ampolas liofilizadas na Coleção de Culturas Tropical, CCT, da FTPTAT.

3.2 Meios de cultura

Nos experimentos foram usados vários meios de cultura, de acordo com as necessidades de cada etapa do processo. O meio de manutenção foi usado para a etapa de crescimento inicial das células em frascos agitados. O meio de propagação foi usado para o crescimento celular em placas de Petri, e o de fermentação para os ensaios posteriores de crescimento celular e produção de ácido acético.

Os meios de cultura utilizados tiveram as seguintes composições:

3.2.1 Meio de manutenção (pH = 7,0)

Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Peptona bacteriológica (Difco)	3,0 g
Glicose (Ecibra)	25,0 g
Água destilada	1000,0 mL

3.2.2 Meio de propagação (pH = 3,0)

Extrato de levedura (Difco)	10,0 g
Peptona bacteriológica (Difco)	10,0 g
Glicose (Ecibra)	10,0 g
Etanol absoluto (Ecibra)	50,0 mL
Ácido acético glacial (Grupo Química)	10,0 mL
Ágar bacteriológico (Difco)	20,0 g
Água destilada	1000,0 mL

3.2.3 Meio de fermentação (pH = 4,0)

Extrato de levedura (Difco)	10,0 g
Peptona bacteriológica (Difco)	10,0 g
Glicose (Ecibra)	10,0 g
Etanol absoluto (Ecibra)	50,0 mL
Ácido acético glacial (Grupo Química)	5,0 mL
Ágar bacteriológico (Difco)	20,0 g
Cloreto de cálcio dihidratado (Ecibra)	1,0 g
Água destilada	1000,0 mL

3.3 Polissacarídeo para a imobilização celular

O polissacarídeo utilizado como suporte na imobilização das células foi o alginato de sódio, lote AWK 3647, produzido pela Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Japão).

3.4 Material inerte para aumentar a densidade das partículas de gel

Como material inerte para aumentar a densidade das partículas de gel foi utilizado α -alumina, de massa específica de $3,2 \text{ g/cm}^3$, fornecida pela Alcoa (Brasil). Em experimentos preliminares foram testados os seguintes materiais finamente pulverizados: carbeto de tungstênio (71VF-NS-1), aço inoxidável (41C e 41C-NS) e titânio-alumina (130SF), todos fornecidos pela METCO Inc. (Estados Unidos). As massas específicas desses materiais foram: 13,6; 7,1; e $3,6 \text{ g/cm}^3$, respectivamente.

3.5 Sal gelificante

O sal gelificante utilizado, específico para alginato de sódio, foi o cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), da marca Ecibra.

3.6 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- dois reatores de vidro Pyrex, encamisados, com fundo cônico;
- ejetor de tubos concêntricos;
- espectrofotômetro modelo Spectronic 21 D, de marca Milton Roy;

- mesa rotatória com controle de temperatura, de marca Superohm;
- autoclave horizontal, marca Sociedade Fabbe Ltda.;
- câmara de fluxo laminar, modelo VLFS-18-M, marca Veco;
- balança eletrônica, modelo BG 400, marca Gehaka;
- banho ultratermostático, modelo 111, da Fanem Ltda.;
- circulador de água, à temperatura constante, modelo 8000, marca Poly Science;
- compressor de ar Schulz Dentalcompressor, da Metalúrgica Schulz S.A.;
- medidor de pH, Mettler Delta 340;
- bomba peristáltica Masterflex, com duplo cabeçote de alimentação;
- microscópio ótico modelo M150, marca Reichert-Jung, acoplado ao sistema fotográfico automático Photostar, da mesma marca;
- monitor de oxigênio biológico, modelo 53, da Yellow Springs Instrument Co., e seus acessórios;

3.7 Instalações experimentais

As instalações experimentais consistiram basicamente do sistema para a imobilização celular e do sistema de fermentação contínua em reator de leito circulante, cujas montagens são descritas a seguir.

3.7.1 Sistema para a imobilização de células

Na etapa de preparação das partículas de gel de alginato de sódio contendo células viáveis imobilizadas, utilizou-se um ejetor apropriadamente construído.

A montagem experimental, em escala de bancada, está esquematizada na Figura 3.1. O ejetor é constituído de dois tubos capilares concêntricos. O tubo externo é de vidro com 3,0 cm de

altura e 0,1 cm de diâmetro interno, aproximadamente. O tubo interno é uma agulha hipodérmica de 2,6 cm de comprimento e 0,05 cm de diâmetro interno. O ejetor é ligado a uma bomba peristáltica de vazão constante, com duplo cabeçote. Para a obtenção das partículas, as soluções de gel são simultaneamente bombeadas através dos tubos externo e interno do ejetor.

Através deste sistema é possível obter-se partículas aproximadamente esféricas, compostas de duas partes distintas: um núcleo mais denso, composto de gel e material inerte, recoberto pela suspensão celular em solução de gel.

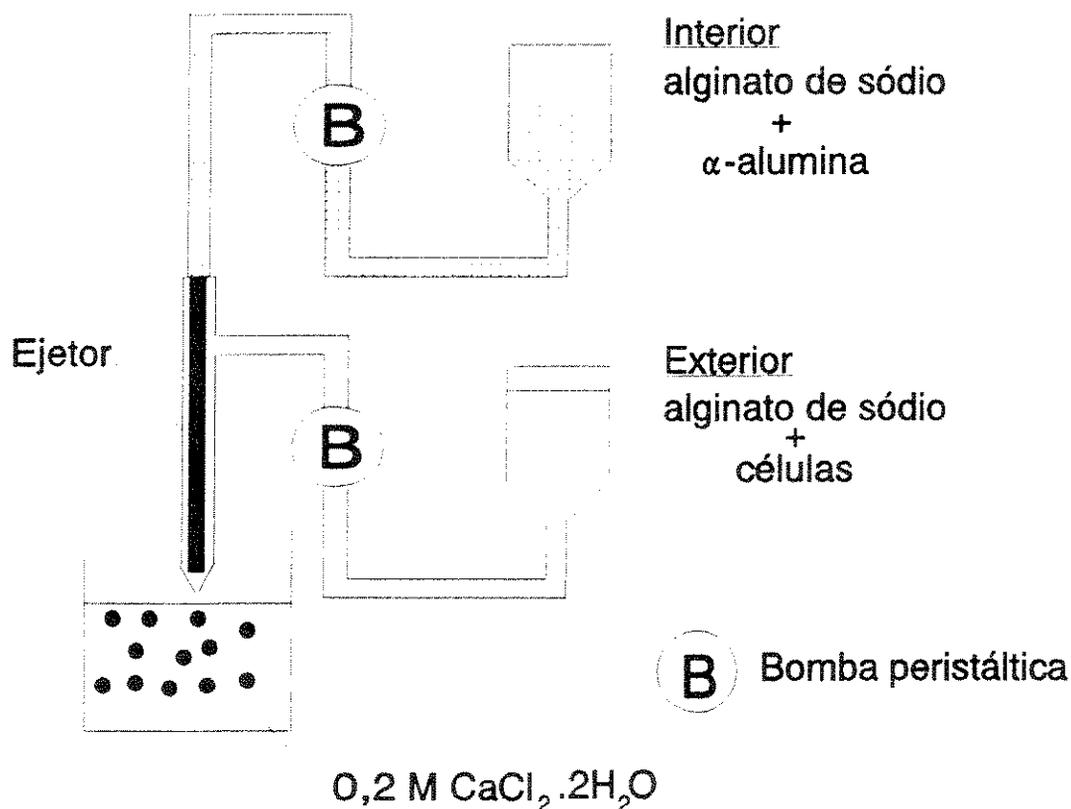


Figura 3.1 - Esquema do sistema utilizado para a obtenção das partículas de biocatalisador.

3.7.2 Sistema de fermentação contínua em biorreator

A Figura 3.2 mostra um esquema da montagem experimental utilizado nos testes de fermentação contínua em biorreator e na medida da taxa de respiração celular. O biorreator, usado em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos dessa faculdade (Moraes, 1991) e (Paz, 1992), é construído em vidro Pyrex, com diâmetro interno de 6,0 cm e 150 mL de volume reacional. O distribuidor de gás é uma placa de vidro porosa. O meio líquido é continuamente alimentado através de uma bomba peristáltica a partir de um tanque de armazenamento de 14 L. Um eletrodo polarográfico de oxigênio, está instalado à uma altura de 5 cm acima do fundo, formando um ângulo de 45° com a horizontal. O ar é fornecido através de um compressor odontológico, passando previamente por um medidor de vazão capilar, um umidificador, e sistema de filtros, antes de entrar no biorreator. A temperatura no biorreator é mantida em 30°C através da circulação de água aquecida na sua jaqueta térmica. Essa água é também conectada com os recipientes de consumo de oxigênio. Um condensador, colocado na saída dos gases, evita o arraste acentuado de etanol e água do biorreator.

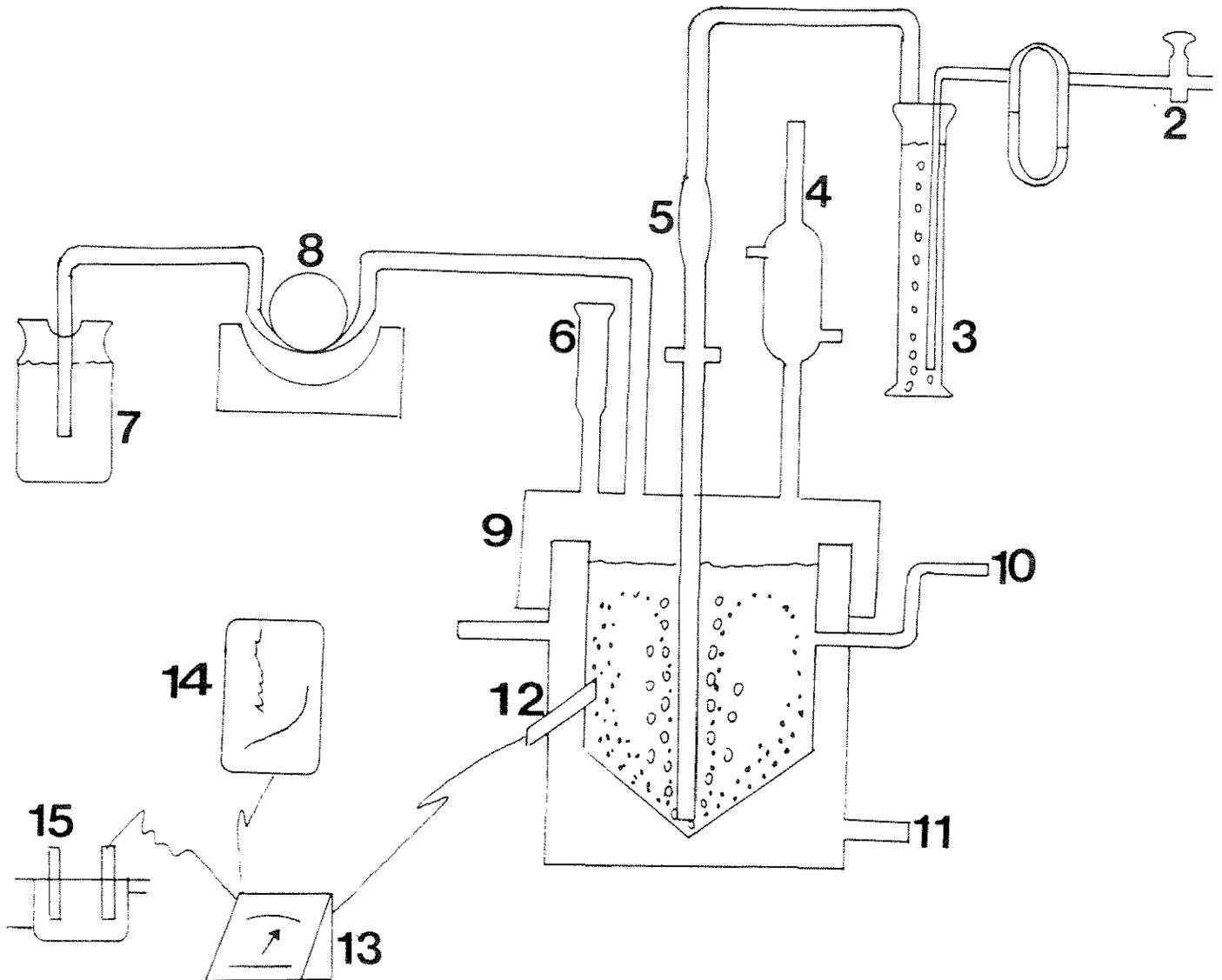


Figura 3.2 - Esquema da montagem experimental do sistema de fermentação. 1 - ar; 2 - válvula; 3 - umidificador; 4 - condensador; 5 - filtros de ar; 6 - antiespumante; 7 - tanque de alimentação; 8 - bomba peristáltica; 9 - bioreator; 10 - saída do bioreator; 11 - água com temperatura controlada; Monitor de oxigênio biológico: 12 - eletrodo de oxigênio dissolvido; 13 - analisador de oxigênio dissolvido; 14 - registrador; 15 - recipiente com controle de temperatura através de camisa com água e locais para receber as amostras.

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 Determinação da concentração de ácido acético

A análise do ácido acético foi feita por titulação com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,05 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

3.8.2 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular de células livres no meio de cultura foi realizada por dois métodos distintos: contagem de colônias em placas de Petri e medidas da absorbância de soluções. No primeiro caso, semeava-se uma alíquota de 0,1 mL de amostra, convenientemente diluída em água esterilizada, na superfície de meio de propagação contido em placas de Petri. Após incubação por 48 a 60 horas em estufa a 30°C, contava-se as colônias crescidas com o auxílio de uma lupa. Os resultados eram obtidos em termos de unidades formadoras de colônias por mililitro de solução, UFC/mL, considerando-se que cada célula viável originava uma colônia.

No caso de células imobilizadas em alginato de sódio, estes géis passavam por uma etapa de solubilização preliminar, para que os microorganismos fossem liberados em solução. Para tal, adicionava-se cerca de 0,15 g de partículas de biocatalisador em um erlenmeyer contendo 10,0 mL de solução tampão de citrato 0,1 M, pH 5,0, previamente esterilizado. Esse erlenmeyer era colocado em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm até a solubilização completa das partículas. A suspensão obtida era convenientemente diluída em água destilada esterilizada e incubada em placas de Petri, seguindo o mesmo procedimento descrito acima.

A determinação da concentração celular pela medida da absorbância das soluções foi feita diluindo-se uma amostra de 5 a 10 vezes em água destilada, de maneira a se trabalhar na faixa

linear do método. A absorbância foi lida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm. Os valores foram convertidos em concentração celular através de uma curva que correlacionava massa celular seca com a absorbância das respectivas suspensões microbianas. No item 3.9.8, encontra-se a descrição detalhada dos métodos de obtenção da massa celular seca e construção da curva de calibração.

3.8.3 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido diretamente através de um pHmetro.

3.8.4 Determinação do oxigênio dissolvido

A concentração do oxigênio dissolvido foi medida utilizando-se um eletrodo polarográfico à temperatura de 30°C. As leituras foram feitas como porcentagem da concentração de saturação do oxigênio no meio líquido. A concentração de saturação do oxigênio dissolvido em água, $0,2115 \cdot 10^{-3}$ M, foi obtida de tabelas a 30°C e 1 atm. Adotou-se o mesmo valor para o meio de fermentação.

3.9 Procedimentos experimentais

3.9.1 Preparação dos meios de cultura

Os reagentes sólidos dos meios de cultura (extrato de levedura, peptona, glicose, ágar, cloreto de cálcio, carbonato de cálcio) foram pesados e solubilizados em água destilada, nas proporções citadas no item 3.2 deste capítulo, e esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

O etanol e o ácido acético foram adicionados aos meios de cultura após a esterilização.

3.9.2 Preparação das placas de Petri

As placas de Petri foram adequadamente embaladas e esterilizadas em autoclave a 121°C, por 20 minutos. Em seguida foram transferidas para estufa de secagem. O meio de propagação foi distribuído nas placas à temperatura ambiente.

3.9.3 Preparação do pré-inóculo

Com o objetivo de obter suspensões microbianas de densidade celular elevada, indispensável na fase de imobilização, foi utilizado o procedimento descrito a seguir.

Partia-se sempre de uma ampola liofilizada contendo o microorganismo (para garantir a reprodutibilidade dos resultados), reativava-se a cultura com 0,1 mL de água destilada esterilizada por 15 minutos, e transferia-se esta suspensão para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de meio de manutenção. Incubava-se em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm, por 24 horas. Repicava-se 0,5 mL desta suspensão celular para a superfície de cada uma das dez placas de Petri que continham meio de propagação, e incubavam-se as placas em estufa a 30°C, por 48h. Raspavam-se, cuidadosamente, as colônias crescidas em superfície e suspendiam-se as mesmas em 50 mL de meio de fermentação. Transferia-se este material para erlenmeyer de 300 mL de capacidade e incubava-se em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm por 27h. O pré-inóculo, obtido por este procedimento, apresentava sempre uma concentração celular de *Acetobacter* da ordem de 10^7 UFC/mL, adequado para ser utilizado na etapa de imobilização. Esse procedimento foi baseado no trabalho de Moraes (1991), o qual teve algumas modificações introduzidas por Paz (1992).

Todas as etapas foram realizadas assepticamente.

3.9.4 Preparação de biocatalisador convencional

A preparação de biocatalisador convencional foi feita segundo a metodologia clássica de imobilização de células em géis hidrofílicos. O processo envolve três etapas básicas: preparação da solução polimérica e mistura do pré-inóculo, extrusão da suspensão resultante dessa mistura em solução contendo sal gelificante, e gelificação das partículas.

A solução polimérica contendo 4 % (peso/volume) de alginato de sódio em água destilada foi preparada mediante agitação e aquecimento em banho-maria a 80°C, para obtenção de uma solução homogênea. Essa solução foi deixada em repouso, por 24 horas, para a eliminação de bolhas de ar e esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121°C.

O pré-inóculo era misturado à solução de alginato esterilizada numa razão de 1:1 (volume/volume), à temperatura ambiente, e homogeneizado com bastão de vidro.

Na etapa de extrusão, a mistura de alginato e pré-inóculo era gotejada, através de seringa descartável Plastipak de 5 mL de capacidade, em 200 mL de solução aquosa esterilizada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M, à temperatura de 10°C. A seringa era munida de agulha de 1,3 mm de diâmetro interno, mantida à uma distância de 5 cm da solução gelificante. Com esse procedimento, obtinham-se partículas aproximadamente esféricas de 1,7 mm de diâmetro médio, as quais foram mantidas imersas em solução gelificante por um período de 20 minutos para endurecimento das mesmas.

Imediatamente antes de sua utilização no biorreator, as partículas eram separadas da solução, por filtração, sendo em seguida lavadas com 200 mL de água destilada esterilizada para remoção do excesso de gelificante.

Todas as etapas foram realizadas assepticamente.

3.9.5 Preparação de biocatalisador de densidade variada

A preparação de biocatalisador de densidade variada envolveu as três etapas básicas descritas no item anterior, com modificações para a incorporação de material inerte nas partículas.

Em ensaios preliminares, o material inerte foi disperso na solução de alginato. O pré-inóculo foi misturado a essa solução, e as partículas preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.9.5. Os materiais adicionados foram: α -alumina, 71VF-NS-1 de carbeto de tungstênio, 41C e 41C-NS de aço inoxidável e 130SF de titânio-alumina. As partículas preparadas com este procedimento apresentaram um diâmetro médio de 1,7 μm e diferentes velocidades terminais de queda indicando a diferença de densidade entre elas.

Nos experimentos posteriores, as partículas foram preparadas de modo que o material inerte fosse confinado no núcleo das mesmas, o qual era recoberto por uma suspensão de alginato e pré-inóculo. A metodologia de recobrimento utilizada foi baseada no trabalho de Tanaka, Irie e Ochi (1992) e adaptada para a obtenção de partículas de densidade variada. Nesses experimentos foram preparadas duas soluções aquosas de alginato de concentrações diferentes: uma contendo 4 % (peso/volume) de alginato de sódio e a outra contendo 1 % (peso/volume) de alginato de sódio e 0 %, ou 1 %, ou 5 %, ou 20 %, ou 40 % (peso/volume) de α -alumina. As soluções foram deixadas em repouso, por 24 horas, para eliminação das bolhas de ar, e em seguida, esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121°C.

O pré-inóculo era misturado com a solução esterilizada isenta de material inerte em uma razão de 1:1 (volume/volume).

As soluções de gel eram bombeadas para o ejetor de tubos concêntricos, descrito no item 3.7.1. A solução contendo material inerte era alimentada ao tubo interno e a suspensão contendo o pré-inóculo ao tubo externo. A relação entre as vazões das soluções externa/interna foi de 2,38. Ambas as soluções eram extrudadas simultaneamente e as partículas coletadas em 200 mL de solução esterilizada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M, a 10°C. A distância entre o ejetor

e a solução gelificante foi mantida em 5 cm nas preparações. A gelificação e a lavagem das partículas para utilização no biorreator foram feitas nas mesmas condições do item 3.9.4. Com esse procedimento, obtinham-se partículas aproximadamente esféricas de 3,0 mm de diâmetro médio.

Todas as etapas foram realizadas assepticamente.

3.9.6 Determinação da velocidade terminal de queda das partículas de gel

A velocidade terminal de queda das partículas foi determinada em uma coluna de vidro Pyrex, de 45 cm de altura e 6 cm de diâmetro interno, contendo água destilada. Foram feitas várias medidas do tempo necessário para as partículas precorrerem 23 cm da coluna. Com o tempo médio obtido, calculava-se a velocidade terminal de queda das partículas.

3.9.7 Determinação da massa específica das partículas de gel

A massa específica das partículas de gel foi determinada através da velocidade terminal de queda das mesmas. Os valores de massa específica podem ser obtidos através da expressão simplificada de velocidade terminal de queda das partícula para o regime intermediário ($0,4 < \text{Rep} < 500$), dada por:

$$v_t = \left[\frac{4 (\rho_p - \rho)^2 g^2}{225 \rho_{H_2O} \mu_{H_2O}} \right]^{1/3} dp$$

onde:

$$\rho_p = \rho_{H_2O} + \sqrt{\frac{225 \rho \mu \left(\frac{v_t}{dp} \right)^3}{4g^2}}$$

Em ensaios preliminares foi testada a determinação da massa específica das partículas de gel pelo método do picnômetro. Os resultados mostraram-se inconsistentes, devido à imprecisões na medida da massa das partículas, em virtude do caráter hidrofílico do gel.

3.9.8 Construção da curva de calibração da absorbância em função da concentração celular

A concentração de uma cultura em crescimento está relacionada com a densidade óptica, DO, ou turbidez de uma suspensão de células. Com soluções diluídas é obtida uma relação linear entre essas variáveis, podendo-se obter uma curva de calibração característica do sistema. As diluições devem ser realizadas de modo que a DO medida seja inferior a 0,5 unidades.

A curva de calibração entre massa celular seca e a absorbância foi estabelecida segundo a seqüência de procedimentos descritos a seguir.

Um volume de 10 mL de pré-inóculo obtido de acordo com o procedimento 3.9.3 foi adicionado a 10 mL de água destilada, e a suspensão centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos. Em seguida, eram descartados 10 mL do sobrenadante e as células ressuspensas no volume residual. A suspensão obtida foi filtrada, sob vácuo de 0,84 atm, através de uma membrana millipore de abertura igual a 0,43 μm , de massa determinada previamente.

A torta resultante foi lavada com 10 mL de água destilada e submetida à secagem em estufa a 110°C, por 12 horas, sendo em seguida, resfriada em dessecador por 12 horas. Após esse período, efetuou-se a pesagem repetindo-se a etapa de secagem e resfriamento em dessecador até que se alcançasse peso constante. A perda de água da membrana foi determinada submetendo-se duas membranas virgens às mesmas condições anteriores de secagem e resfriamento. A massa celular foi calculada subtraindo-se a massa da membrana seca da massa total.

foi atribuído à redução do espaço vazio para as bolhas emergirem no sistema, responsável pela coalescência das bolhas.

Os efeitos da difusão intrapartícula foram considerados por Sun e Furusaki (1989). Nesse caso, os valores de $K_L a$ obtidos foram de 5 a 20 % maiores quando comparados com o obtido no trabalho anterior, nas mesmas condições. Os autores concluíram que a difusão intrapartícula exerce influência marcante no $K_L a$ e que a transferência de massa líquido-sólido poderia ser desprezada quando comparada à difusão intrapartícula, isto é, a concentração de oxigênio na superfície do gel é igual à do seio da fase líquida.

Paz (1992) mediu o $K_L a$ para a transferência de oxigênio em biorreator trifásico com partículas de gel. O $K_L a$ aumentou com a taxa de diluição e valores mais elevados foram obtidos com partículas de gel contendo alumina.

2.4.2.2 Retenção de gás

Bly e Worden (1990) examinaram os efeitos de alguns parâmetros na retenção de gás num biorreator de leito fluidizado trifásico. Os resultados experimentais mostraram que a retenção de gás é fortemente afetada pela velocidade superficial do líquido, tamanho e densidade das partículas, concentração de eletrólitos no meio, tipo de dispersor de gás e temperatura. Observações quantitativas e qualitativas foram feitas utilizando partículas de vidro e partículas de gel de baixa densidade. Verificaram que o grau de coalescência das bolhas e o modo de fluidização foram altamente dependentes de cada sistema. O sistema com partículas de baixa densidade comportou-se de modo muito diferente quando comparado ao sistema com partículas de vidro. Mais notavelmente, a coalescência de bolhas foi observada sob muitas condições operacionais para o sistema com partículas de gel. O grau de coalescência foi dependente, principalmente, do diâmetro da partícula e tipo de líquido, até mesmo utilizando-se uma solução 0,2 M de CaCl_2 , considerada não-coalescente, a coalescência das

bolhas esteve presente. Outra diferença entre os sistemas com partículas de vidro em relação aos com partículas de gel foi o modo de fluidização. As partículas de vidro foram fluidizadas principalmente pela ascensão do líquido; a vazão de gás não ajudou na fluidização da fase sólida. As partículas de gel, por outro lado, foram parcialmente fluidizadas pela fase gasosa.

2.4.3 Medida da concentração de oxigênio dissolvido

Eiki e Osono (1990) estimaram a concentração de oxigênio dissolvido num fermentador como uma função do tipo de Michaelis-Menten. Segundo eles, medidas diretas com um eletrodo de oxigênio fornecem apenas um valor no meio ambiente do sensor, sem fornecer valor representativo indicando o ambiente todo do fermentador.

Martinez, Galindo e Salvador (1989) determinaram a influência da posição do distribuidor de gás na determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em fermentadores convencionais de quatro diferentes tamanhos. Concluíram que a influência da posição do distribuidor no K_La é mais evidente à medida que o tamanho dos tanques aumentou. A fim de avaliarem, também, se a posição do eletrodo de oxigênio tinha algum efeito nos valores de K_La , fizeram algumas determinações num tanque de 0,416 m de diâmetro. A posição do eletrodo foi variada em termos de altura e obtiveram valores semelhantes de K_La . Concluíram que o tempo de mistura é muito pequeno em comparação com o tempo requerido para medidas de K_La , portanto, poderia ser assumido que a tensão do oxigênio era uniforme em todo o tanque e que a posição do eletrodo não afetou as medidas de K_La de maneira significativa.

Paz (1992) estudou uma melhor posição da localização do eletrodo de oxigênio num biorreator de leito fluidizado circulante, a fim de que as medidas não sofressem interferências. Obteve poucas oscilações nas medidas de concentração de oxigênio dissolvido quando o eletrodo foi colocado 5 cm acima do fundo, formando um ângulo de 45° com a horizontal.

Capítulo 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 Microorganismo

A linhagem do microorganismo usada foi uma linhagem de bactéria acética, isolada de uma usina de álcool e açúcar, no ponto de extração do caldo de cana-de-açúcar. Essa linhagem foi isolada pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" (Campinas, S.P., Brasil), FTPTAT, tendo a seguinte nomenclatura e o respectivo código de identificação: *Acetobacter* sp. CCT 2026. Essa linhagem foi mantida e estocada em ampolas liofilizadas na Coleção de Culturas Tropical, CCT, da FTPTAT.

3.2 Meios de cultura

Nos experimentos foram usados vários meios de cultura, de acordo com as necessidades de cada etapa do processo. O meio de manutenção foi usado para a etapa de crescimento inicial das células em frascos agitados. O meio de propagação foi usado para o crescimento celular em placas de Petri, e o de fermentação para os ensaios posteriores de crescimento celular e produção de ácido acético.

Os meios de cultura utilizados tiveram as seguintes composições:

3.2.1 Meio de manutenção (pH = 7,0)

Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Peptona bacteriológica (Difco)	3,0 g
Glicose (Ecibra)	25,0 g
Água destilada	1000,0 mL

3.2.2 Meio de propagação (pH = 3,0)

Extrato de levedura (Difco)	10,0 g
Peptona bacteriológica (Difco)	10,0 g
Glicose (Ecibra)	10,0 g
Etanol absoluto (Ecibra)	50,0 mL
Ácido acético glacial (Grupo Química)	10,0 mL
Ágar bacteriológico (Difco)	20,0 g
Água destilada	1000,0 mL

3.2.3 Meio de fermentação (pH = 4,0)

Extrato de levedura (Difco)	10,0 g
Peptona bacteriológica (Difco)	10,0 g
Glicose (Ecibra)	10,0 g
Etanol absoluto (Ecibra)	50,0 mL
Ácido acético glacial (Grupo Química)	5,0 mL
Ágar bacteriológico (Difco)	20,0 g
Cloreto de cálcio dihidratado (Ecibra)	1,0 g
Água destilada	1000,0 mL

3.3 Polissacarídeo para a imobilização celular

O polissacarídeo utilizado como suporte na imobilização das células foi o alginato de sódio, lote AWK 3647, produzido pela Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Japão).

3.4 Material inerte para aumentar a densidade das partículas de gel

Como material inerte para aumentar a densidade das partículas de gel foi utilizado α -alumina, de massa específica de $3,2 \text{ g/cm}^3$, fornecida pela Alcoa (Brasil). Em experimentos preliminares foram testados os seguintes materiais finamente pulverizados: carbeto de tungstênio (71VF-NS-1), aço inoxidável (41C e 41C-NS) e titânio-alumina (130SF), todos fornecidos pela METCO Inc. (Estados Unidos). As massas específicas desses materiais foram: 13,6; 7,1; e $3,6 \text{ g/cm}^3$, respectivamente.

3.5 Sal gelificante

O sal gelificante utilizado, específico para alginato de sódio, foi o cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), da marca Ecibra.

3.6 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- dois reatores de vidro Pyrex, encamisados, com fundo cônico;
- ejetor de tubos concêntricos;
- espectrofotômetro modelo Spectronic 21 D, de marca Milton Roy;

- mesa rotatória com controle de temperatura, de marca Superohm;
- autoclave horizontal, marca Sociedade Fabbe Ltda.;
- câmara de fluxo laminar, modelo VLFS-18-M, marca Veco;
- balança eletrônica, modelo BG 400, marca Gehaka;
- banho ultratermostático, modelo 111, da Fanem Ltda.;
- circulador de água, à temperatura constante, modelo 8000, marca Poly Science;
- compressor de ar Schulz Dentalcompressor, da Metalúrgica Schulz S.A.;
- medidor de pH, Mettler Delta 340;
- bomba peristáltica Masterflex, com duplo cabeçote de alimentação;
- microscópio ótico modelo M150, marca Reichert-Jung, acoplado ao sistema fotográfico automático Photostar, da mesma marca;
- monitor de oxigênio biológico, modelo 53, da Yellow Springs Instrument Co., e seus acessórios;

3.7 Instalações experimentais

As instalações experimentais consistiram basicamente do sistema para a imobilização celular e do sistema de fermentação contínua em reator de leito circulante, cujas montagens são descritas a seguir.

3.7.1 Sistema para a imobilização de células

Na etapa de preparação das partículas de gel de alginato de sódio contendo células viáveis imobilizadas, utilizou-se um ejetor apropriadamente construído.

A montagem experimental, em escala de bancada, está esquematizada na Figura 3.1. O ejetor é constituído de dois tubos capilares concêntricos. O tubo externo é de vidro com 3,0 cm de

altura e 0,1 cm de diâmetro interno, aproximadamente. O tubo interno é uma agulha hipodérmica de 2,6 cm de comprimento e 0,05 cm de diâmetro interno. O ejetor é ligado a uma bomba peristáltica de vazão constante, com duplo cabeçote. Para a obtenção das partículas, as soluções de gel são simultaneamente bombeadas através dos tubos externo e interno do ejetor.

Através deste sistema é possível obter-se partículas aproximadamente esféricas, compostas de duas partes distintas: um núcleo mais denso, composto de gel e material inerte, recoberto pela suspensão celular em solução de gel.

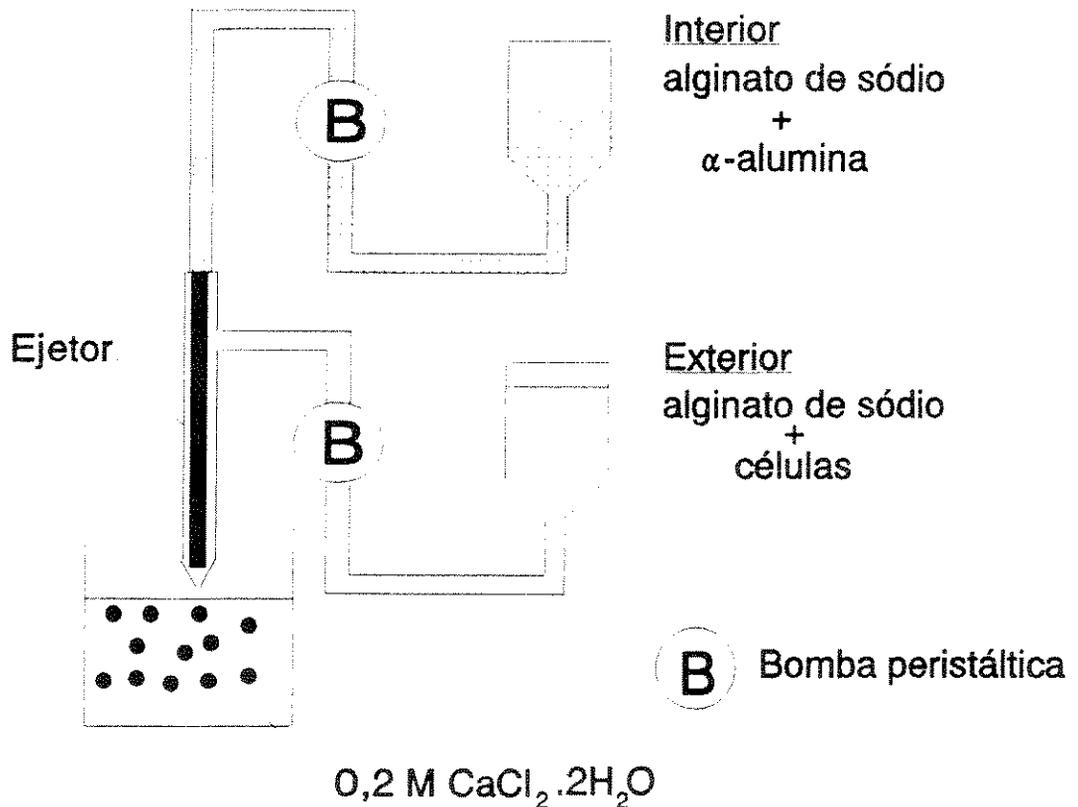


Figura 3.1 - Esquema do sistema utilizado para a obtenção das partículas de biocatalisador.

3.7.2 Sistema de fermentação contínua em biorreator

A Figura 3.2 mostra um esquema da montagem experimental utilizado nos testes de fermentação contínua em biorreator e na medida da taxa de respiração celular. O biorreator, usado em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos dessa faculdade (Moraes, 1991) e (Paz, 1992), é construído em vidro Pyrex, com diâmetro interno de 6,0 cm e 150 mL de volume reacional. O distribuidor de gás é uma placa de vidro porosa. O meio líquido é continuamente alimentado através de uma bomba peristáltica a partir de um tanque de armazenamento de 14 L. Um eletrodo polarográfico de oxigênio, está instalado à uma altura de 5 cm acima do fundo, formando um ângulo de 45° com a horizontal. O ar é fornecido através de um compressor odontológico, passando previamente por um medidor de vazão capilar, um umidificador, e sistema de filtros, antes de entrar no biorreator. A temperatura no biorreator é mantida em 30°C através da circulação de água aquecida na sua jaqueta térmica. Essa água é também conectada com os recipientes de consumo de oxigênio. Um condensador, colocado na saída dos gases, evita o arraste acentuado de etanol e água do biorreator.

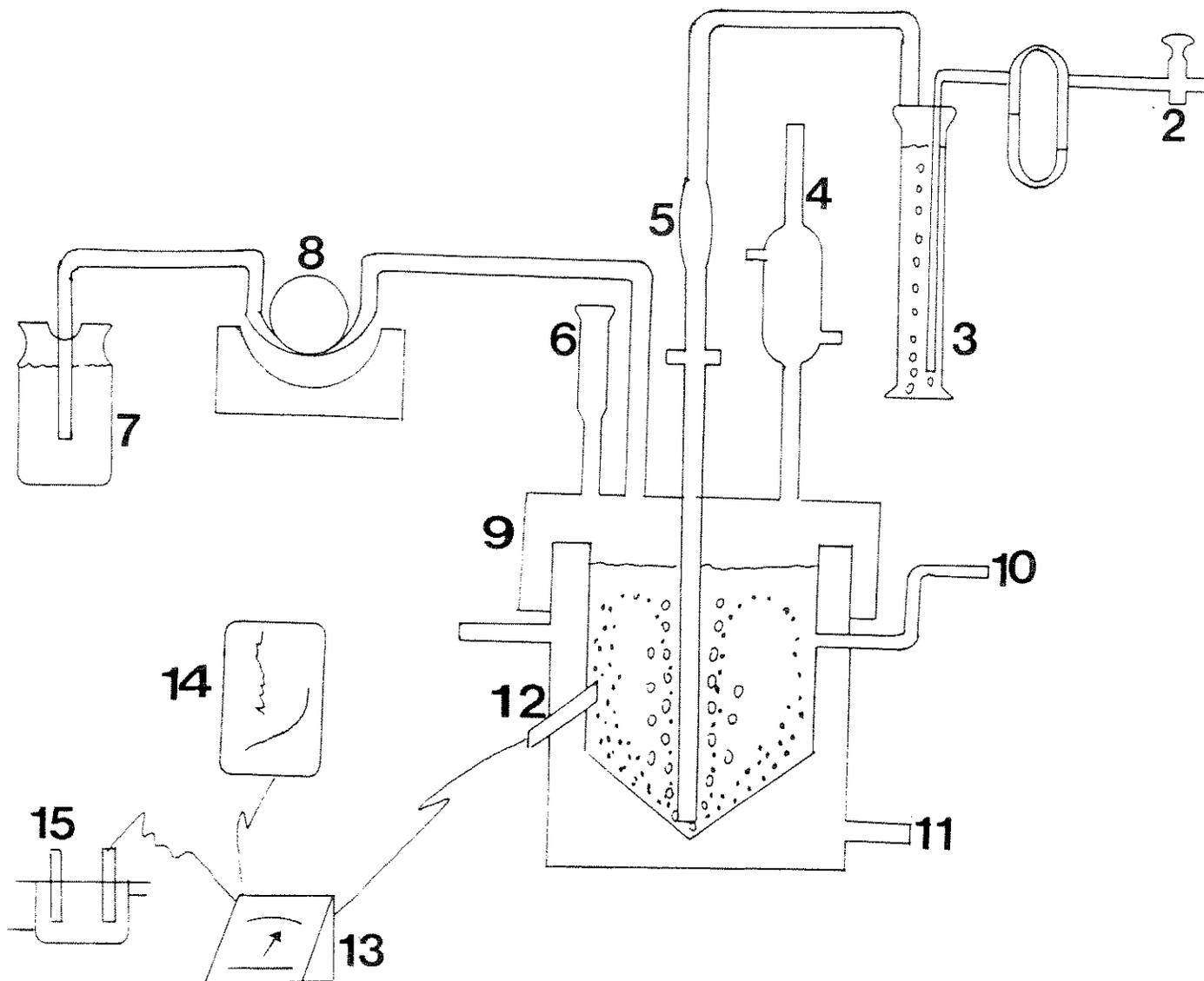


Figura 3.2 - Esquema da montagem experimental do sistema de fermentação. 1 - ar; 2 - válvula; 3 - umidificador; 4 - condensador; 5 - filtros de ar; 6 - antiespumante; 7 - tanque de alimentação; 8 - bomba peristáltica; 9 - biorreator; 10 - saída do biorreator; 11 - água com temperatura controlada; Monitor de oxigênio biológico: 12 - eletrodo de oxigênio dissolvido; 13 - analisador de oxigênio dissolvido; 14 - registrador; 15 - recipiente com controle de temperatura através de camisa com água e locais para receber as amostras.

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 Determinação da concentração de ácido acético

A análise do ácido acético foi feita por titulação com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,05 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

3.8.2 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular de células livres no meio de cultura foi realizada por dois métodos distintos: contagem de colônias em placas de Petri e medidas da absorbância de soluções. No primeiro caso, semeava-se uma alíquota de 0,1 mL de amostra, convenientemente diluída em água esterilizada, na superfície de meio de propagação contido em placas de Petri. Após incubação por 48 a 60 horas em estufa a 30°C, contava-se as colônias crescidas com o auxílio de uma lupa. Os resultados eram obtidos em termos de unidades formadoras de colônias por mililitro de solução, UFC/mL, considerando-se que cada célula viável originava uma colônia.

No caso de células imobilizadas em alginato de sódio, estes géis passavam por uma etapa de solubilização preliminar, para que os microorganismos fossem liberados em solução. Para tal, adicionava-se cerca de 0,15 g de partículas de biocatalisador em um erlenmeyer contendo 10,0 mL de solução tampão de citrato 0,1 M, pH 5,0, previamente esterilizado. Esse erlenmeyer era colocado em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm até a solubilização completa das partículas. A suspensão obtida era convenientemente diluída em água destilada esterilizada e incubada em placas de Petri, seguindo o mesmo procedimento descrito acima.

A determinação da concentração celular pela medida da absorbância das soluções foi feita diluindo-se uma amostra de 5 a 10 vezes em água destilada, de maneira a se trabalhar na faixa

linear do método. A absorbância foi lida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm. Os valores foram convertidos em concentração celular através de uma curva que correlacionava massa celular seca com a absorbância das respectivas suspensões microbianas. No item 3.9.8, encontra-se a descrição detalhada dos métodos de obtenção da massa celular seca e construção da curva de calibração.

3.8.3 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido diretamente através de um pHmetro.

3.8.4 Determinação do oxigênio dissolvido

A concentração do oxigênio dissolvido foi medida utilizando-se um eletrodo polarográfico à temperatura de 30°C. As leituras foram feitas como porcentagem da concentração de saturação do oxigênio no meio líquido. A concentração de saturação do oxigênio dissolvido em água, $0,2115 \cdot 10^{-3}$ M, foi obtida de tabelas a 30°C e 1 atm. Adotou-se o mesmo valor para o meio de fermentação.

3.9 Procedimentos experimentais

3.9.1 Preparação dos meios de cultura

Os reagentes sólidos dos meios de cultura (extrato de levedura, peptona, glicose, ágar, cloreto de cálcio, carbonato de cálcio) foram pesados e solubilizados em água destilada, nas proporções citadas no item 3.2 deste capítulo, e esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

O etanol e o ácido acético foram adicionados aos meios de cultura após a esterilização.

3.9.2 Preparação das placas de Petri

As placas de Petri foram adequadamente embaladas e esterilizadas em autoclave a 121°C, por 20 minutos. Em seguida foram transferidas para estufa de secagem. O meio de propagação foi distribuído nas placas à temperatura ambiente.

3.9.3 Preparação do pré-inóculo

Com o objetivo de obter suspensões microbianas de densidade celular elevada, indispensável na fase de imobilização, foi utilizado o procedimento descrito a seguir.

Partia-se sempre de uma ampola liofilizada contendo o microorganismo (para garantir a reprodutibilidade dos resultados), reativava-se a cultura com 0,1 mL de água destilada esterilizada por 15 minutos, e transferia-se esta suspensão para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de meio de manutenção. Incubava-se em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm, por 24 horas. Repicava-se 0,5 mL desta suspensão celular para a superfície de cada uma das dez placas de Petri que continham meio de propagação, e incubavam-se as placas em estufa a 30°C, por 48h. Raspavam-se, cuidadosamente, as colônias crescidas em superfície e suspendiam-se as mesmas em 50 mL de meio de fermentação. Transferia-se este material para erlenmeyer de 300 mL de capacidade e incubava-se em mesa rotativa a 30°C e 180 rpm por 27h. O pré-inóculo, obtido por este procedimento, apresentava sempre uma concentração celular de *Acetobacter* da ordem de 10^7 UFC/mL, adequado para ser utilizado na etapa de imobilização. Esse procedimento foi baseado no trabalho de Moraes (1991), o qual teve algumas modificações introduzidas por Paz (1992).

Todas as etapas foram realizadas assepticamente.

3.9.4 Preparação de biocatalisador convencional

A preparação de biocatalisador convencional foi feita segundo a metodologia clássica de imobilização de células em géis hidrofílicos. O processo envolve três etapas básicas: preparação da solução polimérica e mistura do pré-inóculo, extrusão da suspensão resultante dessa mistura em solução contendo sal gelificante, e gelificação das partículas.

A solução polimérica contendo 4 % (peso/volume) de alginato de sódio em água destilada foi preparada mediante agitação e aquecimento em banho-maria a 80°C, para obtenção de uma solução homogênea. Essa solução foi deixada em repouso, por 24 horas, para a eliminação de bolhas de ar e esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121°C.

O pré-inóculo era misturado à solução de alginato esterilizada numa razão de 1:1 (volume/volume), à temperatura ambiente, e homogeneizado com bastão de vidro.

Na etapa de extrusão, a mistura de alginato e pré-inóculo era gotejada, através de seringa descartável Plastipak de 5 mL de capacidade, em 200 mL de solução aquosa esterilizada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M, à temperatura de 10°C. A seringa era munida de agulha de 1,3 mm de diâmetro interno, mantida à uma distância de 5 cm da solução gelificante. Com esse procedimento, obtinham-se partículas aproximadamente esféricas de 1,7 mm de diâmetro médio, as quais foram mantidas imersas em solução gelificante por um período de 20 minutos para endurecimento das mesmas.

Imediatamente antes de sua utilização no biorreator, as partículas eram separadas da solução, por filtração, sendo em seguida lavadas com 200 mL de água destilada esterilizada para remoção do excesso de gelificante.

Todas as etapas foram realizadas assepticamente.

3.9.5 Preparação de biocatalisador de densidade variada

A preparação de biocatalisador de densidade variada envolveu as três etapas básicas descritas no item anterior, com modificações para a incorporação de material inerte nas partículas.

Em ensaios preliminares, o material inerte foi disperso na solução de alginato. O pré-inóculo foi misturado a essa solução, e as partículas preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.9.5. Os materiais adicionados foram: α -alumina, 71VF-NS-1 de carbeto de tungstênio, 41C e 41C-NS de aço inoxidável e 130SF de titânio-alumina. As partículas preparadas com este procedimento apresentaram um diâmetro médio de 1,7 mm e diferentes velocidades terminais de queda indicando a diferença de densidade entre elas.

Nos experimentos posteriores, as partículas foram preparadas de modo que o material inerte fosse confinado no núcleo das mesmas, o qual era recoberto por uma suspensão de alginato e pré-inóculo. A metodologia de recobrimento utilizada foi baseada no trabalho de Tanaka, Irie e Ochi (1992) e adaptada para a obtenção de partículas de densidade variada. Nesses experimentos foram preparadas duas soluções aquosas de alginato de concentrações diferentes: uma contendo 4 % (peso/volume) de alginato de sódio e a outra contendo 1 % (peso/volume) de alginato de sódio e 0 %, ou 1 %, ou 5 %, ou 20 %, ou 40 % (peso/volume) de α -alumina. As soluções foram deixadas em repouso, por 24 horas, para eliminação das bolhas de ar, e em seguida, esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121°C.

O pré-inóculo era misturado com a solução esterilizada isenta de material inerte em uma razão de 1:1 (volume/volume).

As soluções de gel eram bombeadas para o ejetor de tubos concêntricos, descrito no item 3.7.1. A solução contendo material inerte era alimentada ao tubo interno e a suspensão contendo o pré-inóculo ao tubo externo. A relação entre as vazões das soluções externa/interna foi de 2,38. Ambas as soluções eram extrudadas simultaneamente e as partículas coletadas em 200 mL de solução esterilizada de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M, a 10°C. A distância entre o ejetor

e a solução gelificante foi mantida em 5 cm nas preparações. A gelificação e a lavagem das partículas para utilização no biorreator foram feitas nas mesmas condições do item 3.9.4. Com esse procedimento, obtinham-se partículas aproximadamente esféricas de 3,0 mm de diâmetro médio.

Todas as etapas foram realizadas assepticamente.

3.9.6 Determinação da velocidade terminal de queda das partículas de gel

A velocidade terminal de queda das partículas foi determinada em uma coluna de vidro Pyrex, de 45 cm de altura e 6 cm de diâmetro interno, contendo água destilada. Foram feitas várias medidas do tempo necessário para as partículas precorrerem 23 cm da coluna. Com o tempo médio obtido, calculava-se a velocidade terminal de queda das partículas.

3.9.7 Determinação da massa específica das partículas de gel

A massa específica das partículas de gel foi determinada através da velocidade terminal de queda das mesmas. Os valores de massa específica podem ser obtidos através da expressão simplificada de velocidade terminal de queda das partículas para o regime intermediário ($0,4 < \text{Rep} < 500$), dada por:

$$v_t = \left[\frac{4 (\rho_p - \rho)^2 g^2}{225 \rho_{H_2O} \mu_{H_2O}} \right]^{1/3} dp$$

onde:

$$\rho_p = \rho_{H_2O} + \sqrt{\frac{225 \rho \mu \left(\frac{v_t}{dp} \right)^3}{4 g^2}}$$

Em ensaios preliminares foi testada a determinação da massa específica das partículas de gel pelo método do picnômetro. Os resultados mostraram-se inconsistentes, devido à imprecisões na medida da massa das partículas, em virtude do caráter hidrofílico do gel.

3.9.8 Construção da curva de calibração da absorbância em função da concentração celular

A concentração de uma cultura em crescimento está relacionada com a densidade óptica, DO, ou turbidez de uma suspensão de células. Com soluções diluídas é obtida uma relação linear entre essas variáveis, podendo-se obter uma curva de calibração característica do sistema. As diluições devem ser realizadas de modo que a DO medida seja inferior a 0,5 unidades.

A curva de calibração entre massa celular seca e a absorbância foi estabelecida segundo a seqüência de procedimentos descritos a seguir.

Um volume de 10 mL de pré-inóculo obtido de acordo com o procedimento 3.9.3 foi adicionado a 10 mL de água destilada, e a suspensão centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos. Em seguida, eram descartados 10 mL do sobrenadante e as células ressuspensas no volume residual. A suspensão obtida foi filtrada, sob vácuo de 0,84 atm, através de uma membrana millipore de abertura igual a 0,43 μm , de massa determinada previamente.

A torta resultante foi lavada com 10 mL de água destilada e submetida à secagem em estufa a 110°C, por 12 horas, sendo em seguida, resfriada em dessecador por 12 horas. Após esse período, efetuou-se a pesagem repetindo-se a etapa de secagem e resfriamento em dessecador até que se alcançasse peso constante. A perda de água da membrana foi determinada submetendo-se duas membranas virgens às mesmas condições anteriores de secagem e resfriamento. A massa celular foi calculada subtraindo-se a massa da membrana seca da massa total.

As medidas de turbidez foram obtidas diluindo-se convenientemente o pré-inóculo e lendo-se a absorbância das amostras em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm.

3.9.9 Determinação da massa celular contida nas partículas de biocatalisador

A concentração das células imobilizadas foi determinada através da quantificação da massa celular seca nas partículas de biocatalisador. Para tal, preparou-se partículas de biocatalisador conforme os procedimentos descritos no item 3.9.4 e 3.9.5. Paralelamente, foram preparadas partículas de referência, isentas de células, substituindo-se o volume de pré-inóculo utilizado pelo mesmo volume de meio de cultura, na solução de alginato de sódio.

Ambas as partículas foram submetidas à secagem em estufa a 110°C, por 12 horas, e resfriadas em dessecador por 12 horas. Após esse período, efetuou-se a pesagem repetindo-se a etapa de secagem e resfriamento em dessecador até que se alcançasse peso constante. A massa celular foi calculada subtraindo-se a perda de água, da massa das partículas de biocatalisador.

A concentração de células viáveis, nas partículas do biocatalisador, foi determinada através da solubilização das mesmas em solução tampão citrato 0,1 M, e pH igual a 5,0, seguida de diluições sucessivas e dispersão em placas de Petri contendo meio de propagação. As placas foram incubadas à temperatura de 30°C por 48 a 60 horas. O número de colônias crescidas foi contado e a concentração foi expressa em unidades formadoras de colônia por mL de gel.

3.9.10 Avaliação dos efeitos da razão entre as vazões das soluções de alginato de sódio na preparação dos biocatalisadores de densidade variada

Estes ensaios foram conduzidos utilizando-se a montagem experimental descrita no item 3.7.1. A solução interna era composta de alginato (1% p/v) e α -alumina (5% p/v) e a solução externa continha alginato de sódio (4% p/v) e uma solução de pré-inóculo.

As partículas de biocatalisador foram obtidas variando-se a razão entre as vazões de solução polimérica interna e externa. Os resultados foram avaliados através da determinação da taxa específica de consumo de oxigênio pela células imobilizadas e da determinação da velocidade terminal de queda das partículas.

3.9.11 Determinação da taxa específica de consumo de oxigênio pelas células imobilizadas

A determinação do consumo de oxigênio pelas células imobilizadas foi feito utilizando parte da montagem experimental esquematizada na Figura 3.2 e de acordo com o procedimento descrito a seguir.

Inicialmente, o meio de fermentação foi saturado com ar e colocado nos frascos de amostras com agitador magnético, do monitor de oxigênio biológico, esquematizado nos itens 12, 13, 14 e 15 da Figura 3.2. O eletrodo de oxigênio dissolvido foi imerso na solução e o sistema mantido à temperatura constante de 30°C. Em seguida, calibrou-se o equipamento considerando-se a condição de saturação do meio de fermentação como correspondendo ao valor de 100 %. As medidas de concentração de oxigênio dissolvido eram expressas em porcentagem do valor de saturação. As partículas de biocatalisador foram adicionados ao meio contido nos frascos, e interrompendo-se a agitação, registrou-se a queda da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

A taxa específica de consumo de oxigênio foi determinada através da inclinação da reta obtida, dividida pela concentração de células no gel.

3.9.12 Determinação do conteúdo de gás, de líquido e da fração sólido-líquido no biorreator

O conteúdo de gás, ϵ_G , foi determinado pela seguinte relação:

$$\epsilon_G = \frac{h_a - h_r}{h_a}$$

onde,

h_a - altura do líquido aerado (cm)

h_r - altura do líquido em repouso (cm)

A altura do líquido em repouso foi determinada interrompendo-se, simultaneamente, as vazões de gás e líquido no biorreator.

O conteúdo de líquido, ϵ_L , foi determinado pela razão entre o volume de líquido e o volume reacional total no biorreator.

$$\epsilon_L = \frac{V_L}{V_R}$$

onde,

V_L - volume de líquido (mL)

V_R - volume reacional (mL)

O volume de líquido foi determinado conhecendo-se o volume reacional, V_R , o volume de gás contido no biorreator, V_G , e o volume de sólidos adicionado, V_S .

$$V_L = V_R - (V_S + V_G)$$

A fração sólido-líquido, $\epsilon_{s/l}$, foi determinada pela seguinte relação:

$$\epsilon_{s/l} = \frac{V_S}{(V_L + V_S)}$$

3.9.13 Cálculo da produtividade de ácido acético e coeficiente de transferência de oxigênio

A produtividade do ácido acético na fermentação contínua, P_r , foi calculada pela relação:

$$Pr = D(C_{HAc2} - C_{HAc1})$$

onde,

D - taxa de diluição

C_{HAc2} e C_{HAc1} - concentrações final e inicial de ácido acético, respectivamente

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, K_La , foi calculado pela equação de balanço de oxigênio no estado estacionário:

Consumo total de oxigênio = $Q_{O_2} X$ = Transferência de oxigênio gás-líquido = $K_La (C^* - C_{O_0})$

O $K_L a$ é expresso por:

$$K_L a = \frac{Q_{O_2} X}{(C^* - C_{OD})}$$

onde,

Q_{O_2} - taxa específica de respiração celular

X - concentração celular

C^* - concentração saturante de oxigênio dissolvido no meio

C_{OD} - concentração de oxigênio dissolvido medida experimentalmente durante a fermentação

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

$$Q_{O_2} X = \frac{Pr}{60\epsilon_L}$$

Portanto, tem-se:

$$K_L a = \frac{Pr}{60\epsilon_L (C^* - C_{OD})}$$

3.9.14 Fermentações em biorreator de leito fluidizado

O sistema de fermentação contínua em biorreator foi testado nas condições experimentais descritas a seguir.

3.9.14.1 Fermentação com células livres

Para a obtenção dos perfis da produtividade de ácido acético e do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, inoculou-se o biorreator, contendo 146 mL de meio de fermentação, com 4 mL de pré-inóculo de *Acetobacter* sp. CCT 2026. A cada 12 horas adicionava-se 0,1 mL de azeite de oliva (rico em ácido oleico) com o objetivo de evitar a formação de espuma no biorreator. A taxa de aeração foi mantida em 8 vvm e as taxas de diluição variaram de 0,03 a 0,82/h. Cada ponto experimental foi obtido somente após se atingir o estado estacionário do sistema. Para a determinação do tempo correspondente ao estabelecimento do estado estacionário foram feitas medidas das concentrações de ácido acético até a obtenção de valores aproximadamente constantes.

3.9.14.2 Fermentação com células imobilizadas

O procedimento e as condições operacionais usadas nas fermentações com células imobilizadas foram as mesmas que as do item 3.9.14.1. Nesse caso, o biorreator foi inoculado com 8 mL de biocatalisador. Os ensaios foram conduzidos variando-se a massa específica das partículas de biocatalisador e a fração sólido-líquido no biorreator.

3.10 Experimentos preliminares

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de se definir um material inerte para ser adicionado à matriz de gel e aumentar a densidade das partículas de biocatalisador.

Para a definição do material inerte, foram testados os seguintes materiais especificados no item 3.4. Os materiais testados foram avaliados quanto à facilidade de incorporação na matriz de gel durante a preparação das partículas, e quanto à sua reatividade com o meio de fermentação e toxicidade às células.

As partículas foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.9.5 e caracterizadas quanto à velocidade terminal de queda e massa específica.

Para a avaliação da toxicidade dos materiais às células, foram conduzidas fermentações em frascos erlenmeyers, de 300 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio de fermentação e 10 mL de biocatalisador. Manteve-se a agitação e temperatura da mesa rotatória em 160 rpm e 30°C. Esses experimentos tiveram a duração de 93 horas, ao final dos quais foi determinada a quantidade de ácido acético no meio. A avaliação da reatividade dos materiais no meio de fermentação foi feita, em ensaios paralelos, com partículas isentas de células.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Resultados dos ensaios preliminares

Os resultados obtidos nos ensaios para avaliação na reatividade dos materiais, demonstraram que todos os materiais testados são inertes quando em contato com o meio de fermentação nas condições descritas no item 3.10.

Na Tabela 4.1 são apresentados os valores de concentrações de ácido acético, obtidos após 93 horas de fermentação, utilizando os diferentes materiais incorporados à matriz de gel. É apresentado, também, o valor obtido com células imobilizadas sem a incorporação de material.

Tabela 4.1 - Influência dos materiais adicionados à matriz de alginato na produção de ácido acético. Diâmetro médio das partículas: 1,7 mm.

Material adicionado 2 % (p/v)	Concentração de ácido acético (g/L)
α -alumina	5,8
41C e 41C-NS	5,7
71VF-NS-1	6,4
130SF	5,9
-----	2,5

Aparentemente, os suportes não apresentaram nenhum efeito de toxicidade às células. As concentrações de ácido acético apresentam valores superiores àquele obtido com células imobilizadas isentas de material inerte, indicando que a densidade das partículas exerce influência significativa no processo.

Na Tabela 4.2 são apresentados resultados de velocidade terminal de queda, número de Reynolds e massa específica para as partículas de densidade variada.

Tabela 4.2 - Influência do tipo de material adicionado à matriz polimérica. Diâmetro médio das partículas: 1,7 mm.

Concentração de alginato (%p/v)	Tipo de material inerte (2% p/v)	v_t (cm/s)	R_{ep} (-)	ρ_p (g/cm ³)
2%	41C e 41C - NS	2,3	39	1,04
2%	α -alumina	2,6	44	1,05
2%	130 SF	2,9	49	1,05
2%	71 VF-NS-1	3,1	58	1,06

Durante os experimentos observou-se que os materiais mais densos sedimentavam mais facilmente durante a extrusão, prejudicando a incorporação na matriz de gel. Os resultados obtidos confirmam essas informações, visto que a incorporação de uma mesma quantidade de material mais denso, deveria resultar em partículas com velocidades terminais significativamente maiores.

Dentre os materiais testados, a α -alumina foi o que apresentou maior facilidade de incorporação à matriz de gel. A partir dessas observações decidiu-se variar a densidade das partículas com a quantidade de α -alumina adicionada à matriz de gel. Na Tabela 4.3 são apresentados resultados que mostram a influência da concentração de α -alumina na velocidade terminal de queda, no número de Reynolds e na massa específica das partículas.

Tabela 4.3 - Influência da concentração de α -alumina adicionada à matriz polimérica. Diâmetro médio das partículas: 1,7 mm.

Concentração de alginato (%p/v)	Concentração de α -alumina (% p/v)	v_t (cm/s)	R_{ep} (-)	ρ_p (g/cm ³)
2%	6 %	3,9	66	1,08
2%	8%	4,7	80	1,11
2%	9 %	5,2	88	1,13

Para a concentração de α -alumina variando de 6 % a 9 %, a massa específica das partículas aumentou de 4,6 %.

4.2 Caracterização da morfologia da linhagem de *Acetobacter* sp. CCT 2026

Na Figura 4.1 pode-se observar a morfologia das células obtidas com a linhagem de *Acetobacter* sp. CCT 2026. Esta linhagem apresenta, depois de 50 horas em frasco agitado contendo meio de fermentação, a 30°C e 160 rpm, coloração roxa para o teste de gram, sendo, portanto, gram-positiva. Dependendo da idade, as células podem também apresentar um resultado negativo, tornando-se róseas. Esta variação não é incomum para as células de *Acetobacter*, conforme Krieg e Holt (1984). As células isoladas têm a forma aproximada de bastonetes cocóides.

Observa-se, com o auxílio de lupa que as colônias crescidas dessa cultura em meio de propagação, em placas de Petri, apresentam-se circulares, com superfícies lisas, bordas perfeitas, elevação plana e coloração bege brilhante.

4.3.3 Fotomicrografias das partículas de biocatalisador

A Figura 4.2 é a fotomicrografia de um biocatalisador recém-preparado com uma solução interna de 1% (p/v) de alginato e 40% (p/v) de α -alumina e solução externa de 4% (p/v) de alginato e pré-inóculo na proporção de 1:1 (volume/volume).



Figura 4.2 - Corte da seção transversal da partícula de biocatalisador recém-preparado. Ampliação 140 vezes.

Por essa fotomicrografia, observa-se a localização da α -alumina no núcleo central, região escura, e a camada de recobrimento, região mais clara.

Nas Figuras 4.3 e 4.4 observa-se as fotomicrografias de um biocatalisador após 15 dias de fermentação. Este biocatalisador foi preparado com uma solução interna de 1% (p/v) de alginato e 1% (p/v) de α -alumina e solução externa de 4% (p/v) de alginato e pré-inóculo na proporção de 1:1 (volume/volume).

Pela fotomicrografia da Figura 4.3 pode-se observar que colônias de células crescem na camada de recobrimento e, pela Figura 4.4 que essas colônias são distribuídas uniformemente na superfície da partícula.

A espessura da camada onde as células crescem, medida pela fotomicrografia da Figura 4.3 é de 0,295 mm. Esse crescimento periférico foi verificado por diversos autores, tais como: Osuga, Mori e Kato (1984), Sun e Furusaki (1990), Moraes (1991) e Paz (1992), em partículas preparadas pelo método convencional.

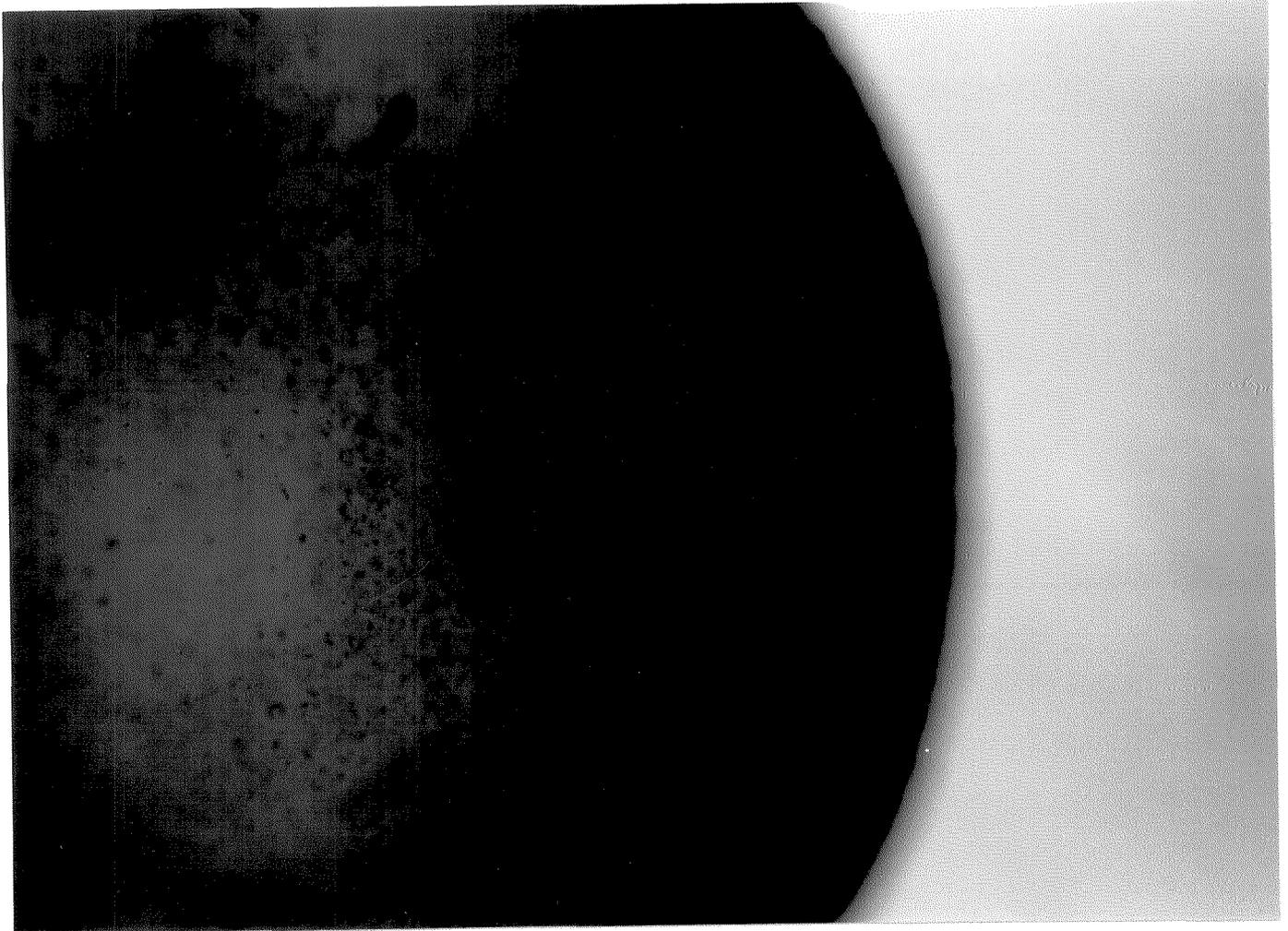


Figura 4.3 - Corte da seção transversal da partícula de biocatalisador. Partícula corada com safranina. Ampliação: 56 vezes.

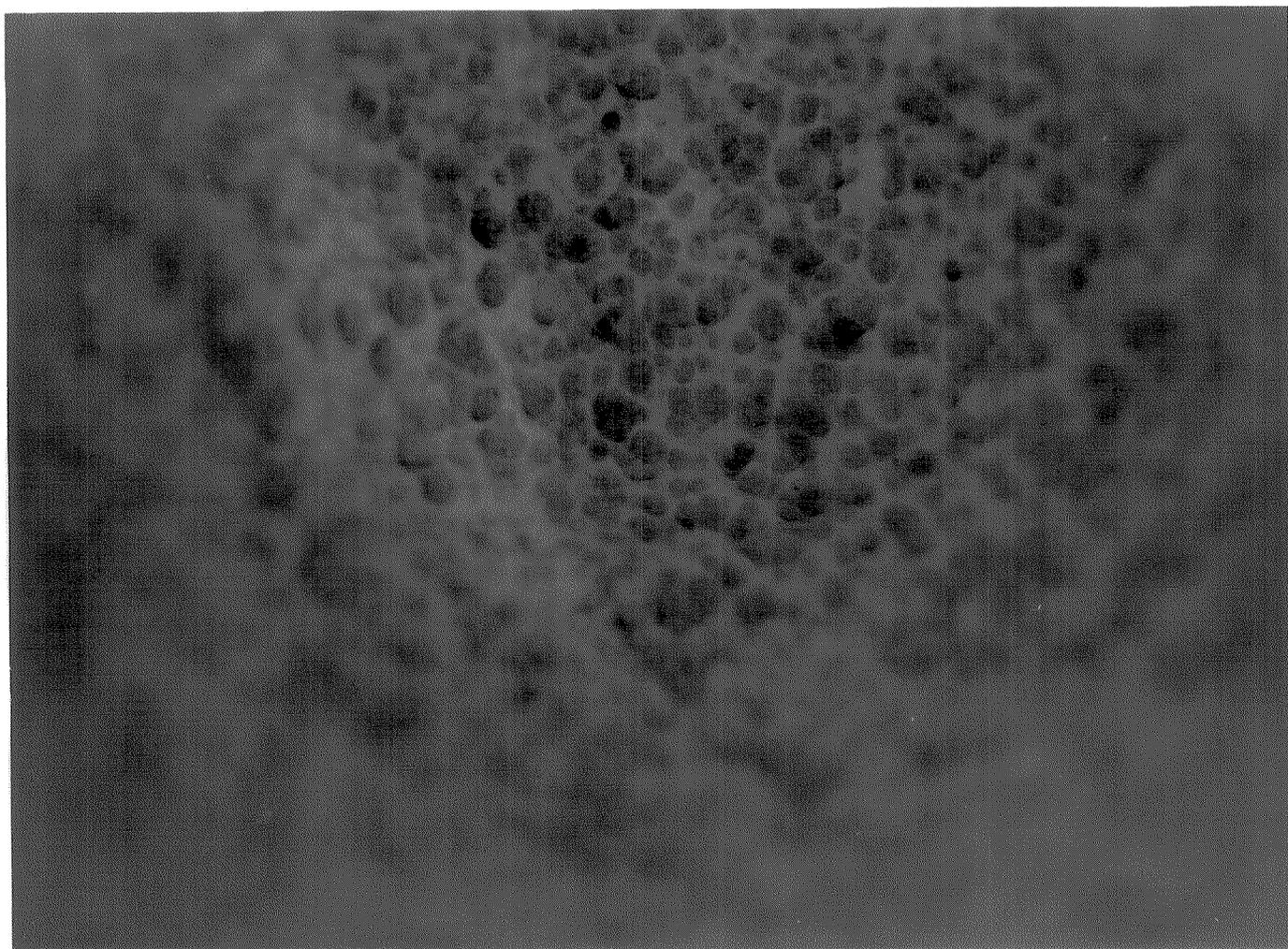


Figura 4.4 - Colônias crescidas uniformemente distribuídas na superfície da partícula de biocatalisador. Partícula corada com safranina. Ampliação: 140 vezes.

4.3.4 Massa celular nas partículas de biocatalisador

A obtenção da massa celular no gel é um fator muito importante, pois através da quantificação da massa celular no gel pode-se obter a real contribuição dessas células para a produtividade do sistema. Além disso, pode-se ter uma idéia da fração de morte celular ocorrido pela imobilização e do crescimento celular no gel durante a fermentação.

Para as partículas de biocatalisador recém-preparadas, obteve-se uma massa celular seca de 23,2 kg célula seca/m³ gel, seguindo o procedimento 3.9.9 para a determinação de massa celular seca no gel. Para essas mesmas partículas, após 15 dias de fermentação em contínuo, a massa celular seca foi de 57,2 kg célula seca/m³ gel. Este valor foi considerado como sendo o valor de saturação das células no gel. Sun e Furusaki (1990) obtiveram um valor de 24,9 Kg célula seca/m³ gel.

A concentração de células viáveis nas partículas de biocatalisador foi determinada segundo o procedimento 3.9.9. Os resultados, no entanto, não se mostraram reprodutíveis devido ao tempo de solubilização das partículas, o qual pode afetar a viabilidade celular. Por esse motivo, adotou-se a determinação da massa seca nas partículas como o método de determinação da concentração celular.

Além do mais, condições de agitação e temperatura de solubilização devem ser uniformizadas e isto não foi possível de ser realizado devido a não disponibilidade de uma mesa rotatória.

4.4 Fermentações contínuas em biorreator de leito fluidizado

4.4.1 Estabelecimento do estado estacionário

A resposta do sistema a uma perturbação em degrau correspondente a um aumento da vazão de alimentação é apresentada na Figura 4.5. Pode-se observar a oscilação característica desse tipo de sistema. Primeiramente a concentração de ácido acético diminui devido à ocorrência de uma maior eliminação das células suspensas. Ao mesmo tempo, a concentração de oxigênio dissolvido disponível aumenta, tendo como efeito um aumento da taxa de crescimento celular e taxa de consumo de etanol. A concentração de ácido acético sobe até atingir um valor relativamente constante, após 33 horas da perturbação. Considerou-se esse tempo para o estabelecimento do estado estacionário no sistema.

O tempo decorrido entre dois estados estacionários depende da amplitude da perturbação degrau imposta ao sistema. Para que esse tempo pudesse ser usado nos experimentos de fermentação contínua, efetuaram-se variações na taxa de diluição semelhantes à usada neste experimento.

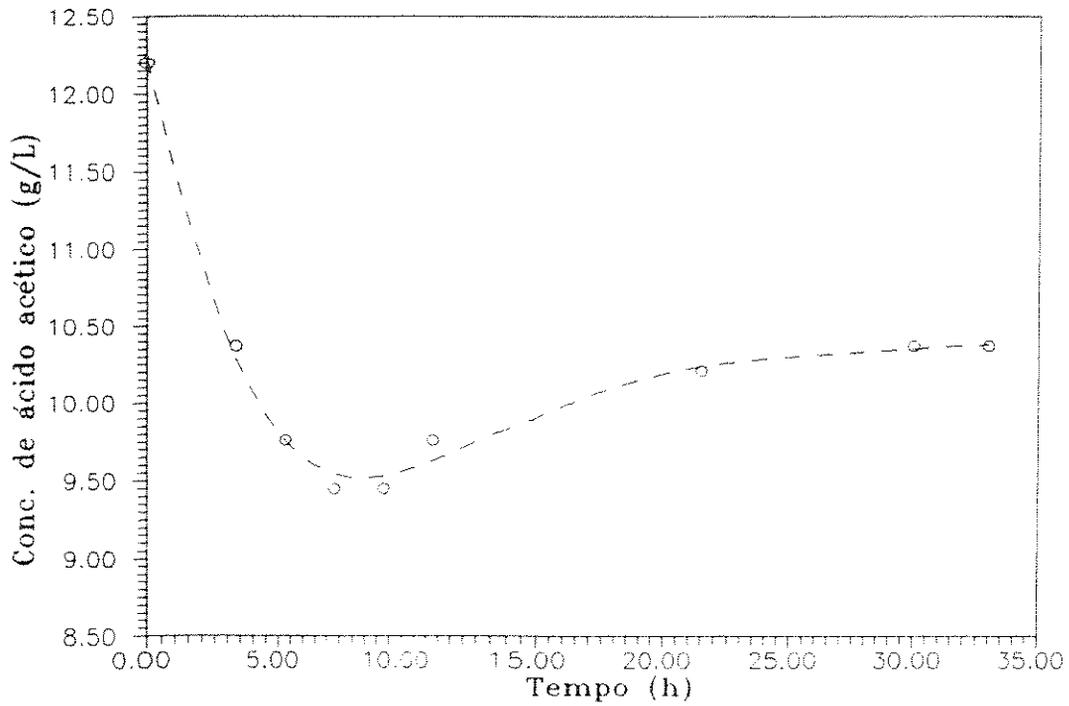


Figura 4.5 - Resposta do sistema a uma perturbação degrau na vazão de alimentação. Taxa de diluição inicial de 0,071/h passou para 0,154/h. Fração sólido-líquido: 0,11.

4.4.2 Fermentação com células livres

Os resultados destas fermentações podem ser observados na Figura 4.6 e na Figura 4.7, as quais caracterizam os perfis de produtividade de ácido acético e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em função da taxa de diluição. Na Figura 4.6 pode-se identificar o aumento da produtividade com a taxa de diluição até a região de lavagem das células ($D=0,3/h$).

Para os valores de taxas de diluição menores que $0,3/h$, a inclinação acentuada da curva é devido aos efeitos inibitórios do ácido acético. Verificou-se, nesses experimentos, que até a taxa de diluição de $0,3/h$, as concentrações de ácido acético foram superiores a 12 g/L , que segundo Sun e Furusaki (1990), já é um valor inibitório da taxa específica de crescimento para as células de *Acetobacter* por eles empregada. Paz (1992), empregando a linhagem *Acetobacter* sp. CCT 2026, verificou que o ácido acético é um forte inibidor na taxa de respiração celular para valores de concentração de ácido acético a partir de 14 g/L .

Para valores de taxa de diluição superiores a $0,45/h$, os efeitos inibitórios não estiveram presentes pois a concentração de ácido acético foi, em todos os casos, inferior a 10 g/L .

Observou-se experimentalmente a presença de um filme microbiano formado nas paredes do biorreator, característico do crescimento de células do gênero *Acetobacter*.

Com o aumento da taxa de diluição há o desprendimento gradativo das células do filme. Isso foi evidenciado pela presença significativa de células na corrente de saída do biorreator. O patamar presente à altas taxas de diluição, deve-se ao filme microbiano residual.

Na Figura 4.7, pode-se observar o perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

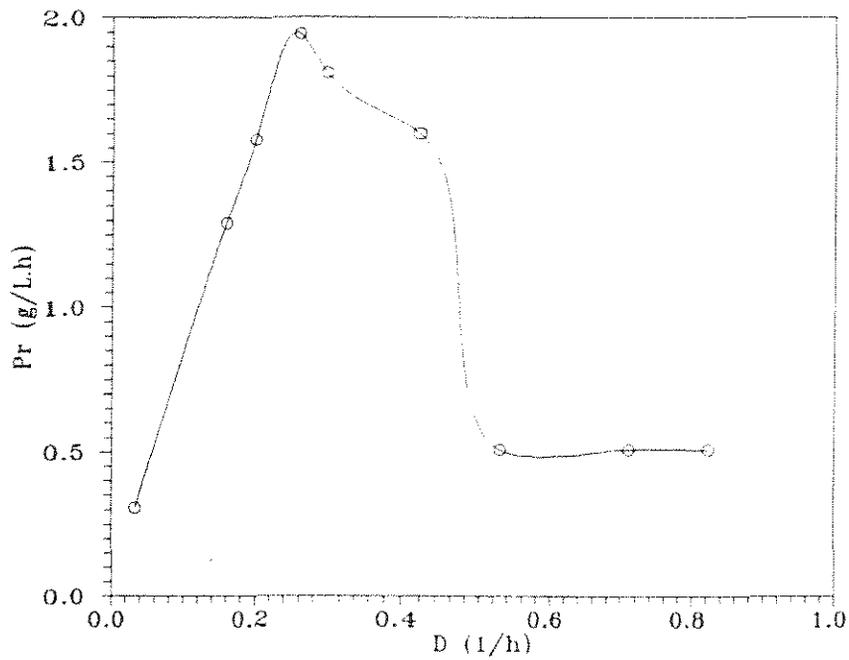


Figura 4.6 - Perfil de produtividade de ácido acético em função da taxa de diluição.

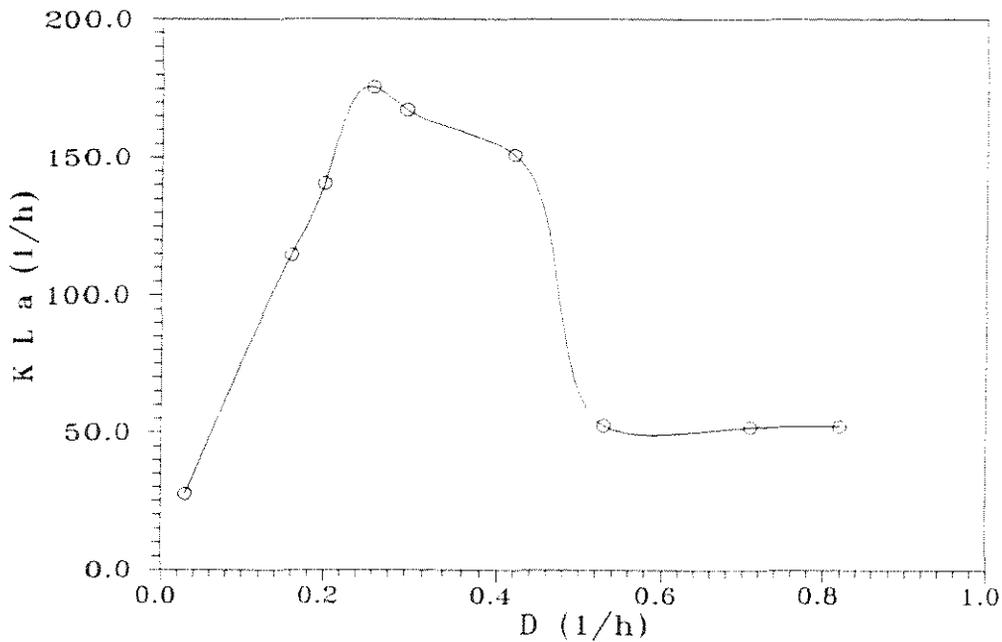


Figura 4.7 - Perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em função de taxa de diluição.

Esse perfil é semelhante ao da produtividade de ácido acético. Os resultados sugerem uma influência marcante da concentração celular no coeficiente volumétrico de transferência de massa. O $K_L a$ aumenta com a concentração de células livres. Brierley e Steel (1959) e van Suijdam, Hols e Kossen (1982) observaram que as células livres afetam o $K_L a$. As células livres também afetam a solubilidade do oxigênio no meio, tal como descrito por Baburin, Shvinka e Viesturs (1981) e Ho e Ju (1988). Esse resultado é oposto ao de Sun e Furusaki que consideraram que o $K_L a$ aumenta com a diminuição da concentração de células livres.

4.4.3 Fermentação contínua com células imobilizadas

4.4.3.1 Perfis de produtividade e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

Na Figura 4.8 pode-se observar os perfis de produtividade de ácido acético em função da taxa de diluição para o sistema com células livres e para o sistema com células imobilizadas.

Os perfis dos sistemas com células imobilizadas são semelhantes aos obtidos com células livres.

Para os sistemas com células imobilizadas, ambas as células imobilizadas e suspensas no meio contribuem para a produção global de ácido acético em toda a faixa de taxas de diluição. As células suspensas presentes no meio são resultantes do excesso de células na matriz de gel que se desprendem para a solução. À baixas taxas de diluição, menores que 0,3/h, as células suspensas crescem no meio de fermentação. A existência de um máximo ($D=0,3/h$) é devido a presença das células suspensas no sistema coexistindo com as células imobilizadas. À taxas de diluição maiores que 0,3/h, verifica-se a lavagem dessas células suspensas e redução da produtividade. No entanto, o desprendimento de células do gel continua a ocorrer. Esse desprendimento foi comprovado experimentalmente através de medidas da concentração de células na corrente de saída do biorreator.

O movimento das partículas no biorreator facilita a remoção de parte do filme microbiano formado. Essa remoção é tanto mais rápida quanto maior a densidade das partículas. À altas taxas de diluição ($D>0,5/h$) a produtividade obtida é devido à contribuição das células imobilizadas, das células suspensas e uma pequena parcela devido às células presentes no filme microbiano remanescente. Nessa região, a contribuição das células imobilizadas é máxima.

Comparando-se os perfis dos sistemas com células livres e imobilizadas em partículas isentas de α -alumina à altas taxas de diluição, observa-se que a produtividade para o sistema com células imobilizadas é menor que para o sistema com células livres. Esse efeito é provavelmente devido as limitações difusionais do transporte de oxigênio para o interior da partícula e à uma maior concentração do filme microbiano formado.

O aumento da densidade das partículas favorece a produtividade de ácido acético à altas taxas de diluição. Partículas contendo 5 % de α -alumina no núcleo apresentam produtividade superior comparada àquelas sem α -alumina. Embora mais densas, as partículas de biocatalisador contendo α -alumina ainda são leves e não quebram as bolhas de ar como os sólidos rígidos densos, conforme observações feitas por Sun, Nozawa e Furusaki (1988). O aumento da produtividade deve-se portanto, a outros fatores que contribuem para uma maior concentração de células no biorreator.

Quando as partículas de biocatalisador estão saturadas de células, o excesso devido ao crescimento celular é removido pelo atrito entre as partículas e/ou entre as partículas e a parede do biorreator.

Os resultados sugerem que para as partículas de biocatalisador mais densas, a interação interpartícula é maior. Conseqüentemente, ocorre uma maior remoção das células crescidas na superfície do gel, aumentando a concentração de células suspensas no biorreator.

Na Figura 4.9 pode-se observar o perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em função da taxa de diluição. Para a região de altas taxas de diluição, a operação com partículas mais densas promove maiores taxas de transferência de oxigênio para o meio, o que pode ser verificado pelos valores mais elevados do $K_L a$.

A partir das observações feitas sobre o efeito das células livres descritas no item 4.4.2, considera-se que na fermentação com

células imobilizadas, as células suspensas influenciam o $K_L a$ à altas taxas de diluição.

Para partículas mais densas, um maior atrito interpartícula produz um maior desprendimento de células da partícula, resultando em uma maior concentração de células suspensas. Essas células contribuem para um maior valor do $K_L a$.

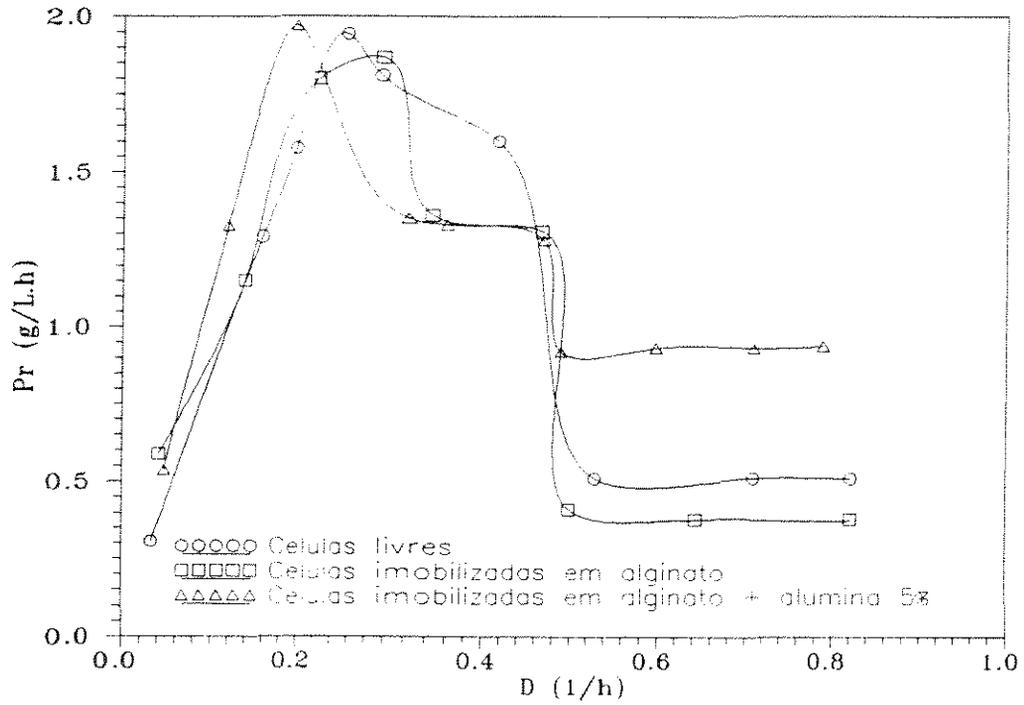


Figura 4.8 - Perfis de produtividade de ácido acético em função da taxa de diluição. Fração sólido-líquido: 0,066.

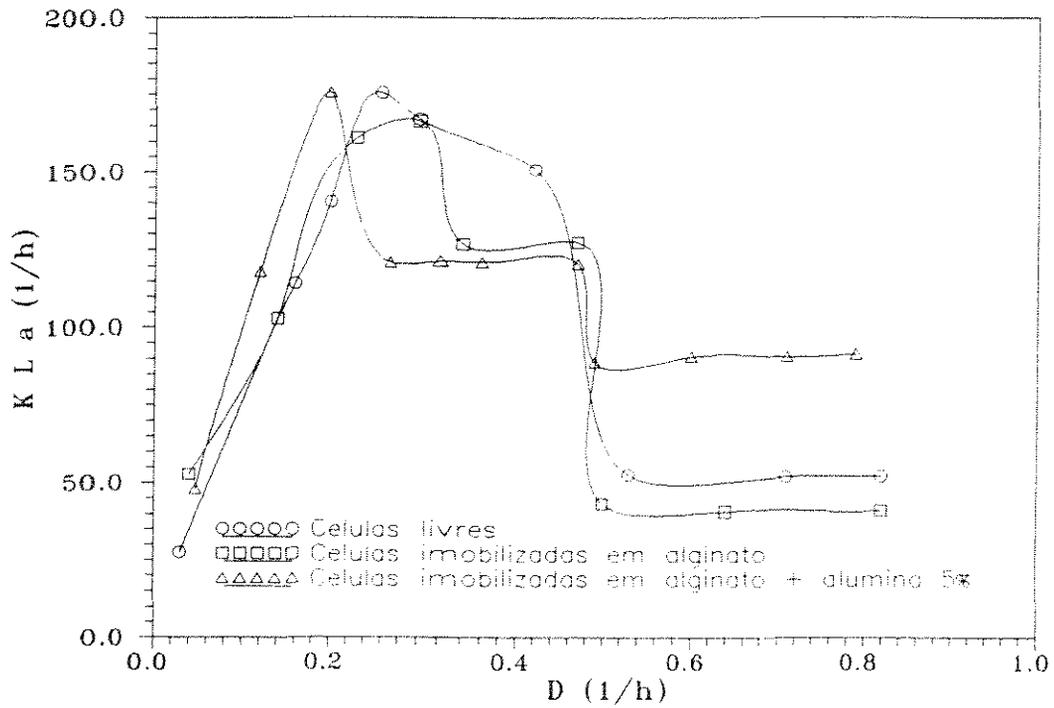


Figura 4.9 - Perfis do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em função da taxa de diluição. As condições experimentais foram as mesmas da Figura 4.8.

4.4.3.2 Influência da velocidade terminal de queda das partículas na produtividade

A Figura 4.10 mostra a produtividade de ácido acético em função da velocidade terminal de queda das partículas de biocatalisador à níveis baixo, médio e alto de taxa de diluição. As partículas contendo 1, 5, 20 e 40% (p/v) de α -alumina no centro tiveram velocidade terminal de 3,2; 3,8; 6,7 e 9,5 cm/s, respectivamente. A influência da densidade das partículas, representada pela velocidade terminal na produtividade de ácido acético pode ser melhor observada na taxa de diluição média ($D=0,28/h$), onde a contribuição das células livres é efetiva. O aumento acentuado da produtividade à maiores velocidades terminais de queda deve-se provavelmente ao aumento do coeficiente transferência de oxigênio no sistema.

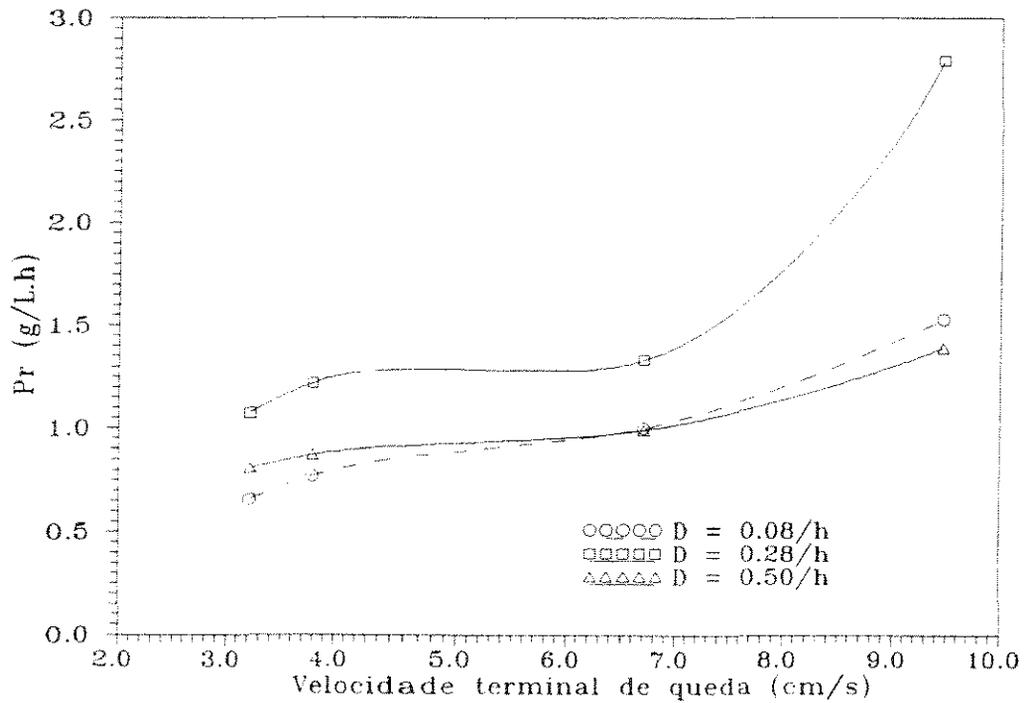


Figura 4.10 - Produtividades de ácido acético em função da velocidade terminal das partículas à taxas de diluição representativas das fases da fermentação. As condições experimentais foram as mesmas da Figura 4.8.

4.4.3.3 Influência da fração sólido-líquido

Os perfis de produtividade e do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em função da taxa de diluição e da fração sólido-líquido do biorreator são apresentados nas Figuras 4.11 e 4.12.

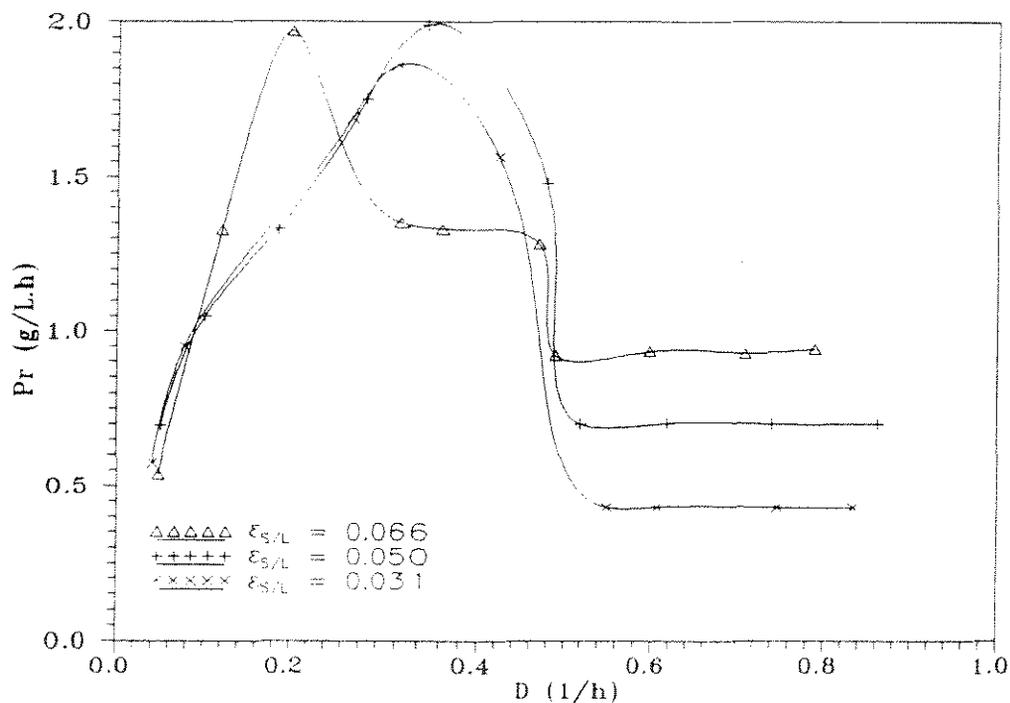


Figura 4.11 - Perfil de produtividade de ácido acético em função da taxa de diluição. Velocidade terminal: 3,8 cm/s.

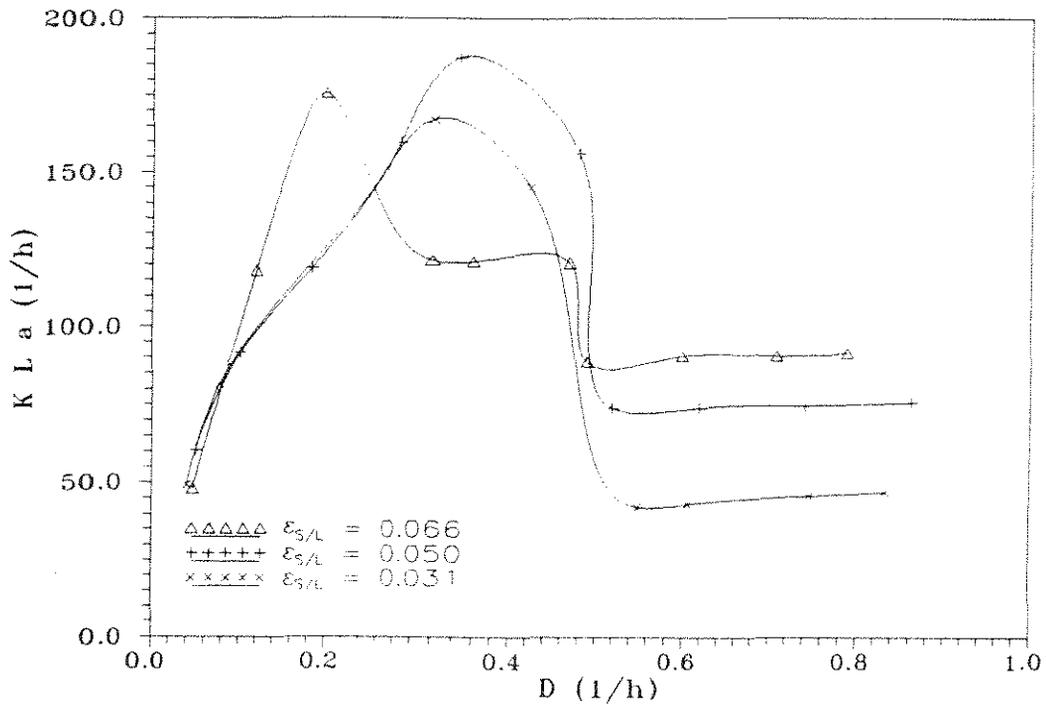


Figura 4.12 - Perfis do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em função da taxa de diluição. As condições experimentais foram as mesmas da Figura 4.11.

A produtividade de ácido acético e o $K_L a$ aumentam com a fração sólido-líquido no biorreator à altas taxas de diluição. Para as maiores frações sólido-líquido, pode ocorrer uma maior interação interpartícula, resultando em uma maior liberação de células do gel.

Esses resultados são opostos aos obtidos por Sun e Furusaki (1988) com partículas de alginato, nos quais o $K_L a$ diminuiu com a fração sólido-líquido. Esses pesquisadores determinaram o $K_L a$ com partículas isentas de células e isto explica essa discrepância.

Por outro lado, no biorreator de geometria cônico-cilíndrica (Figura 3.2) utilizado neste trabalho, não se observou a coalescência de bolhas como no reator de coluna empregado por Sun e Furusaki (1988).

4.5 Proposição de uma correlação empírica para o coeficiente de transferência de oxigênio gás-líquido

Para a predição da variação do coeficiente volumétrico de transferência de massa com a densidade das partículas e com a fração sólido-líquido no biorreator, propõe-se uma correlação empírica para o $K_L a$ em função do número de Reynolds das partículas, R_{ep} , e fração sólido-líquido, $\epsilon_{s/L}$ na região de altas taxas de diluição onde os efeitos inibitórios do ácido acético não estão presentes e onde predomina a contribuição das células imobilizadas. Os dados experimentais foram ajustados pelo método de Marquart usando o "software" "Statistical Analysis Systems" (SAS). Os parâmetros da correlação proposta estão apresentados abaixo. O erro médio encontrado entre os valores preditos e os experimentais foi de 3,9%.

$$K_L a = 96,83 R_{ep}^{0,48} \epsilon_{s/L}^{0,87} \text{ (1/h)}$$

(96 < R_{ep} < 285 e 0,031 < $\epsilon_{s/L}$ < 0,066)

Na Figura 4.13 é apresentado o gráfico dos resíduos correspondentes aos valores preditos pela correlação.

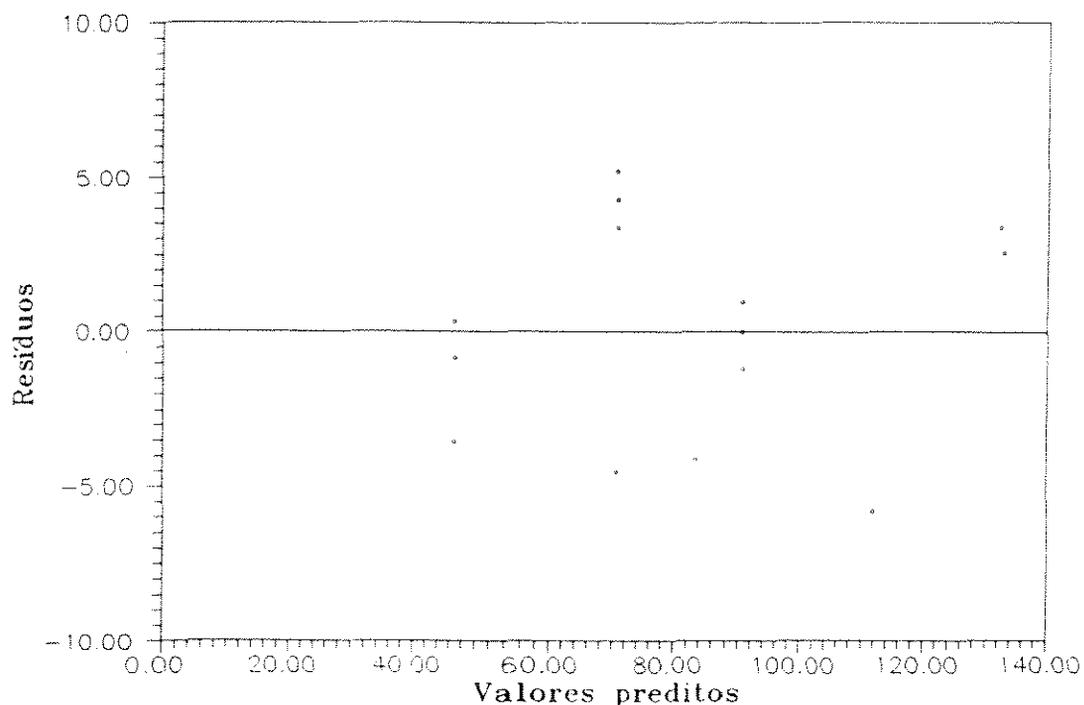


Figura 4.13 - Valores dos resíduos correspondentes aos valores preditos pela correlação.

Os valores de $K_L a$ experimentais obtidos nas fermentações contínuas com células imobilizadas em partículas de densidade variada e a curva correspondente aos valores preditos pela correlação empírica proposta são apresentados na Figura 4.14.

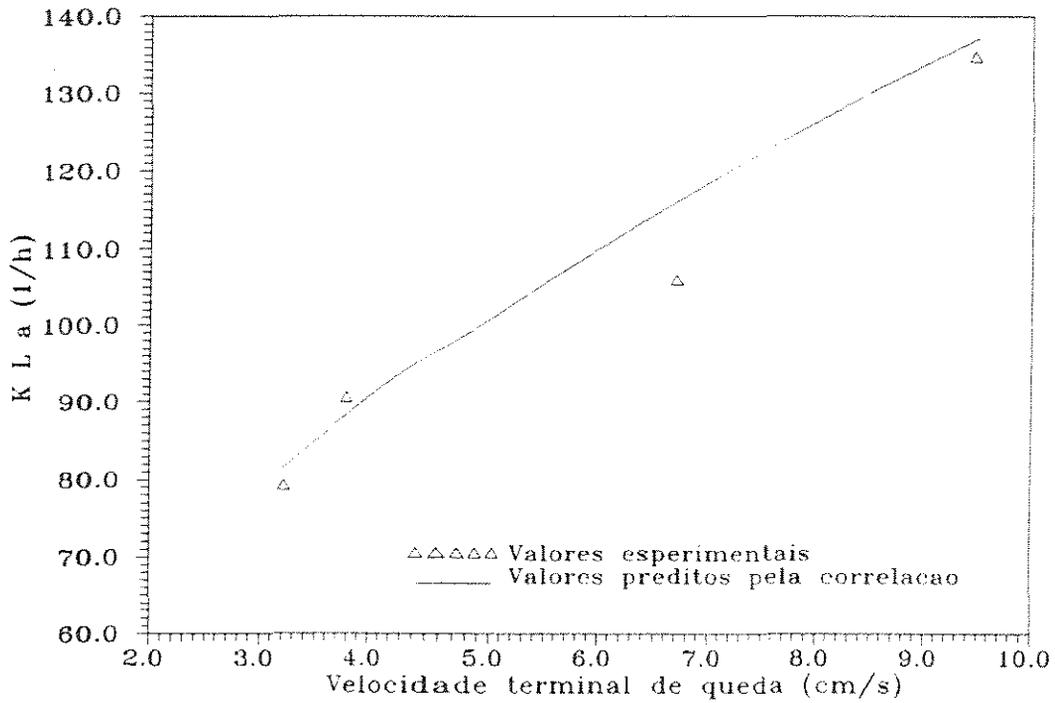


Figura 4.14 - Comparação dos valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio experimentais com os valores preditos pela correlação.

4.6 Predição da produtividade de ácido acético

Um modelo para a predição da produtividade de ácido acético foi obtido a partir das equações de balanço de massa no sistema .

As partículas de gel foram consideradas como sendo uniformes e perfeitamente esféricas. Considerou-se, também, que a transferência de oxigênio gás-líquido foi a etapa limitante do processo, e desprezaram-se os efeitos de transferência de massa líquido-sólido no sistema. Admitiu-se que as taxas de crescimento e de consumo de oxigênio das células imobilizadas foram as mesmas que as das células livres, e que não houve inibição pelo ácido acético formado.

Para partículas esféricas, o balanço de massa do substrato limitante no interior da partícula e em estado estacionário fornece a seguinte equação:(Fink, Na e Schultz,1973)

$$D_e \left(\frac{d^2 C}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC}{dr} \right) = Q_{O_2i} C_{cg} \quad (4.6.1)$$

onde:

$$Q_{O_2i} = \frac{Q_{O_2m} C}{K_m + C} \quad (4.6.2)$$

Uma forma adimensional da equação 4.6.1 é obtida pelas seguintes mudanças de variáveis:

$$r/R = x \quad (4.6.3)$$

$$C/C^* = y \quad (4.6.4)$$

$$\frac{d^2y}{dx^2} + \frac{2}{x} \frac{dy}{dx} = \frac{2\beta_0 y}{1 + \beta_L y} \quad (4.6.5)$$

onde:

$$\beta_0 = \frac{R^2 C_{cg} Q_{0_2,m}}{2 D_e K_m} \quad (4.6.6)$$

$$\beta_1 = \frac{C^*}{K_m} \quad (4.6.7)$$

onde:

C - concentração de oxigênio no gel (Kmol/m³);

D_e - coeficiente de difusão efetivo do oxigênio intrapartícula (m²/h);

Q_{0₂i} - taxa específica de respiração das células imobilizadas dada pela equação 4.6.2 (kmol/Kg célula seca . s);

Q_{0₂m} - taxa específica de respiração máxima das células livres (Kmol/Kg célula seca . s);

K_m - constante de Michaelis - Menten (Kmol/m³);

C_c - concentração celular (Kg célula seca/m³);

C* - concentração de saturação do oxigênio dissolvido no meio líquido (Kmol/m³);

r - coordenada espacial (m);

x - raio adimensional (-);

R - raio da partícula de gel (m);

y - concentração de oxigênio adimensional (-);

R_e - raio da partícula onde a concentração de oxigênio é nula;
subscritos

e: valores no R_e;

g: gel;

i: fermentação com células imobilizadas;

A solução do problema e obtenção do perfil de concentração no interior da partícula foi obtida com as seguintes condições de contorno:

$$x = x_e; y_{x_e} = 0 \text{ e } \left(\frac{dy}{dx} \right) = 0 \quad (4.6.8)$$

A Equação 4.6.5 foi resolvido pelo método de Runge-Kutta-Gill. Inicialmente arbitrava-se um valor de x_e e a resolução foi repetida até que a concentração de oxigênio dissolvido, na superfície do gel, obtida pelo modelo fosse igual ao valor experimental ($C_s = C_{OD}$), ou seja, para $x_{R=1}$, $y_{R=1} = C_{OD}/C^*$. As constantes Q_{O_2m} ($6,431 \cdot 10^{-5}$ Kmol/kg célula seca . s) e K_m ($5,253 \cdot 10^{-6}$ Kmol/m³) foram obtidas do trabalho de Paz (1992), D_e ($2,11 \cdot 10^{-9}$ m²/s) do trabalho de Sun e Furusaki (1990) e C_{cg} (57,15 Kg célula seca/m³ gel) foi determinado experimentalmente neste trabalho e considerado constante.

O balanço global de oxigênio no biorreator em estado estacionário é dado por:

$$K_L a (C^* - C_{ODl}) - Q_{O_2l} C_{cl} \epsilon_L = 3 (\epsilon_S D_e / R) \left(\frac{dC}{dr} \right)_{r=R} \quad (4.6.9)$$

onde:

$K_L a$ - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (1/s);

C_{OD} - concentração de oxigênio dissolvido (Kmol/m³);

Q_{O_2l} - taxa específica de respiração das células livres dada pela equação 4.6.10 (Kmol/Kg célula seca . s);

l: líquido;

S: Sólido;

Q_{o_2l} é calculado pela seguinte expressão:

$$Q_{o_2l} = \frac{Q_{o_2m} C_{ODl}}{K_m + C_{ODl}} \quad (4.6.10)$$

Com a equação 4.6.9, calcularam-se os valores de C_{cl} , conhecendo-se os valores de ϵ_L , ϵ_S , R , C_{ODl} e o valor de K_L a dado pela correlação empírica determinada no item 4.5 deste trabalho.

A taxa de produção de ácido acético pelas células livres pode ser estimada por:

$$P_{il} = 60 \epsilon_L C_{cl} Q_{o_2l} \quad (4.6.11)$$

e a taxa de produção de ácido acético pelas células imobilizadas por:

$$P_{ig} = \frac{60 \epsilon_S \int_{R_c}^R C_{cg} Q_{o_2i} 4\pi r^2 dr}{4\pi R^3/3} \quad (4.6.12)$$

A taxa de produção total pode ser predita por:

$$P_{it} = P_{il} + P_{ig} \quad (4.6.13)$$

Na Figura 4.15 pode-se observar o perfil de concentração de oxigênio numa partícula de gel. Neste caso, para C_{ODl} igual a $1,692 \cdot 10^{-5}$ Kmol/m^3 (8 % da saturação), o raio crítico adimensional obtido foi de 0,98.

Portanto, para a partícula possuindo 3,0 mm de diâmetro médio, a espessura da camada onde as células crescem é de 0,3 mm. Esse valor é bem próximo ao valor obtido experimentalmente pela fotomicrografia da Figura 3.3.

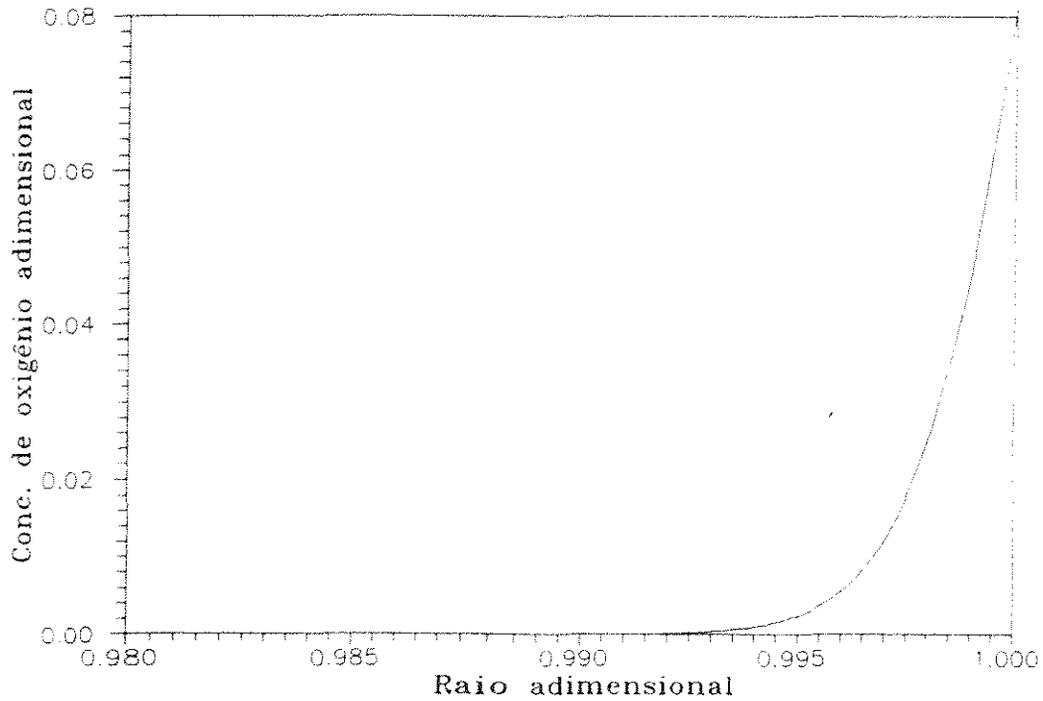


Figura 4.15 - Perfil de concentração de oxigênio adimensional no interior de uma partícula de biocatalisador. Raio da partícula: 1,5 mm. Velocidade terminal de queda: 3,8 cm/s.

Na Figura 4.16 são apresentadas as curvas das produtividades preditas P_{it} , P_{ig} e P_{it} . Comparando os valores preditos com os valores experimentais, observa-se boa concordância dos valores experimentais e dos valores preditos. Entretanto para o valor correspondente à velocidade terminal de 6,7 cm/s encontra-se um maior desvio. Isso é devido ao maior desvio também obtido para essa velocidade terminal no ajuste da correlação para o $K_L a$ (Figura 4.14)

Na Tabela 4.6 são apresentados os valores de concentração de células suspensas experimentais e os obtidos pelo modelo proposto. Os valores experimentais foram obtidos através da curva de calibração obtida conforme o procedimento 3.9.8.

Tabela 4.6 - Comparação dos valores preditos e experimentais de concentração de células livres (massa seca)

v_t (cm/s)	C_{cl} teórico (g/L)	C_{cl} experimental (g/L)
3,2	0,059	0,051
3,8	0,071	0,059
6,7	0,076	0,067
9,5	0,131	0,083

Verifica-se para esses casos mostrados que a contribuição das células suspensas na produtividade global de ácido acético foi maior à medida que se empregaram partículas mais densas. Pode-se concluir que ocorre realmente maior interação interpartícula para as partículas mais densas e, por conseguinte, maior liberação de células do gel, obtendo-se maior produtividade.

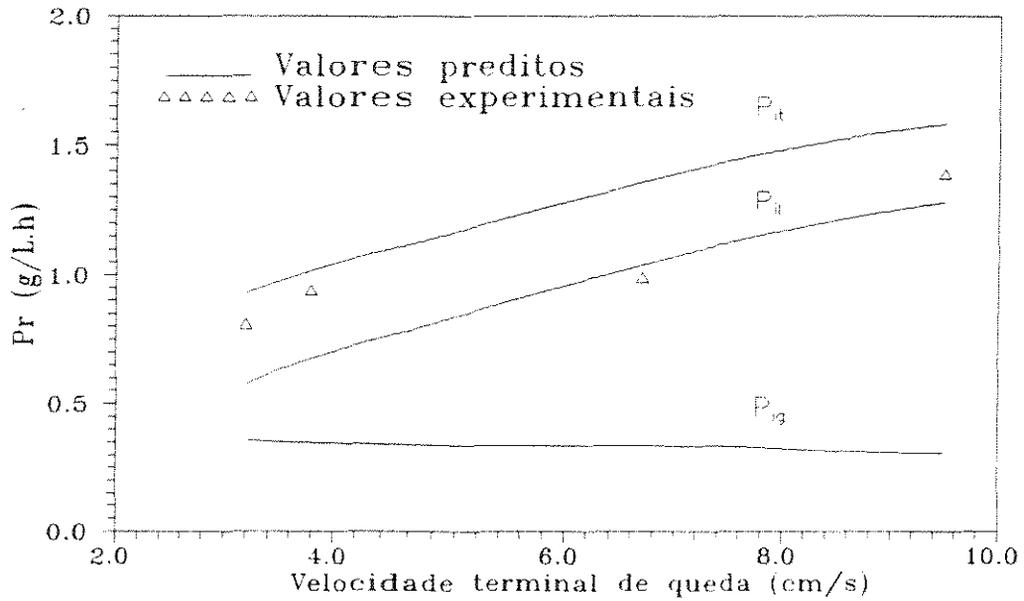


Figura 4.16 - Valores preditos e experimentais de produtividade em função da velocidade terminal de queda das partículas de biocatalisador. Fração sólido-líquido: 0,066.

Na Figura 4.17 são apresentadas as curvas das produtividades preditas (P_{il} , P_{ig} e P_{it}) em função da fração sólido-líquido no biorreator. Os valores experimentais estão próximos da curva de P_{it} . Observa-se também que com o aumento da fração sólido-líquido, a contribuição das células suspensas torna-se maior.

A interação interpartícula é maior a medida que se emprega maior quantidade de sólidos no biorreator e, por conseguinte, um maior atrito entre as partículas ocasiona uma maior liberação de células do gel e maior produtividade.

O modelo proposto representa melhor a influência da fração sólido-líquido do que da velocidade terminal de queda das partículas de biocatalisador sobre a produtividade predita.

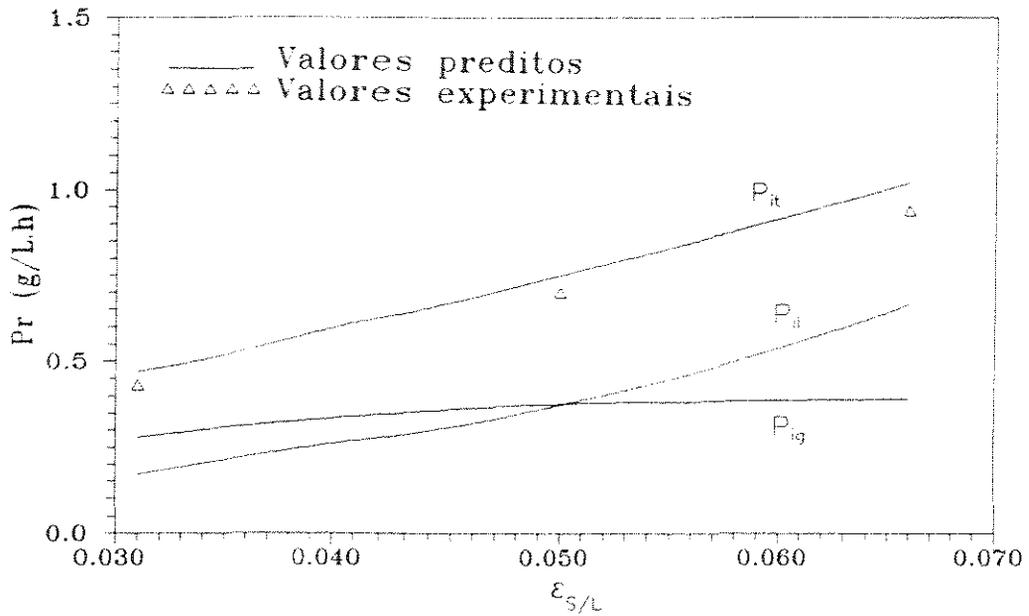


Figura 4.17 - Valores preditos pelo modelo e valores experimentais de produtividade em função da fração sólido-líquido. Velocidade terminal das partículas: 3,8 cm/s.

Capítulo 5

Conclusões e Sugestões

5.1 Conclusões

- A metodologia de preparação das partículas de biocatalisador de densidades variadas mostrou-se simples e reprodutível.

- O uso do ejetor assegurou a mesma distribuição de células no biocatalisador, uma vez que a camada de recobrimento e pré-inóculo preparada como solução externa continha as mesmas concentrações.

- A α -alumina foi o material inerte que apresentou maior facilidade de incorporação à matriz de gel.

- A camada de recobrimento foi influenciada pela razão entre as vazões interna/externa. A razão de 2,38 forneceu um recobrimento uniforme e perceptível no microscópio ótico.

- As fotomicrografias mostraram colônias de células cresceram uniformemente distribuídas na fina camada próxima a superfície das partículas.

- Empregando o ejetor foi possível analisar somente o efeito da densidade das partículas, a qual foi variada empregando-se soluções de diferentes concentrações em α -alumina.

- A massa celular seca nas partículas de biocatalisador atingiu um valor de saturação de 57,2 Kg/cm³ gel. Esse valor foi o dobro da massa celular inicialmente imobilizada.

- A taxa específica inicial de respiração celular das partículas de biocatalisador foi determinada como sendo mais uma propriedade que caracteriza a concentração inicial de células imobilizadas. Essa determinação pode ser empregada como sendo uma maneira rápida de verificação do biocatalisador recém-preparado a ser empregado na fermentação.

- A determinação da velocidade terminal de queda das partículas de gel propiciou a avaliação da influência da densidade das mesmas no processo fermentativo.

- Os perfis de produtividade e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio gás-líquido mostraram as regiões características da fermentação acética com células imobilizadas:

- . contribuição das células livres e imobilizadas à baixas taxas de diluição;

- . lavagem das células livres do biorreator à valores intermediários de taxa de diluição;;

- . contribuição das células imobilizadas, das células suspensas e das do filme microbiano remanescente à altas taxas de diluição;

- A produtividade de ácido acético e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio aumentaram com a velocidade terminal de queda das partículas.

- À altas taxas de diluição, as partículas mais densas apresentaram uma maior interação interpartícula. O maior atrito provocou um maior desprendimento de células das partículas, resultando em uma maior concentração de células suspensas e, por conseguinte, maiores produtividades de ácido acético maiores valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio gás-líquido.

- Os dados experimentais permitiram correlacionar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio gás-líquido com a fração sólido-líquido no biorreator, e o número de Reynolds da partícula à altas taxas de diluição.

- O modelo matemático simplificado proposto para descrever o processo difusão-reação e prever a produtividade de ácido acético representou satisfatoriamente as condições experimentais e elucidou a importância da contribuição das células suspensas na produtividade à altas taxas de diluição. O modelo representou melhor a influência da fração sólido-líquido do que da velocidade terminal de queda sobre a produtividade.

5.2 Sugestões

- O aperfeiçoamento da metodologia de preparação das partículas, empregando uma bomba seringa ao invés da bomba peristáltica de duplo cabeçote. Isso possibilitaria a inclusão de outros materiais e a obtenção de uma maior faixa de densidade das partículas.

- A realização de experimentos variando-se o diâmetro das partículas de biocatalisador. Acrescentar à correlação empírica do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio a influência do diâmetro. Assim, utilizando o modelo matemático proposto, estudar a influência do diâmetro das partículas de biocatalisador na produtividade de ácido acético.

- Aprimorar o modelo matemático para representar melhor os dados experimentais.

- Estudar a adaptação da linhagem de *Acetobacter* sp. CCT 2026 à maiores concentrações de ácido acético através de fermentações em batelada alimentada; assim, os efeitos inibitórios do ácido acético poderiam ser diminuídos.

- Realizar a separação/remoção do ácido acético à medida que este vai sendo produzido. Os efeitos inibitórios também seriam reduzidos por esta maneira.

- Empregar as partículas de gel de densidade aumentada em biorreatores, operando em contínuo à maiores taxas de aeração.

Referências Bibliográficas

Asai, T. Classification of acetic acid bacteria and oxidative bacteria isolated from fruits. A new method of the classification of oxidative bacteria J. Agr. Chem. Soc. Jap., v.10, p.621-629, p.932-941, 1934 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Asai, T. A systematic study of alcohol and carbohydrate oxidative bacteria isolated from fruits and a new classification of oxidative bacteria J. Agr. Chem. Soc. Jap., v.11, p.50-60, p.331-345, p.377-390, p.499-513, p.674-708, 1935 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Baburin, L.A.; Shvinka, J.E.; Viesturs, U.E. Equilibrium oxygen concentration in fermentation fluids Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.13, p.15-18, 1981 **apud** Sun, Y.; Furusaki, S. Continuous production of acetic acid using immobilized *Acetobacter aceti* in a three-phase fluidized bed bioreactor J. Ferment. and Bioeng., v.69, n.2, p.102-110, 1990.

Bar, R.; Gainer, J.L.; Kirwan, D.J. Immobilization of *Acetobacter aceti* on cellulose ion exchangers: adsorption isotherms Biotechnol. Bioeng., v.28, n.8, p.1166-1171, 1986.

Bly, M.J.; Worden, R.M. Gas holdup in a three-phase fluidized-bed bioreactor Appl. Biochem. Biotechnol., v.24/25, p.553-564, 1990.

Boecheave, H. *Elementa chemicae. Lugduni Batavorum*, v.2, p.179-207, 1732 **apud** Mitchell, C.A. - *Vinegar: its manufacture and examination*. 2nd. Ed. Griffin, London, 1926.

Brierley, M.R.; Steel, R. Agitation-aeration in submerged fermentation. II. Effect of solid phase on oxygen adsorption in a fermentor Appl. Microbiol., v.7, p.57-61, 1959 **apud** Sun, Y.; Furusaki, S. Continuous production of acetic acid using immobilized *Acetobacter aceti* in a three-phase fluidized bed bioreactor J. Ferment. and Bioeng., v.69, n.2, p.102-110, 1990.

Calderbank, P.H.; Moo-Young, M.B. The continuous phase heat and mass-transfer properties of dispersions Chem. Eng. Sci., v.16, p.39-54, 1961.

Carr, J.G.; Shimwell, J.L. The acetic acid bacteria, 1941-1961 a critical review. Antonie van Leeuwenhoek, v.27, p.386-400, 1961.

Divies, C. Cinétique de la fermentation acétique réalisée par *Acetobacter xylinum* Rev. Ferment. Industr. Alim., v.25, p.105-110, 1970 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Divies, C. Action de l'éthanol sur l'oxydation de l'acétate par *Acetobacter rancens* Biochimie, v.54, p.1073-1083, 1972 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Ebner, H. - Latest development in the technical verification of the submerged vinegar fermentation Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektioniskr. Hyg. Abt. 1. Suppl. 2, p.65-72, 1967 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Ebner, H.; Follmann, H. - Acetic acid in "biotechnology". Ed. H. Dellweg, Verlag Chemie, Weinheim, v.3, p.387-407, 1983 **apud** Ghommidh, C.; Cutayar, J.M.; Navarro, J.M. Continuous production of vinegar Biotechnol. Lett., v.8, n.1, p.13-18, 1986.

Eiki, H.; Osono, T. A simple method for estimating the average concentration of dissolved oxygen in a fermentor by exis gas analysis J. Ferment. and Bioeng., v.69, n.5, p.313-316, 1990.

Entani, E.; Ohmuri, S.; Masai, H. et al. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity J. Gen. Appl. Microbiol., v.31, p.475-490, 1985.

Fan, L.T.; Newcomer, M.P. Adv. Biotechnol. (Proc. Int. Ferment. Symp., 6th, 1980), 1,643 **apud** Sun, Y.; Nozawa, T.; Furuzaki, S. Gas holdup and volumetric oxygen transfer coefficient in a three-phase fluidized bed bioreactor J. Chem. Eng. Japan, v.21, n.1, p.15-20, 1990.

Fink, D.J; Na,T.; Schultz,J.S. Effectiveness factor calculations for immobilized enzyme catalysts Biotechnol. Bioeng., v.15, p.879-888, 1973.

Fratureur, J. Essai sur la systématique des *Acetobacter*. La Cellule, v.53, p.287-392, 1950 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques.Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Frings, H. Manufacture of Vinegar, U. S. Patent 1880, 381, 1932 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques.Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Fumi, M.D.; Silva, A.; Battistotti, G. et al. Living immobilized *Acetobacter* in Ca-alginate in vinegar production: preliminary study on optimum conditions for immobilization Biotechnol. Lett., v.14, n.7, p.605-608, 1992.

Ghommidh, C.; Navarro, J.M.; Messing, R.A. A study of acetic production by *Acetobacter* cells : production inhibition effects Biotechnol. Bioeng., v.24, p.1991-1999, 1982.

Ghommidh, C.; Cutayar, J.M.; Navarro, J.M. Continuous production of vinegar Biotechnol. Lett., v.8, n.1, p.13-18, 1986.

Gillis, M.; De Ley, J. Intra and intergenetic similarities of the ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter* Int. J. Syst. Bacteriol., v.30, p.7-27, 1980.

Hansen, E.C. Investigations of acetic acid bacteria. Medd. Carlsberg Lab. 4, p.265-327, 1894.

Ho, C.S.; Ju, L. Effects of microorganisms on effective oxygen diffusion coefficients and solubilities in fermentation media Biotechnol. Bioeng., v.32, p.313-325, 1988.

Hoyer, D.P. Dissertation. University of Leiden, Walltman. Delft. Holland, 1898 **apud** Leisinger, Th. Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechse der Essigsäurebakterien. Thesis Univ. Zurich, 1965.

Hromatka, O.; Ebner, H. Untersuchungen über die Essiggärung. I - Fesselgärung und durchluftungsverfahren Enzymologia, v.13, p.369-387, 1949 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Hromatka, O.; Ebner, H. Untersuchungen über die Essiggärung. III - Über den Einfluss der Belüftung auf die submerse Gärung Enzymologia, v.15, p.57-69, 1951 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Hromatka, O.; Kastner, G.; Ebner, H. Untersuchungen über die Essiggärung. V - Über den Einfluss von Temperatur und Gesamtkonzentration auf die submerse Gärung Enzymologia, v.15, p.337-350, 1951 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Hromatka, O.; Ebner, H. Vinegar by submerged oxidative fermentation Ind. Eng. Chem., v.51, p.1279-1280, 1959 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Jamuna, R.; Sai; P.S.T.; Vora, S. et al. Optimization of critical parameters for immobilization of yeast cells to alginate gel matrix J. Ferment. and Bioeng., v.73, n.4, p.319-322, 1992.

Kennedy, J.F.; Humphreys, J.D.; Barker, S.A. et al. Application of living immobilized cells to the acceleration of the continuous conversions of ethanol to acetic acid - hydrous titanium (IV) oxide - immobilized *Acetobacter* species Enzyme Microb. Technol., v.2, p.209-216, 1980 **apud** Ghommidh, C.; Cutayar, J.M.; Navarro, J.M. Continuous production of vinegar Biotechnol. Lett., v.8, n.1, p.13-18, 1986.

King, T.E.; Cheldeling, V.H. Oxidation in *Acetobacter suboxydans* Biochim. Biophys. Acta., v.14, p.108-116, 1954 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Krieg, R.; Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology, v.1, Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.

Leifson, E. The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter* Antonie van Leeuwenhoek, v.20, p.112, 1954 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Leisinger, Th. Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechse der Essigsäurebakterien. Thesis Univ. Zurich, 1965 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Martinez, A.; Galindo, E.; Salvador, M. Sparger position over K_a in bench and pilot stirred-tank fermentors J. Ferment. and Bioeng., v.68, n.1, p.71-73, 1989.

Matsushita, K.; Honobe, M.; Shinagawa, E. et al. Isolation and characterization of outer and cytoplasmic membranes from spheroplasts of *Acetobacter aceti* Agric. Biol. Chem., v.49, p.3519-3526, 1985.

Mitchell, C.A. Vinegar: its manufacture and examination. 2nd. Ed. Griffin, London, 1926.

Moraes, A.M. Estudo da oxidação do etanol à ácido acético por células do gênero *Acetobacter* livres e imobilizadas em géis hidrofílicos. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 1991, 156p. Dissertação (Mestrado).

Namba, A.; Kimura, K.; Nagai, S. Vinegar production by *Acetobacter rancens* fixed on a hollow fiber module J. Ferment. Technol., v.63, p.175-179, 1985.

Ogbonna, J.C.; Amano, Y.; Nakamura, K. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate J. Ferment. and Bioeng., v.67, n.2, p.92-96, 1989.

Ohmori, S.; Masai, H.; Arima, K. et al. Isolation and identification of acetic bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature Agric. Biol. Chem., v.44, p.2901-2906, 1980.

Ohmori, S.; Uozumi, T.; Beppu, T. Low of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability in an *Acetobacter* strain Agric. Biol. Chem., v.46, p.391-389, 1982.

Osuga, J.; Mori, A.; Kato, J. Acetic acid production by immobilized *Acetobacter aceti* cells entrapped in a κ -carrageenan gel J. Ferment. Technol., v.62, n.2, p.139-149, 1984.

Pasteur, L. Etudes sur le vinaigre. Ouvres III, Masson. Paris, 1922; 1868 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Paz, E.D.D. Estudo da transferência de massa num reator trifásico de leito fluidizado circulante na oxidação do etanol à ácido acético com células imobilizadas de *Acetobacter* sp. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 1992, 100p. Dissertação (Mestrado).

Paz, E.D.D.; Santana, M.H.A.; Eguchi, S.Y. Enhancement of the oxygen transfer in a circulating three-phase fluidized bed bioreactor Appl. Biochem. Biotechnol., v.39/40, p.455-466, 1993.

Rao, M.R.R. Pyruvate and acetate metabolism in Acetobacter suboxydans and Acetobacter aceti. Thesis Univ. Illinois, 1955 **apud** Divies, C. Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques. Paris: Université de Paris - VII, 1973, 173p. Tese (Doutorado).

Sun, Y.; Nozawa, T.; Furusaki, S. Gas holdup and volumetric oxygen transfer coefficient in a three-phase fluidized bed bioreactor J. Chem. Eng. Japan, v.21, n.1, p.15-20, 1988.

Sun, Y.; Furusaki, S. Mean bubble diameter and oxygen transfer coefficient in a three-phase fluidized bed bioreactor J. Chem. Eng. Japan, v.21, n.1, p.20-24, 1988.

Sun, Y. ; Furusaki, S. Effect of intraparticle diffusion on the determination of the gas-liquid volumetric oxygen transfer coefficient in a three-phase fluidized bed containing porous particles. J. Chem. Eng. Japan, v.22, n.5, p.556-559, 1989.

Sun, Y.; Furusaki, S. Continuous production of acetic acid using immobilized *Acetobacter aceti* in a three-phase fluidized bed bioreactor J. Ferment. and Bioeng., v.69, n.2, p.102-110, 1990.

Tanaka, H.; Irie, S, Ochi, H. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. J. Ferment. and Bioeng., v.68, n.3, p.216-219. 1989.

van Suijdam, J.C.; Hols, H.; Kossen, N.W. Unstructures model for growth of mycelial pellets in submerged cultures Biotechnol. Bioeng., v.24, p.177-191, 1982.

Visser't Hooft, F. Biochemische anderzvekinger over hit geslachht Acetobacter. Diss. Delft. 1925 **apud** Frateur, J. Essai sur la systématique des Acetobacter. La Cellule, v.53, p.287-392, 1950.

Weeb, C.; Black, G.M.; Atkinson, B. Biomass hod-up in immobilized cell reactor Process engineering aspects of immobilized cell systems Warwickkshire, p. 117-133, 1986.

Weeb, C.; Black, G.M.; Atkinson, B. Characteristics and performance of immibilized cell reactors Process engineering aspects of immobilized cell systems Warwickkshire, p. 75-85, 1986.