

**UNICAMP
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ADESÃO DE CÉLULAS DE SACCHAROMYCES SP. EM
MATERIAIS INORGÂNICOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

ADRIANA DE ANDRADE FREGONESI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Profa Dra. INÉS JOEKES

Orientadora

**Campinas
1998**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

6956965



*aos meus pais,
Laerte e Eufrazia
aos meus irmãos,
Erica e Rodrigo
pela compreensão e estímulo
de toda a vida*

*e ao Carlinhos,
"por viver um grande amor"*

Agradeço...

à minha orientadora Inés Joekes, pelo carinho, atenção e incentivo

aos colegas e amigos do grupo: Carla, Maria Alice, Paula, Renata, Flávia, Euler, João, Ana Luísa, Atilio, Soraya, Antônio, Flávio, Rose, Maria Helena, Carol, Maurício, Fernando...obrigadão!

à amiga Nádia pelo carinho e amizade especiais e pelas boas risadas..

ao amigo Dri, por suas idéias valiosas...

aos Colegas do projeto Sama: Renato, Karina e Eduardo

a dedicação e sabedoria da Ercília

à Flávia pelas amostras em Microscopia e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica/IF- USP

aos professores Paulo Moran e José Augusto pelas contribuições durante o projeto SAMA

a três grandes amigos sempre presentes: Claudinha, Ritinha e Cláudio

ao pessoal do Instituto: Cris, Iarinha, Mika, Renato, Akira, Toshio, Luci, Débora, Milene, Natália e aos esquecidos....

às amigas Túria, Dôra, Dani, Lúcia, Sílvia... pela alegre convivência diária

à minha avó Epifânia e tia Laura pelos momentos agradáveis nos finais de semana em Campinas

a Carlos e Cidinha pelo constante carinho e apoio

a todos os técnicos e funcionários do Instituto

ao CNPq e a Sama por financiar o projeto

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Produção de etanol</i>	1
1.2 <i>Fermentação com células imobilizadas</i>	3
1.3 <i>Imobilização de células para a produção de etanol</i>	4
1.4 <i>Crisotila</i>	5
1.5 <i>Montmorillonita.</i>	6
1.6 <i>O microrganismo</i>	7
1.7 <i>Interação do microrganismo/suporte</i>	9
2. OBJETIVOS	11
3. PARTE EXPERIMENTAL	12
3.1 <i>Materiais e reagentes</i>	12
3.2 <i>Instrumentos</i>	12
3.3 <i>Meio de alimentação</i>	13
3.4 <i>Preparo do suporte crisotila</i>	13
3.4.1 <i>Lavagem e ativação da crisotila</i>	13
3.4.2 <i>Lixiviamento da crisotila</i>	14
3.4.3 <i>Lixiviamento da crisotila para análise em Microscopia eletrônica de varredura</i>	14
3.4.4 <i>Quantificação do magnésio em crisotila lixiviada</i>	14
3.5 <i>Análise do açúcar no melão</i>	15
3.6 <i>Curvas de crescimento de células de fermento de pão</i>	15
3.7 <i>Adesão de células de fermento de pão em crisotila</i>	16
3.7.1 <i>Isoterma de adesão</i>	16
3.7.2 <i>Crescimento celular</i>	16
3.7.3 <i>Crescimento das células desorvidas de crisotila</i>	17
3.8 <i>Adesão de células de fermento de pão em crisotila lixiviada</i>	17
3.8.1 <i>Isoterma de adesão</i>	17
3.8.2 <i>Crescimento das células</i>	17
3.9 <i>Dessorção de células de fermento de pão aderidas em crisotila</i>	18

3.9.1 Células aderidas em meio aquoso	18
3.9.2 Células aderidas em Meio de Crescimento	18
3.10 Imobilização de células em montmorilonita K 10	19
3.10.1 Atividade das células de fermento de pão	19
3.10.2 Atividade das células de fermento de pão imobilizadas em montmorilonita modificada	19
3.11 Seleção de linhagens de <u>Saccharomyces</u> sp.	20
3.11.1 Crescimento das linhagens	20
3.11.2 Adesão das células em crisotila	20
3.11.3 Atividade fermentativa das células em processo de batelada	20
3.11.4 Análise de etanol	21
3.12 Fermentação alcoólica em processo contínuo	21
3.12.1 Montagem dos reatores	21
3.12.2 Variáveis calculadas durante a fermentação	23
3.13 Micrografias de células de <u>Saccharomyces</u> sp. aderidas em crisotila	24
4. RESULTADOS	26
4.1 Curvas de crescimento celular para o fermento de pão	26
4.2 Adesão de células de fermento de pão em crisotila	28
4.2.1 Isoterma de adesão	28
4.2.2 Crescimento celular em crisotila	29
4.2.3 Atividade metabólica das células durante experimento de crescimento celular	29
4.2.4 Crescimento das células desorvidas de crisotila	30
4.3 Adesão de células de fermento de pão em crisotila lixiviada	31
4.3.1 Isoterma de adesão	31
4.3.2 Crescimento das células	31
4.4 Dessorção de células de fermento de pão aderidas em crisotila	32
4.5 Imobilização de células em montmorilonita K10	33
4.5.1 Atividade das células de fermento de pão	33
4.5.2 Atividade de células suportadas em montmorilonita K10 modificada	33
4.6 Comparação da atividade de células de fermento de pão imobilizadas em crisotila e montmorilonita	35
4.7 Seleção de linhagens de <u>Saccharomyces</u> sp.	37
4.8 Fermentação alcoólica em processo contínuo	42
4.9 Determinação da Vazão ótima para a melhor produtividade	42
4.10 Influência do meio de alimentação nos reatores Júnior e Margarida	44

4.11 Estabilidade operacional dos reatores	45
4.12 Micrografias de células de <u>Saccharomyces</u> sp.	46
5. DISCUSSÃO.	54
5.1 Crisotila como suporte de células	54
5.2 Redução da multiplicação celular em meio nutritivo contendo suporte	55
5.3 Diferença na atividade de células suportadas em crisotila e montmorilonita	57
5.4 Diminuição na produtividade dos reatores	59
6. CONCLUSÕES	61
7. PERSPECTIVAS	63
8. REFERÊNCIAS	64

Adesão de células de *Saccharomyces* sp. em materiais inorgânicos para a produção de etanol.

Dissertação de Mestrado: Adriana de Andrade Fregonesi
Orientadora: Profa. Dra. Inés Joeques
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6154 CEP 13083-970 Campinas-São Paulo-Brasil

A utilização de sistemas contínuos empregando-se reatores tubulares com células microbianas imobilizadas é uma técnica promissora para a produção de etanol, o que poderia reduzir seu custo.

Neste trabalho, aderiram-se células de *Saccharomyces* sp. em crisotila, crisotila lixiviada e montmorilonita K10, a fim de observar o comportamento destas células nestes suportes. Escolheram-se linhagens de *Saccharomyces* sp. que quando imobilizadas em crisotila apresentaram os melhores resultados para a produção de etanol, em relação às células livres. As linhagens escolhidas foram, então, utilizadas em processo contínuo de produção de etanol em reatores de leito fixo contendo as células imobilizadas em crisotila.

As células aderidas em crisotila, apresentaram aumento de produtividade em relação às células suspensas, com relação célula/suporte de 0,5 g de células secas por grama de crisotila, enquanto que para aquelas imobilizadas em crisotila lixiviada a relação foi de 0,1g de células/grama de suporte. A microscopia eletrônica de varredura de células de *Saccharomyces* sp. em crisotila mostrou as células aderidas e enoveladas às microfibrilas do suporte, e para as células imobilizadas em crisotila lixiviada somente foram constatadas pequenas partículas do suporte aderidas à superfície. As células quando suportadas em montmorilonita, apresentaram diminuição inicial de produtividade em relação aos sistemas com células suspensas. A montmorilonita, tratada com $MgCl_2$, apresentou o mesmo resultado de produtividade que o da não modificada, quando utilizada no suporte de microrganismos.

Em experimentos de seleção das linhagens CCT (0762, 0290, 3174, 0472, 0294 e 0292), FEA 01 e fermento de pão, as células imobilizadas em crisotila apresentaram valores de produção de CO_2 até 25% maiores em relação às células em suspensão. A cepa CCT 0762 aderida em crisotila apresentou a maior velocidade de conversão, de 0,13 (g/h), enquanto a cepa FEA 01 obteve o maior valor de conversão máxima, de 97,3%. Portanto, essas cepas foram utilizadas na montagem de reatores de leito fixo, com células suportadas em crisotila, para a utilização em processo contínuo de produção de etanol.

Foram obtidos valores iniciais de até 110 g/L de produção de etanol e 28 g/L.h de produtividade, e os reatores permaneceram em funcionamento por até 50 dias. Esses resultados são maiores que os encontrados na produção de etanol em escala industrial.

**Adhesion of *Saccharomyces* sp. cells on inorganic materials
for the production of ethanol**

Master Thesis of Adriana de Andrade Fregonesi
Adviser: Profa. Dra. Inés Joekes
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6154-CEP 13083-970 Campinas- São Paulo -Brasil

Continuous systems, using tubular reactors with immobilized microbians cells, is one promising technique for the production of ethanol, which could reduce its cost.

In this work *Saccharomyces* sp. cells were adhered on chrysotile, lixiviated chrysotile and montmorillonite K10, to observe the cells behavior when supported. Strains of *Saccharomyces* sp. were selected as to produce more ethanol when immobilized than when in suspension. The strains chosen were used in continuous process of ethanol production in packed bed reactors using the cells supported on chrysotile.

Cells adhered on chrysotile presented high values of productivity when compared with suspended cells; the cell/support rate was 0.5 g cells/gram of support, while for cells adhered in lixiviated chrysotile this rate was 0,1g cells/gram of support. Scanning electron micrographs of *Saccharomyces* sp. cells on chrysotile show the cells adhered and entrapped by microfibrils. Cells supported in lixiviated chrysotile show only small particles of support on surface. On montmorillonite, the supported presented reduction on the initial productivity, in relation to the suspended cells system. The same behaviour was observed with montmorillonite treated with MgCl₂.

In the selection experiments of the strains CCT (0762, 0290, 3174, 0472, 0294 and 0292), FEA 01 and baker's yeast, the cells adhered on chrysotile showed values up to 25% higher for CO₂ production, in relation to free cells. The CCT 0762 strain showed the highest conversion rate (0.13 g/h), while FEA 01 strain showed the highest maximum conversion value (97.3%). Therefore, both strains and baker's yeast were used in the assembly of packed bed reactors with supported cells on chrysotile for use in a continuous process of ethanol production.

Initial values up to 110 g/L of ethanol production and 28 g/L.h of productivity were obtained in this work; the reactor kept functioning up to 50 days. This results are better than those found in the ethanol production in industrial scale.

1. Introdução

1.1 Produção de etanol

Etanol é produzido em escala comercial a partir do etileno, derivado do petróleo, ou por fermentação de açúcares ou outros carboidratos. No Brasil, criou-se em 1975 o programa Proálcool, visando a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar para fins combustíveis, devido à alta do preço da gasolina no mercado interno e ao risco de desabastecimento. A preocupação ambiental favoreceu a utilização de 22% de álcool etílico à gasolina, eliminando o aditivo a base de chumbo tetraetilico e hidrocarbonetos aromáticos. Atualmente, a produção de etanol tem sentido bem diferente do início do projeto do Proálcool: visa a obtenção do reconhecimento da tecnologia envolvida para esse fim, a utilização de um combustível limpo, proveniente de uma fonte renovável, a preocupação com a qualidade do ar e saúde e a manutenção de empregos ligados direta ou indiretamente à fabricação do produto. Além disso, é incentivado o uso de tecnologias que visem o aumento da produtividade e a redução dos custos de produção setorial. A literatura mostra que estudos nessa área buscam escolher matérias-primas e microrganismos e obter reatores que permitam um processo com custos mais baixos e com melhor eficiência energética.^{1, 2, 3}

A fermentação em condições anaeróbicas consiste na metabolização da glicose em etanol por microrganismos. Essa conversão pode ser representada estequiometricamente por: $C_6 H_{12} O_6 \rightarrow 2C_2 H_5 OH + 2CO_2$. A degradação da glicose por microrganismo é um processo realizado em um mecanismo de 10 etapas até a produção de piruvato e que é, a seguir, transformado em CO_2 e etanol por um processo anaeróbico. De fato, quantidades de glicerol e outros álcoois podem ser produzidos, dependente das linhagens de fermento e condições de fermentação. Da equação acima o rendimento de 51,1 g de etanol pode ser obtido a partir de 100g de glucose. Em processos industriais o rendimento obtido é de 80-90%. Essa redução no rendimento é atribuída ao uso do substrato para o crescimento celular e para a formação de subprodutos. Entretanto, o processo de fermentação é dependente de parâmetros do meio ambiente, como pH e

temperatura, e das características dos microrganismos usados.^{4,5,6,7}

Há dois processos de produção de etanol: um deles é o de batelada (batch) onde a fermentação é realizada misturando-se o meio de cultura com o microrganismo e depois separando-os por filtração. Usualmente é realizado em um tempo de 8-15 horas, sendo um método que apresenta uma facilidade de operação e baixo risco de perdas de materiais. O outro processo utilizado é o contínuo, em que o microrganismo permanece no interior de um reator onde é feita continuamente a passagem do substrato e este é convertido em produto. A vantagem desse processo em relação ao de batelada é a diminuição da improdutividade dos tempos iniciais de fermentação associados à cultura em batelada: a célula permanece na fase exponencial, período da atividade metabólica em que as células apresentam um crescimento com ritmo máximo. Portanto é poupado o tempo inicial (fase denominada lag) de adaptação das células ao meio de cultura. Dentre as desvantagens do processo contínuo pode-se destacar a contaminação e a dificuldade em manter uma alta taxa de fermentação.^{8,9,10}

A metodologia adotada atualmente para a produção industrial de etanol limita-se ao regime tradicional de batelada. A maioria das usinas utiliza o sistema de fermentação em regime de batelada com a reutilização das células de *Saccharomyces cerevisiae*. Estes sistemas são menos produtivos, comparados com a fermentação contínua. Para melhorar a produtividade, a fermentação alcoólica pode ser efetuada em processos contínuos, através da inoculação das células empregando-se reatores tubulares, utilizando-se leveduras imobilizadas. Entretanto, a utilização da fermentação contínua requer cuidados maiores com a contaminação e a necessidade de otimizar as condições do meio ambiente.¹¹

Em processo contínuo de produção de etanol o modelo do fermentador é importante para manter a atividade do processo. Entre os mais comuns estão o reator de leito fixo "Packed bed bioreactor (PBBR)" e de leito fluidizado "Fluidized bed bioreactor (FBBR)". No primeiro, o recheio fica empacotado no interior do reator e através dele passa-se o meio de alimentação. Contudo, esse tipo de reator, apresenta problemas de acúmulo de CO₂ no interior do recheio e permite a formação de canais preferenciais que deformam o leito ocasionando a

morte das células, devido ao excesso de etanol. No reator de leito fluidizado as partículas do recheio são suspensas e agitadas através do fluxo do meio de alimentação, no qual o biocatalisador pode ser encapsulado ou através da forma de um pellet de células.^{12,13}

1.2 Fermentação com células imobilizadas

Os recentes estudos utilizando sistemas com células microbianas imobilizadas mostram-se atrativos e promissores para a produção econômica de etanol, uma vez que a produção em sistema contínuo com células imobilizadas é superior a do processo convencional que utiliza células livres. A primeira aplicação na produção de compostos utilizando sistemas com células imobilizadas foi o processo de produção de vinagre no começo do século. Atualmente, as enzimas e/ou células imobilizadas são utilizadas em estudos de produção de etanol, ácidos orgânicos, aminoácidos, antibióticos, esteróides, entre outros produtos.^{11,14,15}

Holberg¹⁵ descreve os métodos de produção de etanol por células imobilizadas. O autor cita que o primeiro método foi por adsorção, seguido dos métodos de aprisionamento. Outra citação é o trabalho de Navarro e Durand¹⁵ que em 1977 imobilizaram *Saccharomyces carlsbergensis* usando vidro poroso como suporte. Verificou-se, em concentrações baixas de açúcar e em breve período de fermentação, que o metabolismo das células suportadas foi maior que o das células livres; o que pode ser explicado pela modificação na permeabilidade da membrana. Em outra parte do trabalho, os autores imobilizaram as células em sílica tratada com glutaraldeído permitindo a ligação da célula com o suporte e submeteram o complexo a processo contínuo e obtiveram uma alta produtividade e estabilidade. Marcipar e colaboradores,¹⁶ em 1980 aderiram células de fermento em círculos de cerâmica Rasching cobertas por gelatina e pulverizados com solução glutaraldeído e observaram um aumento na taxa de respiração de tais células de um fator de 1.4 para 6.7. Mais recentemente, Szajáni e colaboradores,¹⁷ em 1996, aderiram células de *Saccharomyces cerevisiae* sobre leitos de celulose utilizando reator de leito fluidizado e constataram que esse suporte é adequado para ser utilizado em produção de etanol. Ryu e colaboradores,¹⁸ em 1997,

constataram que a imobilização de células em alginato de cálcio apresentou uma maior produtividade do que em carragena k.

Em nosso grupo, em um estudo sobre a produção de etanol é apresentada a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* sobre crisotila. Essa técnica de fermentação desenvolvida em reatores contínuos mostrou um rendimento 20% superior ao obtido pelo processo utilizando células livres. Este sistema mostrou-se eficiente para a produção de etanol em alta concentração e juntamente com a otimização das condições de fermentação pode reduzir os custos de fabricação do produto.¹⁹

1.3 Imobilização de células para a produção de etanol

A imobilização de células é um termo utilizado quando as células, por métodos naturais ou artificiais, é impedida de se mover livremente em todas as partes da fase aquosa. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte depende das características peculiares do microrganismo e das condições de uso do sistema. Contudo, o processo de imobilização deve ser realizado sob condições suaves de forma a manter a estrutura do biocatalisador. Os principais fatores que afetam esse sistema são pH, natureza do solvente, natureza da substância a ser imobilizada, força iônica e a proporção adsorvente/substância imobilizada.^{11,20,21}

Dentre os métodos de imobilização utilizados temos o de ligação ao suporte (adesão) onde há a ligação direta das células com o suporte a partir de forças de van der Waals, pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas, alterando pouco a estrutura das células.^{5,21,22} As células podem ser imobilizadas em madeiras, ágar, resina aniônica, bagaço de cana, carvão ativado, celulose, partículas de cerâmica e suportes inertes.^{2,22,23} Um dos problemas na aplicação deste método é que a dessorção ocorre durante o processo de lavagem e operação (variações de pH, temperatura). A ligação cruzada é outro método de imobilização onde ocorrem ligações intermoleculares, entre as próprias células do microrganismo ou das células ao suporte, com auxílio de um agente reticulante, formando uma rede polimérica insolúvel; geralmente é utilizado glutaraldeído.^{5,21} No método de aprisionamento, as células ficam agarradas nos interstícios de um gel ou encapsuladas por uma membrana semipermeável, minimizando a perda de

células.^{5,21} Uma das limitações desse método é que a difusão do substrato para o interior das células fica prejudicada, devido a barreira física do gel. Alguns suportes utilizados são alginato de cálcio, carragena-k, ágar e poliacrilamida.^{20,24}

O principal método de imobilização de células para a produção de etanol é por adesão. As vantagens da imobilização dos biocatalisadores neste método são que a imobilização pode ser feita sob condições brandas; a reutilização do suporte e do biocatalisador é possível; maior quantidade de células pode ser usada em um suporte com grande área superficial; permite a produção em regime contínuo por um longo tempo; aumento da estabilidade enzimática e, conseqüentemente, da produtividade; capacidade de parar a reação rapidamente e diminuição dos riscos de contaminação.^{6,11}

1.4 Crisotila

Crisotila é um silicato de magnésio hidratado de hábito fibroso que cristaliza em sistema monoclinico. Apresenta a célula unitária: $Mg_6Si_4O_{10}(OH)_8$ com uma estrutura única e altamente organizada, constituída de bicamadas de brucita-silicato, enroladas coaxialmente, as quais formam uma fibrila. Cada bicamada é composta por uma lâmina ou folha tetraédrica de silicato e por uma lâmina octaédrica de brucita $Mg(OH)_2$. As fibras de crisotila são constituídas naturalmente por fibrilas cilíndricas agrupadas paralelamente e preenchidas por material não cristalino.^{25,26,27}

A crisotila é considerada um material de boa resistência química e estabilidade térmica. Apresenta uma área superficial específica após tratada e ativada, de $14 \text{ m}^2/\text{g}$. Martinez e Zucker,²⁸ realizaram medidas de potencial de fluxo e obtiveram a curva de potencial zeta com o pH e observaram um potencial zeta positivo entre pH 3 e 12 da ordem de 100 mV e ponto isoelétrico em pH 11,8. A superfície da crisotila é constituída por grande quantidade de sítios doadores, $Mg(OH)_2$, possuindo atividade catalítica.²⁹ Ao reagir com ácidos fortes (lixiviação) é destruída a camada de $Mg(OH)_2$, restando somente a sílica. Parizotto,³⁰ através de medidas de área superficial específica por BET, observou que a crisotila lixiviada apresenta áreas superficiais maiores que as obtidas para a crisotila natural.

A crisotila apresenta-se como suporte pois tem um excepcional poder de adsorção; existe em grande abundância na natureza; apresenta inércia química, técnica e biológica; tem um custo baixo e possibilita o reaproveitamento.¹⁹

A crisotila foi estudada em nosso grupo de pesquisa na obtenção de filtros de profundidade, no estudo da ativação da sua superfície e aplicação na imobilização de biocatalisadores.^{26,31,32} Outros estudos referem-se à adsorção de espécies quirais em crisotila, a interação da crisotila com TiO_2 , à adsorção nos sítios ativos da crisotila e aplicações na fase estacionária para HPLC e como suporte para catalisadores inorgânicos e de enzimas.^{27,29,30,33,34} As patentes obtidas são referentes à obtenção de crisotila com alta atividade superficial e na produção de etanol.^{19,31}

1.5 Montmorilonita.

A montmorilonita é uma argila pertencente ao grupo das esmectitas constituída de silicatos hidratados, de alumínio, ferro e magnésio com duas folhas tetraédricas de silicato e uma folha central octaédrica de alumínio, unida por átomos de oxigênio, com fórmula $(\text{Al Mg})(\text{SiAl})\text{O}_{10}(\text{OH})_2\text{M}^+ n\text{H}_2\text{O}$, onde M é o cátion interlamelar. A figura 1 mostra a estrutura da montmorilonita. Os tetraedros de SiO_4^{4-} formam uma estrutura bidimensional ou lamelar, na forma de um hexágono. A folha de silicato pode se ligar a uma segunda folha, geralmente de unidades octaédricas de hidróxidos metálicos.²⁵

Os cátions, presentes nas intercadas estruturais, podem ser trocados por outros, dependendo do grau de substituição isomórfica, que pode ocorrer quando a argila for imersa em água e ocorrer o entumescimento das camadas lamelares. A troca iônica altera sensivelmente as propriedades físico-químicas da argila, não causando alterações estruturais. Na montmorilonita, a capacidade de troca iônica é devida, principalmente, à substituição de Al^{+3} em posições octaédricas por cátions Mg^{+2} e Fe^{+2} e, menos frequentemente, à substituição de Si^{+4} por Al^{+3} em folhas tetraédricas.²⁵

A fraca ligação entre as camadas e o elevado grau de substituição isomórfica torna fácil a clivagem, em meio líquido, das partículas desse tipo de argilomineral. Há uma tendência muito grande, principalmente quando os cátions

trocáveis são K^+ , Li^+ , NH_4^+ , à separação das camadas estruturais em meio aquoso, podendo ir até 1 nm. As medidas de área superficial, em geral, aumentam com o aumento do raio do cátion trocáveis; o valor alcança $68 \text{ m}^2/\text{g}$ para a montmorilonita-Li e $138 \text{ m}^2/\text{g}$ para a montmorilonita-Cs. As argilas pertencentes a esses argilominerais, possuem um elevado grau de propriedades plásticas e coloidais e apresentam variações em suas propriedades físicas, provocadas pelos cátions trocáveis ou por fatores estruturais. A montmorilonita como um mineral natural, tem sido extensivamente estudada no que se refere as suas propriedades e aplicações industriais.^{35,36}

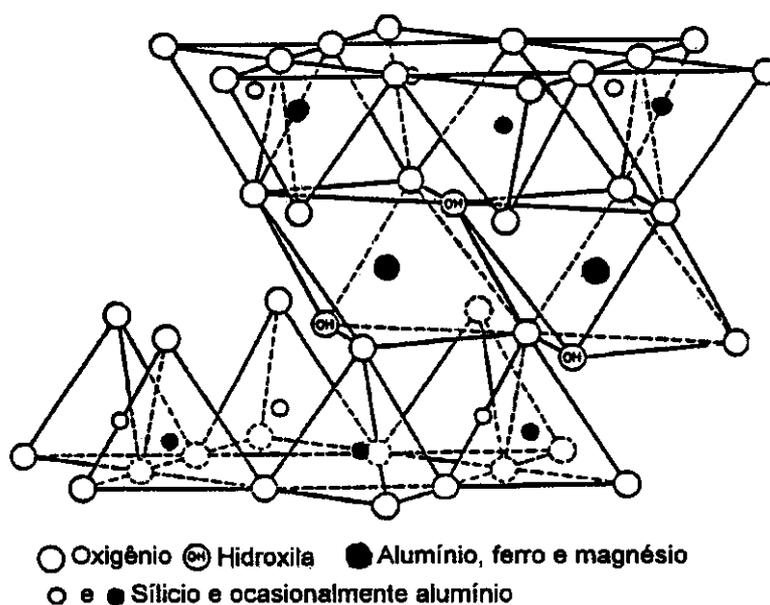


Figura 1 : Estrutura da montmorilonita²⁵

1.6 O microrganismo

O rápido avanço em biotecnologia propiciou a criação de Coleções de Cultura, onde é possível localizar leveduras e outros microrganismos provenientes de diversas partes do mundo, que apresentam uma diversidade de funções metabólicas. Cada Coleção de Culturas representa um conjunto de linhagens com interesses específicos. A National Collection of Yeast Cultures (NCYC) tem a predominância de linhagens para a produção de cerveja, a Yeast Genetics Stock Center (YGSC) tem a predominância de seleções de *Saccharomyces cerevisiae*, além de outras como American Type Culture Collection (ATCC). As linhagens são fornecidas por pesquisadores, e são catalogadas de acordo com suas respostas

da fermentação e assimilação a uma larga variedade de compostos de carbono, bem como a utilização de compostos nitrogenados. Estão disponíveis a todos os grupos de pesquisa interessados em desenvolver novos produtos e processos.^{37,38}

A manutenção das linhagens pode ser feita em tubos de ágar, por métodos de secagem a ar, ou secagem a vácuo. A liofilização (secagem a frio) é o método mais comum de preservação da células microbianas.

Os microrganismos mais adequados para a produção de etanol a partir da sacarose são os do gênero *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e da bactéria *Zymomonas*. Os microrganismos geralmente utilizados e os suportes estão indicados na Tabela I.^{1,11}

As espécies de microrganismos apresentam comportamentos diferentes na fermentação tais como: tolerância ao etanol, ao dióxido de carbono, osmosensibilidade e capacidade de flocular. O microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* é muito tolerante às mudanças das condições do meio, por essa razão ele é geralmente preferido para a produção de etanol, permitindo a sobrevivência por décadas. *Saccharomyces cerevisiae* apresenta, sob condições anaeróbias, somente a produção de etanol e CO₂ a partir de diversas fontes de açúcares; é geneticamente estável e pode operar em pH mais baixo em altas concentrações de açúcar.^{4,8}

TABELA I: Microrganismos e suportes utilizados na produção de etanol^{1,11}

Células microbianas	Suporte para imobilização
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alginato de cálcio Carragena Poliacrilamida Cerâmica Raschig Serragem Resina de troca iônica
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Carragena K Sílica Porosa
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Carragena K
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Alginato de Cálcio
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Alginato de Cálcio
<i>Zymomonas Mobilis</i>	Alginato de Cálcio Carragena K Leito de Poliestireno Leito de fibras

Para o aumento da produtividade no processo de fermentação podem ser utilizadas linhagens puras de *Saccharomyces cerevisiae*, que deverão apresentar tolerância ao meio ambiente, devem manter uma alta taxa de produtividade por um longo período em condições estáveis.³⁹ Em geral, os microrganismos são capazes de crescer e produzir etanol em pH entre 3,5 a 6,0 e temperatura de 28 a 35° C.⁸

Ensaio qualitativos realizados por Zucchetti,³⁴ em 1994, mostraram que a atividade e o tempo de vida do biocatalisador suportado são superiores aos das células livres e, para o complexo *Saccharomyces cerevisiae*/crisotila, foi observado que este apresentou atividade de até 45 dias após o preparo.

1.7 Interação do microrganismo/suporte

Grupos químicos na superfície de um material tendem a interagir com moléculas ou átomos diferentes presentes na fase adjacente (por exemplo água) e os tipos e forças de interação que devem ocorrer dependerão das propriedades químicas de ambas as fases. Estas interações incluem forças de van der Waals, interações polares, interação eletrostática, interações hidrofóbicas, ligação química e ligação de hidrogênio.⁴⁰

A capacidade da superfície para participar de tais interações pode ser expressa em termos termodinâmicos, pela energia livre superficial ou por parâmetros como tensão superficial crítica. Um parâmetro que é geralmente usado para caracterizar a superfície é hidrofobicidade ou o oposto hidrofilicidade. Em geral, a hidrofilicidade da superfície tende a aumentar relativamente ao aumento da energia livre superficial.⁴⁰

A adesão de partículas sobre uma superfície pode ser explicada pela teoria de DLVO (Deryangin, Landau, Verwey e Overbeek), considerando a variação de potencial durante a aproximação de dois sólidos, como a soma de dois termos: um atrativo devido às forças de dispersão de London que dependem da natureza das partículas e do meio de dispersão; o outro repulsivo, resultante da sobreposição das duplas camadas elétricas.^{41,42}

A superfície ionizada de uma partícula pode atrair íons de carga oposta e, assim, formar uma nuvem concentrada de íons (campo elétrico). Este conceito envolve a teoria da dupla camada elétrica, descrita por Gouy e Chapman e depois

por Stern. A dupla camada elétrica contém duas partes externas à superfície: uma camada de íons imediatamente adjacentes à superfície da partícula e a outra é referente aos íons que se situam em camadas mais distantes da superfície. O potencial elétrico no plano de cisalhamento, que é referente a camada de íons mais próxima da partícula, é conhecido como potencial zeta ζ . O potencial zeta é resultado da contribuição eletrostática e pode ser obtido experimentalmente por medidas de eletroforese. O potencial zeta, permite obter um valor aproximado da densidade de cargas superficiais. Células podem ser atraídas para superfícies de potencial zeta oposto. Entretanto, se as células possuem o mesmo potencial zeta da superfície, a adesão é ainda possível por interações moleculares.^{42,43}

Em literatura vários trabalhos descrevem a interação dos microrganismos com suportes em termos da energia e cargas superficiais. Mozes e colaboradores⁴¹ estudando a adesão de microrganismos hidrofílicos, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Acetobacter aceti* em suportes como vidro e alguns polímeros, observaram que a interação é do tipo eletrostática. Entretanto, observaram que com células hidrofóbicas a adesão ocorre em suportes também hidrofóbicos e destacaram, nesse caso, a importância da energia interfacial. Van Haecht e colaboradores⁴⁴ observaram que a adesão de células de *Saccharomyces* tratadas com alumínio quando suportadas em vidro é caracterizada por um interação eletrostática, supondo que há uma diminuição do caráter negativo da superfície do fermento com o tratamento com o metal e, assim, permitir a adesão do microrganismo. Kenji e colaboradores⁴⁵ descrevem a importância da carga superficial de cristobalita, para a adesão de microrganismos. Observaram que as forças eletrostáticas são necessárias para a adesão inicial do microrganismo e para evitar a dessorção.

2. Objetivos

Observou-se em estudos anteriores que o sistema com células imobilizadas apresenta um aumento na estabilidade, na eficiência catalítica e na produtividade no processo de produção de etanol.¹⁹ A imobilização de células de fermento comercial em crisotila mostrou que a adsorção é rápida e intensa, ocorre em todas as faixas de pH e resulta em um material fortemente fixado sem perda da atividade catalítica. Foi observada que a capacidade de adsorção de *Saccharomyces cerevisiae* em crisotila mantém a relação de 1:1 célula/suporte. O rendimento percentual de etanol no processo de batelada com células adsorvidas foi 20% maior em relação ao processo com células livres, para uma concentração de 30% de glicose. Em processo contínuo foi obtido uma produtividade em torno de 15 g/litro.horas.¹⁹ No entanto, a utilização de linhagens puras de *Saccharomyces cerevisiae* pode aumentar a produtividade do processo em relação a utilização de células de fermento de pão.

Por esses motivos, propôs-se como objetivo deste projeto:

- Determinar a quantidade de células aderidas em crisotila e em crisotila lixiviada;
- Comparar a atividade metabólica das células aderidas em crisotila com células aderidas em montmorilonita;
- Escolher linhagens de *Saccharomyces* sp. que, quando suportadas em crisotila, apresentem os melhores resultados de produtividade e tempo reacional para atingir a máxima conversão de açúcares em álcool, comparado com os sistemas com células livres;
- Utilizar as linhagens escolhidas para a produção de etanol, via fermentação, em regime contínuo, utilizando sistemas com células imobilizadas em crisotila.

3. Parte Experimental

3.1 Materiais e reagentes

Os materiais e reagentes utilizados foram: fibras de crisotila do tipo 5R da Mina de Cana Brava em Goiás, cedida pela SAMA Mineração de Amianto S/A, montmorilonita K10 (Aldrich), melão (caldo de cana-de-açúcar) proveniente da Usina São Francisco Capivari- SP, extrato de malte da marca Biobrás, peptona bacteriológica (Biobrás), extrato de levedura (Biobrás), D-glucose anidra PA (Synth), sacarose de açúcar refinado comercial, uréia (Nuclear) e demais reagentes de grau analítico.

As cepas utilizadas estão apresentadas na tabela II. Aquelas com sigla CCT foram obtidas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" em Campinas, as de sigla FEA são da Faculdade de Engenharia de Alimentos na Unicamp. Também foi testado fermento de pão (FP) marca Fleshmann & Royal Ltda.

TABELA II: Microrganismos utilizados para a produção de etanol .

Sigla	Sigla internacional/ Origem	Espécie de <i>Saccharomyces</i>
CCT 0762	ATCC26602, NCYC 975	<i>cerevisiae</i>
CCT 0290	ATCC26602, NRRLY-11877	<i>pastorianus</i>
CCT 3174	Rosane F.S.Rezende	<i>cerevisiae</i>
CCT 0472	Usina Modelo	<i>cerevisiae</i>
CCT 0294	IZ 1904	<i>boulardii</i>
CCT 0292	ATCC 26602, NRRL 857	<i>uvarum</i>
FEA 01	Usina Santa Adélia	várias
FP	comercial	várias

3.2 Instrumentos

Os instrumentos utilizados foram: Espectrofotômetro de absorção atômica 5100 Perkin Elmer, Bomba dosadora peristáltica de marca Milan, Turbidímetro de marca Micronal modelo B-250, Colorímetro fotoelétrico de marca Micronal modelo B-340, Centrífuga marca Fanem, Autoclave marca Quimis Q 190-22, Ultra-som marca Thornton, Banho tipo Dubnoff marca Quimis Q226 D2, Banho de circulação externa marca Marconi modelo MA 150, Cromatógrafo gasoso

marca CG modelo Master, Refratômetro marca Carl Zeiss, Capela de Fluxo Laminar marca Veco modelo VLFS 09.

3.3 Meio de alimentação

Os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave por aproximadamente 10 minutos a 120 °C e 1 atm. O pH foi ajustado com gotas de ácido fosfórico concentrado.^{4,46} Os seguintes meios foram utilizados durante os experimentos:^{47,14}

– Meio de Crescimento: D-glucose 10g/L, peptona bacteriológica 5g/L, extrato de malte 3g/L e extrato de levedura 3g/L, pH 6.

– Meio de Crescimento com melaço: melaço 20g/L, peptona bacteriológica 5g/L, extrato de malte 3g/L e extrato de levedura 3g/L, pH 6.

– Meio Misto de Crescimento: D-glucose 10g/L, sacarose 5g/L, peptona bacteriológica 5g/L, extrato de malte 3g/L e extrato de Levedura 3g/L, pH 6.

– Meio Misto de Fermentação: D-glucose 50g/L, sacarose 50 g/L, peptona bacteriológica 2,5 g/L, extrato de malte 1,5 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L, uréia 1,5 g/L, pH 4,5.

– Meio de Fermentação: D-glucose ou sacarose com concentrações de 300g/L, 250g/L, 200g/L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L, pH 4,5.

– Meio de Fermentação com melaço: melaço 330g/ L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L, pH 4,5.

3.4 Preparo do suporte crisotila

3.4.1 Lavagem e ativação da crisotila

Os experimentos foram feitos de acordo com a patente nº 8.903849/BR do nosso grupo de pesquisa.³¹ Amostras de aproximadamente 5g de crisotila (5R) foram colocadas sobre uma peneira Tyler 250 e jateadas com água durante 10 minutos para a eliminação das impurezas. O material resultante foi colocado sobre vidro de relógio e seco em estufa por 24 horas a 120 °C. A ativação da crisotila foi feita colocando-se 2g de crisotila em 400 mL de uma solução tampão de ácido acético/acetato de sódio equimolar a $3,3 \cdot 10^{-2}$ M. A mistura foi colocada em um

campo de ultra-som de 25 kHz por 30 minutos, a seguir foi filtrada em uma peneira Tyler 250, lavada com água destilada e seca por 24 horas em estufa a 120°C.

3.4.2 *Lixiviação da crisotila*

Aproximadamente 20g de crisotila foram colocadas em um balão volumétrico de 500mL com 250 mL de uma solução de ácido clorídrico fumegante. A mistura permaneceu em refluxo por 72 horas, sendo então filtrada e lavada com água destilada em funil de placa porosa. A crisotila foi seca em estufa por uma noite a 90°C.^{30,48}

3.4.3 *Lixiviação da crisotila para análise em Microscopia eletrônica de varredura*

A crisotila após ser lixiviada por 120 horas, como descrito anteriormente, foi filtrada e, posteriormente, seca em estufa a 90°C por 24 horas. A seguir foi triturada em um almofariz de ágata e novamente foi submetida ao processo de lixiviação com 250 mL de ácido clorídrico fumegante por 48 horas. Após esse período foi filtrada e seca em estufa a 90°C por 24 horas.

3.4.4 *Quantificação do magnésio em crisotila lixiviada*

Uma amostra de 0,5024 g de crisotila lixiviada para a análise de microscopia foi colocada em um cadinho de chumbo, em uma chapa de aquecimento. Algumas gotas de ácido fluorídrico foram adicionadas ao cadinho, até a completa dissolução da amostra. A amostra foi aquecida até a evaporação do solvente, sendo então colocada algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. Após a evaporação do solvente o resíduo foi dissolvido em ácido clorídrico 1M. A solução foi colocada em um balão de 100mL e completou-o com o solvente. Uma curva de calibração foi preparada com soluções 0,1; 0,3 e 0,5 mg/L de MgO em ácido clorídrico 1M.⁴⁹ Foram feitas leituras de absorção atômica dos padrões e da amostra utilizando lâmpada de magnésio, corrente de 6mA e acetileno/ar como gás de arraste. Foi obtido 0,1 mg de magnésio por grama de crisotila.

3.5 Análise do açúcar no melaço

Para determinar a quantidade de açúcares disponível no melaço foi realizado a fermentação exaustiva com uma amostra de 250 mL de Meio de Fermentação e 35 g de fermento de pão, mantendo o sistema em banho termostático com agitação a 30⁰ C. Após 24 horas, uma alíquota da dispersão foi destilada medindo-se o teor de etanol por refratômetria. A partir da equação estequiométrica de conversão de glicose em etanol foi determinada a quantidade de açúcar presente na solução.⁴ Foi obtido o valor de 60g de açúcares por litro de melaço, valor que corresponde ao fornecido pelo fabricante.

3.6 Curvas de crescimento de células de fermento de pão

Esta parte experimental foi desenvolvida por Adriana de Andrade Fregonesi, Renato Wendhausen Jr. e José Eduardo Tonella, durante a 1^a parte experimental do convênio Sama Mineração de Amianto/Unicamp: "Crisotila como suporte de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar."

Uma curva de calibração foi preparada com concentrações 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 e 0,1 g/L de fermento de pão em Meio de Crescimento. Foram feitas leituras instantâneas de turbidez (FTU) e densidade ótica a 660 nm.^{50,51,52} A Figura 2 mostra a curva de calibração colorimétrica e turbidimétrica, permitindo que seja calculada a concentração de uma amostra a partir das leituras de turbidez e absorbância.

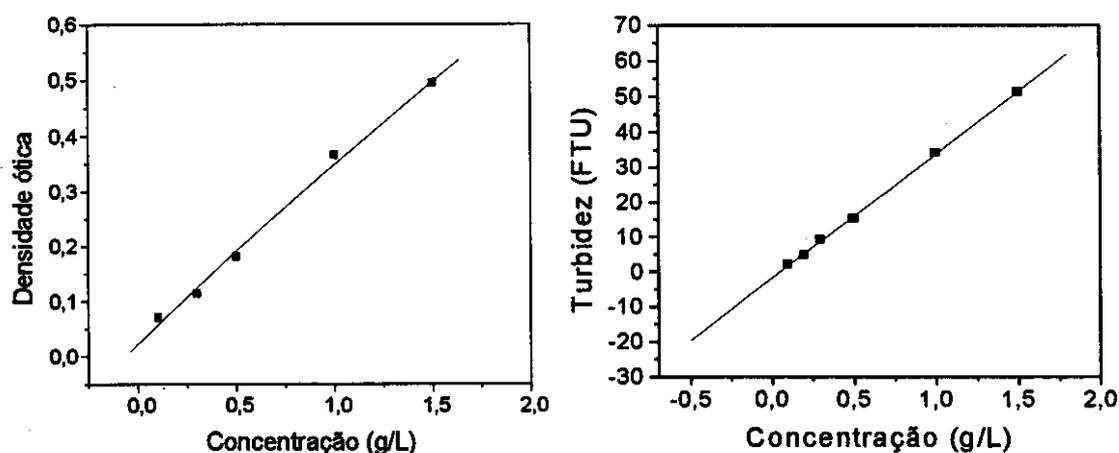


Figura 2: Curvas de calibração colorimétrica a 660nm e turbidimétrica para dispersões de concentrações variadas de fermento de pão em água. Experimento em medida única.

Suspensões 0,1; 0,04 e 0,03 g/L de fermento de pão foram preparadas em Meio de Crescimento e foram colocadas em erlenmeyers de 250 mL tampados com rolhas de algodão em banho termostático a 30°C por 35 horas. Foram feitas leituras de FTU e densidade ótica a fim de verificar o aumento da massa celular em função do tempo. Os experimentos foram realizados em duplicatas de amostra.

3.7 Adesão de células de fermento de pão em crisotila

3.7.1 Isoterma de adesão

Em 1 L de água foi resuspenso fermento de pão e a seguir centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. Foram pesados 0,2; 0,5; 0,8; 1,6; 2,0 e 2,5 g de fermento de pão e adsorvidos em 0,5 g de crisotila em 100mL de água (duplicatas). Os sistemas foram mantidos em banho termostático a 30°C com agitação branda por 1 hora. A seguir foram filtrados em peneira Tyler 250, lavados com água e secos na estufa a 90°C por 24 horas e posteriormente, pesados.²⁶

3.7.2 Crescimento celular

O crescimento celular foi realizado colocando-se o inóculo das células de fermento de pão em 0,3 g de crisotila ativada e 100mL de Meio de Crescimento com 10 g/L de glicose. Sistemas controle foram feitos com 0,3 g de crisotila e Meio de Crescimento.

Os sistemas foram mantidos em banho termostático a 30°C com agitação por aproximadamente 50 horas. Em tempos regulares foram filtrados em peneira Tyler 250 e o filtrado foi colocado em estufa a 90°C por 24 horas e posteriormente pesado. Foi preparado também um sistema contendo somente o inóculo em Meio de Crescimento a fim de quantificar, através de leituras de turbidez, o crescimento total das células livres. O experimento foi realizado em triplicatas de amostras.

O crescimento foi também analisado em sistemas contendo 0,5 g de crisotila em Meio de Crescimento com 100g/L de glicose. O experimento foi mantido nas mesmas condições anteriores, entretanto os sistemas foram pesados regularmente para a medida da evolução de CO₂. Foram efetuadas medidas em

triplicatas de amostra.

3.7.3 Crescimento das células dessorvidas de crisotila

Três sistemas foram preparados colocando-se 1 g de crisotila ativada e 1 g de fermento de pão em erlenmeyers de 125 mL com 100 mL de água destilada. Os sistemas foram mantidos em banho termostático com agitação branda a 30° C por 15 horas. Após esse período foram filtrados em peneira Tyler 250. O complexo célula/suporte foi mantido na peneira e inserido em um recipiente com água e agitado mecanicamente com auxílio de uma barra magnética por 6 horas, a fim de dessorver as células do suporte. A dispersão de células, resultante da filtragem, foi centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm.

Em erlenmeyers de 15 mL foram colocados 0,46g de células dessorvidas e 0,5 g de crisotila em 15 mL de Meio de Fermentação. Para comparar a atividade dessas células foi preparado outro sistema utilizando-se 0,46 g de células de fermento de pão lavadas em água, aderidas em 0,5 g de crisotila. Os sistemas foram mantidos por 70 horas em banho termostático com agitação branda a 30°C. Em tempos regulares os frascos foram pesados para a medir a evolução de CO₂.

3.8 Adesão de células de fermento de pão em crisotila lixiviada

3.8.1 Isoterma de adesão

Em 0,3 g de crisotila lixiviada foi adsorvida uma quantidade variada de fermento de pão 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 g. Os frascos foram agitados em banho termostático a 30° C por 2 horas. Os sistemas foram filtrados, lavados com água e os complexos célula/crisotila obtidos foram secos em estufa a 90° C por 24 horas. O experimento foi realizado em medida única.

3.8.2 Crescimento das células

Sistemas foram preparados com 0,3 g de crisotila lixiviada, um inóculo de fermento de pão e 100mL de Meio de Crescimento e foram deixados por 20 horas em banho termostático com agitação branda a 32°C. Foram filtrados em peneira

Tyler 250 e secos por 24 horas em estufa a 90°C .

Ao final de 20 horas de crescimento foram feitas leituras de turbidez (FTU) com um sistema contendo somente células em Meio de Crescimento .

3.9 Dessorção de células de fermento de pão aderidas em crisotila

3.9.1 Células aderidas em meio aquoso

Seis sistemas foram preparados colocando-se 0,3 g de fermento de pão e 0,5 g de crisotila em béquers de 125 mL com 100mL de água destilada. Os sistemas foram mantidos em banho termostático a 30°C com agitação branda por 1 hora. Os complexos célula/crisotila formados foram filtrados em peneira Tyler 250. A capacidade de dessorção das células do suporte foi testada colocando-se o complexo sobre peneira Tyler 250 e suspensos em um recipiente com água. Os complexos foram submetidos a um campo de ultra-som de 25 kHz por 30 minutos, ou a agitação mecânica por 30 minutos, com auxílio de uma barra magnética. A seguir os complexos foram filtrados e secos em estufa a 90°C por 22 horas. O controle foi somente seco em estufa. Após a secagem o material foi pesado. O experimento foi realizado em duplicatas de amostra.

3.9.2 Células aderidas em Meio de Crescimento

Doze sistemas foram preparados colocando-se 0,5 g de crisotila e 0,1 g células e 100mL de Meio de Crescimento em erlenmeyers de 125 mL. Os frascos foram mantidos em banho termostático a 30° C com agitação branda por 19,5 horas e 44 horas. Em cada período, seis complexos célula/suporte foram filtrados e colocados sobre peneira Tyler de 250 e inseridos em um recipiente com água. Estes sistemas foram submetidos a um campo de ultra-som de 25KHz por 30 minutos, ou a agitação mecânica por 30 minutos. A seguir foram filtrados e secos em estufa a 90° C por 24 horas e posteriormente foram pesados. O experimento foi realizado em duplicatas de amostra.

3.10 Imobilização de células em montmorilonita K 10

3.10.1 Atividade das células de fermento de pão

Em 9 erlenmeyers de 25 mL foram colocados 0,6 g de células de fermento de pão, 1g de montmorilonita K10 e 15 mL de Meio de Fermentação com concentrações de glicose 20, 25 e 30 %. Outros 9 erlenmeyers foram preparados da mesma forma, mas sem o suporte. Os frascos foram fechados com septos estéreis e agulhas para a saída de CO₂. Os sistemas foram mantidos sob agitação em banho Dubnoff a 30°C por 70 h. Os frascos foram pesados regularmente em balança analítica para medir a saída de CO₂. Os experimentos foram realizados em triplicatas de amostra.

3.10.2 Atividade das células de fermento de pão imobilizadas em montmorilonita modificada

Em 5 erlenmeyers de 125 mL foram colocados 5 g de montmorilonita e 100mL de cloreto de magnésio 1M. Os frascos foram colocados em banho termostático com agitação branda a 40 °C por 5 horas. Após esse período a solução foi trocada e os sistemas foram mantidos sob as mesmas condições por 18 horas. Os sistemas foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e a seguir foram lavados com água destilada.

Três sistemas foram preparados com 1 g de montmorilonita modificada, 0,6 g de células de fermento de pão e 15 mL de Meio de Fermentação. Sistemas controle foram preparados da mesma maneira anterior, mas com 1g de montmorilonita somente lavada com água destilada. Os sistemas foram mantidos em banho termostático por agitação branda a 30°C por, aproximadamente, 90 horas e regularmente pesados para a medida de evolução de CO₂.

A influência do magnésio no meio de cultura foi testada preparando 6 outros sistemas da mesma forma que os primeiros, mas o Meio de Fermentação utilizado foi sem a presença de MgSO₄. Os sistemas foram mantidos em banho termostático por agitação branda a 30°C por aproximadamente 90 horas e regularmente foram pesados para a medida da evolução do CO₂.

3.11 Seleção de linhagens de *Saccharomyces sp.*

Esta parte experimental foi desenvolvida por Adriana de Andrade Fregonesi, Renato Wendhausen Jr., José Eduardo Tonella e Karina Althoff, durante a 1ª parte experimental do convênio Sama Mineração de Amianto/Unicamp: “Crisotila como suporte de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.”

Durante esta parte experimental foram tomados os cuidados para se evitar contaminação: a manipulação das linhagens foi realizada, com auxílio de luvas, em uma capela de fluxo laminar, usou-se luvas e o material e o meio de cultura utilizado foram esterilizados em autoclave a 1atm e 120⁰ C por aproximadamente 10 minutos.⁵³

3.11.1 Crescimento das linhagens

As linhagens foram fornecidas na forma de “slants”: tubos inclinados de ágar, contendo um inóculo de células. A fim de obter um maior concentrado de células o inóculo foi repicado raspando-se a superfície do ágar com uma espátula, retirando-se as células e inserindo-as em Meio de Crescimento. Os sistemas permaneceram em banho termostático a 30⁰C por 72 horas e, posteriormente, foram filtrados em papel de filtro.⁵³

3.11.2 Adesão das células em crisotila

Foram colocados 0,6 g de células para serem aderidas em 1 g de crisotila, em 200 mL de água destilada. Os frascos foram submetidos a agitação em banho Dubnoff por 1 hora. Os complexos célula/ suporte obtidos foram filtrados em peneira Tyler de 250 sob vácuo.

3.11.3 Atividade fermentativa das células em processo de batelada

Em 9 erlenmeyers de 25 mL foram colocados os discos do complexo célula/suporte obtidos juntamente com esferas de vidro, um material inerte, e 15 mL de Meio de Fermentação com concentrações de glicose 20, 25 e 30% (em triplicatas). Para efeito de comparação outros 9 erlenmeyers foram preparados da mesma forma, mas sem a presença de crisotila. Os 18 frascos foram fechados com septos estéreis e agulhas para a saída de CO₂ e foram mantidos sob agitação a

30°C por um período de aproximadamente 70 horas.⁵⁴ Em intervalos de tempo regulares, os frascos foram pesados para a determinação da perda de CO₂. Foram analisados por cromatografia gasosa, e/ou refratometria os teores finais de etanol de cada um dos sistemas.

3.11.4 Análise de etanol

Foram colocados 50 mL de amostra do efluente de saída em um equipamento de destilação, com balão volumétrico de 100mL e coluna de destilação. O destilado foi analisado em cromatógrafo com: corrente de 15 A e temperatura da coluna, do vaporizador e do detector de 100°C, 170°C e 170°C; respectivamente. Para a análise do etanol por refratometria, foi feita uma curva de calibração com etanol PA no refratômetro a 20°C e, a seguir, foram feitas as leituras das amostras destiladas.

3.12 Fermentação alcoólica em processo contínuo

Esta parte experimental foi desenvolvida por Adriana de Andrade Fregonesi, Renato Wendhausen Jr., José Eduardo Tonella e Karina Althoff, durante a 1ª parte experimental do convênio Sama Mineração de Amianto/Unicamp: “Crisotila como suporte de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.”

Esta parte experimental foi realizada manipulando-se o recheio dos reatores em uma capela de fluxo laminar, usando-se luvas. Os materiais e os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 10 minutos a 120°C e 1 atm.

3.12.1 Montagem dos reatores

Foram montados reatores de leitos fixos de bancada estruturados com um complexo de crisotila/célula misturado a areia de 3µm (um material inerte) de acordo com da referência 19. O esquema de montagem do reator, medindo 54 cm de altura e 4,7 cm de diâmetro, é apresentado na Figura 3.

Com a finalidade de se obter um maior concentrado de células, foi feito um prévio crescimento celular das linhagens testadas ou das células de fermento de pão, adicionando-se um inóculo em 6 litros de Meio de Crescimento, contendo 120 g de crisotila. O crescimento foi mantido por 72 horas com aeração feita por

bomba de aquário. O meio foi trocado a cada 24 horas, dos quais o último utilizado foi o de Misto de Crescimento. O complexo crisotila/suporte obtido foi filtrado em peneira Tyler 250 sob vácuo.

O complexo célula/suporte obtido foi fragmentado e misturado manualmente com 850 g de areia de granulometria alta (3 μ m). Os reatores foram preparados colocando-se o retentor inferior, aproximadamente 2 cm de esferas de vidro, a mistura areia mais o complexo células/crisotila, preenchendo-se os espaços vazios com auxílio de uma bagueta. A finalização do recheio foi feita com uma camada de 3 cm de esferas de vidro (material inerte) e o retentor superior. Nesta etapa, foram utilizados dois bicos de Bunsen para criar uma atmosfera estéril em torno da parte superior do reator para evitar a contaminação. A termostatização a 30°C ao longo do reator foi feita por sistema de camisa. Com auxílio de bomba peristáltica foi feita a alimentação ascendente do reator.

As mudanças dos meios foram sendo feitas gradualmente para evitar uma mudança brusca no meio ambiente das células. A primeira solução a passar foi o Meio Misto de Fermentação. Após 24 horas foi feita a troca de meio para o Meio de Fermentação.

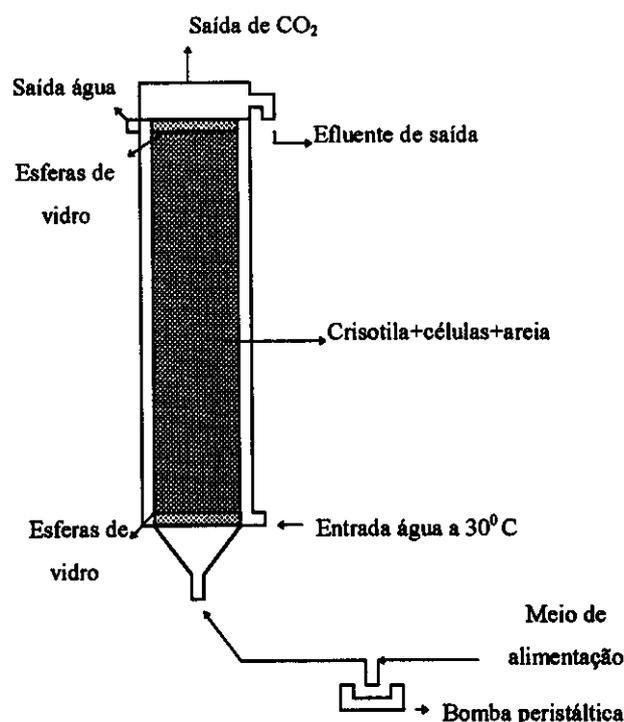


Figura 3: Reatores tubulares estruturados com 120 g de crisotila, 850 g de areia e células, termostatização a 30°C e alimentação com uma solução de açúcar 20%.

O reator chamado “Baby” foi testado com o recheio preparado com 18 g de fermento de pão adsorvidos em crisotila sem haver um crescimento celular prévio. Os dois últimos reatores foram alimentados com Meio de Fermentação com Melaço, e o prévio crescimento celular das linhagens utilizadas no recheio dos reatores foi feito com Meio de Crescimento com Melaço. Os reatores montados, as respectivas linhagens e os meios de alimentação estão representados na tabela III.

TABELA III: Reatores estruturados com 850 g de areia e 120 g de crisotila + células, termostatização a 30^o C e alimentação com solução 20% de açúcar.

Reatores	Linhagens	Alimentação no crescimento das linhagens	Alimentação na fermentação
Baby Júnior	Fermento de pão CCT 0762	Meio de Crescimento Meio de Crescimento	Meio de Fermentação Meio de Fermentação, Meio de Fermentação com melaço
Magali	FEA 01	Meio de Crescimento	Meio de Fermentação, Meio de Fermentação com melaço
Margarida	FEA 01	Meio de Crescimento com melaço	Meio de Fermentação com melaço
Donald	CCT 0762	Meio de Crescimento com melaço	Meio de Fermentação com melaço

3.12.2 Variáveis calculadas durante a fermentação

As variáveis do processo analisadas foram: vazão (mL/ min), vazão específica (h⁻¹), vazão ótima para a máxima produtividade(mL/ min), volume útil do reator (mL), tempo de residência (h), produtividade (g/L. h), pH de entrada e de saída, etanol no efluente e estabilidade operacional.^{6,18,55,56,57,58}

O volume do recheio foi determinado fazendo-se passar pelo reator uma solução de água pura e estéril e o volume de CO₂ foi analisado através da passagem de Meio de Fermentação medindo-se, nos dois casos, a diferença entre o volume de entrada e saída do líquido. O volume útil V_u(mL) foi considerado como a região aproveitável do reator. Foi calculado por $V_U = V_T - V_r - V_{CO_2}$ onde V_T = volume total, V_r = volume do recheio: areia + crisotila + células, V_{CO₂} = volume de CO₂ produzido na reação. A vazão V (L/h) foi calculada pela

quantidade de produto formado em um determinado tempo, através da fórmula $V = E / \text{tempo}$; onde E = efluente de saída. A vazão específica V_E (h^{-1}) foi obtida pela quantidade de produto formado em um determinado tempo no volume aproveitável do reator por $V_E = V / V_u$. O cálculo da vazão ótima V_o (L/h) foi obtido pelo gráfico de produtividade versus a vazão específica. Indica a vazão do meio de alimentação para alcançar a melhor produtividade. O tempo de residência T_{res} (h) foi calculado como o tempo necessário para a solução percorrer uma distância AB no interior do reator, através da fórmula $T_{res} = V_w / V$. A produtividade dp/dt (g/L.h) foi calculada pela formação do produto em um determinado tempo de residência: $dp/dt = EtOH$ (g/L)/ T_{res} . A estabilidade operacional foi obtida por um gráfico de produtividade versus o tempo de operação do reator. A curva foi construída pelos cálculos diários de produtividade e as medidas de etanol (g/L) foram obtidas por refratometria e cromatografia gasosa. As leituras foram diárias.

3.13 Micrografias de células de *Saccharomyces* sp. aderidas em crisotila

As micrografias foram realizadas no laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de Física da USP em São Paulo por Flávia Maria Cassiola. Foram verificadas as células de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174 e células de fermento de pão suportadas em crisotila e em crisotila lixiviada e/ou triturada.

As amostras foram preparadas com células da cepa CCT 3174 aderidas em crisotila, permanecendo em meio aquoso por 1 hora. Amostras destas células aderidas em crisotila também foram colocadas em Meio de Fermentação com 30% de glicose, por aproximadamente 70 horas (parte experimental 3.11.3). Outra amostra foi preparada com células de fermento de pão aderidas em crisotila lixiviada, permanecendo em água por 1 hora. Um inóculo de fermento de pão foi colocado em Meio de Crescimento com 10g/L de glicose contendo a crisotila lixiviada, permanecendo por 20 horas. Todas as amostras foram colocadas em banho termostático a 30°C com agitação branda, e a seguir foram filtradas e lavadas com água em funil de placa porosa. Outra amostra foi preparada com células de fermento de pão aderidas em crisotila, triturada e lixiviada por 168 horas restando 0,1 % de magnésio. Essa amostra foi submetida ao mesmo processo

descrito nas amostras anteriores, mas não foi feita, por filtração e lavagem, a separação das células não aderidas. As amostras foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 2,5% v/v e pós fixação em solução de OsO₄ 1:3(m/m). A seguir foi feita a desidratação usando álcool etílico 50, 80, 95, 100% e secas pelo método do ponto crítico. Posteriormente foi feita a deposição de Au com o método de "Sputtering" e levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL- JSM-840A

4. Resultados

A primeira utilização de crisotila como suporte de *Saccharomyces* sp. foi registrada na patente de produção de etanol com alto rendimento, que apresentou um resultado de produtividade de 20% maior em relação aos processos tradicionais. Contudo, nesse trabalho foi utilizado fermento de pão e, como meio de alimentação, uma solução de sacarose com 20% de açúcar.¹⁹ No presente trabalho, a técnica foi ampliada para as linhagens puras de *Saccharomyces* sp., que podem aumentar a produtividade, e na utilização de melaço, que é o meio de alimentação utilizado em escala industrial. As etapas foram: verificação do comportamento das células de fermento de pão em Meio de Crescimento; determinação da relação máxima de células aderidas em crisotila ativada e em crisotila lixiviada, em meio aquoso; crescimento das células em meio de cultura com a presença do suporte; relação entre a atividade metabólica e o número de células presentes nesta suspensão; comportamento das células desorvidas de crisotila, comportamento das células suportadas em montmorilonita e em montmorilonita modificada; seleção de linhagens de *Saccharomyces* sp. para a produção contínua de etanol; montagem de reatores de leito fixo com células suportadas em crisotila e obtenção de micrografias de células de *Saccharomyces* sp. aderidas em crisotila e em crisotila lixiviada.

4.1 Curvas de crescimento celular para o fermento de pão

Obteve-se curvas de crescimento em função do tempo para as células de fermento de pão através de leituras de turbidez (FTU) e densidade ótica, a fim de estabelecermos o tempo mínimo necessário para atingir a concentração máxima de células. Esse valor é dependente das características de cada linhagem do microorganismo. O fermento de pão, que é uma mistura de linhagens de *Saccharomyces* sp, foi escolhido por ser o produto utilizado para a fermentação em escala industrial.

A Figura 4 mostra os gráficos de concentração celular máxima atingida em determinado tempo para as leituras de FTU. As curvas obtidas através de densidade ótica são semelhantes às obtidas por FTU.

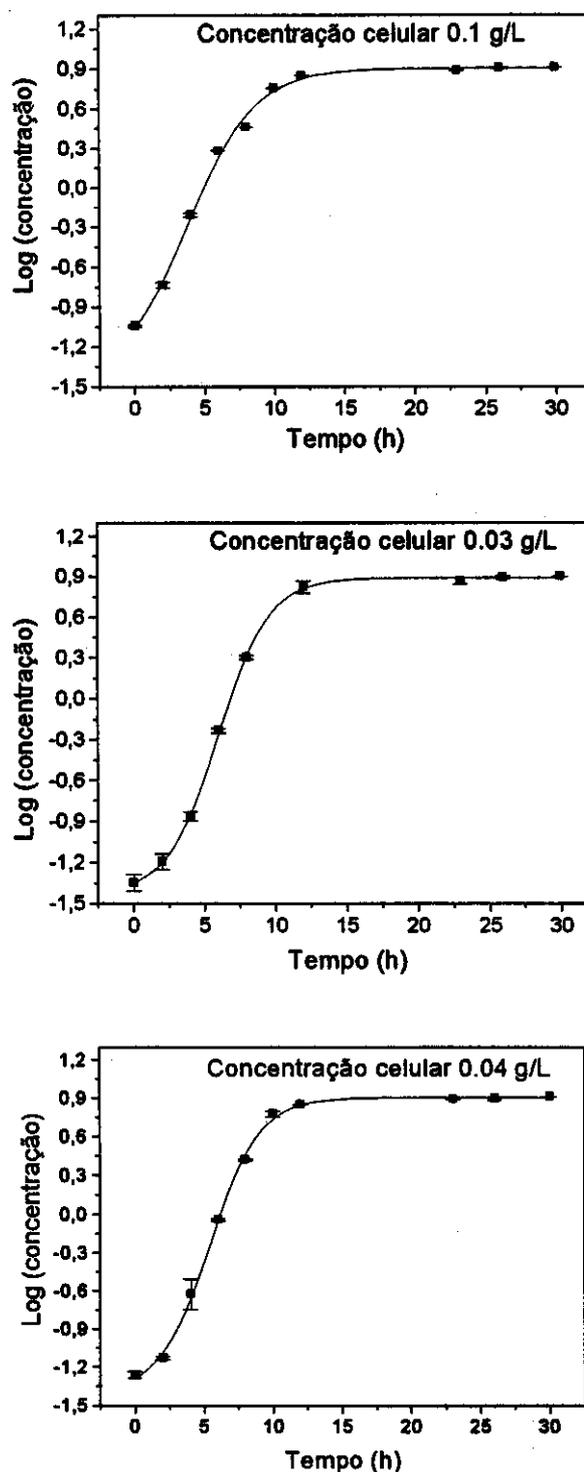


Figura 4: Curvas de crescimento de *Saccharomyces* sp. com concentração celular inicial 0,03; 0,04 e 0,1g/L em função do tempo obtidas a partir de fermento de pão inoculados em Meio de Crescimento: D-glucose 10g/L, peptona bacteriológica 5g/L, extrato de malte 3g/L e extrato de levedura 3g/L. As suspensões foram preparadas a partir de uma suspensão estoque com concentração celular 3 g/L. As leituras foram feitas em turbidímetro a 30°C. Experimentos feitos em duplicatas de amostra.

Foi observado que independente das concentrações iniciais dos inóculos, a concentração máxima alcançada foi de 6,5 g/L em um tempo aproximado de 15 horas. As 3 fases do crescimento celular são observáveis na Figura 4: latente nas duas horas iniciais, exponencial até doze horas e estacionária até o final do experimento. Os valores de concentração a tempo zero não são iguais aos da concentração inicial, porque gastou-se um tempo entre a preparação da amostra e as leituras.

4.2 Adesão de células de fermento de pão em crisotila

4.2.1 Isoterma de adesão

O experimento foi realizado com a finalidade de se determinar a quantidade de células aderidas ao suporte. Utilizou-se quantidades variadas de fermento de pão (ressuspensos em água) e quantidade fixa de crisotila. A Figura 5 mostra a isoterma.

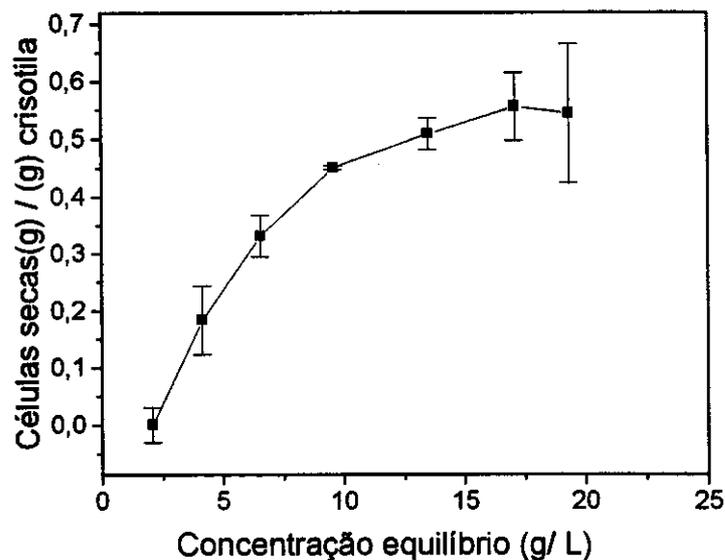


Figura 5: Curva de adesão de fermento de pão em crisotila ativada. Quantidades variadas de fermento de pão e 0,5 g de crisotila, em 100 mL de água, a 30° C, com agitação por 2 horas. Média de duplicatas de amostra.

No intervalo testado, observou-se que a adesão foi de 0,5 g de células secas por grama de crisotila.

4.2.2 *Crescimento celular em crisotila*

Analisou-se o crescimento de células em meio de cultura com 10g/L de glicose contendo crisotila, determinando-se o valor da quantidade célula/ suporte, com a finalidade de comparar com o crescimento de células livres. Esse dado será útil para otimizar o recheio dos reatores em produção contínua de etanol.

A inoculação de uma pequena quantidade de células em meio de cultura com 10g/L de glicose contendo crisotila indicou um valor final de 0,23 g de células secas por grama de crisotila em 52 horas de experimento. O filtrado não apresentou células livres em solução, mostrando que todas as células produzidas aderiram ao suporte. As leituras de turbidez para os sistemas contendo somente o inóculo e o Meio de Crescimento indicaram que a concentração atingida foi de 11 gramas de células por litro de solução. Utilizando-se meio de alimentação com concentração de glicose 100 g/L e 0,5 g de crisotila, obteve-se em 28 horas de crescimento o valor de 0,22 g de células secas por g de crisotila. As células secas tem perda de 70% em umidade. Logo, o crescimento das células em crisotila foi menor ao crescimento das células livres, até 28 horas.

4.2.3 *Atividade metabólica das células durante experimento de crescimento celular*

Observou-se no experimento anterior que o crescimento das células foi menor no sistema contendo crisotila. Neste experimento mediu-se a perda de massa de CO₂, que é diretamente proporcional a concentração de etanol, para sistemas com células livres ou imobilizadas em 100mL de Meio de Crescimento, com a finalidade de observar alguma diferença na atividade metabólica entre eles. O resultado é mostrado na Figura 6.

Notou-se que o sistema com células imobilizadas apresentou uma maior atividade metabólica (massa de CO₂) em relação aos sistemas com células em suspensão, mesmo tendo apresentado uma menor multiplicação celular.

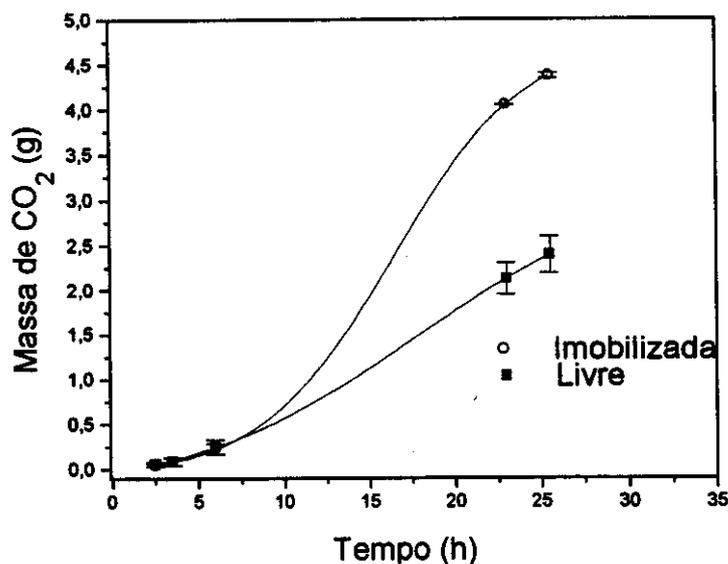


Figura 6: Massas médias de CO_2 (g) produzidas em função do tempo de permanência em meio de cultura. Inoculação de fermento de pão em 100mL de Meio de Crescimento: D-glucose 100g/L, peptona bacteriológica 5g/L, extrato de malte 3g/L e extrato de levedura 3g/L. Células imobilizadas em 0,5 g de crisotila no Meio de Crescimento. $T = 30^\circ\text{C}$. Média de duplicatas de amostra.

4.2.4 Crescimento das células dessorvidas de crisotila

Para observar se há mudanças no comportamento de células anteriormente aderidas em crisotila e a seguir dessorvidas, realizou-se o experimento de fermentação com essas células e comparou-se os resultados com as células livres de fermento de pão lavadas com água. Os dados estão apresentados na Figura 7. Observou-se que a produção de CO_2 em função do tempo foi menor para os sistemas contendo as células dessorvidas em relação aqueles contendo as células que não tiveram nenhum contato com a crisotila.

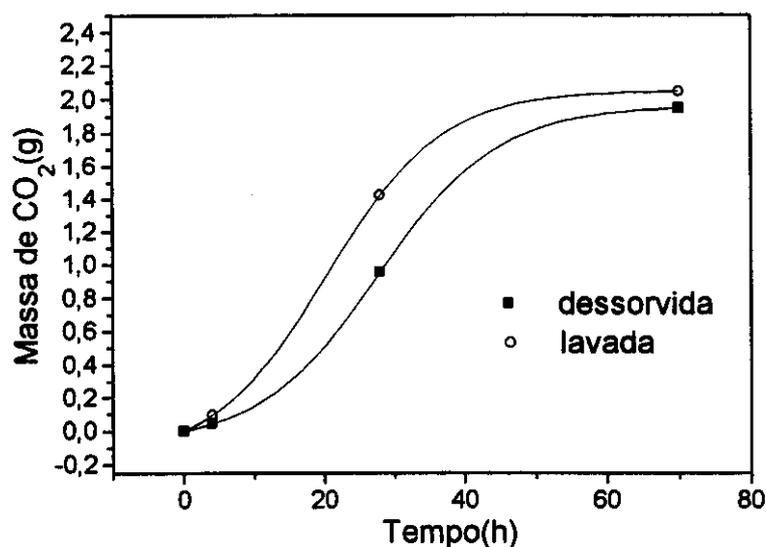


Figura 7: Massas de CO₂ produzidas em função do tempo na fermentação de 0,46 g de células de fermento de pão a)lavadas em água b)dessorvidas, por agitação mecânica, de 1 g de crisotila. 15 mL de Meio de Fermentação: D-glucose 200g/L, uréia 3g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. T= 30°C. Experimento único.

4.3 Adesão de células de fermento de pão em crisotila lixiviada

4.3.1 Isoterma de adesão

Quando a crisotila é lixiviada há um aumento da área superficial em relação a crisotila ativada, o que poderia possibilitar uma maior adesão de células. Realizou-se um experimento de adesão com as células de fermento de pão, a fim de compararmos com os dados de crisotila ativada.

A Figura 8 mostra a isoterma obtida. Verificou-se a relação 0,1 g células secas aderidas por grama de suporte, valor inferior ao obtido com as células aderidas em crisotila ativada para o mesmo tempo de contato.

4.3.2 Crescimento das células

A inoculação de fermento de pão em Meio de Crescimento contendo crisotila lixiviada foi realizada a fim de observarmos se o crescimento das células é afetado pela presença do suporte como observado para a crisotila natural.

Obteve-se 0,086 g células secas /g de crisotila lixiviada após 20 horas de experimento, contra 11 gramas por litro de solução com células livres.

Esta diminuição da capacidade de adesão das células provocou o abandono deste material para uso como suporte de células na produção de etanol.

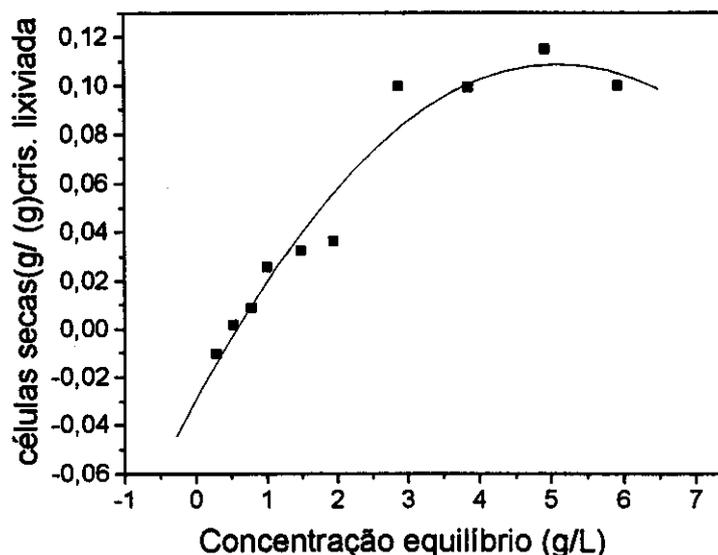


Figura 8: Adesão de fermento de pão em 0,3 g de crisotila lixiviada em 100mL de água, mantidos em banho termostático a 30° C por 2 horas. Experimento único.

4.4 Dessorção de células de fermento de pão aderidas em crisotila

O experimento de dessorção das células aderidas em crisotila foi realizado para observar a força de aderência dessas células ao suporte, quando submetidas a agitação magnética ou a um campo de ultra-som. O resultado encontra-se na TABELA IV.

TABELA IV: Células dessorvidas de sistemas com células adsorvidas a) meio aquoso por 1 hora b) em Meio de Crescimento: D-glucose 10g/L, peptona 5 g/L, extrato de malte 3g/L e extrato de levedura 3g/L por 19,5 e 44 horas. Os sistemas foram submetidos por 30 minutos a agitação magnética ou a um campo de ultra-som de 25Khz. Experimento único e em duplicatas.

Mecanismo dessorção/ Meio	Perda de massa % por agitação mecânica	Perda de massa % por ultra- som
em meio aquoso	-	18,8±7,9
Meio crescimento 19,5 horas	54,4 ± 4,5	52,1
Meio crescimento 44 horas	33,7	53,3 ± 0,31

Observou-se que a perda de massa foi maior para os sistemas em que as células permaneceram em Meio de Crescimento, do que em meio aquoso.

4.5 Imobilização de células em montmorilonita K10

4.5.1 Atividade das células de fermento de pão

A montmorilonita K 10 foi escolhida por também ser, como a crisotila, um material inorgânico com grande área superficial e ser bastante estudada.

A massa de CO₂ produzida em função do tempo é mostrada na Figura 9. Foi possível observar que para a fermentação das células de fermento de pão não há diferença significativa na produção final de CO₂ entre os sistemas imobilizado e livre. O tempo reacional para a fermentação atingir uma conversão máxima (maior valor de CO₂) foi igual ou menor para o sistema com células livres em relação ao sistema com células imobilizadas. A conversão máxima obtida, 1,5 g de massa de CO₂, foi notada em meio de fermentação com concentração de 30 % de glicose.

4.5.2 Atividade de células suportadas em montmorilonita K10 modificada

Quando a montmorilonita foi colocada em solução contendo cloreto de magnésio, os cátions interlamelares foram trocados por magnésio. O experimento foi realizado a fim de observar a influência do magnésio na atividade das células de *Saccharomyces* sp. suportadas em montmorilonita.

Observa-se pela Figura 10 que a produção de CO₂ em função do tempo é a mesma para os sistemas com células imobilizadas em montmorilonita modificada ou em montmorilonita lavada com água, quando colocados em Meio de Fermentação com MgSO₄. O mesmo valor de CO₂ é observado para dois sistemas quando colocados em Meio de Fermentação sem a presença de magnésio, indicando que a presença de magnésio livre, nestas proporções, não interfere na fermentação.

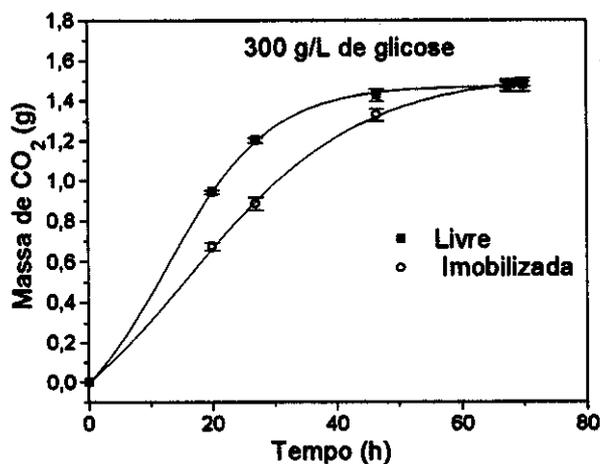
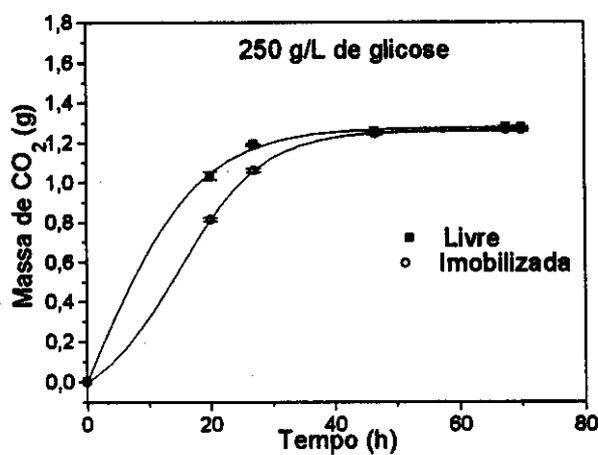
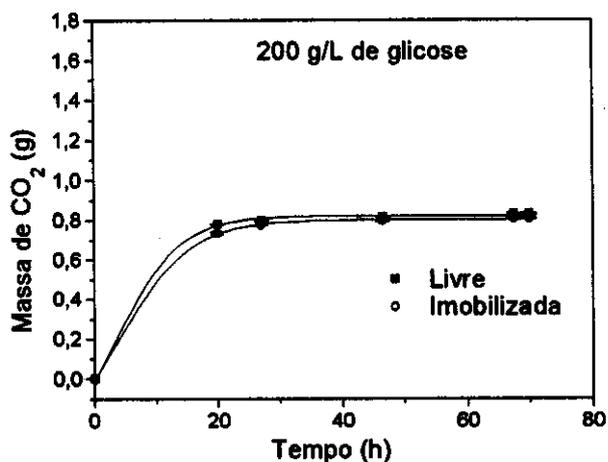


Figura 9: Massas médias de CO₂ (g) produzidas em função do tempo de fermentação. 0,6 g de células de fermento de pão livres ou imobilizadas em 1 g de montmorilonita. 15 mL de Meio de Fermentação: D-glicose com concentrações de 300g/L, 250g/L, 200g/L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. T= 30 °C. Média de triplicatas de amostra.

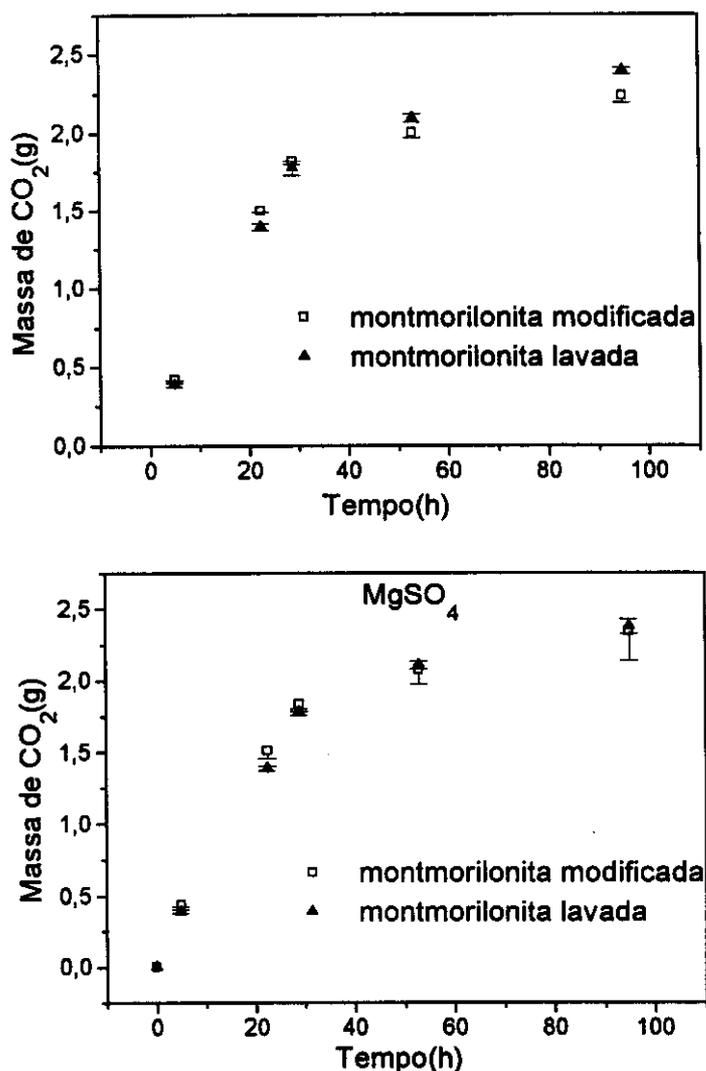


Figura 10: Massas médias de CO₂ (g) produzidas em função do tempo de fermentação. 0,6 g de células imobilizadas em 1 g de montmorilonita modificada ou montmorilonita lavada com água destilada. 15 mL de Meio de Fermentação: D-glucose 300g/L, uréia 3g/L e MgSO₄ 0,75 g/L ou sem MgSO₄ com pH 4,5. T=30°C. Média de triplicatas de amostra.

4.6 Comparação da atividade de células de fermento de pão imobilizadas em crisotila e montmorilonita

Este experimento foi realizado com a finalidade de observar a diferença na variação de CO₂ em função do tempo para as células suportadas em crisotila ou montmorilonita comparadas com células livres em suspensão, inoculadas em Meio de Fermentação. Este experimento é referente a parte experimental (3.10.1 e 3.11.3). A Figura 11 mostra as curvas de variação de CO₂ para os sistemas estudados em meio nutritivo com 30% de glicose.

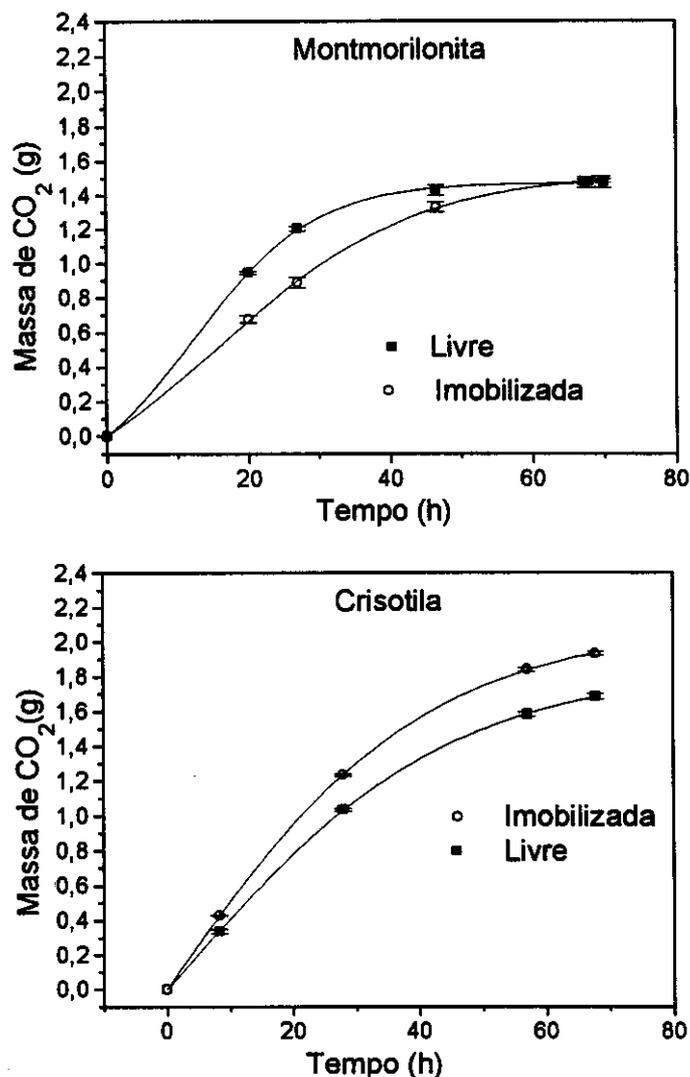


Figura 11: Massas médias de CO₂ (g) produzidas em função do tempo de fermentação. 0.6 g de células de fermento de pão livres ou imobilizadas em 1 g de Crisotila e em 1 g de Montmorilonita. 15 mL de Meio de fermentação: D-glucose 300 g/L, uréia 3g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. T =30°C. Média de triplicatas de amostra.

A produtividade foi maior para as células imobilizadas em crisotila, atingindo um valor de 2,0 g de rendimento de CO₂, enquanto para montmorilonita o resultado foi de 1,5 g. Um valor maior na velocidade inicial foi obtido para as células aderidas à crisotila em relação às células suspensas. Entretanto, as curvas obtidas com o suporte montmorilonita indicaram que o tempo reacional para a fermentação atingir uma conversão máxima foi igual ou menor para o sistema com células livres.

4.7 Seleção de linhagens de *Saccharomyces* sp.

Em processos de produção de etanol a produtividade pode ser aumentada utilizando-se linhagens puras de microrganismo. Estes experimentos foram realizados com 7 linhagens de *Saccharomyces* sp. e fermento de pão, com células imobilizadas em crisotila ou suspensas, a fim de selecionar as linhagens com melhores resultados. Em processos contínuos de produção de etanol, o tempo em que o meio de cultura permanece no interior do reator é pequeno, por isso deseja-se utilizar linhagens que apresentem uma maior velocidade inicial para a conversão ser mais rápida. Além disso, uma linhagem que apresente um valor alto de conversão, permite a diminuição dos custos de produção, pois o açúcar disponível é quase todo convertido em produto.

A massa de CO₂ produzida em função do tempo permite determinar as variáveis para a escolha das melhores linhagens. As variáveis determinadas foram: o tempo reacional, a porcentagem máxima de conversão e a diferença em atividade entre os sistemas com células livres e imobilizadas sobre fibras de crisotila. As Figuras 12, 13 e 14 apresentam as curvas de variação de CO₂ em função do tempo. O valor máximo teórico para a produção de etanol para estes sistemas é de 2,2 g.

As 8 cepas testadas apresentaram um rendimento maior na produção de CO₂ para sistemas com células imobilizadas, comparado com o sistema com células livres. A maior diferença foi observada em Meio de Fermentação contendo 30 % de glicose. A cepa FEA 01 apresentou um rendimento de 25% maior para o sistema imobilizado. A conversão máxima foi atingida também em menor tempo para o sistema com células imobilizadas. Os resultados encontram-se na Tabela V. As porcentagens de conversão foram calculadas a partir de um máximo teórico de 2,2g de CO₂ para 15 mL de Meio de Fermentação com 300g/L de glicose, a partir da reação biológica, que produz 2 moles de etanol e 2 moles de CO₂ para cada mol de glicose.⁴ A velocidade inicial foi obtida pela inclinação da curvas obtidas pelos gráficos da massa CO₂ versus o tempo.

Observou-se uma maior velocidade inicial para a cepa CCT 0762 e maior valor de conversão máxima (%) para a cepa FEA 01. As cepas que apresentaram uma maior velocidade inicial apresentaram um baixo valor de máxima conversão e

vice-versa.

TABELA V: Resultados da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces* sp. em sistemas com 0,6 g de células imobilizadas em 1 g de crisotila. 15 mL de Meio de Fermentação: D-glucose 300g/L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. T = 30°C. Experimentos únicos ou em duplicatas. A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa.

Cepa	Velocidade inicial (gCO ₂ /h)	Máxima conversão(%)	CO ₂ (%) células imobilizadas/livres	Etanol (%) células imobilizadas/livres
F pão	0,05	87,7±0,1	12,7±0,3	15,7
CCT0762	0,13	80,4±0,1	0,5±0,5	13,3
CCT0290	0,10	81,8±0,1	12,1±0,5	15,4
CCT3174	0,09	96,3±0,2	18,5±0,2	19,6
CCT0472	0,08	96,3±0,1	-	--
CCT0294	0,08	91,8±0,1	16,2±0,3	18,4
FEA 01	0,08	97,3±0,3	25,6±0,9	18,8
CCT0292	0,07	96,0±0,2	12,3±0,5	20,6

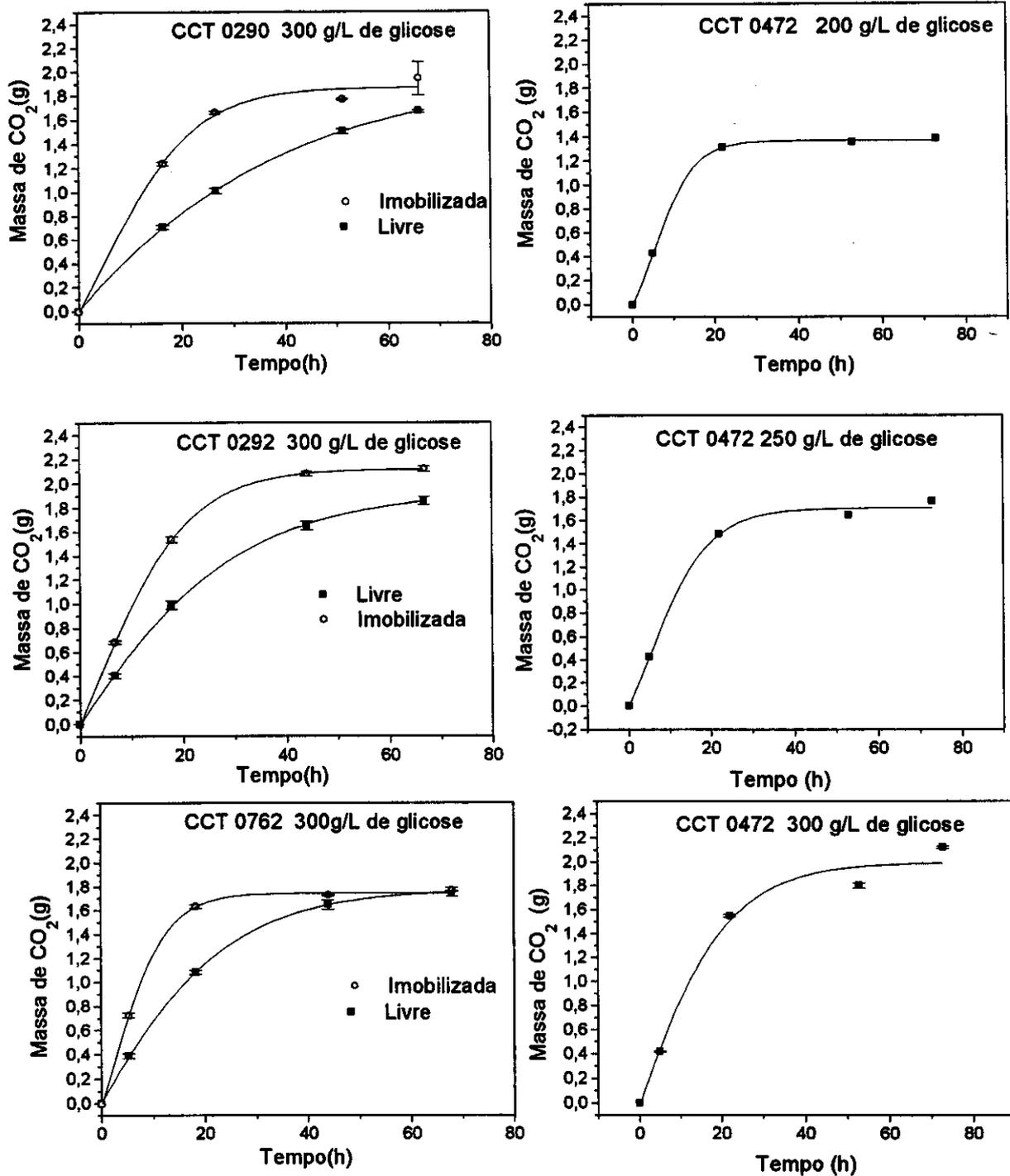


Figura 12: Massas médias de CO₂ (g) produzidas em função do tempo de fermentação. Cepas CCT 0290, CCT 0292, CCT 0762 e CCT 0472. Sistemas com 0,6 g de células livres ou imobilizadas em 1g de crisotila. 15 mL de Meio de Fermentação: D-glucose com concentrações de 300g/L, 250g/L, 200g/L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. T=30°C. As curvas para a cepa CCT 0472 referem-se aos sistemas com células imobilizadas. Média de triplicatas de amostra.

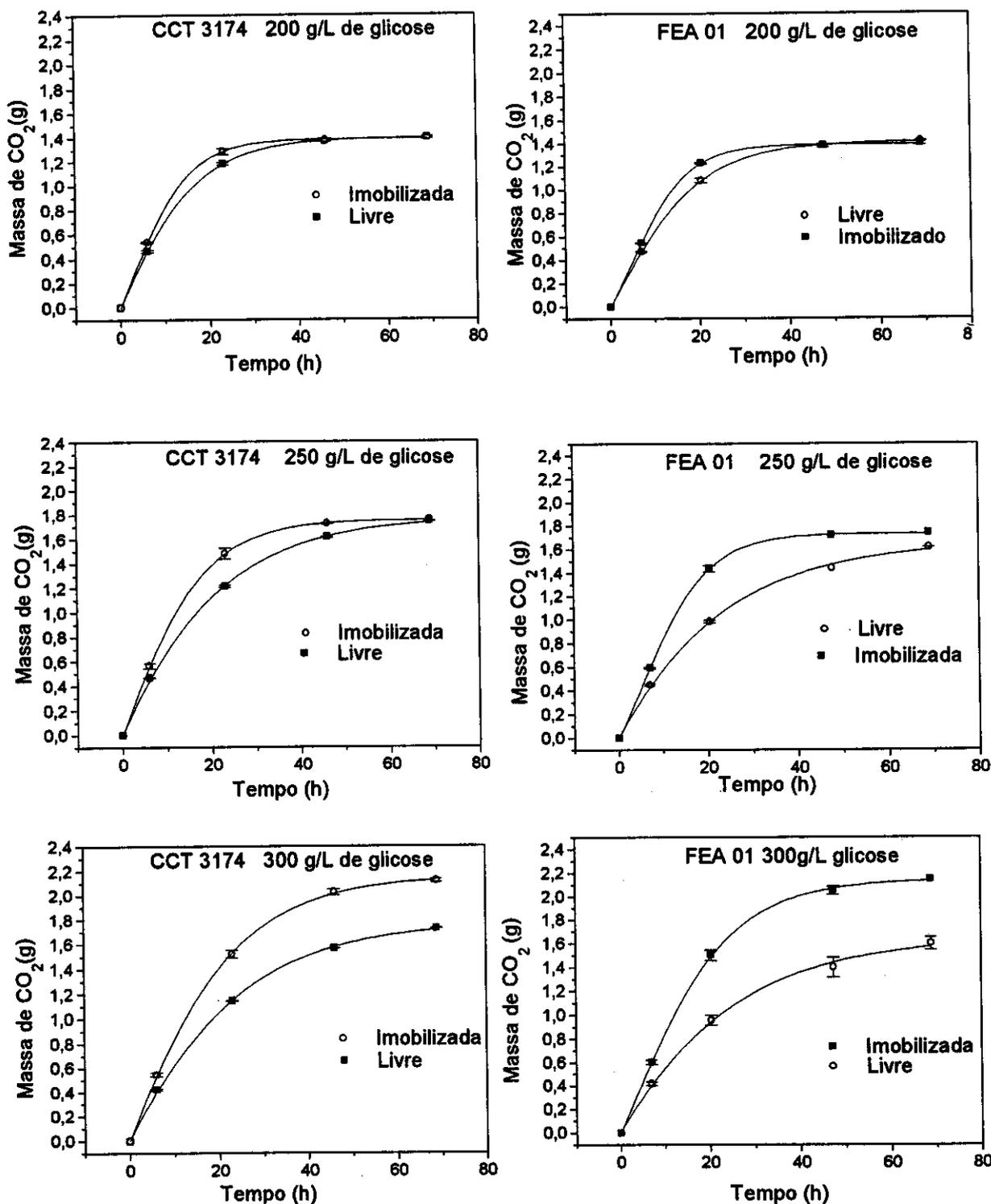


Figura 13: Massas médias de CO₂ (g) produzidas em função do tempo de fermentação. Cepas CCT 3174 e FEA 01. Sistemas com 0,6 g de células livres ou imobilizadas em 1g de crisotila. 15 mL de Meio de Fermentação: D-glucose com concentrações de 300g/L, 250g/L, 200g/L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. T= 30°C. Média de triplicatas de amostra.

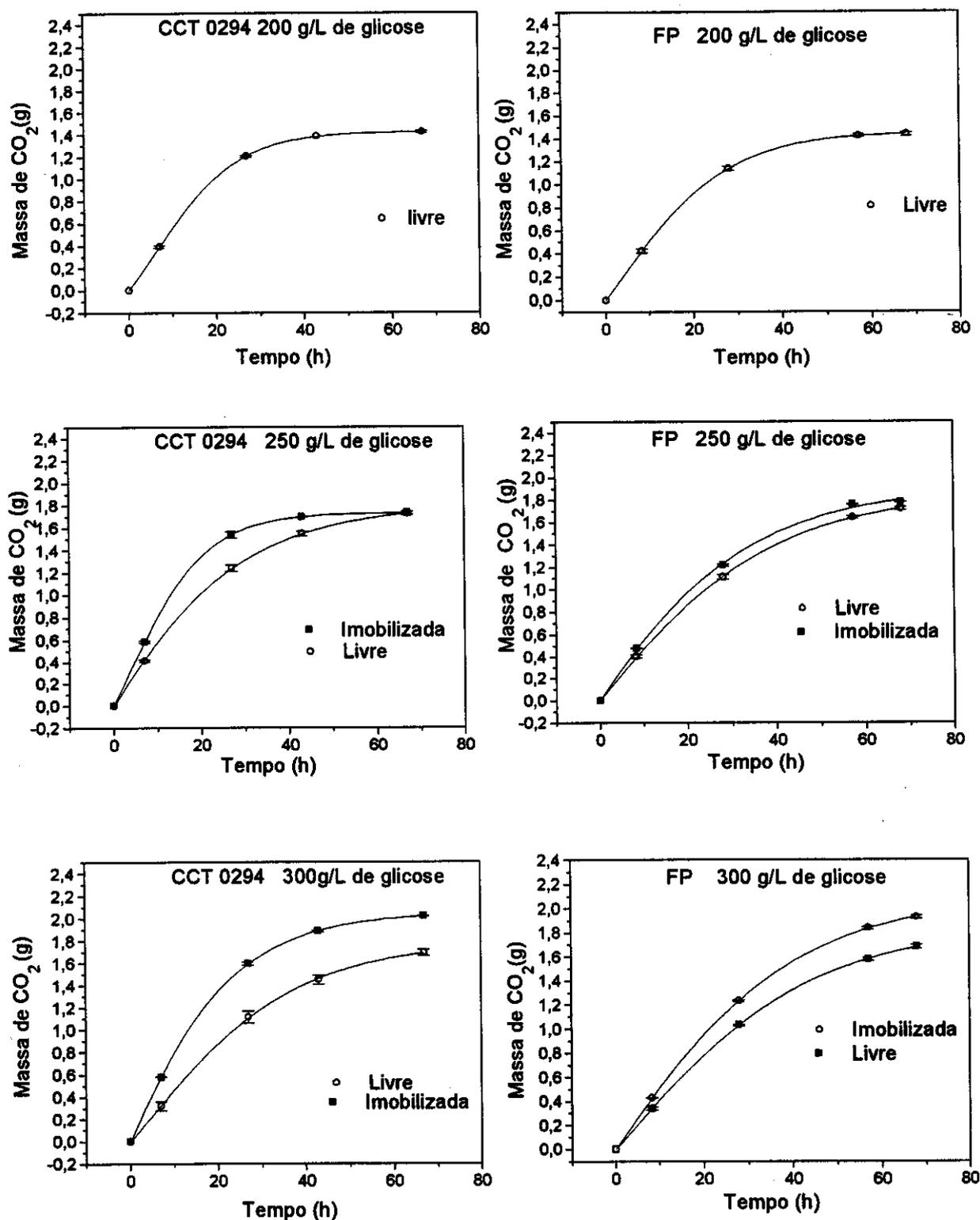


Figura 14: Massas médias de CO₂ (g) produzidas em função do tempo de fermentação. Cepa CCT 0294 e fermento de pão (FP). Sistemas com 0,6 g de células livres ou imobilizadas em 1g de crisotila. 15 mL de Meio de Fermentação: D-glicose com concentrações de 300g/L, 250g/L, 200g/L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. T= 30 °C. Média de triplicatas de amostra.

4.8 Fermentação alcoólica em processo contínuo

As linhagens escolhidas nos experimentos em processo de batelada foram utilizadas em montagem de reatores em processo contínuo. Os reatores foram estruturados com 120 g de crisotila, 850 g de areia e células e foram alimentados com uma solução com 20% de açúcar, sacarose e/ou melão, com pH 5.

O reator denominado Baby, empacotado sem um prévio crescimento celular em crisotila, não produziu CO₂, nem odor alcoólico portanto foi desativado. Com os reatores estruturados com as células já crescidas em crisotila observou-se já no início da passagem do Meio Misto de Fermentação uma produção intensa de CO₂, que continuou após a passagem do Meio de Fermentação, possibilitando obtenção de dados diários. Alguns valores encontram-se na tabela VI.

Tabela VI: Dados dos reatores contínuos de leito fixo montados com *Saccharomyces* sp. /crisotila. 120 g de crisotila, 850 g de areia, solução de açúcar a 20%. pH 5.

Reator/cepa	Volume útil (mL)	Prod. média inicial (g/L.h)	Prod. média final (g/L.h)	Dias de operação
Júnior CCT 0762	371	20	9,6	49
Magali FEA 01	370	20	13,4	45
Margarida FEA 01	371	20	16,0	50
Donald CCT 0762	400	16	15,0	31

A produtividade final foi abaixo dos valores iniciais. Um problema que afetou a produtividade foi a fragmentação da estrutura do recheio, devido a variações na vazão de alimentação e diferença de pressão.

4.9 Determinação da Vazão ótima para a melhor produtividade

Obteve-se a curva de produtividade em função da vazão específica para o cálculo da vazão ótima, que deve propiciar a produtividade máxima. A produtividade foi obtida através da quantidade de etanol produzido pelo tempo de residência e a vazão específica através de variações na vazão do meio de alimentação. O resultado encontra-se Figura 15.

Para o reator Júnior e Magali a produtividade máxima foi de 28g/L.h e 25 g/L.h, em uma vazão específica ótima de 0,27 h⁻¹ e 0,31 h⁻¹ respectivamente. Este procedimento de determinação da vazão ótima provocou uma diminuição de produtividade ao longo do tempo devido a possíveis choques metabólicos nos

microrganismos, decorrentes das variações na concentração dos nutrientes presentes no meio de alimentação. Para o reator Margarida, nos 10 primeiros dias de operação, a vazão específica ótima obtida foi de $0,43 \text{ h}^{-1}$, alcançando a produtividade de 25 g/L.h . O reator Donald foi mantido desde o início na vazão otimizada de $0,48 \text{ h}^{-1}$.

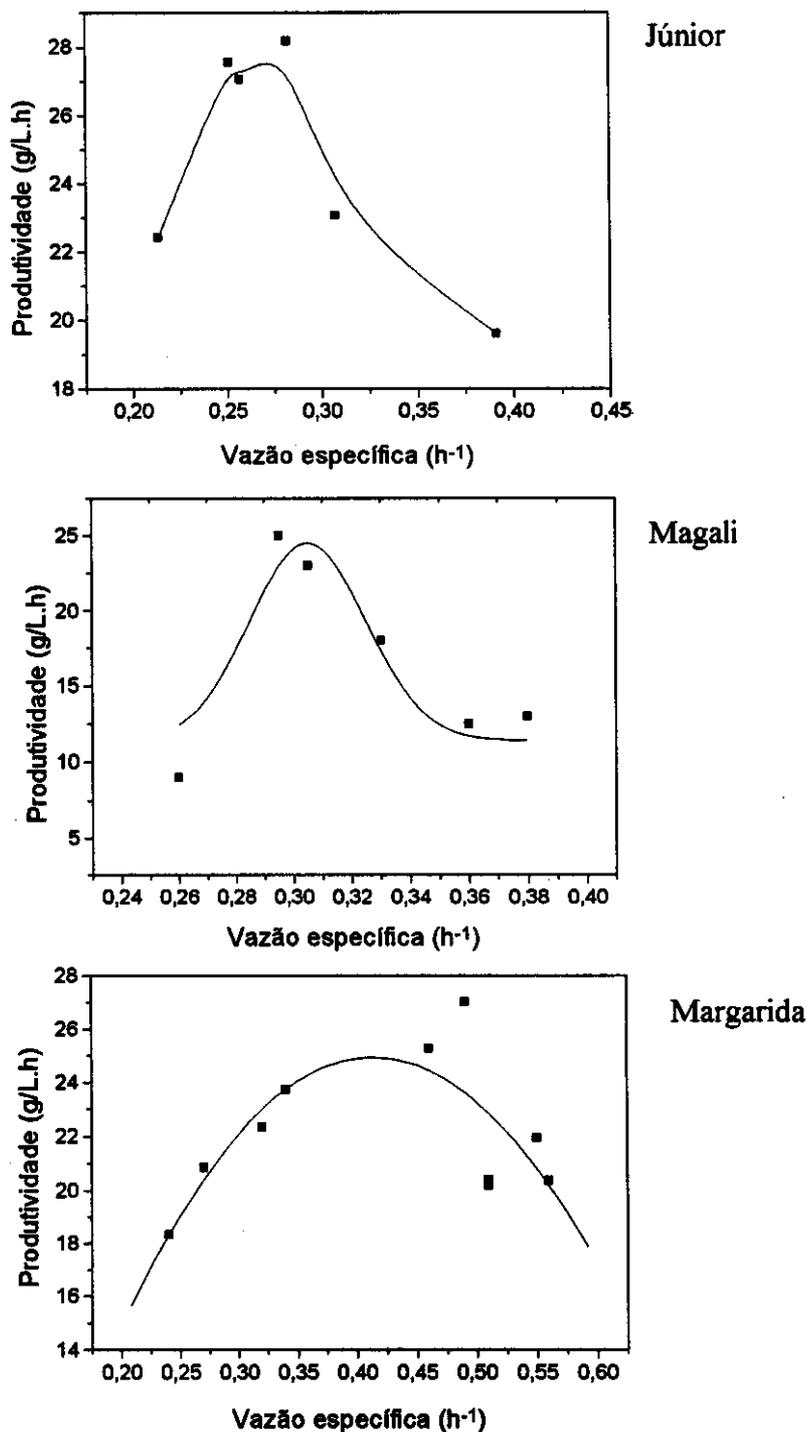


Figura 15: Produtividade em função da vazão específica para os reatores Júnior, cepa CCT 0762, Magali, cepa FEA 01 e Margarida, cepa FEA 01, estruturados com 120 g de crisotila e 850 g de areia, utilizando-se Meio de Fermentação para os reatores Júnior e Magali e Meio de Fermentação com melão para o reator Margarida. pH 4,5. Experimento único.

4.10 Influência do meio de alimentação nos reatores Júnior e Margarida

Os reatores Júnior e Magali foram alimentados inicialmente com solução de sacarose a 20% e no final de 30 dias trocou-se gradualmente para solução de melaço, que é a alimentação utilizada nos processos de fermentação em escala industrial. A Figura 16 mostra a porcentagem de etanol obtida em cada dia de operação.

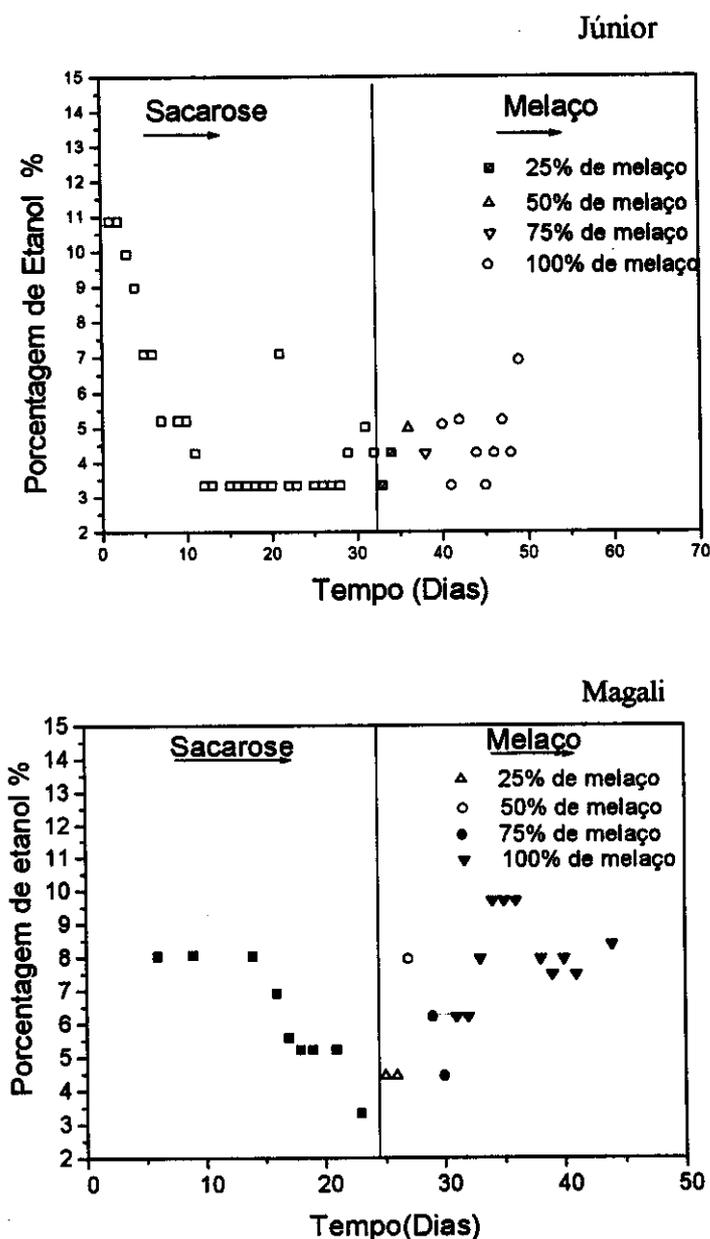


Figura 16: Porcentagem de etanol em função do tempo para o reator Júnior com a cepa CCT 0762 e Magali, cepa FEA 01, alimentados inicialmente com Meio de Fermentação: sacarose 200g/L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5 e a troca gradual para uma solução de melaço com 20 % de açúcar: melaço 330g/ L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. Experimento com medida única.

Nos 30 primeiros dias de operação foi possível notar um decréscimo de produtividade com o tempo. A troca gradual do meio para uma solução de melaço com 20% de açúcar possibilitou uma recuperação da capacidade fermentativa do reator, pois a solução com melaço é mais rica em nutrientes sendo mais apropriada para a produção de etanol. Essa alimentação foi mantida nos reatores montados posteriormente.

4.11 Estabilidade operacional dos reatores

A estabilidade operacional dos reatores depende de valores obtidos para a quantidade de produto formado por dia de operação. Essa medida foi útil para verificar a regularidade dos dados operacionais.

A Figura 17 apresenta a produtividade do reator Margarida e Donald em função do tempo de operação. Para o reator Margarida a produtividade se manteve alta no início do experimento com uma ligeira diminuição a partir do vigésimo dia e estável até o final da operação. O valor inicial ficou em torno de 20g/L (após o estudo de vazão). A produtividade final se manteve em torno de 16 g/L por 50 dias. O reator Donald apresentou uma produtividade média inicial de 16g/L.h e uma diminuição a partir do vigésimo dia.

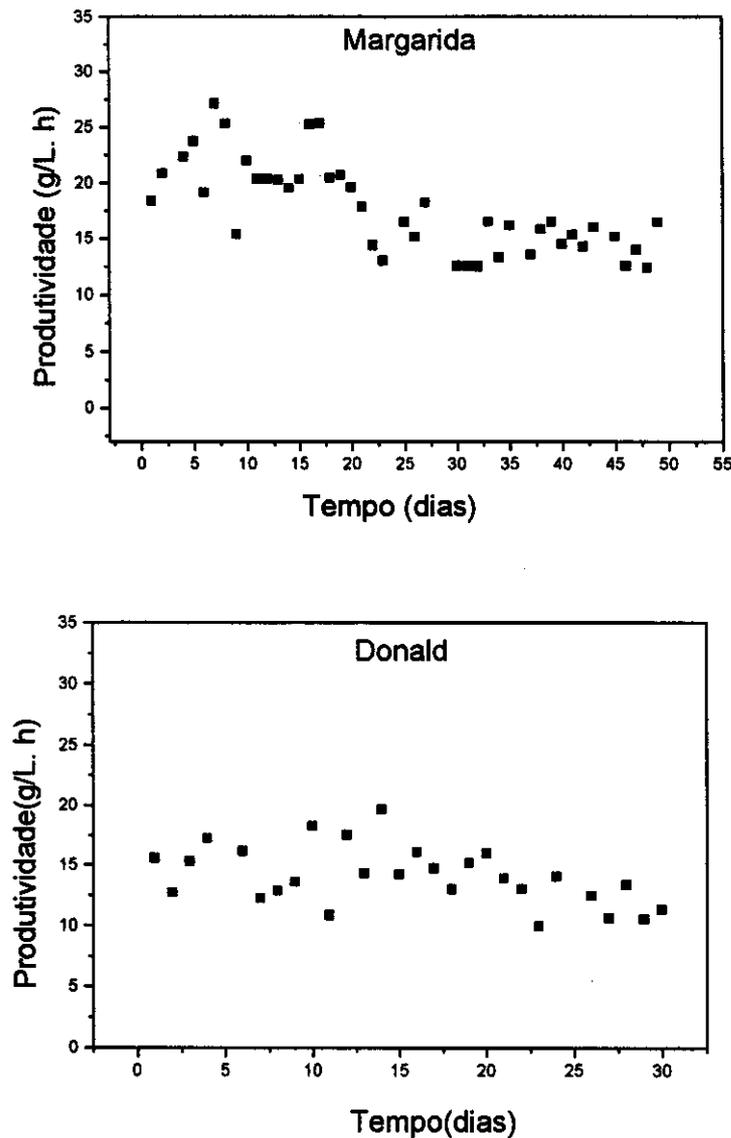


Figura 17: Produtividade em função do tempo de operação para o reator Margarida, cepa da FEA 01 e Donald, cepa CCT 0762, com as células suportadas em 120 g de crisotila, alimentado com melão 330g/ L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH 4,5. Experimento com medida única.

4.12 Micrografias de células de *Saccharomyces sp.*

As Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura mostram células de *Saccharomyces sp.* suportadas em crisotila e em crisotila lixiviada.

A figura 18 mostra células da cepa CCT 3174 em crisotila em Meio de Fermentação. Na figura 18a é constatado um enovelamento das células por fibrilas de crisotila. A parede celular está recoberta por fibras longas de crisotila. Isto pode estabilizar a interação célula/suporte. Na figura 18b, que se refere à mesma amostra, é novamente observado que as células estão aderidas ao suporte. Não se

observa a agregação de células. A figura 18c, com a mesma amostra, mostra que as células preferem aderir nas fibrilas de crisotila. A fibra de crisotila com maior diâmetro não apresenta células aderidas.

A figura 19 se refere à amostra preparada com células de fermento de pão em massa úmida, em crisotila lixiviada por 72 horas. Esta amostra permaneceu sob agitação por 1 hora e foi filtrada e lavada com água. A lavagem fez com que as células se separassem do suporte. A micrografia não mostrou a presença de células no suporte, levando a deduzir que a diminuição do magnésio no suporte, inibe a aderência ou enfraquece a interação célula/ suporte. O mesmo resultado foi obtido para a amostra em meio aquoso.

A figura 20 mostra células de fermento de pão liofilizado em crisotila triturada e lixiviada por 168 horas. A amostra permaneceu sob agitação branda por 1 hora, a seguir foi filtrada e não foi lavada com água, evitando perda de células (aderidas ou não). Assim, observa-se, nesta figura, uma mistura simples das células e do suporte. É notado um aglomerado de células. Neste caso, não se observa a presença de enovelamento da célula pelo suporte, como o observado para a crisotila ativada. Não é possível afirmar que ocorre adesão célula/suporte, embora se observem pequenas partículas de suporte aderidos à parede celular.

A figura 21 refere-se a células de fermento de pão liofilizado em crisotila triturada e lixiviada, permanecendo em Meio de Crescimento por 20 horas. A seguir foi filtrada, sem perda de células (aderidas ou não). Como na figura 20, há uma mistura simples de células com o suporte, com pequenas partículas de crisotila lixiviada aderidas às células.

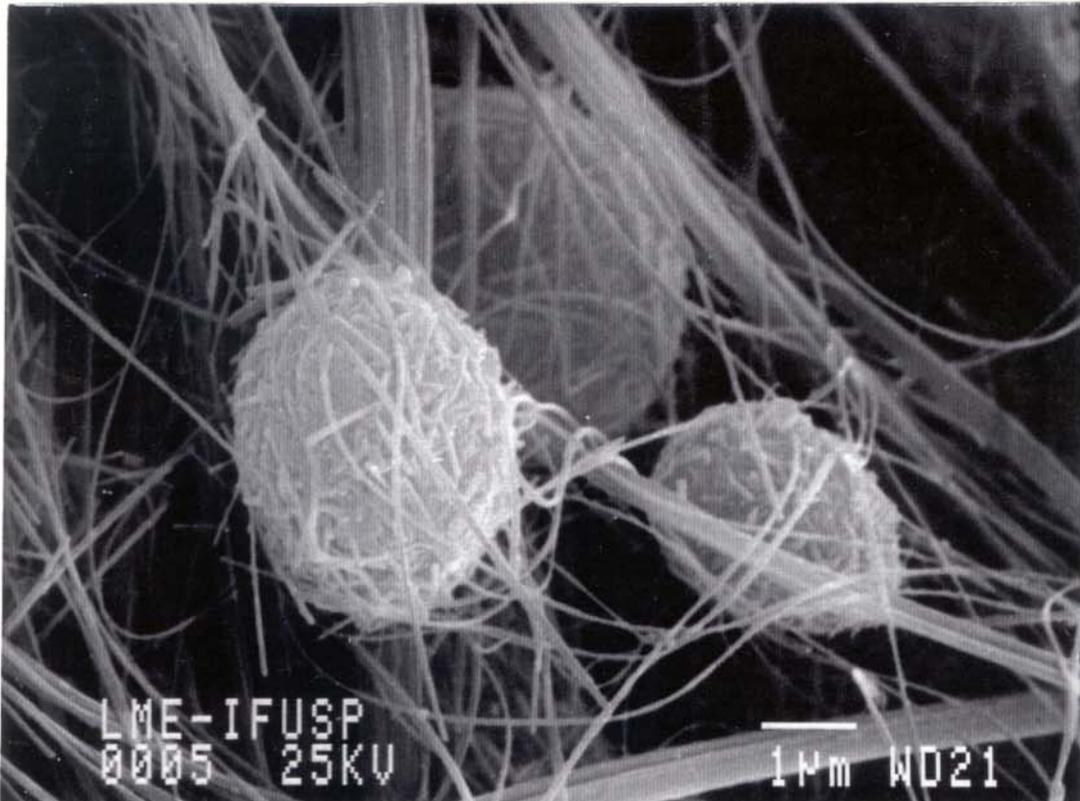


Figura 18 a): Micrografia eletrônica de varredura de células da cepa CCT 3174 immobilizadas em crisotila. Amostra preparada colocando-se as células já crescidas em contato com a crisotila, por 70 horas, em Meio de Fermentação. $T=30^{\circ}\text{C}$. Aumento de 12000 vezes. Observe o enovelamento das células: a parede celular está recoberta por fibrilas de crisotila.



Figura 18 b): Aumento de 2500 vezes. Observe a adesão preferencial de células em fibras de crisotila.

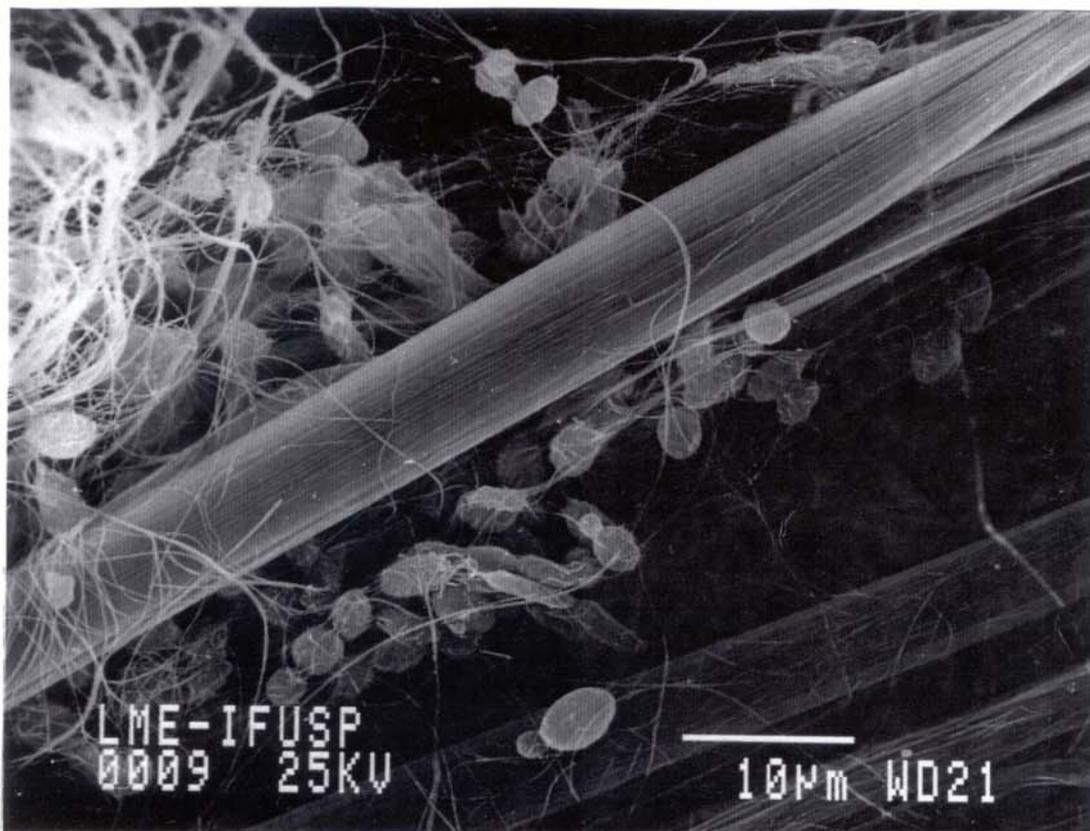


Figura 18c): Aumento de 2200 vezes. Observe a adesão preferencial das células às fibras menores de crisotila.

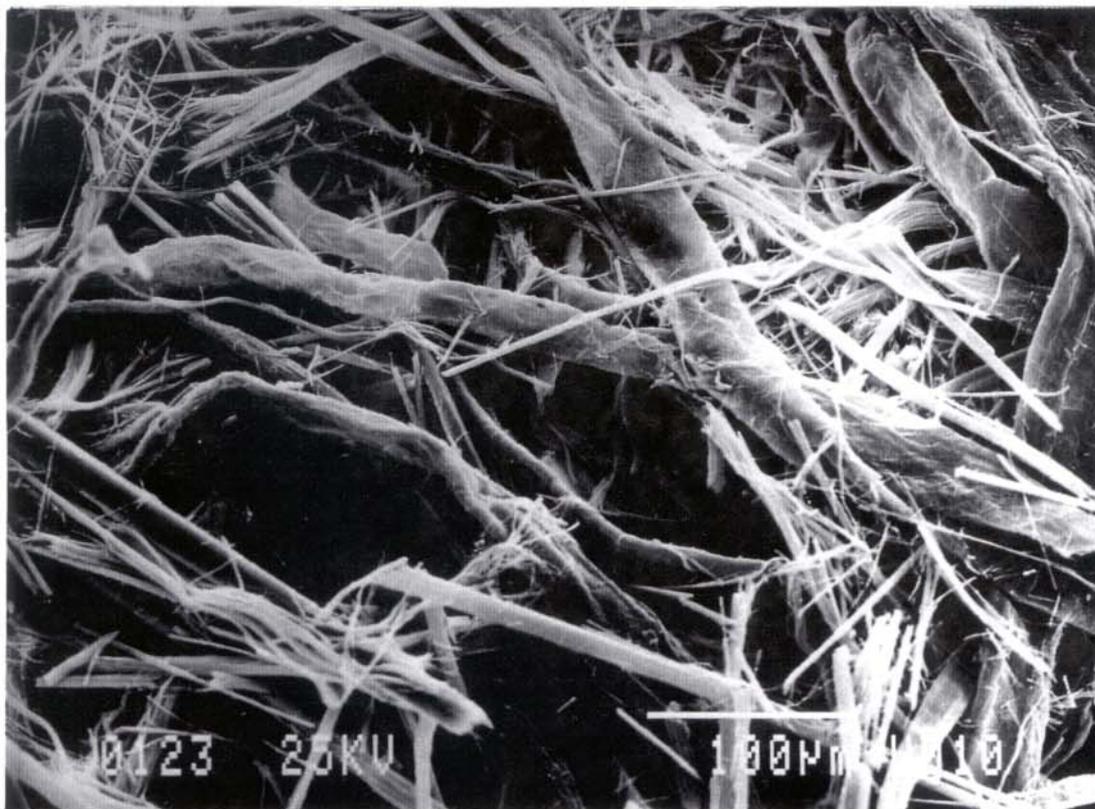


Figura 19: Micrografia eletrônica de varredura de uma amostra preparada com inóculo de células de fermento de pão e crisotila lixiviada, que permaneceu por 20 horas em Meio de Crescimento e a seguir foi filtrada e lavada. Aumento de 280 vezes. Não se observa a presença de células aderidas ao suporte.

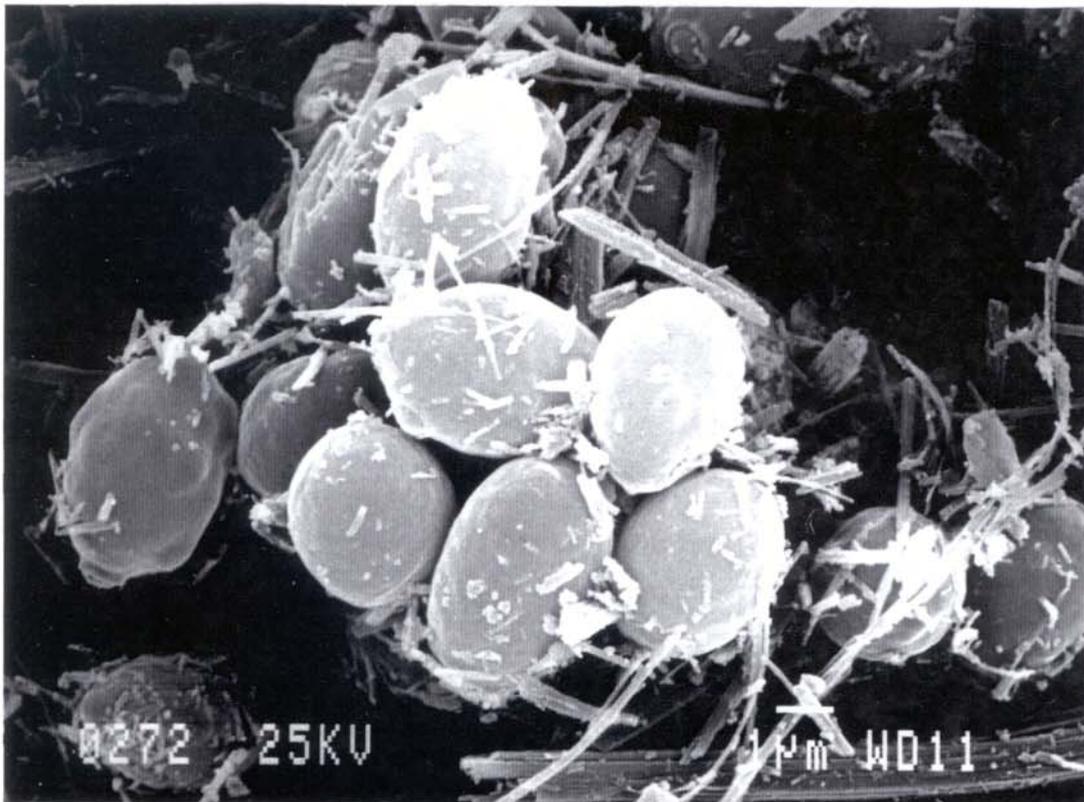


Figura 20: Micrografia eletrônica de varredura de uma amostra preparada com células de fermento de pão immobilizadas em crisotila triturada e lixiviada. A amostra permaneceu por 1 hora em meio aquoso, sendo filtrada de modo não haver perda de células. Aumento de 7000 vezes. Nesta mistura de células com o suporte, as células se apresentam agregadas.

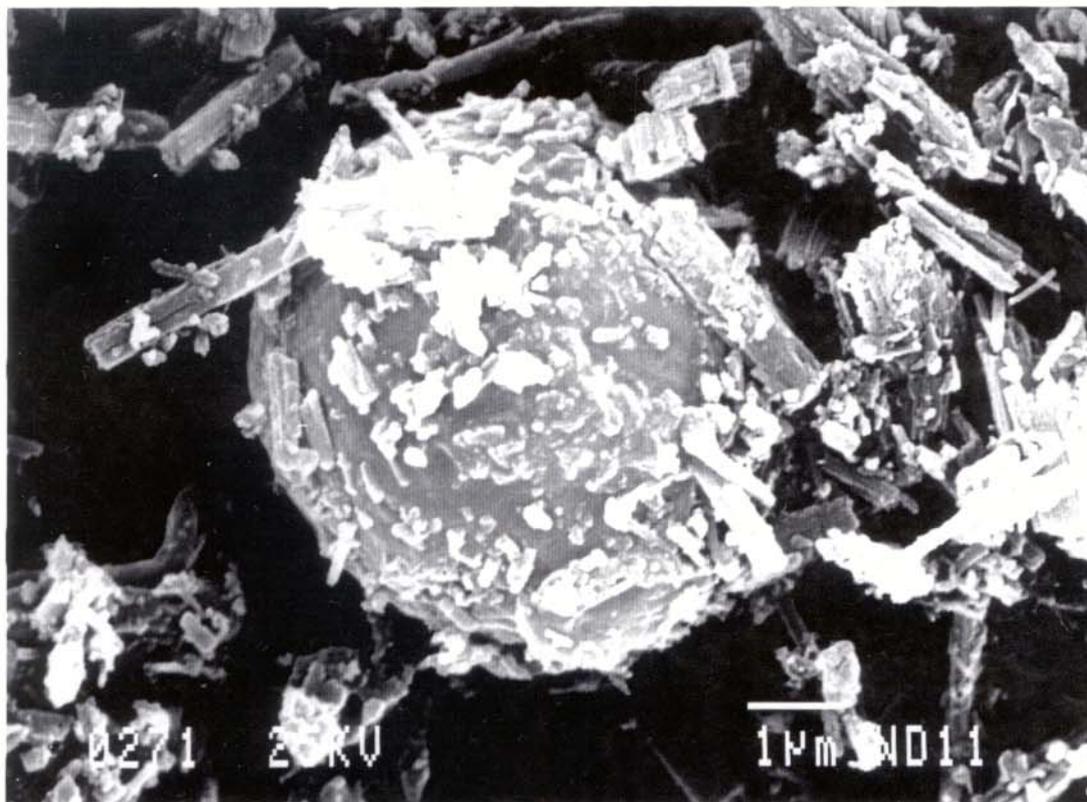


Figura 21: Micrografia eletrônica de varredura de células de fermento de pão immobilizadas em crisotila triturada e lixiviada. A amostra permaneceu por 20 horas em Meio de Crescimento, foi filtrada sem a perda de células. Aumento de 14000 vezes. A amostra refere-se a uma mistura simples de células com o suporte. Observe a presença de pequenos pedaços de crisotila aderidos à parede celular.

5. Discussão.

5.1 *Crisotila como suporte de células*

Em sistemas contínuos o processo é autoregulatório, isto é, deve existir um equilíbrio dinâmico entre o crescimento das células e a quantidade de células que saem do reator. A retenção de células no suporte permite a otimização dos recheios dos reatores. O valor da quantidade de células aderidas ao suporte, determinado através da isoterma de adesão na Figura 5, mostrou uma relação de 0,5 g células/suporte para a crisotila ativada. Enquanto para crisotila lixiviada, a relação célula/suporte observada na Figura 8 foi de 0,1 g de células /g do suporte, ou seja, menor do que o obtido para a crisotila ativada. Em literatura,⁵⁹ os valores encontrados foram de 0,38; 0,24; 0,17 e 0,52 gramas de células secas por grama dos respectivos suportes: “suporte A”, “suporte B”, círculos de cerâmica Rasching e cloreto de polivinila. Esses dados mostraram que a crisotila apresenta altos valores de adesão de células, diferentemente da crisotila lixiviada. Parizzoto,³⁰ em 1995, observou por microscopia de força atômica da crisotila lixiviada com ácido clorídrico, que o diâmetro da crisotila ficou doze vezes maior e a área superficial, obtida por BET, apresentou um aumento de vinte vezes comparado com a crisotila natural. Assim, considerando os valores da área superficial, a crisotila lixiviada poderia apresentar uma maior porcentagem de ocupação da superfície por células. Contudo, observou-se uma diminuição da capacidade de adesão das células, com relação aos valores encontrados em literatura.

A sílica hidroxilada apresenta caráter negativo em região acima de pH 2.⁶⁰ Os efeitos da trituração e lixiviamento da crisotila foram observados por Suquet⁴⁸ em 1989. Através de medidas de SEM, TEM e análise no infravermelho, o autor constatou que o lixiviamento com ácido clorídrico 6 M transformou a crisotila em sílica hidratada não cristalina, porosa e facilmente quebrável. Esse resultado está de acordo com a aparência das fibras de crisotila obtidas neste trabalho após o lixiviamento. Suquet observou também a solubilização da camada de brucita ($Mg(OH)_2$) e transformação de Si-O em Si-OH.

Mozes e colaboradores⁴¹ em 1986 caracterizaram a superfície de

Saccharomyces cerevisiae e observaram que o microrganismo apresenta caráter hidrofílico, com carga negativa entre pH 3,5 e 7. Esse caráter negativo foi atribuído por Amory e Rouxhet,⁶¹ em 1988, aos íons fosfato, que estão presentes em maior quantidade nos sítios superficiais das células. Esses resultados estão de acordo com Zuchetti,³⁴ que propôs que a ligação das células de *Saccharomyces cerevisiae* com a crisotila é governada pela interação química entre esses grupos fosfatos superficiais das células e grupo magnésio da crisotila.

Assim interpretou-se essa diminuição de aderência das células em crisotila lixiviada à perda da camada de brucita ($Mg_2(OH)$) como constatado por Suquet e de acordo com Zuchetti é o responsável pela ligação ao grupo fosfato das células. Outro fator, que pode ter provocado a diminuição das células no suporte, pode ser de origem eletrostática, pois a sílica apresenta potencial zeta negativo e a as células o mesmo caráter negativo. Esta característica pode ocasionar a repulsão entre as células e o suporte. Entretanto, a quantidade de 0,1 g de células aderidas em 1 g de crisotila pode ser devido a pequena quantidade de magnésio presente nas fibras do material não completamente lixiviado, como foi constatado por absorção atômica.

5.2 Redução da multiplicação celular em meio nutritivo contendo suporte

A influência do suporte foi testada no crescimento das células em meio nutritivo contendo crisotila ativada e lixiviada. Observou-se uma diminuição da taxa de crescimento para os dois casos, comparado com o crescimento das células em suspensão. Para os sistemas contendo crisotila ativada foi notado um aumento da evolução de CO_2 (produtividade), mesmo tendo apresentado uma densidade menor de células, em relação ao sistemas com células em suspensão.

Evidências experimentais do metabolismo das células imobilizadas em fermentação de glicose sugerem que o processo e/ ou estado de imobilização do microrganismo afeta a bioquímica do crescimento celular e do processo fermentativo das células de *Saccharomyces cerevisiae*. As condições de crescimento ótimo, os rendimento dos produtos e o tempo da fase lag podem ser diferentes dos observados para as células suspensas.⁵⁸

A diminuição da multiplicação celular, também foi observada no trabalho de Doran e Bailey utilizando sistemas com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em vidro recoberto por gelatina. Foi notado um aumento de 40-50% na taxa de produção específica de etanol, mas a taxa de crescimento específico foi reduzida em 45% e os rendimentos da biomassa foram 1/3 do valor em relação as células suspensas.⁵⁸ Os autores constataram, através de microscopia eletrônica de varredura, que há a formação de brotamento e o desenvolvimento de células filhas, mas em taxas reduzidas. Isto sugere que o suporte pode agir na membrana celular, local de formação de novas células, diminuindo a atividade celular responsável pelo desenvolvimento de células filhas, como o acúmulo de microtubos e vesículas ligadas a membranas. Esse resultado é discordante da observação de Vives e colaboradores⁴⁷ em trabalho de imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*, em alginato de cálcio. Os autores observaram que a taxa de crescimento específico para as células imobilizadas foi próxima da taxa de crescimento das células livres, quando em concentrações iniciais baixas de células no interior do gel.

Entretanto, o resultado obtido por Vives e colaboradores⁴⁷ foi conseguido por encapsulamento de células, que é um processo de imobilização diferente do processo de adesão utilizando o suporte gelatina e crisotila. O tipo de imobilização pode influenciar de maneira diferente o metabolismo das células. Foi observado aumento do diâmetro no complexo célula/alginato de cálcio durante o processo de crescimento das células. Esse resultado mostra as propriedades elásticas do gel, que permitem a reprodução das células sem haver limitações de espaço. Além disso, o contato físico superficial com o suporte não permite alterações na parede celular que pudessem impedir o desenvolvimento de novas células. Já a adesão em gelatina provocou alterações significativas no microrganismo, como relatado.

As células quando suportadas em crisotila podem sofrer as mesmas interferências físicas observadas com a gelatina e além disso, a crisotila por ser um material fibroso, não só adere na parede celular, mas penetra nas células (comunicação pessoal de Flávia Maria Cassiola) de forma a destruir e/ou modificar além da membrana celular outros componentes celulares, como a conformação de proteínas, impedindo a formação novas células.

5.3 Diferença na atividade de células suportadas em crisotila e montmorilonita

Os suportes inorgânicos, para a imobilização de células, são mais estudados em literatura por serem mais estáveis e baratos, mesmo apresentando menos sítios reativos que os materiais orgânicos.⁶² A comparação do rendimento do processo de produção de etanol utilizando células imobilizadas em crisotila foi verificado com as células suportadas em montmorilonita, um material inorgânico com grande área superficial. A verificação da atividade das células, através da evolução de CO₂, revelou um maior valor em sistemas com células imobilizadas em crisotila do que para as células livres. No entanto, com células suportadas em montmorilonita não foi observada a vantagem do sistema imobilizado, apresentando diminuição da velocidade inicial do processo.

De acordo com a suposição de que a interação das células com o suporte crisotila é devido à interação do magnésio da crisotila com o grupo fosfato, fez-se a troca iônica dos cátions da montmorilonita com magnésio, com a finalidade de observar mudanças no comportamento do complexo célula/montmorilonita. A Figura 10 mostra que não há diferença na produtividade para os sistemas que apresentam as células suportadas em montmorilonita modificada em relação aquele contendo células aderidas no suporte natural. Assim, a mudança na produtividade, para esse sistema, não está relacionada com ligação de grupos fosfatos das células ao cátion Mg do suporte, que supõe-se ser a responsável pela adesão das células ao suporte. Entretanto, nenhum experimento foi realizado com a finalidade de verificar se ocorre a adesão das células neste suporte.

Verificou-se, em literatura, que um aumento nas atividades das células foi observado utilizando como suportes inorgânicos alumina, cerâmica Rasching, carvão mineral e alginato de cálcio, entre outros.^{1,6} Kana e colaboradores⁶³ imobilizaram células de *Saccharomyces cerevisiae* em kissiris e observaram um aumento na produção de etanol comparado com as células em suspensão. A diminuição da produtividade foi observada por Bandyopadhyay e Ghose,⁶⁴ em trabalho imobilização de células em vidro de poro controlado e em “suportes A e B”(suportes inertes). Todos os sistemas testados apresentaram menores valores de

produção de CO₂ do que para as células livres. A diminuição da atividade metabólica de células imobilizadas nestes suportes foi atribuída à presença de multicamadas de fermento que provocam um aumento da pressão interna das células, resultando em um maior acúmulo de etanol intracelular. Entretanto essa constatação, não está de acordo com o resultado obtido por Kana e colaboradores,⁶³ pois kissiris é uma rocha vulcânica, com alta porosidade e área superficial específica, o que provocaria a entrada de células nos poros do material e resultaria em acúmulo etanol, provocando diminuição de produtividade durante o processo, o que não ocorreu.

A diminuição na produtividade também foi abordada considerando uma provável inibição no processo devido a composição iônica do meio, proveniente do substrato ou suporte.⁶⁵ Rhee e colaboradores⁶⁶ também descrevem alguns componentes que podem ser os responsáveis por inibição na fermentação, por exemplo alguns sais inorgânicos como cloreto de potássio e determinadas concentrações de cálcio e magnésio. Bakoyians e colaboradores,⁶⁷ em 1997, observaram que células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas em γ -alumina, submetidas a processo de produção de vinhos a temperatura de 7°C, apresentou um diminuição de produtividade. O autor sugeriu que a presença de γ -alumina diluída e outros componentes do meio poderiam ter cristalizado sob a superfície da célula inibindo o processo de imobilização. Portanto, pode-se supor que a razão da diminuição da produtividade observada por Bandyopadhyay e Ghose foi o fator inibitório provocado pela composição iônica do meio. Nesse trabalho de imobilização de células em vidro poroso, a adesão das células ao suporte foi realizada através de ligação covalente cruzada utilizando glutaraldeído, o qual pode apresentar propriedades tóxicas à célula.

De acordo com esses resultados, pode-se descartar o fato de que células quando imobilizadas em montmorilonita apresentem problemas de diminuição da produtividade devido a um aumento na pressão interna, devido à multicamadas de fermento sobre o suporte. Entretanto, o que pode ocorrer é que a montmorilonita por apresentar uma alta área superficial, pode conter um grande acúmulo de nutrientes na interface sólido-líquido e as células quando expostas a essa maior

concentração de nutrientes, podem apresentar mudanças na atividade enzimática, diminuindo a produtividade. Entretanto, essa suposição é discutível, pois esse problema não foi verificado com kissiris e cerâmica. Contudo, a montmorilonita por ser um alto adsorvente, pode apresentar uma maior adesão de nutrientes na superfície, fazendo com que estes tenham um maior contato com as células, e provavelmente na superfície dos suportes kissiris e cerâmica, a concentração de nutrientes seja menor. Outro fator da diminuição da produtividade pode ser uma possível inibição da atividade celular provocada por componentes do suporte como observado por Jones, Rhee e colaboradores.⁶⁵

5.4 Diminuição na produtividade dos reatores

Observou-se que a utilização de linhagens puras do microrganismos em processo de batelada para a produção de etanol, propiciou uma maior atividade das células. Isso pode ser devido à resistência a fatores do ambiente como concentração do substrato e/ou glicose. Contudo, com a utilização de linhagens puras em processo contínuo foi observada uma diminuição da produtividade durante o processo. A diminuição da formação do produto pode ser provocada por efeitos biológicos. A influência do substrato, na diminuição da produtividade, foi analisada por Wendhausen⁶⁸ em trabalho recente de imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em crisotila. O autor observou que o aumento de produtividade no processo foi maior em meio de fermentação contendo 20 a 30 % de glicose. Em concentrações de 40 a 50% de glicose notou-se uma produção de etanol, mesmo em taxas reduzidas, para os sistema com as células imobilizadas. O pH pode ser um fator limitante da produtividade. De acordo com a literatura,⁴ o pH para o crescimento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* situa-se entre 2,4 e 8,6 e, na etapa da fermentação, o pH ideal está entre 3,5 a 6. A inibição pelo etanol envolve funções fisiológicas, como a mudança na permeabilidade da membrana plasmática, que torna-se mais rígida, limitando assim a transferência de etanol para fora da célula e propiciando um aumento na quantidade de etanol intracelular, causando a inativação das enzimas presentes na célula. Namba e colaboradores⁵⁶ em trabalho de produção de etanol em regime contínuo observaram que a máxima concentração aceitável foi de 10% m/v de etanol, pois

além desse valor a produtividade diminuía gradualmente.

Neste trabalho a concentração de açúcar foi um fator determinante para a queda da produtividade nos reatores Júnior e Magali, pois observou-se que após a troca do meio de fermentação contendo 20% de sacarose e nutrientes para uma solução de melaço com 20% de açúcar, os reatores apresentaram recuperação da capacidade fermentativa. Entretanto, para os outros reatores a concentração do substrato não influenciou, pois estes foram alimentados, já inicialmente, com uma solução de melaço com 20% de açúcar, quantidade esta que propiciou uma alta produtividade, como observado por Wendhausen.⁶⁸ O valor inicial do pH do efluente de saída foi de 5,0 e se manteve estável em pH 4,0 em todos os reatores; a temperatura ficou estável em 30⁰C e não se alterou durante o processo. Portanto, pH e temperatura não foram fatores determinantes para a diminuição da produtividade. Para os reatores Margarida e Donald a quantidade inicial de etanol foi de até 80g/L por um período testado de até 50 dias. Esses reatores apresentaram uma desestruturação parcial do recheio ocasionando um empacotamento maior em algumas partes do reator. Portanto, pode-se concluir que o empacotamento diminuiu a porosidade do recheio permitindo a formação de canais preferencias de passagem do meio de alimentação. A parte mais compactada do leito, onde a passagem da solução de alimentação foi reduzida, pode ter retido etanol, o que propiciou diminuição da atividade metabólica das células.

Outro fator de diminuição da produtividade pode ser a contaminação por leveduras selvagens que levam à formação de produtos indesejáveis. Entretanto, amostras do recheio não foram visualizadas em microscópio ótico e a análise do efluente de saída também não foi realizada a fim de que fosse comprovada a contaminação.

6. Conclusões

A crisotila mostrou-se ser um bom suporte para células de *Saccharomyces* sp. e esse sistema quando utilizado em processo de produção de etanol apresentou um aumento na produtividade.

As células imobilizadas em crisotila, quando utilizadas em processo de produção de etanol, apresentaram aumento de atividade metabólica comparado com às células em suspensão;

Foram alcançados rendimentos maiores na produção de CO₂ para os sistemas com células de sete linhagens de *Saccharomyces* sp, imobilizadas em crisotila, comparado com sistemas de células livres. A maior diferença entre esses dois sistemas, foi notada em Meio de Fermentação com 30% de glicose;

A cepa CCT 0762 apresentou o maior valor de velocidade inicial de 0,13 gCO₂/h e a cepa FEA 01 o maior valor de conversão máxima de 97,3 %;

O crescimento das células, em Meio de Crescimento contendo crisotila ou crisotila lixiviada foi menor do que o crescimento das células em suspensão em 26 horas de experimento, entretanto, apresentaram um aumento da produção de CO₂, comparado com os sistemas com células em suspensão;

As células de fermento de pão, independente das concentrações iniciais dos inóculos, atingiram a concentração máxima de 6,5 g/L em um tempo aproximando de 15 horas;

Sistemas, contendo células em Meio de Crescimento com a presença do suporte, apresentaram uma diminuição na produção de células;

As células, após serem desessorvidas de crisotila, quando colocadas em meio nutritivo apresentaram uma diminuição da produção de CO₂ em relação às células que não tiveram contato com a crisotila;

A quantidade de células aderidas em crisotila foi de 0,5 g de células secas por grama de crisotila; enquanto a crisotila lixiviada apresentou o valor de 0,1 grama de células aderidas por grama de crisotila lixiviada; esses resultados foram obtidos com 2 horas de contato célula/suporte em meio aquoso a 30⁰C;

Os sistemas, com células imobilizadas em montmorilonita, apresentaram valor menor ou igual para o tempo reacional de fermentação e nenhuma diferença significativa para a produção final de CO₂, em relação aos sistemas contendo as células suspensas;

Não há diferença de produtividade em sistemas contendo células imobilizadas em montmorilonita, que foi submetida a processo de troca iônica dos cátions por magnésio, em relação aqueles com as células imobilizadas em montmorilonita não-modificada, independente do meio de cultura conter ou não MgSO₄;

Os reatores apresentaram uma produtividade de até 28g/L.h em um período de até 50 dias. O reator Júnior apresentou um valor de 110g/L de etanol. Esses resultados são maiores que os encontrados em processo contínuo de produção de etanol em escala industrial, que é de aproximadamente 7 g/L.h ;

A utilização de uma solução de melão com 20% de açúcar possibilitou uma recuperação da capacidade fermentativa dos reatores, que apresentavam uma baixa produtividade;

Os reatores apresentaram diminuição de produtividade durante o tempo de operação;

As micrografias, obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura, de células imobilizadas mostraram que as células são enveladas por fibrilas de crisotila, e isso não acontece com células suportadas em crisotila lixiviada.

7. Perspectivas

O projeto contínuo de produção de etanol com leveduras imobilizadas em crisotila, passa por fase de otimização do modelo do reator, com o desenvolvimento de reatores de leito fluidizado. A seguir, esse processo será testado com aumento de escala. Novos estudos, para uma melhor otimização nos reatores, devem ser desenvolvidos para observar como e quanto é o crescimento máximo de células em crisotila em condições experimentais diferentes das obtidas neste trabalho.

Estudos bioquímicos das células imobilizadas em crisotila, poderiam ser realizados com o objetivo de verificar mudanças no metabolismo dessas células.

8. Referências

- 1) Lother, A.M.; Oetterer, M. "Microbial Cell Immobilization Applied to Alcohol Production - A Review." Revista de Microbiologia, 26(3), 151-159, 1995
- 2) Dias, J.M.C.S. "Aplicação do Método Dinâmico de Medida da Velocidade Específica Máxima de Crescimento Celular à Fermentação Alcoólica Contínua de Mosto de Melaço." Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, USP, 1982.
- 3) Busche, R.M.; Scott, C.D.; Davison, B.H.; Lynd, L.R. "Ethanol, the Ultimate Feedstock." Applied Biochemistry and Biotechnology, 34/35, 395-417, 1992
- 4) Jones, R.P.; Pamment, N.; Greenfield, P.F. "Alcohol Fermentation by Yeast-The Effect of Environmental and Other Variables." Process Biochemistry, April/May, 42-49, 1981.
- 5) Kolot, F. "New Trends in Yeast Technology-Immobilized Cells." Process Biochemistry, Oct/Nov, 2-8, 1980.
- 6) Willians, D.; Munnecke, M. "The Productions of Ethanol by Immobilized Yeast Cells." Biotechnology and Bioengineering, XXIII, 1813-1825, 1981.
- 7) Xu, P.; Thomas, A.; Gilson, C.D. "Combined Use of Three Methods for High Concentration Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*." Biotechnonology Letters, 18 (12), 1439- 1440, 1996.
- 8) Rehm, H.J.; Peed, G. "Biotechnology", Ed. Verlag Chemie, Weinhein, vol 3, 1983.
- 9) Pelczar, M.; Reid, R.; Chan, E.C.S. "Microbiologia", Ed. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, vol 1, 1980.
- 10) Philips, J.A.; Brock, T.D. "General Microbiology: A Laboratory Manual." Ed. Prentice-Hall, New Jersey, 1984.
- 11) Chibata,I.; Tosa, T.; Fujimura, M. "Immobilized Living Microbial Cells" in Annual Reports on Fermentation Process, cap 1, vol 6, 1985.
- 12) Iida, T. "Fuel Ethanol Production by Immobilized Yeast and Yeast Immobilization" in "Industrial Application of Immobilized Biocatalysts." edited Tanaka, A.; Tosa, T.; Kobayashi,T., USA, cap 11, 1993.

- 13) Shama, G. "Developments in Bioreactor for Fuel Ethanol Production." Process Biochemistry, 23, 138-145, 1988.
- 14) Tyagi, R.D.; Ghose, T.K. "Studies on Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* I-Analysis of Continuous Rapid Ethanol Fermentation in Immobilized Cell Reactor." Biotechnology and Bioengineering, XXIV, 781-795, 1982.
- 15) Holcberg, I.B.; Margalith, P.; "Alcoholic Fermentation by Immobilized Yeast at High Sugar Concentrations." European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 13, 133-140, 1981.
- 16) Marcipar, A.C.N.; Lebeult, B.L. "Immobilization of Yeasts on Ceramic Supports." Biotechnology Letters, 1, 65-70, 1980.
- 17) Szajáni, B.; Buzás, Z.; Dallmann, K.; Gimesi, I.; Krisch, J.; Tóth, M. "Continuous Production of Ethanol Using Yeast Cells Immobilized in Preformed Cellulose Beads." Applied Microbiology and Biotechnology, 46, 122-125, 1996.
- 18) Ryu, S. e Lee, K. "Comparison of Immobilization Matrix for Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Microbiology Biotechnology, 6, 438-440, 1997
- 19) Moran, P.J.S.; Wendhausen Jr., R.; Rodrigues, J.A.R.; Joekes, I. "Processo de Preparação de Etanol em Alto Rendimento em Regimes Contínuo e de Batelada Via Fermentação, Utilizando Células de *Saccharomyces cerevisiae* Suportadas em Minerais." Pedido de Privilégio, em solicitação nº PI 9700635.
- 20) Norton, S.; D'Amore, T.; "Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization: Applications for Brewing." Enzyme and Microbial Technology, 16, May, 365-375, 1994.
- 21) Hultin, H. "Current and Potencial Uses of Immobilized Enzymes." Food Technology, October, 66-82, 1983.
- 22) Faber, K. "Biotransformations in Organic Chemistry: a Textbook." Ed. Springer, 3rd, 345, 1997.
- 23) Chaudhary, A.B.; Chincholkar, S. B. "Cell Immobilization: A Critical Approach to Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*." Indian Journal of Microbiology, 36, June, 75-83, 1996.
- 24) Wisema, A. "Handbook of Enzyme Biotechnology." Ed. England, Ellis Horwood, 2nd, 1987.
- 25) Santos, P.S. "Tecnologia das Argilas." Edgard Blucher Ltda, vol 2, 1975.

- 26) Parizotto, O. "Crisotilas Naturais Brasileiras: Ativação da Superfície e Aplicação na Imobilização de Biocatalisadores." Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1989.
- 27) Giongo, C.V.T. "Estudo da Deposição de TiO_2 sobre Crisotila Brasileira." Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1995.
- 28) Martinez, E.; Zucker, G. L. "Asbestos ore Body Mineral Studies by Zeta Potencial Measurements." Journal of Physical Chemistry, 64, 924, 1960.
- 29) Comerlato, M.H. "Imobilização de Enzimas no Suporte Crisotila." Tese de Doutorado, Instituto Química, Unicamp, 1995.
- 30) Parizotto, O. "Crisotilas Brasileiras: Caracterização dos Sítios Superficiais por Cromatografia Inversa, Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia no Infravermelho." Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 1995.
- 31) Comerlato, M.H. "Obtenção e Caracterização de Filtros de Profundidade em Crisotilas Brasileiras." Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1989.
- 32) Joekes, I.; Comerlato, M.H.; Parizotto, O.; Pedroso, P.R.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R.; De Carvalho, M. "Processo de Preparação de Crisotilas de Alta Superfície Específica e Crisotila Obtida". Proc. INPI 8.903.849, 1989.
- 33) Canizares, E.M.P.N. "Estudo de Adsorção de Espécies Quirais em Crisotila Brasileira". Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1993.
- 34) Zuchetti, R.A.M. "Crisotila Brasileira Como Suporte de Catalisadores. Aplicação na Oxidação de Álcoois com Radiação de Microondas." Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 1994.
- 35) Chiou, C.T. e Rutherford, D. "Effects of Exchanged Cation and Layer Charge on the Sorption of Water and Egmae Vapors on Montmorillonite." Clays and Clays Minerals, 45 (6), 867-880, 1997.
- 36) Ravichandran, J. e Sivasankar, B. "Properties and Catalytic of Acid -Modified Montmorillonite and Vermiculite" Clays and Clays Minerals, 45 (6), 854-858, 1997.
- 37) Panchal, C.J e Tavares, F.C.A. "Yeast Strain Selection for Fuel Ethanol Production" in "Yeast Strain Selection" edited Panchal, C.J, Ed. Vetrogen Corporation, USA, cap 8, 1990.
- 38) Kurtzman, C. "Culture Collections as Sources of Strains for Industrial Uses" in "Yeast Strain Selection" edited Tavares, F. C. A, Vetrogen Corporation, USA, cap 1, 1990.

- 39) Salmon, J. M.; Mauricio, J. C. "Relationship Between Sugar Uptake Kinetics and Total Sugar Consumption in Different Industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain During Alcoholic Fermentation." Biotechnology Letters, 16 (1), 89-94, 1994.
- 40) Fletcher, M. "The Physiological Activity of Bacteria Attached to Solid Surfaces." Advances in Microbial Physiology, 32, 54-83, 1991.
- 41) Mozes, N.; Marchal, F.; Hermesse, M.P.; Van Haecheat, J.L.; Reuliaux, L.; Leonard, A.J. and Rouxhet, P.G. "Immobilization of Microorganisms by Adhesion: Interplay of Electrostatic and Nonelectrostatic Interactions." Biotechnology and Bioengineering, XXX, 439-450, 1987.
- 42) Shaw, D. "Introdução à Química dos Colloides e de Superfície" Ed. Edgard Blucher, 1975.
- 43) Gerson, D.F; Zajic, J.E. in "Immobilized Microbial Cells" edited Venkatsubramanian, cap 3, 1979.
- 44) Van Haechet, J.L.; Bolipombo, M. e Rouxhet, P. G. "Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* by Adhesion: Treatment of The Cells by Al Ions." Biotechnology and Bioengineering, XXVII, 217-224, 1985.
- 45) Kenji, K.; Morimura, S.; Sonada, Y.; Yanoh, T. "The Importance of the Surface Charge on Support Media for Microbial Adhesion." Journal of Fermentation and Bioengineering, 73(4), 323-325, 1992.
- 46) Wada, M.; Kato, J.; Chibata, I. "Continuous Production of Ethanol in High Concentration Using Immobilized Growing Yeast Cells." European Journal Applied Microbiology Biotechnology, 11, 67-71, 1981.
- 47) Vives, C.; Casas, C.; Gòdia, F.; Solà, C. "Determination of the Intrinsic Fermentation Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* Cells Immobilized in Ca-Alginate Beads and Observations on their Growth." Applied Microbiology and Biotechnology, 38, 467-472, 1993.
- 48) Suquet, H. "Effects of Dry Grinding and Leaching on The Crystal Structure of Chrysotile." Clays and Clays Mineral, 37 (5), 439-445, 1989.
- 49) Baccan, N.; Godinho, O.; Aleixo, L.; Stein, E. "Introdução à Semimicroanálise Qualitativa." Editora da Unicamp, Campinas, 1988.
- 50) Galazzo, J.; Bailey; J. "Growing *Saccharomyces cerevisiae* in Calcium-Alginate Beads Induces Cell Alterations which Accelerate Glucose Conversion to Ethanol." Biotechnology and Bioengineering, 36, 417-426, 1990.

- 51) Parsons, R.V.; McDuffie, N.; Din, G. A. "pH Inhibition of Yeast Ethanol Fermentation in Continuous Culture." Biotechnology Letters, 6 (10), 677-680, 1984.
- 52) Letourneau, F.; Villa, P. "*Saccharomyces cerevisiae* Yeast Growth on Beet Molasses. Effects of Substrate Concentration on Alcohol Toxicity." Biotechnology Letters, 9 (1), 53-58, 1987.
- 53) Philips, J.A.; Brock, T.D. "General Microbiology: A Laboratory Manual." Ed. Prentice-Hall, New Jersey, 39, 1984.
- 54) Vieira, A.M.; Sá-Correia, I.; Novais, J.M.; Cabral, J.M.S. "Could the Improvements in the Alcoholic Fermentation of High Glucose Concentrations by Yeast Immobilization be Explained by Media Supplementation?" Biotechnonology Letters, 11(2), 137-140, 1989.
- 55) Sedha, R.K.; Vermas, G.; Gupta, R.P.; Tewari, H. K. "Ethanol Production from Molasses Using Cell Recycling of *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Fermentation Technology, 62 (5), 471-476, 1984.
- 56) Namba, A; Nishizawa, Y.; Tsuchiya, Y.; Nagai, S "Kinetic Analysis for Batch Ethanol Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Fermentation Technology, 65, 277-283, 1987.
- 57) Watanabe, T.; Aoki, T.; Honda, H.; Taya, M.; Kobayashi, T. "Production of Ethanol in Repeated-Batch Fermentation with Membrane-Type Bioreator". Journal of Fermentation and Bioengineering, 69 (1), 33-38, 1990.
- 58) Doran, P.; Bailey, J. "Effects of Immobilization on Growth, Fermentation Properties, and Macromolecular Composition of *Saccharomyces cerevisiae* Attached to Gelatin." Biotechnology and Bioengineering, XXVIII, 73-87, 1986.
- 59) Ghose, T.K; Bandyopadhyay, K.K. "Rapid Ethanol Fermentation in Immobilized Yeast Cell Reactor." Biotechnology and Bioengineering, XXIV, 1489-1496, 1980.
- 60) Iler, R. "The Chemistry of Silica", John Wiley e Sons, USA, 1979.
- 61) Amory, D.; Rouxhet, P. G. "Surface Properties of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces Carlsbergensis*: Chemical Composition, Electrostatic Charge and Hydrophobicity." Biochimica et Biophysica Acta, 938, 61-70, 1988.
- 62) Hultin, H. "Current and Potencial Uses of Immobilized Enzymes." Food Technology, October, 66-82, 1983.

- 63) Kana, K.; Kanellaki, M.; Psarianos, C.; Koutinas, A. "Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Mineral Kissiris." Journal of Fermentation and Bioengineering, 68 (2), 144-147, 1989.
- 64) Bandyopadhyay, K.K.; Ghose, T.K. "Studies on Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. III Physiology of Growth and Metabolism on various Supports." Biotechnology and Bioengineering, XXIV, 805-815, 1982.
- 65) Jones, R. "Effect of the Relative Concentration of Ion Species on Yeast Growth and Ethanol Production." Process Biochemistry, December, 183-187, 1986.
- 66) Rhee, S.K.; Pagan, R.J.; Lefebvre, M.F.; Wong, L.e Rogers, P.L. "Ethanol Production from Desalted Molasses using *Saccharomyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*." Journal of Fermentation Technology, 62 (3), 297-300, 1984.
- 67) Bakoyianis, V.; Koutinas, A. A.; Agelopoulos, K.; Kanellaki, M. "Comparative Study of Kissiris, γ -Alumina, Calcium Alginate as Supports of Cells for Batch and Continuous Wine -Making at Low Temperatures." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 4884-4888, 1997.
- 68) Wendhausen Jr., R. "Estudo sobre Utilização de Crisotila como Suporte de Células de *Saccharomyces cerevisiae* para Uso em Processo Contínuo de Fermentação Alcoólica e Biorreduções." Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 1998.