

ENGENHARIA DE LEVEDURAS FLOCULANTES

ANTÓNIO AUGUSTO MARTINS DE OLIVEIRA SOARES VICENTE



UNIVERSIDADE DO MINHO

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

1997

ENGENHARIA DE LEVEDURAS FLOCULANTES

ANTÓNIO AUGUSTO MARTINS DE OLIVEIRA SOARES VICENTE



UNIVERSIDADE DO MINHO

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

1997

ENGENHARIA DE LEVEDURAS FLOCULANTES

ANTÓNIO AUGUSTO MARTINS DE OLIVEIRA SOARES VICENTE

Dissertação para a obtenção do grau de Doutor
em Engenharia Química e Biológica pela Universidade do Minho

**Este trabalho foi financiado pelo Sub-Programa Ciência e Tecnologia
do 2º Quadro Comunitário de Apoio**

UNIVERSIDADE DO MINHO

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

1997

Tese realizada sob a orientação do
Doutor Eng.º José António Couto Teixeira
Professor Associado

UNIVERSIDADE DO MINHO
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

"Make everything as simple as possible, but not simpler."

ALBERT EINSTEIN

*a meus Pais
à Cristina*

Prefácio

Estou sinceramente convencido de que um Doutorado não é uma tarefa solitária. É, antes, uma troca de ideias, de experiências, de Saber, entre pessoas que têm em comum o gosto por experimentar, descobrir e aprender, tendo o doutorando o privilégio de ser quem mais recebe dos demais.

A principal “vítima” desta minha atitude foi o meu orientador, Prof. Doutor Eng.º José António Couto Teixeira. Com paciência, desde o dia em que me foi oferecida a oportunidade de enveredar pela investigação científica, soube guiar-me pelos meandros da Ciência e não me deixou esmorecer quando o caminho parecia ser demasiado espinhoso ou conduzir a um beco sem saída. Desejo expressar-lhe a minha mais sincera gratidão pela sua dedicação, pela sua disponibilidade, pelo optimismo que sempre soube transmitir e que é fundamental num trabalho onde necessariamente nem tudo corre bem, pela competência com que resolveu ou ajudou a resolver as questões mais delicadas.

Agradeço também ao Prof. Doutor Eng.º Manuel Mota, director do Departamento de Engenharia Biológica, onde realizei este trabalho, a afabilidade com que me recebeu e as discussões e sugestões, sempre proveitosas.

I would like to express my gratitude to Dr. Jan Marten Meinders for his priceless help during the development and testing of the computer aided image analysis method.

Ao Doutor Eng.º Marián Dluhý, agradeço todo apoio e a colaboração prestada nos ensaios relativos à determinação da difusividade efectiva nos flocos e nos cálculos a ela subjacentes, bem como nas simulações dos perfis de concentração no interior dos flocos e durante parte das fermentações em contínuo realizadas no bioreactor *airlift*. Mais, agradeço-lhe a sua amizade incondicional.

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Unai Ugalde del grupo de Bioquímica de la Facultad de Química, Universidad del País Vasco, por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por los conocimientos, consejos y sugerencias que recibí durante mi estancia. Le agradezco asimismo la atención con que me acogió en San Sebastián y su amistad.

No quisiera olvidar al Dr. Juan Ignacio Castrillo, quien aparte de brindarme su ayuda para comenzar el trabajo participó conmigo en el tratamiento y escritura del artículo.

Quisiera asimismo recordar a todos los que compartieron conmigo mi estancia en el laboratorio, por todo su cariño y atención.

Euskal Herriko Unibertsitateko Biokimika taldeko Unai Ugalde Doktore jaunari nire eskerrak agertu nahi nizkioke bere laborategian lana egin ahal izateko aukerarengatik eta egonaldi honetan jaso ditudan ezagutza, aholku eta proposamenengatik. Era berean eskertu nahi dizkiot bere aldetik Donostian egon nintzenean jasotako laguntasuna eta arreta.

Juan Ignacio Castrillo Doktorea ere ez nuke ahaztu nahi izango, berak lanarekin hasi ahal izateko bere laguntza eskeintzeaz gain nirekin parte hartu baitzuen artikuluaaren tratamendu eta idazketan.

Baita ere laborategiko egonaldian izandako pertsona eta lankide oro oroitu nahiko nituzke beren arreta eta begikotasunarengatik.

Ao Doutor Eng.º Eugénio Ferreira gostaria de agradecer toda a ajuda prestada no tratamento de dados, na discussão de alguns aspectos ligados à cinética das culturas de levedura e as preciosas “dicas informáticas” que me pouparam muito tempo e trabalho.

Ao Doutor Nelson Lima agradeço as sempre bem vindas sugestões e achegas respeitantes às minhas leveduras e algumas discussões tidas no âmbito da Microbiologia e da Biologia Celular.

Devo também um reconhecimento muito especial à ajuda técnica do Sr. Manuel Santos, o “pai” de um dos meus bioreactores, sempre presente e pronto a ajudar quando alguma coisa falhava.

A todos quantos trabalham no Departamento de Engenharia Biológica, assim como aos meus amigos mais próximos, agradeço o incentivo, o apoio, a camaradagem e a amizade com que sempre pude contar. Em particular, gostaria de agradecer à Carla Freitas e à Lucília Domingues a ajuda na revisão da versão final do texto.

À J.N.I.C.T. agradeço o apoio financeiro concedido através dos três anos de bolsa ao abrigo do Programa Praxis XXI.

À Cristina, por todo o incentivo, disponibilidade, paciência e pela ajuda inestimável na sempre fastidiosa tarefa de rever o texto.

Aos meus Pais e à minha Irmã, pelo estímulo constante e pelo apoio incondicional que desde sempre me dispensaram.

António Vinte

Resumo

A presente tese pretende contribuir para o esclarecimento de alguns dos principais fenómenos físicos e biológicos que têm lugar em sistemas que utilizam leveduras floculantes.

Assim, alteraram-se as dimensões do tubo interno do bioreactor utilizado (de circulação por arejamento, aqui designado por *airlift*), por forma a melhorar as suas características hidrodinâmicas em presença de uma fase sólida. Esta alteração facilitou a circulação de maiores cargas de sólidos, com menores caudais de arejamento, melhorando a eficiência do sistema em termos energéticos.

A cultura de uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* naquele bioreactor produziu flocos de levedura de dimensões consideráveis (até 5 mm de diâmetro) utilizados para os estudos subsequentes, nomeadamente na determinação da difusividade efectiva de dois compostos importantes em fermentação: a glucose e o oxigénio.

Para obter estes valores revelou-se imprescindível o desenvolvimento e a implementação de duas novas técnicas: uma visando a determinação do tamanho dos flocos por análise de imagem assistida por computador e uma outra permitindo medir a variação, com o tempo, da concentração de solutos num meio líquido onde estão suspensos os flocos de levedura, sem os destruir. Os valores de difusividade assim obtidos foram mais baixos do que em sistemas onde a imobilização se fez em géis sendo, por outro lado, muito influenciados pela presença de um aditivo de floculação, que aumenta em cerca de quatro e oito vezes as difusividades da glucose e do oxigénio, respectivamente.

Uma vez na posse dos valores das difusividades, a partir de um modelo matemático e com o auxílio de uma técnica computacional apropriada, simularam-se os perfis de concentração da glucose e do oxigénio no interior dos flocos, para vários tamanhos destes, diferentes concentrações dos solutos no meio e em presença e na ausência de um aditivo de floculação, tendo por base o modelo metabólico de capacidade respiratória limitada. Concluiu-se existirem fortes limitações difusionais no interior dos flocos, principalmente nos de maior tamanho, que condicionam o seu desempenho no seio dos sistemas onde são utilizados.

Assim, a solução encontrada para o problema reside na diminuição do tamanho médio dos flocos, proporcionada pela introdução de agitadores estáticos no interior do tubo interno do bioreactor *airlift*. Conseguiram-se aumentos significativos na produtividade do sistema em etanol, e nas taxas específicas de consumo de glucose e de produção de etanol.

Estudou-se, por fim, um método de estimação em linha da concentração de biomassa existente num bioreactor, a partir do consumo do reagente de controlo de pH. Estabeleceu-se uma relação formal entre a taxa específica de produção de protões e a taxa específica de consumo de azoto (directamente relacionada com a taxa específica de produção de biomassa) válida para metabolismo respiratório e respiro-fermentativo. Testou-se o método com uma fermentação em descontínuo (embora seja aplicável a qualquer tipo de operação), estando os valores estimados de concentração de biomassa de acordo com os valores determinados experimentalmente.

Palavras-chave: leveduras floculantes, flocos, *Saccharomyces cerevisiae*, *airlift*, hidrodinâmica, difusividade efectiva, simulação, perfil de concentração, análise de imagem, estimação da biomassa, agitadores estáticos.

Abstract

This thesis aims to be a contribution for the understanding of the physical and biological phenomena taking place in systems that make use of flocculating yeast strains.

The dimensions of the draught tube of an airlift bioreactor are changed in order to improve its hydrodynamic characteristics in the presence of a solid phase. This alteration facilitates the circulation of higher solids loading using lower air flow rates, leading to a better energetic performance of the system.

The growth of a flocculating strain of *Saccharomyces cerevisiae* in such a bioreactor makes it possible to obtain yeast flocs of a considerable size (up to 5 mm in diameter) which are used in the subsequent studies, namely for the assessment of the effective diffusivity of two important compounds in fermentation processes: glucose and oxygen.

The evaluation of those values would have not been possible without the development and implementation of two new techniques: one of them deals with the assessment of the floc size by computer aided image analysis, while the other consists on the determination of the progress of the bulk solute's concentration with time in the presence of yeast flocs, by means of a modified diffusion cell that prevents floc damage. The diffusivity values obtained for yeast flocs are lower than those published for gel immobilisation systems being, on the other hand, very much affected by the presence of a flocculation additive, which increases four and eight fold the glucose and oxygen diffusivity, respectively.

Once these diffusivity values are known, the development of a suitable mathematical model and a proper computational technique allow for the simulation of glucose and oxygen profiles in the flocs, for several floc sizes, bulk solute concentrations, with and without flocculation additive, using the respiratory bottleneck model as a basis. The occurrence of strong diffusional limitations inside the flocs, specially in those with a bigger diameter, is confirmed.

Being so, a solution for the problem was proposed based on the reduction of the floc size by means of static mixers introduced along the draught tube of the airlift bioreactor. Significant increases in ethanol productivity and in both the specific glucose uptake rate and the specific ethanol production rate are achieved.

Finally, a method for on-line estimation of biomass concentration inside a bioreactor through the consumption of pH control reagent is dealt with. A formal relation between the specific rate of proton production and the specific rate of nitrogen consumption (directly related to the specific rate of biomass production) is established, which is valid for respiratory and respiro-fermentative metabolism. The method is tested during a batch fermentation (although it may be used in fed-batch and continuous systems, as well), being the estimated values of biomass concentration in very good agreement with the experimentally determined ones.

Key words: flocculating yeast, flocs, *Saccharomyces cerevisiae*, airlift, hydrodynamics, effective diffusivity, simulation, concentration profile, image analysis, biomass estimation, static mixers.

Índice

PREFÁCIO	i
RESUMO	iii
ÍNDICE	v
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 SISTEMAS DE CÉLULAS IMOBILIZADAS - UTILIZAÇÃO DE ORGANISMOS FLOCULANTES	3
1.2 OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	4
1.3 ESTRUTURA DA TESE	5
1.4 BIBLIOGRAFIA	7
2. BIOREACTORES DE FLOCULAÇÃO	9
2.1 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO	10
2.2 CONFIGURAÇÃO DE REACTORES TRIFÁSICOS	13
2.2.1 <i>Tanque agitado</i>	13
2.2.2 <i>Leito fixo</i>	14
2.2.3 <i>Leito fluidizado</i>	15
2.2.4 <i>Coluna de bolhas</i>	15
2.2.5 <i>Reactor de circulação por arejamento (airlift)</i>	16
2.3 SELECÇÃO DE UM BIOREACTOR	18
2.4 FLOCULAÇÃO	20
2.5 PROJECTO DE UM BIOREACTOR <i>AIRLIFT</i>	21
2.5.1 <i>Separador gás-líquido (decantador)</i>	22
2.5.2 <i>Dimensões do bioreactor; tubos ascendente e descendente</i>	23
2.5.3 <i>Outros parâmetros de projecto</i>	24
2.5.4 <i>Influência da fase sólida</i>	25
2.5.5 <i>Consequências do projecto de reactores airlift na sua utilidade como bioreactores de</i> <i>floculação</i>	26
2.6 CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA	27
2.6.1 <i>Transferência de oxigénio gás-líquido</i>	27

2.6.2	<i>Transferência de massa de solutos nos flocos</i>	30
2.7	APLICAÇÕES	33
2.8	BIBLIOGRAFIA	37
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	MICROORGANISMOS	44
3.1.1	<i>Estirpe floculante</i>	44
3.1.1.1	Meio de cultura.....	44
3.1.1.2	Preparação do inóculo	45
3.1.2	<i>Estirpe não floculante</i>	45
3.1.2.1	Meio de cultura.....	45
3.1.2.2	Preparação do inóculo	47
3.2	BIOREACTOR AIRLIFT	47
3.2.1	<i>Características e equipamento</i>	47
3.2.2	<i>Esterilização</i>	50
3.2.3	<i>Inoculação e fermentação</i>	50
3.3	TANQUE AGITADO	51
3.3.1	<i>Características e equipamento</i>	51
3.3.2	<i>Inoculação e fermentação</i>	52
3.4	PREPARAÇÃO DAS BOLAS DE ALGINATO DE CÁLCIO	53
3.5	DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE MISTURA E DE CIRCULAÇÃO	54
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	56
3.6.1	<i>Quantificação da biomassa</i>	56
3.6.1.1	Estirpe floculante.....	56
3.6.1.2	Estirpe não floculante	57
3.6.2	<i>Determinação da viabilidade celular</i>	57
3.6.3	<i>Quantificação da glucose</i>	57
3.6.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).....	57
3.6.3.2	Doseamento de açúcares redutores pelo método de Miller (DNS)	58
3.6.4	<i>Quantificação do etanol</i>	58
3.6.4.1	Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).....	58
3.6.4.2	Cromatografia Gasosa (GC)	59
3.6.5	<i>Quantificação da ureia e da amónia</i>	59
3.6.6	<i>Determinação do volume ocupado pelos flocos e da sua massa específica</i>	60
3.6.7	<i>Determinação da composição dos gases à saída do bioreactor</i>	60
3.6.7.1	Espectrometria de massa.....	60
3.6.7.2	Outros métodos de análise de gases.....	63
3.7	BIBLIOGRAFIA	64
4.	NOVAS METODOLOGIAS.....	67

4.1 ANÁLISE DE IMAGEM POR COMPUTADOR	68
4.1.1 <i>Introdução</i>	68
4.1.2 <i>Método</i>	70
4.1.2.1 <i>Amostragem</i>	70
4.1.2.2 <i>Análise de imagem</i>	70
4.1.2.3 <i>Análise dos dados</i>	72
4.1.3 <i>Resultados e Discussão</i>	73
4.1.4 <i>Conclusões</i>	79
4.2 MEDIÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS E DE COEFICIENTES DE DIFUSÃO EM FLOCOS DE LEVEDURA ..	80
4.2.1 <i>Introdução</i>	80
4.2.2 <i>Método</i>	80
4.2.2.1 <i>Flocos de levedura</i>	80
4.2.2.2 <i>Sistema de medição</i>	81
4.2.2.3 <i>Procedimento experimental para determinações com glucose</i>	82
4.2.2.4 <i>Procedimento experimental para determinações com oxigénio</i>	82
4.2.2.5 <i>Aquisição e tratamento de dados</i>	83
4.2.3 <i>Resultados e Discussão</i>	83
4.2.4 <i>Conclusões</i>	85
4.3 BIBLIOGRAFIA	86
5. ESTUDOS HIDRODINÂMICOS: OPTIMIZAÇÃO DO DESENHO DO BIOREACTOR	
AIRLIFT	89
5.1 <i>INTRODUÇÃO</i>	90
5.2 <i>DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL</i>	91
5.2.1 <i>O bioreactor</i>	91
5.2.2 <i>Partículas de alginato de cálcio</i>	92
5.2.3 <i>Determinações dos tempos de mistura e de circulação e do caudal de arejamento crítico</i> ..	92
5.3 <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	93
5.3.1 <i>Caudal de arejamento crítico</i>	93
5.3.2 <i>Tempo de circulação da fase líquida</i>	96
5.3.3 <i>Tempo de mistura</i>	98
5.4 <i>CONCLUSÕES</i>	100
5.5 <i>BIBLIOGRAFIA</i>	100
6. CARACTERIZAÇÃO DO TRANSPORTE DE GLUCOSE E OXIGÉNIO EM FLOCOS DE LEVEDURA	103
6.1 <i>INTRODUÇÃO</i>	104
6.2 <i>DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL</i>	105
6.3 <i>TRATAMENTO DE DADOS</i>	106
6.3.1 <i>Método analítico</i>	106

6.3.2 Método numérico	108
6.4 RESULTADOS	109
6.4.1 Determinação do tamanho dos flocos	109
6.4.2 Difusividade efectiva da glucose	111
6.4.3 Difusividade efectiva do oxigénio	112
6.5 DISCUSSÃO	114
6.5.1 Difusividade efectiva da glucose	115
6.5.2 Difusividade efectiva do oxigénio	116
6.6 CONCLUSÃO - COMPARAÇÃO COM OUTROS TRABALHOS	117
6.7 BIBLIOGRAFIA	120
7. MODELIZAÇÃO DOS FENÓMENOS DE DIFUSÃO E REACÇÃO EM FLOCOS DE LEVEDURA	123
7.1 INTRODUÇÃO	124
7.2 MODELO	125
7.2.1 Restrições do modelo	125
7.2.2 Equações do modelo	126
7.2.2.1 Parte A: flocos	126
7.2.2.2 Parte B: fase líquida	128
7.2.3 Solução das equações do modelo	128
7.2.4 Valores dos parâmetros do modelo	129
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
7.3.1 Simulações sem aditivo de floculação	130
7.3.2 Simulações com aditivo de floculação	135
7.3.3 Metabolismo nos flocos	137
7.4 CONCLUSÕES	139
7.5 BIBLIOGRAFIA	140
8. MELHORAMENTO DO DESEMPENHO DO BIOREACTOR: ALTERAÇÃO DO PROJECTO DO TUBO INTERNO	143
8.1 INTRODUÇÃO	144
8.2 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL	145
8.2.1 Alteração do desenho do tubo interno	145
8.2.2 Identificação da ocorrência de um estado estacionário	145
8.2.3 Análise de um estado estacionário	147
8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	150
8.4 CONCLUSÕES	153
8.5 BIBLIOGRAFIA	154

9. ESTIMAÇÃO EM LINHA DA BIOMASSA A PARTIR DO CONSUMO DO REAGENTE DE CONTROLO DE PH.....	157
9.1 INTRODUÇÃO.....	158
9.2 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL	159
9.2.1 Determinação da taxa específica de produção de protões (qH^+).....	159
9.2.2 Detecção de reacções laterais passíveis de interferir com a determinação de qH^+	159
9.2.3 Cultura em contínuo	161
9.2.4 Cultura em descontínuo.....	161
9.2.5 Estimação da concentração de biomassa.....	162
9.2.6 Métodos analíticos.....	162
9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	163
9.3.1 Influência da produção/consumo de etanol em qH^+	163
9.3.2 Contribuições ácido/base adicionais para o valor de qH^+	165
9.3.3 Uma cultura em descontínuo como sistema de teste	166
9.4 CONCLUSÕES	168
9.5 BIBLIOGRAFIA	170
10. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO.....	173
APÊNDICES	179
APÊNDICE I	181
APÊNDICE II	185

Lista de Tabelas

<i>Tabela 2.1: Sistema de classificação para técnicas de imobilização (adaptado de Katzbauer et al. 1995).</i>	11
<i>Tabela 2.2: Aplicações de bioreactores de floculação.</i>	36
<i>Tabela 3.1: Composição do meio de cultura para a estirpe floculante.</i>	44
<i>Tabela 3.2: Composição do meio de cultura para a estirpe não floculante.</i>	46
<i>Tabela 3.3: Características do equipamento do bioreactor airlift.</i>	49
<i>Tabela 3.4: Condições de operação do bioreactor airlift.</i>	51
<i>Tabela 3.5: Características do equipamento do tanque agitado.</i>	52
<i>Tabela 3.6: Condições de operação do tanque agitado.</i>	53
<i>Tabela 4.1: Dimensões dos flocos com 48 horas (amostra 1) e 72 horas (amostra 2) em termos da área média de flocos isolados e da área dos dupletos (juntamente com os respectivos desvios padrão) obtidas a partir do ajuste de Gauss para os limiares seleccionados automaticamente.</i>	78
<i>Tabela 5.1: Diâmetros e alturas dos vários tubos internos utilizados.</i>	92
<i>Tabela 5.2: Características das partículas de alginato de cálcio.</i>	92
<i>Tabela 6.1: Resumo das condições experimentais.</i>	106
<i>Tabela 6.2: Resumo das características morfológicas e dimensionais dos flocos utilizados.</i>	110
<i>Tabela 6.3: Resultados para a difusividade efectiva da glucose, obtidos com o ajuste não linear dos dados experimentais dos ensaios 1 a 3, utilizando os métodos analítico (I) e numérico (II). Também se apresentam os resultados do ajuste dos dados em conjunto. $D_{\text{água, gluc}}(30\text{ }^{\circ}\text{C}) = 6,80 \times 10^{-10}\text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Tanaka et al. 1984).</i>	112
<i>Tabela 6.4: Resultados para a difusividade efectiva do oxigénio, obtidos com o ajuste não linear dos dados experimentais dos ensaios 4 a 6, utilizando os métodos analítico (I) e numérico (II). $D_{\text{água, O}_2}(30\text{ }^{\circ}\text{C}) = 2,56 \times 10^{-9}\text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Kurosawa et al. 1989).</i>	113
<i>Tabela 6.5: Resumo de valores publicados para a D_e da glucose e do oxigénio.</i>	119
<i>Tabela 7.1: Valores dos parâmetros do modelo que se mantêm constantes durante as simulações.</i>	129
<i>Tabela 7.2: Valores dos parâmetros do modelo que são modificados durante as simulações.</i>	130
<i>Tabela 7.3: Comparação da profundidade de penetração do oxigénio dissolvido e da correspondente percentagem de volume em flocos com diferentes tamanhos, sem aditivo de floculação.</i>	134
<i>Tabela 7.4: Profundidade de penetração do oxigénio dissolvido e da correspondente percentagem de volume em flocos com 0,80 mm de raio em presença de MF.</i>	136
<i>Tabela 9.1: Taxas específicas (q) obtidas durante a cultura em contínuo com glucose ($30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como fonte de carbono e ureia ($3,6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como fonte de azoto.</i>	164

Tabela 9.2: Taxas específicas (q) obtidas durante a cultura em contínuo com etanol ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de carbono e ureia ($3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de azoto. 164

Lista de Figuras

Figura 2.1: Configurações mais comuns de bioreactores trifásicos.....	14
Figura 2.2: A - airlift de circulação interna e tubos concêntricos; B - airlift de circulação interna e corpo dividido.....	17
Figura 2.3: Factores que afectam a formação de flocos (adaptado de Atkinson e Daoud 1976).....	20
Figura 2.4: Bioreactor contínuo para a indução da floculação de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (Teixeira 1988).....	34
Figura 3.1: Bioreactor airlift (dimensões em milímetros).....	47
Figura 3.2: Sistema de fixação do tubo interno.....	48
Figura 3.3: Diagrama esquemático da instalação experimental.....	54
Figura 3.4: Curvas de resposta típicas do método de pulso de pH.....	55
Figura 4.1: Imagens de flocos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> captadas automaticamente a) 48 horas (amostra 1) e b) 72 horas (amostra 2) após a inoculação. Note-se o aumento de tamanho. A barra nas figuras corresponde a 1 mm.....	74
Figura 4.2: Histograma de valores da escala de cinzentos de uma imagem de flocos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com 48 horas. Para separar os flocos (valores baixos, primeiro conjunto de picos) do fundo (valores elevados, segundo pico) é necessário escolher um valor de limiar adequado. A seta indica o valor encontrado pelo método automático.....	75
Figura 4.3: Histograma de áreas (tamanho das classes: 0,36 mm ²) obtido para flocos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com a) 48 horas (amostra 1) e b) 72 horas (amostra 2) utilizando um limiar calculado automaticamente. A ausência de objectos para a área de 1,6 mm ² indica a separação entre os pixel correspondentes ao ruído e aos flocos. (◻, ○ : pontos experimentais; --- : ajuste aos flocos isolados; — : ajuste aos dupletos; : soma dos ajustes).....	76
Figura 4.4: Área média dos flocos em função do limiar para flocos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com 48 horas (amostra 1, ◻) e 72 horas (amostra 2, ○).....	77
Figura 4.5: Sistema de medição: (1) câmara de medição isolada (isolamento não representado); (2) reservatório; (3) eléctrodo de oxigénio; (4) rede de aço inox; (5a,b) barra magnética; (6) rolha de borracha; (7) dispersor de gás; (8) camisa de controlo de temperatura; (9a,b), (10a-e) e (11) válvulas; (12a,b) líquido de controlo de temperatura; (13) termómetro; (14) anel de borracha.....	82
Figura 4.6: Dados experimentais (○), tratados com recurso a Transformadas de Fourier (para maior clareza não se representam todos os pontos), e o correspondente ajuste (—) a uma cinética do tipo Monod.....	85

- Figura 4.7: Método das diferenças finitas aplicado aos dados experimentais (\bullet); ΔC_O e Δt são as diferenças finitas entre dois pontos consecutivos de concentração de oxigênio e de tempo, respectivamente. Ajustou-se uma curva exponencial aos pontos para evidenciar a sua tendência. 86
- Figura 5.1: Caudal de arejamento crítico em função da carga de sólidos para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes alturas (\square, \blacksquare - $A_i = 42$ cm; $\triangle, \blacktriangle$ - $A_i = 48$ cm; \circ, \bullet - $A_i = 56$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 94
- Figura 5.2: Caudal de arejamento crítico em função da razão de alturas (A_i/A_e) para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes cargas de sólidos (\square, \blacksquare - 5 % sólidos; $\triangle, \blacktriangle$ - 10 % sólidos; \circ, \bullet - 15 % sólidos; \diamond - 20 % sólidos; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 94
- Figura 5.3: Caudal de arejamento crítico em função da carga de sólidos para tubos internos com altura de 56 cm e diferentes diâmetros (\square, \blacksquare - $D_i = 2,2$ cm; $\triangle, \blacktriangle$ - $D_i = 3,2$ cm; \circ, \bullet - $D_i = 4,4$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 95
- Figura 5.4: Caudal de arejamento crítico em função da razão de diâmetros (D_i/D_e) para tubos internos com altura de 56 cm e diferentes cargas de sólidos (\square, \blacksquare - 5 % sólidos; $\triangle, \blacktriangle$ - 10 % sólidos; \circ, \bullet - 15 % sólidos; \diamond - 20 % sólidos; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 95
- Figura 5.5: Tempo de circulação em função da carga de sólidos para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes alturas, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (\square, \blacksquare - $A_i = 42$ cm; $\triangle, \blacktriangle$ - $A_i = 48$ cm; \circ, \bullet - $A_i = 56$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 97
- Figura 5.6: Tempo de circulação em função da carga de sólidos para tubos internos com altura de 42 cm e diferentes diâmetros, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (\square, \blacksquare - $D_i = 2,2$ cm; $\triangle, \blacktriangle$ - $D_i = 3,2$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 97
- Figura 5.7: Tempo de circulação em função da razão de alturas (A_i/A_e) para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes cargas de sólidos, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (\times - 0 % sólidos; \square, \blacksquare - 5 % sólidos; $\triangle, \blacktriangle$ - 10 % sólidos; \circ, \bullet - 15 % sólidos; \diamond - 20 % sólidos; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 98
- Figura 5.8: Tempo de mistura em função da carga de sólidos para tubos internos com diâmetro de 3,2 cm e diferentes alturas, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (\square, \blacksquare - $A_i = 42$ cm; $\triangle, \blacktriangle$ - $A_i = 48$ cm; \circ, \bullet - $A_i = 56$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 99
- Figura 5.9: Tempo de mistura em função da razão de alturas (A_i/A_e) para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes cargas de sólidos, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (\times - 0 % sólidos; \square, \blacksquare - 5 % sólidos; $\triangle, \blacktriangle$ - 10 % sólidos; \circ, \bullet - 15 % sólidos; \diamond - 20 % sólidos; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente). 99

- Figura 6.1: Ilustração do teorema da multiplicação de soluções aplicado ao caso de um cilindro em que a condição $R \ll L$ não é válida. A intersecção de uma placa plana com um cilindro infinito dá origem à forma aproximada de um floco cilíndrico. Esta intersecção expressa-se matematicamente como o produto das soluções (adimensionais) da eq. (6.5) para placa plana e cilindro infinito. .. 108
- Figura 6.2: Histograma da área projectada dos flocos obtida por análise de imagem, com a correspondente curva de Gauss. 110
- Figura 6.3: Concentração de glucose adimensional ($C(t)/C_{\infty}$) versus tempo adimensional (τ) para os ensaios 1 (■), 2 (●) e 3 (▲) com concentrações iniciais de 10, 20 e 130 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Curvas calculadas a partir dos resultados dos métodos analítico (I) (-----) e numérico (II) (—). 111
- Figura 6.4: Concentração de oxigénio adimensional ($C(t)/C_{\infty}$) versus tempo adimensional (τ) para os ensaios 4 (○), 5 (Δ) e 6 (□) com velocidades de agitação de 175, 200 e 300 rpm, respectivamente. Curvas calculadas a partir dos resultados dos métodos analítico (I) (-----) e numérico (II) (—). 113
- Figura 6.5: Variação do valor de K_c com a velocidade de agitação nos ensaios 4 a 6. O aumento da velocidade de agitação corresponde à diminuição do tamanho dos flocos. 118
- Figura 7.1: Perfis de concentração para flocos com 0,45 mm de raio: a) perfis adimensionais da concentração de glucose; os valores junto às linhas identificam a concentração de glucose no meio a que cada linha corresponde; b) perfis da concentração de oxigénio dissolvido; a linha a cheio representa todos os perfis calculados para 10 % da concentração de saturação (correspondendo a 0,1; 0,5; 1 e 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio) e a linha a tracejado representa o perfil calculado para 100 % da concentração de saturação (correspondendo a 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio). 131
- Figura 7.2: Perfis de concentração para flocos com 0,80 mm de raio: a) perfis adimensionais da concentração de glucose; os valores junto às linhas identificam a concentração de glucose no meio a que cada linha corresponde; b) perfis da concentração de oxigénio dissolvido; a linha a cheio representa todos os perfis calculados para 10 % da concentração de saturação (correspondendo a 0,1; 0,5; 1 e 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio) e a linha a tracejado representa o perfil calculado para 100 % da concentração de saturação (correspondendo a 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio). 132
- Figura 7.3: Perfis de concentração para flocos com 1,20 mm de raio: a) perfis adimensionais da concentração de glucose; os valores junto às linhas identificam a concentração de glucose no meio a que cada linha corresponde; b) perfis da concentração de oxigénio dissolvido; a linha a cheio representa todos os perfis calculados para 10 % da concentração de saturação (correspondendo a 0,1; 0,5; 1 e 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio) e a linha a tracejado representa o perfil calculado para 100 % da concentração de saturação (correspondendo a 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio). 133
- Figura 7.4: Comparação dos perfis de concentração para flocos (raio de 0,80 mm) com (linhas tracejadas) e sem (linhas contínuas) a presença de um aditivo de floculação. a) perfis adimensionais da concentração de glucose; os valores junto às linhas identificam a concentração de glucose no meio a que cada linha corresponde; b) perfis de concentração de oxigénio dissolvido, para 10 % da concentração de saturação. 137

- Figura 7.5: Fluxos metabólicos em função da coordenada radial para flocos sem MF. A área sombreada corresponde à quantidade relativa de células a crescer em regime respiratório e as áreas entre as curvas assinaladas com os valores de concentração e a área a sombreado correspondem à quantidade relativa de células a crescer em regime fermentativo. Os valores junto às curvas referem-se à concentração de glucose no meio líquido. A linha vertical corresponde à profundidade de penetração do oxigénio nos flocos. 138
- Figura 7.6: Fluxos metabólicos em função da coordenada radial para flocos com MF. A área sombreada corresponde à quantidade relativa de células a crescer em regime respiratório e as áreas entre as curvas assinaladas com os valores de concentração e a área a sombreado correspondem à quantidade relativa de células a crescer em regime fermentativo. Os valores junto às curvas referem-se à concentração de glucose no meio líquido. A linha vertical corresponde à profundidade de penetração do oxigénio nos flocos. 139
- Figura 8.1: Esquema da colocação dos agitadores estáticos no interior do tubo interno modificado. 146
- Figura 8.2: Evolução das concentrações de glucose (\blacktriangle), etanol (\bullet) e biomassa viável (\blacksquare) no meio em função da taxa de diluição em estado pseudo-estacionário. 151
- Figura 8.3: Evolução das taxas específicas de consumo de oxigénio (\times) e de produção de dióxido de carbono (\blacklozenge) com a taxa de diluição em estado pseudo-estacionário. 152
- Figura 8.4: Comparação entre as taxas específicas de consumo de glucose (Δ , \blacktriangle) e de produção de etanol (\circ , \bullet) obtidas com o sistema original (símbolos vazios) e com o sistema modificado (símbolos a cheio) em função da taxa de diluição. As linhas verticais indicam a taxa de diluição máxima obtida em cada caso (linha a tracejado para o sistema original e linha contínua para o sistema modificado). 153
- Figura 8.5: Comparação entre a produtividade em etanol obtida com o sistema original (\circ) e com o sistema modificado (\bullet) em função da taxa de diluição. As linhas verticais indicam a taxa de diluição máxima obtida em cada caso (linha a tracejado para o sistema original e linha contínua para o sistema modificado). 154
- Figura 9.1: Quantidade de ácido necessária para manter constante o pH versus tempo, numa fermentação em contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* com glucose como fonte de carbono. 160
- Figura 9.2: Fermentação em descontínuo: a) evolução das concentrações de glucose (\blacksquare), biomassa (\blacktriangle) e etanol (\blacksquare) e da concentração de biomassa estimada (Δ); b) evolução dos valores de qH^+ (\bullet) e de $q_{biomassa}$ (\circ); c) evolução dos valores de $qH^+/q_{biomassa}$ 169

Lista de símbolos

LETRAS LATINAS MAIÚSCULAS

A	área específica	L^{-1}
A_a	área da secção recta do tubo ascendente	L^2
A_d	área da secção recta do tubo descendente	L^2
A_e	altura do tubo externo	L
A_i	altura do tubo interno	L
Bi	número de Biot ($K_c \cdot R/D_e$)	
$Bi_{M,i}$	número de Biot modificado relativo ao componente i ($K_c \cdot R/D_{e,S}$)	
C	matriz dos factores de calibração	
C_i	concentração do componente i no meio	ML^{-3}
C^*	concentração de saturação de um componente na fase líquida	ML^{-3}
$C(t)$	concentração do soluto no meio no tempo t	ML^{-3}
C_0	concentração inicial do soluto no meio	ML^{-3}
CO	concentração de dióxido de carbono na fase gasosa	ML^{-3}
C_∞	concentração de equilíbrio do soluto no meio	ML^{-3}
\dot{D}	taxa de diluição	T^{-1}
$D_{agua,gluc}$	difusividade da glucose em água pura	L^2T^{-1}
D_{agua,O_2}	difusividade do oxigénio em água pura	L^2T^{-1}
D_e	diâmetro do tubo externo	L
D_e	difusividade efectiva	L^2T^{-1}
$D_{e,i}$	difusividade efectiva do componente i	L^2T^{-1}
D_i	diâmetro do tubo interno	L
F	matriz de desfragmentação	
F^{-1}	matriz de desconvolução	
F_L	caudal de meio alimentado ao reactor	L^3T^{-1}
F_{NH_3}	taxa de formação de amónia	MT^{-1}
G	caudal molar da corrente gasosa	MT^{-1}
\dot{G}	caudal de arejamento	L^3T^{-1}
I	vector dos sinais desacoplados	
I_j	altura (ou intensidade) total do pico de massa j	
I_{ji}	contribuição do componente i para a intensidade do pico de massa j	

J_D	fluxo difusional médio	$ML^{-2}T^{-1}$
K_c	coeficiente de transferência de massa por convecção	LT^{-1}
K_E	constante cinética para o etanol	ML^{-3}
K_i	constante cinética de inibição	ML^{-3}
K_m	constante cinética de Monod	ML^{-3}
K_O	constante cinética para o oxigénio	ML^{-3}
K_S	constante cinética para o substrato	ML^{-3}
K_1	constante cinética de saturação ($K_S/C_{S,F}$)	
K_2	constante cinética de saturação ($K_O/C_{S,F}$)	
L	espessura do floco	L
M_X	massa molecular da biomassa	M
N	número total de <i>pixel</i>	
N_{OH^-}	miliequivalentes de base consumidos pelo sistema de controlo de pH	M
O	concentração de oxigénio na fase gasosa	ML^{-3}
P	vector das pressões parciais	
\dot{Q}	caudal de líquido	L^3T^{-1}
R	raio do floco	L
T	temperatura	θ
V_f	volume de um floco	L^{-3}
V_R	volume efectivo do bioreactor	L^{-3}
V_r	volume disponível para reacção	L^{-3}
$Y_{X/E}$	coeficiente de rendimento biomassa/etanol	
Y_{X/H^+}	coeficiente de rendimento biomassa/protões libertados	
$Y_{X/O}$	coeficiente de rendimento biomassa/oxigénio	
$Y_{X/S}$	coeficiente de rendimento biomassa/substrato	

LETRAS LATINAS MINÚSCULAS

a	coordenada radial (esfera, cilindro) ou axial (placa plana) do floco	L
a_j	área do floco j	L^{-2}
\bar{a}	área média de uma população de flocos	L^{-2}
\bar{a}_s	área média de um floco isolado	L^{-2}
c_i	concentração do componente i nos flocos	ML^{-3}
$c(a,t)$	concentração do soluto nos flocos na coordenada a e no tempo t	ML^{-3}
c_0	concentração inicial do soluto nos flocos	ML^{-3}
f	factor de geometria (1 - placa plana; 2 - cilindro infinito; 3 - esfera), -	

f_j^i	fragmentação do componente i no pico-base de massa j	
h	limiar	
i	valor da escala de cinzentos (de 0 a 255)	
k	factor de normalização	
k_L	coeficiente de transferência de massa gás/líquido para o oxigénio	LT^{-1}
m	ordem do multiplete	
m_b	massa das células existentes no floco	M
m_f	massa total do floco	M
m_l	massa do meio líquido existente nos poros do floco	M
n	número de objectos com área x	
n	número de flocos no bioreactor	
n_d	número total de dupletos	
n_i	número de <i>pixel</i> com o valor i	
n_j	número de flocos com a área a_j	
n_m	número total de multipletos	
n_t	número total de tripletos	
n_{tot}	número total de flocos	
p_i	pressão parcial do componente i	$ML^{-1}T^{-2}$
p_i	probabilidade do valor i	
p_1	parâmetro correspondente a $q_{O,max}$	T^{-1}
p_2	parâmetro correspondente a K_m	ML^{-3}
$q_{biomassa}$	taxa específica de crescimento de biomassa	T^{-1}
q_C	taxa específica de produção de dióxido de carbono	T^{-1}
q_E	taxa específica de produção de etanol	T^{-1}
q_{etanol}	taxa específica de produção de etanol	T^{-1}
qH^+	taxa específica de produção/consumo de prótons	T^{-1}
q_i	taxa específica de produção/consumo do componente i	T^{-1}
qN	taxa específica de consumo de azoto	T^{-1}
q_{NH3}	taxa específica de formação de amónia	T^{-1}
q_n	raízes positivas não nulas de:	
	$\tan q_n = -\alpha q_n$	para $f=1$
	$\alpha q_n J_0(q_n) + 2 J_1(q_n) = 0$	para $f=2$
	$\tan q_n = 3 q_n / (3 + \alpha q_n^2)$	para $f=3$
onde	$J_0(x)$ é a função de Bessel do primeiro tipo e de ordem 0	
	$J_1(x)$ é a função de Bessel do primeiro tipo e de ordem 1	
q_O	taxa específica de consumo de oxigénio	T^{-1}
q_S	taxa específica de consumo de substrato	T^{-1}
r_i	velocidade/taxa de reacção global para o componente i	$ML^{-3}T^{-1}$

t	tempo	T
u	razão entre a massa total de uma célula e o seu peso seco	
x	área do objecto	L^2
$y_{ent,i}$	fracção molar (ou volúmica) do componente i na corrente gasosa de entrada	
$y_{sai,i}$	fracção molar (ou volúmica) do componente i na corrente gasosa de saída	

LETRAS GREGAS MAIÚSCULAS

Φ	módulo de Thiele	
Z_i	concentração adimensional do componente i no meio ($C_i/C_{S,F}$)	

LETRAS GREGAS MINÚSCULAS

α	razão de volumes líquido/sólido	
α_1	coeficiente externo de transferência de massa (substrato) modificado ($K_{c,S} \cdot a \cdot \epsilon_p / \epsilon_r$)	T^{-1}
α_2	coeficiente externo de transferência de massa (oxigénio) modificado ($K_{c,O} \cdot a \cdot \epsilon_p / \epsilon_r$)	T^{-1}
α_3	coeficiente de transferência de massa gás/líquido (oxigénio) modificado ($k_L \cdot a \cdot \epsilon_p / \epsilon_r$)	T^{-1}
δ_i	parâmetro adimensional relativo ao componente i ($D_{e,i} / D_{e,S}$)	
ϵ_g	fracção da fase gasosa	
ϵ_l	fracção da fase líquida	
ϵ_p	porosidade dos flocos	
ϵ_r	porosidade do leito	
ϵ_s	fracção da fase sólida (flocos)	
η	factor de eficiência	
η_0, η_I	momentos cumulativos de ordem 1 do histograma de valores da escala de cinzentos	
φ	taxa específica de crescimento de biomassa (adimensional)	
μ	taxa específica de crescimento de biomassa	T^{-1}
μ_i	taxa específica de crescimento de biomassa no componente i	T^{-1}
ρ_f	massa específica dos flocos	ML^{-3}
ρ_l	massa específica do meio líquido	ML^{-3}
ρ	coordenada radial do floco (adimensional) (r/R)	
σ	desvio padrão	
σ_s	desvio padrão da área média de um floco isolado	L^2
τ	tempo adimensional ($t \cdot D_e / (\epsilon_p \cdot R^2)$)	
τ_M	tempo adimensional modificado ($t \cdot D_{e,S} / (\epsilon_p \cdot R^2)$)	
ξ_i	concentração adimensional do componente i no floco ($c_i / C_{S,F}$)	
ω_0, ω_I	momentos cumulativos de ordem 0 do histograma de valores da escala de cinzentos	

EXPOENTES

<i>ad</i>	com aditivo de floculação
<i>f</i>	fermentativo
<i>r</i>	respiratório
<i>sat</i>	saturação

ÍNDICES

<i>E</i>	etanol
<i>E1</i>	etanol, com inibição pela glucose
<i>E2</i>	etanol, utilizando a capacidade respiratória remanescente
<i>ent</i>	entrada
<i>F</i>	na alimentação
<i>max</i>	máximo
<i>O</i>	oxigénio
<i>R</i>	à superfície do floco
<i>req</i>	requerido para respiração em glucose
<i>S</i>	substrato/glucose
<i>sai</i>	saída
<i>X</i>	biomassa
<i>X_v</i>	biomassa viável

SIGLAS

<i>AD</i>	alta densidade
<i>AND</i>	ácido desoxirribonucleico
<i>ATCC</i>	American Type Culture Collection
<i>BD</i>	baixa densidade
<i>CBS</i>	Centraal Bureau voor Schimmelcultures
<i>CMC</i>	carboximetilcelulose
<i>DNS</i>	ácido 3,5-dinitrosalicílico
<i>EDO</i>	equação diferencial ordinária
<i>EDP</i>	equação às derivadas parciais
<i>EDTA</i>	ácido etileno-diamino-tetracético
<i>GC</i>	gas chromatography
<i>GIDH</i>	glutamato desidrogenase
<i>HPLC</i>	high pressure liquid chromatography
<i>I.C.</i>	intervalo de confiança
<i>MF</i>	Magna Flocc LT-25

<i>NRRL</i>	Northern Regional Research Laboratory (actualmente Northern Utilization Research and Development Division)
<i>NAD⁺</i>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
<i>NADH</i>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen
<i>PTN</i>	pressão e temperatura normais (1 atm e 0 °C)
<i>r.p.m.</i>	rotações por minuto
<i>SQR</i>	soma dos quadrados dos resíduos
<i>YM</i>	yeast medium

NOTAS

- Por questões de legibilidade, a letra *L* (maiúscula) foi preferida à letra *l* (minúscula) para designar a unidade *litro*;
- As unidades utilizadas são as do Sistema Internacional (S.I.); no entanto, uma vez que não é vulgar em Biotecnologia o seu uso em termos das unidades fundamentais, optou-se por utilizar, em várias ocasiões, os seus múltiplos ou submúltiplos; a utilização de outras unidades que não fazem parte do referido Sistema (a hora, *h*, por exemplo), está devidamente assinalada.

1. Introdução

Sumário

No presente capítulo pretende-se orientar o leitor para o tema deste trabalho. Faz-se uma referência breve ao conceito de Biotecnologia para, seguidamente, situar o trabalho na área das Ciências de Engenharia, nomeadamente no âmbito do estudo de sistemas de células imobilizadas, dos quais as culturas floculantes são parte integrante.

Por fim referem-se os principais objectivos do trabalho e faz-se uma descrição da organização da tese.

A utilização de microorganismos na produção de bens e serviços é uma prática corrente desde há milénios. Em 4000 a.C. já os Egípcios produziam pão e cerca de 3000 a.C. surgiam a cerveja, o vinho e outras bebidas fermentadas. Mais recentes, o queijo e o iogurte são outros dois exemplos de produtos consumíveis resultantes da actividade microbiana. No entanto, foi apenas no final do sec. XIX, com os trabalhos de Pasteur sobre a fermentação, que se iniciou o estudo sistemático dos microorganismos e dos processos em que estão envolvidos assistindo-se, conseqüentemente, a uma grande diversificação da utilização tanto desses microorganismos como dos seus constituintes.

Além dos já citados exemplos na área alimentar, a produção de antibióticos, proteínas, álcoois, ácidos orgânicos e biogás, assim como o tratamento biológico de efluentes são aplicações que se foram tornando comuns a nível industrial. Tal diversidade de processos confere-lhes uma grande importância económica o que conduziu à necessidade de integrar conhecimentos de diversas áreas do Saber para permitir o seu desenvolvimento, quer a nível científico quer a nível tecnológico.

Surgiu, então, a palavra **Biotechnologia** para designar “a integração das Ciências Naturais e das Ciências de Engenharia com vista à aplicação industrial de organismos, células, partes destas e seus análogos moleculares para a obtenção de bens e serviços”, segundo a definição proposta pela *European Federation of Biotechnology* (1994) citada por Ferreira (1995).

No campo das Ciências Naturais destaca-se a Biologia Molecular, cujo acentuado desenvolvimento registado nas últimas décadas impulsionou de forma decisiva a Biotechnologia. Aquele campo é especialmente útil nas fases iniciais de um processo biotecnológico, particularmente quando se trata de seleccionar, transformar ou preservar as estirpes microbianas nele intervenientes.

As Ciências de Engenharia ocupam-se essencialmente dos reactores biológicos (ou *bioreactores*, como serão designados ao longo deste trabalho) e do processamento dos efluentes do reactor. Os primeiros constituem o núcleo de um processo biotecnológico pois é lá que se dão as transformações necessárias à conversão das matérias-primas em produtos; a caracterização dos fenómenos de transferência que aí têm lugar assim como a monitorização e controlo do seu funcionamento são fundamentais para a optimização do

processo produtivo (Ferreira 1995) mas devem ser precedidas de um aperfeiçoamento do projecto, podendo conseguir-se melhorias significativas em termos da produtividade do processo (Vicente *et al.* 1997). O processamento dos efluentes a jusante do reactor tem em vista a recuperação da maior quantidade possível do produto desejado minimizando, simultaneamente, a presença de impurezas, recorrendo a operações unitárias tais como a centrifugação, a sedimentação, a filtração, a extracção, a cromatografia ou a secagem (Venâncio 1996).

Situando-se na área das Ciências de Engenharia, este trabalho vai debruçar-se sobre o tema dos bioreactores de floculação e sobre os fenómenos de transferência que neles têm lugar, mormente aqueles que envolvem a fase sólida (flocos), não descurando a parte respeitante ao projecto de reactores.

1.1 Sistemas de células immobilizadas - utilização de organismos floculantes

Os sistemas de células immobilizadas têm sido utilizados com frequência crescente com o objectivo de aumentar a quantidade de biocatalizador presente num bioreactor para permitir incrementos na produtividade do processo.

De entre os sistemas de células immobilizadas, aqueles que utilizam estirpes floculantes (Abate *et al.* 1996, Kida *et al.* 1992, Roca *et al.* 1995, Sousa *et al.* 1994 e Teixeira *et al.* 1990) permitem efectuar a reciclagem de células simplesmente tirando partido da sua sedimentação, que ocorre naturalmente. Esta é uma técnica extremamente interessante devido aos baixos custos que lhe estão associados, aliados à sua simplicidade. De facto, quer os custos de construção de alguns dos bioreactores de floculação, quer os custos energéticos são menores quando comparados com outros sistemas (Sousa *et al.* 1994). Além disso, o uso de culturas floculantes pode dar contribuições importantes para o desenvolvimento dos processos de separação em fermentação: além de constituir uma técnica menos agressiva do que outras já existentes, permite diminuir os custos de produção pois a quantidade de células a separar posteriormente por centrifugação ou filtração é significativamente reduzida (Teixeira e Mota 1992).

Recentemente foi utilizado um sistema de alta densidade celular com uma estirpe floculante geneticamente manipulada de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de proteínas heterólogas (Domingues 1996).

Aplicações como esta têm surgido cada vez com mais frequência, pelo que é muito importante acompanhar esta tendência com o desenvolvimento de novos bioreactores capazes de albergar as estirpes que vão sendo desenvolvidas, adequando-os às características destas, por um lado, e recolhendo informações que permitam a posterior passagem para a escala industrial, por outro.

Pretende-se dar um contributo para o estudo de microorganismos floculantes e para melhor compreensão dos fenómenos físicos que lhes estão associados, aplicando aos sistemas biológicos conceitos importados da Engenharia Química que, no entanto, se ajustam muito bem às situações em que são utilizados.

1.2 Objectivos específicos

Num estudo anterior foi proposto um novo bioreactor de floculação com circulação por arejamento (*airlift*), de circulação interna, tendo sido comparado a diversos níveis com um bioreactor de recirculação externa forçada, no decurso de fermentações alcoólicas utilizando uma estirpe altamente floculante de *Saccharomyces cerevisiae*. Foi caracterizada a agressividade abrasiva do bioreactor *airlift* sobre partículas de alginato de cálcio e estudado o efeito da presença de um aditivo de floculação em flocos de levedura, bem como o arranque de fermentações (Sousa 1994).

O presente trabalho surge no seguimento desta linha de investigação e insere-se na perspectiva de uma aproximação tecnológica. Assim, teve como primeiros objectivos a optimização do projecto do bioreactor existente no sentido de melhorar as suas características hidrodinâmicas para operação com sistemas trifásicos em presença de sólidos e o estudo e modelização dos mecanismos de transferência de massa (de glucose e oxigénio) em flocos de levedura (a mesma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada por Sousa (1994)), para o que houve a necessidade de desenvolver novos métodos de análise. Tendo atingido estes objectivos, foi possível, posteriormente, introduzir alterações no projecto do tubo interno do bioreactor *airlift* tendo em vista o aumento da eficiência do

processo fermentativo quer em termos de conversão de glucose quer em termos de produtividade em etanol.

1.3 Estrutura da Tese

No presente capítulo pretendeu-se orientar o leitor para o tema deste trabalho, referindo também os seus objectivos principais.

O capítulo 2 constitui uma revisão bibliográfica ao tema dos bioreactores de floculação. Apresenta-se brevemente um sistema de classificação de técnicas de imobilização, nas quais se integra a floculação, e faz-se uma descrição sumária das configurações mais comuns para reactores trifásicos, apontando as suas principais vantagens e inconvenientes. Dá-se especial relevo aos bioreactores do tipo *airlift*, fazendo-se também uma referência ao fenómeno da floculação. São abordados temas como o projecto dos reactores e a influência da presença de uma fase sólida bem como a caracterização dos mecanismos de transferência de massa quer da fase gasosa para a fase líquida, quer desta para a fase sólida (flocos) e vice-versa. Termina-se com uma revisão das aplicações mais significativas deste tipo de sistemas.

No capítulo 3 descrevem-se os métodos de análise mais convencionais bem como a instrumentação utilizada durante a execução do trabalho experimental. Foram excluídas deste capítulo duas metodologias desenvolvidas durante a progressão do presente estudo que, dado o seu carácter específico e inovador, merecem uma descrição mais detalhada.

As duas metodologias às quais se fez referência no parágrafo anterior são a análise de imagem por computador (aplicada essencialmente à avaliação da distribuição de tamanhos de flocos de levedura) e a determinação de coeficientes de difusão nos flocos; estes dois métodos estão descritos no capítulo 4.

O capítulo 5 trata da influência da carga de sólidos, da sua massa específica e das dimensões do tubo interno nos tempos de mistura e circulação da fase líquida e no caudal de arejamento crítico num bioreactor *airlift* com zona de decantação. Com os resultados obtidos, foi possível melhorar as características de mistura e circulação no bioreactor, tendo em vista a sua posterior utilização com flocos de levedura.

No capítulo 6 são determinados a difusividade efectiva (D_e) e o coeficiente externo de transferência de massa (K_c) em flocos de *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizam-se uma célula de difusão modificada e um método de análise de imagem por computador, previamente desenvolvidos (apresentados no capítulo 4), concebidos para minimizar a destruição dos flocos. D_e e K_c são calculados por dois métodos distintos: um método analítico, baseado nas soluções da lei de Fick e um método numérico, baseado em balanços de massa globais aos componentes nos flocos e na solução.

A existência de limitações à transferência de substratos para e no interior de flocos de levedura vai condicionar o comportamento metabólico das células, com consequências no crescimento celular e na formação de produtos, pelo que têm sido utilizados aditivos poliméricos com o objectivo de reduzir essas limitações, com maior ou menor êxito. O conhecimento dos perfis de concentração e dos fluxos metabólicos da glucose e do oxigénio no interior dos flocos poderá trazer informações que permitam efectuar melhorias significativas no processo fermentativo, nomeadamente ao nível da produtividade. Medir esses perfis directamente é uma tarefa extremamente difícil, mas é possível simulá-los com base em algumas premissas e com o conhecimento dos valores da difusividade efectiva dos solutos em questão, entretanto determinados. É o resultado dessas simulações que se apresenta no capítulo 7, considerando diferentes tamanhos de flocos, diferentes concentrações dos substratos no meio e a presença ou ausência de um aditivo polimérico.

No capítulo 8 estuda-se o efeito da introdução de agitadores estáticos no tubo interno do bioreactor *airlift*. Estes permitiram aumentar significativamente a produtividade do sistema em etanol durante a fermentação de glucose pela estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae*. A principal função dos agitadores consistiu em diminuir o tamanho médio dos flocos, quando comparado com o do sistema original, reduzindo as limitações difusionais a que estes estavam sujeitos (tal como se concluíra no capítulo anterior). Comparam-se os resultados obtidos com ambos os sistemas, em estado estacionário, para várias taxas de diluição, em termos de taxas específicas de consumo de glucose e de produção de etanol e da produtividade em etanol. Nos cálculos, utilizam-se conceitos de catálise heterogénea que permitem considerar a presença de flocos porosos.

Uma vez optimizado o desenho do bioreactor *airlift* para operar com leveduras floculantes e melhorada a produtividade do sistema em consequência dos estudos

desenvolvidos em torno dos flocos de levedura, o capítulo 9 faz uma incursão no tema da monitorização de fermentações utilizando leveduras. Recentemente, a quantidade de reagente de controlo de pH (ácido ou base) consumido em fermentações com leveduras foi relacionada com a via metabólica de assimilação do azoto utilizada, em condições respiratórias, não havendo contribuição para o consumo daquele reagente por parte do metabolismo do carbono (Castrillo *et al.* 1995). Neste trabalho fazem-se experiências em condições respiro-fermentativas que mostram que a produção/consumo de etanol não contribui significativamente para a taxa específica de produção de protões (qH^+), sendo possível estender as relações previamente obtidas a todos os tipos de metabolismo, desde que não existam outras contribuições de partículas ácidas ou básicas. Testes efectuados em contínuo e descontínuo confirmam a validade de qH^+ como parâmetro de controlo em fermentações aeróbias.

No capítulo 10 resumem-se as principais conclusões que foi possível extrair das investigações efectuadas no decurso desta tese e avançam-se algumas propostas para trabalhos futuros.

1.4 Bibliografia

- Abate, C., Callieri, D., Rodríguez, E. e Garro, O., 1996. Ethanol Production by a Mixed Culture of Flocculent Strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 580-583.
- Castrillo, J. I., de Miguel, I. e Ugalde, U. O., 1995. Proton Production and Consumption Pathways in Yeast Metabolism. A Chemostat Culture Analysis. *Yeast*, 11, 1353-1365.
- Domingues, L., 1996. Dissertação de Mestrado: *Construção e Caracterização de Estirpes Floculantes de Saccharomyces cerevisiae Capazes de Utilizar Lactose*. Braga: Departamento de Engenharia Biológica da Escola de Engenharia da Universidade do Minho.
- Ferreira, E. M. F. C., 1995. Dissertação de Doutoramento: *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Kida, K., Kume, K., Morimura, S. e Sonoda, Y., 1992. Repeated-Batch Fermentation Process Using a Thermotolerant Flocculating Yeast Constructed by Protoplast Fusion. *J. Fermentation Bioeng.*, 47, 169-173.
- Roca, E., Ghommidh, C., Navarro, J. M. e Lema, J. M., 1995. Hydraulic Model of a Gas-Lift Bioreactor with Flocculating Yeast. *Bioprocess Eng.*, 12, 269-272.
- Sousa, M. L. M., 1994. Dissertação de Doutoramento: *Estudo e Desenvolvimento de Bioreactores de Floculação*. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Sousa, M. L., Mota, M. e Teixeira, J. A., 1994. Influence of Operational Parameters on the Start-up of a Flocculation Airlift Bioreactor. *Col. Surf. B: Biointerfaces*, 2, 181-188.

- Sousa, M. L., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1994. Comparative Analysis of Ethanolic Fermentation in Two Continuous Flocculation Bioreactors and Effect of Flocculation Additive. *Bioprocess Eng.*, 11, 83-90.
- Teixeira, J. A. e Mota, M., 1992. Flocculation Bioreactors. In: T. G. Villa and J. Abalde, eds. *Profiles on Biotechnology*. Espanha: Servicio de Publicaciones, Universidade de Santiago, 1992, 413-428.
- Teixeira, J. A., Mota, M. e Goma, G., 1990. Continuous Ethanol Production by Flocculating Strain of *Kluyveromyces marxianus*: Bioreactor Performance. *Bioprocess Eng.*, 5, 123-127.
- Venâncio, A. A. D., 1996. Dissertação de Doutoramento: *Caracterização de Novos Sistemas para Partição Bifásica Aquosa de Biomoléculas*. Braga: Departamento de Engenharia Biológica da Escola de Engenharia da Universidade do Minho.
- Vicente, A. A., Dluhý, M. e Teixeira, J. A., 1997. Increase of Ethanol Productivity in an Airlift Bioreactor with a Modified Draught Tube (submetido).

2. Bioreactores de floculação

Sumário

Este capítulo constitui uma revisão bibliográfica ao tema dos bioreactores de floculação. Apresenta-se brevemente uma classificação de técnicas de imobilização, nas quais se integra a floculação, e faz-se uma descrição sumária das configurações mais comuns para bioreactores trifásicos, apontando as suas principais vantagens e inconvenientes. Dá-se especial relevo aos bioreactores do tipo *airlift*, fazendo-se também uma referência ao fenómeno da floculação. São abordados temas como o projecto dos reactores e a influência da presença de uma fase sólida bem como a caracterização dos mecanismos de transferência de massa quer da fase gasosa para a fase líquida, quer desta para a fase sólida (flocos) e vice-versa. Termina-se com uma revisão das aplicações mais significativas deste tipo de sistemas.

2.1 Técnicas de imobilização

Um dos principais objectivos da Engenharia de Bioprocessos é aumentar a produtividade dos processos biotecnológicos, tendo-se registado grandes progressos a esse nível nas últimas décadas. Sistemas baseados em fermentações (entendidas no sentido lato, isto é, referindo-se tanto a processos anaeróbios como aeróbios) não constituem excepção e, no sentido de atingir aqueles objectivos, têm sido propostos e estudados sistemas de alta densidade celular (Doran e Bailey 1986a, Galazzo e Bailey 1990, Gikas e Livingston 1993, Kuriyama *et al.* 1993 e Laplace *et al.* 1993). Estes sistemas têm sido alvo de um interesse crescente uma vez que se revelaram uma alternativa bastante promissora à tradicional fermentação com células em suspensão (Sousa *et al.* 1994a). De facto, são possíveis aumentos na produtividade, na concentração de produtos à saída e na conversão de matérias-primas (Gianetto *et al.* 1988, Katzbauer *et al.* 1995 e Roca *et al.* 1995) uma vez que uma maior concentração de biomassa (biocatalisador) está presente, em cada instante, no bioreactor e, tratando-se de operações em contínuo, é suplantada a restrição segundo a qual a taxa de diluição não pode ultrapassar a taxa específica máxima de crescimento do microorganismo (Bailey e Ollis 1986).

As aplicações são muito variadas podendo citar-se, a título de exemplo e apenas para referir algumas das áreas mais representativas, a produção de etanol (Gianetto *et al.* 1988, Gough *et al.* 1997, Oliveira *et al.* 1997, Siimes e Links 1995 e Xu *et al.* 1996), cerveja (Masschelein 1997 e Šmogrovicová *et al.* 1997) e antibióticos (Acai *et al.* 1995) e o tratamento de águas residuais (Tijhuis *et al.* 1994 e Ulonska *et al.* 1995).

A lista de técnicas de imobilização é já bastante extensa o que levou Katzbauer *et al.* (1995) a propor um sistema de classificação baseado em três critérios, cada qual dividido em grupos como se apresenta na Tabela 2.1.

Muito do esforço de investigação nesta área tem sido dedicado à oclusão de células em suportes de κ -carragenato, alginato de cálcio, gelatina e outros bio-polímeros. Estes sistemas podem classificar-se, de acordo com a Tabela 2.1, como pertencendo aos grupos A2-B3-C1. Se a afectação aos grupos B3 e C1 não oferece dúvidas, já a determinação do padrão de fluxo do substrato ou produto pode colocar problemas. De facto, a existência de limitações à

transferência de massa na matriz do gel foi referida e investigada por vários autores (Li *et al.* 1996, Riley *et al.* 1995, Sato e Toda 1983, Tanaka *et al.* 1984 e Venâncio e Teixeira 1997); no entanto, apesar de essas limitações serem dependentes de factores tão diversos como o tipo e a concentração do polímero utilizado e o tamanho e a forma do suporte, tem sido aceite, de uma forma geral, que as referidas limitações existem e podem ser significativas, justificando a opção pelo grupo A2.

Tabela 2.1: Sistema de classificação para técnicas de imobilização (adaptado de Katzbauer *et al.* 1995).

Critérios	Grupos
A. Padrão de fluxo do substrato e do produto	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ausência de limitações à transferência de massa. 2. Limitações à transferência de massa devido ao catalisador. 3. Limitações à transferência de massa devido a outras fases.
B. Forças de imobilização	<ol style="list-style-type: none"> 1. Imobilização mecânica. 2. Imobilização por adsorção. 3. Oclusão.
C. Características do equipamento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Retenção do suporte no bioreactor. 2. Unidades externas de separação.

Os efeitos do processo de imobilização nas células imobilizadas foram examinados por vários investigadores. As propriedades cinéticas de células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em gelatina, por exemplo, são substancialmente diferentes das de células em suspensão; de facto, as taxas específicas de produção de etanol e de consumo de glucose aumentaram 40 a 50 % e 100 %, respectivamente, enquanto que a taxa específica de crescimento diminuiu cerca de 45 % (Doran e Bailey 1986a). Num outro trabalho (Doran e Bailey 1986b), os mesmos autores consideraram os efeitos de um inibidor da síntese de ADN em *Saccharomyces cerevisiae* e mostraram que a recuperação da actividade de síntese de ADN foi mais rápida em células imobilizadas do que em células em suspensão.

Galazzo e Bailey (1989) centraram-se nas consequências da imobilização no metabolismo da glucose por células de *Saccharomyces cerevisiae*, comparando as taxas de fermentação e a composição intracelular de células em suspensão e imobilizadas em

alginate. Mais tarde, aqueles autores mostraram ser possível acelerar a conversão de glucose em etanol fazendo crescer células de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes de alginato de cálcio (Galazzo e Bailey 1990).

Os dados cinéticos obtidos com células em suspensão não devem ser utilizados em modelos para sistemas de células imobilizadas assumindo que toda a biomassa é viável. De facto, Gikas e Livingston (1993) determinaram a viabilidade celular em bioreactores com células imobilizadas e em suspensão e encontraram nos primeiros uma fracção de células viáveis de apenas 5 %. Também Dale *et al.* (1990) abordaram este problema, referindo que “a fracção de células viáveis num bioreactor de células imobilizadas pode ser um factor crítico quando se pretende prever o desempenho do reactor a longo prazo ou em estado estacionário; assumir que a viabilidade celular é próxima de 100 % pode não ser válido em algumas partes de um bioreactor de células imobilizadas”.

Um modelo de parâmetros distribuídos para o processo de fermentação alcoólica foi desenvolvido por Elnashaie e Ibrahim (1991) considerando apenas culturas de células em suspensão; no entanto, o método utilizado permite a sua extensão ao caso de culturas de células imobilizadas. Ainda no campo dos modelos matemáticos, Petersen e Davison (1995) desenvolveram uma representação descritiva de um bioreactor trifásico de leito fluidizado com células imobilizadas. O mesmo tipo de reactor foi utilizado para desenvolver modelos cinéticos para a estabilidade de plasmídeos, crescimento celular e produção de proteína por células recombinantes imobilizadas em vidro poroso (Huang *et al.* 1997). de Gooijer *et al.* (1991) representaram por meio de um modelo o crescimento e o consumo de substrato por células de *Nitrobacter agilis* imobilizadas em κ -carragenato.

Um outro tipo de sistema de alta densidade celular consiste em imobilizar as células tirando partido das suas propriedades floculantes. Os conjuntos de células assim formados podem classificar-se, de acordo com o sistema apresentado na Tabela 2.1, como A2-B2-C1. De facto, neste caso, as partículas de catalisador (células) estão adsorvidas umas às outras formando agregados que normalmente se designam por **flocos**.

O trabalho de investigação neste tipo de sistemas ainda não é comparável ao que foi e está a ser desenvolvido com as técnicas de imobilização em bio-polímeros atrás referidas, estando ainda numa fase mais prematura.

2.2 Configuração de reactores trifásicos

Os biocatalisadores imobilizados (células, enzimas, protoplastos, organelos) podem ser empregues em vários tipos de reactor, dependendo da técnica de imobilização bem como do processo no qual vão ser utilizados.

A seguir considerar-se-ão as configurações de bioreactores trifásicos mais comuns, nomeadamente as de tanque agitado, leito fixo, leito fluidizado, coluna de bolhas e circulação por arejamento (*airlift*), tal como se representa na Figura 2.1.

Existem outros tipos de sistemas tais como reactores de fibras ocas e módulos de membranas enroladas em espiral (Moo-Young e Chisti 1994), mas constituem aplicações bastante específicas pelo que já se situam um pouco fora do âmbito deste sub-capítulo.

2.2.1 Tanque agitado

O tanque agitado é o tipo de bioreactor mais utilizado em processos industriais (Asenjo e Merchuk 1995) (Figura 2.1 A). O agitador desempenha várias funções em simultâneo: auxilia a transferência de massa e calor, agita e homogeniza as suspensões. Isto significa que a escolha de um agitador para uma dada situação será sempre uma solução de compromisso.

Estes reactores apresentam vantagens importantes quando aplicados à escala industrial; além de serem o tipo de reactor mais estudado e, por isso, sobre o qual existe mais informação disponível, permitem um controlo muito fácil da dispersão de gás e da agitação do meio por simples alteração da velocidade do agitador, que é o responsável por uma dispersão de gás eficiente e pela possibilidade de empregar este tipo de fermentador em fermentações com meios muito viscosos. Como a regulação do caudal de arejamento é feita essencialmente em função das necessidades de oxigénio (e não tanto para auxiliar a agitação ou para induzir a circulação do meio, como é o caso noutros tipos de bioreactor), é possível trabalhar com caudais de arejamento reduzidos (Asenjo e Merchuk 1995).

Apesar das vantagens atrás mencionadas, este reactor apresenta uma baixa eficiência de transferência de oxigénio e necessita de grande potência de agitação que, por sua vez, gera grandes quantidades de calor cuja remoção do sistema pode ser problemática. Além disso, o tipo de agitação cria no meio tensões de corte elevadas o que torna estes bioreactores inapropriados para o cultivo de células ou agregados sensíveis a esse tipo de forças. Por

último, os custos de construção e manutenção do equipamento são elevados, especialmente devido às selagens mecânicas que o compõem e à já referida grande potência de agitação de que necessitam.

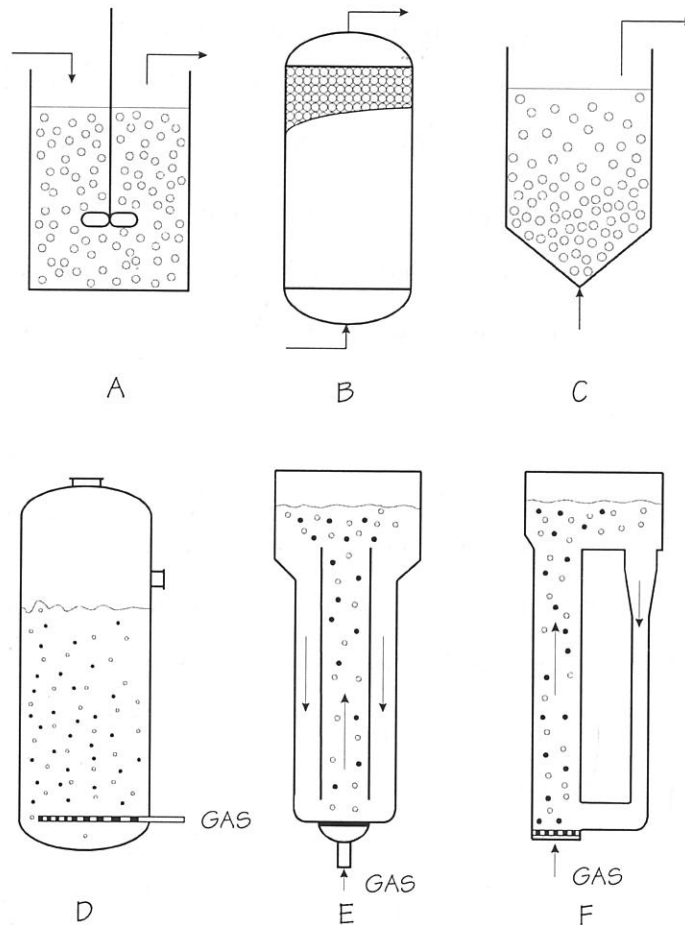


Figura 2.1: Configurações mais comuns de bioreactores trifásicos.

2.2.2 Leito fixo

O leito fixo é, sem dúvida, o tipo de reactor de células imobilizadas mais utilizado (Asenjo e Merchuk 1995). Caracteriza-se por um movimento constante do substrato através de um leito de células imobilizadas (Figura 2.1 B). Esta característica permite obter velocidades de reacção elevadas pois a concentração de substrato é significativa. Por outro lado, devido à baixa velocidade de circulação de fluido, as resistências à transferência de massa e de calor são elevadas.

Estes reactores têm um funcionamento simples mas não constituem a melhor opção no caso de sistemas com células vivas que requerem, em geral, uma boa eficiência de transferência de massa gás-líquido, que é difícil de obter em reactores deste tipo. Além disso, se as células estiverem imobilizadas sob a forma de flocos, a compactação do leito é muito provável devido à fraca resistência dos agregados, que muito dificilmente suportariam a pressão sobre eles exercida. Os leitos fixos apresentam também outros problemas como a oclusão de metabolitos gasosos, bastante comum em sistemas de fermentação arejados.

2.2.3 Leito fluidizado

O reactor de leito fluidizado (Figura 2.1 C) constituiu uma tentativa de atenuar os problemas apresentados pelos leitos fixos, relacionados com dificuldades de obter uma boa mistura e com a libertação de dióxido de carbono e outros gases (Vieth 1994). De facto, como se pode efectuar a fluidização do leito com líquido, gás ou uma mistura de ambos, os reactores de leito fluidizado apresentam uma boa mistura e boas características de transferência de calor e de massa, com quedas de pressão mínimas (Asenjo e Merchuk 1995).

A diferença de densidades entre as fases sólida e fluida deve ser o maior possível por forma a permitir velocidades elevadas de circulação do fluido que, por sua vez, vão melhorar as condições de mistura e de transferência de calor e massa no reactor. O problema surge, porém, quando a fase sólida é constituída por células imobilizadas em partículas de bio-polímeros (o caso mais comum) ou por flocos, pois estes sólidos têm densidades com valores muito próximos da maioria dos meios de fermentação utilizados, agravando as condições de mistura e de transferência dentro do bioreactor uma vez que a velocidade de fluidização será, nesse caso, bastante baixa.

Uma excelente revisão sobre este tipo de bioreactor é feita por Gòdia e Solà (1995).

2.2.4 Coluna de bolhas

Uma coluna de bolhas é um reactor muito simples e barato, desenhado sobretudo para proporcionar o contacto entre as fases líquida e gasosa. Não possui partes móveis e consiste essencialmente num vaso de reacção com um distribuidor de gás montado na secção inferior (Figura 2.1 D).

O fluxo numa coluna de bolhas é determinado pelas bolhas originadas no distribuidor, sendo relevantes quer os mecanismos de oclusão de líquido nos vórtices causados pelas bolhas de gás ascendentes quer os fluxos circulatórios gerados na maior parte das condições de operação (Vieth 1994). Estes mecanismos afectam os padrões de fluxo dentro do bioreactor influenciando o tipo e o grau de mistura que se pode obter. Se a transferência de massa gás-líquido apresenta valores razoáveis, o mesmo já não acontece nos casos das transferências líquido-líquido e líquido-sólido pois a mistura é, em geral, deficiente.

Numa coluna de bolhas é possível suspender partículas com biocatalisadores imobilizados devido à pequena diferença de densidades entre a fase sólida e a fase fluida. Além disso, as colunas de bolhas proporcionam um ambiente de baixas tensões de corte que é apropriado para processos envolvendo microorganismos. No entanto, as limitações em termos da transferência de massa líquido-líquido e líquido-sólido, atrás referidas, impedem o uso deste tipo de bioreactor em muito grande escala pois os gradientes de concentração na fase fluida tornar-se-iam muito significativos.

2.2.5 Reactor de circulação por arejamento (*airlift*)

Por uma questão de simplicidade e porque é o termo mais utilizado e conhecido, adoptar-se-á ao longo deste trabalho a designação anglo-saxónica *airlift* para designar este tipo de bioreactor.

Um *airlift* consiste basicamente numa coluna de bolhas dividida em duas secções distintas (Figura 2.1 E, F), sendo numa delas injectado gás (tubo ascendente ou *riser*) que se liberta na parte superior, ficando a outra (tubo descendente ou *downcomer*) desgaseificada (na maior parte dos casos). Consegue-se assim um decréscimo na densidade do fluido do tubo ascendente em relação ao do tubo descendente, provocando a sua circulação: de baixo para cima, no tubo ascendente e em sentido inverso, no tubo descendente.

Dependendo da colocação do anteparo entre os tubos ascendente e descendente, os reactores *airlift* designar-se-ão de circulação interna (Figura 2.1 E) ou de circulação externa (Figura 2.1 F). No caso dos reactores *airlift* de circulação interna as duas configurações mais comuns são a de tubos concêntricos (Figura 2.2 A) e a de corpo dividido (Figura 2.2 B). No caso dos reactores *airlift* de circulação externa esta dá-se em dois tubos verticais separados

Os bioreactores *airlift* são conhecidos, tal como as colunas de bolhas, pelo baixo valor das tensões de corte associadas ao fluxo da fase fluida, pelo que são adequados para processos envolvendo microorganismos imobilizados (Chang *et al.* 1993 e Kennard e Janekeh 1991). Além disso, o campo de tensões de corte no interior dos reactores *airlift* é relativamente constante quando comparado com reactores do tipo coluna de bolhas ou tanque agitado (Siegel e Merchuk 1991) e, devido às características do fluxo no seu interior, a capacidade de transferência de calor e massa é aumentada ao mesmo tempo que se diminui a energia consumida para agitação.

2.3 Selecção de um bioreactor

Para seleccionar o tipo de bioreactor mais adequado para um determinado processo são necessários estudos de mistura, de transferência de calor e massa entre as fases em presença e de custos de construção, operação e manutenção.

É possível, no entanto, simplificar o processo de escolha. De facto, de entre as configurações de bioreactores aqui mencionadas, os reactores de leito fixo e de leito fluidizado apresentam características tão diferentes das restantes que uma decisão a seu respeito não é difícil de tomar. van't Riet e Tramper (1991) sugerem algumas regras práticas para orientar uma escolha entre o tanque agitado, a coluna de bolhas e o *airlift*:

- se a viscosidade do meio for superior a $0,1 \text{ N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ (por exemplo em fermentações onde há crescimento de micélios) deve utilizar-se um tanque agitado pois as colunas de bolhas e os *airlift* não têm boas características de transferência de massa gás-líquido para aqueles valores de viscosidade;
- se for necessária flexibilidade no que diz respeito à viscosidade do meio e ao arejamento então será necessário, novamente, um tanque agitado pois nem a coluna de bolhas nem o *airlift* são suficientemente flexíveis no que se refere a essas propriedades;
- se se pretende realizar uma fermentação com meio pouco viscoso e a grande escala ($50 \text{ a } 500 \text{ m}^3$) deve empregar-se uma coluna de bolhas pois é o tipo de reactor mais barato;

- se a fermentação tiver lugar a uma escala ainda maior (200 a 10000 m³) a opção deverá recair sobre um *airlift* porque permite adições locais de substrato; um tanque agitado necessitaria de um poder de agitação muito elevado (> 1 MW) para reactores de volume superior a 500 m³.

As considerações acima, no entanto, não foram feitas tendo em conta a presença de sólidos tais como agregados celulares (flocos) ou partículas contendo células imobilizadas. Especialmente os primeiros são não só muito sensíveis a tensões de corte elevadas (Vicente *et al.* 1996 e Vicente *et al.* 1997), como as que se encontram em tanques agitados, mas também não suportam pressões elevadas, como as que se geram num leito fixo. Por estes motivos não se recomenda a utilização de tanques agitados e leitos fixos como bioreactores de floculação, apesar de poderem ser utilizados com outros sistemas de células imobilizadas, mecanicamente mais resistentes. O reactor de leito fluidizado, por sua vez, também não é o mais adequado para culturas floculantes devido à pequena diferença de densidades entre as fases líquida e sólida, atrás discutida. No entanto, se o sistema de imobilização fornecer partículas mais densas, então recomenda-se o uso de um reactor deste tipo (Bejar *et al.* 1992).

Até este ponto apresentaram-se as vantagens e os inconvenientes de vários tipos de reactores, fazendo já uma breve referência à sua possível utilização como bioreactores de floculação. Os tanques agitados e os reactores de leito fixo e fluidizado foram considerados menos apropriados para albergar culturas de microorganismos floculantes, embora tenham sido já utilizados em tais aplicações (Bejar *et al.* 1992, Kuriyama *et al.* 1993 e Wieczorek e Michalski 1994). Assim, reactores em que a potência de agitação (para além do arejamento) é fornecida pela injeção de gás (colunas de bolhas e *airlift*) estão melhor adaptados às condições de cultura requeridas por microorganismos floculantes apresentando, ainda, outras vantagens em relação aos restantes bioreactores, enunciadas por Michalski (1992):

- são de construção mais simples e mais barata;
- a sua manutenção é simples porque não possuem partes móveis;
- as tensões de corte locais máximas são muito menos intensas do que em outros tipos de bioreactor;

- a dispersão de gás é bastante eficiente.

2.4 Floculação

As propriedades apresentadas pelas células são o resultado da interacção permanente de factores como o ambiente, a nutrição e o controlo genético; no caso particular das leveduras, os efeitos daqueles factores na parede celular são os principais responsáveis pela formação de agregados - **floculação**. Em contrapartida, os flocos vão ser os causadores de alterações nas condições ambientais (Figura 2.3).

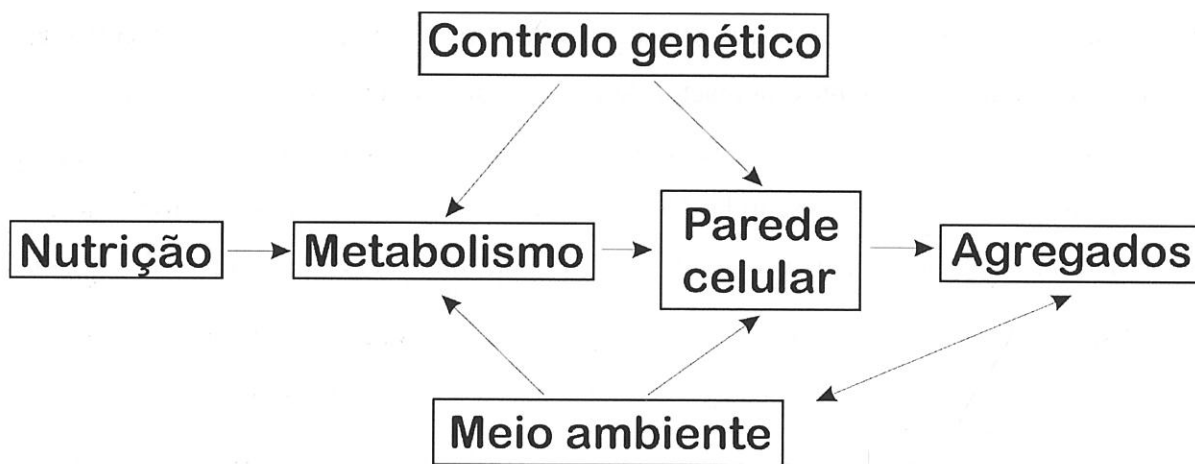


Figura 2.3: Factores que afectam a formação de flocos (adaptado de Atkinson e Daoud 1976).

O estudo dos mecanismos de floculação tem-se centrado em leveduras do género *Saccharomyces* devido à importância capital que aqueles organismos têm na indústria cervejeira (Dengis *et al.* 1995 e Teixeira 1988), embora existam trabalhos realizados com outros microorganismos (Abate *et al.* 1996, Ananta *et al.* 1995, Libicki *et al.* 1988 e Pereboom *et al.* 1990).

Apesar da abundância de trabalhos publicados sobre o tema da formação de agregados celulares, ainda não existe uma interpretação cabal para o fenómeno, pois este é um processo muito complexo que depende de factores tão variados como as características da estirpe microbiana (crescimento, estado fisiológico e metabolismo), a composição do meio de cultura e as condições de cultivo (temperatura, agitação e arejamento) (Dengis *et al.* 1995).

Entre os vários mecanismos que já foram propostos para descrever a floculação, aquele que é melhor aceite baseia-se no reconhecimento de receptores (mananos) de uma célula por lectinas de outra célula adjacente, sendo este processo induzido pela presença de iões cálcio (Miki *et al.* 1992 e Moradas-Ferreira *et al.* 1994).

A influência de propriedades físico-químicas tais como a carga eléctrica das células ou propriedades do meio como o pH, a força iónica e a concentração de solutos orgânicos é fundamental no processo de floculação (Teixeira 1988). A indução da floculação por variação do pH do meio em estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na indústria cervejeira foi estudada por Stratford (1996), enquanto que Dengis *et al.* (1995) investigaram a floculação de estirpes de fermentação alta e baixa. Brohan e McLoughlin (1984), por seu turno, mediram características físicas como a distribuição de tamanhos, densidade e força relativa dos flocos formados por várias estirpes de leveduras floculantes.

A viscosidade do meio, a intensidade da agitação mecânica (quando presente), a velocidade do fluido, o caudal e o tipo de arejamento vão condicionar a formação de flocos, alterando-lhes a forma, o tamanho e a estrutura. Sendo assim, no projecto e posterior operação de um bioreactor de floculação deve haver o cuidado de seleccionar as condições mais apropriadas para a obtenção de flocos com as características desejadas.

2.5 Projecto de um bioreactor *airlift*

A função de um bioreactor é proporcionar o ambiente mais favorável ao crescimento microbiano. Em presença de organismos floculantes é também necessário criar condições hidrodinâmicas propícias ao seu desenvolvimento. Como já foi referido, colunas de bolhas e particularmente reactores do tipo *airlift* são opções bastante atraentes para processos que utilizam aqueles organismos (Onken e Weiland 1983 e Siegel e Robinson 1992).

A produção em contínuo de cerveja fazendo uso de fermentadores do tipo *airlift* (bem como os processos produtivos de vinagre, fungos e leveduras, tanto em contínuo como em descontínuo) já se realiza, pelo menos, desde o início da década de 70 (Greenshields e Smith 1971 e Smith e Greenshields 1974). Actualmente estuda-se a hipótese de fabricar a cerveja utilizando sistemas de células imobilizadas em bioreactores trifásicos à escala industrial (Mensour, *et al.* 1996).

A avaliação do desempenho de reactores trifásicos do tipo *airlift* depende em grande parte do conhecimento dos seguintes parâmetros (Michalski 1992): fracção da fase gasosa (*gas hold-up*), área da interface gás-líquido, tempo de mistura da fase líquida, velocidade de circulação do líquido, coeficientes de dispersão axial das fases líquida e gasosa e coeficiente de transferência de calor do fluido para a parede do reactor. O coeficiente global de transferência de massa gás-líquido bem como os coeficientes de transferência de massa sólido-líquido e no interior das partículas sólidas são também parâmetros muito importantes (mais ainda num bioreactor de floculação) pelo que serão tratados separadamente. O esforço dedicado à optimização do projecto das diferentes partes que compõem um *airlift* tem sido significativo.

2.5.1 Separador gás-líquido (decantador)

O separador gás-líquido é a zona que se situa no topo do reactor e que estabelece a conexão entre os tubos ascendente e descendente. Esta zona tem uma importância decisiva no comportamento hidrodinâmico do reactor: a velocidade de recirculação do gás é bastante afectada pela sua configuração e também pelo nível de líquido aí presente o que influencia, por sua vez, a estabilidade do reactor (Siegel *et al.* 1986).

É também possível flexibilizar o modo de operação de um *airlift* recorrendo ao desenho do separador gás-líquido: o mesmo grupo de autores (Siegel e Merchuk 1991) estudaram a sua influência no desempenho de um reactor *airlift* rectangular com um volume de 300 L, tendo concluído que esta secção pode ser utilizada para alterar os padrões de fluxo, variando-os entre os que são característicos de um reactor de circulação interna e os que caracterizam um reactor de circulação externa.

Parâmetros como a velocidade do líquido e a fracção da fase gasosa são praticamente independentes da altura do separador que tem, no entanto, um efeito significativo na mistura da fase líquida, tendo-se verificado um decréscimo do tempo de mistura com o aumento daquela dimensão (Russel *et al.* 1994).

Choi *et al.* (1995) estudaram três geometrias diferentes para separadores gás-líquido de reactores *airlift* de corpo dividido, por forma a estudar o seu efeito no comportamento hidrodinâmico dos reactores e na transferência de oxigénio. Observaram-se efeitos na

velocidade do líquido, na fracção de gás no tubo descendente, no tempo de mistura e no coeficiente global de transferência de massa gás-líquido.

2.5.2 Dimensões do bioreactor; tubos ascendente e descendente

As alturas e a razão das áreas de secção recta dos tubos descendente e ascendente (A_d/A_a) também têm uma influência significativa no comportamento do reactor. Existem estudos em reactores trifásicos que constituem contribuições muito válidas pois permitem antever o comportamento de sistemas contendo flocos; isto, apesar de os referidos estudos terem sido efectuados apenas com partículas dos mais diversos materiais plásticos, vidro ou bio-polímeros.

Kennard e Janekeh (1991) estudaram a mistura num reactor *airlift* trifásico de tubos concêntricos, contendo partículas de Perlag[®] com diâmetros variando entre 2,5 e 4 mm, e puderam concluir que a razão A_d/A_a afecta significativamente o funcionamento do reactor. O decréscimo da razão A_d/A_a e o aumento da altura do reactor provocam um aumento da velocidade de circulação do líquido o que tem consequências, por exemplo, no valor máximo da fracção de sólidos que é possível manter em circulação. Estes resultados foram obtidos por Livingston e Zhang (1993) em reactores *airlift* trifásicos utilizando esferas de vidro como fase sólida.

A velocidade de circulação do líquido e o coeficiente de dispersão aumentam com a altura do reactor (Verlaan e Tramper 1987) segundo estudos efectuados em reactores *airlift* com circulação interna e externa, utilizando partículas sólidas constituídas por vários tipos de material polimérico com diâmetro médio de cerca de 2,8 mm e com valores de massa específica entre $1202 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ e $1382 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (Kochbeck *et al.* 1992). Também Lu *et al.* (1995) referiram um aumento da velocidade de circulação do líquido com a altura do tubo ascendente num reactor *airlift* trifásico de circulação interna contendo partículas de alginato. Ganzeveld *et al.* (1995) estudaram, por sua vez, o comportamento hidrodinâmico de uma suspensão de micro-suportes de células animais em reactores *airlift* de corpo dividido; utilizaram reactores com diferentes alturas dos tubos ascendente e descendente mas mantendo constante a razão A_d/A_a , tendo concluído que os reactores do tipo *airlift* possuem as características hidrodinâmicas adequadas para albergar culturas de células imobilizadas.

2.5.3 Outros parâmetros de projecto

Apesar da grande influência dos parâmetros mencionados até este ponto, o projecto de outras partes de um bioreactor *airlift* pode, igualmente, afectar o seu desempenho. Nomeadamente foram objecto de estudo o desenho do distribuidor de gás, as distâncias entre o topo do tubo interno e a superfície do líquido e entre a parte inferior do tubo interno e o fundo do reactor (*top* e *bottom clearance*, respectivamente), assim como a introdução de partes móveis ou de agitadores estáticos.

O desenho do distribuidor de gás tem um efeito decisivo no comportamento do reactor, como concluíram Pollard *et al.* (1996), que compararam a localização e a configuração de dois distribuidores em termos do seu efeito na velocidade de circulação do líquido, no grau de mistura e na fracção da fase gasosa durante uma fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* num bioreactor *airlift*.

Por sua vez, também os espaços disponíveis para o fluxo de fluido nos extremos do tubo interno são parâmetros de projecto importantes, como foi anteriormente afirmado, sobretudo o espaço entre o fundo do reactor e a parte inferior do tubo, que exerce uma grande influência no valor da queda de pressão dinâmica além de poder ser utilizado para prever a fracção de gás existente quer no tubo ascendente quer no tubo descendente (Merchuk *et al.* 1994).

Pollard *et al.* (1997) introduziram um agitador do tipo turbina num *airlift* à escala piloto e estudaram a sua influência na fracção de gás em cada secção e na velocidade de circulação do líquido, na presença de *Saccharomyces cerevisiae*. O agitador melhorou significativamente as características hidrodinâmicas do reactor assim como a transferência de oxigénio, contribuindo para uma maior homogeneidade da concentração de oxigénio dissolvido ao longo do reactor. A introdução de um agitador num leito fluidizado teve resultados semelhantes (Sisak *et al.* 1990). Também Rüffer *et al.* (1995) equiparam um *airlift* de circulação externa (com um volume de 60 L) com agitadores estáticos e compararam o seu desempenho com o do mesmo reactor sem agitadores, em termos das propriedades de mistura do sistema para soluções com diferentes valores de viscosidade. Os agitadores aumentaram a dispersão do líquido nas direcções axial e radial para taxas de arejamento baixas mas não produziram esse efeito quando se aumentou o caudal de

arejamento. Na presença de líquidos muito viscosos aumentaram também a fracção da fase gasosa e a área interfacial específica.

Tung *et al.* (1997) observaram um aumento da fracção de gás e da taxa de transferência de oxigénio, simultaneamente com a diminuição do tempo de mistura, num *airlift* com um tubo interno de rede, quando comparado com uma coluna de bolhas com as mesmas características.

2.5.4 Influência da fase sólida

A presença de uma terceira fase, sólida (como, por exemplo, flocos de leveduras), num bioreactor alterará, certamente, o seu comportamento. No entanto, os flocos são bastante frágeis e os estudos hidrodinâmicos que consideram a presença de uma fase sólida são feitos na presença de partículas de gel, vidro ou plásticos.

O reactor *airlift* é ideal para ser utilizado com uma fase sólida (Kennard e Janekeh 1991). A adição de sólidos pode promover tanto a coalescência das bolhas de gás como o seu rebentamento ou os dois fenómenos em simultâneo, sendo o efeito dependente da concentração e do tamanho das partículas sólidas, o que se reflecte na eficiência da transferência de massa gás-líquido. A fracção de gás é também afectada: reduz-se quando se adicionam sólidos a um reactor funcionando com uma taxa de arejamento pequena mas não sofre qualquer alteração se a taxa de arejamento for elevada. O efeito da presença de sólidos na velocidade superficial do líquido é insignificante mas produzem-se alterações no tempo de circulação do líquido, dependendo das características deste: o valor daquele parâmetro aumenta em água destilada mas diminui em soluções de carboximetilcelulose.

O efeito da carga de sólidos (esferas de vidro) num *airlift* trifásico (ar-água-sólidos) foi estudado por Livingston e Zhang (1993), que encontraram uma distribuição desigual de partículas sólidas entre os tubos ascendente e descendente, o que levou ao empacotamento do reactor para fluxos de gás baixos. Foi desenvolvido um modelo capaz de determinar a velocidade de circulação do líquido no reactor e o fluxo de gás crítico (mínimo) para manter a circulação dos sólidos.

Tanto a velocidade de circulação do líquido como a fracção de gás diminuíram com o aumento da carga de sólidos (partículas de alginato de cálcio) e com o aumento do diâmetro das partículas (de 1 a 3,6 mm) (Lu *et al.* 1995).

Ganzeveld *et al.* (1995) utilizaram reactores do tipo *airlift* de corpo dividido para estudar o efeito da carga de sólidos (micro-suportes, em cargas de 0 a 30 kg·m⁻³), do seu tamanho (diâmetro de 150 a 300 µm) e da sua massa específica (1030 a 1050 kg·m⁻³) na velocidade de circulação, tempo de mistura, fracção de gás e fluxo de gás crítico. Os reactores demonstraram ter as características hidrodinâmicas adequadas para sustentar culturas de células animais sobre micro-suportes. Um aumento da carga de sólidos provocou mais uma vez uma diminuição da velocidade do líquido e um aumento do tempo de mistura. Quer o fluxo mínimo de gás quer a velocidade do líquido correspondente necessários para manter as partículas sólidas em circulação se situaram dentro dos limites suportáveis pelas células animais.

2.5.5 Consequências do projecto de reactores *airlift* na sua utilidade como bioreactores de floculação

Vários autores salientaram a adequação de alguns tipos de reactor (nomeadamente o *airlift*) aos sistemas trifásicos (Ganzeveld *et al.* 1995, Kennard e Janekeh 1991, Merchuk *et al.* 1994 e Siegel e Robinson 1992). Independentemente da sua capacidade de transferência de oxigénio (que pode ou não ser necessária, consoante o processo, e que será tratada no sub-capítulo seguinte), a mistura (quer da fase líquida quer da fase gasosa) tem que ser adequada por forma a minimizar as resistências à transferência de massa e proporcionar uma boa homogeneização dentro do bioreactor; o tempo de mistura é um parâmetro directamente relacionado com a mistura, útil para avaliar a rapidez com que se atinge o grau de mistura adequado; o fluxo de gás constitui uma boa variável de controlo pois influencia não só a velocidade de circulação do líquido mas também a fracção de gás nos tubos ascendente e descendente. Assim sendo, um controlo e regulação correctos do fluxo de gás são cruciais para manter a circulação da fase sólida, optimizando as condições hidrodinâmicas dentro do reactor.

Os parâmetros atrás referidos são, por sua vez, influenciados pelo projecto de uma ou várias das partes que constituem um *airlift*. Este sub-capítulo teve como objectivo rever a influência que o desenho do reactor pode ter nesses parâmetros, dando pistas para projectos de futuros bioreactores. Também foi feita uma breve referência ao efeito da presença de sólidos, evidenciando a influência que propriedades tais como a massa específica, o

tamanho, a forma e as características da superfície (por exemplo, a molhabilidade) podem ter na mudança de comportamento do bioreactor.

2.6 Caracterização dos mecanismos de transferência de massa

Este sub-capítulo será dedicado aos principais mecanismos de transferência de massa que ocorrem num bioreactor de floculação: transferência de oxigénio entre a fase gasosa e a fase líquida e transferência de massa dos solutos do meio líquido para os flocos e no interior destes.

2.6.1 Transferência de oxigénio gás-líquido

Particularmente no caso das fermentações aeróbias, a exposição das células a concentrações de oxigénio dissolvido de zero ou próximas de zero pode ter efeitos perniciosos no metabolismo, afectando o rendimento global do processo. Esta situação pode ocorrer, por exemplo, no tubo descendente de um *airlift* se a taxa de consumo de oxigénio pela cultura for suficientemente elevada para provocar o consumo de todo o oxigénio aí dissolvido durante o tempo de residência nessa zona não arejada do bioreactor; a situação torna-se crítica em reactores *airlift* à escala industrial devido à sua altura, sendo necessário ou induzir a recirculação de gás no tubo descendente por meio de uma maior velocidade de circulação do líquido ou colocar aí um distribuidor de gás suplementar. Este exemplo simples serve para evidenciar a importância de um controlo rigoroso das condições de transferência de oxigénio durante uma fermentação.

Devido à sua baixa solubilidade na quase totalidade dos meios de fermentação é necessário um fornecimento contínuo de oxigénio, quer puro quer fazendo parte de uma mistura gasosa (normalmente, ar).

Durante o processo de transferência de massa da fase gasosa para o meio líquido ou vice-versa (caso do dióxido de carbono), a resistência da película de líquido existente na interface gás-líquido é, regra geral, o passo limitante. Portanto, é possível exprimir a taxa de transferência de massa de um componente i , dC_i/dt , como o produto de um coeficiente de transferência de massa, k_L , pela área interfacial específica, A , e pela força motriz de transferência, expressa como a diferença entre a concentração do componente na fase

líquida, C_i , e a concentração de saturação desse componente nessa fase, C^* . Para o caso de um gás que é transferido para o líquido:

$$\frac{dC_i}{dt} = k_L \cdot A \cdot (C^* - C_i) \quad (2.1)$$

A medida directa de A requer um procedimento bastante impreciso; sendo assim, também o cálculo de k_L a partir do produto $k_L A$ não é muito fiável. Alternativamente, prefere-se o próprio valor do coeficiente $k_L A$, que congrega as informações sobre a área de transferência e sobre a cinética do fenómeno de transporte. Apesar da sua conveniência, este método tem a desvantagem de não permitir um estudo independente daqueles dois aspectos do problema.

Vários dos parâmetros de projecto discutidos em secções anteriores assim como a presença de sólidos podem afectar a transferência de oxigénio, tendo sido alvo de diversos estudos.

Verlaan e Tramper (1987) estudaram a transferência gás-líquido de oxigénio num *airlift* trifásico à escala piloto (165 L). A fase sólida consistiu em partículas de poliestireno ou de alginato de cálcio com uma massa específica de $1050 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ e com diâmetros de valores compreendidos entre 2,4 e 2,7 mm; a carga máxima de sólidos no reactor foi de 40 % (v/v), o que provocou uma diminuição do valor de $k_L A$, quando comparado com o que foi obtido na ausência da fase sólida, tanto na presença de partículas de poliestireno como de alginato de cálcio (um resultado semelhante foi obtido por Komáromy e Sisak (1994) numa coluna de bolhas trifásica). Esta diminuição foi justificada pela redução da área interfacial específica, a , devido a um aumento da coalescência causada pela presença de partículas que provocam um aumento da “viscosidade” da “fase fluida” resultante (líquido + sólido). No entanto, este aumento de “viscosidade” é aparente, sendo válido apenas à escala do reactor, dado que a viscosidade do líquido se mantém, obviamente, constante; assim sendo, o valor de k_L não deverá ser afectado pela presença de sólidos. A redução de $k_L A$ na presença das partículas de alginato de cálcio foi um pouco mais significativa do que na presença das partículas de poliestireno; isto pode estar relacionado com uma das propriedades de superfície dos sólidos, a molhabilidade, tal como referido pelos autores, sendo o alginato de cálcio perfeitamente molhável e o poliestireno apenas ligeiramente.

Siegel *et al.* (1988) também registaram uma diminuição do coeficiente global de transferência de massa com o aumento da carga de sólidos; no entanto, contrariamente aos autores anteriormente citados, afirmam que a presença de sólidos não molháveis terá um efeito negativo significativo no coeficiente de transferência enquanto que sólidos molháveis terão um efeito no mesmo sentido mas de menor intensidade. Apresentam correlações para o valor de $k_L A$ (em função quer da potência consumida por volume do reactor quer da velocidade superficial do gás) e da carga de sólidos, sendo os resultados classificados em dois grupos, consoante a fase sólida é constituída por partículas molháveis (Grupo 1) ou não molháveis (Grupo 2).

Num *airlift* de tubos concêntricos para a dessulfurização do carvão, o $k_L A$ para o oxigénio aumentou com a temperatura na gama de 30 a 72 °C e diminuiu com uma carga de sólidos (partículas de carvão com 74 μm de diâmetro e massa específica de 1415 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) de 3,5 % (v/v) ou mais (Smith e Skidmore 1990). No entanto, para cargas de sólidos de 0 a 3,5 % (v/v) registou-se um aumento do valor de $k_L A$. Este efeito foi justificado com o reduzido tamanho das partículas que, em baixas concentrações, rompem a película que rodeia as bolhas de gás reduzindo, assim, a resistência à transferência de massa. Aumentos posteriores do número de partículas sólidas rodeando as bolhas de gás resultaram numa redução efectiva da área de transferência, reduzindo o valor de $k_L A$. Este tipo de efeito não se observa com partículas sólidas maiores (Verlaan e Tramper 1987), como discutido anteriormente.

Kawase e Hashimoto (1996) investigaram os efeitos da carga de sólidos na transferência de oxigénio em bioreactores *airlift* de circulação externa com meios de fermentação não-Newtonianos (carboximetilcelulose - CMC - e goma de xantano). As partículas sólidas consistiram em cilindros de policarbonato (3 mm de comprimento, 2 mm de diâmetro, 1030 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de massa específica) ou de policloreto de vinilo (2 mm de comprimento, 1 mm de diâmetro, 1300 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de massa específica). Uma carga crescente de sólidos fez diminuir o valor de $k_L A$ para a solução de CMC, inelástica, mas fez aumentar esse valor para a solução de goma de xantano, viscoelástica. Os autores concluíram que o comportamento reológico das suspensões contribui para os efeitos da carga de sólidos na taxa de transferência de oxigénio.

Karamanev *et al.* (1992) compararam os valores de $k_L A$ para o oxigénio de um reactor de leito fluidizado (fase sólida: partículas de poliuretano expandido com um diâmetro médio

de 3 mm) com os de outro reactor, obtido introduzindo um tubo interno no primeiro reactor. No novo bioreactor, o k_LA aumentou entre 1,5 e 3 vezes quando comparado com o leito fluidizado normal. O efeito da razão A_d/A_a foi igualmente estudado, tendo sido obtida uma transferência máxima para um valor daquela razão igual a 3.

Utilizando uma modificação de um reactor de circulação por injeção com fluxo invertido, Prasad e Ramanujam (1995) estudaram a influência da razão A_d/A_a , do caudal de arejamento, da carga de sólidos e das propriedades físicas destes no valor de k_LA . Usaram esferas de vidro e de poliuretano e cilindros de poliestireno, com diâmetros entre 2,40 e 4,97 mm e valores de massa específica entre 1050 e 2900 kg·m⁻³. O aumento do caudal de arejamento causou também um aumento do valor de k_LA , enquanto que o efeito da carga de sólidos observado por Smith e Skidmore (1990) se repetiu neste trabalho: o valor de k_LA aumentou com a carga de sólidos até 2,5 % (v/v) e diminuiu com o posterior aumento da carga de sólidos, apesar do tamanho agora significativo das partículas. Por fim, registaram uma diminuição do valor de k_LA com o aumento da massa específica das partículas, tendo esta observação sido atribuída à redução da velocidade de circulação em presença de sólidos mais densos, devido à sua maior velocidade de sedimentação.

2.6.2 Transferência de massa de solutos nos flocos

A difusão é provavelmente o mecanismo mais importante pelo qual se efectua o transporte de solutos através de agregados celulares e é normalmente descrito utilizando apenas um parâmetro, a difusividade efectiva, D_e , que relaciona o gradiente da concentração característica, $c(a,t)$, com o fluxo difusional médio de soluto, J_D , através do volume do objecto em estudo, o que é normalmente expresso pela lei de Fick:

$$J_D = -D_e \cdot \nabla c(a,t) \quad (2.2)$$

Há dois processos diferentes para o cálculo de coeficientes de difusão efectivos que são amplamente utilizados: no primeiro, a difusividade efectiva em agregados pode determinar-se analisando os dados por meio de um modelo de reacção-difusão; no segundo, a determinação é feita utilizando a eq. (2.2) na ausência de reacção. As técnicas utilizadas em ambos os processos têm vantagens mas também alguns inconvenientes (Libicki *et al.* 1988 e Tanaka *et al.* 1984).

Em geral, o coeficiente de difusão de um componente em solução considera-se dependente de alguns parâmetros como a temperatura (Onuma *et al.* 1985), a pressão (em sistemas gasosos) e a composição do meio (Kurillová *et al.* 1992). Existe muito pouco trabalho realizado nesta área com flocos (Ananta *et al.* 1995, Sousa e Teixeira 1991 e Teixeira e Mota 1990) e os dados existentes sobre os coeficientes de difusão, por exemplo, da glucose e do oxigénio não se referem, regra geral, ao caso de agregados celulares (Libicki *et al.* 1988). Uma razão muito simples mas, no entanto, válida para justificar esta situação (já anteriormente apontada noutro contexto) é a estrutura frágil dos flocos: tornam-se muito difíceis de manusear porque se desintegram facilmente; este problema agudiza-se com o aumento do seu tamanho, nomeadamente quando se atingem diâmetros da ordem dos 2 ou 3 mm. Por outro lado, a geometria dos agregados raramente é, como se assume frequentemente, a de uma esfera; cilindros e elipsóides são formas mais comuns. Conjuntamente com outras já referidas, características como as dimensões e a forma dos flocos são, portanto, de importância primordial na determinação de D_e . Particularmente se os agregados forem de forma esférica ou cilíndrica, uma determinação correcta do seu diâmetro é extremamente importante para a obtenção de bons resultados (Hamdi 1995) e uma das melhores formas de o fazer é utilizando métodos de análise de imagem por computador (Vicente *et al.* 1996).

Webster (1981) desenvolveu critérios que permitem determinar a importância relativa das resistências à difusão dos substratos dentro dos flocos, dependendo do modelo de consumo de substrato utilizado.

O diâmetro crítico de um floco é o valor para o qual as limitações difusionais na fase sólida se tornam mais importantes que as limitações difusionais na fase líquida (Hamdi 1995). Um diâmetro de floco maior do que o valor crítico pode ter como consequências a presença de biomassa “inútil” dentro do bioreactor, a produção de metabolitos indesejáveis pela biomassa excedentária e modificações nas características químicas e bioquímicas quer do meio quer dos microorganismos. Aquele autor sugere, portanto, uma desintegração constante dos flocos para reduzir o seu tamanho médio.

Libicki *et al.* (1988) calcularam a difusividade efectiva de óxido nítrico em agregados celulares de *Escherichia coli*. Aquele parâmetro decresceu com o aumento da fracção volúmica das células.

Ananta *et al.* (1995) mediram as propriedades de transferência de oxigénio em agregados de *Solanum aviculare* com 3 a 12,5 mm de diâmetro. A difusividade efectiva do oxigénio nos agregados inactivos aumentou com o diâmetro das partículas, variando entre 2 e 40 % do valor da difusividade molecular daquele gás em água pura à mesma temperatura. Os autores consideram, portanto, que ocorrem fortes limitações de oxigénio dentro dos agregados; no entanto, estes resultados devem ser interpretados com reservas pois foram obtidos com células inactivas, que podem apresentar um comportamento diferente do observado em células activas.

A utilização de aditivos de floculação poliméricos constitui uma tentativa para reduzir as limitações difusionais em flocos (Salt *et al.* 1996, Sousa e Teixeira 1991 e Weir *et al.* 1994). Esses aditivos deveriam aumentar o espaço existente entre células adjacentes, alargando as pontes que ligam as células nos agregados (Lima *et al.* 1992). De facto, observaram-se reduções nas limitações difusionais quando tais aditivos foram utilizados, sugerindo um aumento dos valores da difusividade efectiva dos substratos nos flocos.

Teixeira e Mota (1990) registaram uma diminuição na taxa específica de consumo de lactose por células floculadas de *Kluyveromyces marxianus* quando comparadas com células não floculadas, mas obtiveram um aumento de 10 % no factor de eficiência ao induzir um aumento de 10 % na porosidade dos flocos utilizando um aditivo de floculação.

A influência de vários aditivos poliméricos na taxa específica de consumo de glucose por flocos de *Saccharomyces cerevisiae* foi estudada por Lima *et al.* (1992). Observaram sempre um aumento daquela taxa para as células contidas nos flocos em presença de aditivo quando comparadas com a das células de flocos sem aditivo: 19 % de aumento em presença de bis(polioxi-etileno-bis(amina)) 20000, mais de 50 % em presença de BPA 1000 e 100 % em presença de Magna Floc LT25.

Sousa e Teixeira (1991) prosseguiram o trabalho anterior, estudando a influência de dois polímeros, um aniónico e um catiónico, nos parâmetros de uma fermentação descontínua de uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae*. Enquanto que o polímero catiónico mostrou ter um efeito residual no desempenho do sistema, o polímero aniónico (Magna Floc LT25) provocou uma diminuição para metade do tempo necessário para obter um consumo total da glucose existente no meio de fermentação.

Os mesmos autores (Sousa e Teixeira 1996) determinaram qual o efeito da carga de sólidos e da presença de Magna Floc LT25 nas taxas de transferência e de consumo de oxigénio em fermentações descontínuas de células de levedura floculantes. Para concentrações de biomassa acima de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, aumentos da quantidade de biomassa levaram a reduções no valor de k_{LA} , enquanto que o efeito no consumo de oxigénio foi negligenciável devido à presença do aditivo.

2.7 Aplicações

Uma das primeiras aplicações das propriedades de sedimentação de microorganismos floculantes foi feita pela indústria cervejeira, por forma a facilitar a remoção das células de levedura no final do processo produtivo (Greenshields e Smith 1971). Deste então, foram vários os trabalhos de investigação que utilizaram bioreactores de floculação.

Estirpes floculantes de levedura de cerveja foram cultivadas com êxito em fermentadores do tipo coluna de bolhas, com capacidades entre 1 e 50 L (Smith e Greenshields 1974); foram utilizados vários tipos de meio de cultura tais como subprodutos da refinação do açúcar, melão e mosto, permitindo a manutenção de concentrações celulares até 17,5 % (p/p) durante a operação em contínuo.

Kida *et al.* (1989) utilizaram uma coluna de bolhas a operar em contínuo para produzir etanol a partir de uma estirpe floculante, geneticamente modificada, de *Saccharomyces cerevisiae*. Obtiveram uma produtividade em etanol de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, com uma concentração de etanol à saída de $63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a uma taxa de diluição de $0,4 \text{ h}^{-1}$ num processo anaeróbio. A introdução de arejamento permitiu um aumento da produtividade em etanol para $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ com uma concentração de etanol à saída de $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A floculação também pode ser induzida. Teixeira (1988) utilizou um *airlift* de circulação externa, com um volume de 1,2 L, acoplado a um sedimentador (Figura 2.4) para induzir a floculação de uma levedura capaz de fermentar lactose (*Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022). Teixeira *et al.* (1990) utilizaram essa estirpe para efectuar a fermentação alcoólica de lactose no mesmo bioreactor. Atingiram uma conversão de substrato praticamente completa, uma concentração máxima de etanol à saída de $44,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e uma produtividade máxima em etanol de $24,42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Uma produtividade máxima em etanol de $68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ foi conseguida por Fontana *et al.* (1992), que estudaram a fermentação alcoólica contínua de sacarose por uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* num *airlift* de circulação externa com um volume de 2 L, com flocos de 1,3 mm de diâmetro médio.

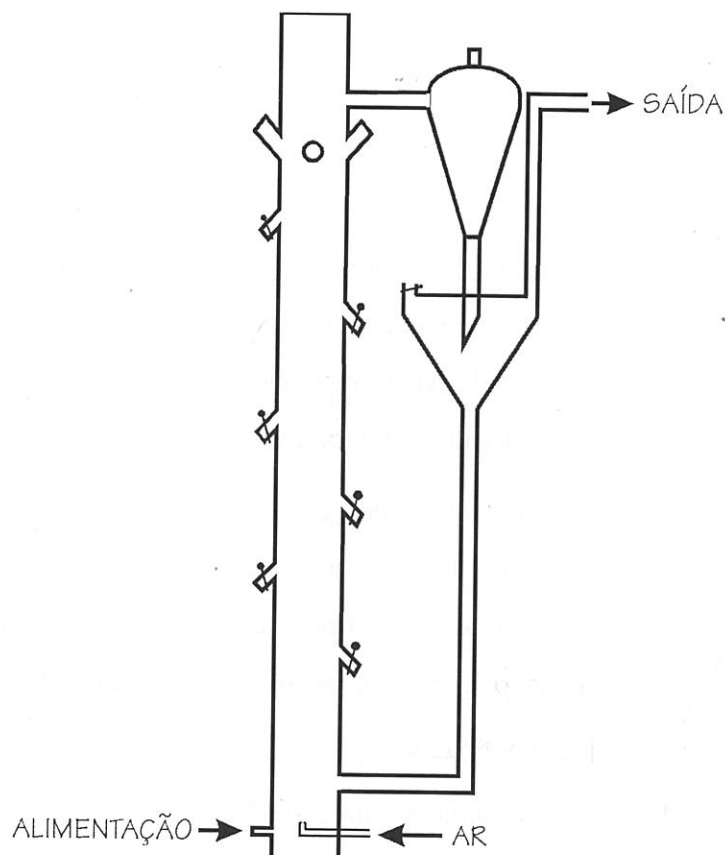


Figura 2.4: Bioreactor contínuo para a indução da floculação de *Kluyveromyces marxianus* (Teixeira 1988).

Kuriyama *et al.* (1993) optimizaram um processo de fermentação alcoólica em contínuo, com uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae*. O sistema consistiu numa série de dois tanques agitados (com volumes de 0,5 e 1,5 L, respectivamente) e permitiu a obtenção de concentrações de etanol à saída de cerca de $93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para uma taxa de diluição de $0,10 \text{ h}^{-1}$.

Sousa *et al.* (1994b) compararam a evolução dos parâmetros da fermentação de uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* durante o arranque de uma fermentação contínua num bioreactor *airlift* de circulação interna com um volume de 5,4 L. Observaram

uma grande influência das taxas de diluição e de arejamento nas concentrações de biomassa e etanol e nos parâmetros cinéticos.

Uma análise comparativa de dois bioreactores de floculação a operar em contínuo - um *airlift* de circulação externa com recirculação forçada e 1,2 L de volume e um *airlift* de circulação interna e 5,4 L de volume - durante uma fermentação etanólica com uma estirpe altamente floculante de *Saccharomyces cerevisiae* (Sousa *et al.* 1994a) permitiu concluir que embora com o bioreactor *airlift* de circulação interna se tenha obtido a maior produtividade em etanol, ambos os sistemas se comportaram de forma similar e os valores de produtividade obtidos foram sete vezes mais elevados do que em sistemas comerciais.

Um bioreactor de leito fluidizado (10 L) com agitação mecânica foi utilizado por Wieczorek e Michalski (1994) para a produção em contínuo de etanol por uma estirpe altamente floculante de *Saccharomyces cerevisiae*. A produtividade em etanol atingiu 15 a 20 g·L⁻¹·h⁻¹.

Abate *et al.* (1996) testaram culturas mistas de estirpes floculantes de *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces* sp. para a produção de etanol a partir de sacarose. Os ensaios foram realizados em matrizes tendo sido obtidas produtividades da ordem de 1,5 g·L⁻¹·h⁻¹.

Kida *et al.* (1992) construíram uma estirpe de levedura floculante e termo-tolerante por fusão de protoplastos e utilizaram-na num tanque agitado com um volume útil de 3 L. A produtividade máxima em etanol foi de 5 g·L⁻¹·h⁻¹.

Roca *et al.* (1995) analisaram o modelo hidráulico de um bioreactor *airlift* com circulação externa durante uma fermentação alcoólica em contínuo utilizando uma levedura altamente floculante. O reactor teve um comportamento semelhante ao de um tanque agitado com uma zona morta (5 % do volume total).

O extracto de tupinambo foi o substrato para a produção de etanol e inulina num bioreactor *airlift* com circulação externa, de 2 L de volume, utilizando uma levedura floculante (Schorr-Galindo *et al.* 1995).

A Tabela 2.2 resume as aplicações de bioreactores de floculação acima descritos.

Tabela 2.2: Aplicações de bioreactores de floculação.

Organismo	Tipo de reator	Volume [L]	Substrato principal	Produto principal	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	coluna de bolhas	1 -50	mosto	cerveja	Smith e Greenshields 1974
<i>S. cerevisiae</i>	coluna de bolhas	-	melaços	etanol	Kida <i>et al.</i> 1989
<i>K. marxianus</i>	<i>airlift</i> de circulação externa	1,2	lactose	etanol	Teixeira <i>et al.</i> 1990
<i>S. cerevisiae</i>	<i>airlift</i> de circulação externa	2	glucose / sacarose	etanol	Fontana <i>et al.</i> 1992
<i>S. cerevisiae</i>	tanque agitado	3	glucose	etanol	Kida <i>et al.</i> 1992
<i>S. cerevisiae</i>	série de 2 tanques agitados	0,5 + 1,5	melaços	etanol	Kuriyama <i>et al.</i> 1993
<i>S. cerevisiae</i>	<i>airlift</i> de circulação interna	5,4	glucose	etanol	Sousa <i>et al.</i> 1994b
<i>S. cerevisiae</i>	<i>airlift</i> de circulação externa + interna	1,2 + 5,4	glucose	etanol	Sousa <i>et al.</i> 1994a
<i>S. cerevisiae</i>	leito fluidizado	10	melaços	etanol	Wieczorek e Michalski 1994
<i>S. cerevisiae</i>	<i>airlift</i> de circulação externa	2	sacarose	etanol	Roca <i>et al.</i> 1995
<i>S. diastaticus</i>	<i>airlift</i> de circulação externa	2	extracto de tupinambo	etanol + inulina	Schorr-Galindo <i>et al.</i> 1995
<i>Z. mobilis</i> + <i>Saccharomyces</i> sp.	matrizes	1	-	etanol	Abate <i>et al.</i> 1996

Além da indústria cervejeira, são raros os exemplos de aplicações industriais de bioreactores de floculação. Os estudos realizados neste tipo de bioreactores foram conduzidos em instalações laboratoriais devido sobretudo aos custos e à complexidade

envolvidos na investigação em maior escala. Sendo assim, as informações sobre hidrodinâmica e transferência de massa necessárias à passagem para a escala industrial são ainda insuficientes e não é surpreendente que a indústria hesite em seleccionar, para aplicação comercial, processos baseados na floculação de microorganismos.

2.8 Bibliografia

- Abate, C., Callieri, D., Rodríguez, E. e Garro, O., 1996. Ethanol Production by a Mixed Culture of Flocculent Strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 580-583.
- Acai, P., Michálková, E. e Bálež, V., 1995. Biotransformation of Cephalosporin-C to 7-Aminocephalosporanic Acid with Coimmobilized Biocatalyst in a Batch Bioreactor. 1. Reaction Kinetics and Diffusion Effects. *Bioprocess Eng.*, 12, 249-252.
- Ananta, I., Subroto, M. A. e Doran, P. M., 1995. Oxygen Transfer and Culture Characteristics of Self-Immobilized *Solanum aviculare* Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 541-549.
- Asenjo, J. A. e Merchuk, J. C., eds., 1995. *Bioreactor System Design*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Atkinson, B. e Daoud, I. S., 1976. Microbial Flocs and Flocculation in Fermentation Process Engineering. In: Ghose, T. K., Fiechter, A. and Blakebrough, N. eds. *Advances in Biochemical Engineering*. New York: Springer-Verlag, 1976, 41-124.
- Bailey, J. E. e Ollis, D. F., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Bejar, P., Casas, C., Gòdia, F. e Solà, C., 1992. The Influence of Physical Properties on the Operation of a Three-Phase Fluidized Bed Fermentor with Yeast Cells Immobilized in Ca-Alginate. *Appl. Biochemistry Biotechnol.*, 34/35, 467-475.
- Brohan, B. e McLoughlin, A. J., 1984. Characterization of the Physical Properties of Yeast Flocs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 16-22.
- Chang, C.-M., Lu, W. J., Own, K. S. e Hwang, S.-J., 1993. Operation Conditions Affecting the Performance of Airlift Reactors for Immobilized Enzyme Reactions. *Biotechnol. Tech.*, 7, 317-322.
- Choi, K. H., Chisti, Y. e Moo-Young, M., 1995. Influence of the Gas-Liquid Separator Design on Hydrodynamic and Mass Transfer Performance of Split-Channel Airlift Reactors. *J. Chem. Biotechnol.*, 62, 327-332.
- Dale, M. C., Chen, C. e Okos, M. R., 1990. Cell Growth and Death Rates as Factors in the Long-Term Performance, Modeling and Design of Immobilized Cell Reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 983-992.
- Dengis, P. B., Nélissen, L. R. e Rouxhet, P. G., 1995. Mechanisms of Yeast Flocculation: Comparison of Top- and Bottom-Fermenting Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 718-728.
- Doran, P. M. e Bailey, J. E., 1986a. Effects of Immobilization on Growth, Fermentation Properties and Macromolecular Composition of *Saccharomyces cerevisiae* Attached to Gelatin. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 73-87.
- Doran, P. M. e Bailey, J. E., 1986b. Effects of Hydroxyurea on Immobilized and Suspended Yeast Fermentation Rates and Cell Cycle Operation. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1814-1831.
- Elnashaie, S. S. E. H. e Ibrahim, G., 1991. A Distributed Parameter Diffusion-Reaction Model for the Alcoholic Fermentation Process. *Appl. Biochemistry Biotechnol.*, 30, 339-360.

- Fontana, A., Ghommidh, C., Guiraud, J. P. e Navarro, J. M., 1992. Continuous Alcoholic Fermentation of Sucrose Using Flocculating Yeast. The Limits of Invertase Activity. *Biotechnol. Lett.*, 14, 505-510.
- Galazzo, J. L. e Bailey, J. E., 1989. *In vivo* Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Immobilization effects on Glucose Metabolism of Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 1283-1289.
- Galazzo, J. L. e Bailey, J. E., 1990. Growing *Saccharomyces cerevisiae* in Calcium-Alginate Beads Induces Cell Alterations which Accelerate Glucose Conversion to Ethanol. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 417-426.
- Ganzeveld, K. J., Chisty, Y. e Moo-Young, M., 1995. Hydrodynamic Behaviour of Animal Cell Microcarrier Suspensions in Split-Cylinder Airlift Bioreactors. *Bioprocess Eng.*, 12, 239-247.
- Gianetto, A., Ruggeri, B., Specchia, V., Sassi, G. e Forna, R., 1988. Continuous Extraction Loop Reactor (CELR): Alcoholic Fermentation by Fluidized Entrapped Biomass. *Chem. Eng. Sci.*, 43, 1891-1896.
- Gikas, P. e Livingston, A. G., 1993. Use of ATP to Characterize Biomass Viability in Freely Suspended and Immobilized Cell Bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 1337-1351.
- Gòdia, F. e Solà, C., 1995. Fluidized-Bed Bioreactors. *Biotechnology Prog.*, 11, 479-497.
- de Gooijer, C. D., Wijffels, R. H. e Tramper, J., 1991. Growth and Substrate Consumption of *Nitrobacter agilis* Cells Immobilized in Carrageenan: Part 1. Dynamic Modeling. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 224-231.
- Gough, S., Brady, D., Nigam, P., Marchant, R. e McHale, A. P., 1997. Production of Ethanol from Molasses at 45 °C using Alginate-Immobilized *Kluyveromyces marxianus* imb 3. *Bioprocess Eng.*, 16, 389-392.
- Greenshields, R. N. e Smith, E. L., 1971. Tower-Fermentation Systems and their Applications. *Chem. Engineer*, May, 182-190.
- Hamdi, M., 1995. Biofilm Thickness Effect on the Diffusion Limitation in the Bioprocess Reaction: Biofloc Critical Diameter Significance. *Bioprocess Eng.*, 12, 193-197.
- Huang, Y. L., Shu, C.-H. e Yang, S.-T., 1997. Kinetics and Modeling of GM-CSF Production by Recombinant Yeast in a Three-Phase Fluidized Bed Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 170-177.
- Karamanev, D. G., Nagamune, T. e Endo, I., 1992. Hydrodynamic and Mass Transfer Study of a Gas-Liquid-Solid Draft Tube Spouted Bed Bioreactor. *Chem. Eng. Sci.*, 47, 3581-3588.
- Katzbauer, B., Narodoslowsky, M. e Moser, A., 1995. Classification System for Immobilization Techniques. *Bioprocess Eng.*, 12, 173-179.
- Kawase, Y. e Hashimoto, N., 1996. Gas Hold-Up and Oxygen Transfer in Three-Phase External-Loop Airlift Bioreactors: Non-Newtonian Fermentation Broths. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 65, 325-334.
- Kennard, M. e Janekeh, M., 1991. Two- and Three-Phase Mixing in a Concentric Tube Gas-Lift Fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1261-1270.
- Kida, K., Kume, K., Morimura, S. e Sonoda, Y., 1992. Repeated-Batch Fermentation Process Using a Thermotolerant Flocculating Yeast Constructed by Protoplast Fusion. *J. Fermentation Bioeng.*, 47, 169-173.
- Kida, K., Yamadaki, M., Asano, S.-I., Nakata, T. and Sonoda, Y., 1989. The Effect of Aeration on Stability of Continuous Ethanol Fermentation by a Flocculating Yeast. *J. Ferm. Bioeng.*, 68, 107-111.
- Kochbeck, B., Lindert, M. e Hempel, D. C., 1992. Hydrodynamics and Local Parameters in Three-Phase-Flow in Airlift-loop Reactors of Different Scale. *Chem. Eng. Sci.*, 47, 3443-3450.
- Komáromy, P. e Sisak, C., 1994. Investigation of Gas-Liquid Oxygen Transport in Three-Phase Bioreactor. *Hungarian J. Ind. Chemistry*, 22, 147-151.

- Kurillová, L'Ubica, Gemeiner, P., Ilavský, M., Štefuca, V., Polakovic, M., Welwardová, A. and Tóth, D., 1992. Calcium Pectate Gel Beads for Cell Entrapment. *Bioetchnol. Appl. Biochem.*, 16.
- Kuriyama, H., Ishibashi, H., Miyagawa, H., Kobayashi, H. e Eiichi, M., 1993. Optimization of Two-Stage Continuous Ethanol Fermentation Using Flocculating Yeast. *Biotechnol. Lett.*, 15, 415-420.
- Laplace, J. M., Delgenes, J. P., Moletta, R. e Navarro, J. M., 1993. Ethanol Production from Glucose and Xylose by Separated and Co-culture Processes Using High Cell Density Systems. *Process Biochem.*, 28, 519-525.
- Li, R. H., Altreuter, D. H. e Gentile, F. T., 1996. Transport Characterization of Hydrogel Matrices for Cells Encapsulation. *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 365-373.
- Libicki, S. B., Salmon, P. M. e Robertson, C. R., 1988. The Effective Diffusive Permeability of a Nonreacting Solute in Microbial Cell Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 68-85.
- Lima, N., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1992. Enhancement of Metabolic Rates of Yeast Flocculent Cells Through the Use of Polimeric Additives. *Bioprocess Eng.*, 7, 343-348.
- Livingston, A. G. e Zhang, S. F., 1993. Hydrodynamic Behaviour of Three-Phase (Gas-Liquid-Solid) Airlift Reactors. *Chem. Eng. Sci.*, 48, 1641-1654.
- Lu, W.-J., Hwang, S.-J. e Chang, C.-M., 1995. Liquid Velocity and Gas Holdup in Three-Phase Internal Loop Airlift Reactors with Low Density Particles. *Chem. Eng. Sci.*, 50, 1301-1310.
- Masschelein, C. A., 1997. A Realistic View on the Role of Research in the Brewing Industry Today. *J. Inst. Brew.*, 103, 103-113.
- Mensour, N. A., Margaritis, A., Briens, C. L., Pilkington, H. e Russell, I., 1996. Application of Immobilized Yeast Cells in the Brewing Industry. In: R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke e J. Tramper, eds. *Immobilized Cells: Basics and Applications*. Elsevier Science B. V., 1986, 661-671.
- Merchuk, J. C., Ladwa, N., Cameron, A., Bulmer, M. e Pickett, A., 1994. Concentric-Tube Airlift Reactors: Effects of Geometrical Design on Performance. *AIChE J.*, 40, 1105-1117.
- Michalski, H. J., 1992. Air-Lift Bioreactors. In: M. Berovic e T. Koloini, eds. *Bioreactor Engineering Course Workshop Notes; Italy, 1992*.
- Miki, B. L. A., Poon, N. H., James, A. P. e Seligy, V. L., 1992. Possible Mechanisms for Flocculation Interaction Governed by Gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 150, 878-889.
- Moo-Young, M. e Chisti, Y., 1994. Biochemical Engineering in Biotechnology. *Pure Appl. Chemistry*, 66, 117-136.
- Moradas-Ferreira, P., Fernandes, P. A. e Costa, M. J., 1994. Yeast Flocculation - the Role of Cell Wall Protein. *Colloids Surf. B.*, 2, 159-164.
- Oliveira, A. C., Rosa, M. F., Cabral, J. M. S. e Aires-Barros, M. R., 1997. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells and *Rhizomucor michei* Lipase for the Production and Extractive Biocatalysis of Ethanol. *Bioprocess Eng.*, 16, 349-353.
- Onken, U. e Weiland, P., 1983. Airlift Fermenters: Construction, Behavior, and Uses. In: *Advances in Biotechnological Processes I*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1983, 67-95.
- Onuma, M., Omura, T., Umita, T. e Aizawa, J., 1985. Diffusion Coefficient and Its Dependency on Some Biochemical Factors. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1533-1539.
- Pereboom, J. H. F., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S. S. P., Huisman, J. W. e de Beer, D., 1990. Physical Transport Phenomena in Aggregated Microbial Systems. In: H. Breteler, R. F. Beuker and K. Ch. A. M. Luyben, eds. *Proceedings 3rd. Netherlands Biotechnology Congress 1990, Part II, Amsterdam 4th April 1990*.
- Petersen, J. N. e Davison, B. H., 1995. Development of a Predictive Description of an Immobilized-Cell, Three-Phase, Fluidized-Bed Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 139-146.

- Pollard, D. J., Ison, A. P., Shamlou, P. A. e Lilly, M. D., 1997. Influence of a Propeller on *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations in a Pilot Plant Scale Airlift Bioreactor. *Bioprocess Eng.*, 16, 273-281.
- Pollard, D. J., Shamlou, P. A., Lilly, M. D. e Ison, A. P., 1996. *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations in a Pilot Scale Airlift Bioreactor: Comparison of Air Sparger Configurations. *Bioprocess Eng.*, 15, 279-288.
- Prasad, K. Y. e Ramanujam, T. K., 1995. Overall Volumetric Mass Transfer Coefficient in a Modified Reversed Flow Jet Loop Bioreactor with Low Density Particles. *Bioprocess Eng.*, 12, 209-214.
- van't Riet, K. e Tramper, J., 1991. *Basic Bioreactor Design*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Riley, M. R., Muzzio, F. J. e Buettner, H. M., 1995. Diffusion in Heterogeneous Media: Application to Immobilized Cell Systems. *AIChE J.*, 41, 691-700.
- Roca, E., Cameselle, C., Núñez, M. J. e Lema, J. M., 1995. Continuous Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in Ca-Alginate Beads Hardened with Al^{3+} . *Biotechnol. Tech.*, 9, 815-820.
- Roca, E., Ghommidh, C., Navarro, J. M. e Lema, J. M., 1995. Hydraulic Model of a Gas-Lift Bioreactor with Flocculating Yeast. *Bioprocess Eng.*, 12, 269-272.
- Rüffer, H. M., Bröring, S. e Schügerl, K., 1995. Fluiddynamic Characterization of Airlift Tower Loop Bioreactors With and Without Motionless Mixtures. *Bioprocess Eng.*, 12, 119-130.
- Russel, A. B., Thomas, C. R. e Lilly, M. D., 1994. The Influence of the Vessel Height and Top-Section Size on the Hydrodynamic Characteristics of Airlift Fermentors. *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 69-76.
- Salt, D. E., Bentham, A. C., Hay, S., Idris, A., Gregory, J., Hoare, M. e Dunnill, P., 1996. The Mechanism of Flocculation of a *Saccharomyces cerevisiae* Cell Homogenate using Polyethyleneimine. *Bioprocess Eng.*, 15, 71-76.
- Sato, K. e Toda, K., 1983. Oxygen Uptake Rate of Immobilized Growing *Candida lipolytica*. *J. Ferm. Technol.*, 61, 239-245.
- Schorr-Galindo, S., Ghommidh, C. e Guiraud, J. P., 1995. Inulin Enrichment by Fermentation in a Flocculating Yeast Reactor. *Biotechnol. Lett.*, 17, 1303-1310.
- Siegel, M. H., Hallaile, M., Herskowitz, M. e Merchuk, J. C., 1988. Hydrodynamics and Mass Transfer in a Three-Phase Airlift Reactor. In: R. King, ed. *2nd International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics, 21-23 September 1988*.
- Siegel, M. e Merchuk, J.C., 1991. Hydrodynamics in Rectangular Airlift Reactors: Scale-up and the Influence of Gas-Liquid Separator Design. *Can. J. Chem. Eng.*, 69, 465-473.
- Siegel, M. H., Merchuk, J. C. e Schügerl, K., 1986. Airlift Reactor Analysis: Interrelationships Between Riser, Downcomer, and Gas-Liquid Separator Behavior, Including Gas Recirculation Effects. *AIChE J.*, 32, 1585-1596.
- Siegel, M. H. e Robinson, C. W., 1992. Applications of Airlift Gas-Liquid-Solids Reactors in Biotechnology. *Chem. Eng. Sci.*, 47, 3215-3229.
- Siimes, T. and Links, P., 1995. Fuzzy Supervisory Control of Fed-Batch Baker's Yeast Process. *Biotechnol. Tech.*, 9, 799-804.
- Sisak, C., Boross, L. e Szajáni, B., 1990. Stirred Fluidised-Bed Reactor Developed for Low Density Biocatalyst Supports. *Biotechnol. Tech.*, 4, 15-20.
- Smith, B. C. e Skidmore, D. R., 1990. Mass Transfer Phenomena in an Airlift Reactor: Effects of Solids Loading and Temperature. *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 483-491.
- Smith, E. L. e Greenshields, R. N., 1974. Tower-Fermentation Systems and their Application to Aerobic Processes. *Chem. Engineer*, January, 28-34.
- Šmogrovicová, D., Dömény, Z., Gemeiner, P., Malovíková, A. e Šturdík, E., 1997. Reactors for Continuous Primary Beer Fermentation using Immobilized Yeast. *Biotechnol. Tech.*, 11, 261-264.

- Sousa, M. L., Mota, M. e Teixeira, J. A., 1994b. Influence of Operational Parameters on the Start-up of a Flocculation Airlift Bioreactor. *Col. Surf. B: Biointerfaces*, 2, 181-188.
- Sousa, M. L. e Teixeira, J. A., 1991. Reduction of Diffusional Limitations in Yeast Floccs. *Biotechnol. Lett.*, 13, 883-888.
- Sousa, M. L. e Teixeira, J. A., 1996. Characterization of Oxygen Uptake and Mass Transfer in Flocculent Yeast Cell Cultures with or without a Flocculation Additive. *Biotechnol. Lett.*, 18, 229-234.
- Sousa, M. L., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1994a. Comparative Analysis of Ethanolic Fermentation in Two Continuous Flocculation Bioreactors and Effect of Flocculation Additive. *Bioprocess Eng.*, 11, 83-90.
- Stratford, M., 1996. Induction of Flocculation in Brewing Yeasts by Change in pH Value. *FEMS Microbiol. Lett.*, 136, 13-18.
- Tanaka, H., Matsumura, M. e Veliky, I. A., 1984. Diffusion Characteristics in Ca-Alginate Gel Beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 53-58.
- Teixeira, J. A., 1988. Dissertação de Doutoramento: *Floculação da levedura Kluyveromyces marxianus*. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Teixeira, J. A. e Mota, M., 1990. Experimental Assessment of Internal Diffusion Limitations in Yeast Floccs. *Chem. Eng. J.*, 43, B13-B17.
- Teixeira, J. A., Mota, M. e Goma, G., 1990. Continuous Ethanol Production by Flocculating Strain of *Kluyveromyces marxianus*: Bioreactor Performance. *Bioprocess Eng.*, 5, 123-127.
- Tijhuis, L., van Loosdrecht, M. C. M. e Heijnen, J. J., 1994. Formation and Growth of Heterotrophic Aerobic Biofilms on Small Suspended Particles in Airlift Reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 595-608.
- Tung, H.-L., Chiou, S.-Y. e Wu, W.-T., 1997. An Airlift Reactor with Double Net Draft Tubes and its Application in Fermentation. *Bioprocess Eng.*, 17, 1-5.
- Ulonska, A., Deckwer, W.-D. e Hecht, V., 1995. Degradation of Quinoline by Immobilized *Comamonas acidovorans* in a Three-Phase Airlift Reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 80-87.
- Venâncio, A. e Teixeira, J. A., 1997. Characterization of Sugar Diffusion Coefficients in Alginate Membranes. *Biotechnol. Tech.*, 11, 183-185.
- Verlaan, P. e Tramper, J., 1987. Hydrodynamics, Axial Dispersion and Gas-Liquid Oxygen Transfer in an Airlift Loop Bioreactor with Three Phase Flow. In: *International Conference on Bioreactors and Biotransformations, Gleneagles, Scotland 9-12 November 1987*. 363-373.
- Vicente, A. A., Dluhý, M., Ferreira, E. C. e Teixeira, J. A., 1997. Modelling Diffusion-Reaction Phenomena in Yeast Floccs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng.* (no prelo).
- Vicente, A. A., Dluhý, M. e Teixeira, J. A., 1997. A New Technique for Measuring Kinetic and Mass Transfer Parameters in Floccs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Tech.*, 11, 113-116.
- Vicente, A., Meinders, J. M. e Teixeira, J. A., 1996. Sizing and Counting of *Saccharomyces cerevisiae* Flocc Populations by Image Analysis, Using an Automatically Calculated Threshold. *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 673-678.
- Vieth, W. R., 1994. *Bioprocess Engineering - Kinetics, Mass Transport, Reactor and Gene Expression*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Webster, I. A., 1981. Criteria for the Prediction of Diffusional Control within Whole Cells and Cell Floccs. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 31, 178-182.
- Weir, S., Ramsden, D. K., Hughes, J. e Le Thomas, F., 1994. The Strength of Yeast Floccs Produced by the Cationic Flocculant Chitosan: Effect of Suspension Medium and of Pretreatment with Anionic Polyelectrolytes. *Biotechnol. Tech.*, 8, 129-132.

-
- Wieczorek, A. e Michalski, H., 1994. Continuous Ethanol Production by Flocculating Yeast in the Fluidized Bed Bioreactor. *FEMS Microbiol. Reviews*, 14, 69-74.
- Xu, P., Thomas, A. e Gilson, C. D., 1996. Combined Use of Three Methods for High Concentration Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 18, 1439-1440.

3. Materiais e Métodos

Sumário

Neste capítulo descrevem-se os métodos de análise mais convencionais bem como a instrumentação utilizada durante a execução do trabalho experimental. Foram excluídas, porém, duas metodologias desenvolvidas durante a progressão do presente estudo que, dado o seu carácter específico e inovador, merecem uma descrição mais detalhada, efectuada no capítulo seguinte.

3.1 Microorganismos

3.1.1 Estirpe floculante

Nas fermentações em que se pretende obter flocos de levedura utiliza-se uma estirpe com reconhecidas características floculantes (Lima *et al.* 1992, Netto 1984, Sousa 1994 e Taylor e Orton 1975), a *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y265.

A conservação desta estirpe a longo prazo é feita a uma temperatura de -80 °C em tubos plásticos de 1,5 mL contendo a levedura suspensa em glicerol. Para uso mais frequente a levedura é conservada a 4 °C em tubos inclinados contendo YM agar (Difco), procedendo-se periodicamente (cada 3 meses) à sua repicagem.

3.1.1.1 Meio de cultura

Esta levedura é capaz de crescer num meio semi-sintético, cuja composição se descreve na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição do meio de cultura para a estirpe floculante.

Componente	Concentração (g·L ⁻¹)	Grau de pureza	Marca
D-Glucose anidra ^a	20,0	bioquímico	Merck
Dextropan (glucose mono-hidratada)	130	comercial	Copam
KH ₂ PO ₄ ^b	5,0	puro	M. Vaz Pereira
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	puro	M. Vaz Pereira
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	puro	M. Vaz Pereira
Extracto de levedura	1,0	bioquímico	Merck
Magna Floc LT-25 ^c	0,01 % (p/v)	-	Allied Collids, Ltd.
Anti-espuma (óleo de silicone)	-	-	Sigma

^a - inóculos

^b - fermentação em contínuo

^c - quando utilizado

O meio é preparado dissolvendo todos os componentes em água potável, sendo o pH ajustado a 4,0 ± 0,1 com H₃PO₄. A solução é então esterilizada em autoclave a 121 °C

durante 30 minutos. A esterilização provoca uma ligeira caramelização da fonte de carbono pelo que se registaram oscilações na concentração de glucose no meio de fermentação de cerca de $\pm 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.1.1.2 Preparação do inóculo

A inoculação de um bioreactor deve fazer-se com uma quantidade de biomassa suficiente, estando as células de preferência na fase de crescimento exponencial. Para tal, prepara-se um pré-inóculo num matraz de 250 mL inoculando 100 mL de meio a partir da cultura em tubo inclinado. Incuba-se o matraz num agitador orbital a 150 r.p.m. e 30 °C durante 15 horas. Decorrido esse tempo, transfere-se o conteúdo do matraz para um outro, de 5 L, contendo 2,5 L de meio de cultura. Após nova incubação a 30 °C com agitação orbital (150 r.p.m.), desta vez durante 24 horas, este inóculo pode ser transferido para o bioreactor.

3.1.2 Estirpe não floculante

Quando não é necessária a estirpe floculante utiliza-se uma outra levedura, pulverulenta, a *Saccharomyces cerevisiae* CBS 7336 (ATCC 32167).

A estirpe encontra-se conservada a 4 °C em tubos inclinados contendo YM agar (Difco), repicados periodicamente (cada mês).

3.1.2.1 Meio de cultura

Devido ao tipo de ensaios e de medições que foi necessário efectuar com esta estirpe, o meio de cultura utilizado para a fazer crescer foi alterado em relação ao anterior, tendo sido adaptado de Fiechter *et al.* (1987) (Tabela 3.2).

O meio é preparado dissolvendo os componentes (excepto o etanol e a ureia, quando utilizados, e as vitaminas) em água desionizada e esterilizado a 121 °C durante 40 minutos. Com a concentração de açúcar utilizada não se verificou a ocorrência de caramelização. A ureia e as vitaminas são dissolvidas em água desionizada e, dada a sua sensibilidade à temperatura, são esterilizadas por filtração através de membranas estéreis com poros de 0,45 μm (Gelman Sciences, EUA), enquanto que o etanol não necessita de esterilização. Estes compostos são adicionados aos restantes imediatamente antes da utilização do meio, que ainda sofre uma correcção do valor de pH com HCl ou NaOH para o situar em $4,0 \pm 0,1$.

Tabela 3.2: Composição do meio de cultura para a estirpe não floculante.

Componente	Concentração (g·L ⁻¹)	Grau de pureza	Marca
D-Glucose anidra ^a	30,0 (ferm. em contínuo)	microbiológico	Merck
	15,0 (ferm. em descontínuo)	microbiológico	Merck
Etanol ^a	10,0	p. a.	Riedel-de-Haën
Ureia ^b	3,6	puríssimo	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₄ ^b	7,9	p. a.	Merck
KH ₂ PO ₄	3,0	p. a.	Merck
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,45	p. a.	Merck
Extracto de levedura	3,0	diagnóstico	Oxoid
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,23	p. a.	Merck
NaCl	0,7	p. a.	Merck
FeCl ₃ ·6H ₂ O	15×10 ⁻³	p. a.	Merck
MnSO ₄ ·H ₂ O	16×10 ⁻³	p. a.	Merck
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9×10 ⁻³	p. a.	Merck
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,4×10 ⁻³	p. a.	M&B
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	4×10 ⁻³	p. a.	Merck
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,3×10 ⁻³	p. a.	Merck
mio-inositol	60×10 ⁻³	99 %	Sigma
pantotenato de cálcio	30×10 ⁻³	-	Sigma
ác. nicotínico	6×10 ⁻³	-	Sigma
tiamina	6×10 ⁻³	-	Sigma
piridoxina	1,5×10 ⁻³	-	Sigma
d-biotina	30×10 ⁻⁶	99 %	Sigma

^a - alternativamente, dependendo da fonte de carbono a utilizar

^b - alternativamente, dependendo da fonte de azoto a utilizar

3.1.2.2 Preparação do inóculo

Tal como no caso da estirpe floculante recorre-se a um pré-inóculo, a partir da cultura em tubo inclinado, num matraz de 250 mL com 100 mL de meio de cultura. Após incubação a 30 °C com agitação orbital (60 r.p.m.) durante 12 horas, transfere-se o conteúdo do matraz para um vaso de 2 L, contendo 1,5 L de meio estéril. O vaso é arejado à taxa de 3 L·min⁻¹ (PTN), o que também promove a agitação, e incubado a 30 °C durante 14 horas, período após o qual o inóculo pode ser transferido para o bioreactor.

3.2 Bioreactor airlift

3.2.1 Características e equipamento

O bioreactor *airlift* utilizado está representado na Figura 3.1 e foi descrito detalhadamente por Sousa (1994).

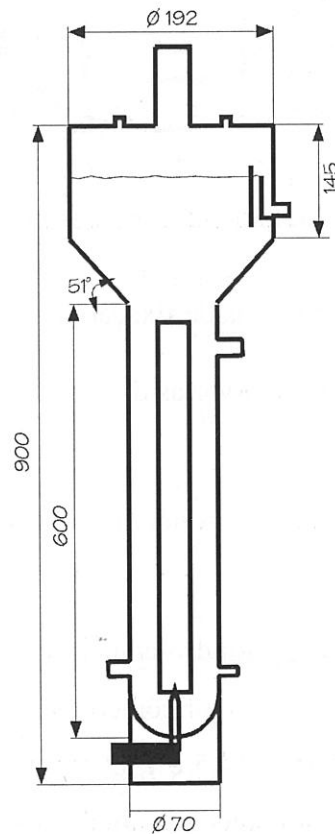


Figura 3.1: Bioreactor *airlift* (dimensões em milímetros).

Trata-se de um *airlift* de circulação interna, de tubos concêntricos, construído em Perspex[®] com uma altura total de 90 cm, tendo um tubo descendente com 60 cm de altura e um diâmetro interno de 7 cm. O líquido no interior do reactor atinge uma altura de 77 cm, correspondendo a um volume útil de 6 L. O sistema de fixação do tubo interno foi construído por forma a permitir a sua fácil substituição (Figura 3.2). Uma pequena barra em aço inox está fixa ao tubo interno e é revestida com tubo de silicone; é este revestimento que vai fixar o tubo interno, impedindo-o de se deslocar (em condições normais de funcionamento).

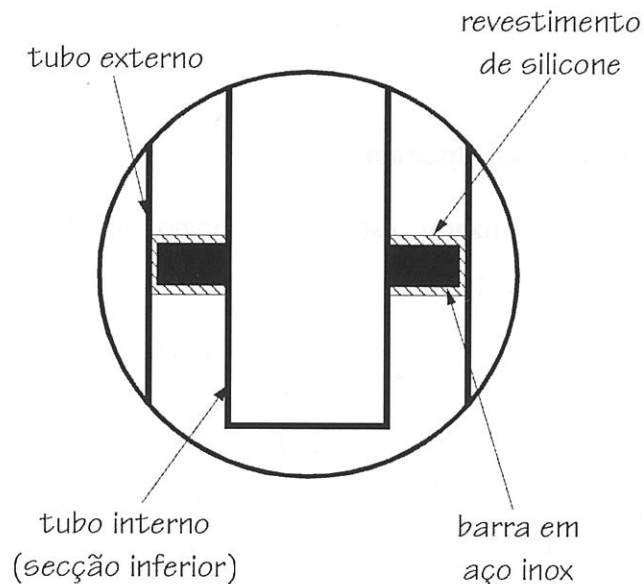


Figura 3.2: Sistema de fixação do tubo interno.

Foram utilizados tubos internos com várias dimensões, descritas em detalhe no capítulo 5.

A injeção do gás é feita na parte inferior do tubo interno por um injetor com um orifício de 1 mm de diâmetro.

A secção superior (decantador) é cilindro-cónica para facilitar a libertação do gás e a sedimentação dos sólidos. O ângulo do sector cónico com o corpo do reactor é de 51° sendo a altura e o diâmetro da parte cilíndrica 14,5 e 19,2 cm, respectivamente. No local de saída do efluente, existente nesta secção, foi colocado um anteparo para minimizar o arrastamento da biomassa. No topo do sedimentador é colocada uma tampa com vários orifícios destinados a albergar eléctrodos ou a permitir a adição de anti-espuma ou de soluções de controlo do pH. Da tampa faz ainda parte uma chaminé de saída de gases, onde se ajusta um

rolhão de algodão devidamente esterilizado, destinado a impedir a entrada de partículas estranhas durante o decurso da fermentação.

Quando utilizado em estudos de hidrodinâmica, o equipamento do bioreactor *airlift* resume-se a um sistema de injeção de ácido ou base e um eléctrodo de pH, ligado a um sistema informático para aquisição de dados.

Por outro lado, se o objectivo é efectuar fermentações, são utilizados eléctrodos de pH e oxigénio (colocados na parte superior do reactor), um sistema de controlo de pH e monitorização da tensão de oxigénio, uma camisa de controlo de temperatura, um elemento de filtração e outro de controlo de fluxo do gás de entrada, um condensador dos gases de saída e um sistema de alimentação de substrato. As características deste equipamento estão detalhadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Características do equipamento do bioreactor *airlift*.

Equipamento	Marca (Origem)	Descrição e características
Eléctrodo de pH	Ingold (Suíça)	eléctrodo combinado de vidro
Controlador de pH	B. Braun (Alemanha)	bomba peristáltica; solução de NH ₃ (1 parte de amónia comercial em 2 partes de água)
Eléctrodo de oxigénio	Ingold (Suíça)	eléctrodo polarográfico
Arejamento	-	ar atmosférico comprimido, esterilizado por filtro de algodão
Controlador do caudal de arejamento	Hastings (EUA)	medidor de caudal mássico
Tratamento do gás de saída	-	condensador de dupla serpentina (tipo Dimroth); filtro de sílica
Controlo de temperatura	B. Braun (Alemanha)	serpentina enrolada no exterior do corpo do bioreactor; bomba de circulação; resistência eléctrica; banho termostaticado
Alimentação do substrato	B. Braun (Alemanha)	bomba peristáltica com velocidade regulável

A calibração do eléctrodo de pH é feita *a priori* recorrendo a duas soluções tampão a pH 7 (zero) e 4 (declive) (Ingold, Suíça); o eléctrodo de oxigénio é calibrado fazendo passar

N₂ gasoso (zero) e ar (declive) pelo meio de fermentação à temperatura de operação, onde o eléctrodo se encontra mergulhado.

A alimentação de substrato realiza-se com o auxílio de uma bomba peristáltica (FE 411, B. Braun, Alemanha), a partir de recipientes em aço inox, esterilizáveis em autoclave, com uma capacidade de 15 L.

3.2.2 Esterilização

Dado que o material utilizado na construção do bioreactor *airlift* não suporta temperaturas superiores a 80 °C é necessário o recurso à esterilização química. Após testar várias substâncias (incluindo a que foi anteriormente utilizada (Sousa 1994): Betadine - solução dérmica) e tendo em consideração o facto de o material ser sensível aos solventes orgânicos, verificou-se que a mais eficaz é uma solução de uma parte de hipoclorito de sódio comercial (lixívia) em quinze partes de água. Esta solução deve ser bombeada para o bioreactor (com os eléctrodos já instalados) onde deve permanecer durante 48 horas. Após esse período, procede-se à lavagem com água previamente esterilizada, enchendo e esvaziando o reactor pelo menos duas vezes por forma a reduzir ao mínimo a concentração residual de hipoclorito de sódio. Finda esta operação, o reactor encontra-se estéril, pronto a receber o meio de cultura. Obviamente, tanto o rolhão de algodão que se coloca na chaminé do reactor como o filtro do ar de entrada necessitam de uma esterilização prévia em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.2.3 Inoculação e fermentação

Após o enchimento do reactor com meio de cultura, deve efectuar-se o arejamento à taxa desejada até atingir a concentração de saturação do líquido com oxigénio (nas condições do ensaio), correspondendo a um valor de 100 % indicado pelo respectivo eléctrodo, permitindo, simultaneamente, o equilíbrio da temperatura. Atingidas estas condições, o reactor está pronto a ser inoculado, o que se faz simplesmente transferindo o inóculo do matraz onde se encontra para o fermentador com o auxílio de uma bomba peristáltica.

O sistema está preparado para operação em descontínuo; se for necessário utilizá-lo em modo contínuo deve deixar-se o sistema em descontínuo durante 15 horas, período após o

qual pode iniciar-se a adição de substrato à taxa de diluição pretendida. Na Tabela 3.4 resumem-se as condições de operação.

Tabela 3.4: Condições de operação do bioreactor *airlift*.

Variável	Valor
Temperatura	$30,0 \pm 0,1$ °C
pH	$4,0 \pm 0,1$
Caudal de arejamento	600 a 7900 ± 1 mL·min ⁻¹ (PTN)
Taxa de diluição	$0,03 - 0,40 \pm 0,01$ h ⁻¹

3.3 Tanque agitado

3.3.1 Características e equipamento

O tanque agitado utilizado (Chemap, Suíça) está construído em vidro de boro-silicato e aço inox e tem uma capacidade máxima de 14 L (diâmetro interno de 22 cm). A agitação é promovida por um veio com dois impulsores de 6 lâminas cada e o arejamento faz-se por meio de um anel perfurado.

Do equipamento fazem parte sondas de temperatura, pH, oxigénio e detecção de espuma, um motor com controlador de agitação, um acessório para o controlo da massa do reactor (que permite uma regulação muito eficaz do nível de líquido durante fermentações em contínuo) e um rotâmetro para medir o caudal de arejamento. Existem também sistemas para controlo de pH e do nível de espuma, monitorização da tensão de oxigénio, uma serpentina de controlo de temperatura e um filtro do gás de entrada.

A calibração dos eléctrodos de pH e oxigénio é feita de modo semelhante à já descrita para o bioreactor *airlift*. A alimentação de substrato faz-se recorrendo a uma bomba peristáltica (Watson Marlow, Reino Unido) a partir de um recipiente contendo o meio estéril.

Na Tabela 3.5 o equipamento é descrito com maior detalhe.

Tabela 3.5: Características do equipamento do tanque agitado.

Equipamento	Marca (Origem)	Descrição e características
Eléctrodo de pH	Ingold (Suíça)	eléctrodo combinado de vidro
Controlo de pH	Chemap (Suíça)	2 bombas peristálticas; soluções de NaOH ($3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e H_2SO_4 ($1,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Eléctrodo de oxigénio	Ingold (Suíça)	eléctrodo polarográfico
Arejamento	-	bomba de ar com membrana; filtro de $75 \mu\text{m}$; rotâmetro; anel perfurado
Sonda de temperatura	-	Pt-100
Controlo de temperatura	Chemap (Suíça)	serpentina no interior do bioreactor; bomba de circulação; resistência eléctrica; circuito fechado
Sonda de detecção de espuma	-	condutividade eléctrica
Controlo anti-espuma		bomba peristáltica para adição de óleo de silicone
Controlo da massa do bioreactor	Chemap (Suíça)	balança integrada no bioreactor accionando uma bomba peristáltica para retirar líquido quando o valor de referência é ultrapassado
Alimentação do substrato	Watson Marlow (Reino Unido)	bomba peristáltica com velocidade regulável

3.3.2 Inoculação e fermentação

A inoculação do tanque agitado faz-se transferindo o inóculo entretanto já preparado (com cerca de 1,5 L) para o bioreactor, que já contém 2 L de meio estéril, saturado com ar e à temperatura de operação. Após 3 horas de funcionamento em descontínuo, liga-se o sistema de adição de substrato (à taxa de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) para que o volume de líquido dentro do bioreactor atinja o valor pretendido: 5 L para fermentações em contínuo e 6 L para fermentações em descontínuo; uma vez atingido esse valor, activa-se o sistema de controlo de peso (se se pretende operar em modo contínuo) ou desactiva-se a adição de substrato (se se pretender operar em modo descontínuo).

Na Tabela 3.6 resumem-se as condições de operação.

Tabela 3.6: Condições de operação do tanque agitado.

Variável	Valor
Temperatura	$30,0 \pm 0,1$ °C
pH	$4,00 \pm 0,01$
Caudal de arejamento	$5 \pm 0,2$ L·min ⁻¹ (PTN)
Taxa de diluição	$0,11 - 0,38 \pm 0,01$ h ⁻¹
Volume (operação em contínuo/descontínuo)	5,00/6,00 $\pm 0,05$ L

3.4 Preparação das bolas de alginato de cálcio

As bolas de alginato de cálcio utilizadas nos estudos hidrodinâmicos obtêm-se dissolvendo 2 % (p/v) de alginato de sódio (Manutex RSX, Kelco International, Ltd., Reino Unido), com agitação forte, em água destilada aquecida a 70 °C. Esta solução é filtrada e, após o arrefecimento, bombeada a um caudal de 20 mL·h⁻¹ por uma bomba peristáltica de quatro canais (Ismatec MS-Reglo, Ismatec, Suíça) através de orifícios com 1 mm de diâmetro, gotejando para uma solução de cloreto de cálcio a 2 % (p/v), suavemente agitada, desde uma altura mínima de 10 cm acima da superfície do líquido, de maneira a obter uma forma esférica. As bolas devem permanecer nesta solução durante cerca de 24 horas para permitir o seu endurecimento por reticulação do alginato.

Para evitar o crescimento de microorganismos e manter a sua estrutura, as bolas conservam-se imersas numa solução de cloreto de cálcio a 2 % (p/v), a uma temperatura de 4 °C; alternativamente pode acrescentar-se azida sódica, na concentração de 0,1 % (p/v), à solução de cloreto de cálcio.

Antes de cada utilização as bolas devem ser lavadas com água, devendo ser substituídas ao fim de três experiências uma vez que as suas dimensões e densidade se alteram por contacto com soluções com valores de pH abaixo de 4 e acima de 10, que ocorrem normalmente durante os ensaios para determinação dos tempos de mistura e de circulação. O volume de bolas a colocar no reactor mede-se a partir do volume de água deslocado pela sua adição em provetas de 0,5 a 1 L (dependendo da quantidade de bolas necessária) (Sousa 1994).

A preparação e conservação de bolas contendo células é em tudo idêntica à anteriormente descrita, apenas se suspendendo 20 % (p/v) de fermento de padeiro (Activa, Gist-Brocades, Portugal) na água destilada, que deve ser seguidamente aquecida a 50 °C durante 1 hora para inactivar as células. Esta suspensão, subsequentemente aquecida a 70 °C, vai substituir a água destilada no procedimento acima descrito.

3.5 Determinação dos tempos de mistura e de circulação

Para determinar os tempos de mistura e de circulação utiliza-se a técnica do pulso de pH (Kawase *et al.* 1994 e Lu *et al.* 1994). Na Figura 3.3 representa-se a instalação experimental usada nas experiências. O sistema de medição de pH (Metrohm 691, Suíça) está acoplado a um sistema de aquisição de dados (PCL-812 PG Enhanced Multi-Lab Card, Advantech Co. Ltd., EUA) que transmite o sinal a um computador pessoal.

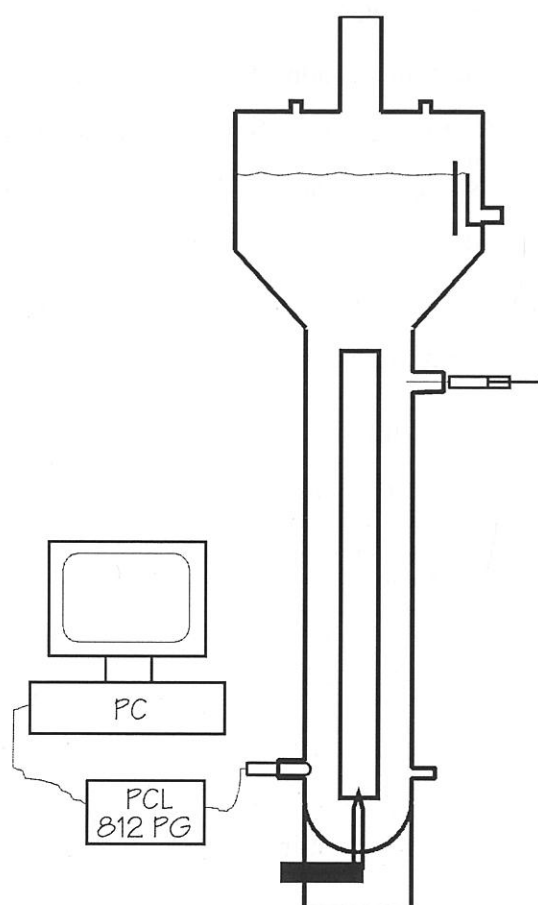


Figura 3.3: Diagrama esquemático da instalação experimental.

O sensor de pH localiza-se 4 cm acima do fundo do reactor e o local da injeção, feita com uma seringa, situa-se 41 cm acima do fundo do reactor, ambos no tubo externo. O sinal obtido é fortemente dependente quer da localização do eléctrodo e do ponto de injeção, quer das suas posições relativas, pelo que se determinou previamente qual a melhor combinação por forma a obter sinais com o maior número possível de picos. As curvas de resposta típicas obtidas com este sistema estão representadas na Figura 3.4.

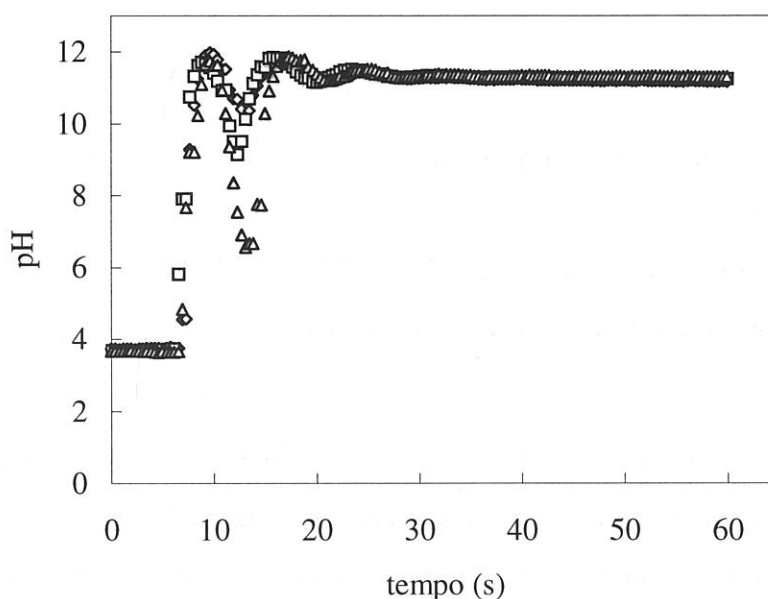


Figura 3.4: Curvas de resposta típicas do método de pulso de pH.

Começa-se por fazer o valor de pH descer até próximo de 3 adicionando H_2SO_4 ($0,25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); após estabilização, injecta-se no local indicado na Figura 3.3 um pulso de 5 mL de uma solução de NaOH ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Neste momento inicia-se a aquisição de dados, terminando quando se obtém novamente um valor de pH constante ($\pm 5\%$ do valor de equilíbrio), que agora se situa na gama 10 - 12. Dada a variabilidade dos valores obtidos, devem realizar-se medições em triplicado. Para minimizar a alteração do tamanho das bolas de alginato (ficam túrgidas ao permanecerem em soluções com valores extremos de pH) estas devem lavar-se com água corrente no fim de cada experiência e ser substituídas ao fim das três réplicas feitas com cada conjunto de condições experimentais.

3.6 Métodos analíticos

Sempre que não for possível analisar as amostras de fermentação no momento da sua recolha, estas devem ser arrefecidas a 4 °C e centrifugadas àquela temperatura, sendo o sobrenadante imediatamente congelado. Excluem-se as quantificações de biomassa e as determinações de viabilidade, que devem ser sempre efectuadas na ocasião da amostragem.

3.6.1 Quantificação da biomassa

3.6.1.1 *Estirpe floculante*

Uma medida da concentração de biomassa obtém-se por leitura da densidade óptica num espectrofotómetro (Hitachi U-1100, Japão), correlacionada com o respectivo peso seco. A leitura da densidade óptica é efectuada a um comprimento de onda de 620 nm contra um branco de água. Uma vez que a gama linear se situa entre 0 e $\approx 1,0$ unidades de absorvância pode haver necessidade de diluir a amostra.

Como se trata de uma estirpe floculante é necessário proceder a uma desfloculação antes de efectuar a leitura no espectrofotómetro. O processo de desfloculação começa centrifugando a amostra (20 a 50 mL) durante 5 minutos a 2000 g, rejeitando o sobrenadante e ressuspendendo as células em solução de EDTA 50 mmol·L⁻¹; seguem-se duas lavagens idênticas, uma com a mesma solução de EDTA e outra com água ultra-pura. Por fim, as células são ressuspendidas numa solução desfloculante (NaCl 15 g·L⁻¹, a pH 4) estando preparadas para a leitura no espectrofotómetro. Se houver necessidade de diluir a amostra, a diluição deve ser feita com a solução desfloculante. Todas as soluções são preparadas com água ultra-pura.

A curva de calibração para a conversão da densidade óptica em peso seco é elaborada do seguinte modo: filtram-se (em triplicado) 50 mL de uma suspensão com aproximadamente 0,30 g_{peso seco}·L⁻¹ (correspondendo a valores de absorvância próximos de 1) com filtros de 0,45 µm de diâmetro de poro (Gelman Sciences, EUA), que se colocam numa estufa a 108 °C até peso constante; o peso seco da biomassa determina-se por diferença para o peso seco inicial dos filtros, previamente submetidos ao mesmo tratamento de secagem; seguidamente, preparam-se suspensões diluídas (correspondendo a valores de concentração entre cerca de 0,06 e 0,30 g_{peso seco}·L⁻¹) a partir da suspensão original,

efectuando a leitura das respectivas densidades ópticas. A representação destes valores em função do respectivo peso seco (obtido multiplicando o factor de diluição pelo peso seco da suspensão original, anteriormente determinado) constitui a curva de calibração.

3.6.1.2 *Estirpe não floculante*

A concentração da biomassa em suspensão, no caso da estirpe não floculante, é determinada utilizando dois métodos alternativos: o método espectrofotométrico anteriormente descrito (exceptuando o passo de desfloculação, agora desnecessário) e um método gravimétrico, que consiste em recolher amostras de 25 mL (em duplicado), centrifugá-las durante 5 minutos a 2000 g e lavá-las com água destilada, secando-as a 108 °C até peso constante em vidros de relógio previamente tarados.

3.6.2 **Determinação da viabilidade celular**

A viabilidade celular é determinada com base no método de coloração com azul de metileno (Jones 1987) e contagem em câmara de Neubauer.

À suspensão de células junta-se igual volume de solução de azul de metileno (0,1 g·L⁻¹ de azul de metileno em água ultra-pura) e aguarda-se 5 minutos. Terminado este tempo, enche-se a câmara de Neubauer com a suspensão corada e observa-se ao microscópio, determinando a proporção de células viáveis (não coradas de azul) em relação ao número total de células.

As células floculantes têm que ser desfloculadas, utilizando o processo descrito em 3.6.1.1, antes da adição do corante.

3.6.3 **Quantificação da glucose**

3.6.3.1 *Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)*

A concentração de glucose é determinada por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), usando um detector de índice de refração (830-RI, Jasco, Japão). A amostra (20 µL) é filtrada (filtros de 0,20 µm, Gelman Sciences, EUA) e injectada numa coluna Polyspher[®] CH CA (Merck, Alemanha), aquecida a 85 °C através de um forno com controlador de temperatura (Chrompack, Países Baixos) e eluída com uma solução de Na₂SO₄, 0,01 mol·L⁻¹, filtrada e desgaseificada por ultra-sons. O caudal de eluente é de 0,5 mL·min⁻¹, debitado por uma bomba 880-PU (Jasco, Japão).

As curvas de calibração são previamente determinadas com soluções padrão de glucose (Merck, Alemanha).

3.6.3.2 Doseamento de açúcares redutores pelo método de Miller (DNS)

Alternativamente pode utilizar-se o método de Miller (1959), específico para o doseamento de açúcares com poder redutor, na quantificação da glucose. Este método baseia-se na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. A presença do tartarato duplo de sódio e de potássio (sal de La Rochele) destina-se a proteger o reagente da acção do oxigénio dissolvido.

O método consiste em adicionar 0,5 mL da amostra a analisar a 0,5 mL do reagente DNS, mergulhando a solução resultante num banho de água em ebulição durante 5 minutos. Após um arrefecimento rápido com água fria, adicionam-se 5 mL de água destilada e lê-se a densidade óptica num espectrofotómetro a 540 nm, sendo a concentração de glucose na amostra determinada a partir de uma curva de calibração, previamente construída com padrões de glucose com concentrações entre 0 e 1 g·L⁻¹.

O reagente de DNS prepara-se dissolvendo 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 100 mL de NaOH 2 mol·L⁻¹ a 80 °C. Simultaneamente, dissolvem-se 150 g de tartarato duplo de sódio e de potássio (sal de La Rochele) em 250 mL de água destilada, também a 80 °C. Após a dissolução completa misturam-se as duas soluções ajustando o volume final a 500 mL, com água destilada. A solução deve conservar-se num frasco escuro.

3.6.4 Quantificação do etanol

3.6.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

A determinação da concentração de etanol em amostras por Cromatografia Líquida de Alta Resolução é em tudo semelhante (procedimentos, equipamento, condições de operação) à anteriormente descrita para o caso da glucose. De facto, ambas as determinações são feitas em simultâneo, uma vez que a coluna e as condições utilizadas permitem uma separação perfeita dos picos cromatográficos correspondentes às duas espécies.

Neste caso, obviamente, a curva de calibração é determinada com etanol (Merck, Alemanha).

3.6.4.2 Cromatografia Gasosa (GC)

Nas fermentações com leveduras não floculantes, além da determinação da concentração de etanol, é importante verificar a presença de outros possíveis produtos da fermentação (acetaldeído, glicerol, acetato de etilo e álcoois superiores). Assim sendo, é necessário recorrer à Cromatografia Gasosa, que permite a detecção e determinação simultânea daqueles compostos.

As análises cromatográficas são feitas utilizando uma coluna Carbowax 1500, Chromsorb WAW 80/100 (Supelco, EUA), com o injector, o forno e o detector (Shimadzu GC-8A, Japão) a 170 °C, 130 °C e 210 °C, respectivamente. As pressões de N₂, ar e H₂ são, respectivamente, de 2, 0,5 e 0,5 kgf·cm⁻² e o volume da amostra injectada é de 2 µL.

Efectuam-se periodicamente curvas de calibração usando metanol como padrão interno. Os padrões de etanol utilizados têm concentrações de 0,2 a 10,0 g·L⁻¹, adicionando-se 50 µL de uma solução de metanol (200 g·L⁻¹) a 10 mL de cada padrão. As amostras sofrem o mesmo tratamento antes de serem injectadas.

Preparam-se também calibrações para acetaldeído e para acetato de etilo, com concentrações de 0,02 a 1,00 g·L⁻¹, utilizando o mesmo procedimento.

3.6.5 Quantificação da ureia e da amónia

As concentrações de ureia e de amónia nas amostras de fermentação determinam-se por meio de reacções enzimáticas realizadas com o conjunto de testes n.º 542946 da Boehringer Mannheim (Alemanha).

Os testes baseiam-se na hidrólise da ureia a amónia e dióxido de carbono na presença da enzima urease:



A amónia, por sua vez, reage com o 2-oxoglutarato (que se converte em L-glutamato) à custa de um nucleótido reduzido de nicotinamida-adenina (NADH), que se oxida (NAD⁺), em presença da enzima glutamato desidrogenase (GIDH):



A quantidade de NADH que é oxidada tem uma relação estequiométrica de 1:1 com a quantidade de amónia e de 2:1 com a quantidade de ureia, segundo as equações acima. Assim sendo, determinando NADH espectrofotometricamente a 334, 340 ou 365 nm, é possível obter as concentrações de ureia e de amónia em solução.

3.6.6 Determinação do volume ocupado pelos flocos e da sua massa específica

A determinação do volume dos flocos é feita por um sistema semelhante ao utilizado na determinação do volume das bolas de alginato: após avaliar o volume total ocupado por uma suspensão de flocos em meio de cultura, “filtra-se” essa suspensão por um coador de cozinha. O volume ocupado pelos flocos é a diferença entre o volume total e o volume de líquido filtrado.

A massa específica dos flocos obtém-se com o auxílio de um picnómetro. A diferença entre a massa do picnómetro vazio e a massa total quando este se encontra cheio com água pura a uma dada temperatura, é igual à massa de água àquela temperatura, à qual corresponde um volume igual ao volume exacto do picnómetro. Por outro lado, colocando no picnómetro vazio flocos de levedura aos quais se retirou, cuidadosamente, a água superficial e determinando a massa do conjunto, fica a saber-se a massa dos flocos por diferença com a massa do picnómetro vazio. Se este, ainda com os flocos, for completado com água pura a uma dada temperatura e novamente pesado, ao excesso de massa corresponde um volume de água que, subtraído ao volume do picnómetro, permite obter o volume dos flocos. A divisão da massa destes últimos, anteriormente determinada, pelo seu volume, corresponde à massa específica.

3.6.7 Determinação da composição dos gases à saída do bioreactor

3.6.7.1 Espectrometria de massa

O método de eleição para realizar as medições das concentrações dos gases de saída de um bioreactor é a espectrometria de massa. O espectrómetro de massa utilizado (Bioquad, Ledamass, Reino Unido) é constituído por um sistema de vácuo, um analisador de gás do tipo quadripolo e uma entrada capilar. O vácuo é gerado por duas bombas rotativas e uma bomba turbo-molecular; do analisador fazem parte uma fonte de alimentação, um emissor de rádio-frequência, um amplificador e uma unidade de controlo.

O sistema quadripolo funciona por emissão de electrões por um filamento aquecido, electrões esses que vão colidir com as moléculas do gás a analisar na região de ionização do analisador, produzindo fragmentos de iões. Esses fragmentos atravessam campos eléctricos que os direccionam para um filtro de massas cuja função é seleccionar os iões com uma razão massa/carga determinada, rejeitando todos os outros. Alterando a magnitude das voltagens desses campos eléctricos é possível fazer o varrimento dos valores da razão massa/carga desde 0 até cerca de 1000 (Gordon e Macrae 1987).

As massas dos iões seleccionados são convertidas numa corrente eléctrica que é proporcional à correspondente pressão parcial molecular na fonte, por intermédio de um detector do tipo *taça de Faraday*, obtendo-se assim o espectro de massas da amostra, em que as alturas dos picos são proporcionais ao respectivo valor da pressão parcial (em *torr*).

O aparelho é comandado por um programa informático instalado num computador pessoal.

Calibração

A calibração do espectrómetro efectua-se com uma mistura de gases cuja composição é conhecida (Union Carbide, Espanha): azoto 70,04 %, oxigénio 19,95 % e dióxido de carbono 10,01 % (percentagens volúmicas ou molares). O oxigénio e o dióxido de carbono são gases comuns em fermentações aeróbias e o azoto é necessário para determinar o caudal do gás de saída do bioreactor, segundo a equação:

$$G_{sai} = G_{ent} \cdot \left(\frac{y_{ent, N_2}}{y_{sai, N_2}} \right) \quad (3.3)$$

em que G representa o caudal molar de gás e y a fracção molar (ou volúmica) do azoto no gás em questão, sendo o índice *ent* referente ao gás de entrada e o índice *sai* referente ao gás de saída.

É conveniente que as condições de calibração e de análise sejam semelhantes, pelo que existe um medidor de caudal mássico (Hi-Tec F-111C-HA, Bronkhurst, Países Baixos) e uma válvula de agulha (Nupro, EUA) antes da entrada capilar do espectrómetro.

Determinação da composição de gases

Cada componente puro possui um espectro de massas particular, constituído pelos vários picos de massa resultantes da sua fragmentação ao passar no analisador. Assim sendo, ao analisar uma mistura de gases, é natural supor que cada pico do espectro de massas resultante é constituído pelas contribuições dos iões moleculares ou dos fragmentos de iões que foram gerados. Supõe-se que essas contribuições possam ser linearmente adicionadas sendo a altura (ou intensidade) de cada pico (I_j) igual à soma das alturas dos picos individuais (I_{ji}) que seriam produzidos se cada componente (i) estivesse sozinho no sistema:

$$I_j = \sum_i I_{ji} \quad (3.4)$$

Assim sendo, para corrigir as interferências entre os componentes de uma mistura utiliza-se o método de desconvolução ou desacoplamento (Bartman 1987 e Lee 1990), determinando os sinais desacoplados de cada componente, pela equação:

$$S = F^{-1} I \quad (3.5)$$

em que S representa o vector dos sinais desacoplados, I é o vector dos sinais gerados pelo espectrómetro ($=[I_j]$) e F^{-1} é a matriz de desconvolução, que tal como se indica corresponde à inversa da matriz de fragmentação, F .

Como foi atrás referido, numa fermentação aeróbia são necessárias apenas determinações de azoto, oxigénio e dióxido de carbono, com massas relativas de 28, 32 e 44, respectivamente. Para quantificar estes gases utilizam-se os sinais gerados para as respectivas massas, tendo a matriz de fragmentação F a seguinte forma (as linhas representam os chamados picos-base, correspondentes às massas acima referidas, e as colunas representam as fragmentações de cada componente nesses picos-base):

$$F \equiv \begin{bmatrix} f_{28}^{N_2} & f_{28}^{O_2} & f_{28}^{CO_2} \\ f_{32}^{N_2} & f_{32}^{O_2} & f_{32}^{CO_2} \\ f_{44}^{N_2} & f_{44}^{O_2} & f_{44}^{CO_2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0,08 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.6)$$

pelo que a matriz de desacoplamento será:

$$F^{-1} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -0.08 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.7)$$

sendo os sinais desacoplados determinados pelas equações que se seguem:

$$p_{N_2} = I_{28} - 0.08I_{44} \quad (3.8)$$

$$p_{O_2} = I_{32} \quad (3.9)$$

$$p_{CO_2} = I_{44} \quad (3.10)$$

Por fim, determina-se a fracção molar de cada componente, y_i , dividindo cada elemento do vector das pressões parciais P pela soma dos elementos desse vector e multiplicando o resultado pela matriz dos factores de calibração, C :

$$y_i = \frac{C \times P}{\sum_{i=1}^3 p_i} \quad (3.11)$$

A matriz de calibração resulta da análise do espectro de massas da mistura de gases de calibração tendo-se obtido, a partir das várias calibrações efectuadas, os valores médios para o azoto (1,011), oxigénio (1,189) e dióxido de carbono (0,732), dando origem à matriz:

$$C = \begin{bmatrix} 1,011 & 0 & 0 \\ 0 & 1,189 & 0 \\ 0 & 0 & 0,732 \end{bmatrix} \quad (3.12)$$

Ferreira (1995) apresenta uma descrição mais pormenorizada deste método de análise.

3.6.7.2 Outros métodos de análise de gases

As fracções volumétricas do oxigénio e do dióxido de carbono no gás de saída do bioreactor podem igualmente determinar-se por analisadores de gás específicos.

No caso do oxigénio utiliza-se um analisador paramagnético (Beckman 755, Beckman Instruments, EUA), cujo funcionamento se baseia no facto de, num campo magnético não uniforme, as substâncias que têm propriedades paramagnéticas tenderem a dirigir-se para a

zona onde o campo é mais forte. Isto permite medir a concentração daquelas substâncias, nomeadamente o oxigénio, que é o gás mais fortemente paramagnético (Perry e Chilton 1984).

No caso do dióxido de carbono usa-se um analisador de infravermelho (Beckman 870, Beckman Instruments, EUA), que mede a diminuição da intensidade de um raio electromagnético provocada pela absorção da radiação pelas moléculas daquele gás; essa medição permite obter a concentração do gás na mistura gasosa por aplicação da lei de Lambert-Beer.

Ambos os instrumentos necessitam de uma calibração, feita com uma mistura de gases de composição conhecida semelhante à utilizada na calibração do espectrómetro de massa.

3.7 Bibliografia

- Bartman, C. D., 1987. The Application of a Quadrupole Mass Spectrometer to Biotechnology Process Control. In: E. Heinzle e M. Reuss, eds. *Mass Spectrometry in Biotechnological Process Analysis and Control*. New York: Plenum Press, 1987, 49-61.
- Ferreira, E. M. F. C., 1995. Dissertação de Doutoramento: *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Fiechter, A., Käppeli, O. e Meussdoerffer, F., 1987. Batch and Continuous Culture. In: A. H. Rose e J. J. Harrison, eds. *The Yeasts*. Vol. 2, 2nd ed. London: Academic Press, 1987, 99-129.
- Gordon, M. H. e Macrae, R., 1987. *Instrumental Analysis in the Biological Sciences*. London: Blackie & Son, Ltd.
- Jones, R.-P., 1987. Measures of Yeast Death and Deactivation and Their Meaning: Part I. *Process Biochem.*, 118-128.
- Kawase, Y., Omori, N. and Tsujimura, M., 1994. Liquid-Phase Mixing in External Loop Airlift Bioreactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 61, 49-55.
- Lee, K.-S., 1990. Dissertação de Doutoramento: *Feedback Optimization of Fed-Batch Baker's Yeast Fermentation*. Purdue University, 1990.
- Lima, N., Teixeira, J. A. and Mota, M., 1992. Enhancement of Metabolic Rates of Yeast Flocculent Cells Through the Use of Polymeric Additives. *Bioprocess Eng.*, 7, 343-348.
- Lu, W.-J., Hwang, S.-J. and Chang, C.-M., 1994. Liquid Mixing in Internal Loop Airlift Reactors. *Ind. Eng. Chem. Research*, 33, 2180-2186.
- Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Netto, C., 1984. Dissertação de Doutoramento: *Fermentation Alcoolique par Levures Flocculées: Étude des Facteurs Limitants et Potentialités Technologiques*. Toulouse: Inst. National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Perry, R. H. e Chilton, C. H., 1984. *Chemical Engineers Handbook*. 5^a ed. New York: McGraw-Hill Book Company.

Sousa, M. L. M., 1994. Dissertação de Doutoramento: *Estudo e Desenvolvimento de Bioreactores de Floculação*. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Taylor, N. W. e Orton, W. L., 1975. *J. Inst. Brew.*, 79, 294.

4. Novas metodologias

Sumário

Este capítulo contém uma descrição detalhada de duas novas metodologias desenvolvidas no decurso deste trabalho e que se revelaram cruciais para a sua prossecução. A necessidade de tais metodologias ficou a dever-se à ausência de métodos com as características adequadas para efectuar, de uma forma fiável, a medição das propriedades pretendidas. Assim, apresenta-se um método de análise de imagem por computador (destinado essencialmente à avaliação da distribuição de tamanhos de flocos de levedura) e um outro para a determinação de coeficientes de difusão nos flocos.

4.1 Análise de imagem por computador

4.1.1 Introdução

A caracterização da biomassa é muito importante nas indústrias que dependem de processos biológicos (por exemplo, as indústrias farmacêutica e alimentar). Da mesma forma, determinações rotineiras de características tais como o diâmetro, o volume ou a morfologia das células, do número total de células presentes numa amostra, da sua viabilidade ou da distribuição de tamanhos de agregados celulares, são necessárias em áreas tão diversas como a biologia, a bioquímica ou a biotecnologia (Pons *et al.* 1992). Uma avaliação correcta destes e de outros parâmetros é fundamental para o controlo e optimização de bioprocessos (por exemplo, avaliação do tamanho e do desenvolvimento de bactérias responsáveis pela formação de biofilmes em peças de equipamento, determinação do tamanho óptimo para os flocos de levedura durante a produção de cerveja, determinação da concentração e viabilidade celular no processo de produção de fermento de padeiro).

Os processos fermentativos que utilizam leveduras floculantes são muito dependentes da distribuição do tamanho dos flocos. Este, por sua vez, é função da composição do meio, do caudal de arejamento, da taxa de diluição (em processos contínuos) e da idade da cultura. A presença de flocos de maior tamanho possibilita a manutenção de uma grande concentração de biomassa dentro do bioreactor, mas a viabilidade tende a ser menor devido às limitações difusionais que ocorrem no interior dos flocos. A compreensão dos fenómenos de transferência de massa em flocos de levedura e a sua quantificação revelam-se como factores muito importantes quando se estudam processos em que participam agregados celulares, como o fabrico de cerveja e a produção de etanol (Sousa *et al.* 1994) ou a formação de biofilmes (Hamdi 1995).

As taxas de difusão (ou de transporte, de uma maneira geral) de solutos ou de deposição de bactérias, por exemplo, são parâmetros que dependem do tamanho das células envolvidas. Por outro lado, a formação de agregados celulares tem grande influência nas propriedades de transporte do sistema, uma vez que aqueles tendem a apresentar maior velocidade de sedimentação e menores coeficientes de difusão. Em qualquer dos casos é necessária a determinação do tamanho ou, melhor ainda, da distribuição de tamanhos dos

agregados, para poder avaliar os parâmetros de transferência de massa característicos do sistema. Essas determinações, tanto quanto se sabe, ainda não foram feitas com flocos de levedura nem foi desenvolvido um método conveniente para as efectuar.

Em geral, a caracterização da biomassa (em termos de tamanho, morfologia, viabilidade) faz-se por métodos baseados na vista humana (Wilke e Vorlop 1994), que são frequentemente morosos e enfadonhos, tendo além disso uma baixa precisão. Aqui incluem-se as contagens e as análises morfológicas ao microscópio, assim como os métodos fotográficos, todos eles envolvendo cálculos mais ou menos laboriosos. A utilidade destes procedimentos “manuais” (isto é, não automáticos) é ainda mais restrita quando se considera o número elevado de imagens que é necessário analisar para obter dados significativos de um ponto de vista estatístico. Outros métodos como a citometria de fluxo (Al-Rubeai *et al.* 1995, López-Amorós *et al.* 1994 e Peterson e Patkar 1992) e a granulometria laser (Vaija *et al.* 1995) permitem a análise de milhões de objectos; no entanto, a citometria de fluxo apresenta dificuldades na coloração de agregados, uma vez que é essencialmente utilizada com células individuais (Peterson e Patkar 1992), enquanto se demonstrou que os valores obtidos por granulometria laser eram sempre inferiores aos valores reais (Vaija *et al.* 1995). Além disso, os flocos são estruturas frágeis que se quebram facilmente, sendo aconselhada a utilização de técnicas menos agressivas.

A análise de imagem por computador permite a determinação das características morfológicas dos microorganismos sem a intervenção directa do operador (Meinders *et al.* 1992) constituindo, por isso, um método automático de análise. O desenvolvimento de computadores mais rápidos, de sistemas avançados de captação de imagem e de programas mais sofisticados torna possível a utilização daquele método em aplicações de rotina.

A análise de imagem é uma ferramenta valiosa, tendo sido aplicada na caracterização morfológica de leveduras (Pons *et al.* 1993 e Vanhoutte *et al.* 1995), determinação da concentração de biomassa, extensão radial e dimensão fractal de micélios (Donnelly *et al.* 1995), monitorização de culturas de células animais (Pons *et al.* 1992), determinação do tamanho de células (Vaija *et al.* 1995) e medições em linha da concentração e de características morfológicas da biomassa em processos fermentativos (Suhr *et al.* 1995, Yamashita *et al.* 1993 e Zalewski *et al.* 1994).

Apresenta-se aqui um método normalizado que permite a determinação do número total de flocos de levedura presente numa amostra assim como a sua distribuição de tamanhos; é igualmente possível o cálculo do número de dupletos (conjuntos de dois flocos) tripletos e multipletos. Estas determinações realizam-se em função do limiar de reconhecimento instalado, cuja escolha é feita automaticamente.

4.1.2 Método

4.1.2.1 Amostragem

Os flocos de levedura utilizados obtêm-se com o bioreactor *airlift* descrito no capítulo 3, funcionando em contínuo (Sousa *et al.* 1994 e Vicente e Teixeira 1995).

Retiram-se duas amostras do bioreactor (tendo um cuidado especial para não romper os flocos) em duas ocasiões após a inoculação: a amostra 1 é recolhida com 48 horas de fermentação e a recolha da amostra 2 faz-se quando a cultura tem já 72 horas. De cada amostra preparam-se 10 placas de Petri com flocos, separando-os uns dos outros para minimizar a formação de agregados de flocos (dupletos, tripletos, etc.). Cada placa de Petri coloca-se na plataforma de uma lupa (Olympus SZ - 4045 TR Zoom Stereo Microscope, Japão), equipada com um adaptador para câmara de vídeo e uma base de iluminação (Olympus SZ - 12 A, Japão); as amostras são iluminadas por transmissão (Olympus LSGA EPI, Japão).

4.1.2.2 Análise de imagem

As imagens são captadas por meio de uma câmara de vídeo (Sony AVC-D5CE CCD, Japão), adaptada à lupa e ligada a uma placa electrónica de captação de imagem (DT 2851, Data Translation, Inc., EUA), instalada num computador pessoal. As imagens analógicas captadas pela câmara são digitalizadas pela placa electrónica, que as converte numa matriz com as dimensões de 512×512 *pixel*, representando cada *pixel* um valor na escala de cinzentos, que está compreendida entre 0 (preto) e 255 (branco).

De cada placa de Petri obtêm-se dez pares de imagens, que se gravam para posterior tratamento. As imagens são obtidas aos pares para permitir a realização de um tratamento prévio com o objectivo de melhorar a sua qualidade. Com as mesmas condições (de ampliação, iluminação, etc.) grava-se uma imagem sem os flocos.

O processamento realiza-se por meio de um programa especialmente desenvolvido para o efeito, e inicia-se com uma subtração da imagem sem os focos a cada uma das 200 imagens (100 pares) com focos. Este procedimento destina-se a eliminar das imagens contaminantes que porventura estivessem presentes nas lentes ou na câmara no momento da captação e serve também para uniformizar a iluminação. As duas réplicas de cada imagem são então multiplicadas. Esta operação resulta na redução do ruído e num maior contraste entre os objectos (focos) e o fundo. Nestas imagens os objectos aparecem escuros (valores baixos da escala de cinzentos) enquanto que o fundo é claro (valores elevados daquela escala).

Como o computador apenas é capaz de analisar imagens binárias (0 - preto; 1 - branco), os valores mais baixos da escala de cinzentos terão que ser convertidos em “0” e os mais elevados em “1”. Assim sendo, torna-se necessário definir um valor da escala de cinzentos, chamado **limiar** (*threshold*), que estabeleça o limite abaixo do qual todos os valores são convertidos a “0” e acima do qual são convertidos a “1”.

Esta escolha deve ser feita para cada imagem processada, por forma a tornar possível uma distinção óptima entre o fundo (mais claro) e os objectos (mais escuros). Um dos processos de a efectuar consiste em determinar o número total de focos (no conjunto das amostras) utilizando como limiar cada um dos valores da escala de cinzentos: de 0 a 255. Representando o número total de focos contados em função dos valores da escala de cinzentos (utilizados sucessivamente como limiar), verifica-se que existe uma gama de valores para os quais o número de focos contados se mantém constante; o limiar mais correcto estará dentro dessa gama.

Também é possível determinar o valor correcto do limiar recorrendo ao método de Otsu (1979). Este método foi adoptado aqui e permite uma escolha automática do limiar mais correcto para cada imagem e consiste na maximização da separação das classes de um histograma de valores da escala de cinzentos. A determinação do óptimo passa pela utilização dos momentos cumulativos de ordem 0 e 1 daquele histograma, determinando-se o máximo da função:

$$\omega_0 \omega_1 (\eta_1 - \eta_0)^2 \quad (4.1)$$

onde

$$\omega_0 = \sum_{i=1}^h p_i \quad \text{e} \quad \omega_1 = \sum_{i=h+1}^{255} p_i \quad (4.2)$$

e

$$\eta_0 = \frac{\sum_{i=1}^h i \cdot p_i}{\omega_0} \quad \text{e} \quad \eta_1 = \frac{\sum_{i=h+1}^{255} i \cdot p_i}{\omega_1} \quad (4.3)$$

em que ω_0 e ω_1 são os momentos cumulativos de ordem 0 e η_0 e η_1 são os momentos cumulativos de ordem 1 do histograma de valores da escala de cinzentos. Nas eqs. (4.1), (4.2) e (4.3) i é o valor da escala de cinzentos, h é o limiar e p_i é a probabilidade do valor i definida por:

$$p_i = \frac{n_i}{N} \quad (4.4)$$

onde n_i é o número de *pixel* com valor i na escala de cinzentos e N é o número total de *pixel*. O método assume a existência de pelo menos dois picos no histograma, um correspondente aos objectos e o outro ao fundo. Os dois picos estarão bem separados sempre que o contraste entre os objectos e o fundo for bom.

4.1.2.3 Análise dos dados

O número total de flocos e de conjuntos de flocos obtém-se analisando o número de objectos em função da área. Nem todos os flocos têm a mesma área mas estão distribuídos à volta de um valor médio. É razoável assumir que esta distribuição tem a forma de uma curva de Gauss:

$$n = k \cdot e^{-\left(\frac{x-\bar{a}}{\sigma}\right)^2} \quad (4.5)$$

em que n é o número de objectos com uma área x , k é um factor de normalização, \bar{a} é a área média e σ o desvio padrão. Fazendo um ajuste da eq. (4.5) aos pontos experimentais é possível obter os valores da área média e do desvio padrão. O número total de flocos isolados (isto é, não agrupados) calcula-se integrando a eq. (4.5):

$$\int_{-\infty}^{+\infty} k \cdot e^{-\left(\frac{x-\bar{a}_s}{\sigma_s}\right)^2} dx = \pi^{0.5} \cdot k \cdot \bar{a}_s \quad (4.6)$$

onde \bar{a}_s é a área média de um floco isolado e σ_s o respectivo desvio padrão. Se estão presentes conjuntos de flocos é possível utilizar uma soma de funções de Gauss como função de ajuste, tendo em vista a separação de dupletos, tripletos e multipletos.

Assim que a área média de um floco isolado for conhecida, o número total de flocos (n_{tot}) pode obter-se por separação dos conjuntos de flocos em flocos isolados de acordo com:

$$n_{tot} = \sum_{j=1}^{\infty} \frac{a_j}{\bar{a}_s} \cdot n_j \quad (4.7)$$

em que a_j é a área do floco j e n_j é o número de flocos com a área a_j .

Como alternativa, se for conhecido o número total de dupletos (n_d), tripletos (n_t) e multipletos (n_m) pode determinar-se o número total de flocos por:

$$n_{tot} = n_s + 2 \cdot n_d + 3 \cdot n_t + \sum_{m=4}^{\infty} m \cdot n_m \quad (4.8)$$

onde m se refere à ordem do multipletos m .

Por fim é necessário efectuar uma calibração dos eixos horizontal e vertical da imagem, que consiste em substituir os objectos por uma barra de comprimento conhecido; isto permite converter as unidades de área de *pixel* para o sistema métrico. Na direcção horizontal um *pixel* corresponde a 52 μm e na direcção vertical um *pixel* corresponde a 35 μm ; assim, cada *pixel* tem uma área de 1820 μm^2 .

4.1.3 Resultados e Discussão

O tamanho dos flocos depende da idade da cultura (Figura 4.1). Normalmente, crescem durante as primeiras 72 horas depois da inoculação, após o que se estabelece um equilíbrio dinâmico. Os flocos maiores acabam por se quebrar em flocos mais pequenos e biomassa livre. Esta é arrastada para fora do bioreactor, enquanto que os flocos menores voltam a crescer, fechando o ciclo. É importante que este ciclo produza flocos cuja distribuição de

tamanhos apresente um desvio padrão pequeno: um valor elevado deste parâmetro significa que vão coexistir no bioreactor flocos com tamanhos muito diferentes, tornando difícil a tarefa de caracterizar os mecanismos de transferência de massa e reacção bioquímica que ocorrem no sistema (Hamdi 1995). Na indústria, por exemplo, flocos com diferenças de tamanho muito significativas poderão apresentar um metabolismo diferente, consoante o seu

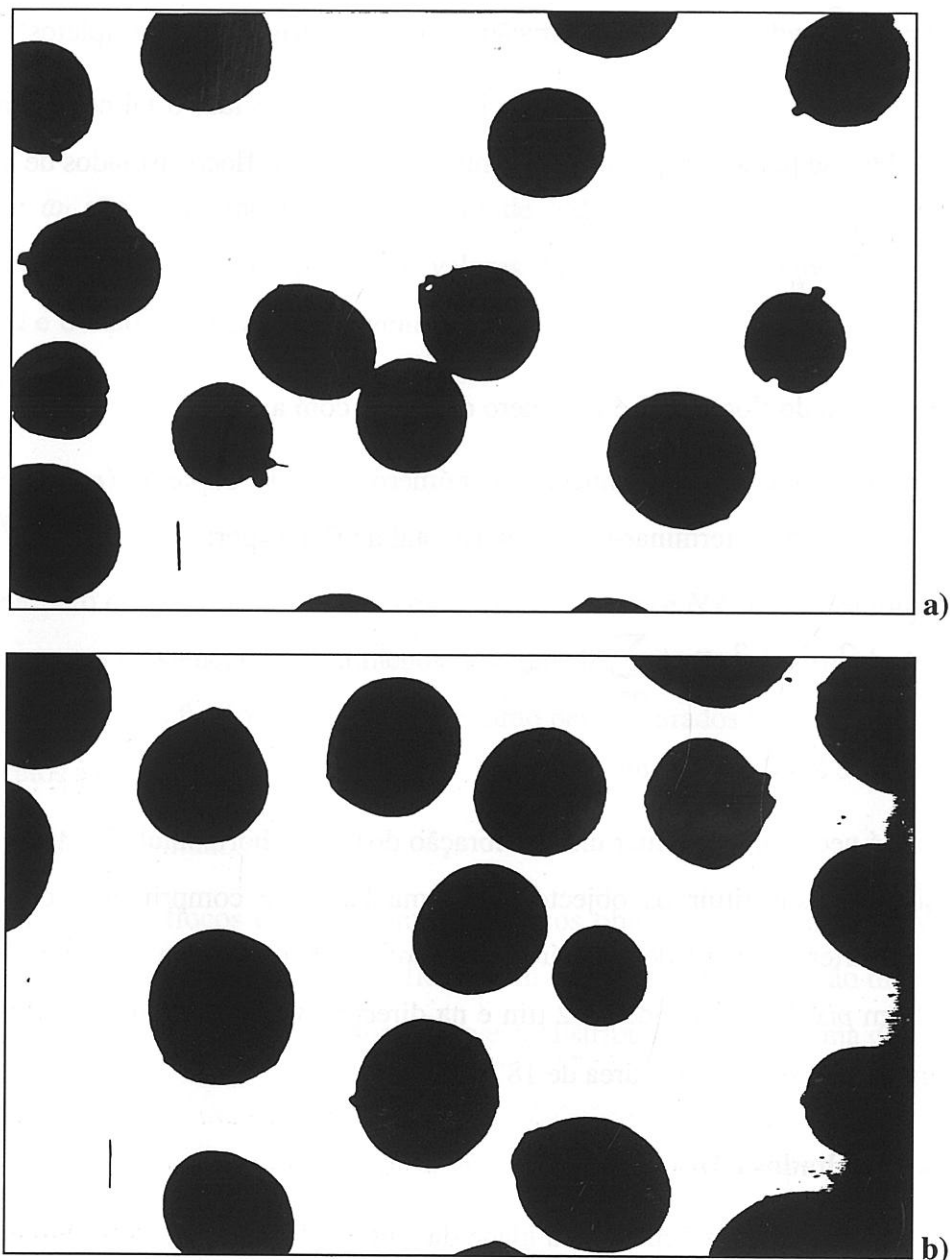


Figura 4.1: Imagens de flocos de *Saccharomyces cerevisiae* captadas automaticamente a) 48 horas (amostra 1) e b) 72 horas (amostra 2) após a inoculação. Note-se o aumento de tamanho. A barra nas figuras corresponde a 1 mm.

tamanho, devido a um possível esgotamento dos nutrientes no interior dos flocos maiores, produzindo metabolitos indesejáveis que podem afectar o rendimento do processo.

Na Figura 4.2 apresenta-se o histograma dos valores da escala de cinzentos correspondentes à Figura 4.1a. Os flocos, escuros, estão representados pelo primeiro conjunto de picos e o fundo (mais claro) está representado pelo segundo pico. É necessário escolher o limiar mais adequado para distinguir entre os objectos e o fundo, o que pode fazer-se automaticamente separando o histograma em classes (eqs. 4.1 a 4.4), possibilitando assim o processamento rápido de um grande número de imagens. O valor do limiar calculado desta forma está assinalado pela seta.

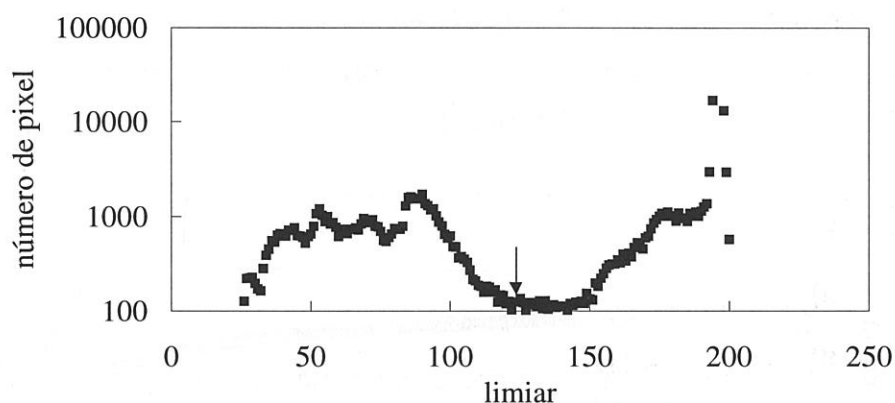
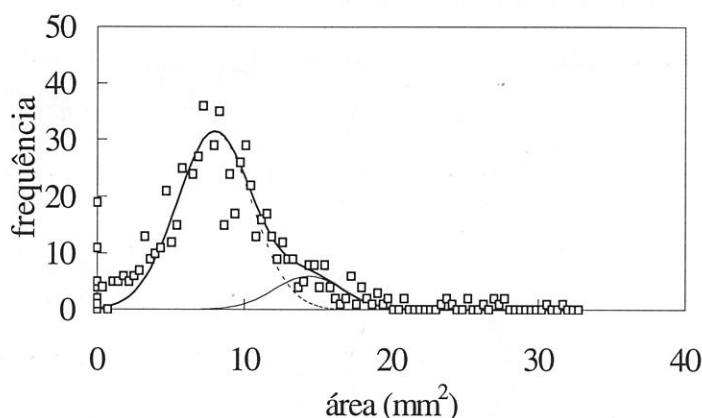


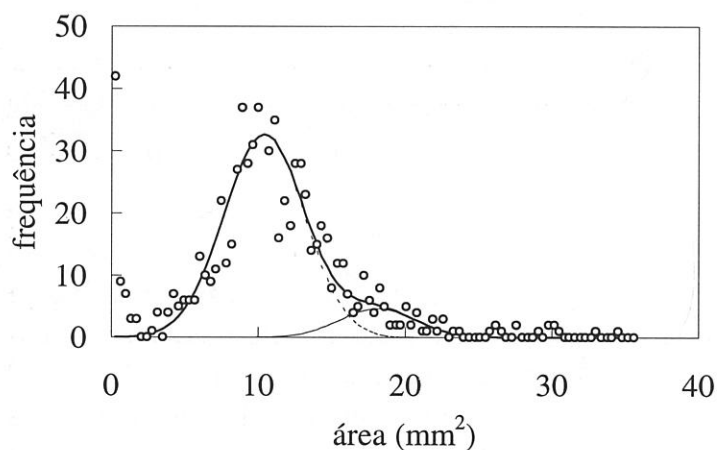
Figura 4.2: Histograma de valores da escala de cinzentos de uma imagem de flocos de *Saccharomyces cerevisiae* com 48 horas. Para separar os flocos (valores baixos, primeiro conjunto de picos) do fundo (valores elevados, segundo pico) é necessário escolher um valor de limiar adequado. A seta indica o valor encontrado pelo método automático.

O contraste das imagens a analisar deve ser suficiente para permitir uma boa separação entre os objectos e o fundo, o que se traduz numa igualmente boa separação entre os picos do histograma. Isto é importante porque a área projectada de cada floco é calculada em função do número de *pixel* que cada floco ocupa e esse número é, por sua vez, função do limiar escolhido (ver Figura 4.2). Esta dependência será grande se não houver uma separação conveniente daqueles picos (situação indesejável), mas será diminuta se os picos estiverem bem separados. Assim, justifica-se plenamente a utilização de técnicas tais como a subtracção do fundo e a multiplicação de imagens, empregues no método aqui proposto, resultando em picos bem separados (Figura 4.2).

Nas Figura 4.3 a) e b) representam-se histogramas de área obtidos aplicando o método automático de selecção de limiar às amostras 1 e 2, respectivamente (para uma melhor visualização optou-se por um tamanho de classes de $0,36 \text{ mm}^2$). Para a amostra 1 o valor mais adequado para o limiar foi de 118 enquanto que para a amostra 2 esse valor foi de 108.



a)



b)

Figura 4.3: Histograma de áreas (tamanho das classes: $0,36 \text{ mm}^2$) obtido para flocos de *Saccharomyces cerevisiae* com a) 48 horas (amostra 1) e b) 72 horas (amostra 2) utilizando um limiar calculado automaticamente. A ausência de objectos para a área de $1,6 \text{ mm}^2$ indica a separação entre os *pixel* correspondentes ao ruído e aos flocos. (\square , \circ : pontos experimentais; --- : ajuste aos flocos isolados; — : ajuste aos dupletos; — : soma dos ajustes).

Na vizinhança de $1,6 \text{ mm}^2$ há um número mínimo de objectos; para áreas inferiores a essa os objectos são apenas partes de flocos quebrados ou mesmo ruído que não foi possível eliminar, pelo que esta parte do histograma não foi utilizada para o ajuste. É possível detectar dois picos, o primeiro dos quais corresponde aos flocos isolados (a maioria, dado que se procurou separá-los antes de efectuar a captação das imagens) e o segundo aos

dupletos; a “cauda” do histograma corresponde aos multipletos, presentes em número muito reduzido.

Estes dois picos são ajustados pela soma de duas funções de Gauss, o que permite obter simultaneamente os valores das respectivas áreas médias e desvios padrão (eq. 4.5). Os ajustes foram repetidos para todos os valores possíveis do limiar.

A consistência dos resultados obtidos pode verificar-se representando a área média dos flocos em função do limiar com que é obtida. Para serem consistentes, os valores da área têm que ser independentes do valor do limiar seleccionado, caso contrário um pequeno desvio neste valor teria um impacto forte (e indesejado) no valor da área. A Figura 4.4 revela que há apenas um pequeno desvio na área média dos flocos isolados quando esta é representada em função do limiar (exceptuando os valores extremos deste parâmetro, onde esse desvio já é bastante considerável).

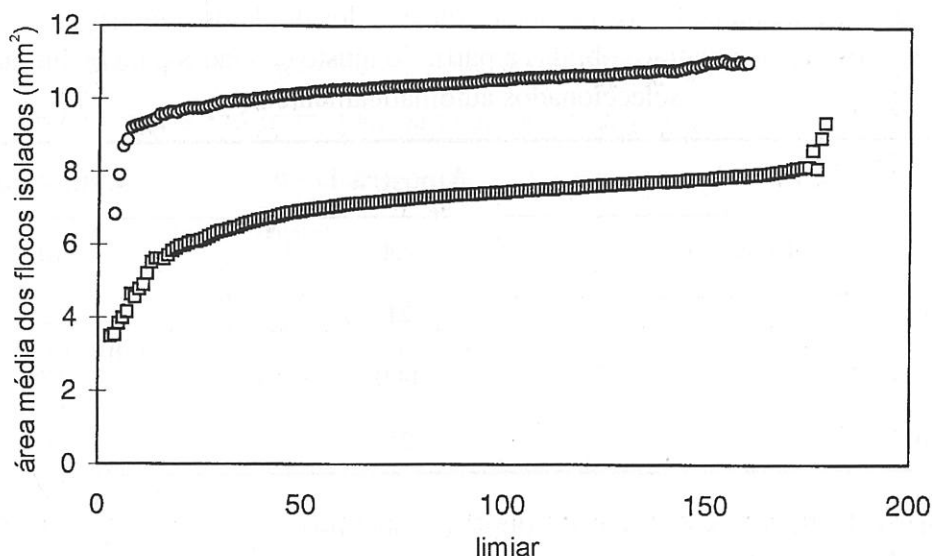


Figura 4.4: Área média dos flocos em função do limiar para flocos de *Saccharomyces cerevisiae* com 48 horas (amostra 1, \square) e 72 horas (amostra 2, \circ).

O pequeno mas constante aumento no valor da área é plenamente justificável se se atender ao facto de que os bordos dos flocos constituem, em termos de cor, uma transição suave de cinzento-escuro para cinzento mais claro, pelo que à medida que se aumenta o valor do limiar vão sendo incluídos mais *pixel* na “área do floco” à custa de outros tantos

que são retirados à “área do fundo”. A área dos flocos da amostra 1 varia entre 7 e 9 mm² e a área dos flocos da amostra 2 varia entre 10 e 12 mm², apresentando variações de $\pm 12\%$ e $\pm 9\%$ em relação aos valores médios de 8 e 11 mm², respectivamente. Na Figura 4.4 pode ainda verificar-se que a área média dos flocos da amostra 2 estabiliza para valores do limiar menores do que a amostra 1. Isto deve-se a uma menor intensidade da iluminação no primeiro caso, tendo deslocado todo o gráfico para valores mais baixos (mais “escuras”) da escala de cinzentos sem lhe alterar a forma e sem alterar a amplitude do intervalo de valores de cinzento onde a área sofre apenas uma ligeira alteração (cerca de 20 valores).

Utilizando o método automático de selecção do limiar, obtêm-se valores da área média de flocos isolados da ordem de 7,4 e 10,5 mm² (ver Tabela 4.1) para as amostras 1 e 2, respectivamente, que estão em concordância com os valores acima referidos para o método não automático.

Tabela 4.1: Dimensões dos flocos com 48 horas (amostra 1) e 72 horas (amostra 2) em termos da área média de flocos isolados e da área dos dupletos (juntamente com os respectivos desvios padrão) obtidas a partir do ajuste de Gauss para os limiares seleccionados automaticamente.

	Amostra 1	Amostra 2
Área média dos flocos isolados (mm ²)	7,4	10,5
Desvio padrão (%)	21	24
Área média dos dupletos (mm ²)	14,0	17,0
Desvio padrão (%)	21	14

O número de flocos isolados e de dupletos obtêm-se após integração da função de distribuição de Gauss (eq. 4.6). A determinação do número de conjuntos de mais de dois flocos foi impossível devido à sua quase total ausência nas amostras. Quanto ao número de flocos isolados, e para o método não automático de selecção do limiar, decresce com o limiar de 850 para 750 e de 750 para 650 nas amostras 1 e 2, respectivamente, valores aos quais correspondem médias de $800 \pm 6\%$ e $700 \pm 7\%$. No caso do método automático de selecção do limiar os valores obtidos são equivalentes: 784 para a amostra 1 e 674 para a amostra 2. O decréscimo do número de flocos contados com o limiar é um sintoma das dificuldades que se colocam ao tentar identificar e distinguir flocos isolados mas muito

próximos entre si de conjuntos de flocos; de facto, haverá sempre uma incerteza associada ao número de flocos contados, que no caso presente se situa entre 6 a 7 %, como foi referido.

Assim que se obtém a área média dos flocos isolados é possível determinar o número total de flocos utilizando a eq. 4.7. Este número deveria ser constante dado que durante a análise os flocos não se multiplicam ou desaparecem. No entanto, e para o método não automático de selecção do limiar, o número total de flocos decresce (de 900 para 800 e de 850 para 750 nas amostras 1 e 2, respectivamente, resultando em valores médios de 850 ± 6 % para a amostra 1 e de 800 ± 6 % para a amostra 2) devido ao facto de a área média de um duplete não ser exactamente o dobro da área média de um floco isolado, como se assume na eq. 4.7 (ver também a Tabela 4.1). De facto, quando dois flocos se juntam as projecções das suas áreas sobrepõem-se, produzindo aquele efeito. Os valores apresentados são comparáveis aos obtidos com o método automático de escolha do limiar: 834 (amostra 1) e 790 (amostra 2).

O número total de flocos também se pode determinar avaliando as áreas sob as curvas de Gauss. Os resultados mostram que, também neste caso, o número total de flocos ainda apresenta uma tendência decrescente devido à existência de multipletos. Assumindo que esses multipletos são todos tripletos, a eq. 4.8 permite determinar o seu número. Assim, calculou-se o número de dupletos e tripletos com os dados obtidos pelo método automático de selecção do limiar: 25 dupletos e 0 tripletos para a amostra 1 e 52 dupletos e 4 tripletos para a amostra 2.

4.1.4 Conclusões

Desenvolveu-se um método simples, fácil de utilizar e preciso para determinar o número e a distribuição de tamanhos de flocos de levedura por análise de imagem, com uma reduzida intervenção por parte do operador.

Ajustando funções de Gauss à distribuição das áreas dos flocos é possível determinar a área média dos flocos isolados e o respectivo desvio padrão. Além disso, utilizando um método automático para a selecção do limiar mais adequado, consegue-se caracterizar e fazer a distinção entre diferentes populações de flocos, enumerando os flocos isolados, dupletos, tripletos, etc.

O número total de flocos numa amostra pode ser avaliado não apenas quando se sabem os números de flocos isolados, dupletos, tripletos, etc., mas também quando se conhece a área média de um floco isolado. Estes dois métodos são comparáveis em termos de resultados e permitem uma descrição simples mas fiável da população de flocos.

4.2 Medição de parâmetros cinéticos e de coeficientes de difusão em flocos de levedura

4.2.1 Introdução

Os flocos de levedura são agregados mecanicamente muito sensíveis que são, por isso, difíceis de manusear. No entanto, os parâmetros cinéticos e os coeficientes de difusão dos substratos e produtos nos flocos são valores muito importantes para o estudo e optimização dos processos em que estes são utilizados (Hamdi 1995 e Pereboom *et al.* 1990). Apesar de já existir uma vasta lista de literatura publicada nesta área com outros sistemas de alta densidade celular (dos quais o mais utilizado é a imobilização em partículas de alginato de cálcio) (Handriková *et al.* 1996, Kurosawa *et al.* 1989, Øyaas *et al.* 1995, Riley *et al.* 1996 e Tanaka *et al.* 1984), ainda há muito pouco trabalho realizado com flocos de levedura (Ananta *et al.* 1995, Sousa e Teixeira 1991 e Teixeira e Mota 1990).

O método que aqui se apresenta constitui uma nova técnica para determinar parâmetros cinéticos e de transferência de massa em flocos de levedura. O sistema foi concebido para minimizar as tensões responsáveis pela ruptura (e conseqüente destruição) dos flocos mantendo, no entanto, boas características de mistura. Assim sendo, o método pode ser utilizado também com outras técnicas de imobilização, em particular as que empregam partículas sólidas de pequeno tamanho. Como teste ao método, determinou-se a taxa de consumo de oxigénio para uma cultura de flocos de levedura em regime respiratório fermentativo, comparando o valor obtido com os publicados na literatura para a mesma estirpe.

4.2.2 Método

4.2.2.1 Flocos de levedura

Os flocos de levedura utilizados pertencem à estirpe *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y265 cultivada em contínuo no bioreactor *airlift*. Após serem retirados do bioreactor, devem ser lavados cuidadosamente em água corrente e suspensos numa solução de acetato de etilo (12 % v/v) durante 12 horas com agitação idêntica à que será utilizada durante a execução da experiência. Após aquele período lavam-se novamente os flocos e ressuspendem-se em meio de fermentação. Este procedimento destina-se a inactivar as células de levedura, impedindo-as de consumir glucose ou oxigénio. A eficácia do tratamento verifica-se adicionando meio aos flocos e monitorizando a actividade metabólica da cultura: não foi registada produção de etanol nem de qualquer gás e não houve crescimento celular durante um período de três horas, pelo menos. Deve referir-se aqui que se testaram outros inactivadores como a azida sódica mas, após o tratamento e apesar de 99 % das células se apresentarem coradas de azul quando tratadas com azul de metileno, ainda se registou produção de etanol e de gás, pelo que foi necessário optar pela solução de acetato de etilo.

4.2.2.2 Sistema de medição

O equipamento utilizado representa-se na Figura 4.5.

Consiste essencialmente numa câmara de medição com isolamento térmico (poliuretano expandido) (1) com um eléctrodo de oxigénio (3) e um reservatório termostaticado (2). O conjunto foi construído em Perspex[®]. A mistura faz-se por meio de barras magnéticas (5a,b) e o fornecimento de gás ao reservatório realiza-se por meio de um dispersor (7) com cinco orifícios de 1 mm de diâmetro. Quer a câmara de medição quer o reservatório são hermeticamente fechados por meio de uma rolha de borracha (6) e de um anel de borracha (14), respectivamente. Quando completamente preparada, a câmara de medição tem um volume de 269 mL e o reservatório tem um volume aproximado de 2 L.

4.2.2.3 Procedimento experimental para determinações com glucose

Enche-se o reservatório (2) com meio sem fonte de carbono e equilibra-se a temperatura a 30 °C. Entretanto colocam-se cuidadosamente os flocos inactivados na câmara de medição (neste caso sem o eléctrodo de oxigénio e sem a rolha de borracha), enchendo-a em seguida

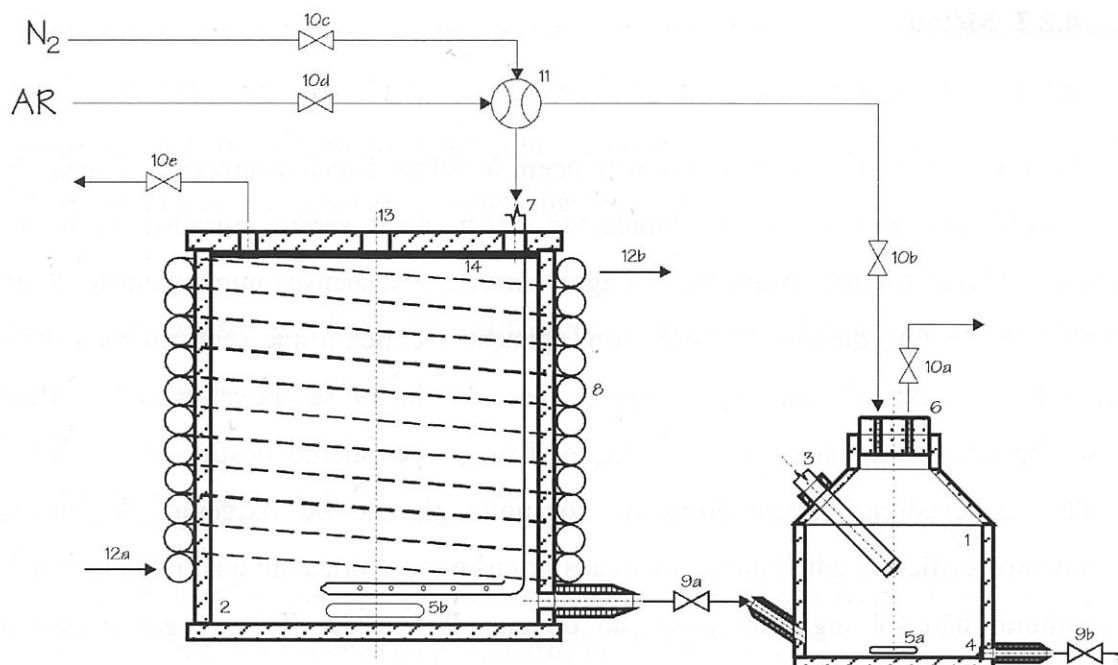


Figura 4.5: Sistema de medição: (1) câmara de medição isolada (isolamento não representado); (2) reservatório; (3) eléctrodo de oxigénio; (4) rede de aço inox; (5a,b) barra magnética; (6) rolha de borracha; (7) dispersor de gás; (8) camisa de controlo de temperatura; (9a,b), (10a-e) e (11) válvulas; (12a,b) líquido de controlo de temperatura; (13) termómetro; (14) anel de borracha.

com um dado volume do meio contido no reservatório (por forma a que os flocos representem $\approx 5\%$ v/v da suspensão final) sob agitação suave. Deve substituir-se periodicamente este meio até que a concentração de glucose dissolvida não seja detectada, por forma a garantir que os flocos não contenham glucose antes do início da experiência. Então, adiciona-se à câmara de medição um volume conhecido de uma solução concentrada de glucose e dá-se início à contagem do tempo, retirando-se amostras de $100\ \mu\text{L}$ em intervalos de $60\ \text{s}$ durante $30\ \text{minutos}$, que são analisadas por HPLC (ver capítulo 3).

Estes ensaios foram precedidos de testes onde se verificou não existir uma adsorção significativa da glucose em células pulverulentas inactivadas de *Saccharomyces cerevisiae*, tendo-se extrapolado a conclusão para o caso da estirpe floculante.

4.2.2.4 Procedimento experimental para determinações com oxigénio

Enche-se o reservatório (2) com meio (incluindo $50\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose como fonte de carbono) e injecta-se N_2 puro para deslocar o oxigénio dissolvido. Entretanto, coloca-se a suspensão de flocos na câmara de medição ($\approx 5\%$ v/v), drenando-se o líquido pela válvula

9b com o auxílio de uma sobre-pressão de N_2 . A rede (4) evita o arrastamento dos flocos, retendo-os no interior da câmara. Para garantir que se consegue retirar a maior quantidade possível de oxigénio dos flocos, transfere-se meio desoxigenado do reservatório para a câmara, através da válvula 9a. A câmara deve ser repetidamente cheia e esvaziada até se conseguir obter um valor baixo (e estável) de oxigénio dissolvido na câmara ($< 2\%$ da concentração de saturação).

O meio remanescente no reservatório satura-se, então, com ar. Quando se termina esta operação, o meio desoxigenado que se encontra na câmara de medição é substituído por este outro, saturado, e inicia-se a aquisição de dados. Durante o desenrolar da experiência deve manter-se uma velocidade de agitação uniforme para conseguir assegurar a manutenção do tamanho dos flocos, que é verificado no final (Vicente *et al.* 1996).

4.2.2.5 Aquisição e tratamento de dados

O sinal enviado pelo eléctrodo de oxigénio é registado de 2 em 2 segundos por meio de uma placa de aquisição de dados (Labtech Notebook Ltd, Build Time, EUA) com o programa informático correspondente, instalados num computador pessoal. Dado o seu carácter oscilatório, os dados assim registados são amortecidos aplicando Transformadas de Fourier (*Fast Fourier Transformation*).

Assumindo que o consumo de oxigénio pelas células segue uma cinética de Monod, os parâmetros correspondentes determinam-se ajustando os dados experimentais por meio de uma regressão não linear (Dluhý e Báleš 1996).

4.2.3 Resultados e Discussão

O sistema que aqui se apresenta foi especialmente concebido para determinar parâmetros cinéticos e de transferência de massa em agregados celulares ou outros sistemas mecanicamente frágeis. Para testar o equipamento e o procedimento acima descritos efectuou-se uma experiência utilizando glucose como fonte de carbono, durante a qual não se registaram alterações nos flocos nem a nível físico nem a nível metabólico.

Os parâmetros de uma cinética de Monod:

$$r_O = -p_1 \cdot C_O \cdot C_{Xv} / (p_2 + C_O) \quad (4.9)$$

foram calculados aplicando um método de regressão não linear tendo como objectivo a minimização da soma de quadrados residual (SQR). Na eq. (4.9) r_O é a taxa de consumo de oxigénio, C_O é a concentração de oxigénio dissolvido, C_{Xv} é a concentração de biomassa activa, p_1 corresponde a $q_{O,max}$ e p_2 corresponde a K_m . Apesar de esta equação representar um modelo cinético do tipo Monod, os valores calculados p_1 e p_2 são apenas aparentes, não se relacionando com os parâmetros cinéticos normalmente utilizados. Assim, intencionalmente não foram aplicadas aqui as designações $q_{O,max}$ e K_m , normalmente utilizadas para culturas de células em suspensão, pois no caso presente fez-se uso de flocos de levedura que muito provavelmente alteram o comportamento global do sistema e, com isso, o significado daqueles parâmetros.

Na Figura 4.6 pode observar-se o registo dos valores obtidos no decurso da experiência; também está representada a curva resultante do ajuste dos dados ao modelo do tipo Monod acima referido. Os valores dos parâmetros são: $p_1 = 50,65 \pm 11,65 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $p_2 = 20,40 \pm 5,84 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{L}^{-1}$ ($SQR = 0,123 \text{ mg}^2_{O_2} \cdot \text{L}^{-2}$). O valor de r_O é aproximadamente igual a $32 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Na Figura 4.6 pode ver-se ainda claramente que o ajuste é bastante concordante com os pontos experimentais, o que se pode confirmar pelo valor relativamente baixo de SQR .

A taxa de consumo de oxigénio depende de vários factores tais como a estirpe utilizada, as condições de cultura e o seu estado fisiológico, entre outros, o que dificulta a tarefa de comparar dados de diferentes origens. Devido essencialmente à sua fragilidade mecânica, que acarreta grandes dificuldades de manuseamento, não abundam os dados relativos a flocos de levedura. Em geral, para células imobilizadas em gel e para células em suspensão, é possível encontrar na literatura valores de r_O que variam entre 112 e $720 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Kurosawa 1989, Sato e Toda 1983, Sonnleitner e Hahnemann 1994 e Sousa e Teixeira 1996). Em comparação, os valores determinados para agregados de células de plantas são significativamente menores: $2,1\text{-}3,1 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Ananta *et al.* 1995).

O valor elevado de p_2 (correspondente a um K_m aparente para os flocos) levantou suspeitas acerca da existência de fortes limitações à transferência de oxigénio no interior dos flocos. Na Figura 4.7 representa-se a evolução da taxa de consumo de oxigénio com o tempo. Verifica-se uma diminuição exponencial ao longo do curso da experiência, o que indica que o oxigénio que chega às células no interior dos flocos é insuficiente; assim sendo,

mesmo desprezando a resistência externa à transferência de massa devido à agitação, a resistência interna tem um papel importante no processo tornando-se o fenómeno limitante.

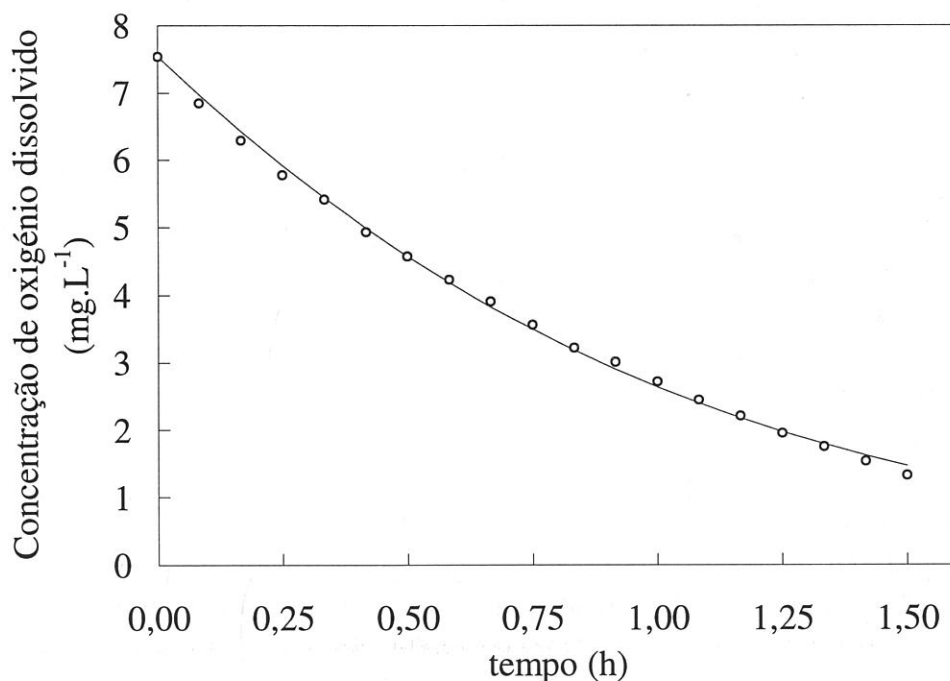


Figura 4.6: Dados experimentais (o), tratados com recurso a Transformadas de Fourier (para maior clareza não se representam todos os pontos), e o correspondente ajuste (—) a uma cinética do tipo Monod.

Para determinar os parâmetros reais de um modelo cinético de Monod ($q_{O,max}$ e K_m) sem a influência das limitações difusionais seria necessário representar o factor de eficiência (η) em função do módulo de Thiele (ϕ), que compara a importância relativa de reacção e difusão.

Apesar de só terem sido obtidos parâmetros cinéticos, este sistema permite igualmente determinar parâmetros de transferência de massa, o que é feito no capítulo 6.

4.2.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo para a taxa de consumo de oxigênio pelos flocos ($32 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) utilizando o novo sistema desenvolvido são concordantes com os publicados por Sousa e Teixeira (1996), para a mesma estirpe desenvolvida em condições semelhantes ($36 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Esta comparação vem demonstrar que tanto o sistema como o método que aqui foram propostos são apropriados para atingir os objectivos para os quais foram

designados. Além disso, algumas experiências preliminares efectuadas com bolas de alginato (cujos resultados não foram aqui apresentados) corroboram a afirmação anterior, confirmando a possibilidade de aplicar o sistema a outras técnicas de imobilização.

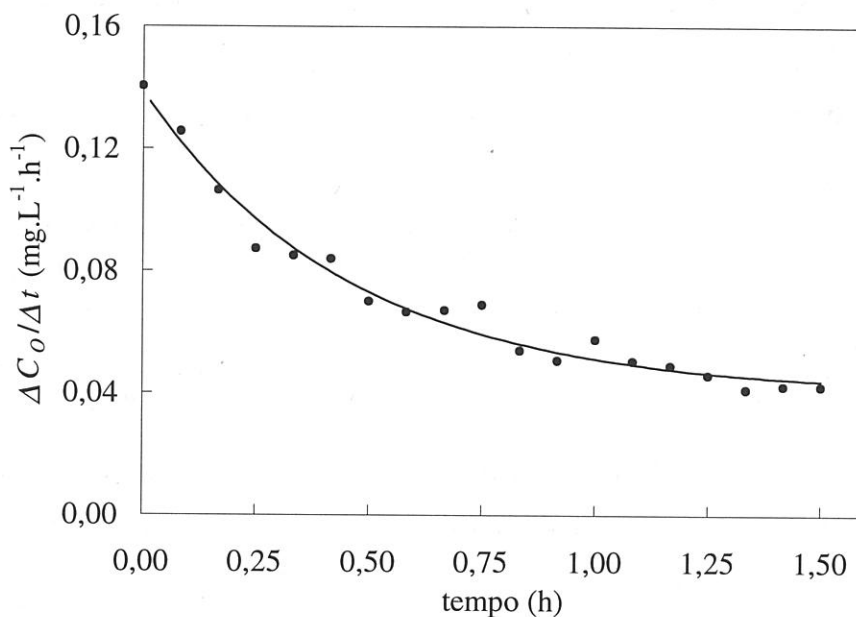


Figura 4.7: Método das diferenças finitas aplicado aos dados experimentais (●); ΔC_0 e Δt são as diferenças finitas entre dois pontos consecutivos de concentração de oxigênio e de tempo, respectivamente. Ajustou-se uma curva exponencial aos pontos para evidenciar a sua tendência.

4.3 Bibliografia

- Al-Rubeai, M., Singh, R. P., Emery, A. N. e Zhang, Z., 1995. Cell Cycle and Cell Size Dependence of Susceptibility to Hydrodynamic Forces. *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 88-92.
- Ananta, I., Subroto, M. A. e Doran, P. M., 1995. Oxygen Transfer and Culture Characteristics of Self-Immobilized *Solanum aviculare* Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 541-549.
- Dluhý, M. e Bálaš, V., 1996. Phenol Degradation by Bacteria. Part Two: Kinetic and Growth Study. *Polish J. Environmental Studies*, 5 (4), 9-15.
- Donnelly, D. P., Wilkins, M. F. e Boddy, L., 1995. An Integrated Image Analysis Approach for Determining Biomass, Radial Extent and Box-Count Fractal Dimension of Microscopical Mycelial Systems. *Binary*, 7, 19-28.
- Hamdi, M., 1995. Biofilm Thickness Effect of the Diffusion Limitation in the Bioprocess Reaction: Biofloc Critical Diameter Significance. *Bioprocess Eng.*, 12, 193-197.
- Handriková, G., Štefuca, V., Polakovic, M. e Bálaš, V., 1996. Determination of Effective Diffusion Coefficient of Substrate in Gel Particle with Immobilized Biocatalyst. *Enzyme Microbial Technol.*, 18, 581-584.

- Kurosawa, H., Matsumura, M. e Tanaka, H., 1989. Oxygen Diffusivity in Gel Beads Containing Viable Cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 926-932.
- López-Amorós, R., Comas, J., Carulla, C. e Vives-Rego, J., 1994. Variations in Flow Cytometric Forward Scatter Signals and Cell Size in Batch Cultures of *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 117, 225-230.
- Meinders, J. M., van der Mei, H. C. e Busscher, H. J., 1992. *In situ* Enumeration of Bacterial Adhesion in a Parallel Plate Flow Chamber - Elimination of in Focus Flowing Bacteria From the Analysis. *J. Microbiological Methods*, 16, 119-124.
- Otsu, N., 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, SMC-9, 62-66.
- Øyaas, J., Storrø, I., Lysberg, M., Svendsen, H. e Levine, D. W., 1995. The Effective Diffusion Coefficient and the Distribution Constant for Small Molecules in Calcium-Alginate Gel Beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 492-500.
- Pereboom, J. H. F., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S. S. P., Huisman, J. W. e de Beer, D., 1990. Physical Transport Phenomena in Aggregated Microbial Systems. In: H. Breteler, R. F. Beuker and K. Ch. A. M. Luyben, eds. *Proceedings 3rd. Netherlands Biotechnology Congress 1990, Part II, Amsterdam 4th April 1990*.
- Peterson, M. S. e Patkar, A. Y., 1992. Flow Cytometric Analysis of Total Protein Content and Size Distributions of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Tech.*, 6, 203-206.
- Pons, M.-N., Vivier, H., Rémy, J. F. e Dodds, J. A., 1993. Morphological Characterization of Yeast by Image Analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 1352-1359.
- Pons, M.-N., Wagner, A., Vivier, H. e Marc, A., 1992. Application of Quantitative Image Analysis to a Mammalian Cell Line Grown on Microcarriers. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 187-193.
- Riley, M. R., Muzzio, F. J., Buettner, H. M. e Reyes, S. C., 1996. A Simple Correlation for Predicting Effective Diffusivities in Immobilized Cell Systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 223-227.
- Sato, K. e Toda, K., 1983. Oxygen Uptake Rate of Immobilized Growing *Candida lipolytica*. *J. Ferm. Technol.*, 61, 239-245.
- Sonnleitner, B. e Hahnemann, U., 1994. Dynamics of the Respiratory Bottleneck of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 38, 63-79.
- Sousa, M. L. e Teixeira, J. A., 1991. Reduction of Diffusional Limitations in Yeast Floccs. *Biotechnol. Lett.*, 13, 883-888.
- Sousa, M. L. e Teixeira, J. A., 1996. Characterization of Oxygen Uptake and Mass Transfer in Flocculent Yeast Cell Cultures with or without a Flocculation Additive. *Biotechnol. Lett.*, 18, 229-234.
- Sousa, M. L., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1994. Comparative Analysis of Ethanolic Fermentation in Two Continuous Flocculation Bioreactors and Effect of Flocculation Additive. *Bioprocess Eng.*, 11, 83-90.
- Suhr, H., Wehnert, G., Schneider, K., Bittner, C., Scholz, T., Geissler, P., Jähne, B. e Scheper, T., 1995. *In situ* Microscopy for On-line Characterization of Cell Populations in Bioreactors, Including Cell Concentration Measurements by Depth from Focus. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 106-116.
- Tanaka, H., Matsumura, M. e Veliky, I. A., 1984. Diffusion Characteristics in Ca-Alginate Gel Beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 53-58.
- Teixeira, J. A. e Mota, M., 1990. Experimental Assessment of Internal Diffusion Limitations in Yeast Floccs. *Chem. Eng. J.*, 43, B13-B17.
- Vaija, J., Lagaude, A. e Ghommidh, C., 1995. Evaluation of Image Analysis and Laser Granulometry for Microbial Cell Sizing. *Ant. van Leeuwenhoek*, 67, 139-149.

- Vanhoutte, B., Pons, M.-N., Thomas, C. R., Louvel, L. e Vivier, H., 1995. Characterization of *Penicillium chrysogenum* Physiology in Submerged Cultures by Color and Monochrome Image Analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 1-11.
- Vicente, A., Meinders, J. M. e Teixeira, J. A., 1996. Sizing and Counting of *Saccharomyces cerevisiae* Flocc Populations by Image Analysis, Using an Automatically Calculated Threshold. *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 673-678.
- Vicente, A. A. e Teixeira, J. A., 1995. Hydrodynamic Performance of a Phree-Phase Airlift Bioreactor with an Enlarged Degassing Zone. *Bioprocess Eng.*, 14, 17-22.
- Willke, B. e Vorlop, K.-D., 1994. Long Term Observation of Gel-Entrapped Microbial Cells in a Microscope Reactor. *Biotechnol. Tech.*, 8, 619-622.
- Yamashita, Y., Kuwashima, M., Nonaka, T. e Suzuki, M., 1993. On-line Measurement of Cell Size Distribution and Concentration of Yeast by Image Processing. *J. Chem. Eng. Japan*, 26, 615-619.
- Zalewski, K., Götz, P. e Buchholtz, R., 1994. On-line Estimation of Yeast Growth Rate Using Morphological Data from Image Analysis. In: E. Galindo e O. T. Ramírez eds. *Advances in Bioprocess Engineering*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994, 191-195.

5. Estudos hidrodinâmicos: otimização do desenho do bioreactor *airlift*

Sumário

Existem poucos dados relativamente ao efeito da fase sólida no comportamento hidrodinâmico dos bioreactores do tipo *airlift*.

Este capítulo trata da influência da carga de sólidos, da sua massa específica e das dimensões do tubo interno nos tempos de mistura e circulação da fase líquida e no caudal de arejamento crítico num bioreactor *airlift* com zona de decantação. Com os resultados obtidos, foi possível melhorar as características de mistura e circulação no bioreactor, tendo em vista a sua posterior utilização com flocos de levedura.

5.1 Introdução

Nas últimas duas décadas a utilização do *airlift* como bioreactor foi tendo cada vez mais importância: começando com a produção de proteína unicelular, agora em declínio, foi posteriormente aplicado aos mais variados processos, tais como o tratamento biológico de efluentes, produção de antibióticos e de células animais e vegetais, entre outros (Chen *et al.* 1987, Choi 1990, Sousa *et al.* 1994 e Tijhuis *et al.* 1994).

Parte do seu sucesso fica a dever-se a características muito peculiares, nomeadamente as tensões de corte, constantes e de baixo valor, que gera no meio (sendo, portanto, ideal para culturas de células e agregados mecanicamente menos resistentes) (Kennard e Janekeh 1991, Siegel e Merchuk 1991 e Sukan e Vardar-Sukan 1987), o desenho simples (que faz com que seja mais fácil de construir, mais barato e menos propenso a contaminações), a facilidade de operação e os baixos custos de manutenção que lhe estão associados (Fraser e Hill 1993, Prasad e Ramanujam 1994 e Sousa *et al.* 1994).

Até ao momento, foram efectuados apenas alguns estudos hidrodinâmicos em reactores do tipo *airlift* com uma zona de decantação (Merchuk *et al.* 1994, Moresi 1981, Siegel e Merchuk 1991, Siegel *et al.* 1986 e Thomas e James), embora em nenhum deles se tenha considerado a presença de uma terceira fase. Por outro lado, só foi possível encontrar um artigo onde o caudal de gás crítico foi determinado (Livingston e Zhang 1993), juntamente com a velocidade de circulação do líquido, para várias cargas de sólidos (esferas de vidro com diâmetros médios entre 0,0975 mm e 1,130 mm e massa específica de 2950 kg·m⁻³).

A influência da massa específica da fase sólida (907, 1250, 1420 e 1470 kg·m⁻³) foi estudada, por exemplo, por Siegel *et al.* (1988), mas num *airlift* rectangular.

Weiland (1984) sugeriu que a razão de diâmetros entre o tubo ascendente e o tubo descendente deveria situar-se entre 0,8 e 0,9 para se conseguir uma maior capacidade de transferência de oxigénio e uma mistura mais eficiente. No entanto, o autor refere que, no caso de reactores trifásicos, aquela razão deveria ser reduzida para 0,6 com o objectivo de evitar a sedimentação das partículas sólidas.

O desempenho hidrodinâmico do bioreactor em termos dos tempos de mistura e de circulação da fase líquida pode ser avaliado recorrendo a uma técnica de pulso de pH largamente utilizada e, em geral, preferida a técnicas condutimétricas ou de medição da densidade óptica (Assa e Bar 1991, Favre *et al.* 1994, Kawase *et al.* 1994, Lu e Hwang 1994 e Russel *et al.* 1994).

Os processos biotecnológicos são complexos em termos dos fenómenos hidrodinâmicos e de transferência de calor e massa. Esta complexidade fica a dever-se, em grande parte, à presença habitual de três ou mesmo quatro fases em simultâneo dentro do bioreactor. Em sistemas de células imobilizadas, quer natural quer artificialmente, a combinação de fases em presença é normalmente do tipo gás-líquido-sólido, podendo a carga de sólidos chegar a ocupar 30 ou 40 % do volume total do reactor.

Em muitos sistemas de células imobilizadas a massa específica das partículas sólidas tem valores próximos de $1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, que podem ser ligeiramente alterados com o crescimento celular. O trabalho que a seguir se apresenta destina-se a estudar a influência da carga de sólidos (5, 10, 15 e 20 % em volume) e de pequenas diferenças na massa específica (valores próximos de $1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) nos tempos de mistura e de circulação do líquido e no caudal de arejamento crítico (o valor mínimo de caudal de arejamento que é necessário para manter a circulação da fase sólida) no bioreactor *airlift* descrito no capítulo 3. Aqueles parâmetros são determinados para vários valores de diâmetro e altura do tubo interno, utilizando partículas de alginato de cálcio como fase sólida, permitindo uma optimização da circulação e da mistura no bioreactor tendo em vista a sua posterior utilização com flocos de levedura.

5.2 Descrição experimental

5.2.1 O bioreactor

O bioreactor utilizado está descrito no capítulo 3, tendo as dimensões do tubo interno sido alteradas de acordo com a Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Diâmetros e alturas dos vários tubos internos utilizados.

Tubo interno	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diâmetro do tubo interno, D_i (cm)	2,2	3,2	4,4	2,2	3,2	4,4	2,2	3,2	4,4
Altura do tubo interno, A_i (cm)	42	42	42	48	48	48	56	56	56

5.2.2 Partículas de alginato de cálcio

Utilizam-se partículas esféricas de alginato de cálcio sem e com células inactivas no seu interior, destinando-se a introdução das células a aumentar a sua massa específica. O método de produção das partículas de alginato de cálcio está descrito no capítulo 3, tendo-se obtido partículas com as características descritas na Tabela 5.2, onde também se apresentam os valores obtidos para as mesmas medições efectuadas no final do conjunto de ensaios realizados. As diferenças encontradas não são suficientemente importantes para afectar os resultados obtidos. Para maior comodidade, designam-se as partículas sem células (com menor massa específica) por partículas de baixa densidade (ou BD) e as partículas com células (com maior massa específica) por partículas de alta densidade (ou AD).

Tabela 5.2: Características das partículas de alginato de cálcio.

Partículas	BD	AD
Diâmetro médio inicial (mm)	2,092 ± 0,003	2,086 ± 0,003
Diâmetro médio final (mm)	2,174 ± 0,003	2,224 ± 0,003
Massa específica média inicial ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	1016 ± 1	1048 ± 1
Massa específica média final ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	1010 ± 1	1047 ± 1

5.2.3 Determinações dos tempos de mistura e de circulação e do caudal de arejamento crítico

Os tempos de mistura e circulação determinam-se de acordo com o descrito no capítulo 3, para 0, 5, 10, 15 e 20 % (v/v) de carga de sólidos e para cada um dos tubos internos referidos na Tabela 5.1, exceptuando os de maior diâmetro (4,4 cm).

O caudal de arejamento crítico, definido como sendo o caudal mínimo necessário para manter a fase sólida em circulação, determina-se para 5, 10, 15 e 20 % (v/v) de carga de sólidos e para todos os tubos internos referidos na Tabela 5.1.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Caudal de arejamento crítico

A Figura 5.2 mostra o efeito da altura do tubo interno e da massa específica das partículas no caudal de arejamento crítico para o caso dos tubos de menor diâmetro. Conforme o esperado, nota-se uma diferença clara no comportamento dos dois tipos de partículas: as de menor massa específica (BD) necessitam de valores mais baixos de caudal de arejamento para se manterem em circulação do que as de maior massa específica (AD), apesar de a diferença entre as massas específicas dos dois tipos de partículas não ser grande (um aumento de cerca de 3 %, apenas). Este efeito é visível para todos os tubos mas torna-se mais evidente no tubo interno de menor altura, onde se registou um aumento para o dobro do caudal de arejamento crítico com uma carga de sólidos de 15 %.

Por outro lado, o valor crítico do caudal de arejamento aumenta com a diminuição da altura do tubo interno. Para o mesmo diâmetro e para o mesmo caudal de arejamento, a velocidade do líquido no tubo interno aumenta com a altura deste (Russel *et al.* 1994); como, além disso, a velocidade do líquido também depende do caudal de arejamento e aumenta com este (Russel *et al.* 1994), então para manter os sólidos em circulação em reactores com tubos internos sucessivamente mais altos são necessários caudais de arejamento sucessivamente menores. A Figura 5.2 confirma estes resultados: para tubos internos com o mesmo diâmetro, há uma diminuição do valor crítico do caudal de arejamento com o aumento da razão das alturas dos tubos interno (A_i) e externo (A_e).

Observou-se um comportamento idêntico para os tubos internos com diâmetro intermédio, mas para os tubos de maior diâmetro a circulação das partículas de maior massa específica tornou-se difícil ou mesmo impossível, dada a sua acumulação no fundo do tubo externo causada pelo espaço exíguo existente entre as paredes deste e do tubo interno.

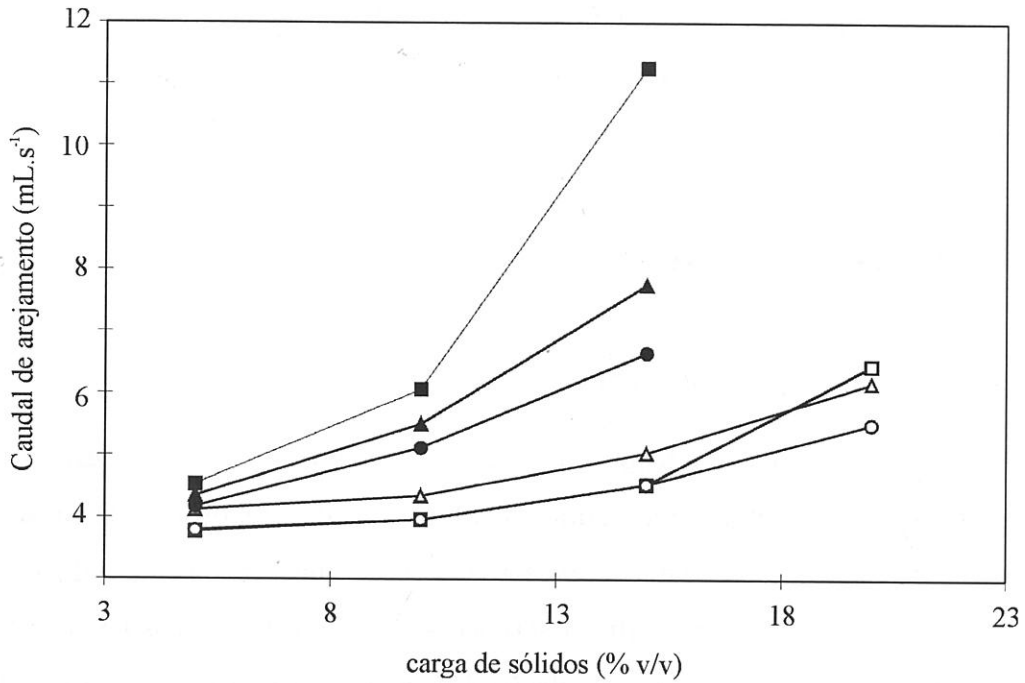


Figura 5.1: Caudal de arejamento crítico em função da carga de sólidos para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes alturas (□, ■ - $A_i = 42$ cm; △, ▲ - $A_i = 48$ cm; ○, ● - $A_i = 56$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

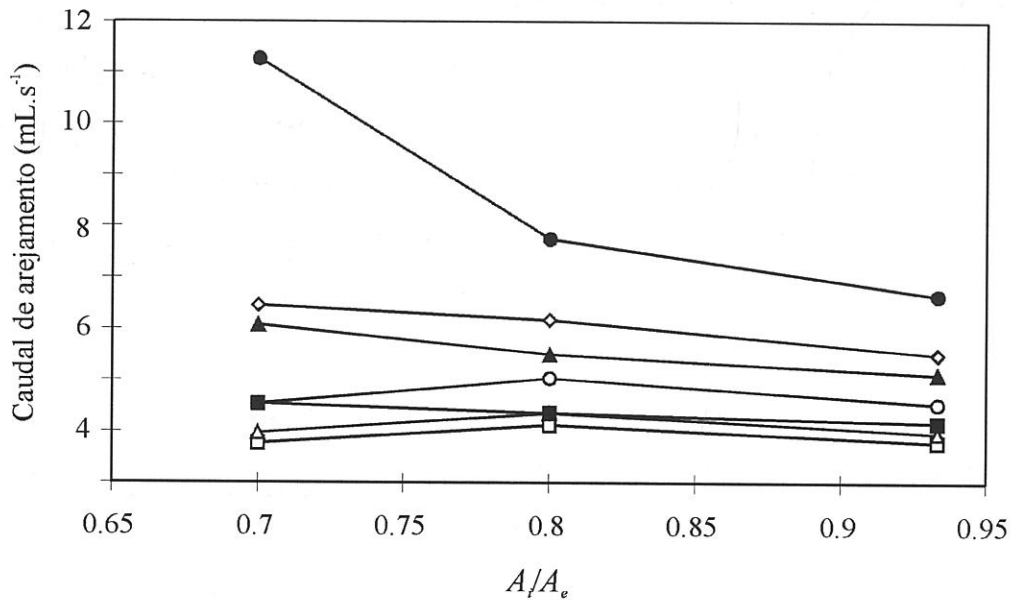


Figura 5.2: Caudal de arejamento crítico em função da razão de alturas (A_i/A_e) para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes cargas de sólidos (□, ■ - 5 % sólidos; △, ▲ - 10 % sólidos; ○, ● - 15 % sólidos; ◇ - 20 % sólidos; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

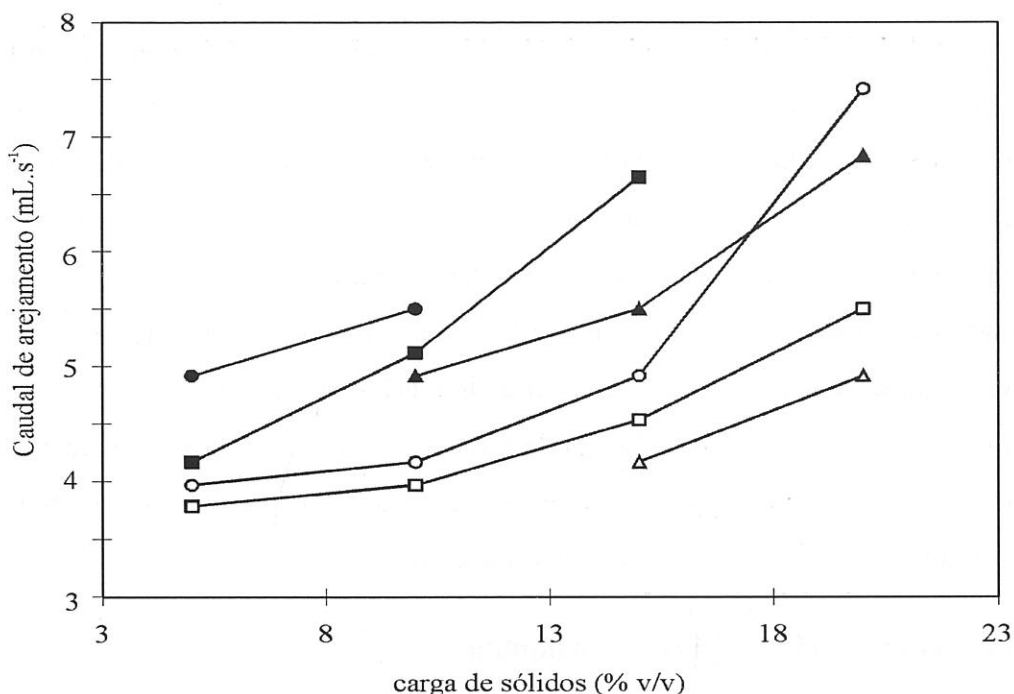


Figura 5.3: Caudal de arejamento crítico em função da carga de sólidos para tubos internos com altura de 56 cm e diferentes diâmetros (\square, \blacksquare - $D_i = 2,2$ cm; $\triangle, \blacktriangle$ - $D_i = 3,2$ cm; \circ, \bullet - $D_i = 4,4$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

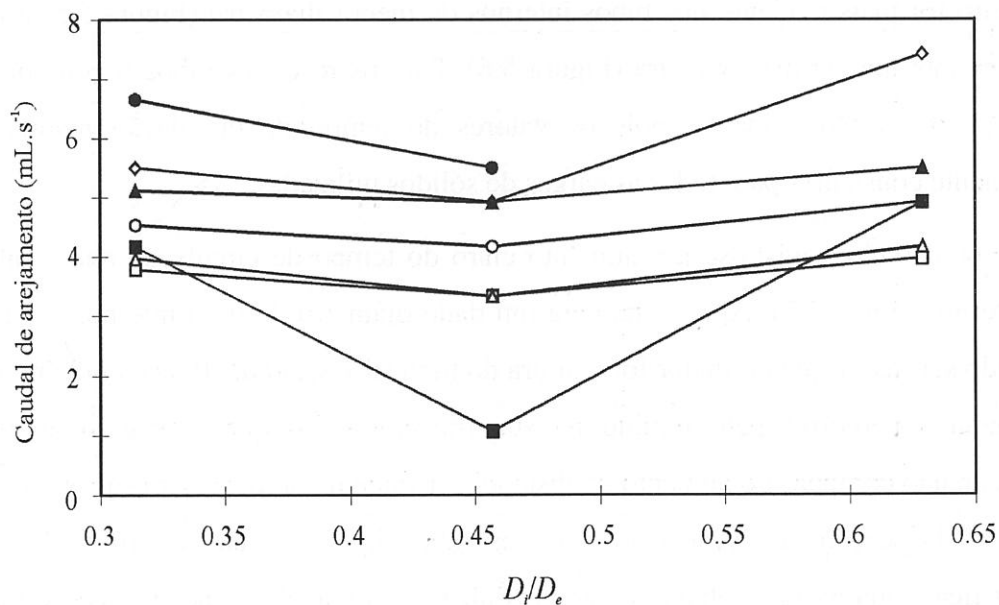


Figura 5.4: Caudal de arejamento crítico em função da razão de diâmetros (D_i/D_e) para tubos internos com altura de 56 cm e diferentes cargas de sólidos (\square, \blacksquare - 5 % sólidos; $\triangle, \blacktriangle$ - 10 % sólidos; \circ, \bullet - 15 % sólidos; \diamond - 20 % sólidos; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

A Figura 5.3 mostra os resultados obtidos, em termos do caudal de arejamento crítico, para os tubos internos mais longos e com diferentes diâmetros. Mais uma vez, as partículas de maior massa específica necessitaram de caudais de arejamento mais elevados para se manterem em circulação. No entanto, há uma diferença em relação ao caso anterior, onde havia uma relação inversa entre a altura do tubo interno e o valor crítico do caudal de arejamento; aqui, parece haver um valor para o diâmetro do tubo interno que minimiza o caudal de arejamento necessário para manter a circulação dos sólidos. Esta afirmação torna-se mais clara ao analisar a Figura 5.4, onde a razão de diâmetros dos tubos interno (D_i) e externo (D_e) para o tubo mais longo que minimiza o caudal de arejamento é 0,46. Os tubos com outras alturas exibiram o mesmo comportamento.

5.3.2 Tempo de circulação da fase líquida

Como pode ver-se na Figura 5.5 e também na Figura 5.6, a massa específica das partículas de alginato parece afectar apenas ligeiramente o tempo de circulação. Mais importante é a influência da carga de sólidos, que provoca aumentos no tempo de circulação até atingir um máximo para cargas de sólidos entre 5 e 10 % (v/v), diminuindo em seguida. Este efeito foi mais evidente nos tubos internos de menor diâmetro (Figura 5.5) e também nos tubos internos de menor altura (Figura 5.6). Para os restantes tubos o comportamento descrito não foi tão evidente, pois os valores do tempo de circulação mantiveram-se praticamente constantes para todas as cargas de sólidos utilizadas.

Por outro lado, regista-se um aumento claro do tempo de circulação com a altura do tubo interno (Figura 5.7). Apesar de, para um dado diâmetro do tubo interno, a velocidade do líquido ser maior quanto maior for a altura do tubo (Russel *et al.* 1994), também aumenta a distância a percorrer pelo líquido na sua trajetória; ao que parece, o aumento da velocidade não compensa o aumento da distância. Também não deve ser esquecida a grande influência da secção de decantação: com os tubos internos mais curtos (cujo extremo superior fica ainda bastante abaixo da zona cónica), é provável que aquela secção tenha um comportamento próximo de uma zona estagnada, caso em que os valores do tempo de circulação se referem essencialmente ao fluxo no circuito tubo ascendente → tubo descendente → tubo ascendente; com tubos internos mais longos o líquido que por eles ascende é injectado directamente na base da secção cónica; esta estará portanto bem agitada

e os tempos de circulação assim determinados representarão mais fielmente o que se passa ao nível de todo o reactor.

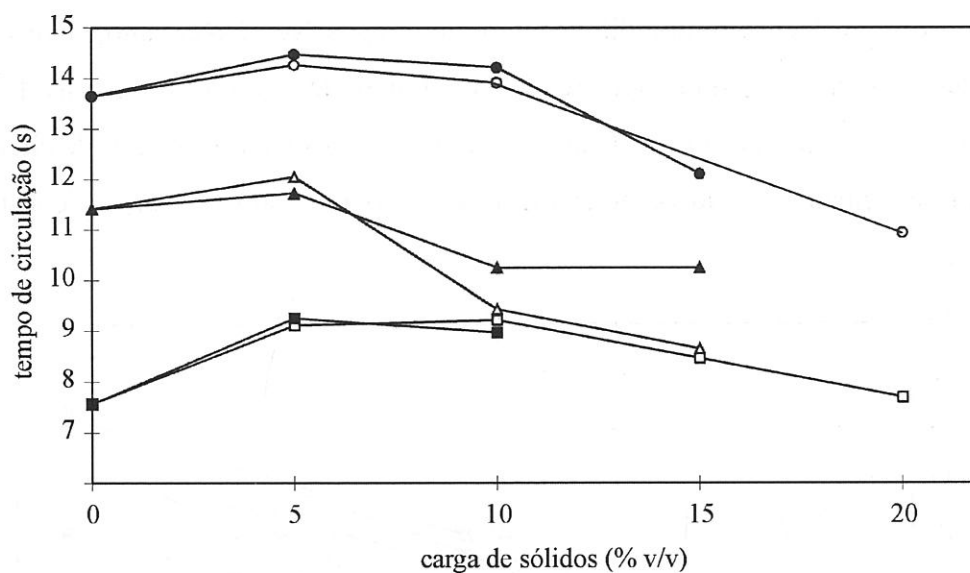


Figura 5.5: Tempo de circulação em função da carga de sólidos para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes alturas, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (\square, \blacksquare - $A_i = 42$ cm; $\triangle, \blacktriangle$ - $A_i = 48$ cm; \circ, \bullet - $A_i = 56$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

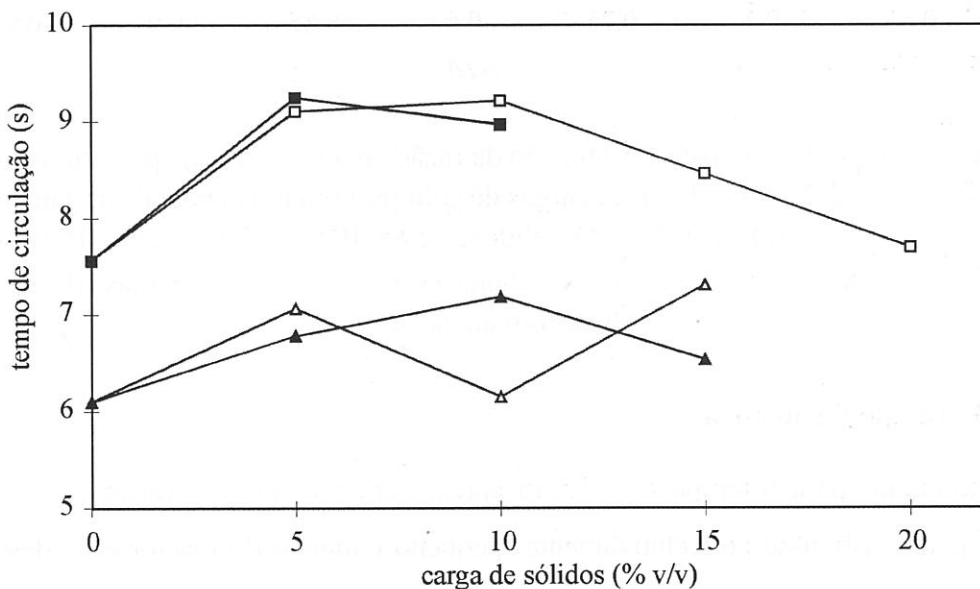


Figura 5.6: Tempo de circulação em função da carga de sólidos para tubos internos com altura de 42 cm e diferentes diâmetros, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (\square, \blacksquare - $D_i = 2,2$ cm; $\triangle, \blacktriangle$ - $D_i = 3,2$ cm; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

Os tubos internos de maior diâmetro não foram utilizados nem para medir o tempo de circulação nem o tempo de mistura (ao qual se refere a secção seguinte), uma vez que a circulação da fase sólida se tornou difícil ou mesmo impossível. No entanto, deve salientar-se que mesmo com os sólidos acumulados no fundo do reactor, foi possível detectar circulação do líquido no reactor, ainda que os valores obtidos para os tempos de circulação e de mistura se tenham situado completamente fora do intervalo de valores considerados razoáveis.

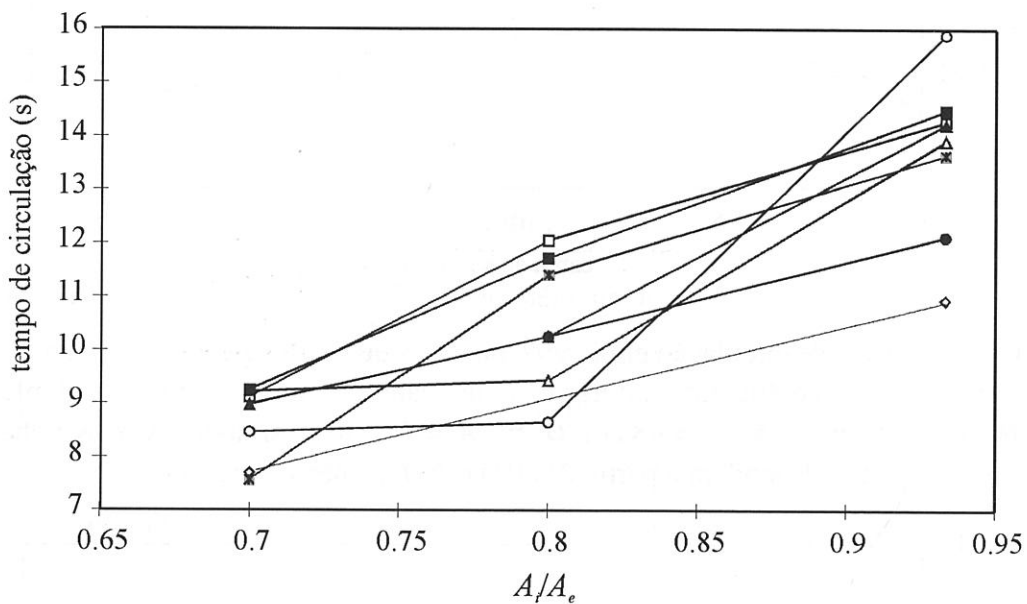


Figura 5.7: Tempo de circulação em função da razão de alturas (A_i/A_e) para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes cargas de sólidos, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (× - 0 % sólidos; □, ■ - 5 % sólidos; △, ▲ - 10 % sólidos; ○, ● - 15 % sólidos; ◇ - 20 % sólidos; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

5.3.3 Tempo de mistura

Os resultados para o tempo de mistura apresentam uma grande variabilidade (Figura 5.8), que pode atribuir-se ao (relativamente) pequeno tamanho do reactor e ao desenho da zona de decantação. No entanto, é possível fazer alguns comentários pertinentes: a influência da massa específica das partículas sólidas é evidente, pois para cada tubo interno testado obtêm-se tempos de mistura mais elevados para as partículas AD quando comparados com os obtidos no mesmo tubo para as partículas BD; ainda que não muito

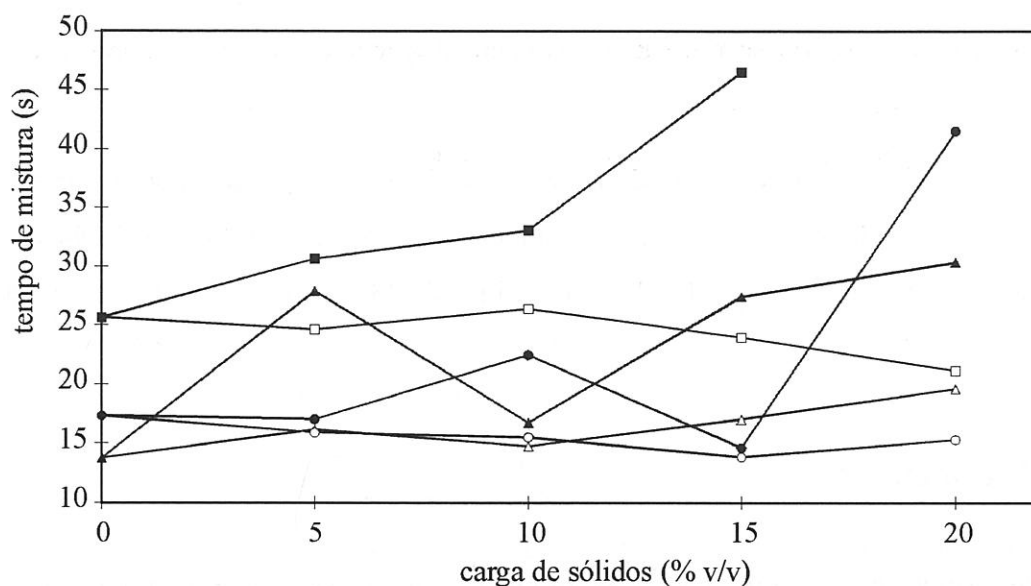


Figura 5.8: Tempo de mistura em função da carga de sólidos para tubos internos com diâmetro de 3,2 cm e diferentes alturas, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (□, ■ - $A_i = 42 \text{ cm}$; △, ▲ - $A_i = 48 \text{ cm}$; ○, ● - $A_i = 56 \text{ cm}$; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

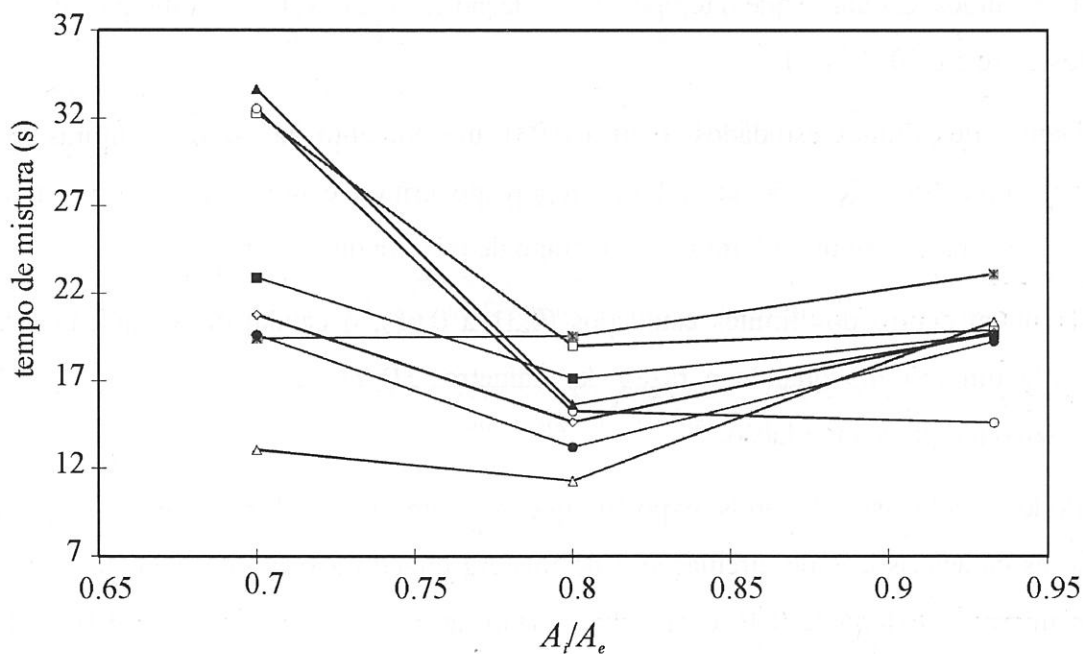


Figura 5.9: Tempo de mistura em função da razão de alturas (A_i/A_e) para tubos internos com diâmetro de 2,2 cm e diferentes cargas de sólidos, com um caudal de arejamento de $12,3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (× - 0 % sólidos; □, ■ - 5 % sólidos; △, ▲ - 10 % sólidos; ○, ● - 15 % sólidos; ◇ - 20 % sólidos; os símbolos vazios e cheios correspondem a partículas BD e AD, respectivamente).

claramente, pode observar-se um ligeiro aumento dos tempos de mistura com a carga de sólidos.

A Figura 5.9 sugere que o valor da razão de alturas entre os tubos interno e externo que minimiza o tempo de mistura no reactor para todas as cargas de sólidos é 0,8. Obtiveram-se resultados semelhantes com o tubo de diâmetro médio (3,2 cm); o tubo de maior diâmetro não foi testado.

5.4 Conclusões

Este estudo mostra que pequenas diferenças na massa específica da fase sólida influenciam o caudal de arejamento crítico e o tempo de mistura num bioreactor *airlift* de circulação interna, mas não afectam significativamente o tempo de circulação.

Registam-se aumentos do caudal de arejamento crítico e do tempo de mistura com a carga de sólidos, enquanto que o tempo de circulação exhibe um valor máximo para cargas de sólidos entre 5 e 10 % (v/v).

Dentro dos limites estudados (0,70 a 0,93), um aumento da razão de alturas (A_i/A_e) provoca uma diminuição do caudal de arejamento crítico e um aumento do tempo de circulação. Observa-se um mínimo para o tempo de mistura quando $A_i/A_e = 0,80$.

Também dentro dos limites estudados (0,31 a 0,63), o caudal de arejamento crítico apresenta um mínimo quando a razão de diâmetros (D_i/D_e) é 0,46, valor que também minimiza o tempo de circulação.

Pode concluir-se, do atrás exposto, que o bioreactor *airlift* em estudo apresenta melhores características de circulação e de mistura quando a razão de diâmetros entre os tubos interno e externo é 0,46 e quando a razão de alturas correspondente é 0,80. Estes valores foram utilizados para construir o *airlift* utilizado durante todo o trabalho experimental seguidamente apresentado nesta tese.

5.5 Bibliografia

- Assa, A. e Bar, R., 1991. Biomass Axial Distribution in Airlift Bioreactor with Yeast and Plant Cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1325-1330.

- Chen, N. Y., Kondis, E. F. e Srinivasan, S., 1987. Low Pressure Airlift Fermenter for Single Cell Protein Production: I. Design and Oxygen Transfer Studies. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 414-420.
- Choi, P. B., 1990. Designing Airlift Loop Fermenters. *Chem. Eng. Prog.*, December, 32-37.
- Favre, E., Deront, M. e Péringer, P., 1994. Influence of a Rotating Sieve on Pumping and Mixing Performances of an Internal Loop Reactor. *Bioprocess Eng.*, 11, 91-95.
- Fraser, R. D., e Hill, G. A., 1993. Hydrodynamic Characteristics of a Spinning Sparger, External Loop Airlift Bioreactor. *Can. J. Chem. Eng.*, 71, 419-425.
- Kawase, Y., Omori, N. e Tsujimura, M., 1994. Liquid-Phase Mixing in External Loop Airlift Bioreactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 61, 49-55.
- Kennard, M. e Janekeh, M., 1991. Two- and Three-Phase Mixing in a Concentric Tube Gas-Lift Fermenter. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1261-1270.
- Livingston, A. G. e Zhang, S. F., 1993. Hydrodynamic Behaviour of Three-Phase (Gas-Liquid-Solid) Airlift Reactors. *Chem. Eng. Sci.*, 48, 1641-1654.
- Lu, W.-J., Hwang, S.-J. e Chang, C.-M., 1994. Liquid Mixing in Internal Loop Airlift Reactors. *Ind. Eng. Chem. Research*, 33, 2180-2186.
- Merchuk, J. C., Ladwa, N., Cameron, A., Bulmer, M. e Pickett, A., 1994. Concentric-Tube Airlift Reactors: Effects of Geometrical Design on Performance. *AIChE J.*, 40, 1105-1117.
- Moresi, M., 1981. Optimal Design of Airlift Fermenters. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2537-2560.
- Prasad, K. Y. e Ramanujam, T. K., 1994. Liquid Circulation Velocity and Overall Gas Holdup in a Modified Jet Loop Bioreactor with Low Density Particles. *Bioprocess Eng.*, 10, 131-137.
- Russel, A. B., Thomas, C. R. e Lilly, M. D., 1994. The Influence of the Vessel Height and Top-Section Size on the Hydrodynamic Characteristics of Airlift Fermenters. *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 69-76.
- Siegel, M. H., Hallaile, M., Herskowitz, M. e Merchuk, J. C., 1988. Hydrodynamics and Mass Transfer in a Three-Phase Airlift Reactor. In: R. King, ed. *2nd International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics, 21-23 September 1988*.
- Siegel, M. e Merchuk, J.C., 1991. Hydrodynamics in Rectangular Airlift Reactors: Scale-up and the Influence of Gas-Liquid Separator Design. *Can. J. Chem. Eng.*, 69, 465-473.
- Siegel, M. H., Merchuk, J. C. e Schügerl, K., 1986. Airlift Reactor Analysis: Interrelationships Between Riser, Downcomer, and Gas-Liquid Separator Behavior, Including Gas Recirculation Effects. *AIChE J.*, 32, 1585-1596.
- Sousa, M. L., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1994. Comparative Analysis of Ethanolic Fermentation in Two Continuous Flocculation Bioreactors and Effect of Flocculation Additive. *Bioprocess Eng.*, 11, 83-90.
- Sukan, A. A. e Vardar-Sukan, F., 1987. Mixing Performance of Airlift Fermenters Against Working Volume and Draft Tube Dimensions. *Bioprocess Eng.*, 2, 33-38.
- Thomas, N. H. e James, D. A., Fluid Dynamic Considerations in Airlift Bioreactors. *Biotechnol. Processes*, 60-71.
- Tijhuis, L., van Loosdrecht, M. C. M. e Heijnen, J. J., 1994. Formation and Growth of Heterotrophic Aerobic Biofilms on Small Suspended Particles in Airlift Reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 595-608.
- Weiland, P., 1984. Influence of Draft Tube Diameter on Operation Behaviour of Airlift Loop Reactors. *Ger. Chem. Eng.*, 7, 374-385.

6. Caracterização do transporte de glucose e oxigénio em flocos de levedura

Sumário

A utilização de organismos floculantes em fermentações é uma técnica promissora mas que apresenta inconvenientes, a maior parte dos quais se relaciona com limitações à transferência de massa no interior dos flocos.

Este capítulo trata da determinação da difusividade efectiva (D_e) e do coeficiente externo de transferência de massa (K_c) em flocos de *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizam-se uma célula de difusão modificada e um método de análise de imagem por computador previamente desenvolvidos, concebidos para minimizar a destruição dos flocos. D_e e K_c são calculados por dois métodos distintos: um método analítico, baseado nas soluções da lei de Fick e um método numérico, baseado em balanços de massa globais aos componentes nos flocos e na solução.

6.1 Introdução

Uma das maiores restrições tanto à aplicação de técnicas avançadas de monitorização e controlo a sistemas de alta densidade celular como ao aumento do seu rendimento é a falta de dados referentes às propriedades de transferência de massa dos vários substratos e produtos em agregados celulares. Apesar do número relativamente grande de referências que utilizam outros sistemas de alta densidade celular (de entre os quais o mais usado é a imobilização em partículas de alginato de cálcio) (Handriková *et al.* 1996, Kurosawa *et al.* 1989, Øyaas *et al.* 1995a, Riley *et al.* 1996 e Tanaka *et al.* 1984), não abundam os trabalhos com agregados celulares (Ananta *et al.* 1995, Sousa e Teixeira 1991 e Teixeira e Mota 1990), e os dados de coeficientes de difusão não se referem, em geral, a este caso (Libicki *et al.* 1988). É provável que esta situação se deva à grande fragilidade mecânica dos agregados (nomeadamente, dos flocos de levedura), problema que se agudiza quando o seu tamanho atinge os 2 ou 3 mm de diâmetro. Por outro lado, também a geometria pode variar: além de flocos esféricos, não é raro encontrá-los com a forma de cilindros achatados ou mesmo de elipsóides, tornando mais complicado o problema de determinar as propriedades de transporte.

A difusão como mecanismo de transporte já foi referida no capítulo 2, tendo-se na ocasião referido que pode ser descrita por um único parâmetro, a difusividade efectiva (D_e), relacionando o gradiente da concentração característica ($c(a,t)$) com o fluxo difusional médio através do volume do objecto em estudo (J_D), relação que é expressa pela lei de Fick:

$$J_D = -D_e \cdot \nabla c(a,t) \quad (6.1)$$

Referiu-se também a importância de efectuar uma determinação correcta das dimensões dos agregados, para permitir a obtenção de resultados fidedignos. A sua estrutura é igualmente importante: os valores de difusividade obtidos em partículas de alginato com células imobilizadas não devem ser utilizados para substituir os que deveriam ser determinados com flocos dado que são bastante diferentes. Ananta *et al.* (1995) determinaram a difusividade do oxigénio em agregados de células de plantas inactivas e encontraram valores correspondentes a apenas 2 % daquele valor em água pura (valores

muito baixos quando comparados com os obtidos em géis de alginato, por exemplo). Além disso, enquanto que os valores típicos para a porosidade de partículas de gel se situam entre 0,80 e 0,98 (Hannoun e Stephanopoulos 1986, Itamunoala 1988, Korgel *et al.* 1992 e Kurillová *et al.* 1992), dependendo da fracção de células no gel, o valor correspondente para flocos de levedura, por exemplo, é de apenas 0,50 (Teixeira e Mota 1990); esta propriedade tem uma grande influência em D_e .

Com o trabalho apresentado neste capítulo pretende-se determinar a difusividade efectiva de dois substratos importantes (a glucose e o oxigénio) em agregados de uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y265). Os valores em questão são obtidos medindo o decréscimo da concentração daqueles substratos numa suspensão de flocos inactivos em meio de fermentação. Utilizam-se dois métodos de cálculo: um método analítico baseado nas soluções da eq. (6.1), ignorando a existência de resistências externas à transferência de massa e um método numérico, baseado em balanços mássicos globais quer aos flocos quer ao meio líquido, que considera a existência daquelas resistências. Comparam-se os resultados obtidos com ambos os métodos, o que permite estabelecer a importância da resistência externa à transferência de massa no conjunto dos fenómenos de transporte que ocorrem num reactor com culturas floculantes.

6.2 Descrição experimental

Neste trabalho utilizam-se flocos pertencentes à estirpe *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y265 cultivada em contínuo no bioreactor *airlift* (ver capítulo 3).

O procedimento experimental para a determinação dos coeficientes de difusão da glucose e do oxigénio nos flocos está descrito no capítulo 4. Faz-se variar a concentração inicial de glucose nos ensaios 1 a 3 (correspondentes à determinação da difusividade efectiva da glucose) e varia-se a velocidade de agitação (originando flocos com tamanhos diferentes) nos ensaios 4 a 6 (correspondentes à determinação da difusividade efectiva do oxigénio), como se resume na Tabela 6.1. A concentração de oxigénio dissolvido no meio é, em todos os ensaios, igual a 100 % da concentração de saturação correspondente.

Tabela 6.1: Resumo das condições experimentais.

Ensaio	1	2	3	4	5	6
Concentração inicial de glucose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	10	20	130	50	50	50
Velocidade de agitação (rpm)	300	300	300	300	200	175

A determinação do diâmetro dos flocos é feita com base no método de análise de imagem descrito no capítulo 4, assumindo que a projecção da área de um floco tem a forma circular (o que constitui uma boa aproximação à realidade). O volume dos flocos calcula-se conforme se descreve no capítulo 3, enquanto que a espessura dos flocos (determinada apenas para flocos com forma cilíndrica) é medida com o auxílio de um micrómetro e corresponde à média de 20 medições.

Todas estas determinações são feitas apenas no final de cada ensaio para evitar tensões desnecessárias nos flocos.

6.3 Tratamento de dados

6.3.1 Método analítico

Um dos métodos mais frequentemente utilizados para o tratamento de dados de difusão baseia-se nas soluções analíticas da equação de difusão de Fick (eq. 6.1) (Acai *et al.* 1995, Crank 1975 e Tanaka *et al.* 1984). A forma destas soluções depende, entre outros, de factores tais como a geometria dos objectos em estudo, do tipo de dados disponíveis e das condições fronteira que são impostas.

Neste trabalho impõem-se as seguintes condições iniciais e condições fronteira:

$$t = 0 \quad \forall a \quad C(t) = C_0 \quad (6.2)$$

$$t > 0 \quad a = R, L \quad C(t) = C(t) \quad (6.3)$$

$$t > 0 \quad a = 0 \quad \frac{\partial c(a, t)}{\partial a} = 0 \quad (6.4)$$

onde a designa a coordenada radial (esfera, cilindro) ou axial (placa plana) do floco, t é o tempo, $C(t)$ é a concentração do soluto no meio no tempo t , C_0 é a concentração inicial do soluto no meio e $c(a,t)$ é a concentração do soluto nos flocos na coordenada a e no tempo t . A eq. (6.3) considera a existência de uma agitação perfeita no líquido que rodeia as partículas, ou seja, despreza a resistência externa à transferência de massa. Para este conjunto de condições, e dependendo da geometria ($f = 1, 2$ ou 3 para placa plana, cilindro infinito ou esfera, respectivamente), as soluções analíticas para a eq. (6.1) são do tipo (Crank 1975):

$$\frac{C(t)}{C_\infty} = 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2 \cdot f \cdot (1 + \alpha)}{f^2 + f^2 \cdot \alpha + \alpha^2 \cdot q_n^2} \exp\left(-\frac{D_e \cdot q_n^2 \cdot t}{a^2}\right) \quad (6.5)$$

em que C_∞ representa a concentração de equilíbrio do soluto no meio, f é o factor de geometria, α é a razão de volumes líquido/sólido, q_n representa as raízes positivas não nulas de equações que dependem do factor de geometria e D_e é a difusividade efectiva.

No caso de objectos com geometria cilíndrica mas em que a condição $R \ll L$ não é satisfeita (isto é, não podem considerar-se cilindros infinitos) existe a possibilidade de recorrer ao *teorema da multiplicação de soluções* (Isachenko *et al.* 1977). Este teorema diz que a multiplicação de soluções (na forma adimensional) da eq. (6.5) conduz à solução desejada para uma geometria correspondente à intersecção das geometrias originais; no caso presente, a multiplicação das soluções da eq. (6.5) para $f = 1$ e 2 (placa plana e cilindro infinito, respectivamente) dá origem à solução para um cilindro não infinito, correspondente à intersecção daquelas duas geometrias (Figura 6.1).

Para tempos de difusão suficientemente elevados os termos da eq. (6.5) correspondentes a $n \geq 2$ podem desprezar-se (Crank 1975). O valor de D_e obtém-se aplicando uma rotina de optimização aos dados experimentais. Os dados de oxigénio dissolvido, devido ao seu carácter oscilante, foram previamente amortecidos aplicando Transformadas de Fourier.

Deve referir-se aqui que está disponível uma solução analítica mais geral para a eq. (6.1), que considera também a existência de resistências externas à transferência de massa (Crank 1975). No entanto, surgiram problemas de convergência ao tentar aplicá-la para o cálculo simultâneo de D_e e K_c que não foi possível resolver, pelo que a tentativa foi abandonada.

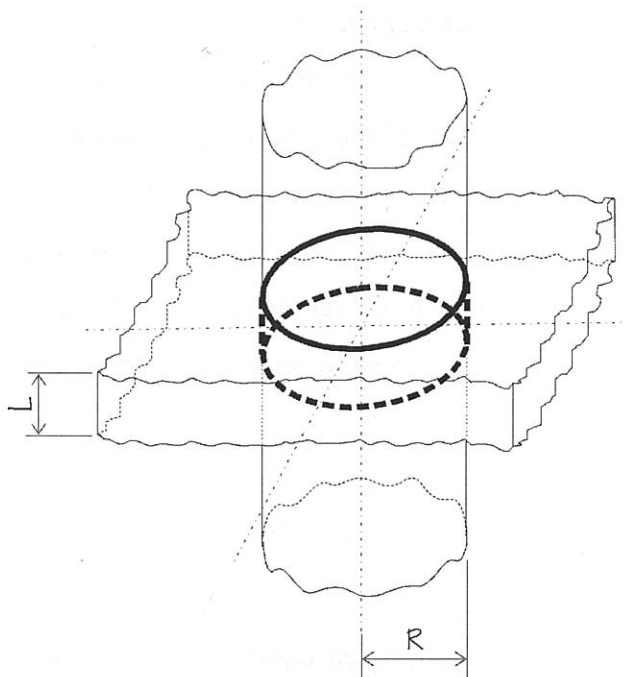


Figura 6.1: Ilustração do teorema da multiplicação de soluções aplicado ao caso de um cilindro em que a condição $R \ll L$ não é válida. A intersecção de uma placa plana com um cilindro infinito dá origem à forma aproximada de um floco cilíndrico. Esta intersecção expressa-se matematicamente como o produto das soluções (adimensionais) da eq. (6.5) para placa plana e cilindro infinito.

6.3.2 Método numérico

As desvantagens do método analítico podem evitar-se aplicando métodos numéricos ao cálculo dos coeficientes de difusão (Øyaas *et al.* 1995b, Kurosawa *et al.* 1989 e Riley *et al.* 1995) ou por análise dos momentos da resposta (concentração *versus* tempo) de um sistema descontínuo a um pulso de traçador, aplicando Transformadas de Laplace às eqs. (6.6) a (6.10) (Hacimusalar e Mehmetoglu 1995).

O balanço mássico geral a um componente durante a sua difusão em estado não estacionário ao longo de um elemento infinitesimal da coordenada de uma partícula sólida, ∂a , pode escrever-se:

$$\varepsilon_p \frac{\partial c(a,t)}{\partial t} = D_e \cdot \left(\frac{\partial^2 c(a,t)}{\partial a^2} + \frac{(f-1)}{a} \frac{\partial c(a,t)}{\partial a} \right) \quad (6.6)$$

onde ε_p é a porosidade dos flocos, com as seguintes condições iniciais e condições fronteira:

$$t = 0 \quad \forall a \quad c(a, t) = c_0 \quad (6.7)$$

$$t > 0 \quad a = R, L \quad K_c \cdot (C(t) - c(a, t)) = D_e \frac{\partial c(a, t)}{\partial a} \quad (6.8)$$

$$t > 0 \quad a = 0 \quad \frac{\partial c(a, t)}{\partial a} = 0 \quad (6.9)$$

Por sua vez, o balanço mássico para a fase líquida, envolvendo resistência externa à transferência de massa, para um reactor agitado descontínuo será:

$$\varepsilon_r \frac{dC(t)}{dt} = -K_c \cdot A \cdot (C(t) - c(a, t)) \quad a = R, L \quad (6.10)$$

sendo ε_r a porosidade do leito e A a área específica.

As eqs (6.6) a (6.10) devem ser normalizadas utilizando parâmetros adimensionais para permitir a aplicação do método de colocação ortogonal de Villadsen e Michelsen (1975). Este método baseia-se no princípio de que as derivadas espaciais das funções (as concentrações dos solutos, neste caso) podem ser representadas de forma discreta pelas funções (concentrações) multiplicadas por um factor (ou *peso*) em determinados *pontos de colocação*. Estes são as raízes do polinómio ortogonal assimétrico de Legendre (*polinómio de nodos*). Utilizam-se aqui cinco pontos de colocação internos que, juntamente com uma rotina para o ajuste dos dados experimentais, permitem o cálculo simultâneo de D_e e K_c .

6.4 Resultados

6.4.1 Determinação do tamanho dos flocos

Para determinar o diâmetro dos flocos analisaram-se mais de 150 objectos com a técnica de análise de imagem descrita no capítulo 4. Na Figura 6.2 apresenta-se um histograma representativo da distribuição das áreas projectadas dos flocos, bem como a função de Gauss que melhor se ajusta aos dados experimentais. Esta última permite determinar a área projectada média da população de flocos (\bar{a}). O tamanho dos flocos pode considerar-se bastante uniforme dado que a curva resultante do ajuste é estreita quando

comparada com outras, obtidas em análises semelhantes efectuadas anteriormente (Vicente *et al.* 1996).

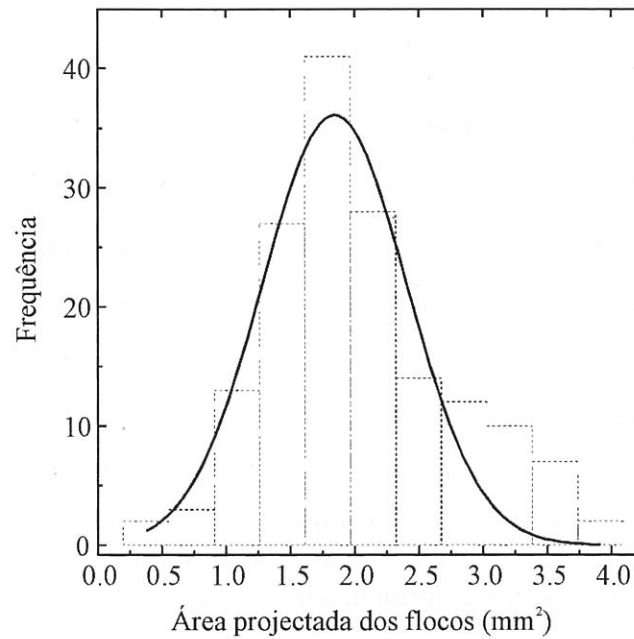


Figura 6.2: Histograma da área projectada dos flocos obtida por análise de imagem, com a correspondente curva de Gauss.

Morfologicamente, os flocos mais pequenos são esféricos enquanto que os flocos maiores têm a forma de cilindros achatados, assemelhando-se a hemácias. Em ambos os casos, porém, a área projectada é circular, permitindo o cálculo imediato do raio dos flocos, R , segundo a eq. (6.11):

$$R = \sqrt{\frac{\bar{a}}{\pi}} \quad (6.11)$$

A Tabela 6.2 resume as principais características dos flocos utilizados. Estes dados são

Tabela 6.2: Resumo das características morfológicas e dimensionais dos flocos utilizados.

Ensaio	1	2	3	4	5	6
Forma	esférica	esférica	esférica	esférica	cilíndrica	cilíndrica
Raio ($R \times 10^3$ m)	0,44	0,46	0,48	0,49	0,78	1,21
Espessura ($L \times 10^3$ m)	-	-	-	-	0,7	1,1

muito importantes para uma escolha correcta do factor f nas eqs. (6.5) e (6.6). A espessura dos flocos só se determina quando estes têm forma cilíndrica.

6.4.2 Difusividade efectiva da glucose

Os ensaios 1 a 3 têm como objectivos determinar o valor da difusividade efectiva da glucose em flocos de levedura e a possível influência da concentração inicial daquele açúcar, que é variada de 10 a 130 g·L⁻¹. Na Figura 6.3 representam-se os pontos experimentais obtidos no decurso dos ensaios e as curvas correspondentes, calculadas com os dois métodos (analítico e numérico) anteriormente descritos. Dado que os flocos utilizados nestes ensaios têm dimensões e geometrias muito semelhantes (ver Tabela 6.2) as curvas representadas referem-se aos dados do conjunto dos três ensaios, tratados como um só.

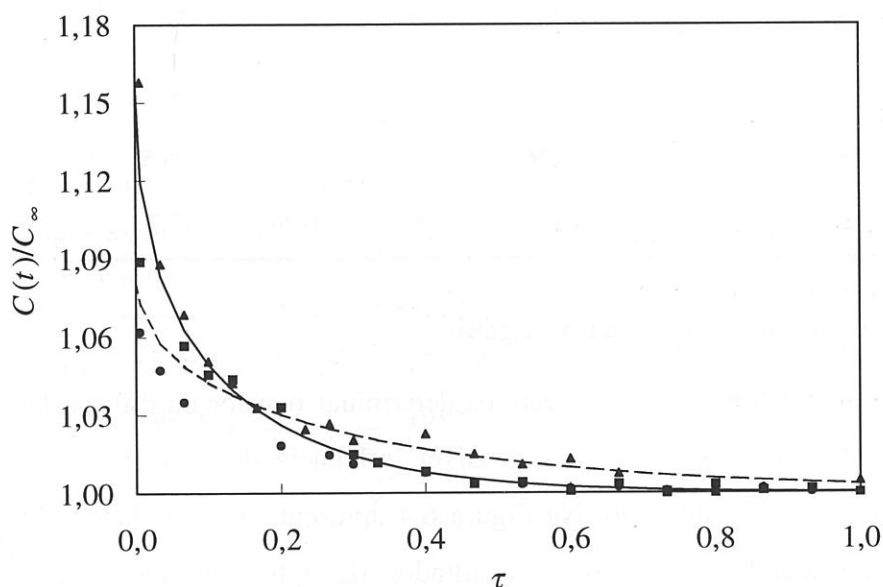


Figura 6.3: Concentração de glucose adimensional ($C(t)/C_\infty$) versus tempo adimensional (τ) para os ensaios 1 (■), 2 (●) e 3 (▲) com concentrações iniciais de 10, 20 e 130 g·L⁻¹, respectivamente. Curvas calculadas a partir dos resultados dos métodos analítico (I) (-----) e numérico (II) (—).

A Tabela 6.3 constitui um resumo dos resultados do cálculo de D_e e K_c , incluindo os intervalos de confiança a 95 % (I.C.). O critério que se utiliza para o ajuste não linear aos dados experimentais é a minimização da soma dos quadrados dos resíduos (SQR). O ensaio denominado “Conjunto” corresponde às curvas representadas na Figura 6.3. Faz-se ainda

uma comparação dos valores obtidos para D_e com valores citados na literatura para a difusividade da glucose em água pura ($D_{\text{água, gluc}}$).

Tabela 6.3: Resultados para a difusividade efectiva da glucose, obtidos com o ajuste não linear dos dados experimentais dos ensaios 1 a 3, utilizando os métodos analítico (I) e numérico (II). Também se apresentam os resultados do ajuste dos dados em conjunto.

$$D_{\text{água, gluc}} (30 \text{ }^\circ\text{C}) = 6,80 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \text{ (Tanaka et al. 1984).}$$

Ensaio	Método	$D_e \times 10^{10}$ [m ² ·s ⁻¹]	I.C.	$K_c \times 10^8$ [m·s ⁻¹]	I.C.	$SQR \times 10^4$	$100 \times D_e / D_{\text{água, gluc}}$ [%]
1	I	0,47	±0,24	-	-	9,5	6,9
	II	1,08	±0,43	4,75	±0,36	10,6	15,9
2	I	0,51	±0,24	-	-	11,3	7,5
	II	0,98	±0,41	4,96	±0,37	54,6	14,4
3	I	0,54	±0,23	-	-	88,7	7,9
	II	1,22	±0,37	4,89	±0,36	22,0	17,9
Conjunto	I	0,52	±0,26	-	-	109,5	7,6
	II	1,10	±0,47	4,87	±0,36	77,2	16,2

6.4.3 Difusividade efectiva do oxigénio

Os ensaios 4 a 6 têm como objectivos determinar o valor da difusividade efectiva do oxigénio em flocos de levedura e a possível influência do tamanho dos agregados em diferentes condições de agitação. Na Figura 6.4 apresentam-se os dados obtidos naqueles ensaios, representando as curvas os resultados da aplicação dos métodos analítico e numérico.

Na Tabela 6.4 apresenta-se um sumário dos resultados do cálculo de D_e e K_c , incluindo os intervalos de confiança a 95 % (I.C.). Mais uma vez, o critério que se utiliza para o ajuste não linear aos dados experimentais é a minimização da soma dos quadrados dos resíduos (SQR). Os valores de SQR para os dados correspondentes às curvas calculadas pelo método analítico (ver Figura 6.4) são muito elevados pelo que foram substituídos por (*) na Tabela 6.4. A difusividade efectiva para o oxigénio em flocos de levedura é comparada com o valor correspondente em água pura ($D_{\text{água, O}_2}$).

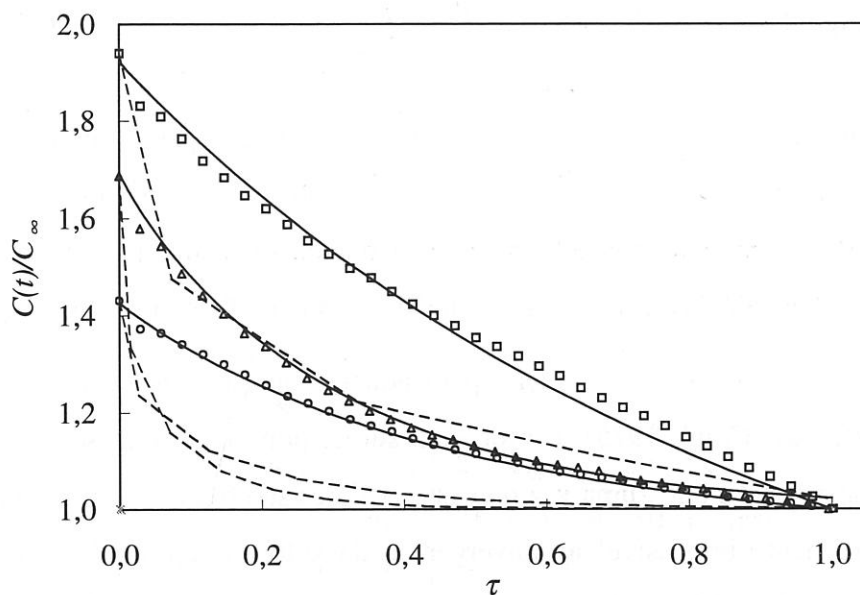


Figura 6.4: Concentração de oxigénio adimensional ($C(t)/C_{\infty}$) versus tempo adimensional (τ) para os ensaios 4 (O), 5 (Δ) e 6 (\square) com velocidades de agitação de 175, 200 e 300 rpm, respectivamente. Curvas calculadas a partir dos resultados dos métodos analítico (I) (-----) e numérico (II) (—).

Tabela 6.4: Resultados para a difusividade efectiva do oxigénio, obtidos com o ajuste não linear dos dados experimentais dos ensaios 4 a 6, utilizando os métodos analítico (I) e numérico (II). $D_{\text{água}, O_2}$ (30 °C) = $2,56 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Kurosawa *et al.* 1989).

Ensaio	Método	$D_e \times 10^{11}$ [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	I.C.	$K_c \times 10^8$ [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]	I.C.	$SQR \times 10^4$	$100 \times D_e / D_{\text{água}, O_2}$ [%]
4	I	0,49	-	-	-	*	0,2
	II	0,65	$\pm 0,33$	1,46	$\pm 1,21$	3,81	0,3
5	I	2,10	-	-	-	*	0,8
	II	2,93	$\pm 1,05$	1,03	$\pm 1,11$	7,23	1,1
6	I	1,60	-	-	-	*	0,6
	II	2,49	$\pm 1,04$	0,75	$\pm 0,65$	54,1	1,0

6.5 Discussão

Neste trabalho utilizam-se dois métodos diferentes para analisar os dados experimentais: um método analítico que se baseia na solução da equação da lei de Fick na ausência de resistências externas à transferência de massa, e um método numérico que considera a existência dessas resistências, juntamente com a difusão interna.

Não é difícil encontrar uma solução para aquela equação que considere também as resistências externas (Crank 1975); o problema surge, porém, quando se tenta efectuar o cálculo simultâneo de D_e e K_c , uma vez que estes valores são bastante dependentes entre si, tornando virtualmente impossível a convergência da solução seja qual for o método de cálculo empregue. Não foi possível encontrar na literatura nenhuma referência que utilize este método para o cálculo simultâneo destes dois parâmetros.

Por outro lado, se as condições hidrodinâmicas em torno das partículas sólidas estiverem bem caracterizadas é possível aplicar uma das correlações empíricas existentes para obter o valor de K_c . Esta possibilidade só é válida, porém, para geometrias bem definidas, isto é, só se encontraram correlações para esfera, cilindro infinito ou placa plana o que, juntamente com a restrição anterior, limita bastante este método e tornou impossível a sua aplicação neste trabalho, pelo que foi necessário optar por um método numérico.

A presença de uma resistência externa à transferência de massa pode ignorar-se se for possível manter uma agitação suficiente para considerar perfeita a mistura em torno das partículas sólidas. No entanto, devido à estrutura frágil dos flocos de levedura, é necessária uma agitação muito suave durante os ensaios por forma a preservar a sua integridade, situação que é, provavelmente, incompatível com a hipótese de agitação perfeita. As resistências interna e externa à transferência de massa correspondem ao inverso dos valores D_e e K_c , respectivamente. Assim sendo, a resistência total (resistência interna + resistência externa) será obviamente maior que a resistência interna, se a resistência externa for considerável. Por outro lado, se for possível desprezar a resistência externa, então a resistência total e a resistência interna terão aproximadamente o mesmo valor. Por outras palavras, o valor de D_e calculado ignorando a resistência externa à transferência de massa (método analítico) representará a resistência total e será menor do que o valor de D_e calculado considerando a existência de resistência externa à transferência de massa (método

numérico), se esta for significativa. Pelo contrário, os valores de D_e serão aproximadamente iguais se a resistência externa for desprezável. Do exposto, pode concluir-se que calculando a difusividade efectiva tanto ignorando como considerando a existência de resistência externa à transferência de massa e comparando os dois valores de D_e obtidos, deve ser possível tirar conclusões acerca da conveniência de desprezar aquela resistência. Essa comparação é feita neste trabalho e os resultados da Tabela 6.3 (para a glucose) e da Tabela 6.4 (para o oxigénio) mostram claramente que se cometeria um erro considerável, nas condições dos ensaios realizados, se se desprezasse K_c . De facto, o número de Biot (Bi) médio é 0,20 para os ensaios com glucose e 0,21 para os ensaios com oxigénio, valores que são muito menores do que o limite geralmente aceite de 50, indicando que é necessário considerar a resistência externa à transferência de massa.

6.5.1 Difusividade efectiva da glucose

Nos ensaios 1 a 3, correspondentes à determinação da difusividade efectiva da glucose, a velocidade de agitação foi mantida constante para assegurar um tamanho uniforme dos flocos. Assim sendo, e assumindo que é similar a estrutura interna de flocos com o mesmo tamanho e sob as mesmas condições de agitação, não se espera que variações na concentração inicial de glucose vão influenciar os resultados, uma vez que tanto D_e como K_c não dependem dessa variável. Quer a Figura 6.3 quer a Tabela 6.3 confirmam estas expectativas: uma vez normalizados, e apesar de pertencerem a ensaios diferentes, os pontos experimentais comportam-se como se tivessem sido obtidos no mesmo ensaio, enquanto que nem D_e nem K_c mostram diferenças significativas entre ensaios.

Aos ensaios 1 a 3 corresponde o menor tamanho de flocos (Tabela 6.2), isto é, a maior velocidade de agitação. Nestas condições, o valor de K_c será menos significativo (mas ainda considerável) e as diferenças entre os dois métodos de cálculo não serão muito notórias (comparar as duas curvas da Figura 6.3). Os valores da SQR chegam a ser menores para o método I nos ensaios 1 e 2, tendência que se inverte no ensaio 3 e no conjunto dos ensaios (Tabela 6.3).

Comparando os valores de D_e e $D_{\text{água, gluc}}$ verifica-se que a difusividade efectiva da glucose nos flocos de levedura se situa entre 7 e 18 % da difusividade em água pura à mesma temperatura, conforme se despreza ou não a resistência externa, o que está de acordo

com os valores obtidos por De Backer *et al.* 1992 para concentrações elevadas de células numa membrana de alginato de cálcio a 4 % (Tabela 6.5).

6.5.2 Difusividade efectiva do oxigénio

Tendo concluído que a concentração inicial do soluto não influencia os valores de D_e e K_c , estudou-se o efeito do tamanho dos flocos. Este, por si só, não deve ter influência em D_e , mas mudanças na estrutura interna (que acarretarão variações no valor da tortuosidade e no tamanho dos poros, por exemplo) vão certamente provocar alterações naquele parâmetro. Nos ensaios 4 a 6, onde se aumentou progressivamente o tamanho dos flocos (Tabela 6.2) decrescendo a velocidade de agitação (Tabela 6.1), é notória a variação dos valores de D_e e de K_c . Se, por um lado, não é possível estabelecer uma dependência entre o tamanho dos flocos e o valor de D_e , já K_c mostra uma diminuição clara com a velocidade de agitação, correspondendo a um aumento da resistência externa à transferência de massa (Tabela 6.4).

Neste caso não foi possível (nem era desejável) tratar os dados em simultâneo. De facto, quer os pontos experimentais relativos a cada ensaio quer as curvas correspondentes aos ajustes efectuados pelo método analítico e pelo método numérico mostram diferenças significativas entre si (Figura 6.4). As diferenças observadas entre os ensaios podem ter ficado a dever-se a alterações na estrutura interna dos flocos, como se referiu anteriormente, à medida que estes aumentaram de tamanho. Além disso, é provável que ocorram interacções do oxigénio com os componentes da parede celular que sejam mais fortes do que as que existem em géis de alginato, por exemplo, retardando a difusão daquele soluto nos agregados e justificando as diferenças encontradas entre os valores de difusividade efectiva já publicados e os que aqui se obtiveram. É possível que os componentes da parede celular provoquem nos flocos um fenómeno semelhante ao que ocorre em cromatografia de exclusão, onde as moléculas de menor tamanho (como o oxigénio, por exemplo) são retidas em pequenas cavidades enquanto que moléculas maiores (por exemplo, a glucose) passam mais facilmente através da estrutura do gel.

É possível encontrar várias correlações para o cálculo da difusividade baseadas na fracção volúmica das células imobilizadas em géis (Korgel *et al.* 1992, Riley *et al.* 1996 e Westrin e Axelsson 1991). No entanto, e uma vez que os resultados deste trabalho não se ajustam a nenhuma daquelas correlações, deve salientar-se que provavelmente não é válido

extrapolá-las ao caso dos flocos, uma vez que estes são apenas constituídos por um empacotamento de células, não tendo nenhuma matriz de suporte.

As diferenças que se observam nas curvas obtidas com o método analítico e com o método numérico, aplicados ao mesmo ensaio, podem interpretar-se como correspondendo ao erro que se comete ao desprezar a resistência externa à transferência de massa: quando não se considera (linhas a tracejado) há uma grande disparidade entre os pontos experimentais e a curva calculada (Figura 6.4), originando valores de SQR elevados (Tabela 6.4); quando se considera aquela resistência, as curvas (linhas a cheio) e os pontos experimentais são praticamente coincidentes.

Comparando D_e com $D_{\text{água},O_2}$ obtêm-se valores para a difusividade efectiva do oxigénio nos flocos entre 0,2 e 1 % do respectivo valor em água pura à mesma temperatura.

Os valores de K_c também variam. No ensaio 4, onde a velocidade de agitação (e , conseqüentemente, o tamanho e a forma dos flocos) é a mesma que nos ensaios 1 a 3, o valor de K_c é comparável. Porém, quando se diminui a velocidade de agitação (permitindo a formação de flocos maiores, com forma cilíndrica) o valor de K_c diminui, como se esperava, coincidindo com um aumento da resistência externa à transferência de massa (Tabela 6.4).

A Figura 6.5 representa a variação de K_c com a velocidade de agitação, dando uma ideia da influência deste parâmetro nas propriedades de transferência de massa no exterior dos flocos.

6.6 Conclusão - comparação com outros trabalhos

Como já foi referido, não se encontraram referências com valores de D_e para flocos de levedura. No entanto, na Tabela 6.5 apresenta-se uma relação de valores publicados para outros sistemas de imobilização.

Ao confrontar os valores de difusividade obtidos neste trabalho com os publicados verifica-se facilmente que, regra geral, os primeiros são mais baixos quer para a glucose quer para o oxigénio. A menor porosidade dos flocos quando comparada com a dos géis juntamente com as diferenças que muito provavelmente existem em termos de estrutura interna estarão na origem das diferenças encontradas. Além disso, de entre os valores

obtidos para a difusividade do oxigénio num agregado de células de plantas (Ananta *et al.* 1995), aquele que corresponde ao agregado de menor tamanho está bastante próximo do valor obtido para os flocos de levedura (apenas ligeiramente menores), apesar das diferenças que possivelmente existem na estrutura. De todos os sistemas referidos na Tabela 6.5 aquele é o que mais se aproxima, como técnica de imobilização (Katzbauer *et al.* 1995), do que aqui se utiliza, pelo que é um termo de comparação privilegiado.

Uma vez determinados os valores das difusividades da glucose e do oxigénio em flocos de levedura, é possível simular os perfis de concentração daqueles substratos no interior dos flocos, para várias concentrações de substrato, vários tamanhos dos flocos, na ausência ou na presença de um aditivo de floculação. Este é o assunto do capítulo seguinte.

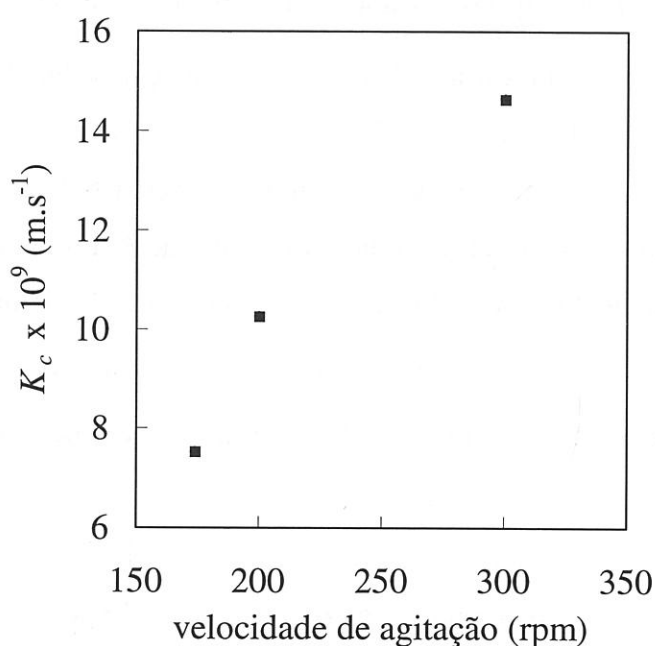


Figura 6.5: Variação do valor de K_c com a velocidade de agitação nos ensaios 4 a 6. O aumento da velocidade de agitação corresponde à diminuição do tamanho dos flocos.

Tabela 6.5: Resumo de valores publicados para a D_e da glucose e do oxigénio.

Suporte	Tipo de células	Temperatura (°C)	Soluto	$D_e \times 10^{10}$ [m ² ·s ⁻¹]	Referência
Alginato de cálcio (4 %)	leveduras	30	glucose	1,0-3,2 ^a	De Backer <i>et al.</i> 1992
Alginato de cálcio (3 %)	leveduras (32.1 %)	25	glucose	4,68	Hacimusalar e Mehmetoglu 1995
Alginato de cálcio (2 %)	leveduras (20 %)	22-26	glucose	6,1	Hannoun e Stephanopoulos 1986
Alginato de cálcio (3 %)	-	37	glucose	6,21	Li <i>et al.</i> 1996
Alginato de cálcio (2 %)	-	30	glucose	6,22	Merchant <i>et al.</i> 1987
Alginato de cálcio (2 %)	-	30	glucose	6,79	Merchant <i>et al.</i> 1987
Alginato de cálcio (2 e 4 %)	-	30	glucose	6,83	Tanaka <i>et al.</i> 1984
Agregados	leveduras	30	glucose	1,10	Este trabalho
Meio de fermentação	leveduras	22	oxigénio	15,7-21,0 ^b	Ho e Ju 1988
Alginato de cálcio (2,5 %)	leveduras	30	oxigénio	20,8-22,2 ^c	Kurosawa <i>et al.</i> 1989
Alginato de cálcio (3 %)	-	37	oxigénio	12,2	Li <i>et al.</i> 1996
Alginato de cálcio (3 %)	-	30	oxigénio	3,66	Renneberg <i>et al.</i> 1988
Poliuretano	-	30	oxigénio	1,95	Renneberg <i>et al.</i> 1988
<i>Pellets</i> de micélios	fungos	-	oxigénio	3,50	Webster 1981
Agregados	plantas	25	oxigénio	0,5-10 ^d	Ananta <i>et al.</i> 1995
Agregados	leveduras	30	oxigénio	0,049-0,21 ^d	Este trabalho

^a dependendo da concentração celular na membrana;

^b dependendo na fracção volúmica das células no meio;

^c dependendo da densidade celular;

^d dependendo do tamanho dos agregados.

6.7 Bibliografia

- Acai, P., Michálková, E. e Bálež, V., 1995. Biotransformation of Cephalosporin-C to 7-Aminocephalosporanic Acid with Coimmobilized Biocatalyst in a Batch Bioreactor. 1. Reaction Kinetics and Diffusion Effects. *Bioprocess Eng.*, 12, 249-252.
- Ananta, I., Subroto, M. A. e Doran, P. M., 1995. Oxygen Transfer and Culture Characteristics of Self-Immobilized *Solanum aviculare* Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 541-549.
- Crank, J., 1975. *The Mathematics of Diffusion*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press.
- De Backer, L., Devleminck, S., Willaert, R. e Baron, G., 1992. Reaction and Diffusion in a Cell Membrane Reactor Containing Immobilized Cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 322-328.
- Hacimusalar, M. e Mehmetoglu, Ü., 1996. Determination of the Effective Diffusion Coefficients of Glucose and Ethanol in Calcium Alginate Gel by the Moment Analysis Method. *Chem. Eng. Sci.*, 50, 3001-3004.
- Handriková, G., Štefuca, V., Polakovic, M. e Bálež, V., 1996. Determination of Effective Diffusion Coefficient of Substrate in Gel Particle with Immobilized Biocatalyst. *Enzyme Microbial Technol.*, 18, 581-584.
- Hannoun, B. J. M. e Stephanopoulos, G., 1986. Diffusion Coefficients of Glucose and Ethanol in Cell-free and Cell-occupied Calcium Alginate Membranes. *Biotech. Bioeng.*, 28, 829-835.
- Ho, C. S. e Ju, L.-K., 1988. Effects of Microorganisms on Effective Oxygen Diffusion Coefficients and Solubilities in Fermentation Media. *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 313-325.
- Isachenko, V. P., Osipova, V. A. e Sukomel, A. S., 1977. *Heat Transfer*. Moscow: Mir Publishers.
- Itamunoala, G. F., 1988. Limitations of Methods of Determining Effective Diffusion Coefficient in Cell Immobilization Matrices. *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 714-717
- Katzbauer, B., Narodoslowsky, M. e Moser, A., 1995. Classification System for Immobilization Techniques. *Bioprocess Eng.*, 12, 173-179.
- Korgel, B. A., Rotem, A. e Monbouquette, H. G., 1992. Effective Diffusivity of Galactose in Calcium Alginate Gels Containing Immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Prog.*, 8, 111-117.
- Kurillová, L'Ubica, Gemeiner, P., Ilavský, M., Štefuca, V., Polakovic, M., Welwardová, A. e Tóth, D., 1992. Calcium Pectate Gel Beads for Cell Entrapment. *Bioetchnol. Appl. Biochem.*, 16.
- Kurosawa, H., Matsumura, M. e Tanaka, H., 1989. Oxygen Diffusivity in Gel Beads Containing Viable Cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 926-932.
- Li, R. H., Altreuter, D. H. e Gentile, F. T., 1996. Transport Characterization of Hydrogel Matrices for Cells Encapsulation. *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 365-373.
- Libicki, S. B., Salmon, P. M. e Robertson, C. R., 1988. The Effective Diffusive Permeability of a Nonreacting Solute in Microbial Cell Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 68-85.
- Merchant, F. J. A., Margaritis, A., Wallace, J. B. e Verdanis, A., 1987. A Novel Technique for Measuring Solute Diffusivities in Entrapment Matrices Used in Immobilization. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 936-945.
- Øyaas, J., Storrø, I., Lysberg, M., Svendsen, H. e Levine, D. W., 1995a. The Effective Diffusion Coefficient and the Distribution Constant for Small Molecules in Calcium-Alginate Gel Beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 492 -500.
- Øyaas, J., Storrø, I., Lysberg, M., Svendsen, H. e Levine, D. W., 1995b. Determination of Effective Diffusion Coefficients and Distribution Constants in Polysaccharide Gels with Non-Steady-State Measurements. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 501 -507.
- Renneberg, R., Sonomoto, K., Katoh, S. e Tanaka, A., 1988. Oxygen Diffusivity of Synthetic Gels Derived from Prepolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 1-7.
- Riley, M. R., Muzzio, F. J. e Buettner, H. M., 1995. Diffusion in Heterogeneous Media: Application to Immobilized Cell Systems. *AIChE J.*, 41, 691-700.

- Riley, M. R., Muzzio, F. J., Buettner, H. M. e Reyes, S. C., 1996. A Simple Correlation for Predicting Effective Diffusivities in Immobilized Cell Systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 223-227.
- Sousa, M. L. e Teixeira, J. A., 1991. Reduction of Diffusional Limitations in Yeast Flocs. *Biotechnol. Lett.*, 13, 883-888.
- Tanaka, H., Matsumura, M. e Veliky, I. A., 1984. Diffusion Characteristics in Ca-Alginate Gel Beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 53-58.
- Teixeira, J. A. e Mota, M., 1990. Experimental Assessment of Internal Diffusion Limitations in Yeast Flocs. *Chem. Eng. J.*, 43, B13-B17.
- Vicente, A., Meinders, J. M. e Teixeira, J. A., 1996. Sizing and Counting of *Saccharomyces cerevisiae* Floc Populations by Image Analysis, Using an Automatically Calculated Threshold. *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 673-678.
- Villadsen, J. e Michelsen, M. L., 1975. *Solution of Differential Equation Models by Polynomial Approximation*. 2nd ed. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice-Hall.
- Webster, I. A., 1981. Criteria for the Prediction of Diffusional Control within Whole Cells and Cell Flocs. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 31, 178-182.
- Westrin, B. A. e Axelsson, A., 1991. Diffusion in Gels Containing Immobilized Cells: A Critical Review. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 439-446.

7. Modelização dos fenómenos de difusão e reacção em flocos de levedura

Sumário

A existência de limitações à transferência de substratos para e no interior de flocos de levedura vai condicionar o comportamento metabólico das células, com consequências no crescimento celular e na formação de produtos, pelo que têm sido utilizados aditivos poliméricos com o objectivo de reduzir essas limitações, com maior ou menor êxito.

O conhecimento dos perfis de concentração e dos fluxos metabólicos da glucose e do oxigénio no interior dos flocos poderá trazer informações que permitam efectuar melhorias significativas no processo fermentativo, nomeadamente ao nível da produtividade. Medir esses perfis directamente é uma tarefa extremamente difícil, mas é possível simulá-los com base em algumas premissas e com o conhecimento dos valores da difusividade efectiva dos solutos em questão. É o resultado dessas simulações que se apresenta neste capítulo, considerando diferentes tamanhos de flocos, diferentes concentrações dos substratos no meio e a presença ou ausência de um aditivo polimérico.

7.1 Introdução

Os sistemas de alta densidade celular (nomeadamente os que utilizam organismos floculantes) permitem obter bons rendimentos. É possível, no entanto, melhorar ainda mais a sua produtividade, para o que é essencial caracterizá-los em termos das propriedades difusionais dos solutos uma vez que a difusão é, talvez, o mecanismo de transporte mais importante através de agregados celulares (Riley *et al.* 1995, Riley *et al.* 1996 e Webster 1981).

Limitações à difusão de substratos para os agregados e dentro destes vão condicionar o comportamento metabólico das células, sendo especialmente críticas as quantidades disponíveis de glucose e oxigénio (Hamdi 1995, Rieger *et al.* 1983 e Sonnleitner e Käppeli 1986), o que irá afectar o crescimento celular e a formação de produtos de fermentação.

A formação de flocos em leveduras, segundo Miki *et al.* (1992), dá-se quando “um componente específico da parede celular, do tipo lectina, reconhece e adere aos α -mananos de uma célula adjacente (formando uma ponte) com o auxílio de iões Ca^{2+} , que actuam como co-factores activando a capacidade de adesão”. Iões como Mg^{2+} , Co^{2+} e K^+ também promovem a floculação, que é inibida pela presença de La^{3+} , Cr^{2+} e outros (Kuriyama *et al.* 1991). Assim, a composição do meio de fermentação pode afectar as propriedades de superfície e de agregação das células de levedura (Mozes *et al.* 1994).

A utilização de aditivos poliméricos foi ensaiada por vários autores para tentar reduzir as limitações difusionais em flocos de levedura (Salt *et al.* 1996, Sousa e Teixeira 1991 e Weir *et al.* 1994). Tais aditivos podem, por exemplo, prolongar as pontes intercelulares estabelecidas, aumentando o espaço existente entre células adjacentes num floco (Lima *et al.* 1992), tendo sido já publicados resultados que apontam para reduções nas limitações difusionais nessa situação (Sousa e Teixeira 1991, Sousa *et al.* 1994b, Lima *et al.* 1992 e Sousa e Teixeira 1996), sugerindo uma diminuição do valor da difusividade dos substratos na presença desses aditivos.

Com dados de difusividade efectiva, um modelo apropriado e o apoio matemático conveniente, é possível calcular os perfis de concentração de solutos no interior dos objectos em estudo. O conhecimento desses perfis pode revelar-se útil quando se pretende prever ou

justificar o comportamento metabólico dos agregados, assim como permite adiantar hipóteses sobre a sua estrutura e sobre o efeito dos aditivos de floculação.

No trabalho apresentado neste capítulo fazem-se simulações de perfis de concentração da glucose e do oxigénio dissolvido em flocos de levedura no decurso de uma fermentação contínua. Desenvolveu-se um modelo que inclui a permuta entre metabolismo respiratório e respiro-fermentativo, segundo Sonnleitner e Käppeli (1986) (ver Apêndice I). As equações às derivadas parciais (EDP) do modelo foram transformadas num conjunto de equações diferenciais ordinárias (EDO) por meio de um método de colocação ortogonal (Villadsen e Michelsen 1975). Os perfis de concentração obtiveram-se resolvendo este sistema de EDO por meio uma rotina de integração adequada. Efectuaram-se cálculos para flocos de vários tamanhos, diferentes concentrações de glucose e oxigénio e considerando ou não a presença de um aditivo de floculação.

7.2 Modelo

7.2.1 Restrições do modelo

Para conseguir desenvolver um modelo matemático que descreva convenientemente o sistema (flocos de levedura num reactor do tipo *airlift* a funcionar em contínuo) em termos de balanços mássicos aos substratos tanto nos flocos como no meio de fermentação, torna-se necessário impor as seguintes restrições:

- i) os flocos têm a forma esférica;
- ii) o crescimento de biomassa não é significativo durante o período da simulação;
- iii) a população de flocos tem um único diâmetro, que se mantém constante durante o período da simulação;
- iv) imediatamente antes do início do período de simulação os flocos não contêm glucose nem oxigénio;
- v) os coeficientes de partição dos solutos entre a fase líquida (meio) e os flocos são constantes e unitários;

- vi) as reacções metabólicas ocorrem apenas nos flocos; não se dão reacções na fase líquida uma vez que não há células em suspensão;
- vii) difusão e reacção ocorrem simultaneamente;
- viii) não tendo sido possível encontrar dados cinéticos para estirpes floculantes, utilizam-se dados de células em suspensão (Sonnleitner e Käppeli 1986).

As simulações começam quando os flocos são adicionados ao meio de fermentação, devidamente arejado.

7.2.2 Equações do modelo

Para facilitar o desenvolvimento do modelo, o sistema em estudo divide-se em duas partes: a *Parte A*, representando os flocos e a *Parte B*, representando a fase líquida. As condições fronteira estabelecem o elo entre as duas partes.

7.2.2.1 Parte A: flocos

De acordo com o modelo metabólico proposto por Sonnleitner e Käppeli (1986), a glucose pode ser consumida por via respiratória ou respiro-fermentativa. A via utilizada depende ou da disponibilidade de oxigénio dissolvido no meio (se este substrato for limitante), ou da capacidade respiratória máxima das células (se o oxigénio não for limitante). Assim, se houver limitações de oxigénio ou se for atingida a capacidade respiratória máxima, as células consumirão glucose pela via respiro-fermentativa. Caso contrário, será utilizada a via respiratória. Esta é a base do modelo acima referido, descrito brevemente no Apêndice I.

As taxas específicas de crescimento em glucose para metabolismo respiratório (φ_S^r) e respiro-fermentativo (φ_S^f) são traduzidas, em termos adimensionais, pelas eqs. (7.1) e (7.2), respectivamente:

$$\varphi_S^r = \left(\frac{R^2}{D_{e,S}} \right) \cdot Y_{X/O}^r \cdot q_{O,\max} \cdot \frac{\xi_O}{K_2 + \xi_O} \quad (7.1)$$

$$\varphi_S^f = \left(\frac{R^2}{D_{e,S}} \right) \cdot Y_{X/S}^f \cdot \left(q_{S,\max} \cdot \frac{\xi_S}{K_1 + \xi_S} - q_{O,\max} \cdot \frac{Y_{X/O}^r}{Y_{X/S}^r} \cdot \frac{\xi_O}{K_2 + \xi_O} \right) \quad (7.2)$$

onde R é o raio dos flocos, $D_{e,s}$ é a difusividade efectiva do substrato nos flocos, $Y_{X/O}^r$ é o coeficiente de rendimento biomassa/oxigénio em metabolismo respiratório, $Y_{X/S}^r$ e $Y_{X/S}^f$ são os coeficientes de rendimento biomassa/substrato em metabolismo respiratório e respiro-fermentativo, $q_{S,max}$ e $q_{O,max}$ são as taxas específicas máximas de consumo de substrato e oxigénio, ξ_S e ξ_O são as concentrações adimensionais de substrato e oxigénio nos flocos e K_1 e K_2 são constantes cinéticas de saturação.

Estas duas variáveis são os termos de reacção nos balanços mássicos adimensionais para a glucose e para o oxigénio, representados pelas eqs. (7.3) e (7.4), respectivamente:

$$\frac{\partial \xi_S}{\partial \tau_M} = \delta_S \cdot \left(\frac{\partial^2 \xi_S}{\partial \rho^2} + \frac{2}{\rho} \cdot \frac{\partial \xi_S}{\partial \rho} \right) - \left(\frac{\varphi_S^r}{Y_{X/S}^r} + \frac{\varphi_S^f}{Y_{X/S}^f} \right) \cdot Z_X \quad (7.3)$$

$$\frac{\partial \xi_O}{\partial \tau_M} = \delta_O \cdot \left(\frac{\partial^2 \xi_O}{\partial \rho^2} + \frac{2}{\rho} \cdot \frac{\partial \xi_O}{\partial \rho} \right) - \frac{\varphi_S^r}{Y_{X/O}^r} \cdot Z_X \quad (7.4)$$

em que τ_M é o tempo adimensional, δ_S e δ_O são parâmetros adimensionais correspondentes aos quocientes entre as difusividades efectivas do substrato e do oxigénio (respectivamente) e a difusividade efectiva do substrato, ρ é a coordenada radial adimensional do floco e Z_X é a concentração adimensional de biomassa no meio.

Impõe-se o seguinte conjunto de condições iniciais e condições fronteira:

$$\tau_M \leq 0 \quad 0 < \rho < 1 \quad \xi_i = 0 \quad (7.5)$$

$$\tau_M > 0 \quad \rho = 0 \quad \frac{\partial \xi_i}{\partial \rho} = 0 \quad (7.6)$$

$$\tau_M > 0 \quad \rho = 1 \quad \frac{\partial \xi_i}{\partial \rho} = Bi_{M,i} \cdot (Z_i - \xi_i), \quad \text{para } i = S \text{ ou } O \quad (7.7)$$

em que Bi_M designa o número de Biot modificado, definido como $Bi_{M,i} = K_C \cdot R/D_{e,s}$.

7.2.2.2 Parte B: fase líquida

Para a fase líquida, os balanços mássicos adimensionais para a glucose e o oxigénio podem representar-se pelas eqs. (7.8) e (7.9), respectivamente:

$$\frac{dZ_S}{d\tau_M} = -\frac{R^2}{D_{e,S}} \cdot \left[\alpha_1 \cdot (Z_S - \xi_{S,R}) - \dot{D} \cdot (Z_{S,F} - Z_S) \right] \quad (7.8)$$

$$\frac{dZ_O}{d\tau_M} = -\frac{R^2}{D_{e,S}} \cdot \left[\alpha_2 \cdot (Z_O - \xi_{O,R}) - \alpha_3 \cdot (Z_O^{sat} - Z_O) \right] \quad (7.9)$$

onde α_1 e α_2 são os coeficientes de transferência de massa para o substrato e para o oxigénio nos flocos, respectivamente, α_3 é o coeficiente de transferência gás/líquido para o oxigénio e Z_S e Z_O são concentrações adimensionais de substrato e oxigénio, respectivamente.

A forma adimensional em que estão escritas as eqs. (7.1) a (7.9) adopta-se porque, além de permitir a simplificação formal do modelo matemático (reduzindo significativamente o número de parâmetros envolvidos), é essencial para a aplicação do método de colocação ortogonal utilizado nos cálculos subsequentes.

7.2.3 Solução das equações do modelo

O primeiro passo para resolver as eqs. (7.1) a (7.7) é a sua transformação de EDP em EDO, o que é conseguido aplicando uma técnica de colocação ortogonal (Villadsen e Michelsen 1975). Esta técnica, já utilizada no capítulo 6, baseia-se no princípio de que as derivadas espaciais das funções (as concentrações dos solutos, neste caso) podem ser representadas de forma discreta pelas funções (concentrações) multiplicadas por um factor (ou *peso*) em determinados *pontos de colocação*. Estes são as raízes do polinómio ortogonal assimétrico de Legendre (*polinómio de nodos*).

Utilizam-se dezassete pontos de colocação internos ao longo da coordenada radial do floco, com o cuidado de aumentar a sua densidade desde o centro até à superfície, onde foi colocado um décimo oitavo ponto. Os pesos em cada ponto de colocação são determinados calculando os valores da primeira e da segunda derivada nas raízes do polinómio de nodos.

Depois de se converterem as eqs. (7.1) a (7.7) em EDO, todo o sistema (eqs. (7.1) a (7.7)) é integrado utilizando a modificação de Merson (passo de integração variável) ao

método de Runge-Kutta de quarta ordem. Este método possibilita uma integração mais eficiente dos sistemas ditos *stiff*, como o que aqui se apresenta.

7.2.4 Valores dos parâmetros do modelo

Os valores da difusividade efectiva da glucose e do oxigénio em flocos de levedura foram determinados no capítulo anterior. A metodologia então utilizada é novamente aplicada, agora para obter os valores da difusividade daqueles solutos em flocos que cresceram na presença de um aditivo de floculação (Magna Floc LT-25, aqui designado por MF), na concentração de 0,01 % (p/v).

As difusividades efectivas, juntamente com os outros parâmetros do modelo utilizados nas simulações, estão representadas na Tabela 7.1 e na Tabela 7.2. Estes são usados para obter os valores dos grupos adimensionais presentes nas eqs. (7.1) a (7.9). Nas simulações mantêm-se constantes alguns parâmetros (Tabela 7.1) e variam-se outros (Tabela 7.2)

Tabela 7.1: Valores dos parâmetros do modelo que se mantêm constantes durante as simulações.

Parâmetro	valor	Parâmetro	valor
$D_{e,O}$	$2,49 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$Y_{x/s}^f$	0,05 ^a
$D_{e,O}^{ad}$	$2,20 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$Y_{x/s}^r$	0,49 ^a
$D_{e,S}$	$1,10 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	C_o^{sat}	0,008 g·L ⁻¹ ^b
$D_{e,S}^{ad}$	$4,32 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	C_x	5,0 g·L ⁻¹
K_o	$1,0 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ a}$	\dot{D}	$5,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
K_s	$0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ a}$	ϵ_p	0,5 ^c
$q_{O,max}$	$7,11 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}_{biomass}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ a}$	ϵ_p^{ad}	0,6 ^c
$q_{S,max}$	$9,72 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{g}_{biomass}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ a}$	T	303 K
$Y_{x/o}^r$	1,20 ^a		

^a Sonnleitner e Käppeli 1986.

^b Perry e Chilton 1984.

^c Lima *et al.* 1992.

para poder determinar a sua influência nos perfis de glucose e de oxigénio dissolvido dentro dos flocos. Notem-se os aumentos muito significativos registados nos valores de difusividade obtidos na presença de um aditivo de floculação, quando comparados com os valores correspondentes obtidos sem aditivo: quatro vezes maiores para a glucose e oito vezes maiores para o oxigénio.

Tabela 7.2: Valores dos parâmetros do modelo que são modificados durante as simulações.

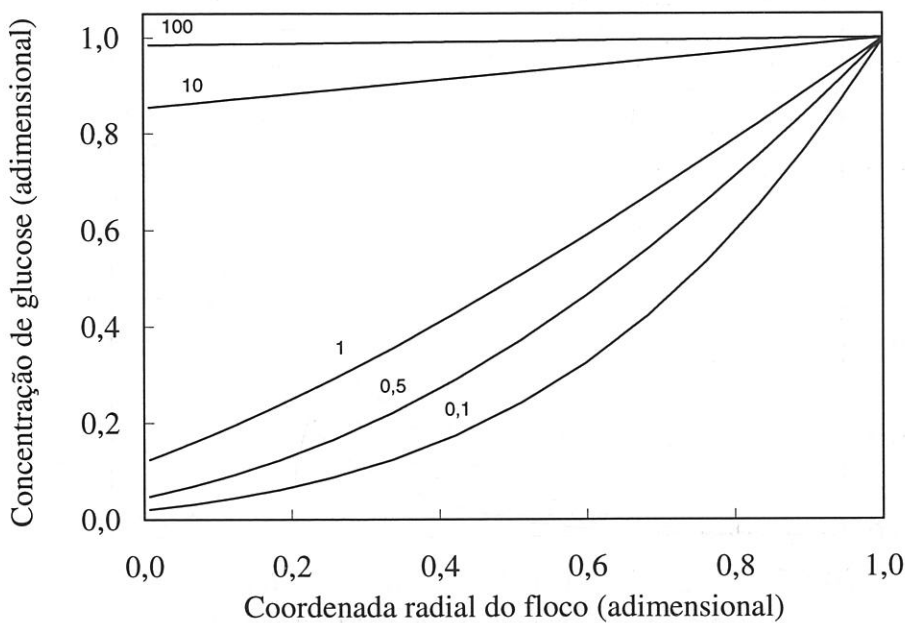
Parâmetro	valor	Parâmetro	valor
C_o	10; 100 % saturação	R	0,45; 0,80; 1,20 mm
C_s	0,1; 0,5; 1; 10; 100 g·L ⁻¹		

7.3 Resultados e Discussão

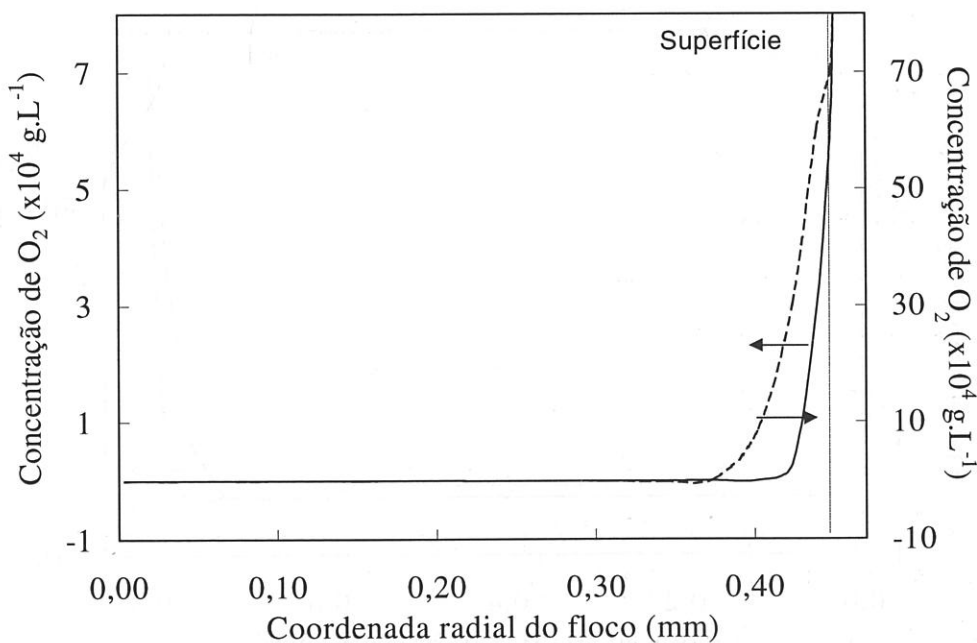
7.3.1 Simulações sem aditivo de floculação

Uma vez atingido o estado estacionário não se esperam alterações nos perfis de concentração, que podem dar uma ideia interessante acerca do comportamento do sistema. Esses perfis de estado estacionário estão representados nas Figuras 7.1, 7.2 e 7.3 para flocos com diferentes raios (0,45; 0,80 e 1,20 mm, respectivamente).

Nas Figuras 7.1a, 7.2a e 7.3a comparam-se os perfis obtidos para diferentes concentrações de glucose no meio, variando de 0,1 a 100 g·L⁻¹, como se representa junto das curvas correspondentes. Utilizam-se variáveis adimensionais para permitir a comparação simultânea das várias curvas. Das figuras é manifesto o facto de que a glucose não atinge o centro dos flocos em quantidades apreciáveis quando a concentração no meio é de 1 g·L⁻¹ ou menos (valores comuns em fermentações contínuas), pelo que parte das células estarão privadas deste nutriente. A situação é agravada com o aumento do tamanho dos flocos: enquanto que num floco com 0,45 mm de raio (Figura 7.1a) existe glucose em virtualmente todo o seu volume, num outro com 1,20 mm de raio (Figura 7.3a) aquele substrato está presente em apenas 88 % do volume total.



a)



b)

Figura 7.1: Perfis de concentração para flocos com 0,45 mm de raio: **a)** perfis adimensionais da concentração de glucose; os valores junto às linhas identificam a concentração de glucose no meio a que cada linha corresponde; **b)** perfis da concentração de oxigénio dissolvido; a linha a cheio representa todos os perfis calculados para 10 % da concentração de saturação (correspondendo a 0,1; 0,5; 1 e 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio) e a linha a tracejado representa o perfil calculado para 100 % da concentração de saturação (correspondendo a 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio).

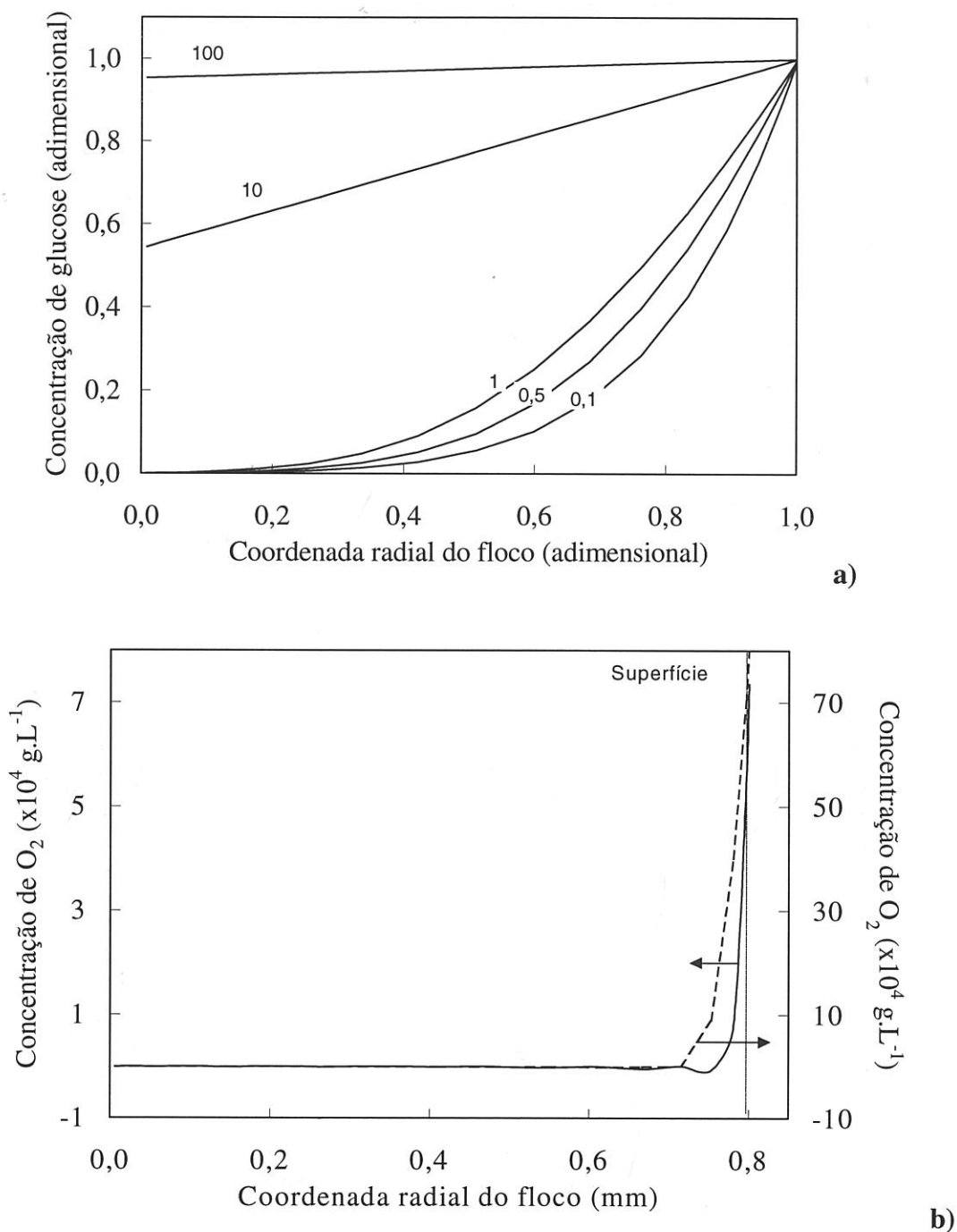
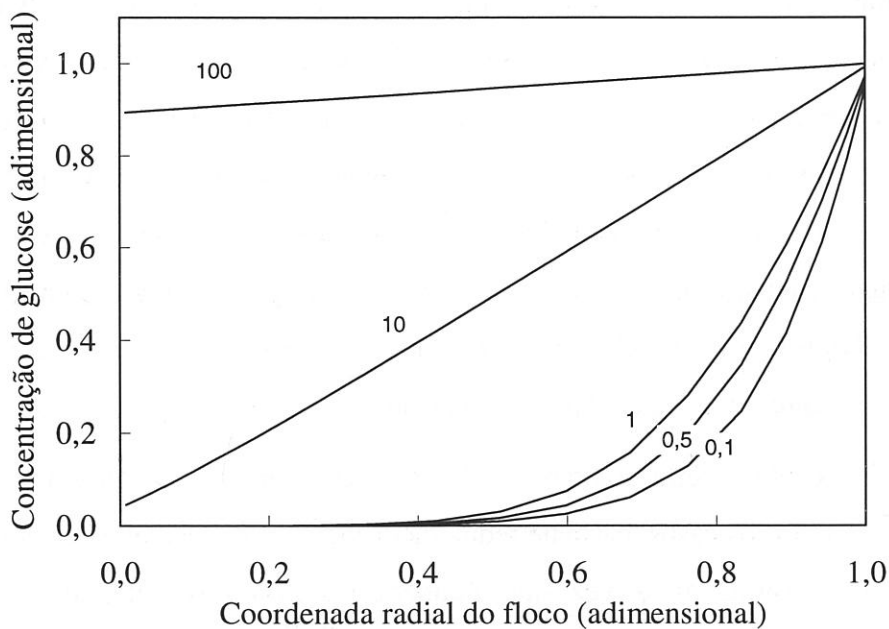
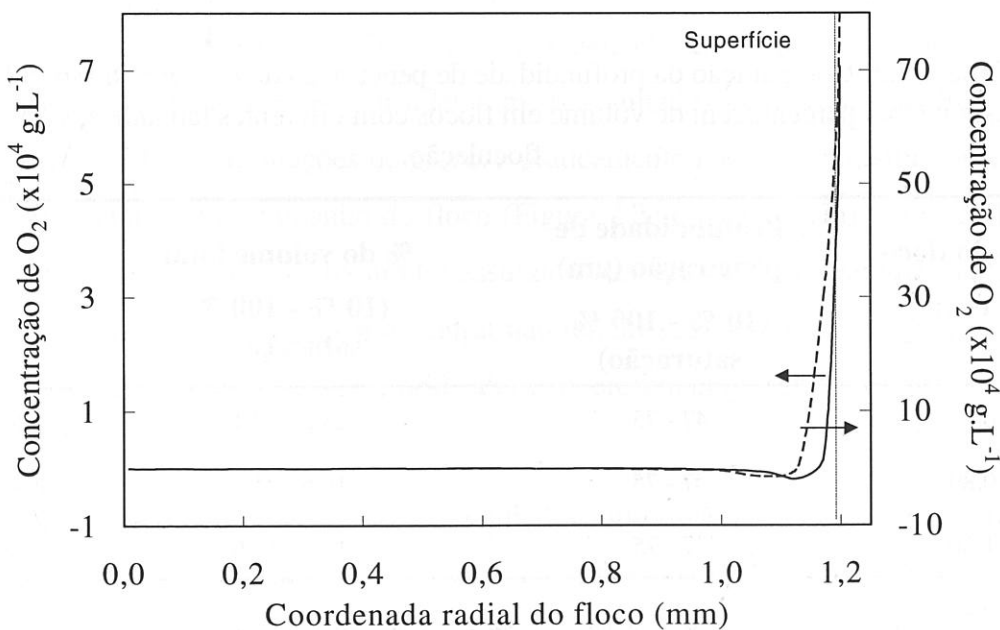


Figura 7.2: Perfis de concentração para flocos com 0,80 mm de raio: **a)** perfis adimensionais da concentração de glucose; os valores junto às linhas identificam a concentração de glucose no meio a que cada linha corresponde; **b)** perfis da concentração de oxigénio dissolvido; a linha a cheio representa todos os perfis calculados para 10 % da concentração de saturação (correspondendo a 0,1; 0,5; 1 e 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio) e a linha a tracejado representa o perfil calculado para 100 % da concentração de saturação (correspondendo a 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose no meio).



a)



b)

Figura 7.3: Perfis de concentração para flocos com 1,20 mm de raio: **a)** perfis adimensionais da concentração de glucose; os valores junto às linhas identificam a concentração de glucose no meio a que cada linha corresponde; **b)** perfis da concentração de oxigénio dissolvido; a linha a cheio representa todos os perfis calculados para 10 % da concentração de saturação (correspondendo a 0,1; 0,5; 1 e 10 g.L⁻¹ de glucose no meio) e a linha a tracejado representa o perfil calculado para 100 % da concentração de saturação (correspondendo a 100 g.L⁻¹ de glucose no meio).

As Figuras 7.1b, 7.2b e 7.3b representam os perfis de oxigénio dissolvido para as mesmas situações descritas acima. Com concentrações de glucose no meio de 0,1, 0,5, 1 e 10 g·L⁻¹, a concentração de oxigénio dissolvido foi mantida a 10 % da concentração de saturação e os respectivos perfis nos flocos correspondem à linha a cheio; de facto, como todos os perfis são praticamente coincidentes, apresenta-se apenas um em cada figura para ilustração. Quando a concentração de glucose no meio atingiu 100 g·L⁻¹, a concentração de oxigénio dissolvido foi aumentada para 100 % da concentração de saturação e o respectivo perfil nos flocos representa-se pela linha a tracejado.

A profundidade de penetração do oxigénio nos flocos depende da concentração deste no meio, sendo, em todos os casos, bastante reduzida (Tabela 7.3) e mantendo-se constante se a concentração não variar, uma vez que também não varia o valor da difusividade. Consequentemente, a percentagem do volume do floco onde o oxigénio está presente diminui significativamente com o aumento do seu tamanho.

Tabela 7.3: Comparação da profundidade de penetração do oxigénio dissolvido e da correspondente percentagem de volume em flocos com diferentes tamanhos, sem aditivo de floculação.

Raio do floco (mm)	Profundidade de penetração (µm) (10 % - 100 % saturação)	% do volume total (10 % - 100 % saturação)	Ref.
0,45	47 - 75	28,2 - 42,1	este trabalho
0,80	47 - 75	16,6 - 25,6	este trabalho
1,20	47 - 75	11,3 - 17,6	este trabalho
0,45	13	8,3 ^a	Sousa <i>et al.</i> 1994a
0,80	11	4,1 ^b	Sousa <i>et al.</i> 1994a

^a 41 % de saturação por O₂ puro.

^b 6.3 % de saturação por O₂ puro.

Os resultados de profundidade de penetração obtidos neste trabalho são cerca de quatro vezes superiores aos que foram apresentados por Sousa *et al.* (1994). As diferenças ao nível do método utilizado para as determinações são muito grandes, tornando difícil a comparação dos valores; estes são, porém, da mesma ordem de grandeza, não tendo sido possível

encontrar outras referências onde este problema tenha sido abordado para permitir uma comparação mais ampla.

As Figuras 7.1 a 7.3 mostram claramente que enquanto que o oxigénio é consumido rapidamente esgotando-se imediatamente abaixo da superfície dos flocos, ainda existe glucose em partes mais interiores. Isto é correcto mesmo para valores baixos de concentração de glucose no meio ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou menos), e tem implicações principalmente no crescimento da biomassa e na produção de etanol, de acordo com o modelo de Sonnleitner e Käppeli (1986). Os valores oscilantes e negativos que se vêem nos gráficos das figuras devem-se exclusivamente ao método de cálculo aplicado e estão directamente relacionados com a determinação dos pesos atribuídos aos pontos de colocação.

De acordo com a experiência prévia, a forma geométrica dos flocos depende em larga medida do seu tamanho; concretamente, flocos com um raio de 0,45 mm são esféricos mas o aumento do tamanho induz uma transformação gradual da forma para a de uma hemácia: um cilindro achatado, mais espesso nos bordos e mais delgado no centro. Estas observações podem agora ser justificadas se se considerarem os resultados deste trabalho. Em flocos pequenos (Figura 7.1a) as limitações de glucose praticamente não existem, situação que se modifica com o aumento do tamanho do floco (Figura 7.2a e Figura 7.3a). Se estes flocos maiores também fossem esféricos (como foi assumido para efectuar estas simulações) então as células que constituíssem a sua parte central não teriam acesso, por exemplo, à glucose. Assim, a forma geométrica “de equilíbrio” entre o crescimento celular e as limitações difusionais crescentes será a atrás descrita.

Acresce o facto de que certamente as condições hidrodinâmicas dentro do bioreactor *airlift* onde os flocos foram produzidos também têm influência na sua forma final, uma vez que não é possível obter flocos com aquela forma se as tensões de corte dentro do reactor devidas à circulação do fluido (como as que existem, por exemplo, num tanque agitado) forem muito elevadas (Vicente e Teixeira 1995).

7.3.2 Simulações com aditivo de floculação

Na Figura 7.4a comparam-se os perfis de concentração de glucose (para diferentes concentrações no meio) em flocos com 0,80 mm de raio sem e com aditivo de floculação (MF). Pode ver-se um aumento notável da concentração de glucose, para cada valor da

coordenada radial e para cada valor de concentração no meio, quando se utiliza o aditivo. Isto deve-se a um aumento de cerca de 20 % na porosidade causado pelo aditivo (Lima *et al.* 1992) e às consequentes alterações no tamanho e estrutura dos poros. De facto, a difusividade efectiva da glucose nos flocos aumenta para o quádruplo quando em presença de MF, o que implica que o açúcar penetre mais profundamente nos flocos (Tabela 7.4), dado que a taxa de consumo da glucose já está no seu valor máximo, que se mantém constante quando em estado estacionário. Porém, o consumo da glucose é afectado pela quantidade de oxigénio dissolvido disponível no meio (Sonnleitner e Käppeli 1986), que, por sua vez, também sofreu alterações devidas à acção de MF.

Tabela 7.4: Profundidade de penetração do oxigénio dissolvido e da correspondente percentagem de volume em flocos com 0,80 mm de raio em presença de MF.

Raio do floco (mm)	Profundidade de penetração (μm) (10 % - 100 % saturação)	% do volume total (10 % - 100 % saturação)	Ref.
0,80	130 - ^a	41,3 - ^a	este trabalho

^a não calculado.

Na Figura 7.4b comparam-se os perfis de concentração de oxigénio dissolvido para as condições estudadas (na presença - linha a tracejado - e na ausência - linha a cheio - de MF), obtidos com uma concentração de oxigénio dissolvido no meio igual a 10 % da concentração de saturação. Tal como aconteceu no caso da glucose, aqueles perfis apresentam diferenças significativas. Pelas mesmas razões, registou-se um aumento da difusividade efectiva do oxigénio nos flocos (oito vezes), pelo que a profundidade de penetração daquele soluto nos flocos também aumentou (cerca de três vezes), ao que correspondeu um aumento do volume de cada floco com oxigénio disponível (de 17 % do volume total na ausência de MF para 41 % na presença de MF, em flocos do mesmo tamanho).

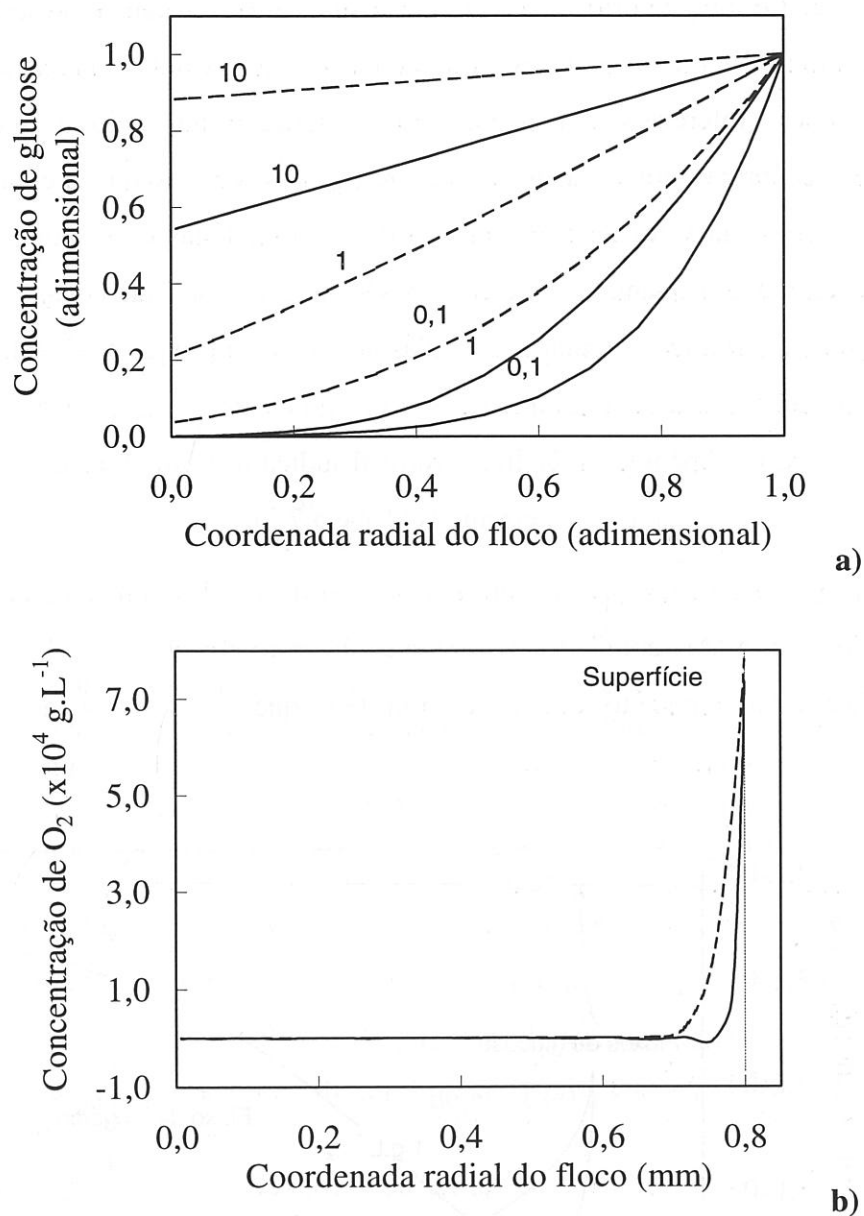


Figura 7.4: Comparação dos perfis de concentração para flocos (raio de 0,80 mm) com (linhas tracejadas) e sem (linhas contínuas) a presença de um aditivo de floculação. **a)** perfis adimensionais da concentração de glucose; os valores junto às linhas identificam a concentração de glucose no meio a que cada linha corresponde; **b)** perfis de concentração de oxigênio dissolvido, para 10 % da concentração de saturação.

7.3.3 Metabolismo nos flocos

A Figura 7.5 e a Figura 7.6 representam os fluxos metabólicos ao longo da coordenada radial, para flocos com um raio de 0,8 mm, na ausência e na presença de MF, respectivamente. A área sombreada corresponde à quantidade relativa de células que

crecem em regime respiratório uma vez que a linha que a limita representa o fluxo de oxigénio dissolvido. As áreas entre esta linha e cada uma das linhas marcadas com valores de concentrações (referentes à concentração de glucose no meio à qual cada linha corresponde) são proporcionais à quantidade relativa de células que crescem em regime fermentativo para cada valor de concentração de glucose. Estas correspondências entre as áreas sob as curvas e a quantidade de células são possíveis apenas considerando válida a hipótese de uma distribuição regular das células nos flocos e porque se incluíram no cálculo das curvas os coeficientes estequiométricos correspondentes à glucose e ao oxigénio tal como se descreve no Apêndice I. A linha vertical indica a profundidade de penetração do oxigénio nos flocos, previamente determinada (Tabela 7.3).

Como já se referiu, apenas um número restrito de células (imediatamente abaixo da superfície do floco) tem condições para metabolizar a glucose por via respiratória ou respiro-fermentativa, enquanto que a maioria tem que recorrer exclusivamente à via fermentativa.

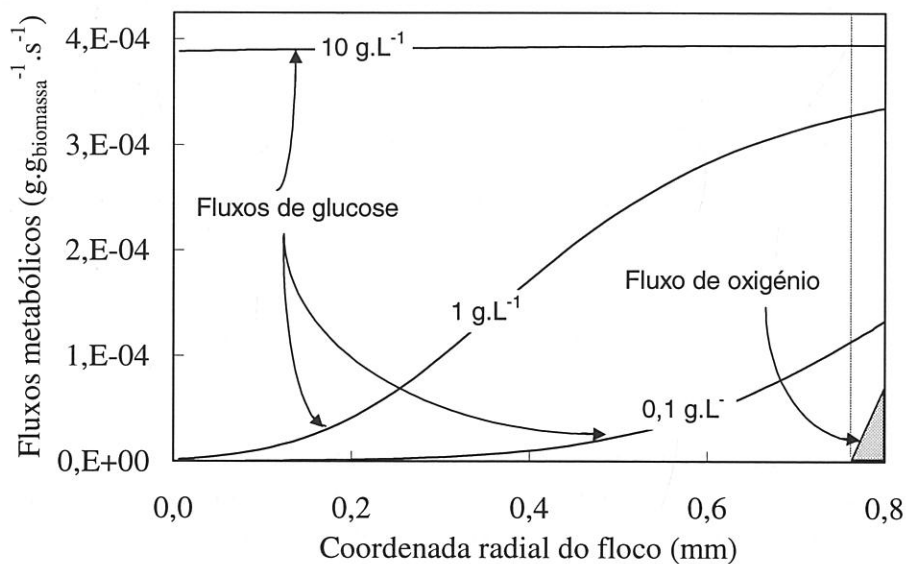


Figura 7.5: Fluxos metabólicos em função da coordenada radial para flocos sem MF. A área sombreada corresponde à quantidade relativa de células a crescer em regime respiratório e as áreas entre as curvas assinaladas com os valores de concentração e a área a sombreado correspondem à quantidade relativa de células a crescer em regime fermentativo. Os valores junto às curvas referem-se à concentração de glucose no meio líquido. A linha vertical corresponde à profundidade de penetração do oxigénio nos flocos.

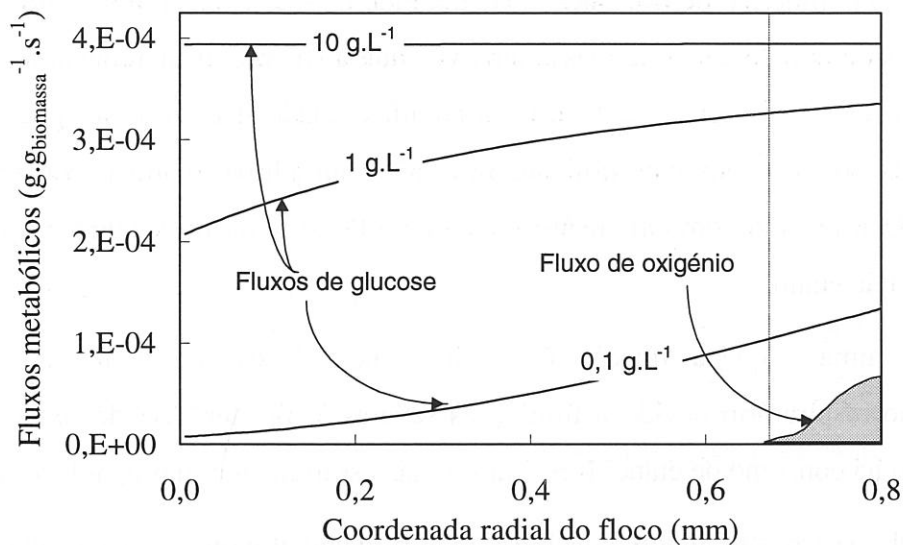


Figura 7.6: Fluxos metabólicos em função da coordenada radial para flocos com MF. A área sombreada corresponde à quantidade relativa de células a crescer em regime respiratório e as áreas entre as curvas assinaladas com os valores de concentração e a área a sombreado correspondem à quantidade relativa de células a crescer em regime fermentativo. Os valores junto às curvas referem-se à concentração de glucose no meio líquido. A linha vertical corresponde à profundidade de penetração do oxigênio nos flocos.

Comparando a Figura 7.5 com a Figura 7.6 pode ver-se claramente que a presença de MF aumenta a percentagem células em metabolismo respiratório (áreas sombreadas): entre 0,4 % ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose) e 5,7 % ($0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose) do total de células quando o aditivo não está presente, para 1,2 % ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose) a 8,5 % ($0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose) em presença do aditivo.

7.4 Conclusões

Apesar das restrições impostas ao modelo, é possível concluir que os substratos (nomeadamente glucose e oxigênio) se tornam limitantes dentro dos flocos devido a restrições significativas ao nível da difusão. Estas limitações vão influenciar a resposta metabólica dos microorganismos e, portanto, o comportamento global do sistema. Os resultados obtidos com as simulações permitiram ainda avançar uma explicação possível para a forma geométrica adoptada pelos flocos.

O aditivo polimérico de floculação (Magna Floc LT-25) exerceu um efeito positivo nas propriedades de transferência de massa uma vez que a sua presença aumentou em cerca de quatro e oito vezes, respectivamente, o valor da difusividade efectiva para a glucose e para o oxigénio nos flocos. É possível, utilizando (ou não) um aditivo polimérico como o Magna Floc LT-25, orientar o comportamento metabólico do sistema no sentido da produção de biomassa ou de etanol.

Apenas uma pequena fracção das células nos flocos metaboliza a glucose por metabolismo respiratório devido a limitações severas à transferência do oxigénio. Assim, também não há consumo de etanol (respiratório, necessariamente) nas condições estudadas.

Estas observações permitem concluir que uma eventual redução do tamanho dos flocos possibilitaria que um maior número de células estivesse em contacto com os substratos dissolvidos no meio. No próximo capítulo este assunto é retomado, aplicando estas conclusões ao melhoramento do projecto do bioreactor *airlift*.

7.5 Bibliografia

- Hamdi, M., 1995. Biofilm Thickness Effect on the Diffusion Limitation in the Bioprocess Reaction: Biofloc Critical Diameter Significance. *Bioprocess Eng.*, 12, 193-197.
- Kuriyama, H., Umeda, T. e Kobayashi, H., 1991. Role of Cations in the Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* and Discrimination of the Corresponding Proteins. *Can. J. Microbiol.*, 37, 397-403.
- Lima, N., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1992. Enhancement of Metabolic Rates of Yeast Flocculent Cells Through the Use of Polymeric Additives. *Bioprocess Eng.*, 7, 343-348.
- Miki, B. L. A., Poon, N. H., James, A. P. e Seligy, V. L., 1992. Possible Mechanisms for Flocculation Interaction Governed by Gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 150, 878-889.
- Mozes, N., Schinckus, L. L., Ghommidh, C., Navarro, J.-M. e Rouxhet, P. G., 1994. Influence of Medium Composition on Surface Properties and Aggregation of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 3, 63-74.
- Perry, R. H. e Chilton, C. H., 1984. *Chemical Engineers Handbook*. 5ª ed. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Rieger, M., Käppeli, O. e Fiechter, A., 1983. The Role of Limited Respiration in the Incomplete Oxidation of Glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 653-661.
- Riley, M. R., Muzzio, F. J. e Buettner, H. M., 1995. Diffusion in Heterogeneous Media: Application to Immobilized Cell Systems. *AIChE J.*, 41, 691-700.
- Riley, M. R., Muzzio, F. J., Buettner, H. M. e Reyes, S. C., 1996. A Simple Correlation for Predicting Effective Diffusivities in Immobilized Cell Systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 223-227.
- Salt, D. E., Bentham, A. C., Hay, S., Idris, A., Gregory, J., Hoare, M. e Dunnill, P., 1996. The Mechanism of Flocculation of a *Saccharomyces cerevisiae* Cell Homogenate using Polyethyleneimine. *Bioprocess Eng.*, 15, 71-76.

- Sonnleitner, B. e Hahnemann, U., 1994. Dynamics of the Respiratory Bottleneck of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 38, 63-79.
- Sonnleitner, B. e Käppeli, O., 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* Is Controlled by Its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 927-937.
- Sousa, M. L., Mota, M. e Teixeira, J. A., 1994a. Influence of Operational Parameters on the Start-up of a Flocculation Airlift Bioreactor. *Col. Surf. B: Biointerfaces*, 2, 181-188.
- Sousa, M. L. e Teixeira, J. A., 1991. Reduction of Diffusional Limitations in Yeast Floccs. *Biotechnol. Lett.*, 13, 883-888.
- Sousa, M. L. e Teixeira, J. A., 1996. Characterization of Oxygen Uptake and Mass Transfer in Flocculent Yeast Cell Cultures with or without a Flocculation Additive. *Biotechnol. Lett.*, 18, 229-234.
- Sousa, M. L., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1994b. Comparative Analysis of Ethanol Fermentation in Two Continuous Flocculation Bioreactors and Effect of Flocculation Additive. *Bioprocess Eng.*, 11, 83-90.
- Vicente, A. A. e Teixeira, J. A., 1995. Hydrodynamic Performance of a Three-Phase Airlift Bioreactor with an Enlarged Degassing Zone. *Bioprocess Eng.*, 14, 17-22.
- Villadsen, J. e Michelsen, M. L., 1975. *Solution of Differential Equation Models by Polynomial Approximation*. 2nd ed. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice-Hall.
- Webster, I. A., 1981. Criteria for the Prediction of Diffusional Control within Whole Cells and Cell Floccs. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 31, 178-182.
- Weir, S., Ramsden, D. K., Hughes, J. e Le Thomas, F., 1994. The Strength of Yeast Floccs Produced by the Cationic Flocculant Chitosan: Effect of Suspension Medium and of Pretreatment with Anionic Polyelectrolytes. *Biotechnol. Tech.*, 8, 129-132.

8. Melhoramento do desempenho do bioreactor: alteração do projecto do tubo interno

Sumário

A introdução de agitadores estáticos no tubo interno do bioreactor *airlift* permite aumentar significativamente a produtividade do sistema em etanol durante a fermentação de glucose pela estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae*. A principal função dos agitadores consiste em diminuir o tamanho médio dos flocos, quando comparado com o do sistema original, reduzindo as limitações difusionais a que estes estão sujeitos.

Neste capítulo comparam-se os resultados obtidos com ambos os sistemas, em estado estacionário, para várias taxas de diluição, em termos de taxas específicas de consumo de glucose e de produção de etanol e da produtividade em etanol. Nos cálculos, utilizam-se conceitos de catálise heterogénea que permitem considerar a presença de flocos porosos.

8.1 Introdução

Ao utilizar sistemas a operar em contínuo é possível obter produtividades mais elevadas e, simultaneamente, menores custos de manutenção, do que com sistemas descontínuos ou semi-contínuos (Chen *et al.* 1987, Gyamerah e Glover 1996, Sousa *et al.* 1994a e Šmogrovicová *et al.* 1997).

Os sistemas de alta densidade celular possibilitam melhorar o desempenho dos processos onde são utilizados (Lima *et al.* 1992, Roca *et al.* 1995 e Sousa *et al.* 1994b), empregando, por exemplo, organismos floculantes (Kuriyama *et al.* 1993 e Vicente *et al.* 1997). No entanto, os flocos resultantes da agregação de células individuais apresentam algumas desvantagens quando comparados com as células em suspensão. De facto, já nos Capítulos 6 e 7 se pôde concluir que existem limitações difusionais nos flocos em relação a substratos importantes como a glucose e o oxigénio, problema que se agrava significativamente com o aumento do tamanho dos agregados (Hamdi 1995, Pereboom *et al.* 1990 e Sousa e Teixeira 1991). Assim, espera-se um impacto no metabolismo das células que constituem os flocos (principalmente as que estão situadas nas camadas mais interiores) que condicionará o resultado de todo o processo em termos, por exemplo, das produtividades em biomassa e etanol.

O controlo do tamanho dos flocos permite obter uma maior eficiência: os flocos de menor tamanho, embora mantendo as características de sedimentação que possibilitam a manutenção de uma concentração elevada de biomassa dentro do bioreactor, reduzem os problemas difusionais (Ananta *et al.* 1995). Então, para a mesma quantidade de biomassa, uma redução do tamanho dos flocos traduz-se num maior número de células que são facilmente alcançáveis pelos nutrientes existentes no meio líquido, o que se traduz por um aumento da conversão do(s) substrato(s).

No trabalho que aqui se apresenta o tubo interno do bioreactor *airlift* é alterado por introdução de agitadores estáticos, com o objectivo de reduzir o tamanho médio dos flocos da estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* que tem vindo a ser utilizada ao longo desta tese, sem todavia prejudicar a capacidade de retenção de células do sistema. Esta alteração tem como objectivo aumentar a produtividade do sistema em etanol por redução

das limitações resultantes da utilização de flocos. Obtiveram-se dados em estados estacionários sucessivos (correspondentes a várias taxas de diluição) que se compararam com os que foram obtidos no sistema original (ainda sem a alteração do tubo interno) (Sousa *et al.* 1994b).

8.2 Descrição experimental

Neste trabalho utilizam-se flocos pertencentes à estirpe *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y265 cultivada em contínuo no bioreactor *airlift* (ver capítulo 3), com taxas de diluição entre 0,03 e 0,40 h⁻¹ e com taxas de arejamento entre 0,15 e 1,32 v.v.m.

As concentrações de glucose e etanol determinam-se por HPLC, a quantificação da biomassa faz-se por leitura da densidade óptica, a determinação da viabilidade celular efectua-se recorrendo à coloração com azul de metileno, os gases de saída são analisados por espectrometria de massa e a massa específica dos flocos (ρ_f) determina-se por picnometria (Atkinson 1974), obtendo-se um valor médio de 1033 kg·m⁻³. Todos estes métodos se encontram descritos no capítulo 3.

8.2.1 Alteração do desenho do tubo interno

O novo tubo interno tem o mesmo diâmetro (3,2 cm) e altura (48 cm) que o original, mas introduziram-se seis agitadores estáticos, distribuindo-os regularmente ao longo do eixo, sendo o primeiro colocado 5 cm acima do extremo inferior e o último exactamente no extremo superior do tubo. As suas posições relativas estão estudadas por forma a minimizar a formação de canais preferenciais para o fluxo das fases líquida e gasosa (Figura 8.1). A principal função destes agitadores é aumentar as tensões de corte no tubo interno do bioreactor *airlift* por forma a diminuir o tamanho médio dos flocos, melhorando simultaneamente a mistura e a transferência de massa.

8.2.2 Identificação da ocorrência de um estado estacionário

A ocorrência de um estado estacionário confirma-se pela constância do valor de oxigénio dissolvido no meio, em simultâneo com a manutenção da composição do gás de saída e da concentração residual de glucose no efluente (com uma densidade - ρ_l - de cerca de 1000 kg·m⁻³), cujo valor não deve ultrapassar os 3 g·L⁻¹ (Sousa *et al.* 1994b). Este valor

corresponde a uma conversão da glucose maior que 98 %. As amostras para as análises à glucose, ao etanol, à biomassa, à viabilidade celular e ao efluente gasoso são retiradas apenas depois de se confirmar a obtenção de um estado estacionário.

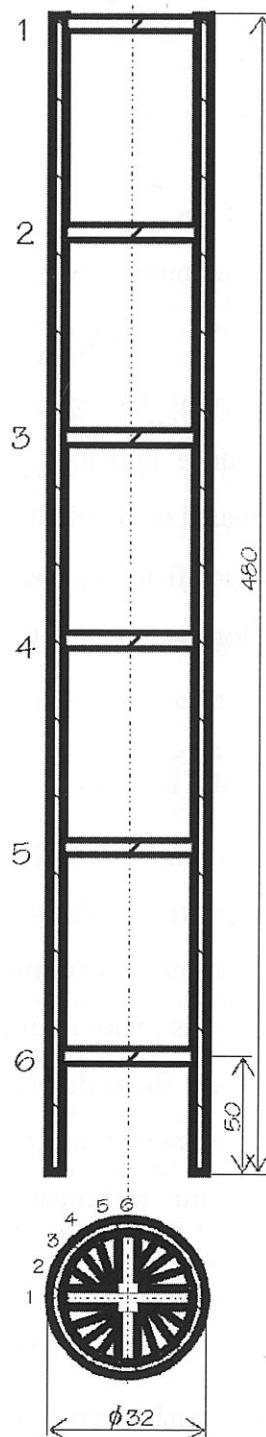


Figura 8.1: Esquema da colocação dos agitadores estáticos no interior do tubo interno modificado.

8.2.3 Análise de um estado estacionário

Ao efectuar a análise de um estado estacionário utilizam-se conceitos de catálise heterogénea, que permitem uma maior aproximação à realidade. De facto este sistema, contendo flocos de levedura porosos em suspensão num meio líquido, assemelha-se bastante a um reactor catalítico com partículas de um catalisador poroso. Assim, para calcular as taxas de consumo de substrato (q_S) e de oxigénio (q_O) e as taxas de produção de etanol (q_E) e de dióxido de carbono (q_C), é necessário impor restrições e definir algumas variáveis:

- uma vez que as amostras são retiradas com o sistema já em estado estacionário, os termos de acumulação nos balanços mássicos são nulos e, portanto, não se apresentam;
- a glucose atinge todas as células que fazem parte dos flocos;
- a alimentação ao reactor não contém etanol nem biomassa ($E_{ent} = X_{ent} = 0$);
- o caudal de entrada é igual ao caudal de saída ($\dot{Q}_{ent} = \dot{Q}_{sai} = \dot{Q}$);
- a taxa de diluição é definida como:

$$\dot{D} = \dot{Q}/V_R \quad (8.1)$$

onde V_R é o volume útil do reactor;

- a soma das fracções gasosa (ε_g), líquida (ε_l) e sólida (ε_s), no reactor, é igual à unidade:

$$\varepsilon_g + \varepsilon_l + \varepsilon_s = 1 \quad (8.2);$$

- não há reacção nos poros dos flocos, onde apenas está presente a fase líquida;
- a reacção tem lugar apenas no volume V_r , correspondente ao volume ocupado pelas células nos flocos:

$$V_r = (1 - \varepsilon_p) \cdot \varepsilon_s \cdot V_R \quad (8.3)$$

onde a porosidade dos flocos (ε_p) se considera igual a 0,5 (Teixeira e Mota 1990);

- a fracção sólida (correspondente aos flocos) no reactor (ε_s) pode escrever-se (ver Apêndice II):

$$\varepsilon_s = \frac{u \cdot C_X}{(\rho_f - \varepsilon_p \cdot \rho_l)} \quad (8.4)$$

onde u é a razão entre a massa total de uma célula e o seu peso seco, C_X é a concentração de biomassa total no meio, ρ_f é a massa específica dos flocos e ρ_l é a massa específica do meio líquido.

- a velocidade de reacção para o componente i é:

$$(-) r_i = q_i \cdot C_{Xv} \quad (8.5)$$

onde os sinais positivo e negativo correspondem, respectivamente, à produção e ao consumo do componente i , q_i é a taxa específica de consumo/produção do componente i e C_{Xv} é a concentração de biomassa viável no meio.

O balanço mássico para o substrato (glucose) é:

$$\dot{Q}_{ent} \cdot C_{S,ent} + (-r_S) \cdot V_r = \dot{Q}_{sai} \cdot C_{S,sai} \quad (8.6)$$

onde $(-r_S)$ inclui o consumo de substrato quer pela via respiratória quer pela via fermentativa e $C_{S,ent}$ e $C_{S,sai}$ são as concentrações de substrato à entrada e à saída.

Substituindo as eqs. (8.4) e (8.5) na eq. (8.6), obtém-se a taxa específica de consumo de substrato (q_S):

$$q_S = \frac{1}{(1 - \varepsilon_p)} \frac{(\rho_f - \varepsilon_p \cdot \rho_l)}{C_{Xv}} \frac{\dot{D}}{u \cdot C_X} (C_{S,ent} - C_{S,sai}) \quad (8.7)$$

O balanço mássico para o produto (etanol) é:

$$\dot{Q}_{ent} \cdot C_{E,ent} + r_E \cdot V_r = \dot{Q}_{sai} \cdot C_{E,sai} \quad (8.8)$$

onde r_E inclui a produção de etanol pela via fermentativa e o consumo de etanol pela via respiratória, sendo $C_{E,ent}$ e $C_{E,sai}$ as concentrações de etanol no meio líquido à entrada e à saída.

Substituindo as eqs. (8.4) e (8.5) na eq. (8.8), obtém-se a taxa específica de consumo/produção de etanol (q_E):

$$q_E = \frac{1}{(1-\varepsilon_p)} \frac{(\rho_f - \varepsilon_p \cdot \rho_l)}{C_{X_v}} \frac{\dot{D}}{u \cdot C_X} \cdot C_{E,sai} \quad (8.9)$$

O balanço mássico ao oxigénio pode escrever-se:

$$\dot{G}_{ent} \cdot O_{ent} + (-r_O) \cdot V_r = \dot{G}_{sai} \cdot O_{sai} \quad (8.10)$$

onde $(-r_O)$ inclui o consumo de oxigénio em todos os processos respiratórios que possam ocorrer no sistema e O_{ent} e O_{sai} são as concentrações de oxigénio nos gases de entrada e de saída.

Substituindo as eqs. (8.4) e (8.5) na eq. (8.10), obtém-se a taxa específica de consumo de oxigénio (q_O):

$$q_O = \frac{1}{(1-\varepsilon_p)} \frac{(\rho_f - \varepsilon_p \cdot \rho_l)}{C_{X_v}} \frac{1}{u \cdot C_X \cdot V_R} (\dot{G}_{sai} \cdot O_{sai} - \dot{G}_{ent} \cdot O_{ent}) \quad (8.11)$$

O balanço mássico para o dióxido de carbono pode escrever-se:

$$\dot{G}_{ent} \cdot CO_{ent} + r_C \cdot V_r = \dot{G}_{sai} \cdot CO_{sai} \quad (8.12)$$

onde r_C se refere a toda a produção de dióxido de carbono, sendo CO_{ent} e CO_{sai} as concentrações de dióxido de carbono nos gases de entrada e de saída.

Substituindo as eqs. (8.4) e (8.5) na eq. (8.12), obtém-se a taxa específica de produção de dióxido de carbono (q_C):

$$q_C = \frac{1}{(1-\varepsilon_p)} \frac{(\rho_f - \varepsilon_p \cdot \rho_l)}{C_{X_v}} \frac{1}{u \cdot C_X \cdot V_R} (\dot{G}_{sai} \cdot CO_{sai} - \dot{G}_{ent} \cdot CO_{ent}) \quad (8.13).$$

8.3 Resultados e discussão

Foi feita uma alteração no desenho do tubo interno do bioreactor *airlift*, introduzindo agitadores estáticos, para investigar os efeitos que as mudanças nas características de fluxo e nas tensões de corte têm no rendimento de uma fermentação com uma levedura floculante. Esta alteração permitiu a formação de flocos visivelmente mais pequenos quando comparados com os que se formam no sistema original. Naqueles, as limitações difusionais não são tão importantes como em flocos maiores, como se concluiu nos dois capítulos anteriores, o que é particularmente importante quando se considera a concentração de substratos como a glucose e o oxigénio dissolvido (frequentemente limitante) e de produtos como o etanol (por exemplo, concentrações elevadas deste metabolito dentro dos flocos, devidas a limitações à sua difusão para fora dos agregados, podem inibir a continuação da sua produção pelas células).

As amostras para análise são retiradas quando se confirma a ocorrência de um estado *pseudo*-estacionário (*pseudo* porque a concentração de biomassa - e apenas esta - não se mantém constante mas oscila em torno de um valor médio, observação que já tinha sido feita em sistemas semelhantes (Sousa 1994)).

A Figura 8.2 mostra a evolução das concentrações de glucose, etanol e biomassa viável no meio em função da taxa de diluição em estado *pseudo*-estacionário. A concentração da glucose no meio mantém-se abaixo de $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, correspondendo a conversões muito próximas de 100 % (> 98 %), até a uma taxa de diluição de $0,34 \text{ h}^{-1}$. Para a taxa de diluição mais elevada ($0,40 \text{ h}^{-1}$), apesar de não ocorrer a lavagem do bioreactor, a conversão da glucose diminui, correspondendo ao aumento da concentração daquele substrato no efluente líquido. Os resultados aqui obtidos estão em concordância com os que foram apresentados por Sousa *et al.* (1994b), onde foi possível manter a concentração de glucose à saída abaixo de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ apenas até uma taxa de diluição de $0,25 \text{ h}^{-1}$, a partir da qual aquele valor de concentração aumentou.

A concentração de biomassa viável no meio aumenta linearmente com a taxa de diluição (\dot{D}) até ao valor máximo de $\dot{D} = 0,40 \text{ h}^{-1}$; valores mais elevados de \dot{D} provocam a lavagem do reactor. A concentração de biomassa total atinge um valor de $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com a

viabilidade a variar entre 52 e 92 %, enquanto que no sistema original foi obtida uma concentração de biomassa total de cerca de $78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

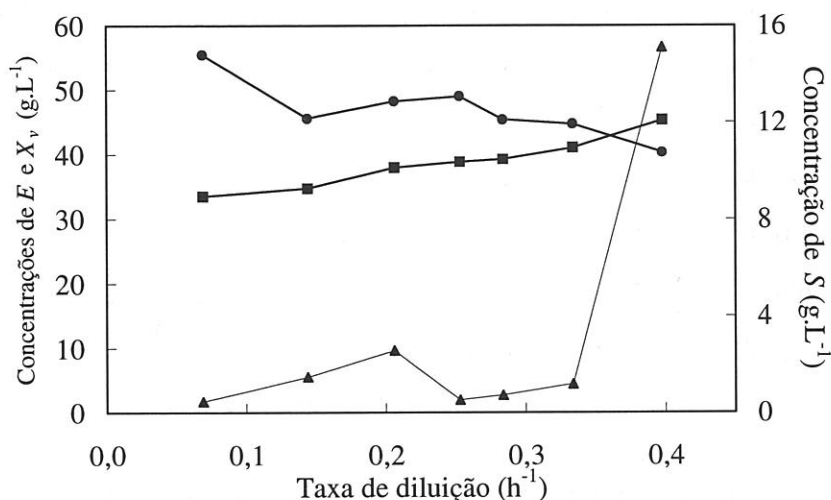


Figura 8.2: Evolução das concentrações de glucose (▲), etanol (●) e biomassa viável (■) no meio em função da taxa de diluição em estado *pseudo*-estacionário.

Deve salientar-se que, devido ao menor tamanho dos flocos no sistema modificado, os caudais de arejamento necessários para manter em circulação a fase sólida são também menores do que no sistema original. Caudais de arejamento elevados juntamente com taxas de diluição também elevadas podem provocar a lavagem de bioreactores do tipo *airlift*; esta é, provavelmente, e juntamente com a melhoria do comportamento do sistema em termos de transferência de massa, uma das principais razões pelas quais é possível atingir taxas de diluição mais elevadas no sistema modificado sem a ocorrência da lavagem do reactor.

A concentração de etanol no meio regista uma diminuição ligeira com a taxa de diluição, oscilando em torno de um valor médio de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e atingindo um máximo de $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Fontana *et al.* (1992) obtiveram concentrações de etanol no efluente de cerca de $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ num bioreactor de alta densidade celular com uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae*.

A progressão da taxa específica de consumo de oxigénio e da taxa específica de produção de dióxido de carbono com a taxa de diluição está representada na Figura 8.3. A diferença significativa entre q_C e q_O indica que o metabolismo é sobretudo fermentativo.

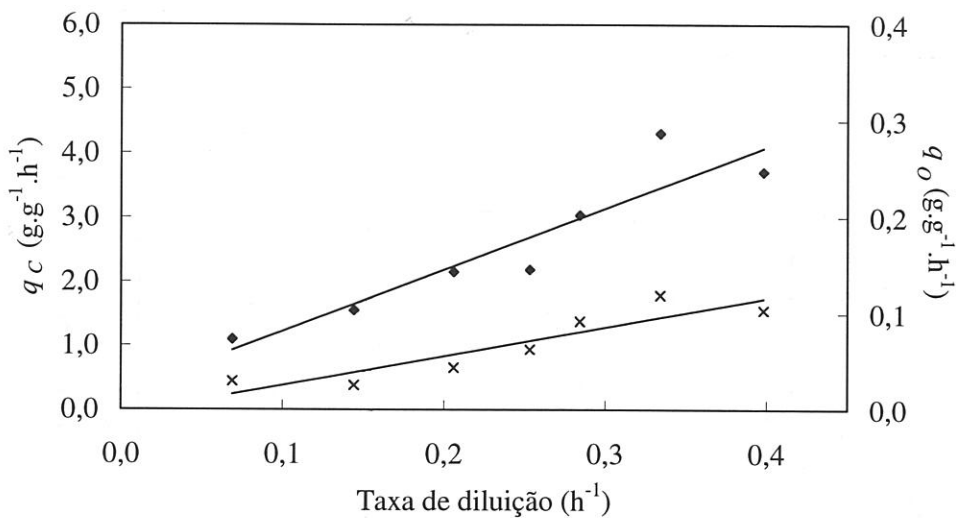


Figura 8.3: Evolução das taxas específicas de consumo de oxigénio (×) e de produção de dióxido de carbono (◆) com a taxa de diluição em estado *pseudo*-estacionário.

Como pode ver-se, quer q_C quer q_O são bem ajustados por uma regressão linear, o que significa que a razão dos declives obtidos é uma constante. Como essa razão é proporcional ao quociente respiratório, este é também constante (com um valor de cerca de 23), o que significa que o estado metabólico das células viáveis nos flocos se manteve constante para todas as taxas de diluição e para as condições operacionais utilizadas.

Conforme se indica na eq. (8.5) a viabilidade celular está incluída nos cálculos das taxas específicas de consumo/produção. É normal assumir-se que toda a biomassa é viável, mas neste trabalho essa aproximação não seria razoável (viabilidade entre 52 e 92 %), pois poderia introduzir um erro apreciável nas taxas de reacção calculadas.

Na Figura 8.4 comparam-se as taxas específicas de consumo de glucose e de produção de etanol obtidas com o sistema modificado (q_S e q_E) e com o sistema original (q_S' e q_E') (Sousa *et al.* 1994b). Os valores de q_S são duas vezes mais elevados do que os de q_S' e os valores de q_E são 1,5 vezes mais elevados do que os de q_E' . Mesmo utilizando a biomassa total (em lugar da biomassa viável) nos cálculos das taxas específicas, registar-se-iam aumentos de, pelo menos, 50 a 60 %. Uma outra diferença já foi referida e diz respeito aos valores máximos da taxa de diluição atingidos sem a ocorrência da lavagem do reactor: 0,25 h⁻¹ no sistema original e 0,40 h⁻¹ no sistema modificado, o que constitui um contributo suplementar para o aumento das taxas específicas de consumo/produção do sistema.

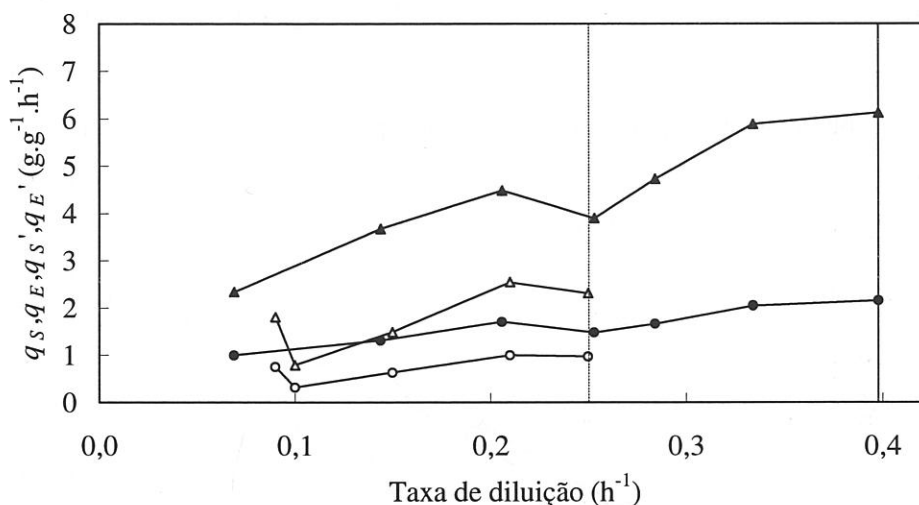


Figura 8.4: Comparação entre as taxas específicas de consumo de glicose (Δ , \blacktriangle) e de produção de etanol (\circ , \bullet) obtidas com o sistema original (símbolos vazios) e com o sistema modificado (símbolos a cheio) em função da taxa de diluição. As linhas verticais indicam a taxa de diluição máxima obtida em cada caso (linha a tracejado para o sistema original e linha contínua para o sistema modificado).

Como pode verificar-se na Figura 8.5, a produtividade em etanol antes e depois da alteração do tubo interno é similar até ao ponto em que se atinge a taxa de diluição máxima do sistema original. Porém, no sistema modificado, é possível obter um aumento da produtividade em etanol devido à possibilidade de trabalhar a uma taxa de diluição mais elevada, como atrás se referiu. Além disso, tal como foi definida aqui, a taxa de diluição (\dot{D}) está calculada por volume de reactor; no entanto, e devido à elevada fracção de sólidos existente no reactor, o volume de líquido é, de facto, bastante inferior a V_R , pelo que uma taxa de diluição calculada apenas em função do volume de líquido seria ainda mais elevada.

8.4 Conclusões

A alteração efectuada no tubo interno do bioreactor *airlift* reduziu o tamanho médio dos flocos de levedura e permitiu atingir taxas de diluição mais elevadas com conversão praticamente total e produtividades também mais elevadas.

A redução do tamanho dos flocos minorou as limitações difusionais, contribuindo assim para o aumento do valor das taxas específicas de consumo/produção do sistema. Por seu lado, o aumento da taxa de diluição máxima (cerca de 30 %) conduziu a maiores

produtividades. A operação do sistema a taxas de diluição mais elevadas tem ainda a vantagem de o tornar menos susceptível a contaminações por outros microorganismos, que seriam rapidamente arrastados para fora do bioreactor juntamente com o efluente.

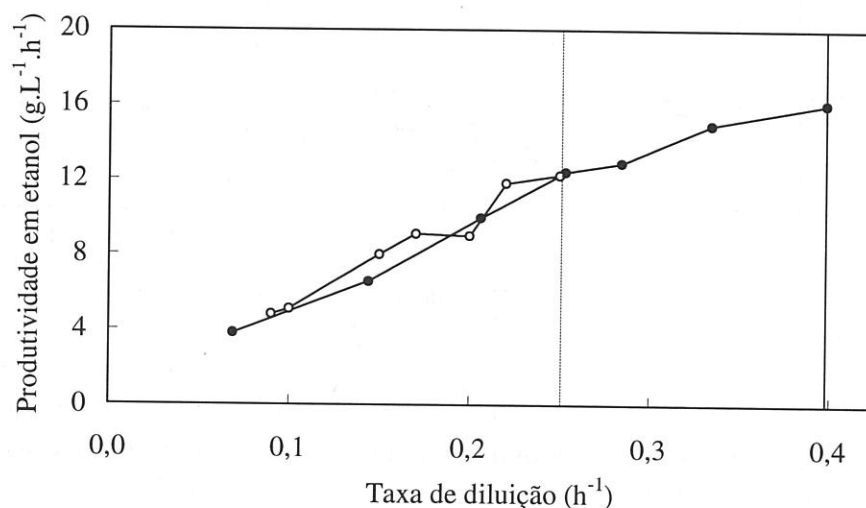


Figura 8.5: Comparação entre a produtividade em etanol obtida com o sistema original (O) e com o sistema modificado (●) em função da taxa de diluição. As linhas verticais indicam a taxa de diluição máxima obtida em cada caso (linha a tracejado para o sistema original e linha contínua para o sistema modificado).

É aconselhável, em sistemas de alta densidade celular como o que aqui se utiliza, considerar que as reacções se dão apenas no volume ocupado pelas células nos flocos e não em todo o volume do reactor, uma vez que para este tipo de sistemas esta aproximação é bastante grosseira, podendo conduzir a resultados erróneos.

8.5 Bibliografia

- Ananta, I., Subroto, M. A. e Doran, P. M., 1995. Oxygen Transfer and Culture Characteristics of Self-Immobilized *Solanum aviculare* Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 541-549.
- Atkinson, P., 1974. *Biochemical Reactors*. London: Pion, Ltd.
- Chen, N. Y., Kondis, E. F. e Srinivasan, S., 1987. Low Pressure Airlift Fermenter for Single Cell Protein Production: I. Design and Oxygen Transfer Studies. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 414-420.
- Fontana, A., Ghommidh, C., Guiraud, J. P. e Navarro, J. M., 1992. Continuous Alcoholic Fermentation of Sucrose Using Flocculating Yeast. The Limits of Invertase Activity. *Biotechnol. Lett.*, 14, 505-510.
- Gyamerah, M. e Glover, J., 1996. Production of Ethanol by Continuous Fermentation and Liquid-Liquid Extraction. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 66, 145-152.
- Hamdi, M., 1995. Biofilm Thickness Effect on the Diffusion Limitation in the Bioprocess Reaction: Biofloc Critical Diameter Significance. *Bioprocess Eng.*, 12, 193-197.

- Kuriyama, H., Ishibashi, H., Miyagawa, H., Kobayashi, H. e Eiichi, M., 1993. Optimization of Two-Stage Continuous Ethanol Fermentation Using Flocculating Yeast. *Biotechnol. Lett.*, 15, 415-420.
- Lima, N., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1992. Enhancement of Metabolic Rates of Yeast Flocculent Cells Through the Use of Polimeric Additives. *Bioprocess Eng.*, 7, 343-348.
- Pereboom, J. H. F., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S. S. P., Huisman, J. W. e de Beer, D., 1990. Physical Transport Phenomena in Aggregated Microbial Systems. In: H. Breteler, R. F. Beuker and K. Ch. A. M. Luyben, eds. *Proceedings 3rd. Netherlands Biotechnology Congress 1990, Part II, Amsterdam 4th April 1990*.
- Roca, E., Cameselle, C., Núñez, M. J. e Lema, J. M., 1995. Continuous Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in Ca-Alginate Beads Hardened with Al³⁺. *Biotechnol. Tech.*, 9, 815-820.
- Šmogrovicová, D., Dömény, Z., Gemeiner, P., Malovíková, A. e Šturdík, E., 1997. Reactors for Continuous Primary Beer Fermentation using Immobilized Yeast. *Biotechnol. Tech.*, 11, 261-264.
- Sousa, M. L. M., 1994. Dissertação de Doutoramento: *Estudo e Desenvolvimento de Bioreactores de Floculação*. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Sousa, M. L., Mota, M. e Teixeira, J. A., 1994a. Influence of Operational Parameters on the Start-up of a Flocculation Airlift Bioreactor. *Col. Surf. B: Biointerfaces*, 2, 181-188.
- Sousa, M. L. e Teixeira, J. A., 1991. Reduction of Diffusional Limitations in Yeast Floccs. *Biotechnol. Lett.*, 13, 883-888.
- Sousa, M. L., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1994b. Comparative Analysis of Ethanolic Fermentation in Two Continuous Flocculation Bioreactors and Effect of Flocculation Additive. *Bioprocess Eng.*, 11, 83-90.
- Teixeira, J. A. e Mota, M., 1990. Experimental Assessment of Internal Diffusion Limitations in Yeast Floccs. *Chem. Eng. J.*, 43, B13-B17.
- Vicente, A. A., Dluhý, M. e Teixeira, J. A., 1997. A New Technique for Measuring Kinetic and Mass Transfer Parameters in Floccs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Tech.*, 11, 113-116.

9. Estimação em linha da biomassa a partir do consumo do reagente de controlo de pH

Sumário

Recentemente, a quantidade de reagente de controlo de pH (ácido ou base) consumido em fermentações com leveduras foi relacionada com a via metabólica de assimilação do azoto utilizada, em condições respiratórias, não havendo contribuição para o consumo daquele reagente por parte do metabolismo do carbono (Castrillo *et al.* 1995).

Neste trabalho fazem-se experiências em condições respiro-fermentativas que mostram que a produção/consumo de etanol não contribui significativamente para a taxa específica de produção de prótons (qH^+), sendo possível estender as relações previamente obtidas a todos os tipos de metabolismo, desde que não existam outras contribuições de partículas ácidas ou básicas. Testes efectuados em contínuo e descontínuo confirmam a validade de qH^+ como parâmetro de controlo em fermentações aeróbias.

9.1 Introdução

Uma vez optimizado o desenho do bioreactor *airlift* para operar com leveduras floculantes e melhorada a produtividade do sistema em consequência dos estudos desenvolvidos em torno dos flocos de levedura, faz-se agora uma incursão no tema da monitorização de fermentações, nomeadamente no que respeita à determinação da concentração de biomassa no bioreactor.

A concentração de biomassa é uma variável básica em qualquer processo fermentativo. Assim, é desejável o desenvolvimento de procedimentos simples e fiáveis para a sua estimação em linha, particularmente em fermentações de *Saccharomyces cerevisiae* (Larsson *et al.* 1993, Postma *et al.* 1989 e Verduyn *et al.* 1992), utilizadas em larga escala pela indústria como fonte de uma grande variedade de produtos (van Gulik e Heijnen 1985, Ohta *et al.* 1993 e Sousa *et al.* 1994).

Já no passado se apresentaram provas experimentais da existência de uma relação directa entre a produção de protões e o crescimento celular (Huth *et al.* 1990a,b,c, Roos e Luckner 1984); por outro lado, a quantidade de equivalentes de ácido ou base consumidos pela cultura por unidade de tempo tem sido utilizada para o controlo em linha de processos fermentativos (Ishizaki *et al.* 1994, Iversen *et al.* 1994, Pons *et al.* 1989, San e Stephanopoulos 1984, Shioya 1989 e Siano 1995). No entanto, a maioria dos estudos tem-se restringido ao estabelecimento de relações empíricas, obviamente válidas apenas nos sistemas em estudo, enquanto que a base fisiológica para os modelos propostos permanece por esclarecer.

Muitos dos estudos em que se observaram mudanças no pH do meio associadas ao crescimento apontam a actividade metabólica como sendo a causa principal da troca de protões entre o meio e as células (Huth *et al.* 1990a,b,c, Kotyk 1989 e Sigler e Höfer 1991). Estas observações foram confirmadas num trabalho mais recente onde, após uma determinação rigorosa da taxa específica de produção de protões (qH^+), se concluiu ser a via de assimilação de azoto a principal responsável pelas alterações ao pH do meio quando as células se encontram em metabolismo respiratório (Castrillo *et al.* 1995).

O objectivo deste trabalho é verificar a aplicabilidade deste modelo ao caso mais geral de metabolismo respiro-fermentativo, com produção e consumo de etanol.

9.2 Descrição experimental

Neste trabalho utilizou-se a estirpe não floculante *Saccharomyces cerevisiae* CBS 7336 (ATCC 32167), cultivada no bioreactor do tipo tanque agitado. A cultura foi efectuada segundo as condições descritas no capítulo 3 para aquela estirpe, quer em contínuo quer em descontínuo.

9.2.1 Determinação da taxa específica de produção de protões (qH^+)

O procedimento para a medição da taxa específica de produção de protões (qH^+ , $\text{meqH}^+ \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) em condições tais que permitem desprezar a formação de compostos ácidos/básicos foi descrito detalhadamente por Castrillo *et al.* (1995). Em resumo, consiste na medição do volume (ou massa) de ácido/base consumido pela cultura (correspondente à quantidade de ácido/base necessária para manter o pH do meio) durante um tempo determinado que, conjuntamente com um balanço mássico aos protões no meio de fermentação, permitirá a determinação rigorosa da taxa específica de consumo/produção de protões pelas células. Esse volume regista-se ao longo do tempo, dando origem a gráficos como o que se apresenta na Figura 9.1, neste caso para a utilização de ácido sulfúrico como reagente de controlo de pH.

9.2.2 Detecção de reacções laterais passíveis de interferir com a determinação de qH^+

A utilização de meios complexos ou de condições favoráveis ao aparecimento de amónia (por exemplo, degradação dos compostos azotados presentes no meio ou desequilíbrios metabólicos que resultem na excreção de amónia por parte das células (Phaff *et al.* 1978)) podem resultar em contribuições indesejáveis para o cálculo de qH^+ , afectando a sua exactidão. Estas contribuições podem ser determinadas (e, portanto, descontadas ao resultado final) fazendo o balanço mássico à amónia no meio de fermentação e determinando, em seguida, a taxa específica de formação de amónia (qNH_3 , $\text{meqNH}_3 \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

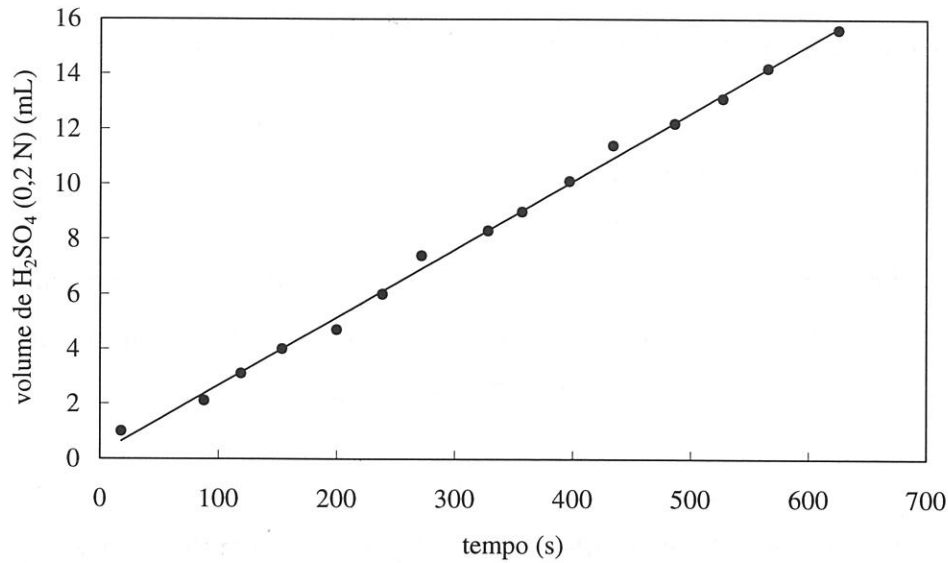


Figura 9.1: Quantidade de ácido necessária para manter constante o pH *versus* tempo, numa fermentação em contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* com glucose como fonte de carbono.

O balanço mássico para NH_3 no volume do reactor é:

$$V_R \cdot \frac{d(C_{\text{NH}_3})}{dt} = F_L \cdot (C_{\text{NH}_3, \text{ent}} - C_{\text{NH}_3, \text{sai}}) + F_{\text{NH}_3} \quad (9.1)$$

onde V_R é o volume útil do reactor, F_L é o caudal de meio alimentado ao reactor em culturas contínuas e semi-contínuas, C_{NH_3} é a concentração de amónia e F_{NH_3} é a taxa de formação de amónia.

Para os diferentes modos de operação possíveis (contínuo, semi-contínuo, e descontínuo), a determinação da concentração de amónia à entrada e à saída ou da grandeza do termo de acumulação $(d(C_{\text{NH}_3})/dt)$ permite saber o valor de F_{NH_3} . Este, por sua vez, pode ser expresso em termos da taxa específica de formação de amónia (q_{NH_3}):

$$F_{\text{NH}_3} = q_{\text{NH}_3} \times 10^3 \cdot C_X \cdot V_R \quad (9.2)$$

onde C_X é a concentração de biomassa. Assim, q_{NH_3} pode escrever-se:

$$q_{\text{NH}_3} = F_{\text{NH}_3} \times 10^3 \cdot C_X^{-1} \cdot V_R^{-1} \quad (9.3)$$

Cada miliequivalente de amónia presente no meio, em média, consome um miliequivalente de protões, o que conduziria a um valor de qH^+ subestimado. Nestas circunstâncias, aplica-se a seguinte correcção:

$$qH^+_{\text{corrigido}} = qH^+_{\text{medido}} + qNH_3 \quad (9.4)$$

onde qH^+_{medido} corresponde à taxa específica de produção de protões tal como foi determinada (Castrillo *et al.* 1995).

9.2.3 Cultura em contínuo

A obtenção de um estado estacionário verifica-se pela manutenção das concentrações de biomassa e oxigénio dissolvido e das fracções molares de oxigénio e dióxido de carbono no gás de saída por um período mínimo equivalente a três tempos de residência (Stafford 1986).

Atingido um estado estacionário, retiram-se amostras para análises em diferido e a taxa específica de consumo/produção de protões (qH^+) determina-se por titulação (ver Figura 9.1), registando-se o volume de ácido/base (H_2SO_4 ou $NaOH$ 0,2 N) consumido durante um tempo determinado (Castrillo *et al.* 1995). Completado este procedimento, altera-se a taxa de diluição para um novo valor e aguarda-se pelo estado estacionário seguinte.

Realizam-se duas fermentações em contínuo, uma utilizando glucose e a outra utilizando etanol como a única fonte de carbono, analisando-se os estados estacionários obtidos pela variação da taxa de diluição.

9.2.4 Cultura em descontínuo

A cultura em descontínuo efectua-se para testar a aplicabilidade do método na monitorização do crescimento da levedura. Calcula-se a razão qH^+/q_{biomassa} ($\text{meqH}^+ \cdot \text{meq}_{\text{biomassa}}^{-1}$), definindo q_{biomassa} como $\text{meq}_{\text{biomassa}} \cdot g_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot h^{-1}$ (Castrillo e Ugalde 1994 e Herbert 1976).

O procedimento para a realização da cultura em descontínuo com a estirpe não floculante está descrito no capítulo 3. As amostras são retiradas em duplicado para efectuar as análises em diferido.

9.2.5 Estimação da concentração de biomassa

Para uma cultura em descontínuo utilizando glucose e sulfato de amónio como fontes de carbono e de azoto, respectivamente, ocorrem duas fases de crescimento independentes (crescimento em glucose e etanol). Em cada fase, é possível estimar a concentração de biomassa segundo a expressão:

$$C_{X,(t+\Delta t)} = C_{X,(t)} + N_{OH^-, \Delta t} \cdot Y_{X/H^+, \Delta t} \quad (9.5)$$

onde $N_{OH^-, \Delta t}$ representa os miliequivalentes de base consumidos pelo sistema de controlo de pH durante o intervalo Δt e $Y_{X/H^+, \Delta t}$ corresponde à quantidade de biomassa produzida por miliequivalente de prótons libertados para o meio pelas células naquele intervalo de tempo, que pode exprimir-se por:

$$Y_{X/H^+, \Delta t} = \frac{\mu}{qH^+} \quad (9.6)$$

sendo μ a taxa específica de crescimento de biomassa. Em termos de $q_{biomassa}$, a eq. (9.6) vem:

$$Y_{X/H^+, \Delta t} = M_X \times 10^{-3} \cdot \frac{q_{biomassa}}{qH^+} \quad (9.7)$$

onde M_X é a massa molecular da biomassa determinada com uma expressão do tipo $CH_xO_yN_z$ (Castrillo e Ugalde 1994, Herbert 1976 e Oura 1972).

9.2.6 Métodos analíticos

As determinações das concentrações de biomassa, glucose, etanol, acetaldeído, acetato, glicerol, ureia e amónia fazem-se de acordo com os procedimentos descritos no capítulo 3, onde também se descrevem os métodos utilizados para obter as fracções molares de oxigénio e de dióxido de carbono nos gases de saída, determinadas neste caso com um analisador paramagnético e com um analisador de infravermelho, respectivamente.

9.3 Resultados e discussão

9.3.1 Influência da produção/consumo de etanol em qH^+

Tendo em vista a confirmação da hipótese de que o metabolismo do carbono está equilibrado no que diz respeito a qH^+ , tanto em condições respiratórias como em condições respiro-fermentativas, conduziram-se paralelamente duas fermentações em contínuo, uma com glucose e a outra com etanol como fonte de carbono. Utilizou-se a ureia como fonte de azoto uma vez que este composto elimina a contribuição do metabolismo do azoto para qH^+ (Castrillo *et al.* 1995), permitindo portanto a determinação da influência do metabolismo do carbono (e só deste) naquele parâmetro.

Reacções laterais tais como a hidrólise da ureia em amónia, a desaminação oxidativa (que pode ocorrer na transição entre estados estacionários) de compostos azotados presentes no meio ou nas células, ou mesmo desequilíbrios na assimilação do azoto pelas vias metabólicas correspondentes (Large 1986 e Phaff *et al.* 1978) resultam em alterações da concentração de amónia no meio. Assim sendo, é necessário proceder à determinação da taxa específica de formação/consumo de amónia (qNH_3) e à aplicação da correcção correspondente, que tem em consideração a contribuição daqueles processos para a taxa específica de produção de protões, e que permite isolar o valor de qH^+ correspondente ao metabolismo do carbono.

Os valores de qH^+ , q_{etanol} (definido como $meq_{etanol} \cdot g_{biomassa}^{-1} \cdot h^{-1}$) e qH^+/q_{etanol} para o conjunto de taxas de diluição aplicadas nas fermentações utilizando glucose e etanol apresentam-se na Tabela 9.1 e na Tabela 9.2, respectivamente (os sinais negativos significam que houve consumo de protões, e não produção). O intervalo de taxas de diluição escolhido conduziu a estados estacionários caracterizados por diferentes condições fisiológicas, como se pode observar pelos níveis de produção de etanol (Tabela 9.1) e de biomassa (Tabela 9.2). Os valores absolutos da razão qH^+/q_{etanol} em função da taxa de diluição situaram-se sempre abaixo de $0,1 meqH^+ \cdot g_{biomassa}^{-1} \cdot h^{-1}$, corroborando a afirmação de que a produção ou o consumo de etanol não afecta significativamente qH^+ nas condições estudadas.

Tabela 9.1: Taxas específicas (q) obtidas durante a cultura em contínuo com glucose ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de carbono e ureia ($3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de azoto.

Taxa de diluição $\pm 0,01 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,13	0,17	0,23	0,38
Concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	11,40	9,28	8,40	8,80
$q_{\text{NH}_3} \pm 0,01 \text{ (meqNH}_3 \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	< 0,01	< 0,01	< 0,01	- 0,30
$q_{\text{etanol}} \pm 0,01 \text{ (meq}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	1,00	2,50	4,40	3,90
$q_{\text{H}^+ \text{ medido}} \pm 0,01 \text{ (meqH}^+ \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	0,02	0,04	0,04	0,06
$q_{\text{H}^+ \text{ corrigido}} \pm 0,01 \text{ (meqH}^+ \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	0,03	0,05	0,05	- 0,24
$q_{\text{H}^+}/q_{\text{etanol}} \pm 0,01 \text{ (meqH}^+ \cdot \text{meq}_{\text{etanol}}^{-1}\text{)}$	< 0,10	< 0,10	< 0,10	- 0,10 < x < 0

Tabela 9.2: Taxas específicas (q) obtidas durante a cultura em contínuo com etanol ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de carbono e ureia ($3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de azoto.

Taxa de diluição $\pm 0,01 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,11	0,16	0,24	0,33
Concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	3,20	3,18	3,70	1,46
$q_{\text{NH}_3} \pm 0,01 \text{ (meqNH}_3 \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	-	< 0,02	- 0,30	- 0,90
$q_{\text{etanol}} \pm 0,01 \text{ (meq}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	- 3,40	- 5,80	- 10,80	- 7,20
$q_{\text{H}^+ \text{ medido}} \pm 0,01 \text{ (meqH}^+ \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	- 0,03	- 0,01	0,73	0,45
$q_{\text{H}^+ \text{ corrigido}} \pm 0,01 \text{ (meqH}^+ \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	- 0,03	-	0,43	- 0,45
$q_{\text{H}^+}/q_{\text{etanol}} \pm 0,01 \text{ (meqH}^+ \cdot \text{meq}_{\text{etanol}}^{-1}\text{)}$	< 0,10	-	- 0,10 < x < 0	< 0,10

Os resultados obtidos mostram que quer o metabolismo respiratório quer o metabolismo respiro-fermentativo têm um efeito negligenciável em q_{H^+} , confirmando a hipótese anteriormente avançada de que o metabolismo do carbono está equilibrado no que respeita aos prótons. Este facto, apesar de geralmente aceite em todas as formulações estequiométricas (Stryer 1995 e Verduyn *et al.* 1991), nunca tinha sido verificado ao nível fisiológico sob condições experimentais controladas.

As vias de assimilação do carbono envolvidas neste estudo podem resumir-se nas seguintes equações:





Além disso, os resultados confirmam que a via de assimilação de azoto é a principal responsável pelo consumo/produção de protões em culturas microbianas. As relações estequiométricas obtidas previamente, em que o quociente entre a taxa específica de produção de protões e a taxa específica de consumo de azoto (qH^+/qN) tomava os valores +1, 0 e -1, conforme a fonte de azoto disponível (iões amónio, ureia e iões nitrato, respectivamente) (Castrillo *et al.* 1995), podem agora ser estendidas a todos os tipos de metabolismo, desde que não haja outras contribuições ácidas ou básicas, e constituem a base metabólica fundamental segundo a qual é possível monitorizar muitos processos fermentativos através do consumo do reagente de controlo de pH (Ishizaki *et al.* 1994, Iversen *et al.* 1994, Pons *et al.* 1989, San e Stephanopoulos 1984, Shioya 1989 e Siano 1995).

9.3.2 Contribuições ácido/base adicionais para o valor de qH^+

Apesar de a maior contribuição para a produção/consumo de protões se dever à assimilação do azoto, existem reacções laterais que podem afectar significativamente a determinação de qH^+ . Neste trabalho, e uma vez que se utiliza a ureia como fonte de azoto, é necessário ter em conta a possível existência de amónia no meio de fermentação. De entre os vários mecanismos que conduzem à presença de amónia no meio, a degradação espontânea da ureia pode desde já ser considerada desprezável, uma vez que houve o cuidado de esterilizar este composto por filtração, evitando assim a sua autoclavagem (Budavari 1996). A desaminação oxidativa de proteínas celulares, que ocorre ocasionalmente nos períodos que medeiam a passagem de um estado estacionário a outro, ou a ocorrência de condições de desequilíbrio na assimilação do azoto pelas vias correspondentes (Large 1986), são duas outras causas possíveis para a excreção de amónia para o meio, registadas em leveduras urease-positivas (por exemplo, *Rhodospiridium*) (Phaff *et al.* 1978). No caso de leveduras urease-negativas (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*), que metabolizam a ureia através da via catalizada pela ureia carboxilase e pela alofanato hidrolase, este efeito, apesar de não ser tão extremo, não deve ser ignorado, como mostram as diferenças entre os valores de qH^+ medidos e

corrigidos (Tabela 9.1). Este tipo de análise e de correcções ao valor de qH^+ podem ser efectuadas também noutros casos em que se utilizem diferentes fontes de azoto.

Em condições de crescimento equilibrado, o ácido acético, proveniente do acetaldeído por via da reacção catalisada pela piruvato descarboxilase, é conduzido ou para o ciclo de Krebs (na mitocôndria) ou para a biosíntese (no citoplasma ou nos peroxissomas) (Flikweert *et al.* 1996, de Jong-Gubbels *et al.* 1995 e Postma *et al.* 1989). Ambas as conversões ocorrem sem haver produção de protões. No entanto, em muitas condições fermentativas (por exemplo, com excesso de açúcar ou com limitação de oxigénio) pode haver acumulação de ácido acético, que difunde da célula para o meio conduzindo ao aumento de qH^+ que, se utilizado como parâmetro de monitorização, pode levar a uma sobre-estimação da concentração de biomassa (como exemplo, a produção de apenas $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido acético resultaria na estimação de um excesso de $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa). Efeitos semelhantes podem ocorrer em fermentações envolvendo a produção ou consumo de outros componentes ácido/base (por exemplo, outros ácidos orgânicos) (Siano 1995).

9.3.3 Uma cultura em descontínuo como sistema de teste

Os resultados acima descritos e as conclusões daí retiradas acerca da contribuição desprezável do metabolismo do carbono para o valor de qH^+ constituem uma base formal para a utilização deste parâmetro na monitorização em linha da concentração de biomassa em fermentações aeróbias, quer em regime respiratório quer em regime respiro-fermentativo, e permitem estender a validade do modelo proposto a uma grande variedade de fontes de carbono, simples e complexas, normalmente utilizadas em processos industriais.

Os balanços mássicos globais e os modelos aplicáveis, numa base empírica, à produção de protões como parâmetro de controlo em linha de fermentações foram já formulados no passado (Cooney *et al.* 1977, San e Stephanopoulos 1984, Stephanopoulos 1986, Chattaway *et al.* 1992 e Siano 1995). Neste estudo, testa-se o modelo formal aqui proposto durante uma fermentação em descontínuo com *Saccharomyces cerevisiae* (tendo a glucose e o sulfato de amónio como fontes de carbono e de azoto, respectivamente), constituindo portanto um sistema não estacionário, que representa uma das formas mais utilizadas de fermentação.

Para um dado organismo, a quantidade de azoto por unidade de peso seco depende de vários factores tais como a fonte de carbono utilizada e as condições de cultura. Apesar das variações que podem ocorrer, pode considerar-se que aquela quantidade se mantém sensivelmente constante, pelo que é possível formular uma composição elementar média para a biomassa (Herbert 1976 e Oura 1972). Como exemplo, podem citar-se algumas composições médias para *Saccharomyces cerevisiae* com glucose como fonte de carbono: $CH_{1,613}O_{0,525}N_{0,152}P_{0,010}S_{0,001}$ (Oura 1972), $CH_{1,760}O_{0,581}N_{0,144}$ (Verduyn *et al.* 1991 e Verduyn 1992), $CH_{1,79}O_{0,57}N_{0,15}$ (Castrillo e Ugalde 1994, Roels 1980 e Sonnleitner e Käppeli 1986). Este conceito constitui a base para a formulação das equações estequiométricas globais para o crescimento, onde a composição da biomassa tem a fórmula geral $CH_xO_yN_z$, normalizada para conter um átomo-grama de carbono (Castrillo e Ugalde 1994, Herbert 1976 e Oura 1972).

Na reacção global representando o crescimento em glucose e sais de amónio:



as taxas de consumo e produção não são independentes, estando estreitamente associadas por relações estequiométricas específicas (Herbert 1976 e Roels 1980). Assim, vem:

$$qH^+/qN = d/b \quad (9.12)$$

$$qH^+/q_{biomassa} = d \quad (9.13)$$

e também:

$$b = z \quad (9.14)$$

uma vez que corresponde ao conteúdo molar de azoto na biomassa. Dado que qH^+/qN é igual à unidade quando se utilizam sais de amónio como fonte de azoto, tal como se determinou anteriormente (Castrillo *et al.* 1995), então:

$$qH^+/q_{biomassa} = b = d = z \quad (9.15)$$

esperando-se, portanto, uma relação directa entre a taxa específica de produção de protões (qH^+) e a taxa específica de crescimento de biomassa ($q_{biomassa}$), sendo os valores de

$qH^+/q_{biomassa}$ uma medida directa do conteúdo de azoto na biomassa. Pelo atrás exposto, estas relações devem permanecer válidas no caso de crescimento em etanol.

A Figura 9.2a representa a evolução das concentrações de biomassa, glucose e etanol no decurso de uma fermentação em descontínuo. O intervalo de tempo entre a 7ª e a 10ª hora corresponde ao período de latência que precede o início do consumo do etanol pelas células. Outros metabolitos como o acetato, o acetaldeído e o glicerol foram igualmente detectados, mas em quantidades desprezáveis. Na Figura 9.2b mostra-se a evolução de qH^+ e de $q_{biomassa}$ e na Figura 9.2c representam-se os valores do quociente $qH^+/q_{biomassa}$ ao longo da fermentação. Este quociente tem um valor médio constante de 0,15, que está em pleno acordo com os valores referidos na literatura para a composição da biomassa em azoto para esta levedura (Oura 1972, Roels 1980 e Verduyn *et al.* 1991) (o valor negativo registado na 8ª hora deve-se, provavelmente, a uma ligeira paragem no crescimento e à consequente desaminação que geralmente acompanham a transição do consumo de glucose para o consumo de etanol).

Utilizando as relações apresentadas nas eqs. (9.5) a (9.15), é possível proceder à estimação da evolução da concentração de biomassa no sistema. Os resultados apresentam-se na Figura 9.2a, podendo verificar-se que os valores calculados são praticamente coincidentes com os valores reais, tanto durante o consumo de glucose como durante o consumo de etanol.

9.4 Conclusões

Dos resultados aqui apresentados pode concluir-se que a taxa específica de produção de protões (qH^+) está directamente relacionada com a taxa específica de crescimento de biomassa através da relação directa estabelecida com o metabolismo do azoto (qH^+/qN). Uma vez que estas relações se apoiam numa base fisiológica, podem ser utilizadas na monitorização e controlo de fermentações como regras formais, extensíveis a todos os microorganismos que apresentem padrões metabólicos semelhantes. Representam, portanto, uma vantagem interessante em relação às estratégias empíricas de controlo de processos, que geralmente se restringem aos casos para os quais foram desenvolvidas.

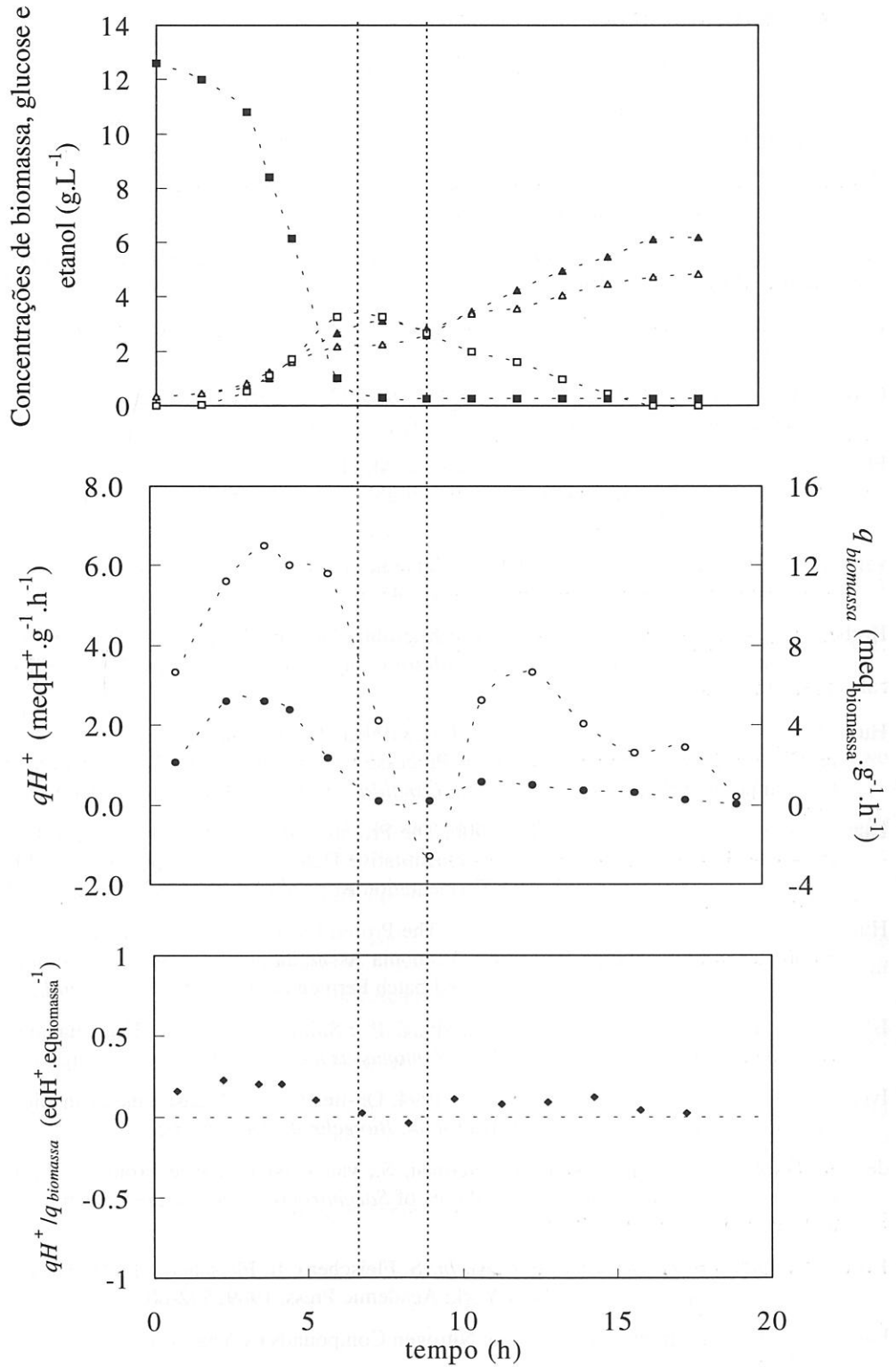


Figura 9.2: Fermentação em descontínuo: **a)** evolução das concentrações de glucose (■), biomassa (▲) e etanol (◻) e da concentração de biomassa estimada (Δ); **b)** evolução dos valores de q_{H^+} (●) e de $q_{biomassa}$ (○); **c)** evolução dos valores de $q_{H^+}/q_{biomassa}$.

9.5 Bibliografia

- Budavari, S., 1996. *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 12th ed. New Jersey: Merck.
- Castrillo, J. I., de Miguel, I. e Ugalde, U. O., 1995. Proton Production and Consumption Pathways in Yeast Metabolism. A Chemostat Culture Analysis. *Yeast*, 11, 1353-1365.
- Castrillo, J. I. e Ugalde, U. O., 1994. A General Model of Yeast Energy Metabolism in Aerobic Chemostat Culture. *Yeast*, 10, 185-197.
- Chattaway, T., Demain, A. L. e Stephanopoulos, G., 1992. Use of Various Measurements for Biomass Estimation. *Biotechnol. Prog.*, 8, 81-84.
- Cooney, C. L., Wang, H. Y. e Wang, D. I. C., 1977. Computer-aided Material Balancing for Prediction of Fermentation Parameters. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 56-67.
- Flikweert, M. T., van der Zanden, L., Janssen, W. M., Th., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. e Pronk, J. T., 1996. Pyruvate Decarboxylase: an Indispensable Enzyme for Growth of *Saccharomyces cerevisiae* on Glucose. *Yeast*, 12, 247-257.
- van Gulik, W. M. e Heijnen, J. J., 1995. A Metabolic Network Stoichiometry Analysis of Microbial Growth and Product Formation. *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 681-698.
- Herbert, D., 1976. Stoichiometric Aspects of Microbial Growth. In: A. C. R. Dean, D. C. Ellwood, C. G. T. Evans e J. Melling, eds. *Continuous Culture 6: Applications and New Fields*. Ellis Horwood Limited, 1976, 1-30.
- Huth, J., Blasig, R., Werner, S. e Mueller, H. G., 1990a. The Proton Extrusion of Growing Yeast Cultures as an On-line Parameter in Fermentation Processes: Determination of Biomass Production and Substrate Consumption in Batch Experiments with *Candida maltosa* EH 15D. *J. Basic Microbiol.*, 30, 481-488.
- Huth, J., Werner, S. e Mueller, H. G., 1990b. The Proton Extrusion of Growing Yeast Cultures as an On-line Parameter in Fermentation Processes: Quantitative Determination of Growth from Miligram Amounts of Substrate in a Minimized Fed-batch Fermentation Apparatus. *J. Basic Microbiol.*, 30, 489-497.
- Huth, J., Werner, S. e Mueller, H. G., 1990c. The Proton Extrusion of Growing Yeast Cultures as an On-line Parameter in Fermentation Processes: Ammonia Assimilation and Proton Extrusion are Correlated by an 1:1 Stoichiometry in Nitrogen-limited Fed-batch Fermentations. *J. Basic Microbiol.*, 30, 561-567.
- Ishizaki, A., Tripetchkul, S., Tonokawa, M., Shi, Z. P. e Shimizu, K., 1994. pH-mediated Control Methods for Continuous Ethanol Fermentation Using *Zymomonas mobilis*. *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 541-547.
- Iversen, J. J. L., Thomsen, J. K. e Cox, R. P., 1994. On-line Growth Measurements in Bioreactors by Titrating Metabolic Proton Exchange. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 256-262.
- de Jong-Gubbels, P., Vanrolleghem, P., Heijnen, S., van Dijken, J. P. e Pronk, J. T., 1995. Regulation of Carbon Metabolism in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* Grown on Mixtures of Glucose and Ethanol. *Yeast*, 11, 407-418.
- Kotyk, A., 1989. Proton Extrusion in Yeast. In: S. Fleischer e B. Fleischer, eds. *Methods in Enzymology*. Vol. 174 (Biomembranes, Part C). New York: Academic Press, 1989, 592-603.
- Large, P. J., 1986. Degradation of Organic Nitrogen Compounds by Yeasts. *Yeast*, 2, 1-34.
- Larsson, C., von Stockar, U., Marison, I. e Gustafsson, L., 1993. Growth and Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in Chemostat Cultures Under Carbon-, Nitrogen-, or Carbon- and Nitrogen-limiting Conditions. *J. Bacteriol.*, 175, 4809-4816.
- Ohta, K., Hamada, S. e Nakamura, T., 1993. Production of High Concentrations of Ethanol from Inulin by Simultaneous Saccharification and Fermentation Using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 729-733.
- Oura, E., 1972. Dissertação de Doutoramento: *The Effect of Aeration on the Growth Energetics and Biochemical Composition of Baker's Yeast*. Helsinquia: University of Helsinki.

- Phaff, H. J., Miller, M. W. e Mrak, E. M., 1978. *The Life of Yeasts. Nutrition and Growth*. 2nd ed. Harvard University Press.
- Pons, M. N., Garrido-Sanches, N. e Engasser, J. M., 1989. Observability by pH in Bioprocesses. In: N. M. Fish, R. I. Fox e N. F. Thornhill, eds. *Computer Applications in Fermentation Technology: Modelling and Control of Biotechnological Processes*. London: Elsevier Applied Science, 1989, 227-231.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A. e van Dijken, J. P., 1989. Enzyme Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-limited Chemostat Culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 648-677.
- Roels, J. A., 1980. Application of Macroscopic Balances to Microbial Metabolism. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2457-2514.
- Roos, W. e Luckner, M., 1984. Relation Between Proton Extrusion and Fluxes of Ammonium Ions and Organic Acids in *Penicillium cyclopium*. *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1007-1014.
- San, K.-Y. e Stephanopoulos, G., 1984. Studies on On-line Bioreactor Identification. IV.: Utilization of pH Measurements for Product Estimation. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1209-1218.
- Shioya, S., 1989. Measurements of Biological Reaction Rates Using Advanced pH Control Systems. In: N. M. Fish, R. I. Fox e N. F. Thornhill, eds. *Computer Applications in Fermentation Technology: Modelling and Control of Biotechnological Processes*. London: Elsevier Applied Science, 1989, 15-22.
- Siano, S. A., 1995. On the Use of pH Control Reagent Addition Rate for Fermentation Monitoring. *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 651-665.
- Sigler, K. e Höfer, M., 1991. Mechanisms of Acid Extrusion in Yeast. *Biochem. Biophys. Acta*, 1071, 375-391.
- Sonnleitner, B. e Käppeli, O., 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by Its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 927-937.
- Sousa, M. L., Teixeira, J. A. e Mota, M., 1994. Comparative Analysis of Ethanolic Fermentation in Two Continuous Flocculation Bioreactors and Effect of Flocculation Additive. *Bioprocess Eng.*, 11, 83-90.
- Stafford, K., 1986. Continuous Fermentation. In: A. L. Demain e N. A. Solomon, eds. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington: American Society for Microbiology, 1986, 137-151.
- Stryer, L., 1995. *Biochemistry*. 3rd ed. New York: W. H. Freeman & Co.
- Stephanopoulos, G., 1986. Application of Macroscopic Balances and Bioenergetics of Growth to the On-line Identification of Biological Reactors. In: H. C. Lim e K. Venkatasubramanian, eds. *Biochemical Engineering IV*. Vol. 469, Annals of the New York Academy of Sciences., New York, 1986, 332-349.
- Verduyn, C., Stouthamer, A. H., Scheffers, W. A. e van Dijken, J. P., 1991. A Theoretical Evaluation of Growth Yields of Yeasts. *Ant. van Leeuwenhoek*, 59, 49-63.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. e van Dijken, J. P., 1992. Effect of Benzoic Acid on Metabolite Fluxes in Yeasts: A Continuous-culture Study on the Regulation of Respiration and Alcoholic Fermentation. *Yeast*, 8, 501-517.
- Verduyn, C., 1992. Dissertação de Doutorado: *Energetic Aspects of Metabolic Fluxes in Yeasts*. Delft: University of Technology.

10. Conclusões e sugestões para trabalho futuro

Várias das abordagens aqui utilizadas são o resultado de um esforço anterior a que esta tese se veio juntar. Em conjunto com outro já desenvolvido, muito do trabalho apresentado só pôde realizar-se após o estabelecimento de duas novas metodologias: uma que permitiu determinar com exactidão o valor da área projectada média de uma população de flocos (fornecendo informação valiosa, portanto, acerca das suas dimensões) e uma outra cuja finalidade foi a obtenção de dados com os quais as difusividades efectivas da glucose e do oxigénio puderam ser determinadas.

Pode afirmar-se que os principais objectivos deste trabalho foram atingidos com sucesso.

Em primeiro lugar, melhoraram-se as características hidrodinâmicas do bioreactor *airlift*, nomeadamente no que se refere à operação com sistemas trifásicos (sólido-líquido-gás); assim, foi possível reduzir o caudal de gás necessário para manter a fase sólida em circulação, por alteração das dimensões do tubo interno, ao mesmo tempo que se melhoraram as características de mistura da fase líquida.

Utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, passou-se ao estudo dos mecanismos de transferência de massa da glucose e do oxigénio em flocos de levedura. Obtiveram-se valores para a difusividade efectiva daqueles dois solutos que estão bastante aquém dos determinados para outros sistemas de células imobilizadas. Contudo, existem grandes diferenças entre estes e flocos de levedura, nomeadamente ao nível da estrutura interna, tal como se referiu no capítulo 2 quando se introduziu o tema da floculação. É a estrutura muito particular dos flocos que permite, por exemplo, que a utilização de um aditivo de floculação como o Magna Floc LT-25 lhes altere a estrutura interna (por alargamento das pontes inter-celulares) por forma a aumentar os valores da difusividade efectiva da glucose e do oxigénio cerca de quatro e oito vezes, respectivamente.

Na posse destes valores e de um modelo adequado, concluiu-se que existem fortes limitações de glucose e oxigénio (menores no sistema com aditivo de floculação) no interior dos flocos, a julgar pelos perfis de concentração daqueles solutos, calculados para flocos esféricos. Além de permitirem justificar parcialmente a forma geométrica adoptada pelos flocos de maior tamanho (à qual também não são alheias, certamente, as condições

hidrodinâmicas existentes no bioreactor), os perfis de concentração confirmaram a importância das limitações referidas.

Testou-se a introdução de agitadores estáticos no tubo interno do bioreactor *airlift* que provocaram o aumento das tensões de corte no meio e reduziram, portanto, o tamanho dos flocos. Esta redução, por si só, acarretaria um aumento das taxas específicas de consumo/produção do sistema. No entanto, assistiu-se também a um aumento da taxa de diluição máxima a que o sistema pôde operar com conversão praticamente total da glucose, o que veio contribuir para a obtenção de maiores taxas de consumo/produção e de uma maior produtividade em etanol.

Por fim, avançou-se com uma proposta para a monitorização em linha da biomassa num bioreactor através do reagente de controlo de pH. A contribuição que aqui se deu foi, no entanto, mais além: estabeleceu-se uma relação directa entre a produção/consumo de protões pelo sistema e o metabolismo do azoto, válida tanto para metabolismo respiratório como respirofermentativo, o que é inédito. Com base no conhecimento, já utilizado (só que empiricamente) por outros autores, de que a taxa específica de produção/consumo de protões está directamente relacionada com a taxa específica de crescimento de biomassa, concluiu-se ser possível monitorizar a concentração de biomassa num bioreactor, quer este opere em descontínuo, semi-contínuo ou contínuo. A vantagem deste novo método reside no facto de ser possível a sua aplicação a todos os microorganismos com padrões metabólicos semelhantes ao que foi testado.

Em resumo, as principais contribuições desta tese são as seguintes:

- desenvolvimento de um novo sistema, semi-automático, de análise de imagem por computador para a determinação do número e do tamanho de flocos de levedura presentes numa dada amostra, sistema este que pode ser utilizado com quaisquer outros objectos (células, por exemplo);
- desenvolvimento de um novo sistema, não destrutivo, para a determinação de coeficientes de difusão em flocos de levedura, que também pode ser utilizado na determinação de parâmetros cinéticos e com outros sistemas de imobilização (partículas de alginato, por exemplo);

- otimização do desenho do bioreactor *airlift*, com o objectivo de melhorar o seu comportamento hidrodinâmico na presença de uma fase sólida;
- determinação das difusividades efectivas da glucose e do oxigénio em flocos de levedura na ausência e na presença de um aditivo de floculação, tendo em conta a geometria dos flocos, utilizando um método analítico e um método numérico, cujo desempenho é comparado;
- determinação dos coeficientes de transferência de massa no exterior dos flocos, em condições de agitação muito suave;
- simulação dos perfis de concentração da glucose e do oxigénio em flocos de levedura com diferentes tamanhos, na ausência e na presença de um aditivo de floculação, utilizando um modelo baseado em balanços mássicos aos componentes do sistema; detecção de fortes limitações daqueles dois componentes no interior dos flocos;
- aumento da produtividade em etanol do sistema constituído pelo bioreactor *airlift* contendo a estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae*, com uma conversão quase total (> 98 %) da glucose; análise dos estados estacionários utilizando conceitos de catálise heterogénea;
- utilização da taxa de consumo de reagente de controlo de pH na estimação em linha da concentração de biomassa num bioreactor, através do estabelecimento de uma relação formal entre a produção/consumo de protões e o metabolismo do azoto, válida em qualquer tipo de metabolismo aeróbio.

Apresentam-se, no seguimento, algumas sugestões para trabalho futuro. Na sua essência, constituem continuações possíveis para o tema desta tese, nomeadamente no que se refere ao desenvolvimento de um modelo global, tendo em vista o alargamento da aplicação dos sistemas de células floculantes (por exemplo, para produção de produtos de alto valor acrescentado, como são as proteínas heterólogas). Nesse estudo, é possível distinguir duas vertentes: a primeira referente aos fenómenos que ocorrem no exterior dos flocos e a segunda vocacionada para o estudo de características internas dos agregados.

Concretamente, e para a primeira vertente, apresentam-se as seguintes sugestões:

- apesar do sucesso conseguido, em termos hidrodinâmicos, com a alteração das dimensões do tubo interno, o fundo do bioreactor *airlift* apresenta ainda características de zona estagnada, onde ocorre a deposição de uma quantidade significativa de biomassa; sugere-se uma alteração do projecto desta parte do bioreactor, tendo em vista a eliminação do problema, particularmente importante durante a fase de arranque da fermentação;

- o alargamento do leque de aplicação da técnica de estimação em linha da biomassa aqui iniciada, nomeadamente estudando a possibilidade da sua utilização com organismos floculantes e em fermentações com interesse industrial (fungos, células animais e vegetais, por exemplo).

No caso da segunda vertente de investigação atrás referida, consideram-se as seguintes propostas:

- determinação das difusividades (na presença e na ausência de aditivo de floculação) de outros solutos de interesse nos flocos, como sejam o etanol e o dióxido de carbono, por exemplo;

- determinação *in situ* dos perfis reais de concentração (de glucose, etanol, oxigénio e dióxido de carbono) dentro dos flocos utilizando, por exemplo, microeléctrodos;

- avaliação do estado metabólico das células num floco em camadas sucessivamente mais interiores, após imobilização, por exemplo, com azoto líquido.

Apêndices

Apêndice I

Modelo de Sonnleitner e Käppeli

Este trabalho utiliza o modelo proposto por Sonnleitner e Käppeli (1986), baseado no conceito de capacidade respiratória limitada.

O crescimento celular em glucose com produção/consumo de etanol pode ser descrito por três vias metabólicas principais: a) crescimento respiratório em glucose; b) crescimento fermentativo em glucose e c) crescimento respiratório em etanol.

Supõe-se que as células têm uma capacidade respiratória limitada, isto é, um *estrangulamento respiratório*. Se o fluxo total de substrato(s) puder passar por esse estrangulamento sem o preencher completamente (pelas vias a), c) ou ambas) denomina-se fluxo *sub-crítico*; quando o fluxo total de substrato(s) preenche completamente o estrangulamento mas sem ultrapassar a sua capacidade, denomina-se fluxo *crítico*; se o fluxo total de substrato(s) excede a capacidade do estrangulamento, denomina-se fluxo *supra-crítico*, sendo o excesso metabolizado pela via b) (excepto no caso de crescimento respiratório em etanol).

Quer a taxa específica (total) de consumo de glucose (q_S) quer a taxa específica de consumo de oxigénio (q_O) podem ser representadas pelo modelo cinético de Monod:

$$q_S = q_{S,\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (\text{I.1})$$

$$q_O = q_{O,\max} \cdot \frac{C_O}{K_O + C_O} \quad (\text{I.2})$$

em que $q_{S,\max}$ e $q_{O,\max}$ são as taxas específicas máximas de consumo de glucose e oxigénio, C_S e C_O são as concentrações de glucose e oxigénio na fase líquida e K_S e K_O são constantes cinéticas para a glucose e para o oxigénio.

Por outro lado, o crescimento da biomassa é uma reacção auto-catalítica:

$$r_X = \mu \cdot C_X \quad (\text{I.3})$$

onde r_X é a taxa de crescimento de biomassa, μ é a taxa específica de crescimento de biomassa e C_X é a concentração total de biomassa no meio.

A quantidade de oxigénio dissolvido requerida para respiração em glucose ($q_{O,req}$) é dada por:

$$q_{O,req} = \frac{Y_{X/S}^r}{Y_{X/O}^r} \cdot q_S \quad (I.4)$$

onde $Y_{X/S}^r$ e $Y_{X/O}^r$ representam os coeficientes de rendimento biomassa/substrato e biomassa/oxigénio.

Dependendo da disponibilidade de oxigénio dissolvido no meio, podem ocorrer duas situações:

1) $q_{O,req} \leq q_O$ (fluxo de substrato sub-crítico/crítico). Essencialmente toda a glucose é metabolizada por via respiratória. A capacidade respiratória residual (no caso do fluxo sub-crítico) pode ser utilizada para o crescimento em etanol, se este estiver disponível. Assim, a taxa específica de crescimento em glucose será a soma da contribuição das taxas específicas de crescimento em glucose sob metabolismo respiratório (μ_S^r) e sob metabolismo respiro-fermentativo (μ_S^f):

$$\mu_S^r = Y_{X/S}^r \cdot q_S \quad (I.5)$$

$$\mu_S^f = 0 \quad (I.6)$$

O crescimento em etanol também segue uma cinética de Monod, em que a prioridade do consumo da glucose em relação ao consumo do etanol pode ser representada como a inibição deste último pela glucose:

$$\mu_{E1}^r = \mu_{E,max} \cdot \frac{C_E}{K_E + C_E} \cdot \frac{K_i}{K_i + C_S} \quad (I.7)$$

sendo μ_{E1}^r a taxa específica de crescimento em etanol com inibição pela glucose, $\mu_{E,max}$ a taxa específica máxima de crescimento em etanol, C_E e C_S as concentrações de etanol e glucose no meio e K_E e K_i constantes cinéticas para o etanol e de inibição, respectivamente.

A capacidade respiratória remanescente ($q_O - q_{O,req}$) é utilizada na via c) para produção de biomassa:

$$\mu_{E2}^r = \frac{Y_{X/O,E}^r}{Y_{X/E,E}^r} \cdot (q_O - q_{O,req}) \quad (\text{I.8})$$

sendo μ_{E2}^r a taxa específica de crescimento em etanol utilizando a capacidade respiratória remanescente, e $Y_{X/O,E}^r$ e $Y_{X/E,E}^r$ os coeficientes de rendimento biomassa/oxigênio e biomassa/etanol para o crescimento em etanol.

Conseqüentemente, $\mu_{E1}^r \leq \mu_{E2}^r$ e, portanto, a taxa específica de crescimento em etanol (μ_E^r) será:

$$\mu_E^r = \min(\mu_{E1}^r, \mu_{E2}^r) \quad (\text{I.9})$$

2) $q_{O,req} > q_O$ (fluxo de substrato supra-crítico). Toda a capacidade respiratória é utilizada para metabolizar a glucose de acordo com a via a):

$$\mu_S^r = Y_{X/S}^r \cdot q_O \cdot \frac{Y_{X/O}^r}{Y_{X/S}^r} \quad (\text{I.10})$$

e a glucose restante é metabolizada de acordo com a via b) (via fermentativa):

$$\mu_S^f = Y_{X/S}^f \cdot (q_S - q_O) \cdot \frac{Y_{X/O}^r}{Y_{X/S}^r} \quad (\text{I.11})$$

onde $Y_{X/S}^f$ é o coeficiente de rendimento biomassa/substrato em metabolismo respiro-fermentativo.

Além disso, como se produz etanol pela via fermentativa e devido à falta de oxigênio dissolvido aquele não pode ser consumido pela via c), então:

$$\mu_E^r = 0 \quad (\text{I.12}).$$

Apêndice II

Derivação da eq. (8.4)

Na eq. (8.3) não é possível determinar directamente ε_s . Assim, houve a necessidade de definir aquele parâmetro em função de outros, determinados experimentalmente.

Para cada floco, pode escrever-se:

$$m_f = m_b + m_l \quad (\text{II.1})$$

onde m_f é a massa total do floco, m_b é a massa das células existentes no floco e m_l é a massa do meio líquido nos poros. Reformulando a eq. (II.1) e multiplicando-a pelo número total de flocos existentes no bioreactor (n), obtém-se:

$$n \cdot V_f \cdot \rho_f = n \cdot m_b + n \cdot \varepsilon_p \cdot V_f \cdot \rho_l \quad (\text{II.2})$$

onde V_f é o volume de um floco, ρ_f é a massa específica dos flocos e ρ_l é a massa específica do meio líquido.

O volume total de flocos no bioreactor ($n \cdot V_f$) pode expressar-se em termos do produto da fracção de flocos no bioreactor (ε_s) pelo volume útil do bioreactor (V_R):

$$n \cdot V_f = \varepsilon_s \cdot V_R \quad (\text{II.3})$$

A concentração total de biomassa no bioreactor ($n \cdot m_b / V_R$) pode ser representada pelo produto da concentração de biomassa em peso seco (C_X), uma variável medida, por um factor (u) que é a razão entre a massa total de uma célula e o seu peso seco, que aqui se considera como sendo aproximadamente igual a 10/3, correspondendo a um conteúdo de água na célula de cerca de 70 % (Alberts *et al.* 1994):

$$\frac{n \cdot m_b}{V_R} = u \cdot C_X \quad (\text{II.4})$$

Substituindo as eqs. (II.3) e (II.4) na eq. (II.2), reformulando e separando ε_s , obtém-se finalmente:

$$\varepsilon_s = \frac{u \cdot C_X}{\rho_f - \varepsilon_p \cdot \rho_l} \quad (\text{II.5}).$$