

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Uso de Alumina como suporte para imobilização de leveduras

Ilana Moscovici Borenstein

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientador:
Prof. Dr. Urgel de Almeida Lima**

**São Paulo
2003**

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005413

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

B731u Borenstein, Ilana Moscovici
Uso de alumina como suporte para imobilização de leveduras
/ Ilana Moscovici Borenstein. -- São Paulo, 2003.
80p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Lima, Urgel de Almeida

I. Fermentação : Tecnologia química 2. Fermentação:
Bebidas alcoólicas : Tecnologia 3. Levedura : Microbiologia
industrial. I. T. II. Lima, Urgel de Almeida, orientador.

660.28449 CDD

Ilana Moscovici Borenstein

Uso de Alumina como suporte para imobilização de leveduras

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Urgel Almeida Lima
orientador/presidente

Prof. Dr. Walter Borzani

Prof. Dr. Sunao Sato

São Paulo, 24 de abril de 2003.

Orientador:
Prof. Dr. Urgel de Almeida Lima

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são dirigidos:

Ao Prof. Dr. Urgel de Almeida Lima pelo apoio e orientação.

À FAPESP pela concessão da bolsa por determinado período de execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Pêrsio de Souza Santos do Laboratório de Cerâmica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo pelas sugestões e preparo das membranas de alumina-alfa.

À Profª Drª Helena Souza Santos e Pedro Kiyohara do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da USP pelos exames de microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Pedro Bertolini da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas pela identificação da levedura *Cândida*.

À Escola de Engenharia Mauá e seu Departamento de Engenharia Química e de Alimentos pela permissão de uso de seus laboratórios.

A Lea, Isaak e Marcelo, pela compreensão.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo do trabalho	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Imobilização	3
2.2 Métodos de Imobilização	9
2.3 Imobilização com produção de etanol	10
2.4 Imobilização de células em carragena	14
2.5 Imobilização de células em alginato de cálcio	15
2.6 Imobilização de células em outros suportes	16
2.7 Imobilização de células em alumina	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Materiais	25
3.1.1 Suporte sólido	25
3.1.2 Meios de fermentação	25
3.1.3 Inóculo	27
3.1.4 Fermentadores	28
3.2 Métodos	29
3.2.1 Preparo de inóculo	29
3.2.2 Imobilização	29
3.2.3 Fermentação	30

	VI
3.2.4 Quantificação de leveduras presas no suporte	31
3.2.5 Exame dos suportes por microscopia de varredura	33
3.2.6 Acompanhamento da fermentação	33
3.2.6.1 Determinação do teor de açúcar fermentescível	33
3.2.6.2 Determinação do teor de etanol	34
3.2.7 Determinação da quant. de células desprendidas durante a ferm.	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Seleção de leveduras	35
4.2 Escolha do meio de fermentação	37
4.3 Escolha do tipo de membrana	53
4.4 Ensaio de fixação de leveduras em membranas de alumina	54
4.5 Determinação do número de células fixadas	58
4.6 Ensaios de fermentação descontínua com leveduras imobilizadas	61
4.7 Comparação entre células livres e imobilizadas	70
4.8 Duração da imobilização	71
4.9 Resultados em comparação com os dados da bibliografia	71
4.10 Considerações finais	73
5. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tamanho das bolhas de dióxido de carbono aprisionadas nos tubos de Durham, nos testes de seleção da cepa em tubos de ensaio, utilizando meio sintético como fonte de açúcar.	37
Tabela 2.	Primeiro ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células imobilizadas em membranas de alumina.	38
Tabela 3.	Ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células imobilizadas em membranas de alumina.	39
Tabela 4.	Terceiro ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células imobilizadas em membranas de alumina.	40
Tabela 5.	Primeiro ensaio de fermentação descontínua de meio de xarope de açúcar invertido com células imobilizadas em membranas de alumina.	41
Tabela 6.	Segunda ensaio de fermentação descontínua de meio de xarope de açúcar invertido com células imobilizadas em membranas de alumina.	43
Tabela 7.	Terceiro ensaio de fermentação descontínua de meio de xarope de açúcar invertido com células imobilizadas em membranas de alumina.	45
Tabela 8.	Primeiro ensaio de fermentação descontínua de meio de caldo de cana-de-açúcar com células imobilizadas em membranas de alumina.	46
Tabela 9.	Segundo ensaio de fermentação descontínua de meio de caldo de cana-de-açúcar com células imobilizadas em membranas de alumina.	48
Tabela 10.	Terceiro ensaio de fermentação descontínua de meio de caldo de cana-de-açúcar com células imobilizadas em membranas de alumina.	49
Tabela 11.	Rendimentos das fermentações descontínuas dos diferentes meios com células imobilizadas em membranas de alumina e respectivos coeficientes de correlação quando plotadas as curvas de álcool formado pela quantidade de açúcar fermentescível existente no meio.	51
Tabela 12.	Massa das amostras de membranas imobilizadas.	59
Tabela 13.	Cálculo de proteínas em membranas imobilizadas.	60
Tabela 14.	Primeiro ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizadas em membranas de alumina.	62
Tabela 15.	Segundo ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizadas em membranas de	64

alumina.

Tabela 16. Terceiro ensaio de fermentação descontínua de meio de melão com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em membranas de alumina. 66

Tabela 17. Rendimento de fermentação de meios de melão com células imobilizadas em novas membranas de alumina. 67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fermentador com seis saídas laterais para o dióxido de carbono e uma entrada no fundo. Reator de 10 cm de diâmetro externo e 55 cm de altura. Ao lado esquerdo encontra-se o cartucho com 9,5 cm de diâmetro externo e 20 cm de comprimento, para conter as membranas com células imobilizadas para a fermentação. 29
- Figura 2. Acompanhamento da primeira fermentação descontínua em meio de melão, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 38
- Figura 3. Regressão linear do primeiro ensaio de fermentação descontínua em meio de melão, usando o gráfico de % de etanol formado em função da quantidade de açúcar fermentescível total existente no meio de melão a fermentar. 38
- Figura 4. Acompanhamento da segunda fermentação descontínua com meio de melão, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 39
- Figura 5. Regressão linear do segundo ensaio de fermentação descontínua em meio de melão, usando o gráfico de % de etanol formado versus açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 39
- Figura 6. Acompanhamento da terceira fermentação descontínua com meio de melão, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 40
- Figura 7. Regressão linear do terceiro ensaio de fermentação descontínua em meio de melão, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 40
- Figura 8. Acompanhamento da primeira fermentação descontínua com meio de Gludex, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 42
- Figura 9. Regressão linear do primeiro ensaio de fermentação descontínua em meio sintético, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 42
- Figura 10. Acompanhamento da segunda fermentação descontínua com meio sintético, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 43

- Figura 11. Regressão linear do segundo ensaio de fermentação descontínua em meio sintético, usando o gráfico de % de etanol formado em função do açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 44
- Figura 12. Acompanhamento da terceira fermentação descontínua de meio de xarope de açúcar invertido, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 45
- Figura 13. Regressão linear do terceiro ensaio de fermentação descontínua em meio sintético, usando o gráfico de % de etanol formado em função do açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 45
- Figura 14. Acompanhamento da primeira fermentação descontínua com meio de caldo de cana-de-açúcar, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 46
- Figura 15. Regressão linear do primeiro ensaio de fermentação descontínua em meio de caldo de cana-de-açúcar, usando o gráfico de % de etanol formado em função do açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 47
- Figura 16. Acompanhamento da segunda fermentação descontínua com meio de caldo de cana-de-açúcar, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 48
- Figura 17. Regressão linear do segundo ensaio de fermentação descontínua em meio de caldo de cana-de-açúcar, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 48
- Figura 18. Acompanhamento da terceira fermentação descontínua com meio de caldo de cana-de-açúcar, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 49
- Figura 19. Regressão linear do terceiro ensaio de fermentação descontínua em meio de caldo de cana-de-açúcar, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 50
- Figura 20. Micrografia de varredura da membrana de alumina de superfície brilhante (com polimento na superfície) com imobilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1830. 53
- Figura 21. Micrografia de varredura da membrana de superfície opaca (sem polimento na superfície) sem leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1830 imobilizadas. Não há presença de circunferências pequenas (morfologia característica das leveduras desse gênero). 54
- Figura 22. Micrografia de varredura da superfície dorsal da membrana de alumina com imobilização de células (IZ-1830) e presença de contaminação. 57

- Figura 23. Micrografia de varredura da superfície ventral da mesma membrana de alumina, imobilização de IZ-1830 e presença de contaminação. 57
- Figura 24. Acompanhamento da fermentação descontínua com meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 62
- Figura 25. Regressão linear do ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 63
- Figura 26. Acompanhamento da fermentação descontínua com meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 64
- Figura 27. Regressão linear do ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado versus açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 65
- Figura 28. Acompanhamento da fermentação descontínua com meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo. 66
- Figura 29. Regressão linear do ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar. 67

RESUMO

O presente projeto estudou a viabilidade de imobilizar células de *Saccharomyces cerevisiae* em membranas de alumina-alfa especialmente preparadas para o projeto e o comportamento delas por meio de fermentação etanólica .

A alumina foi escolhida porque é material inorgânico, inerte, poroso, não prejudicial às leveduras, de obtenção relativamente fácil e de custo acessível. Contribuiu, também, para sua escolha, a durabilidade, a estabilidade dimensional e a porosidade controlada. Sua vida útil, se não ilimitada, é mais longa do que a dos suportes orgânicos.

Os ensaios foram feitos em processo descontínuo, empregando meios preparados com açúcar invertido comercial, caldo de cana-de-açúcar e melaço. Ensaios paralelos foram executados com leveduras dispersas, para comparação com o desempenho das imobilizadas.

O desenvolvimento das fermentações foi acompanhado pelo consumo de açúcar, decréscimo da quantidade de sólidos solúveis e pela produção de etanol.

ABSTRACT

The purpose of this project is to observe the ability of alfa-alumina membranes, specially prepared for this work, to immobilize yeast cells and their performance through ethanol fermentation.

Alumina was chosen as a solid support for yeast cells because it is an inorganic, chemically inert and porous material, not harmful for yeast, relatively easy and cheap to produce. Its strength, stability, the possible control of porosity and its life larger than that of the organic supports commonly used to immobilize yeast cells, were also characteristics that recommended the use of alumina membranes.

The assays were carried out with fermentation media prepared with liquid sugar, blackstrap molasses and sugarcane juice in batch. In parallel a few assays with suspended cells – were carried out using the same media to compare the fermentation performance of both suspended and immobilized yeast cells.

1. INTRODUÇÃO

O processo de fermentação etanólica consiste na transformação de açúcares de um meio açucarado em etanol e gás carbônico, por ação de leveduras ou bactérias. As células de microrganismos podem estar livres no meio ou imobilizadas em algum suporte.

Os processos de fermentação etanólica industrial variam do sistema de reaproveitamento de pés de cubas, de cortes, clássico e o de reciclagem de células, todos com diversas variações, incluindo processos descontínuos e contínuos. Nos processos descritos as leveduras são mantidas em suspensão no meio, em íntimo contato com os açúcares a desdobrar em etanol e gás carbônico.

Pelo processo com imobilização de células, as leveduras são presas em um suporte e teoricamente ficam retidas para serem usadas indefinidamente, sem perda de atividade catalítica, por muitas fermentações sucessivas.

A imobilização de células para usar em processos de fermentação etanólica vem sendo estudada há muito tempo, mas ainda há dificuldades a vencer para seu uso para produção industrial de etanol em larga escala.

São muitos os suportes estudados para imobilização de leveduras, variando de géis a materiais sólidos. Entre os géis destacam-se os alginatos e os glutaraldeídos, entre os polímeros as acrilamidas, DEAE – celulose e, entre os sólidos, pérolas de vidro poroso, aço inoxidável poroso, náilon, madeira, poliestireno, alumina e muitos outros. De forma geral esses materiais imobilizam as células por contato, entrelaçamento, adsorção e ligações covalentes.

É difícil definir qual o melhor suporte para imobilização, pois há ampla variação nas suas características químicas, nas características dos substratos usados e metabólitos, influenciando também o tipo de imobilização requerida. Para cada caso há

necessidade de um processo simples de obtenção, que o suporte não afete as leveduras, seja de fácil aquisição e de baixo custo. A alumina foi escolhida porque é material poroso, quimicamente inerte, de preparação relativamente fácil, de boa durabilidade e de custo acessível.

1.1 Objetivo do trabalho

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de membranas de alumina-alfa imobilizarem células de *Saccharomyces cerevisiae* e a viabilidade de seu uso em processos de fermentação etanólica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Imobilização

De acordo com JAIN et al. (1985), depois da crise do petróleo na década de 1970, a produção de etanol por fermentação mereceu especial atenção, tendo como maior interesse o desenvolvimento de tecnologias de produção por sistemas contínuos, para conseguir alta conversão dos substratos em álcool etílico e alta produtividade. Num sistema contínuo de fermentação etanólica, o custo da conversão do substrato em etanol corresponde a aproximadamente 80 % dos custos totais. Disso resulta que os custos de obtenção do etanol sejam determinados, principalmente, pelo preço do da matéria-prima usada. Daí, a disponibilidade de matérias-primas de baixo preço ser fator decisivo para desenvolvimento dos processos (LINKO & LINKO, 1983).

Não é fácil obter total conversão dos substratos e alta concentração de etanol, tanto em sistemas contínuos como descontínuos. Para CHIBATA et al. (1986), os processos contínuos apresentam problemas de estabilidade na operação e de eficiência de produção. Os novos processos com células imobilizadas parecem atrativos e promissores; a produção contínua por esse meio é superior aos processos convencionais.

HAMDY et al. (1990) desenvolveram uma técnica de produção de etanol com meio de material amiláceo, realizando-a em duas etapas subseqüentes. Na primeira o amido foi hidrolisado por bactérias e na segunda os açúcares obtidos foram fermentados pela ação de leveduras. Em ambas as etapas os microrganismos foram imobilizados em leito de esferas de alumina. As operações foram executadas, com bons resultados, em dois reatores dispostos em série, montados em seguida ao outro, inclinados a aproximadamente 15° em relação à horizontal. A combinação dos microrganismos levou a 85 % de eficiência na hidrólise do amido e a 97,5 % de eficiência na produção de etanol.

Lembram AMIN et al. (1983) que a quantidade de etanol produzida é influenciada pela rapidez da transformação de açúcar em álcool etílico, e que a concentração de subprodutos também atesta a eficiência da fermentação. De acordo com estes autores, nas fermentações descontínuas são consumidos de 3 a 5 % de glicose para produção de subprodutos durante a fase principal, mas nos sistemas de células imobilizadas esse gasto é menor, proporcionando um aumento na quantidade de etanol produzido.

A imobilização significa a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (CANTARELLI, 1989).

De acordo com TAMPION & TAMPION (1988), a imobilização pode ser definida como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro do agente imobilizador.

De acordo com MEERSMAN (1992), existem dois tipos de leitos para imobilização de células : os que fixam-nas internamente e os que as aderem à superfície. No segundo caso são encapsuladas em glóbulos ou fibras feitas de polissacarídeos, de proteínas ou de polímeros sintéticos. No primeiro, a fixação é conseguida por ligação direta, por ligações químicas, iônicas ou covalentes, ou indiretamente por sistemas de intercruzamento. Descrevendo a propriedade da DEAE - celulose (dietil amino etil celulose), útil material de suporte desta categoria, o autor lembra que ela é um fraco trocador iônico, material durável, inerte, não poroso. Suas partículas têm superfície específica baixa e forma suficientemente irregular para formar um trançado permeável, mas de alta resistência ao entupimento. Esse material é adequado para o propósito de imobilização; tendo mais afinidade com leveduras do que com bactérias, deve reduzir o risco de contaminação. As leveduras imobilizadas com DEAE-celulose são aplicadas na

maturação contínua de cerveja e na produção de cerveja livre de álcool ou de baixo teor alcoólico.

À medida que os estudos feitos com células imobilizadas foram avançando, observou-se que a imobilização de células é vantajosa em relação aos processos de imobilização de enzimas, pois evita o trabalho de extrair-las dos microrganismos para fixá-las em seguida, num suporte (CHIBATA et al., 1983). Segundo KOLOT (1980), nos processos onde há imobilização de células vivas, a reação de fermentação é acelerada por causa do aumento da concentração celular. Assim é possível conduzir a operação contínua sem descargas, atingir rendimento mais alto, eliminar fermentadores caros e exercer controle fácil e mais eficiente do processo fermentativo.

Quando os cofatores são necessários no processo fermentativo, o uso de células é preferível ao das enzimas imobilizadas, porque elas regeneram os cofatores. As células podem ser imobilizadas sem perda significativa de sua atividade catalítica, e sua estabilidade operacional e de armazenamento é alta. A preparação e utilização das células imobilizadas, como já foi dito anteriormente, são mais fáceis de executar do que de enzimas. As células são mais eficazes quando se trata de catalisar uma série de reações subseqüentes e têm a capacidade de regenerar os cofatores (DURAND & NAVARRO, 1978).

A imobilização eleva a atividade fermentativa da levedura (HOLEBERG & MARGALITH, 1981 e DURAN & BAILEY, 1986). Como ela já está adaptada ao sistema, ocorre eliminação da fase lag, diminui o risco de contaminação em altas concentrações de células, reduz a formação de subprodutos pelas células residuais, não há necessidade de remoção de células e de reciclo, tornando a extração do produto mais eficiente (maior rendimento em produto). Também há maior concentração de etanol no efluente (SHIOTANI & YAMANÉ, 1984), facilita o controle e o projeto (CHOTANI &

CONSTANTINIDES, 1984), permite trabalhar com menor volume do reator por causa das altas concentrações de células (GHOSE & BANDYOPADHYAY, 1980 e YAMINÉ & SHIMIZU, 1982) e reduz a produção de dióxido de carbono em relação às células livres, além de melhorar o produto final (BANDYOPADHYAY & GHOSE, 1982). Em sistemas imobilizados consegue-se maior massa de células por reator do que em sistemas descontínuos, contínuos e de recuperação de células trabalhando com células livres, e obtém-se maior produção de etanol. Não há necessidade de remoção das células ou de reciclagem e a extração do produto é mais eficiente (WILLIAMS & MUNNECKE, 1981).

De acordo com LEE et al. (1983), o sistema que usa células livres de leveduras é limitado, porque há perdas de células no fermentador e o produto final pode inibi-las, já que ficam em contato direto com elas. Por este motivo procura-se produzir etanol com células imobilizadas em reatores de coluna. Para chegar a esta conclusão os autores estudaram : 1- o efeito de reativação de células imobilizadas com nutrientes na produtividade em etanol; 2- o desempenho nos tanques agitados e em reatores de coluna; 3- efeito da inibição da glicose e do tempo de residência na produtividade e no rendimento em etanol; 4- efeitos da inibição de substrato e produto na atividade metabólica das leveduras; 5- efeito da operação do fermentador com células imobilizadas na produtividade de etanol. No experimento as células foram imobilizadas em alginato de cálcio. Nesse processo contínuo variaram o tempo de residência do meio de fermentação e a concentração de glicose para observar a produção resultante de etanol.

Conforme SITTON & GADDY (1980), as reações biológicas, incluindo a hidrólise, são geralmente lentas e há necessidade de selecionar um reator para acelerá-las. Os reatores de células imobilizadas permitem obtenção de alto desempenho porque

trabalham com altas concentrações de células fixadas nos suportes. Uma desvantagem é que o estado fisiológico dos organismos não pode ser controlado. Isto é particularmente prejudicial nos sistemas em que um metabólito primário ou secundário é o produto principal e produzido só na fase estacionária ou na final.

De acordo com HAMDY et al. (1990) há três motivos básicos para aceitar a imobilização de células : 1- reutilizar o hidrolisador por mais de um ciclo fermentativo; 2- usar um processo contínuo sem reciclo; 3- aumentar a estabilidade do biocatalisador em relação às variações de pH, temperatura, concentração de nutrientes ou do meio de produção e estresse mecânico (fluxo de gás, difusão dos gases produzidos).

MESSING & OPPERMANN (1979), afirmam que a imobilização de microrganismos, entre outros fatores, depende da dimensão das células a serem imobilizadas, do modo de reprodução e da dimensão dos poros do suporte. É necessário que aconteça aumento da concentração celular, pois estas se alojam dentro dos poros, ou seja, quanto mais células, mais imobilização terá. Estes autores observaram este fato a partir da imobilização de microrganismos que se reproduzem por cissiparidade, em comparação aos que se multiplicam por gemação. *Escherichia coli* e *Serratia marcescens* foram imobilizadas com adição de poli-isocianato e *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces amurcae* imobilizados por adsorção. Por meio de experimentos comparativos foi visto que os microrganismos que se dividem por cissiparidade exigem poros de um a cinco vezes maior do que as células que se multiplicam por gemação (como exemplo: leveduras), para as quais o poro tem que ser quatro vezes maior que as células a imobilizar.

SIESS & DIVIES (1981) estudaram o comportamento de células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em gel de poliacrilamida e verificaram que a imobilização no polímero pode chegar a destruir de 40 a 80% das células – valores que

dependem do estado fisiológico das mesmas. Estando em estado estacionário elas apresentam sobrevivência superior a 55% , mas em fase exponencial este valor passa a ser aproximadamente 22%. Dentro das partículas de gel a viabilidade da atividade fermentativa se comporta de forma heterogênea; grande parte tem baixa atividade. Entretanto, nos experimentos realizados pelos autores as células que se encontravam na superfície do gel mantiveram a capacidade de formar colônias com boa atividade fermentativa. PUNDLE et al. (1988), procuraram saber se a imobilização de células de leveduras em gel de poliacrilamida causaria redução de sua capacidade fermentativa. Comparando essa atividade com a de células imobilizadas em alginato de calcio, chegou à conclusão de que as primeiras citadas não perderam sua capacidade fermentativa após 10 ciclos. As esferas em poliacrilamida eram estáveis e não mostraram alteração aparente em sua estrutura.

PARASCANDOLA et al. (1987) estudaram a imobilização de células de leveduras para hidrólise contínua de sacarose, empregando fragmentos calcários vulcânicos porosos de 0,2 a 0,5 mm de diâmetro recobertos com uma fina camada de gelatina. O resultado foi praticamente o mesmo com grãos que não tinham gelatina, porém, os com gelatina conseguiram melhor adesão. Também foram feitos alguns ensaios, por estes mesmos autores, comparando dois grânulos recobertos de gelatina, um tratado com formaldeído e outro com glutaraldeído, que mostrou melhor desempenho.

Segundo DIVIES (1989) de maneira geral a atividade das células imobilizadas é maior que a de células livres, porém isto depende do tipo de suporte usado. Há casos em que mesmo reduzindo a atividade, o índice de conversão é maior que o com células livres, como na produção de etanol com *Saccharomyces carlsbergensis* com glicose. Trabalhando com células livres e enredadas, em condições particulares, o autor, obteve

menos quantidade de álcool etílico com células livres do que com células imobilizadas que produziram cinco vezes mais. A imobilização das células não perturba a viabilidade delas e, em determinados casos, parece favorecê-las. Fazendo comparação entre células livres e imobilizadas, o autor notou que as células imobilizadas não necessitam de freqüentes operações de purificação ou isolamento, procedimentos estes que interferem no processo e aumentam os custos.

Segundo NAGASHIMA et al. (1984), os materiais utilizados para a fabricação do suporte devem apresentar boa atividade como suporte, ser encontrados com facilidade e em abundância, ter baixo custo, oferecer baixo custo de imobilização, facilidade de operação em grande escala e ter resistência mecânica para uma longa vida operacional.

2.2 Métodos de imobilização

De acordo com KENNEDY et al. (1990) as imobilizações por ligação covalente e intercruzamento, em que ocorrem reações químicas entre biocatalisadores e suporte, onde se pode ter mudanças na conformação da molécula do biocatalisador, não devem ocorrer ou serem mínimas, para evitar parcial desativação. Isto requer condições brandas (condições que não afetem o pH do sistema, estrutura da partícula e liberação do biocatalisador para o meio) para não afetar a imobilização. Se esta é bem sucedida, a estabilidade operacional do produto será alta. A ligação covalente não é adequada para imobilização, porque a matriz não pode ser sempre regenerada. A ligação cruzada não é geralmente usada em imobilização em larga escala, porque a matriz não mostra estabilidade mecânica.

A adsorção física, quelação e ligações metálicas ou iônicas são métodos de imobilização atrativos, porque não são realizadas em condições severas. Por causa da debilidade das forças de ligação envolvidas, mudanças na concentração iônica,

temperatura, pH e/ou concentração do substrato do meio de fermentação podem promover perda de biocatalisador do suporte e resulta em baixa estabilidade operacional. No entanto, a possibilidade de regeneração significa que essa técnica é viável para uso industrial em alguns casos.

Com os métodos de enredamento é possível manter a atividade celular, pois não há ligações da célula com o suporte, mas a atividade celular pode ser limitada por efeito da difusão de substrato e metabólitos.

Embora a estabilidade de células não possa ser garantida em todo o processo de imobilização, a sua vantagem é o reuso do inóculo preso no suporte, maior pureza e rendimento de produtos. Estando no interior das células (que são o meio natural) as enzimas estão organizadas estruturalmente e a estabilidade operacional é garantida pela regeneração natural das células e, por vezes, pode ser aumentada. O material celular é mais barato que as enzimas e pode ser obtido em grandes quantidades. Não há necessidade de extração e purificação, os cofatores e coenzimas necessárias para a atividade enzimática já existem e as reações de regeneração associadas são também providas pelos processos metabólicos das células e podem ser esperados resultados econômicos mais favoráveis.

2.3 Imobilização com produção de etanol

SHABTAI et al. (1991) desenvolveram um sistema combinado composto de um reator com células de leveduras imobilizadas e de uma membrana, que denominaram de pervaporação, que reúne propriedades de permeabilidade e evaporação. O sistema objetiva produzir, separar e concentrar o etanol continuamente. Os dois circuitos integrados funcionam com o meio a fermentar fluindo através da camada de células imobilizadas, e o meio já fermentado com o etanol produzido, passando pela membrana. A operação funciona com parâmetros de pH, temperatura e vazão específica

determinados. A unidade de fermentação usada, de 2 litros de capacidade, com camisa, é dividida em cinco segmentos cheios com pérolas de poliacrilamida hidrazida (PAAH de 5 mm de diâmetro externo, incluindo a cápsula de alginato de cálcio, com sílica gel na formulação. A sílica-gel aumenta o peso específico e não impede a liberação do gás carbônico. O reator de células imobilizadas tem 1,5 litro de volume com 40 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro. O trabalho foi conduzido com melaço diluído e com meio sintético, com tempo de residência de 1,25 h, produtividade 10 g/L.h, durante 50 dias. A unidade de pervaporação foi construída com tubos de membrana de silicone de 60 cm de comprimento e um suporte de polissulfona. O efluente de fermentação circulou dentro dos tubos com área de 800 cm², com fluxo de 150 mL/h. O etanol foi removido na proporção de 20 – 30 g/h, com a aplicação de vácuo de 30 mb e recolhido em condensador. A remoção contínua do etanol reduziu seu efeito inibidor aumentou a produtividade e permitiu trabalhar com meios de até 40 % de concentração de açúcares em massa/ volume. Isso pode conduzir a maior produção de etanol com menos vinhaça. As folhas das membranas sofreram lavagem por reversão em pequenos períodos. O sistema trabalhou 50 dias, com dois módulos intercambiáveis, com produtividade de 20 – 30 g/L.h.

Foi estudada por TYIAGI & GHOSE (1982), uma fermentação rápida de melaço de cana-de-açúcar em processo descontínuo, contínuo com células livres e contínuo com células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em meio natural e retenção de 0,123 células /g de suporte. As fermentações foram conduzidas a 30°C e pH 5,0. O máximo de produtividade de etanol no sistema imobilizado foi de 28,6 g/L.h. A coluna de células imobilizadas trabalhou continuamente por 35 dias e produziu mais etanol que a de células livres. Foram estudados os efeitos inibidores do álcool nas células livres e nas imobilizadas, e o efeito inibidor do melaço, que foi maior do que na fermentação de

hidrolisado de bagaço. O rendimento do fermentador foi mantido acima de 92 % na fase estacionária, sem requerer mais entrada de células. Embora tenha melhor produção específica (g de álcool produzido/ h. g de leveduras contidas no fermentador em peso seco) e maior rendimento, o sistema imobilizado tem suas limitações, tais como : 1- ser difícil controlar o estado fisiológico das células; 2- grande volume do reator (19 %) ser ocupado pelo gás e 47 % pelo suporte. É necessário melhorar a retenção de células no suporte e achar uma forma de reduzir a retenção de gás, como também conseguir suporte com grandes densidades a granel e reduzir o volume das colunas.

BANDYOPADHYAY & GHOSE (1982), procuraram observar a fisiologia do crescimento e o metabolismo, da *Saccharomyces cerevisiae* pela da produção de gás carbônico, consumo de oxigênio, coeficiente respiratório e o tempo de geração da levedura imobilizada em diversos suportes. Foi feita a comparação com a atividade das leveduras livres e encontrada vantagem em relação ao tempo de geração das imobilizadas em todos os suportes usados.

De acordo com TYIAGI & GHOSE (1982), as células imobilizadas têm produção específica (g de álcool produzido/ h. g de leveduras contidas no fermentador em peso seco) e rendimento mais alto em etanol que as células em suspensão. Neste trabalho, os autores, usaram glóbulos de vidro de poros controlados (controlled pore glass – CPG) com área específica de 33,9 a 43,9 m² /g, na forma silanizada ou intercruzado com glutaraldeído. Da observação da atividade da levedura em diversos suportes notaram que apenas uma ofereceu resultados mais altos, possivelmente porque em alguns casos ocorreram multicamadas de células. A superposição desenvolve interfaces obscuras, aumentando a pressão interna nas células, resultando em maior liberação de etanol intracelular, o que foi confirmado pelos autores na publicação. De maneira geral, os suportes sólidos são aptos a concentrar os nutrientes na interface

líquido-sólido. Os microrganismos fixados são expostos a concentrações mais altas de nutrientes que os que existem livres. Quando as células se acham em presença de substratos mais concentrados há mudanças significativas das atividades enzimáticas relacionadas com a respiração, acompanham mudanças fisiológicas na estrutura mitocondrial e integridade das células. Em um suporte, as células mudaram para forma oval e no CPG para bastonetes longos. As mudanças na morfologia e integridade das células pode ser devida à instabilidade interfacial. O mecanismo molecular de turbulência interfacial cria alguns pontos de interferência, um turbilhão de fluxo de substrato, que leva a um aumento da concentração do meio a níveis mais altos que o de outros pontos da interface. Os turbilhões podem originar-se seja da formação de gotas, seja de desigualdades térmicas (particularmente na fermentação etanólica) no sistema ou quando o processo começa em movimentos associados com estímulos prévios. Na interface, a alta concentração do substrato expõe as células imobilizadas à repentina mudança na pressão interna. Esse fato causa a separação das células brotadas, através da superfície, seguida por súbita dessorção no efluente. A separação súbita da progênie causa mudança da morfologia nas células imobilizadas. No caso do CPG de menor área, as reduções das velocidades de absorção de oxigênio e liberação de gás carbônico são menos distintas, comparando com o glutaraldeído inter cruzado e quando comparado com CPG de maior área específica.

TAIPA et al. (1993) usaram a técnica de ressonância magnética num estudo de fermentação alcóolica, para comparar o metabolismo anaeróbio de células de *Saccharomyces bayanus* suspensas e enredadas em gel, em um sistema contínuo. A fermentação foi conduzida em um sistema de fermentação contínua. A determinação de glicose, de produtos de fermentação e da biomassa, foi feita por técnicas analíticas. Durante a fermentação, o pH intracelular das células imobilizadas manteve-se em um

valor constante, ao contrário das células suspensas, nas quais ocorre um decréscimo constante. Entre as células livres também há mais forte acidificação intracelular. Com as células imobilizadas houve maior produção de etanol, de biomassa e menos de subprodutos. O pH intracelular mais alto, alcançado na presença da matriz de gel, teve um efeito regulador no metabolismo, que favoreceu a produção de etanol.

Para ARCURI (1982) foi possível conseguir produção de álcool por *Zymomonas mobilis* imobilizada em um leito de fibras de vidro em um reator operando continuamente por 28 dias. A produção de etanol pode ser associada aos níveis de biomassa presentes no leito de imobilização. O autor distingue as fases exponencial, linear e estacionária de crescimento, e afirma que pode obter 6,4% de etanol e produtividade volumétrica de $152 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, resultados maiores do que os obtidos por LEE (1980) em reator contínuo agitado e reatores de película fixa, com reciclo de células que chegou a resultados da ordem de 6,0% da concentração de etanol no efluente, ou por MOO-YOUNG (1980) com *Saccharomyces cerevisiae* com 6,0% de etanol também. O autor cita a ocorrência do crescimento de bactérias floculantes que auxiliou os resultados finais. A certeza da afirmação foi conseguida pelo isolamento da bactéria do meio, para identificá-la através de isolamento em placa de Petri.

2.4 Imobilização de células em carragena

Segundo CHIBATA et al. (1986), o sistema de imobilização de células parece promissor para produção industrial de etanol e estima que K-carragena seja um bom suporte para isto. Segundo os mesmos autores, os melaços não conduziram a bons resultados por causa da baixa atividade enzimática e pouca estabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio. O enredamento de bactérias em alginato foi satisfatório para a produção de n-butanol e iso-propanol, assim como glicerol em K-carragena adicionado de sulfito de sódio, na produção de etanol. Para

CHIBATA et al. (1986) há muitas técnicas de imobilização mas não um método ideal e geral.

GODIA et al. (1987) estudaram o desempenho de uma coluna vertical de fermentação cheia com glóbulos de gel de carragena com leveduras imobilizadas. Os autores procuraram dar ênfase ao modelo matemático do comportamento do fermentador na fase de estabilidade, por meio de tanques em série. Eles incluíram o módulo cinético intrínseco, a transferência de massa externa e as condições de reações de difusão interna nos glóbulos.

2.5 Imobilização de células em alginato de cálcio

Conforme SMIDSROD & SKJAK-BRAEK (1990), a técnica mais amplamente usada para a fixação de células é o enredamento em alginato de cálcio, obtido pelo gotejamento de uma suspensão de células em alginato de sódio sobre uma solução com cátions multivalentes, comumente de cálcio. O gotejamento causa a formação de glóbulos de gel, que enredam as células em um novelo tridimensional de alginato, inter cruzado ionicamente. A maioria das células é suscetível a essa técnica de fixação, adequada para muitas aplicações na indústria, na medicina, na agricultura, para produção de álcool etílico, anticorpos monoclonais e células híbridonas. Qualquer catalisador de natureza coloidal pode ser imobilizado para uso em sistemas solventes, aquosos ou não. A imobilização não se restringe a enzimas em solução aquosa; é aplicável a células de leveduras, bactérias, algas, células vegetais e de mamíferos.

OGBONA et al. (1980) afirmam que a concentração máxima de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em um suporte de alginato é função da concentração inicial de microrganismos inoculados. Entretanto, SIMON (1989), estudando o mesmo sistema de imobilização obteve uma concentração final de 10^9 células de microrganismos imobilizados/cm³ inóculo inicial que diz não ser dependente da concentração inicial de

inóculo pois o suporte aprisiona a mesma quantidade de células a partir de inóculos de 10^3 a 10^8 células microrganismos/cm³ de inóculo.

GALLAZO & BAILEY (1989) fizeram ensaios colocando células de *Saccharomyces cerevisiae* suspensas e imobilizadas em alginato em contato com meio de glicose, para estudar o efeito da imobilização sobre elas, e observaram que a imobilização favoreceu significativamente a produção de glicerol e etanol. Durante a fermentação, os passos mais afetados foram o transporte de glicerol e a fosforilação. A velocidade da conversão talvez seja afetada pela mudança de sua regulação ou alteração na concentração dos fosfatos de influência nessas fases.

WHITE & PORTNO (1978) procuraram estudar a imobilização de células de leveduras em alginato de cálcio com a finalidade de buscar uma solução para a floculação das leveduras. No processo descontínuo, a fermentação decorreu da mesma forma, tanto para células livres como imobilizadas. O crescimento das leveduras não foi afetado pela imobilização mas os flocos desprendidos durante o processo de fermentação, ficaram menores. No processo de fermentação contínua em torres para produção de cerveja, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não pode ser usada porque ela se perderia por lavagem, daí a utilidade da imobilização. A torre funcionou durante sete meses consecutivos; o crescimento de leveduras continuou, mas não de forma significativa durante o período de operação. Visando a saber se bactérias poderiam ser imobilizadas junto com as leveduras, fez-se uso do mosto contaminado juntamente com um esterilizado. Houve uma rápida eliminação das bactérias para fora da torre e em pouco tempo a cerveja ficou livre de contaminação.

2.6 Imobilização de células em outros suportes

NAVARRO & DURAND (1977) usaram pérolas de vidro poroso para imobilizar *Saccharomyces carlsbergensis* e *S. uvarum*. Há adsorção se os poros do suporte são

grandes. A ativação da sílica por glutaraldeído leva as células a aderir à superfície e para isso são suficientes 15 minutos. A adsorção conduz à aceleração do metabolismo enquanto há um decréscimo de atividade das células pela ligação covalente. De qualquer forma, pela conversão da glicose há aumento do rendimento da produção de etanol e decréscimo da formação de CO₂. Eles mediram a formação do CO₂ por respirômetro de Warburg e a produção de álcool por cromatografia de ionização de chama.

KUMAKURA et al. (1992) imobilizaram células de leveduras em suportes porosos de terra de Kanuma, carvão ativado, celulose em pó e em monômeros hidrófilos, por polimerização por irradiação a baixa temperatura. A produtividade de etanol das células imobilizadas aumentou com o decréscimo da concentração de monômeros e com o aumento da concentração do suporte poroso. As células imobilizadas por copolimerização de dois monômeros (10% de metoxinonetilenoglicol e 10% de hidroxietilmetacrilato) e 30% de terra de Kanuma, conduziram a mais alta produtividade em etanol. As fermentações foram executadas com glicose obtida de hidrólise de restos de cereais, com caldo de cana e beterraba açucareira. Os reatores de células imobilizadas representam alternativa menos custosa e menos complexa do que os sistemas que usam recuperação de células. Nos reatores com células imobilizadas, o teor de etanol foi mais elevado que nos de células livres. O aumento da substância porosa aumenta o teor de álcool etílico porque aumenta a porosidade da matriz do polímero. A terra de Kanuma foi mais efetiva que a celulose em pó; a atividade das células nela imobilizadas permaneceu constante por longos períodos, com repetições em culturas descontínuas e o espaço poroso efetivo decresceu com a redução do tamanho das partículas.

RICHTER et al. (1989) procuraram imobilizar leveduras em suportes celulares estruturados, isto é imobilizar leveduras em células ocas e fibrosas das paredes de vegetais. O material era constituído de partes de plantas das quais o maior parte do conteúdo celular foi extraído. Musgos, lentilha d'água (planta aquática de nome científico *Lemna minor*) e tecidos parenquimatosos foram considerados adequados para imobilização de leveduras. Os espaços vazios intracelulares ou espaços deixados pelo material extraído, constituem câmaras ou espaços intercelulares que podem ser preenchidos com leveduras. A rede formada pelos tecidos e fibras impede o deslocamento das células e é suficiente para manter adequada concentração de células. Os musgos foram lavados com água, submetidos a tratamento com etanol e secos. Tecidos parenquimatosos de 3 mm de diâmetro, no máximo, foram obtidos pela secagem e moagem de fatias secas de beterraba residuais de usinas de açúcar, parênquima de maçãs e colmo de milho. Etanol aquecido a 60°C foi usado para lavar as partículas, que foram secas depois.

NAVARRO et al. (1982) estudaram a produção de álcool em um sistema aberto, heterogêneo, sem reciclagem de leveduras e de um só reator, usando medula de bagaço como suporte sólido. A concentração de células retidas foi elevada aumentando até o final do ensaio.

De acordo com KANELLAKI et al. (1988) afirmam que a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em γ -alumina torna mais rápida a cinética da fermentação etanólica, possivelmente por causa do aumento de células da levedura. Este fato foi também observado com *Zymomonas mobilis*, a ação catalítica das enzimas envolvidas no processo e porque os microrganismos estudados são mais ativos imobilizados do que na forma livre. Em todo os ensaios, com fixação em γ -alumina, houve menos açúcar residual e aumento do rendimento em etanol. A presença da γ -alumina é importante em

concentrações de glicose igual ou acima de 200g/L; possivelmente em presença de γ -alumina a fermentação possa vir a produzir concentrações relativamente altas de etanol. Os autores afirmam, ainda, que a γ -alumina contribui para aumenta a concentração celular final, o rendimento em biomassa, a velocidade de crescimento das células e a produtividade em etanol. O pH inicial do meio em fermentação com células imobilizadas em γ -alumina era 5,6; no final estabilizou-se em 4,8. Nos meios com células livres baixou até perto de 3,0. Entretanto as variações de pH não influenciaram particularmente o tempo de fermentação em meios fermentados com células livres e imobilizadas em γ -alumina. Concluíram que a γ -alumina não influenciou negativamente a fermentação de glicose com a levedura; ao contrário, mas contribuiu para aumentar a velocidade do processo. Os autores também assinalaram que o baixo custo da alumina torna-a atrativa para imobilizar *Saccharomyces cerevisiae*.

KOUTINAS & KANELAKI (1990) realizaram ensaios de produção de etanol usando *Zymomonas mobilis* imobilizada em esferas de γ -alumina. Os experimentos em sistema contínuo de fermentação foram conduzidos com um meio de fermentação de uvas passas obtido pela extração do açúcar por maceração das passas em água potável a 72°C durante quatro horas e enriquecido pela adição de sais de amônio, fósforo e magnésio. Os ensaios foram feitos com 460 mL de meio não esterilizado em um reator de 1.060 mL, fluindo continuamente durante 60 dias. Os autores concluíram que a γ -alumina serviu de modo satisfatório para imobilização das bactérias mas observaram que o aprisionamento das bolhas de gás carbônico entre as esferas de alumina foi uma desvantagem em relação ao rendimento das fermentações.

KOUTINAS et al. (1988) afirmam que, dentro de um reator, a imobilização pode levar ao aumento da concentração das células sem exigir inoculação de novas leveduras e, em decorrência, aumenta a velocidade e a produtividade da fermentação. Foi também

observado que as células imobilizadas em um suporte de γ -alumina produz mais gás carbônico que as células livres em menor tempo de fermentação. Foi possível fazer fermentações com os mesmos suportes por 10 vezes.

2.7 Imobilização de células em alumina

A alumina já foi testada com êxito, como suporte sólido viável para imobilizar enzimas e leveduras, em ensaios de produção de etanol a partir de um mosto amiláceo, em reator com enzimas imobilizadas para hidrólise do amido e com leveduras, para a fermentação do hidrolisado. Esferas de hidróxido de alumínio e membranas de alumina permitiram fácil imobilização de leveduras, sem perturbar suas propriedades fermentativas (HAMDY et al., 1990).

Material inorgânico, inerte, poroso, não prejudicial às leveduras, de obtenção relativamente fácil e custo acessível, foi escolhido pela sua durabilidade, estabilidade dimensional e porosidade controlada. Sua vida útil, se não ilimitada, é mais longa do que a dos suportes orgânicos mais comumente usados em testes com fermentação alcoólica (SANTOS et al., 1996,1997 e 1998).

SANTOS et al. (1996,1997) prepararam esferas de hidróxido de alumínio e membranas de alumina para tentar reproduzir as condições obtidas por HAMDY et al. (1990), pois as aluminas comerciais não apresentavam porosidade necessária para acomodar as células de levedura. Os ensaios foram bem sucedidos tanto com as esferas como com as membranas. As esferas e membranas com células imobilizadas, além da capacidade de imobilização, não perturbaram as propriedades fermentativas das leveduras.

Segundo HAMDY et al. (1990), a adsorção de células e o enredamento são métodos eficientes de imobilização de células. A adsorção é preferível porque é simples, enquanto o enredamento tem limitações quanto ao transporte de massa de meio de

fermentação até as células. Os suportes inorgânicos são mais vantajosos que os orgânicos pela durabilidade, densidade, estabilidade dimensional e controle de porosidade. Os autores fizeram um estudo comparativo de fermentação alcoólica contínua com 2 reatores, usando células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos, um vertical e outro quase horizontal, inclinado de 15°C em relação à horizontal, foram preenchidos com pérolas caneladas de alumina, de diversos diâmetros e tamanho de poros, contendo as células fixadas. O espaçamento de 1 a 6,5 mm entre os glóbulos, o ângulo de 15° e seis saídas para dióxido de carbono formado favoreceram o aumento da produtividade. O meio de malte, extrato de levedura e 16,7 % de glicose, alimentado à razão de 3 L/h, em duas colunas inclinadas montadas em série renderam 40 g/L.h de álcool. O fluxo de alimentação, pH, temperatura, nutrientes e teor de glicose influenciaram a produtividade. O sistema de células imobilizadas teve estabilidade operacional por 3 meses sem entupir e pode ser guardado por um ano sem perda de desempenho. Microfotografias eletrônicas mostraram as células imobilizadas na superfície e no interior dos poros.

O uso de materiais inorgânicos como suporte, de acordo com MOUEDDEB et al. (1996), tem suas vantagens pela facilidade de esterilização e limpeza. Estes autores utilizaram em processo contínuo um reator com membranas de alumina para conversão de lactose em ácido láctico com a imobilização de *Lactobacillus rhamnosus*. Este foi operado por 90 horas permitindo a conversão total do substrato do meio e o contato direto do produto com as membranas. Ao final os autores ressaltam que este processo é uma boa alternativa para uso industrial.

Conforme descrito por JUN-ICHI et al. (2000), a membrana de alumina pode ser usada como suporte para imobilização pois é mecanicamente forte e estável quimicamente. Em estudos anteriores, os autores usaram uma membrana de alumina

para imobilizar glucoamilase por meio de ligações covalentes entre amino grupos (da superfície da membrana) e a enzima. Nesse trabalho, os ensaios foram modificados de modo que os amino grupos no interior do poro da membrana, conseguindo, pelas ligações covalentes, que a glucoamilase fosse imobilizada internamente no suporte. Estes estudos foram realizados para verificar se havia alteração quanto à estabilidade da enzima, se localizada externa ou internamente ao suporte. Os resultados mostraram que a glucoamilase, quando imobilizada no interior, conserva sua atividade em uma ampla faixa de pH, em temperaturas consideradas altas para a enzima imobilizada na superfície da membrana.

HYNDMAN et al. (1992) usaram a adsorção química de compostos organofosforados em alumina para criar superfícies de ligação para imobilização de proteínas. Muitos suportes de alumina foram selecionados por suas propriedades físicas e capacidade de ligar compostos fosforados orgânicos. Duas aluminas foram escolhidas para serem testadas como leito para imobilização de proteínas. Papaína foi imobilizada nesses suportes quando complexada com compostos fosforados com grupos carboxílicos terminais livres. A ligação da proteína foi estimulada com 1-etil-3 (3-di metil amino propil) carbodiimida. O nível de imobilização da papaína dependeu do comprimento do ligador usado e da massa de proteína exposta ao suporte. Foram usadas matrizes orgânicas e inorgânicas. Sílica e vidro poroso foram os suportes usados pela facilidade de controlar a porosidade e para introduzir grupos funcionais reativos, por meio de compostos silânicos, mas dissolução de sílica em pH alcalino é um problema. Os leitos de sílica silanizados exigem uma complexa técnica para garantir reprodutividade, com necessidade de refluxo em solventes orgânicos com umidade controlada. Contrariamente, os ligadores, acopladores fosfatos, podem ser adicionados em lotes, cargas, ou em colunas de recirculação em meios aquosos, simplificando a

preparação de suportes de imobilização. A alumina é pouquíssima solúvel em pH 10 e provê a estabilidade necessária, mas para explorar as suas vantagens potenciais acredita-se que as interações alumina e fosfato requerem maior caracterização com vistas à imobilização desejada. Uma característica da superfície dos óxidos e hidróxidos de alumínio é a forte adsorção de ânions, que ocorre nos sítios catiônicos, na superfície do óxido, que são os resultados tanto dos hidróxidos protonados como dos cátions de alumínio expostos. Estes sítios são correlacionados com a aresta do cristal de hidróxidos ou com regiões imperfeitas, causadas por desidratação durante a formação dos óxidos. Foram usados diversos fosfatos orgânicos com grupos funcionais que puderam ser usados diretamente, ou depois de algumas modificações, com pontos de atrelamento para imobilizar a proteína. As aluminas foram escolhidas por causa do diâmetro útil dos poros.

De acordo com BEKERS et al. (2001), a origem do uso de alumina como suporte imobilizador de microrganismos teve seu início na Grécia. Os autores fizeram uma comparação entre células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alumina e observaram que houve formação de colônias de *Zymomonas mobilis* dentro dos poros de alumina, usando o mesmo suporte por várias vezes. Os autores também verificaram que a alumina pode ser usada como suporte para imobilizar microrganismos, pois se manteve estável, enquanto que as esferas de alginato de cálcio foram destruídas depois de 4 a 5 dias por causa do acúmulo de levânio e fructanas em seu interior provocando o aumento de volume e estouro das esferas. As esferas de alumina não sofreram o mesmo efeito.

COSTA et al. (2001) isolou catalase de *Bacillus sp*, que foi imobilizada por ação covalente em alumina silanizada com auxílio de glutaraldeído. A quantidade de enzima imobilizada foi medida indiretamente pela quantidade de proteína presente no suporte.

Também foi medida a atividade do imobilizado por longo período de tempo, para comparar a ação da enzima imobilizada e livre em solução, e a produção de produto final. Com relação à atividade das diferentes formas de enzima (imobilizada e livre) os autores mediram-na em diferentes pHs e temperaturas e constataram que a enzima imobilizada tem alta atividade em pH 11,0 a 30°C.

Ao final do artigo os autores afirmam que o suporte é adequado, pois garante a estabilidade da enzima mesmo em pH elevado e temperaturas altas.

Para INLOES et al. (1983), o desenvolvimento de reatores microbianos de larga escala tem sido limitado, na maior parte das vezes, por causa da dificuldade de manter estáveis as culturas de células por longos períodos de tempo. Para os autores, as técnicas de imobilização de células dentro ou sobre um suporte sólido aumentam a possibilidade de seu uso em reatores bioquímicos, melhoram a estabilidade do catalisador e permitem trabalhar com maiores concentrações de células do que as suspensões convencionais, o que resulta em maior produtividade do reator.

KENNEDY et al. (1990) afirmam que há muito a estudar ainda, pois as tecnologias de imobilização de biocatalisadores estão dependendo da solução de muitos problemas, muitos deles de biosistemas imobilizados adaptados à produção em larga escala.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os materiais constituíram-se dos suportes para imobilização, dos meios de fermentação, do inóculo e dos fermentadores.

3.1.1 Suporte sólido

O leito para imobilização é constituído por membranas assimétricas de alumina preparadas como descrito por SANTOS et al. (1998), usando dispersões aquosas contendo pseudoboemita fibrilar e hidróxido acetato de alumínio. Elas foram obtidas pela reação química entre alumínio em pó ALCOA123 e solução aquosa de ácido acético. A relação em massa de Al:Hac deve ser 1:1,5 (em massa) e o tempo de reação de 48 a 72h a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A dispersão é colocada em moldes cilíndricos de polipropileno com 7,0 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura. As membranas são formadas por evaporação livre à temperatura ambiente; a evaporação forçada provoca-lhes empenamentos e trincas macroscópicas; com esse procedimento, membranas planas de até 9,0 cm de diâmetro e 3,0 mm de espessura e com massa variável de $1,0 \pm 0,2$ a $2,0 \pm 0,2$ gramas, podem ser facilmente obtidas. Após este procedimento, onde já se tem a membrana formada, ela segue para a etapa de incineração. No caso do projeto, as membranas sofreram calcinação a 1150°C por 4 horas.

As membranas foram preparadas no laboratório de cerâmica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

3.1.2 Meios de fermentação

Os ensaios foram executados com meio sintético, melão e caldo de cana-de-açúcar. Todos foram preparados pela diluição da matéria prima e correção por adição de nutrientes. A seguir foram distribuídos em frascos Erlenmeyer fechados com tampões de algodão e esterilizados a 121°C por 15 minutos.

No trabalho foram distinguidos os meios para as primeiras observações e para ensaios de fermentação propriamente ditos.

Os meios para as primeiras observações foram usados para se conhecer o comportamento das leveduras imobilizadas, e foram preparados com concentração de sólidos de 7-9°Brix. Os meios usados nos ensaios de fermentação, foram preparados com concentração de 15 a 22% de sólidos solúveis e as correções de acidez e nutrientes foram as mesmas para todos os meios, nas diversas concentrações de açúcares.

Meio sintético

Foi considerado como meio sintético o preparado com Gludex, xarope de açúcar invertido fabricado e gentilmente cedido pela Usina São Luiz de Piraçununga, SP, com a seguinte composição :

Brix.....	75,0 ° Brix
Açúcares redutores totais.....	73,8 g/100 g de Gludex
Açúcares redutores.....	44,0 g/100 g de Gludex
Sacarose.....	28,3 g/100 g de Gludex

O meio sintético de fermentação foi obtido pela diluição de xarope de açúcar invertido com água potável e adição, por litro de meio, de 3,0 gramas de mistura de nutrientes composta de : $1,0 \pm 0,1$ g de fosfato de amônio bibásico, $35,0 \pm 0,1$ g de tartarato neutro de amônio, $2,0 \pm 0,1$ g de sulfato de magnésio, $5,0 \pm 0,1$ g de sulfato de cálcio, $0,30 \pm 0,01$ g de cloreto de sódio, $25,0 \pm 0,1$ g de ácido tartárico (LEME, 1965). A correção do pH para 4,5 foi feita com solução de ácido sulfúrico 2N. Depois de distribuído em frascos Erlenmeyer de 2 000 mL, devidamente tampados com algodão, foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Depois de frio recebeu $1,0 \pm 0,1$ mL de solução de vitaminas preparadas com $1,0 \pm 0,1$ g de tiamina, $1,0 \pm 0,1$ g de ácido pantotênico e $0,10 \pm 0,01$ g de ácido fólico dissolvidos em 10 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração em membrana milipore de 0,22µm.

Meio de melaço

O meio de melaço foi preparado pela diluição com água potável, de um mel final de usina de açúcar com a seguinte composição:

Brix	79,5 ° Brix
Açúcares redutores totais.....	75,4 g/100 g de meio
Açúcares redutores.....	20,8 g/100 g de meio
Sacarose.....	51,9 g/100 g de meio

Meio de caldo de cana-de-açúcar

O meio de fermentação foi obtido pela diluição com água potável, de caldo de cana comprado na zona urbana, que apresentou 21°Brix, 0,50 g de açúcares redutores/100 mL de mosto, 14,8 g de açúcares redutores totais/100 mL de mosto e 13,6 g de sacarose/100mL de meio. O caldo de cana foi clarificado. Primeiramente foi colocado a ferver e, em seguida, foram adicionados $2,0 \pm 0,1$ gramas de bentonita para cada litro de meio como auxiliar de decantação dos sólidos em suspensão; depois de frio foi filtrado em camada de celulose, e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Não foi feita a correção de pH, que, ao natural, acusou 5,36.

3.1.3 Inóculo

O agente de fermentação foi o *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1830, fornecido em culturas puras pelo Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Esta cepa foi escolhida entre duas, IZ-1830 e IZ-1904, que por muitos anos foram fornecidas pelo Departamento para indústrias de aguardente e álcool no Estado de São Paulo. A escolha da cepa foi feita por meio de ensaios de fermentação em meio sintético, comparativos entre as leveduras IZ-1830 e IZ-1904.

A seleção foi feita pela comparação da velocidade e volume de produção de gás carbônico das duas cepas em testes de fermentação de meio sintético, com 5% de açúcares fermentescíveis, enriquecido com $1,0 \pm 0,1$ g de fosfato de amônio e $1,0 \pm 0,1$ g

de extrato de levedura por litro de meio. O meio foi distribuído em 6 tubos de ensaio de 15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro externo, cada um deles contendo 10 mL do meio e um tubo de Durhan de 5 cm de comprimento e 0,4 cm de diâmetro interno, calibrados com marcas no vidro, feitas distantes 0,5 cm uma da outra, criando uma escala arbitrária para permitir avaliar o tamanho da bolha de gás que se acumularia no seu interior.

Os tubos de ensaio, fechados com tampões de algodão, foram esterilizados a 121°C por 10 minutos.

Após a esterilização, os tubos foram inoculados (3 com IZ-1830 e 3 com IZ-1904) com 1,0 mL de uma suspensão de leveduras preparada como segue:

As leveduras em exame foram multiplicadas em meio de laboratório por fermentação de um meio de caldo de cana diluído a 5° Brix conforme LIMA et al. (2001). Após a multiplicação, os meios fermentados foram filtrados em papel de filtro em câmara de repicagem para reduzir o perigo de contaminação. Depois de todo o líquido da suspensão de células terminar de escorrer foi retirada uma alíquota de $1,0 \pm 0,1$ g de massa de células retida no filtro, pesada em folha de alumínio em balança analítica e transferida para um tubo de ensaio com 5 mL de água destilada esterilizada. A massa de células transferida foi ressuspensa por forte agitação durante 30 segundos e da suspensão foi retirado 1 mL para inocular cada tubo de ensaio contendo o tubo de Durhan. Cada alíquota de 1 mL para cada tubo foi retirada após nova agitação da suspensão. Após a inoculação, os conjuntos de três tubos com a suspensão de cada cepa foi colocado em estufa a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.1.4 Fermentadores

Os ensaios foram feitos em sistema descontínuo, em recipientes de volumes diversos escolhidos entre a vidraria comum de laboratórios (erlenmeyeres de 1,2 e 4 L),

potes de vidro adquiridos no comércio, de 4 000mL de capacidade e fermentador especialmente construídos para o projeto, representado na Figura 1.



Figura 1 - Fermentador com seis saídas laterais para o dióxido de carbono e uma entrada no fundo. Reator de 10 cm de diâmetro externo e 55 cm de altura. Ao lado esquerdo encontra-se o cartucho com 9,5 cm de diâmetro externo e 20 cm de comprimento, para conter as membranas com células imobilizadas para a fermentação.

3.2 Métodos

Os métodos seguidos para execução do trabalho normatizaram as operações desenvolvidas.

3.2.1 Preparo do inóculo

O inóculo usado nos ensaios de fermentação foi uma suspensão de células multiplicadas a partir das culturas puras, de acordo com a técnica descrita por LIMA et al. (2001), em etapa de laboratório.

3.2.2 Imobilização

Neste trabalho, a imobilização das leveduras seguiu a técnica descrita por SANTOS et al. (1998). Os suportes de alumina foram submersos em um meio de cultura e esterilizados conjuntamente em autoclave a 121°C por 15 minutos. Pelo aquecimento

durante a esterilização, o ar era expulso do interior dos poros das membranas e, após o esfriamento, o meio penetrava em seus poros. Em seguida foi feita a inoculação do meio com uma suspensão de células de leveduras (IZ-1830) que fermentam o meio do recipiente contendo os suportes e o do interior dos poros, onde se fixam.

Em um outro reator usado no processo, construído à semelhança do de HAMDY (1990), a esterilização foi executada por uma técnica diferente, mas também eficaz. O aparelho construído de material acrílico, não suporta temperaturas altas em autoclave; para efetuar a esterilização as membranas foram colocadas no reator que foi cheio com etanol a 70% em volume e deixado em repouso por 24 horas, com os orifícios de saídas fechados. Após este período, o álcool foi drenado e o reator, com os orifícios tampados com algodão, foi colocado em estufa a 45° C por 24 horas, para eliminação do álcool. Após esse tempo, o reator, já com as membranas, foi cheio com meio de fermentação previamente esterilizado em autoclave e resfriado à temperatura de 65° C. Este meio quente causou a expulsão do ar ocluso nas membranas dando lugar à penetração do meio de fermentação após o resfriamento à temperatura ambiente.

Em seguida, o meio a $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foi inoculado com um volume aleatório de uma suspensão de leveduras que o fermentaram até o esgotamento dos açúcares, causando, em consequência, a fixação das células no interior dos poros pelo seu acesso pela fermentação do meio no interior das membranas (SANTOS et al, 1996).

3.2.3 Fermentação

Após a imobilização das células, as membranas eram retiradas, enxaguadas com água destilada esterilizada e colocadas em contato com novo meio de fermentação esterilizado. A nova fermentação foi feita em erlenmeyeres de 1L de capacidade e no fermentador de acrílico, ambos com temperatura controlada: nos erlenmeyeres em estufa a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e, no reator, submergindo-o em banho de água nessa temperatura.

A colocação dos meios nos fermentadores contendo as membranas com células imobilizadas, foi feita em câmara de repicagem, para reduzir o risco de contaminação com microrganismos estranhos, como *Candida tropicalis*.

O processo foi acompanhado pelas leituras refratométricas de grau Brix, determinação de álcool e açúcares.

Ao final de cada fermentação, o mosto fermentado era drenado e os suportes lavados novamente com água destilada esterilizada. Essas operações não eram feitas em condições estéreis, mas a transferência de novo mosto era realizada com técnica bacteriológica, ao lado de chama de bico de Bunsen, em câmara de repicagem, como dito anteriormente.

Após a lavagem do suporte, era adicionado um novo mosto esterilizado. A lavagem era feita para remover o máximo de células remanescentes na superfície do suporte, permitindo o início de uma nova fermentação somente com as células imobilizadas no seu interior. A lavagem com água, ainda que não se possa garantir a remoção total das células da superfície, foi suficiente para remover células que se depositaram no exterior das membranas. As que sedimentaram no fundo do reator foram removidas por lavagem, antes de nova fermentação. Foi essa a melhor forma encontrada para repetir os ensaios, buscando verificar o potencial de retenção do suporte. Ao final do processo o meio fermentado era drenado e destilado para se obter o etanol formado.

3.2.4 Quantificação de leveduras presas no suporte

Foi feita por dois métodos. Um pela determinação de nitrogênio orgânico e o segundo por pesagem. O primeiro utilizou a técnica de Kjeldahl para determinação de nitrogênio. Neste método, o nitrogênio da amostra é transformado em amônia, que é separada por destilação e dosada por titulometria. O método, que é executado em três

etapas, digestão, destilação e titulação, neste trabalho seguiu as normas da AOAC (1995).

Fragmentos de membranas, com e sem imobilização, foram colocados para digerir e depois submetidos às demais fases do método.

◆ **Determinação da quantidade de leveduras pelo método de Kjeldahl**

O método foi executado após a padronização dos reagentes.

⇒ **Padronização dos reagentes**

⇒ **Padronização de NaOH**

Titulação com biftalato

$$N^{\circ} \text{ equivalentes biftalato} = N^{\circ} \text{ equivalentes NaOH}$$

$$N_{\text{biftalato}} * V_{\text{biftalato}} = N_{\text{NaOH}} * V_{\text{NaOH}}$$

$$\frac{\text{Massa de biftalato}}{E_{\text{biftalato}}} = N_{\text{NaOH}} * V_{\text{NaOH}}$$

$$E_{\text{biftalato}} = 204,22 \text{ eqg}$$

⇒ **Padronização de HCl**

Titulação com NaOH

$$N^{\circ} \text{ equivalentes HCl} = N^{\circ} \text{ equivalentes NaOH}$$

$$N_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}} = N_{\text{NaOH}} * V_{\text{NaOH}}$$

Calculo da massa de nitrogênio :

$$M_{\text{nitrogênio}} = N_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}} * E_{\text{nitrogênio}}$$

$$M_{\text{nitrogênio}} = N_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}} * 14,06$$

Calculo da massa de proteína :

$$100 \text{ g proteína} \longrightarrow 16 \text{ g de nitrogênio}$$

$$X \text{ g de proteína} \longrightarrow M_{\text{nitrogênio}}$$

Percentagem de proteína :

$$P\% = (M_{\text{proteína}} / M_{\text{amostra}}) * 100$$

O segundo método foi executado em uma única etapa. As membranas secas ainda não submetidas à imobilização de leveduras ou a um processo fermentativo, foram em estufa a 100-105°C por 24 horas e pesadas. Depois da imobilização da levedura como descrito por SANTOS et al. (1998), as membranas foram lavadas externamente com água destilada, esterilizada, resfriada e colocadas em uma estufa a 100-105°C, por 24 h, para eliminar toda umidade. Ao final, os suportes são resfriados em dessecador e novamente pesadas; a diferença das pesagens entre as membranas com e sem células indicou a massa de leveduras secas imobilizadas nos poros do suporte.

3.2.5 Exame dos suportes por microscopia de varredura

A imobilização das leveduras nas membranas foi feita também detectada por exame de microscopia eletrônica de varredura. O método permite visualizar os poros das membranas e as leveduras aí alojadas. Entretanto não permitem quantificá-las, o que deve ser feito pelos métodos citados no item precedente.

3.2.6 Acompanhamento da fermentação

Os ensaios de fermentação foram acompanhados pelo decaimento do teor de sólidos solúveis por refratometria, pela facilidade e economia do meio de fermentação. Entretanto houve determinação analítica de açúcares fermentescíveis no início e no final da fermentação e no final, também a determinação analítica do etanol formado, para avaliação do rendimento.

3.2.6.1 Determinação do teor de açúcar fermentescível

A determinação de açúcares fermentescíveis totais (AFT) foi feita no meio a fermentar e no meio fermentado pelo método de Fehling após a inversão da sacarose por via ácida, segundo LEME & BORGES (1965). A avaliação da redução de açúcar

durante o período de fermentação foi acompanhado por determinação de °Brix por refratometria.

3.2.6.2 Determinação do teor de etanol

O teor de etanol foi determinado por dois métodos. Para o acompanhamento da fermentação foi feito por meio de ebulioscópio, para economizar o meio em fermentação, usando apenas 15 mL. O teor final foi feito por destilação do meio, determinação da densidade do destilado a 20°C por meio de picnômetro e obtenção do grau alcoólico em tabelas próprias.

3.2.7 Determinação da quantidade de células desprendidas durante a fermentação

A massa de células depositada no fundo do reator era calculada como segue : Após a fermentação, todo o meio era filtrado em papel de filtro previamente seco a 65° C por 5 horas e pesado; o material celular retido e o papel eram lavados com 250 mL de água destilada e depois, secos a 65° C pelo mesmo tempo e depois pesados. Subtraída a massa inicial do papel, era obtida a massa de células depositadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção das leveduras

Numa fermentação industrial, é comum serem usadas leveduras de panificação pela facilidade de preparo de inóculo, porém essas leveduras não são puras.

Para a imobilização foi considerada importante a fixação de uma única cepa sobre o suporte para garantir que os ensaios de fermentação fossem conduzidos com uma levedura selecionada, sem os riscos de alteração da flora microbiana no meio fermentativo. De acordo com LIMA et al. (2001) a população das leveduras selecionadas usadas em um processo fermentativo, ao longo do período de reutilização do agente da fermentação, sofre alteração e toma características específicas da região de trabalho. Ao contrário, uma cepa de levedura pura imobilizada deverá manter-se inalterada durante longo tempo de safra.

Os resultados do presente trabalho concordam com a afirmação de DIVIES (1989) que a imobilização das células torna desnecessários a purificação ou isolamentos durante as fermentações. Entretanto, neste trabalho ocorreu contaminação com *Candida* em uma etapa de imobilização, o que recomenda proceder a imobilização das células puras de de levedura em ambiente isento de contaminação.

Durante a produção de cerveja em uma torre de fermentação com células imobilizadas em alginato de cálcio, WHITE & PORTNO (1978) conseguiram eliminar uma contaminação bacteriana mas no presente trabalho ao contrário daqueles autores, a eliminação da levedura contaminante foi conseguida após calcinação das membranas, que puderam ser reaproveitadas para nova imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* sem danos.

Algumas incongruências encontradas no presente trabalho, como a variação do tempo de fermentação usando membranas de alumina, podem ser aceitas, em face a

informações conflitantes encontradas na bibliografia tais como o citado por SIESS & DIVIES (1981) que de 40% a 80% de células imobilizadas em gel de poliacrilamida são destruídas pela imobilização; mas partículas de gel, a viabilidade das células se comporta de forma heterogênea, sobretudo as do interior, porque as da superfície mantiveram a capacidade de formar colônias com boa atividade fermentativa. Entretanto PUNDLE et al (1988) refutaram, em parte, esta afirmação.

PARASCANDOLA et al. (1987) imobilizaram células em fragmentos de calcário vulcânico, com e sem adição de gelatina, e informaram que nestas o desempenho parece ter sido melhor. HAMDY (1990), em comunicação pessoal, após saber de certos insucessos com a imobilização em pérolas de alumina por falta de poros adequados, sugeriu adicionar glutaraldeído aos suportes, mas não pareceu adequado assim proceder, neste trabalho, pois a tecnologia não parece viável para aumento de escala.

Das duas cepas testadas, IZ-1830 e IZ-1904, a escolha recaiu sobre a identificada com IZ-1830. Essa levedura fermentou o meio e produziu o máximo volume de dióxido de carbono em menor tempo, diferentemente da outra, que não produziu gás carbônico suficiente para encher o tubo de Durhan no período do ensaio. A levedura IZ-1830 em 72 horas conseguiu, nos três tubos de ensaio produzir mais CO₂, suficiente para preencher todo o espaço do tubo de Durhan, enquanto a levedura IZ-1904, nas mesmas condições, não preencheu mais de 60% do tubo com o CO₂ desprendido. Esses resultados levaram à escolha da cepa IZ-1830. A Tabela 1 ilustra as diferenças entre elas.

Tabela 1 – Tamanho das bolhas de dióxido de carbono aprisionadas nos tubos de Durhan, nos testes de seleção da cepa em tubos de ensaio, utilizando meio sintético como fonte de açúcar.

Levedura	Volume de inóculo no tubo de ensaio	Dimensões das bolhas em centímetros *		
		24 horas	48 horas	72 horas
IZ-1830	1mL	0,5	2,5	5,0
IZ-1904	1mL	0,0	1,0	3,0

* média das leituras de três tubos de ensaio

4.2 Escolha do meio de fermentação

Os resultados das fermentações expressos pelo rendimento em etanol em cada ensaio nas Tabelas de 2 a 10, orientaram a escolha do meio de fermentação.

Há alguns ensaios que contém poucos pontos na fase mais importante, mas o resultado final mostra que foi viável a imobilização das células em alumina.

Tabela 2 – Primeiro ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	17,7	13,5	0,0
24	15,0	7,8	1,5
48	11,7	2,0	5,4
72	11,2	1,4	5,7
120	11,0	1,4	5,9

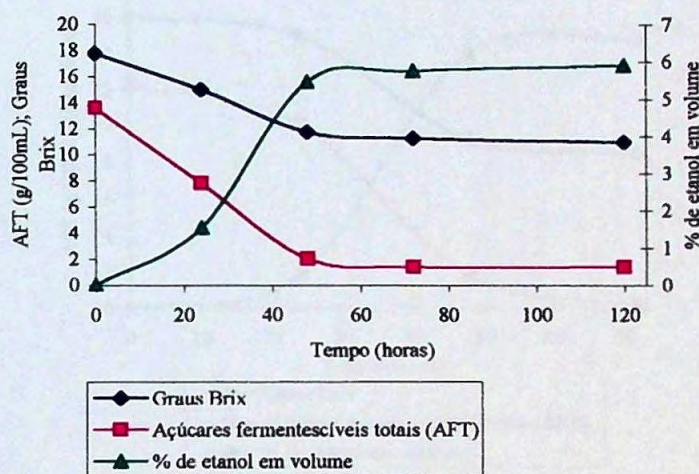


Figura 2 – Acompanhamento da primeira fermentação descontínua em meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

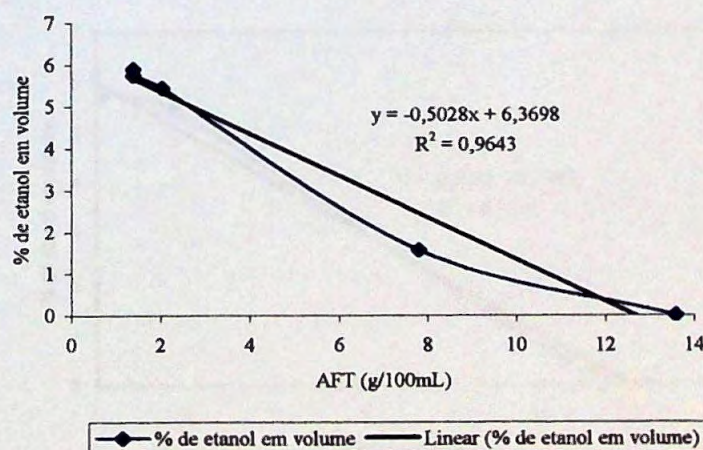


Figura 3 – Regressão linear do primeiro ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado em função da quantidade de açúcar fermentescível total existente no meio de melaço a fermentar.

Tabela 3 – Ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	16,0	12,3	0,0
24	15,0	10,1	0,7
48	9,2	1,7	5,4
72	8,5	0,1	5,7

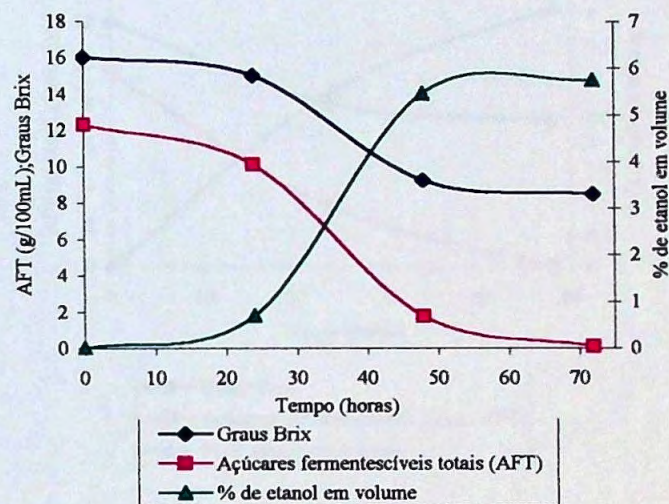


Figura 4 – Acompanhamento da segunda fermentação descontínua com meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

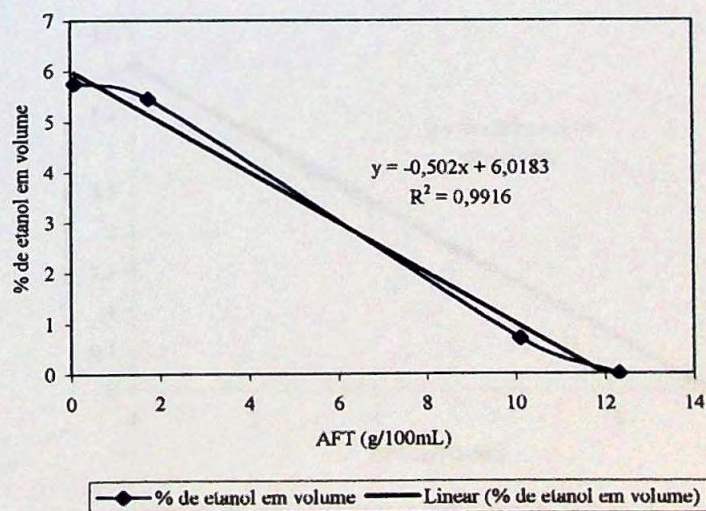


Figura 5 – Regressão linear do segundo ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado versus açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Tabela 4 – Terceiro ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	12,0	9,5	0,0
24	8,0	2,9	2,7
48	7,2	0,05	4,1

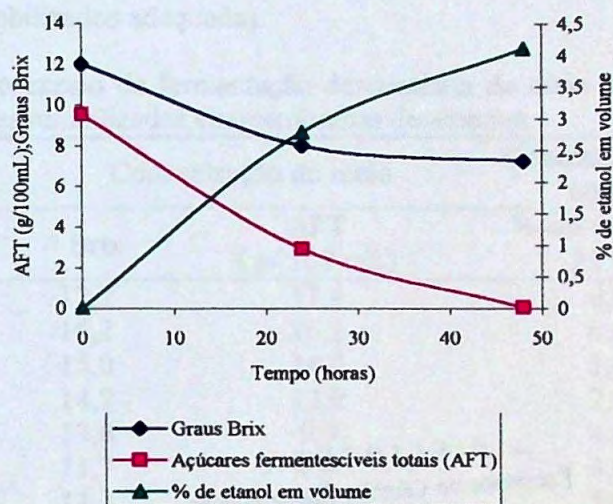


Figura 6 – Acompanhamento da terceira fermentação descontínua com meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

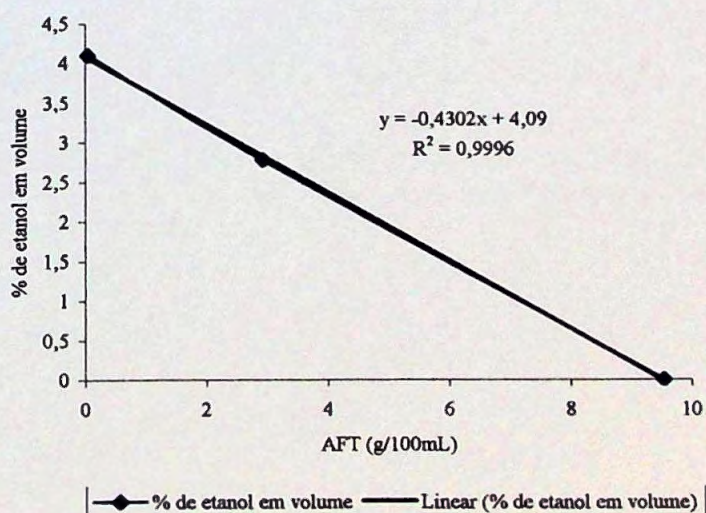


Figura 7 – Regressão linear do terceiro ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Devido ao tempo muito prolongado do início ao final do processo, para a tabela 2, 3 e 4 a fermentação não é adequada para comparar com uma produção de etanol industrial, mas é aceitável para ensaios em que não se sabia a quantidade de células em trabalho (pois o processo de fermentação era feito com células imobilizadas, e ainda, nesta etapa, não havia o desenvolvimento de uma técnica de quantificação de microrganismos imobilizados adequada).

Tabela 5 – Primeiro ensaio de fermentação descontínua de meio de xarope de açúcar invertido com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/ 100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	17,2	17,4	0,0
24	16,2	16,2	0,4
48	15,0	14,0	1,6
72	14,2	12,0	2,6
120	13,0	9,9	4,0
144	11,7	7,9	4,9
168	11,2	7,0	5,0
192	11,0	6,9	5,1
216	10,5	6,7	5,4
288	9,2	5,3	6,0

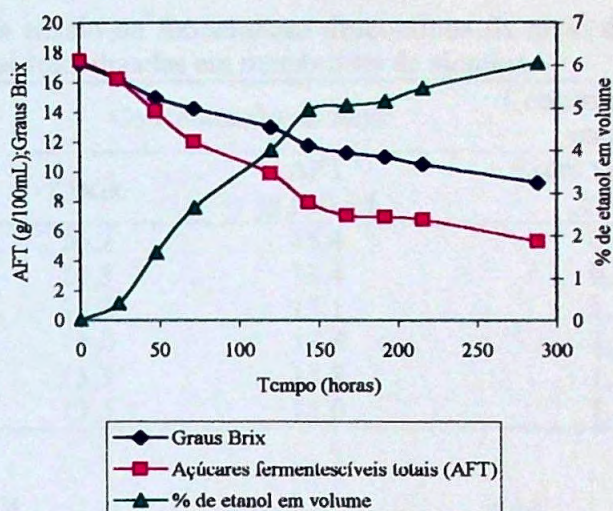


Figura 8 – Acompanhamento da primeira fermentação descontínua com meio de Gludex, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

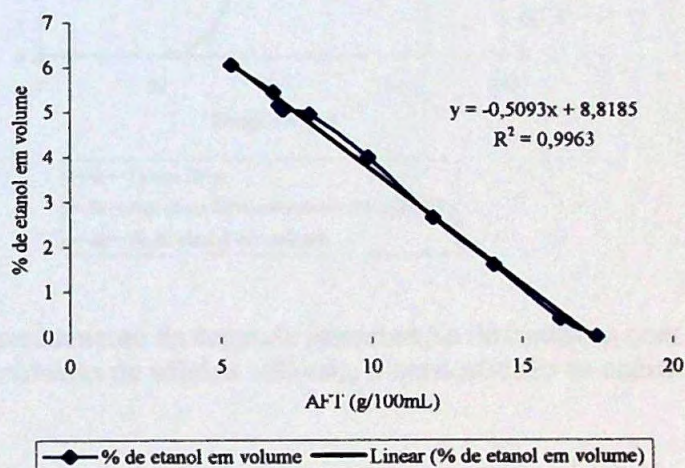


Figura 9 – Regressão linear do primeiro ensaio de fermentação descontínua em meio sintético, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Tabela 6 – Segunda ensaio de fermentação descontínua de meio de xarope de açúcar invertido com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/ 100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	16,2	15,4	0,0
72	14,5	13,4	0,1
96	14,2	13,1	1,1
120	14,0	12,5	1,1
168	13,7	11,8	1,2
192	13,5	11,0	1,2

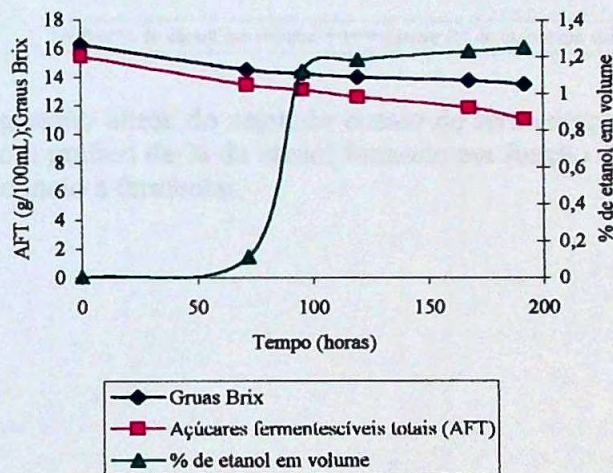


Figura 10 – Acompanhamento da segunda fermentação descontínua com meio sintético, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

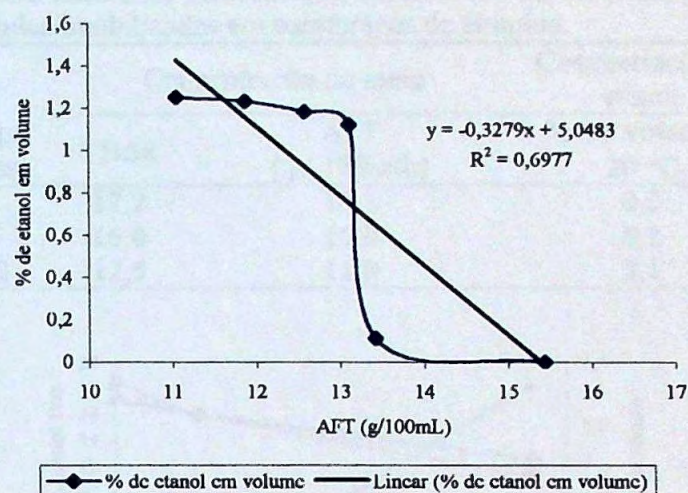


Figura 11 – Regressão linear do segundo ensaio de fermentação descontínua em meio sintético, usando o gráfico de % de etanol formado em função do açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Tabela 7 – Terceiro ensaio de fermentação descontínua de meio de xarope de açúcar invertido com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/100 mL)	% em volume a 20 °C
0	17,2	18,5	0,0
24	16,0	16,0	0,1
120	12,5	11,0	3,1

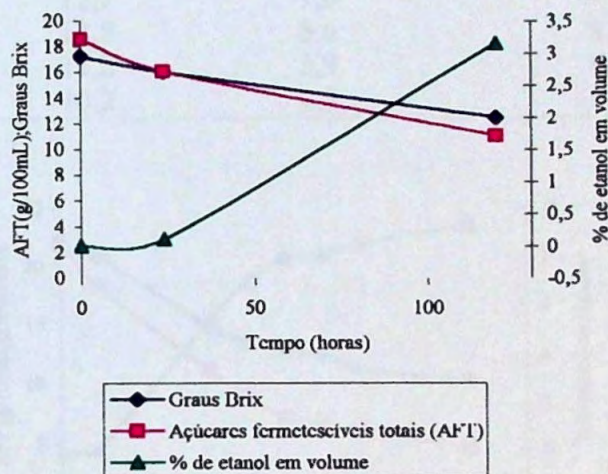


Figura 12 – Acompanhamento da terceira fermentação descontínua de meio de xarope de açúcar invertido, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

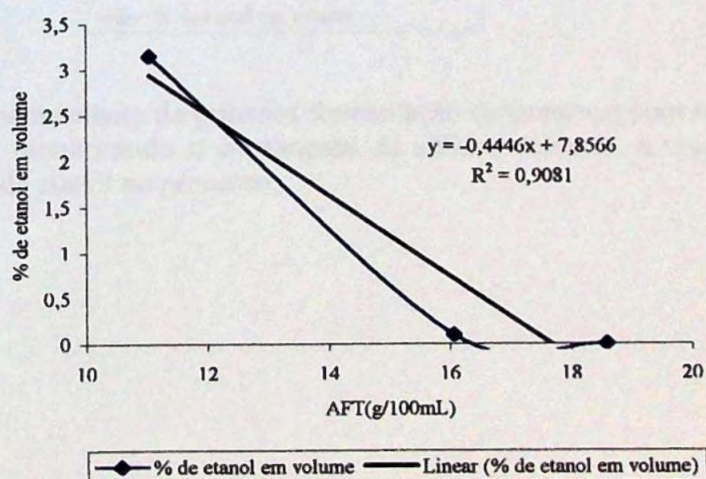


Figura 13 – Regressão linear do terceiro ensaio de fermentação descontínua em meio sintético, usando o gráfico de % de etanol formado em função do açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Tabela 8 – Primeiro ensaio de fermentação descontínua de meio de caldo de cana-de-açúcar com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	21,5	22,1	0,0
24	20,7	18,2	0,2
96	14,7	11,0	5,4
120	13,5	8,9	6,9
144	12,7	7,0	7,9
168	12,5	6,6	8,1
192	11,2	5,9	8,4
264	10,2	4,5	9,2

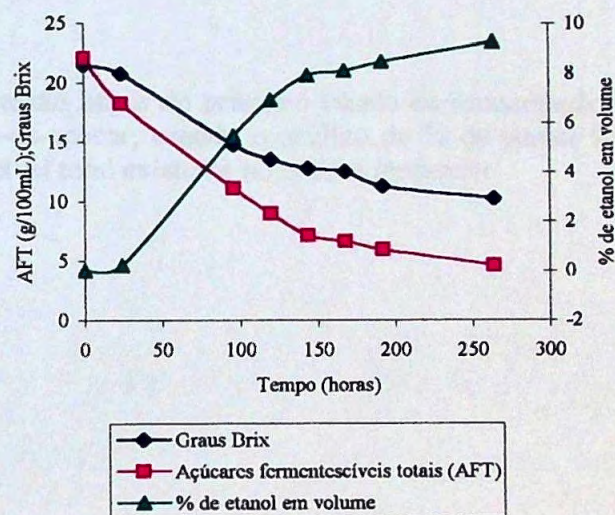


Figura 14 – Acompanhamento da primeira fermentação descontínua com meio de caldo de cana-de-açúcar, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

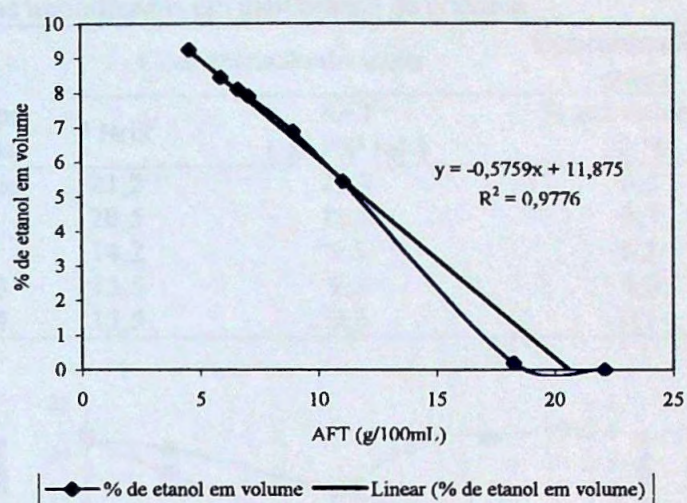


Figura 15 – Regressão linear do primeiro ensaio de fermentação descontínua em meio de caldo de cana-de-açúcar, usando o gráfico de % de etanol formado em função do açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Tabela 9 – Segundo ensaio de fermentação descontínua de meio de caldo de cana-de-açúcar com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	21,2	21,7	0,0
24	20,5	18,0	0,2
96	14,2	9,6	5,5
120	13,5	9,3	5,9
144	13,5	9,3	6,1

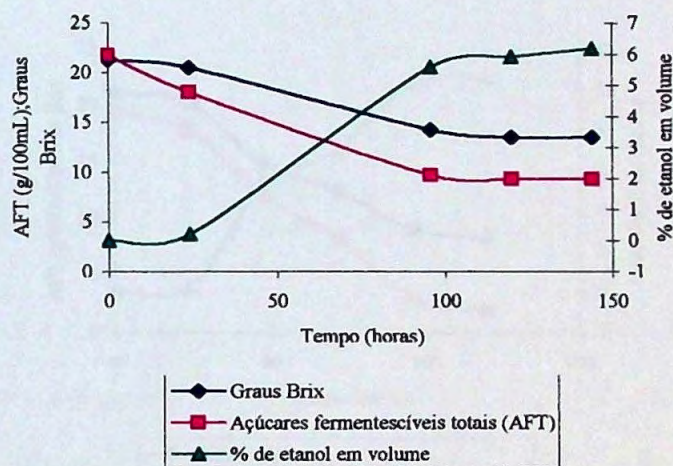


Figura 16 – Acompanhamento da segunda fermentação descontínua com meio de caldo de cana-de-açúcar, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

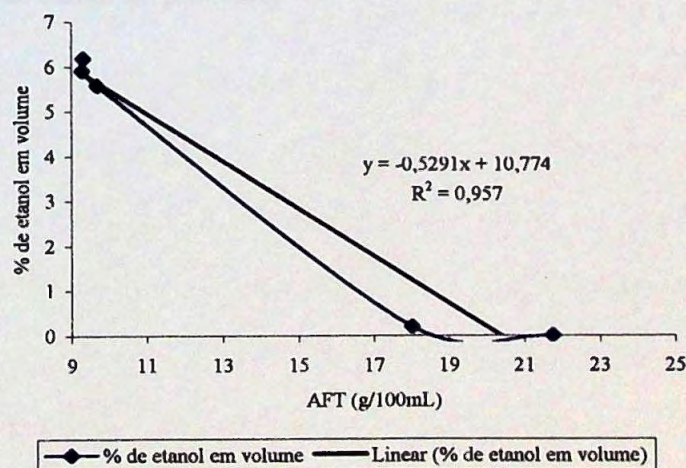


Figura 17 – Regressão linear do segundo ensaio de fermentação descontínua em meio de caldo de cana-de-açúcar, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Tabela 10 – Terceiro ensaio de fermentação descontínua de meio de caldo de cana-de-açúcar com células imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	21,0	19,3	0,0
24	20,2	17,7	0,2
48	14,7	11,8	5,3
72	12,5	8,2	7,0
96	9,0	2,8	10,3
120	8,2	1,8	10,5

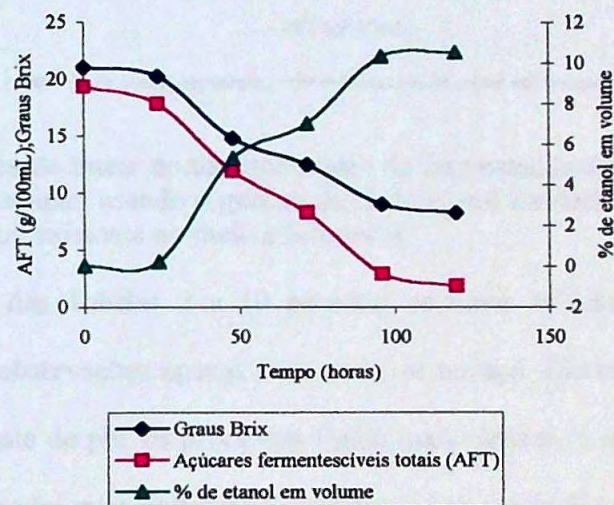


Figura 18 – Acompanhamento da terceira fermentação descontínua com meio de caldo de cana-de-açúcar, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

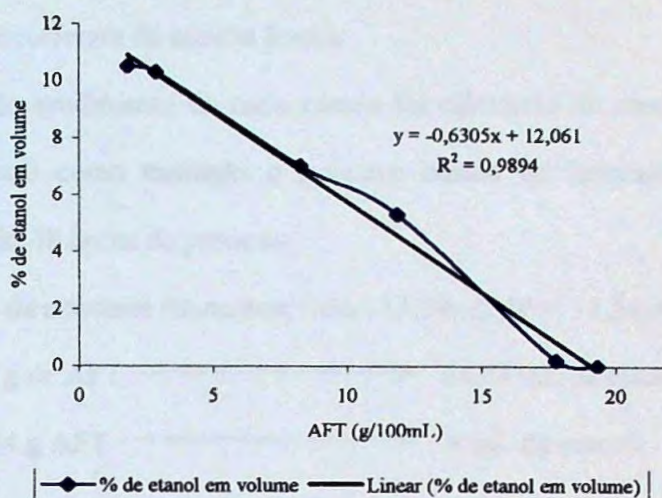


Figura 19 – Regressão linear do terceiro ensaio de fermentação descontínua em meio de caldo de cana-de-açúcar, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

O exame das Tabelas 2 a 10 permitiu construir a Tabela 11 e decidir pela continuação das observações apenas com meio de melaço. Ele não exigiu a adição de nutrientes e o ajuste de pH, os processos foram mais rápidos, a queda da concentração de sólidos solúveis foi mais uniforme (comparando os resultados mostrados nas figuras 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18) e maior a produção em relação ao tempo de fermentação. É interessante o comportamento das células imobilizadas nos diferentes meios. Os resultados encontrados mostram que é necessária boa difusão para que o meio a ser fermentado chegue até as leveduras e produza etanol. No caso do meio de caldo de cana-de-açúcar parece que houve menor difusão, talvez por causa de materiais pécnicos e mucilaginosos, gomas naturais de sua composição e conseqüentemente aumento das horas de fermentação. No meio sintético houve demora também, mas talvez não pela sua composição mas à dificuldade de fermentar uma solução de açúcares puros ainda que enriquecidas.

Os dados da tabela 11 mostram que o rendimento em etanol na fermentação de melaço foi estável, o que sugere que o número das leveduras não diminuiu, isto é,

inicialmente, em cada ensaio, manteve-se imobilizado o mesmo número de células e todos os testes ocorreram da mesma forma.

O cálculo do rendimento de cada ensaio foi calculado de acordo com o esquema abaixo, utilizando como exemplo o primeiro ensaio de fermentação com meio de melação e fixando 48 horas de processo.

Quantidade de açúcares fermentescíveis : $13,59 - 2,05 = 11,54$ AFT em g/100 mL

100 g de AFT \longrightarrow 64,74 mL de etanol

11,54 g AFT \longrightarrow X mL de etanol

$$X = 7,471 \text{ mL de etanol}$$

Valor obtido de etanol no ensaio com 48 horas de processo : 5,45 mL de etanol.

7,47 mL de etanol em volume \longrightarrow 100%

5,45 mL de etanol em volume \longrightarrow Y

$$Y = (5,45 \cdot 100) / 7,47$$

$$Y = 72,9\% \text{ de rendimento}$$

Tabela 11 – Rendimentos das fermentações descontínuas dos diferentes meios com células imobilizadas em membranas de alumina e respectivos coeficientes de correlação quando plotadas as curvas de álcool formado pela quantidade de açúcar fermentescível existente no meio.

Ensaio	Meio de fermentação					
	Sintético 120h	Coefficiente de correlação R^2	Melaço 48h	Coefficiente de correlação R^2	Caldo de cana 96 h	Coefficiente de correlação R^2
Primeiro	81,51%	0,9963	72,95%	0,9643	76,39%	0,9776
Segundo	63,73%	0,6977	79,72%	0,9916	71,40%	0,9570
Terceiro	64,53%	0,9081	66,73%	0,9996	96,83%	0,9894

No meio de caldo de cana-de-açúcar as fermentações foram mais lentas em todos os ensaios, assim como no meio sintético. Admite-se que a concentração de leveduras era a mesma, visto que as membranas usadas foram as mesmas dos outros testes. Nesses meios o tempo de fermentação foi maior do que nos meios de melaço e não conduziu à máxima produção de etanol. Somente no terceiro ensaio com caldo de cana de açúcar o

rendimento de fermentação foi bom, acima do obtido com melaço. Entretanto o tempo foi longo demais.

A baixa produção de etanol e a baixa velocidade de fermentação combinam com o baixo consumo de açúcares, fato que pode ser explicado por baixa concentração de células imobilizadas nas membranas.

As membranas de um ensaio foram transferidas de um meio para outro, apenas enxaguadas com água destilada estéril.

Pode ser admitido que à medida que foram cultivados os meios houve multiplicação das células nas membranas, fato presumido e não comprovado, mas que pode ser reestudado futuramente. Esta presunção decorre dos resultados da Tabela 11 pelos quais os rendimentos em meio sintético aumentaram com a renovação dos ensaios. BEKERS et al. (2001) afirmam em seu trabalho, que durante sucessivos ensaios ocorre a multiplicação das leveduras dentro dos poros do suporte, e que quando o suporte é de alumina a multiplicação não é afetada pelo material (alumina-alfa) das membranas, o que não acontece com as esferas de alginato de cálcio.

A comprovação do que foi aventado, poderá ser reestudada após ter sido encontrada uma forma, de quantificar as células aprisionadas nas membranas.

No que se refere ao meio de caldo de cana-de-açúcar o teor de etanol alcançado foi perto de 20% maior do que o de melaço mas o tempo de fermentação foi praticamente o dobro.

Também podemos analisar a veracidade dos resultados das fermentações por meio das figuras 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19, que mostram o coeficiente de correlação dos ensaios quando construída a reta de % de etanol em volume, formado durante o ensaio de fermentação, em relação aos açúcares fermentescíveis totais presentes no meio. Observamos que nas figuras 3, 5 e 7 estes coeficientes que deveriam estar próximos da

unidade são bastante altos e de valores mais próximos entre si, quando comparados com os outros ensaios. Isto significa que são ensaios mais confiáveis, em que os pontos localizam-se em maior quantidade sobre a reta, enquanto as outras fermentações, analisando os gráficos subsequentes (figuras 9, 11, 13, 15, 17 e 19), mostram a não uniformidade dos ensaios, talvez por erro de medida no valor de etanol.

4.3 Escolha do tipo de membrana

As membranas preparadas para o trabalho apresentaram diferenças nas superfícies de acordo com a maneira de obtê-las. Umas tinham superfícies brilhantes porque sofreram polimento e outras superfícies opacas. Alguns ensaios foram feitos para observar se a diferença entre a superfície das membranas influenciava a imobilização. Os ensaios de imobilização, nos dois tipos de membranas, opacas e brilhantes, seguiram a mesma técnica usada nos ensaios anteriores da multiplicação das leveduras até sua imobilização que ocorreu de maneira diversa nos dois tipos de membranas, como pode ser constatado pelas Figuras 20 e 21.

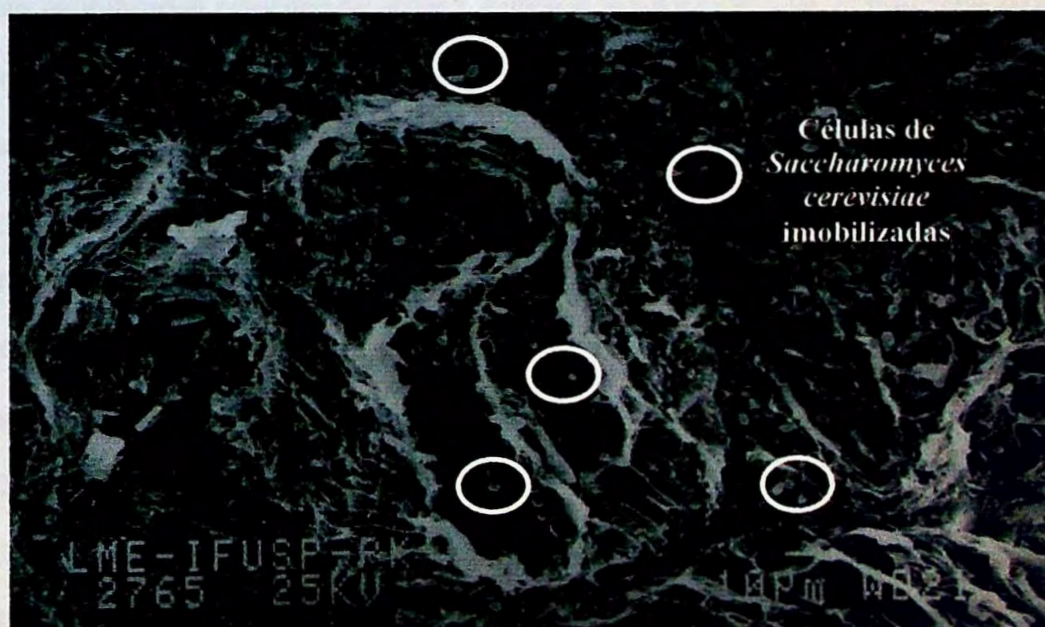


Figura 20 - Micrografia de varredura da membrana de alumina de superfície brilhante (com polimento na superfície) com imobilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1830.

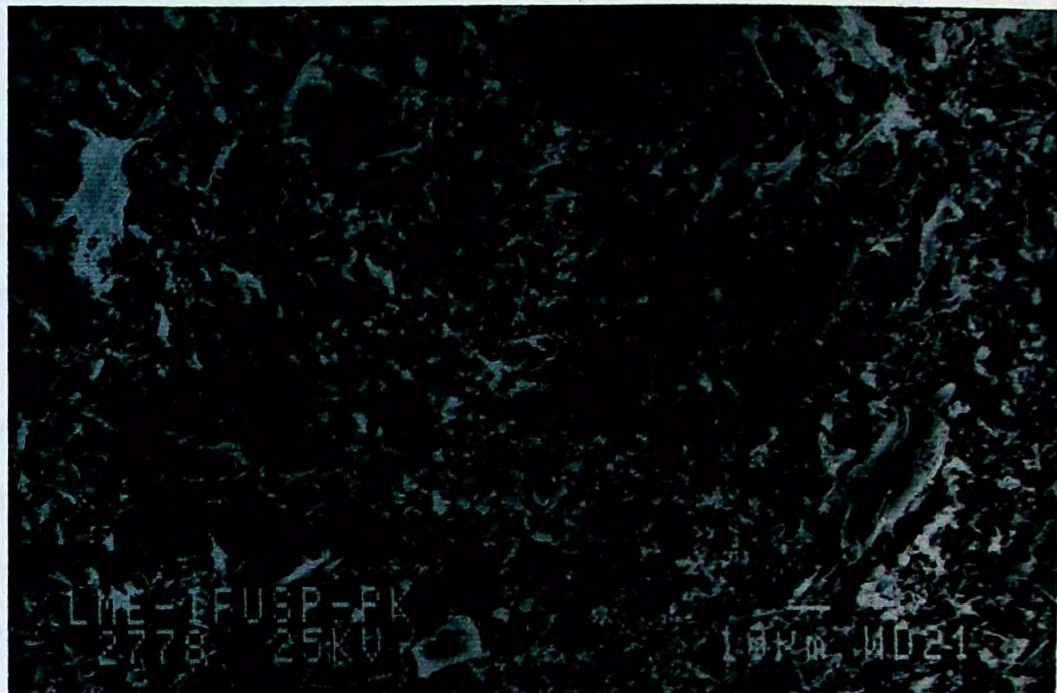


Figura 21 – Micrografia de varredura da membrana de superfície opaca (sem polimento na superfície) sem leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1830 immobilizadas. Não há presença de circunferências pequenas (morfologia característica das leveduras desse gênero).

Pelas Figuras 20 e 21, ficou evidente que somente as membranas de superfície brilhante immobilizaram convenientemente a levedura IZ-1830, levando a ajuizar que os suportes deveriam se constituir apenas de membranas com superfície brilhante.

4.4 Ensaios de fixação de leveduras em membranas de alumina

A imobilização de enzimas e células é uma técnica importante para o desenvolvimento de processos enzimáticos e fermentativos. Entre muitos suportes estudados para fixação de células, o hidróxido de alumínio e as aluminas atraíram a atenção de vários pesquisadores como KOUTINAS et al (1988,1990), HAMDY (1990), HYNDMAN et al (1992), SANTOS et al. (1996,1997,1998), JUN-ICHI (2000).

DIVIES (1989) afirma que a imobilização das células torna desnecessária a purificação ou isolamentos, o que concorda com os resultados desta pesquisa. Afora a contaminação com *Candida* em uma operação de imobilização, não ocorreu nenhum outro problema desta natureza.

WHITE & PORTNO (1978) em uma torre de fermentação de cerveja com células imobilizadas em alginato de cálcio, eliminaram a contaminação de bactérias no processo. Ao contrário desses autores, no presente trabalho a contaminação ocorrida só foi eliminada com a calcinação das membranas, possivelmente porque se tratava de outra levedura de células maiores do que as bactérias.

Segundo SIESS & DIVIES (1981) de 40 a 80% de células imobilizadas em gel de poliacrilamida são destruídas pela imobilização; nas partículas do gel a viabilidade das células se comporta de forma heterogênea, sobretudo, as do interior, porque as da superfície mantiveram a capacidade de formar colônias com boa atividade fermentativa. PUNDLE et al. (1988) refutam em parte esta afirmação.

Os autores citados na referencia bibliográfica, com suas afirmações, em parte conflitantes, permitem que sejam aceitas certas incongruências encontradas no presente trabalho com as membranas de alumina, como variação do tempo de fermentação.

PARASCANDOLA et al. (1987) imobilizaram células em fragmentos de calcário vulcânico com e sem adição de gelatina, e contam que nestas o desempenho parece ter sido melhor. HAMDY (1990), em uma comunicação pessoal, após saber de certos insucessos com a imobilização em pérolas de alumina por falta de poros adequados, sugeriu adicionar glutaraldeído aos suportes, mas não pareceu adequado assim proceder, ao mesmo tempo em que a tecnologia não parece viável.

Após ter sido feita a escolha da levedura e tipo de membrana, foram feitos os ensaios de imobilização, apenas utilizando membranas brilhantes. Inicialmente foi feita a multiplicação das leveduras IZ-1830 em um frasco Erlenmeyer, acompanhada pela redução da quantidade de açúcar presente no meio, medida por refratômetro. Por causa da pequena quantidade de células no inóculo, a multiplicação ocorreu lentamente,

mesmo em condições favoráveis : estufa a 32°C, meio com nutrientes e vitaminas e pH adequado.

Para confirmar a imobilização nas condições acima, isto é, com algumas células fixadas, foi feito um novo ensaio de fixação com as mesmas membranas, porém após eliminação das células anteriormente alojadas nos poros, por meio de calcinação dos suportes em mufla a 500°C por 5-6 horas.

Foi preparado um novo meio de fermentação, no qual foram mergulhadas as membranas de alumina, previamente calcinadas em mufla a 500°C; em seguida foi efetuada a esterilização do conjunto de meio e membranas em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Depois de resfriado, o meio com as membranas foi inoculado com um volume aleatório de suspensão de leveduras previamente multiplicadas (aproximadamente 5% do volume total) e deixadas em repouso em estufa a 32°C por sete dias, para a fermentação do meio.

A seguir, uma amostra da membrana foi submetida à observação por microscopia eletrônica de varredura, para confirmar que a imobilização foi positiva, como comprovam as Figuras 22 e 23 seguintes.

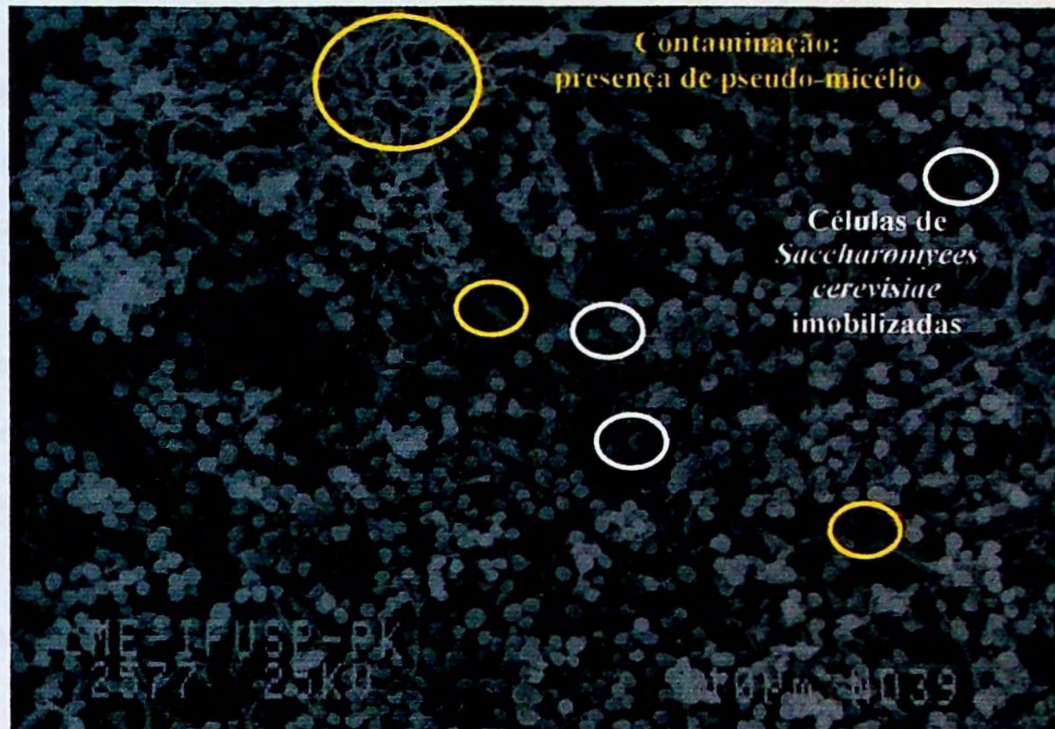


Figura 22- Micrografia de varredura da superfície dorsal da membrana de alumina com imobilização de células (IZ-1830) e presença de contaminação.

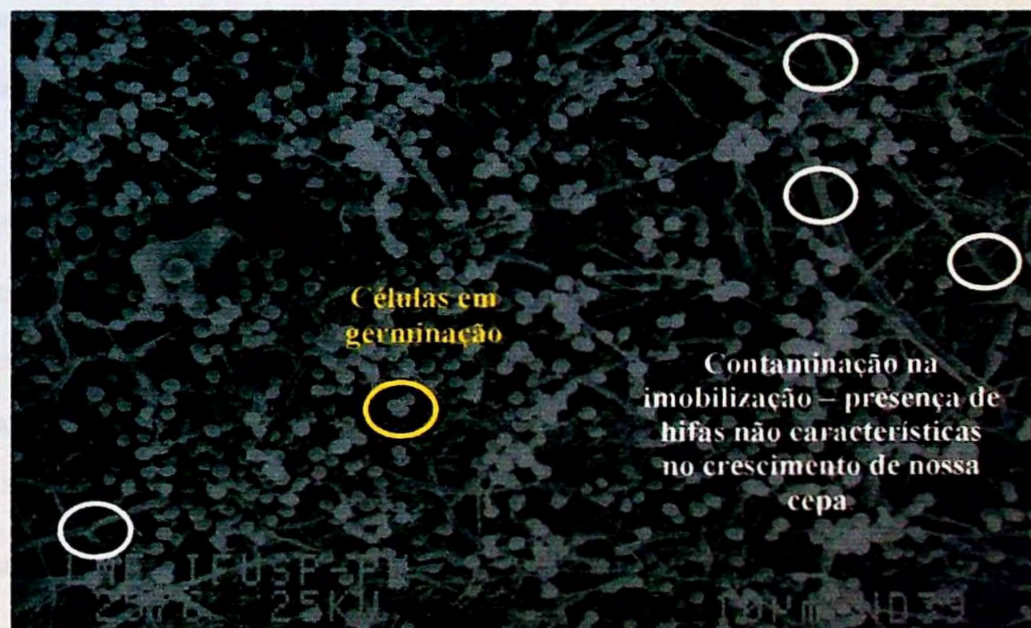


Figura 23- Micrografia de varredura da superfície ventral da mesma membrana de alumina, imobilização de IZ-1830 e presença de contaminação.

A figura 22 confirma que houve imobilização, pela identificação visual de células de *Saccharomyces cerevisiae*, de morfologia conhecida, mas pela observação da

Figura 23, foi observado que a imobilização não ocorreu apenas com *Sacharomyces cerevisiae*, mas também com agrupamentos de células em forma de micélio, indicando que o ensaio foi contaminado. A contaminação ocorreu com uma levedura do gênero *Candida sp.*

Para a continuação do trabalho, as membranas foram separadas, submetidas à calcinação, em mufla a 500°C e de novo foi procedida nova imobilização pelo método já descrito. A contaminação que ocorrera por causa não determinada, não voltou acontecer nos demais ensaios.

De acordo com KOLOT (1980), nos processos de imobilização de células vivas a reação de fermentação é acelerada e favorece as fermentações em sistema contínuo.

O aumento da concentração celular supõe alta multiplicação celular no interior do suporte, que deve ocorrer sempre que nova porção de meio é adicionada para entrar em contato com o microrganismo imobilizado e haverá células que se multiplicam e desprendem do suporte, fato que caracteriza a vitalidade das células.

Na bibliografia consultada não foram encontradas citações sobre o desprendimento das células dos suportes durante o processo de fermentação, nem citações sobre sua quantificação.

4.5 Determinação do número de células fixadas

A determinação feita como descrita no item 3.2.4, levou à detecção média de $2,3 \cdot 10^{11}$ leveduras/100g de membrana pelo método de pesagem e de $3,5 \cdot 10^9$ leveduras/100g de suporte pelo método indireto da determinação de nitrogênio. Deve-se levar em consideração que as amostras usadas em cada uma das análises não foi a mesma.

Os resultados da determinação da quantidade celular presente nas membranas pelos dois métodos são discutidos a seguir :

◆ **Determinação pelo método de pesagem**

Amostras de membranas colocadas na mufla

Tabela 12 – Massa das amostras de membranas imobilizadas.

Amostras	1	2	3	4
Massa da membrana sem imobilização	0,7677	0,4831	0,9582	0,3778
Massa da membrana com leveduras secas	0,8285	0,5104	1,008	0,4006
Quantidade de leveduras secas aprisionadas dentro do poro da membrana	0,0608	0,0273	0,0498	0,0228
Quantidade de células de leveduras secas / quantidade de amostra (membrana)	$2,25 \cdot 10^9$	$1,01 \cdot 10^9$	$1,84 \cdot 10^9$	$8,43 \cdot 10^8$
Quantidade de células de leveduras secas / 100 g de membrana	$2,93 \cdot 10^{11}$	$2,09 \cdot 10^{11}$	$1,92 \cdot 10^{11}$	$2,23 \cdot 10^{11}$

De acordo com BORZANI (1955), 1,0 g de fermento de panificação contém cerca de $1,11 \cdot 10^{10}$ células de leveduras em valores médios. Se admitirmos que o fermento de panificação encerra 70% de umidade e é composto somente por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* temos:

0,3 g de fermento seco \longrightarrow $1,11 \cdot 10^{10}$ células de levedura

0,0608 g de leveduras secas \longrightarrow X células de leveduras

$$X = (0,0608 \times 1,11 \cdot 10^{10}) / 0,3$$

$$X = 2,25 \cdot 10^9 \text{ leveduras} / 0,7677 \text{ g amostra}$$

$2,25 \cdot 10^9$ leveduras \longrightarrow 0,7677 g amostra

Y leveduras \longrightarrow 100 g amostra

$$Y = (2,25 \cdot 10^9 \times 100) / 0,7677$$

$$Y = 2,93 \cdot 10^{11} \text{ leveduras} / 100 \text{ g de suporte}$$

$$\text{Valor médio} = (2,93 \cdot 10^{11} + 2,09 \cdot 10^{11} + 1,92 \cdot 10^{11} + 2,23 \cdot 10^{11}) / 4 =$$

$$\text{Valor médio} = 2,29 \cdot 10^{11} \text{ células} / 100 \text{ g de suporte}$$

♦ **Determinação pela técnica indireta, pela dosagem de nitrogênio pelo método de Kjeldahl**

Tabela 13 – Cálculo de proteínas em membranas imobilizadas.

Amostra	Massa da amostra usada em gramas	Massa de nitrogênio em gramas da amostra	Massa de proteína em gramas da amostra	Percentagem de proteína (N * 6,25) da amostra	Quantidade de células de leveduras secas / 100 g de membrana de alumina (amostra)
1	0,212	$6,86 \cdot 10^{-5}$	$4,29 \cdot 10^{-4}$	0,20	$5,62 \cdot 10^9$
2	0,421	$1,14 \cdot 10^{-4}$	$7,15 \cdot 10^{-4}$	0,17	$4,72 \cdot 10^9$
3	0,719	$9,15 \cdot 10^{-5}$	$5,72 \cdot 10^{-4}$	0,08	$2,21 \cdot 10^9$
4	0,428	$4,58 \cdot 10^{-5}$	$2,86 \cdot 10^{-4}$	0,07	$1,86 \cdot 10^9$
5	0,606	$1,14 \cdot 10^{-4}$	$7,15 \cdot 10^{-4}$	0,12	$3,28 \cdot 10^9$

Uma célula de levedura úmida possui cerca de 40 % de proteína, valor obtido pelo método de Kjeldahl, realizado apenas com fermento de panificação.

1,0 g de leveduras úmidas \longrightarrow $1,11 \cdot 10^{10}$ células de leveduras

J g de leveduras úmidas \longrightarrow 1 célula de levedura

$$J = (1 \cdot 1,0) / 1,11 \cdot 10^{10} = 9,01 \cdot 10^{-11} \text{ g de leveduras úmidas}$$

$9,01 \cdot 10^{-11}$ g \longrightarrow 100 % (levedura inteira)

X(massa de proteína) \longrightarrow 40% da levedura é proteína

$$X = (40 \cdot 9,01 \cdot 10^{-11}) / 100$$

$$X = 3,60 \cdot 10^{-11} \text{ g de proteína em uma levedura}$$

Isto significa que em cada levedura encontramos cerca de $3,60 \cdot 10^{-11}$ g de proteína.

1 célula de levedura \longrightarrow $3,60 \cdot 10^{-11}$ g de proteína

J leveduras \longrightarrow $4,29 \cdot 10^{-4}$ g de proteína

$$J = (4,29 \cdot 10^{-4}) / 3,60 \cdot 10^{-11}$$

$$J = 1,19 \cdot 10^7 \text{ leveduras em } 0,212 \text{ g de amostra}$$

0,212 g de amostra \longrightarrow $1,19 \cdot 10^7$ leveduras

100 g amostra \longrightarrow K leveduras

$$K = (1,19 \cdot 10^7 \cdot 100) / 0,212$$

$$K = 5,62 \cdot 10^9 \text{ leveduras/100g suporte}$$

$$\text{Valor médio} = (5,62 \cdot 10^9 + 4,72 \cdot 10^9 + 2,21 \cdot 10^9 + 1,86 \cdot 10^9 + 3,28 \cdot 10^9) / 5 =$$

$$\text{Valor médio} = 3,54 \cdot 10^9 \text{ células /100g de suporte}$$

Vale ressaltar novamente que as amostras usadas nas duas análises não tiveram a mesma massa e nem eram as mesmas membranas. Não é possível fazer as duas análises com o mesmo material pois, em qualquer uma das análises, obrigatoriamente, há destruição do material com células imobilizadas para se obter a quantificação.

Deve-se ressaltar também que por se tratarem de membranas diferentes, a quantidade de poros internamente não tem igual distribuição, permitindo mais ou menos imobilização.

4.6 Ensaio de fermentação descontínua com leveduras imobilizadas

Os ensaios da fermentação descontínua levaram aos resultados citados nas Tabelas 14 a 17. O decréscimo de açúcares foi acompanhado pelo decaimento do teor de sólidos solúveis em °Brix. Os teores finais de açúcar e etanol foram dosados analiticamente pelos métodos citados.

Tabela 14 – Primeiro ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/ 100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	21,0	18,8	0,0
24	20,0	16,5	0,2
48	16,5	13,5	4,3
72	14,5	10,2	6,2
96	10,2	5,2	9,6
120	9,0	2,5	10,0

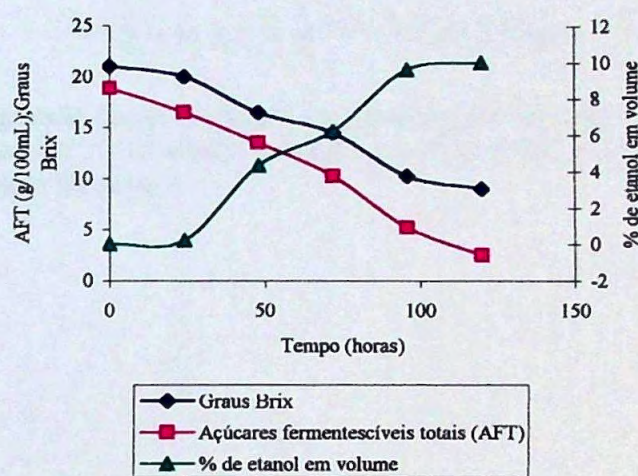


Figura 24 – Acompanhamento da fermentação descontínua com meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

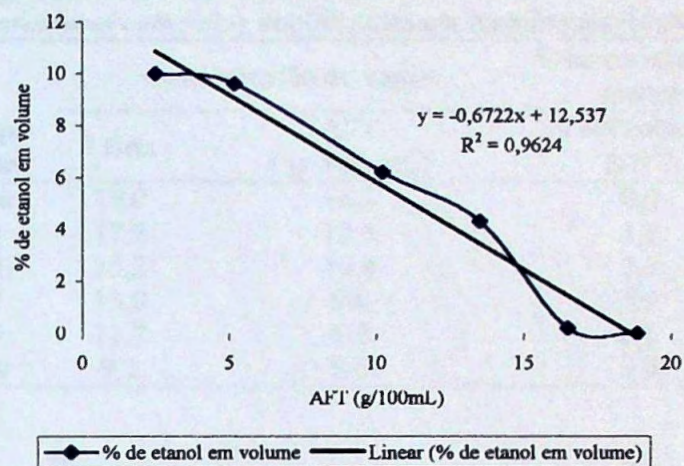


Figura 25 – Regressão linear do ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Tabela 15 – Segundo ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/ 100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	19,0	16,3	0,0
24	17,7	12,6	1,3
48	15,2	10,4	3,1
72	13,0	9,8	5,2
96	11,7	6,2	8,6
120	9,2	3,6	9,4

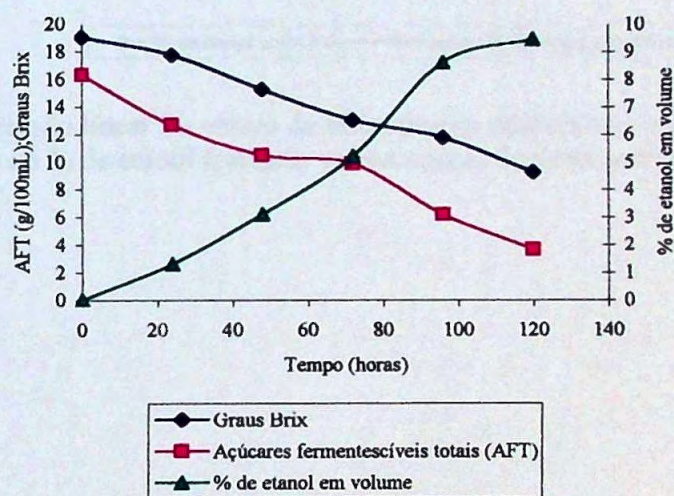


Figura 26 – Acompanhamento da fermentação descontínua com meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

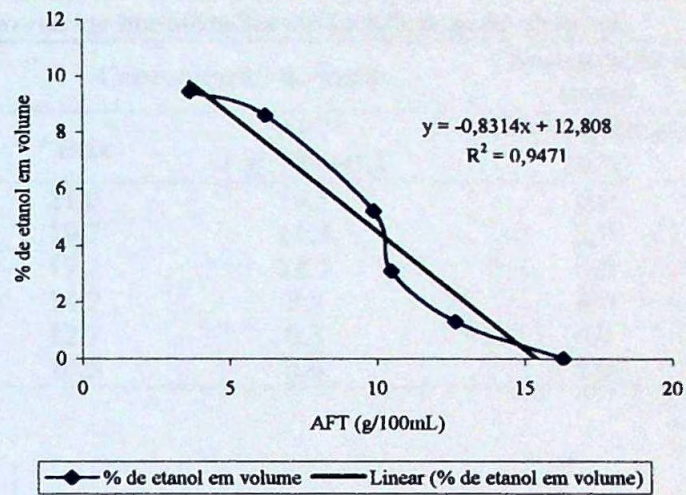


Figura 27 – Regressão linear do ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado versus açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Tabela 16 – Terceiro ensaio de fermentação descontínua de meio de melaço com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em membranas de alumina.

Tempo (horas)	Concentração do meio		Concentração de etanol
	° Brix	AFT (g/100 mL)	% em volume a 20 °C
Início	21,0	19,5	0,0
24	19,7	15,3	2,0
48	17,2	12,7	3,5
72	14,2	9,5	4,9
96	12,7	6,3	6,7
120	10,5	2,6	8,9

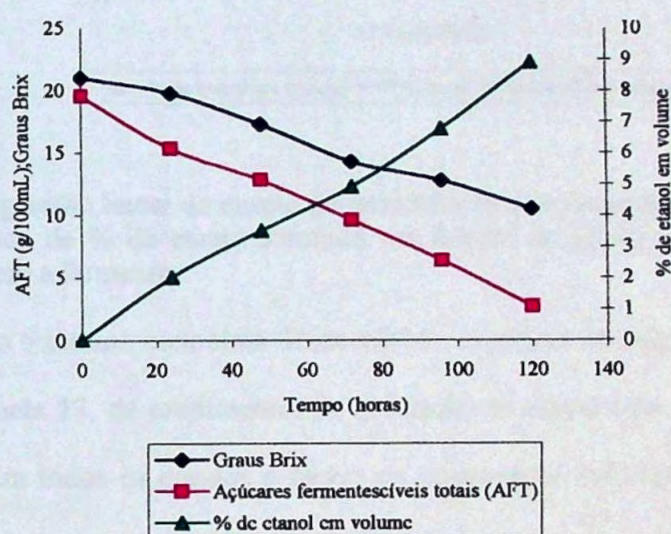


Figura 28 – Acompanhamento da fermentação descontínua com meio de melaço, monitorando o decaimento de sólidos solúveis, a concentração de açúcar e formação de etanol no processo.

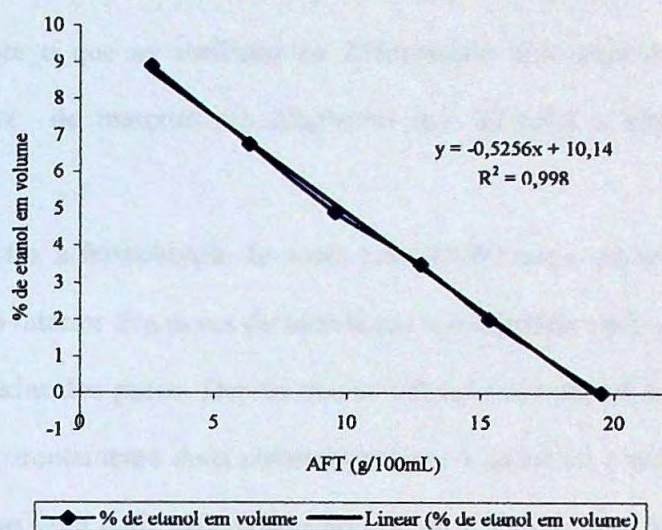


Figura 29 – Regressão linear do ensaio de fermentação descontínua em meio de melaço, usando o gráfico de % de etanol formado em função de açúcar fermentescível total existente no meio a fermentar.

Fazendo o mesmo raciocínio desenvolvido na página 38 e seguintes, foi possível construir a Tabela 17, de rendimentos de produção de etanol com melaço em sistema descontínuo. Em todos os ensaios o termo de comparação foi estabelecido como 120 horas de fermentação, um tempo muito longo, mas que permite comparação pela quantidade significativa de etanol produzido.

A Tabela 17 mostra os resultados de rendimento da fermentação em produção de etanol em três ensaios com melaço, com células imobilizadas em novas membranas.

Tabela 17 – Rendimento de fermentação de meios de melaço com células imobilizadas em novas membranas de alumina.

Ensaio	Rendimento de etanol formado
	120 horas de processo
Primeiro	94,47 %
Segundo	115,30%*
Terceiro	81,59%

* Com certeza houve erro na determinação do volume de álcool.

HAMDY (1990) escolheu a posição inclinada para facilitar o escape do CO₂ formado. Realmente o que se verificou na fermentação com membranas é que elas criam uma camada de material muscilaginoso que dificulta a circulação do CO₂ formado.

Quando se faz a fermentação do meio para imobilização de células, ela ocorre tanto fora como no interior dos poros da membrana e é realizada com células livres que migram para o interior dos poros. Depois que as células de levedura ocupam seu nicho nas membranas, aparentemente duas coisas ocorrem. A primeira é que o meio vai ao encontro das células com mais dificuldade do que no início da fixação quando o ar é expelido do suporte pelo aquecimento e substituído pelo meio de fermentação e a segunda seria a maior dificuldade da saída de CO₂ pela falta de circulação.

As membranas quebradas parece terem conduzido a maior velocidade da fermentação, pelo melhor contato com o meio.

Quando as membranas não são quebradas e são distribuídas no fermentador assentadas umas sobre as outras, o espaço fica compartimentado, dificulta o escoamento de CO₂ e o movimento convectivo do meio, o que reduz o contato dos açúcares com as células de levedura.

CHIQUETTO SILVA (1997) observou que houve ruptura de glóbulos de alginato com células imobilizadas, por causa da formação de gás carbônico no interior das esferas, mas é possível que não só o CO₂ tenha causado a ruptura, mas também a multiplicação das células. Se isto ocorreu, houve liberação de células para o meio, que passaram a agir livremente, multiplicando-se, fermentando e produzindo etanol.

No presente trabalho os suportes de alumina ficavam abrigados dentro de um cartucho de chapa perfurada de aço inoxidável (aproximadamente 70 furos/cm²), que permitia a livre circulação de meio fermentativo entre os suportes e que células

multiplicadas e liberadas atravessassem a parede do cartucho e se depositassem no fundo do fermentador.

A quantidade de células depositadas no fundo do fermentador com 2 litros de meio, em cada ciclo de fermentação, com células imobilizadas em número $2,29 \cdot 10^{11}$ células por 100g de suporte, após 10 recolhimentos de amostras mostrou uma média de 0,378 g de células.

Como havia 0,378 g de células retidas no papel filtro após filtração dos 2 L de meio, a explicação é a de que as células retidas eram o produto de multiplicação das células imobilizadas; o meio era fermentado, ao mesmo tempo em que havia multiplicação de células.

De acordo com AMIN et al. (1983), de 3 a 5% de glicose são consumidos na fase principal das fermentações descontínuas, para produção de subprodutos e no sistema de células imobilizadas esse gasto é menor com conseqüente maior produção de etanol.

Neste trabalho não foi feita dosagem de subprodutos da fermentação alcoólica, produzidos durante a fermentação. Pelos exames de resultados de uma fermentação descontínua com células imobilizadas com outra de células livres será possível estimar o afirmado por AMIN et al (1983).

Segundo HOLLEBERG & MARGARITH (1981), e DURAN & BAILEY (1986), a imobilização eleva a atividade fermentativa das leveduras porque há eliminação da fase lag, diminui o risco de contaminação em operações com alta concentração de células. Até certo ponto isto ocorreu no presente trabalho, pois a cada vez que o sistema era renovado já se iniciava a fermentação, mas não com a velocidade esperada pelos informes da bibliografia.

Durante a execução da presente pesquisa, em um determinado ensaio foi percebida a redução de velocidade de fermentação e a formação de um véu esbranquiçado na superfície do meio, característico da presença de leveduras oxidativas. Micrografias eletrônicas de varredura mostraram que houve contaminação com levedura identificada como do gênero *Candida*, como visto nas Figuras 22 e 23 .

4.7 Comparação entre células livres e imobilizadas

Foi feito um ensaio comparativo de fermentação com células imobilizadas em membranas e com células livres em suspensão no meio. Dois volumes iguais de meio de fermentação foram inoculados com um mesmo número de células. Um foi inoculado com células imobilizadas em membranas de alumina-alfa e o outro com células em suspensão.

Os ensaios demonstraram que as células imobilizadas no início apresentavam uma fase lag, de adaptação ao meio, pois a fermentação demorava mais para começar, comprovado pelo lento decaimento dos sólidos solúveis. A explicação é a maior dificuldade das células entrarem em contato com o meio, por causa da dificuldade de sua difusão para o interior das membranas.

No caso das células suspensas terá havido contato mais rápido das células com o meio a fermentar, acelerando o processo de formação de etanol, porém, esta questão precisa ser objeto de novas observações.

Segundo MERSMANN (1992), há dois tipos de leitos para imobilização de células: os que fixam fisicamente e os que lhe aderem à superfície. No caso da alumina houve fixação física por alojamento das células no interior dos poros do suporte de forma irregular, o que deveria formar trama permeável de alta resistência ao entupimento e reduzir ao mínimo as contaminações. Como neste trabalho não houve

entupimentos, deduz-se que não foi fácil ao meio de fermentação alcançar as células alojadas no interior do suporte a não ser no início de sua imobilização.

4.8 Duração da imobilização

Uso das mesmas membranas por cerca de seis meses sem armazenamento em refrigerador e sem demonstrar contaminação efetiva, mostrou que a imobilização manteve a atividade celular por longo período sem necessidade de reimobilização.

De acordo com CANTARELLI (1989), a imobilização de células vivas em um ambiente não altera sua atividade catalítica, mas não foi possível comprovar por este trabalho se isto ocorreu e, se ocorreu, o foi em curto período, ou ao longo da repetição dos ensaios de laboratório.

4.9 Resultados em comparação com os dados da bibliografia

Segundo LEE et al (1983), os sistemas de células livres são limitados porque há perda de células nos fermentadores e o produto principal pode inibi-las pois ficam em contato direto. Daí o interesse em produzir etanol com células imobilizadas em reatores de colunas.

Entretanto, SITTON & GADDY (1980) afirmam que há necessidade de selecionar e escolher um reator para acelerar as reações biológicas, normalmente lentas e que os reatores de células imobilizadas permitem alto desempenho, mas não o controle do estado fisiológico dos organismos.

Nesta pesquisa não foi observado o que MESSING & OPPERMANN (1979) afirmam, isto é, que há necessidade de aumento de concentração celular e quanto mais células mais imobilização há. Não é fácil afirmar se ocorreu aumento significativo de células, pois só quando o trabalho já estava muito adiantado, foi encontrada uma forma viável de observar a multiplicação celular pelos métodos de quantificação das leveduras imobilizadas nas membranas de alumina. As micrografias eletrônicas não registram

aumento de concentração celular nas membranas mas a presença de células em gemação e presença de células filhas (de menor dimensão) indicam multiplicação das células no interior dos poros. Houve registro da imobilização e não se pode negar a ocorrência de multiplicação, porque a deposição de células no fundo dos reatores atesta o crescimento do número de células. O que não foi possível determinar é se a multiplicação foi intensa quando células saíam dos poros e se tornavam livres no meio de fermentação. Se isto for verdadeiro, contraria o que afirmam LEE et al. (1983), segundo os quais o metabólito inibe as leveduras.

O estudo da imobilização envolve o uso de diferentes suportes. A pesquisa de HAMDY et al. (1990), com alumina, inspirou este trabalho, mas há autores que trabalharam com outros suportes sólidos, como RICHTER et al. (1989), com estruturas vegetais, PARASCANDOLA et al (1989) com pedras vulcânicas, KUMAKURA et al. (1992), com terras porosas e TYIAGI & GHOSE (1982), que usaram glóbulos de vidro poroso, com poros de dimensões controladas e afirmam que as células imobilizadas apresentaram produção de etanol e rendimento mais alto. De maneira geral os suportes sólidos acarretam concentração dos nutrientes na interface sólido-líquido e expõem os microrganismos fixados a concentrações mais altas de nutrientes que as células livres (TYIAGI & GHOSE, 1982). Segundo eles, a alta concentração do substrato na interface a causa repentina mudança da pressão nas células imobilizadas e a separação das células brotadas pela superfície, com dessorção no efluente, separação súbita da progênie e mudança na morfologia das células imobilizadas. Isso talvez explique a liberação de células que ocorreu neste trabalho, nas fermentações com as células imobilizadas em alumina, mas não houve observação de células alongadas ou diferentes em sua morfologia, nas micrografias obtidas.

MOO YOUNG (1980), fez um trabalho em que usou células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas, mas observou a presença de bactérias floculantes. Não ficou claro no seu trabalho, se bactérias floculantes ocorreram no suporte ou no meio; deste foi conseguido obter isolamento, mas não há referência sobre sua ocorrência no suporte.

De forma similar, durante a execução do presente trabalho, em uma única vez, houve contaminação com leveduras oxidativas, como já foi comentado, assim como a forma de eliminá-las, pela calcinação das membranas e nova imobilização.

4.10 Considerações finais

1. Aparentemente as leveduras imobilizadas são estáveis, dedução decorrente das fermentações que se seguiram sem contaminações e com a repetição dos resultados;
 2. Na comparação com o processo de células livres, a velocidade de transformação do açúcar em etanol foi menor com as células imobilizadas do que com as células suspensas, possivelmente por causa da má circulação do meio dentro do suporte, e menos contato com as leveduras;
 3. A colocação aleatória das membranas no fermentador causa seu empilhamento, diminui o contato com o meio de fermentação porque reduz a circulação do gás formado e, em consequência, prejudica o acesso das leveduras ao substrato e sua atividade fermentativa;
 4. A fragmentação das membranas melhora seu contato com o meio de fermentação e o acesso das leveduras aos açúcares, com reflexo sobre sua atividade fermentativa;
 5. As membranas mantiveram a imobilização das células durante todo o período da execução deste trabalho, superior a seis meses de uso, embora tenham ocorrido fratura e fragmentação;
-

6. A alumina-alfa não prejudicou a vitalidade das leveduras, pois elas mantiveram sua atividade fermentativa durante todo o período de utilização das membranas, sem necessidade de reimplantação;
7. O tempo prolongado de fermentação nos diferentes testes parece ter sido consequência de pequena quantidade de células imobilizadas e não de qualquer influência negativa da alumina-alfa na imobilização da cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

O prolongado tempo de fermentação em cada ensaio deste trabalho conduziu à interpretação de que a imobilização das leveduras em alumina não mostrou viabilidade para produção de etanol em escala industrial, mas é preciso levar em conta que havia pouca massa de membranas e que só após ter sido encontrada uma forma de quantificar as leveduras no interior das membranas foi possível estimar a quantidade de células em trabalho nos ensaios.

O conhecimento desse número de células permitirá calcular a quantidade de membranas a usar para obter fermentações mais rápidas.

Os resultados mostram que um dos objetivos do trabalho, que era demonstrar a aplicabilidade da viabilização em alumina foi alcançada e o segundo que há possibilidade de realizar fermentação etanólica com as células imobilizadas. Pelos ensaios percebe-se que em processos de fermentação em que o tempo não é fator restritivo como fermentações ou refermentações de vinhos o tempo não importa, pois o que importa é a qualidade do produto final – seu aroma e sabor, a fermentação alcoólica foi viável .

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, dentro das condições de sua execução, permitiram concluir que :

1. As membranas de alumina-alfa usadas, permitiram, a imobilização da cepa *Saccharomyces cerevisiae*;
2. Não foram observados efeitos negativos do material do suporte na morfologia celular, na sua atividade fermentativa;
3. A conservação da viabilidade de uso das leveduras imobilizadas por tempo prolongado sugere que a alumina-alfa poderá ser usada, eventualmente, para estocar cepas puras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC – **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995 2V.

AMIN,G.; VAN den EYNDE, E.; VERACHTERT, H. Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation, using batch and immobilized cell Systems of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.18 (n.1), p.1-5, 1983.

ARCURI, E.J. Continuous Ethanol Production and Cell Growth in an Immobilized-Cell Bioreactor Employing *Zymomonas mobilis*. **Biotechnol. Bioengng.** V. 24, p. 595-604, 1982.

BANDYOPADHYAY, K.K.; GHOSE, T.K. Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. III-Physiology of growth and metabolism of various supports. **Biotechnol. Bioengng.** V. 24, p. 805-15, 1982.

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KA MINSKA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry.** 36, 979-986, 2001.

BORZANI, W.; Concentração de leveduras no fermento prensado., **Engenharia e Química.** v.7,n.2 p. 5-7, 1955.

CANTARELLI, C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. **Italian Journal of food Science.** n. 3, p. 3 - 20, 1989.

CHIBATA, I., TOSA, T., & SATO. T. Immobilized biocatalysts to produce aminoacids and other organic compounds. In: LASKIN, A.I. Enzyme and immobilized cells in biotechnology. p. 37-70. **The benjamin/Cummings**, U.S.A.1983.

CHIBATA, I; TOSA, T.; SATO, T. Methods of cell immobilization. In: DEMAIN, A.L ; SOLOMON, N.A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology.** Washington: American Chemical Society. p. 217-29, 1986.

CHIQUETO SILVA, N.C. Produto Vinificado Espumante de Maçã Obtido com Células Imobilizadas. **Tese de mestrado**, Universidade de São Paulo, 100p, 1997.

CHOTANI, G.K.; CONSTANTINIDES, A. Immobilized cell cross-flow reactor. **Biotechnol. Bioengng.** v. 26, p. 217-20, 1984.

COSTA, S.A.; TZANOV, T.; PAAR, A.; GUDELJ, M.; GUBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Immobilization of catalase from *Bacillus SF* on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. **Enzyme and Microbial Technology.** 28, 815-19, 2001.

* Normas adotadas da ABNT de NBR 6023/89

DIVIES, C. Les microorganismes immobilizes. In BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J.P. **Microbiologie Alimentaire – Les Fermentations Alimentaires**, Paris: Technique et Documentation – Lavoisier, p. 299-318, 1989.

DURAND, G. ; NAVARRO, J.M. Immobilized microbial cells. **Process Biochemistry**, V.3 (n. 9), p. 14-23, 1978.

DURAN, P.M.; BAILEY, J.E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. **Biotechnol. Bioengng.v. 28**, p. 73-87, 1986.

GALLAZO, J.L. & BAILEY, J.E. In vivo nuclear magnetic resonance análisis of immobilization Effects on glucose metabolism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Bioengineering**. New York, 33 (10), p. 1283-89, 1989.

GALLAZO, J.L. & BAILEY, J.E. - Growing *Saccharomyces cerevisiae* in Calcium Alginate beads induce cell alterations which accelerate glucose conversion.. **Biotechnology Bioengineering**. New York, 36 (4), p. 417-26, 1989.

GHOSE, T.K.; BANDYOPADHYAY, K.K. Rapid ethanol fermentation in immobilized yeast cell reactor. **Biotechnol. Bioengng.v.22**, p. 1489-96, 1980.

GÒDIA, F. CASCAS, C., SOLA, Ç. Mathematical modelization of packed-bed reactor performances with immobilized yeast for ethanol fermentation. **Biotech. Bioengng.**, New York, 30(7), p. 836-43, 1987.

HAMDY, M.K. ; KIM, K.; RUDTKE, C.A. Continuous ethanol production by yeast immobilized onto channeled alumina beads. **Biomass. v.21**, p. 189-206,1990.

HOLEBERG, I.B.; MARGALITH, P. Alcoholic fermentation by immobilized yeast at high sugar concentrations. **Eur. J. Appl.Microbiol. Biotechnol. v.13**, p. 33-140,1981.

HYNDMAN, D.; LEVER, G.; BURRELL, R; FLYNN, G. Protein immobilization to alumina supports: I. Organophosphate ligand interaction and use in the attachment of papain. **Biotechnology and Bioengineering. v.40**, p. 1319-27,1992.

JUN-ICHI. I; MATSUYAMA. T., YAMAMOTO. H. Immobilization of glucoamylase on ceramic membrane surface modified with a new method of treatment utilizing SPCP-CVC. **Biochemical Engineering Journal. v.5**, p. 179-84, 2000.

INLOES, D.S.; TAYLOR. D.P. ; COHEN, S.N.; MICHAELS, A.S; ROBERTSON, C.R. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, immobilized in hollow fiber membrane reactors. **Applied and Enviromental Microbiology. v.46 (n.1)**, p. 264-78, 1983.

JAIN, W.K.; TORAN-DIAZ, I. ; BARATTI, J. Continuous production of ethanol from fructose by immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology and Bioengineering. v .27**,p. 613-20, 1985.

KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A.; KANA, K.; NICOLOPOULOU, M.; PAPADIMITRIOU, A. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* promoted by γ -alumina. **Biotechnology and Bioengineering**. 34, 121-25, 1989.

KENNEDY, J.F.; MELO, E.H.M; JUMEL, K. Immobilized enzymes and cells. **Chemistry Engineering Progress**. July, p.81-9, 1990.

KOLOT, F .B. New trends in yeast technology-immobilized cells. **Process biochemistry** v.15, p. 2-8,1980.

KOUTINAS, A.A.; KANELLAKI, M.; LYKOUGHOTIS, A.; TYPAS, M.A.; DRAINAS, C.. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* entrapped in alumina pellets. **Appl. Microbiol Biotechnol**.v.28: 235 –9, 1988.

KOUTINAS, A.A.; KANELLAKI, M. Contineous potable alcohol production by *Zymomonas mobilis* on γ -alumina pellets. **J. Food Sci**. 55: 525-31, 1990.

KUMAKURA, M.; YOSHIDA, M.; ASANO, M. Preparation of immobilized yeast cells with porous substrates. **Process Biochemistry**. v.27, p. 225-9,1992.

LEE, K.J.; LEFEBVRE, M.; TRIBE, D.E.; ROGERS, P.L. **Biotechnol. Lett.** , 2, 487, 1980.

LEE, T.H.; AHN, J.C.; RYU, D.Y. Performance of an immobilized yeast reactor system for ethanol production. **Enzyme Microbial.Technol.** v.5, p. 41-45, 1983.

LEME, J. – Industria do vinho. **Enciclopédia Delta Larousse**, Rio de Janeiro, v.XIV. p. 7617, 1965.

LEME, J.; BORGES, J.M. Açúcar de cana. Viçosa. Universidade de R. do Estado de Minas Gerais. 328p, 1965.

LIMA, U.A. Aguardente –Fabricação em pequenas destilarias. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 187p. 1999.

LIMA, U.A. Produção de álcool. In : LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.;SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo : Edgar Blücher. p. 593, 2001.

LINKO, P; LINKO, Y. Y. Applications of immobilized microbial cells. In CHIBATA, I.(coord) **Immobilized Microbial Cells**. New York.Academic Press. p. 53-151, 1983.

MESSING, R.A.; OPPERMANN, R.A. Pore Dimensions for Accumulating Biomass. I. Microbes that Reproduce by Fission or Budding. **Biotechnol. Bioengng**. v. 21, p. 49-58,1979.

MEERSMAN, E. Use of a monolayer carrier in brewery. **Cerevisiae and Biotechnology**. v.17 (n.4), p. 55-56, 58-59, 1992.

MOO-YOUNG, M.; LAMPTEY, J.; ROBINSON, C.W. **Biotechnol Lett**. 2. 541, 1980.

MOUEDDEB, H.; SANCHEZ, J.; BARDOT, C.; FICK, M. Membrane bioreactor for lactic acid production. **Journal of Membrane Science**. Volume 114:1, pp 59-71, 1996.

NAGASHIMA, M. et al Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. **Biotechnol. Bioengng**. v. 21, p. 49-58, 1984.

NAVARRO, J.M.; DURAND, Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. **European Journal of Applied Microbiology**. v. 4, p. 243-54, 1977.

NAVARRO, A.C; LUCCA, M.E.; ALLIERI, D.A.S. Producción continua de etanol con leva duras inmovilizadas en bagazo. **Acta Cient. Venezolana** v.33, p. 214-18,1982.

OGBONNA, J.C.; AMANO, Y.; NAKAMURA, K. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. **J. Ferment Bioeng**, 67:92-96, 1989.

PARASCANDOLA, P.; SCARDI, V.; TARTAGLIONE, O. Immobilization of yeast cells by adhesion on tuff granules. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.26, p. 507 -10, 1987.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N.P. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Volume 1 – **Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos**. 3º edição, SP., 364p, 1985.

PUNDLE, A.; PRABHUME, A.; SIVARAMAN .H. Immobilization of *Saccharomyces uvarum* cells in porous beads of polyacrylamide gel for ethanolic fermentation. **Appl Microbiol. Biotechnol.** v. 29, p. 426-29, 1988.

RICHTER, E.; EHWALD, R.; CONITZ, C. Immobilization of yeast cells in plant cell wall frameworks **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.32, p. 300-12, 1989.

SANTOS, P.S.;KJYOHARA, P.; SANTOS,H.S.; LIMA, U. de A. Desenvolvimento de esferas e membranas porosas de hidróxido de alumínio e de alumina para imobilização e crescimento de levedura de cerveja. IN: CONGR. BRAS. DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 12 Águas de Lindóia, 1996. **Anais. São Paulo. -CBECIMAT, Associação Brasileira de Materiais**, 1996.

SANTOS, P.S.; KIYOHARA, P. ; SANTOS,H.S.; LIMA, U. de A. Preparação de esferas e membranas porosas de alumina e de pseudoboemita para imobilização de levedura de cerveja. **Cerâmica**. v.43, (n.279), p. 25. jan/fev,1997.

SANTOS, P.S.; LIMA, U. de A.; SANTOS, H.S.; KIYOHARA, P. Preparation of channeled alumina and aluminium hydroxide beads and membranes for yeast cell immobilization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.70 (n.1), p.23-34,1998.

SHABTAI, Y., CHAIMOVITZ, S., FREEMAN, A., KATSCHALSKI-KATZIR, E., LINDER, C., NEMAS, M., PERRY, M., KEDEM. Continuous Ethanol production by immobilization yeast reactor. **Biotechnol. Bioengng**. New York, v.38 (n.8), p. 869-76, 1991.

SHIOTANI, T.; YAMANÉ, T. A horizontal packed-bed bioreactor to reduce CO₂ gás hold up in the continuous production of ethanol by immobilized yeast cells. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.13, p. 96-101, 1984.

SIESS, M.H.; DIVIES, C. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in a polyacrilamide gel and performing alcoholic fermentation. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.12, p. 10-15, 1981.

SIMON J.P. Facteurs affectant la productivité et la longévité d'un bioréacteur continu utilisant *Saccharomyces cerevisiae* inclus dans une matrice d' alginate de calcium.2. Effets des taux d' inoculation des contre-ions de gélicification et de la géométrie des matrices. **Belg J Food Chem Biotechol**, 44:183-191, 1989.

SITTON, O.C.; GADDY, J.L. Ethanol production in na immobilized cell reactor. **Biotechnology Bioengineering.** v.22, p.1735-48, 1980.

SMIDSROD, O. & SKJAK – BREAK, G. Alginate as immobilized cell reactor. **Biotechnology Bioengineering (Tibtech)**, v.8 (n.3), p. 71-5, 1990.

TAIPA, M.A., CABRAL, J.M.S., SANTOS, H. Comparison of glucose fermentation by suspended and gel-entrapped yeast cells; an in-vivo nuclear magnetic resonance study. **Biotechnol. Bioengng.** New York. v.41 (n.6), p. 647-53, 1993.

TAMPION, J. & TAMPION, M. D. Immobilized cells : principles and aplications. **Cambridge University Press.** 257 p., 1988.

TYIAGI, R.D. & GHOSE, T.K. Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. I- Analisis of continuos rapid ethanol fermentation in immobilized reactor. **Biotechnol. Bioengng.** New York. v.24, p. 781-95, 1982.

WILLIAMS, D.; MUNNECKE, D.M. The production of ethanol by immobilized yeast cells. **Biotechnology Bioengineering**, v.23, p. 1.813-25, 1981.

WHITE, F.H.; PORTNO, A.D. Continuous fermentation by immobilized brewers yeast. **J. Inst. Brew.** v.84, p. 228-30,1978.

YAMANÉ, T.; SHIMIZU, S. The minimum sized ideal reactor for continuous alcohol fermentation using immobilized microrganism, **Biotechnol. Bioengng.** v.24, p. 805-15, 1982.

LIV. <u>Doação do Autor</u>
N. E. _____
DATA <u>18/07/03</u>
PREÇO _____
TOMBAMENTO <u>24/07/03</u>

.j. 17582

BIBLIOTECA -
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Data:	<u>10.11.03</u>
Lilacs:	_____
Dedalus:	<u>1328809</u>
MFN:	<u>26012</u>
Terminal:	_____