

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E**  
**TECNOLOGIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**ENGENHARIA DE PROCESSOS E TECNOLOGIAS**

EMPREGO DE MEMBRANA NA SEPARAÇÃO DE CÉLULAS DE  
*Zymomonas mobilis* EM BIOPROCESSOS ASSOCIADOS PARA A  
PRODUÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO LACTOBIÔNICO

**Paloma Fontanari Forest**

CAXIAS DO SUL, 2014

PALOMA FONTANARI FOREST

**EMPREGO DE MEMBRANA NA SEPARAÇÃO DE CÉLULAS DE  
*Zymomonas mobilis* EM BIOPROCESSOS ASSOCIADOS PARA A  
PRODUÇÃO DE ETANOL E ÁCIDO LACTOBIÔNICO**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias”

**Orientador:** Profa. Dra. Eloane Malvessi

**Co-Orientador:** Profa. Dra. Mara Zeni Andrade

Caxias do Sul, 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

F716e Forest, Paloma Fontanari

Emprego de membrana na separação de células de *Zymomonas mobilis* em bioprocessos associados para a produção de etanol e ácido lactobiônico / Paloma Fontanari Forest. - 2014.

viii, 76 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias. 2014.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloane Malvessi, co-orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Zeni Andrade.

1. *Zymomonas mobilis*. 2. Bioprocessos. 3. Etanol. 4. Ácido lactobiônico. 5. Engenharia de processos. I. Título.

CDU 2.ed. : 579.844

Índice para o catálogo sistemático:

1. <i>Zymomonas mobilis</i>	579.844
2. Bioprocessos	577.1
3. Etanol	661.722
4. Ácido lactobiônico	661.746.2
5. Engenharia de processos	658.5

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.


“EMPREGO DE MEMBRANA NA SEPARAÇÃO DE CÉLULAS DE  
*Zymomonas mobilis* EM BIOPROCESSOS ASSOCIADOS PARA A PRODUÇÃO  
DE ETANOL, SORBITOL E ÁCIDO LACTOBÍÔNICO

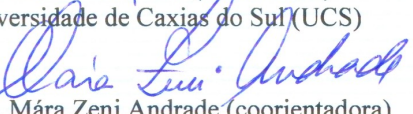
**Paloma Fontanari Forest**


Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.


Caxias do Sul, 20 de Maio de 2014.


Banca Examinadora:

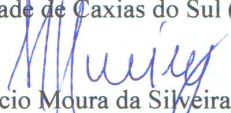
  
Dra. Eloane Malvessi (orientadora)  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

  
Dra. Mára Zeni Andrade (coorientadora)  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

  
Dra. Camila Baldasso  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

  
Dr. Carlos Pérez Bergmann  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

  
Pós-doutoranda Fernanda Bettin  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

  
Dr. Maurício Moura da Silveira  
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Caravaggio por guiarem meu caminho, iluminando meus passos e orientando minhas escolhas.

Às prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Eloane Malvessi e prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Mara Zeni Andrade pela orientação desse trabalho, dedicação, ensinamentos, colaborações, confiança e incentivo ao longo dessa caminhada.

Ao prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira e prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Camila Baldasso por compartilharem seus conhecimentos.

Ao programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias pela oportunidade.

Ao CNPQ pela oportunidade e apoio financeiro.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos do Instituto de Biotecnologia e Laboratório de Pesquisa em Química de Materiais, pelos bons momentos em que trocamos experiências e conhecimentos.

Às bolsistas Mônica Girardi e Roberta Rauch, pela colaboração, disponibilidade, amizade e dedicação a esse projeto.

Aos colegas e amigos, pelas caronas, companhias e trocas de experiências: Caroline Reginatto, Marcelo Zaro, Sabrina Carra, Patrícia Poletto e Fernando Stuani.

À minha mãe Mara Isabel, por estar sempre ao meu lado, pelo seu amor e pelo seu carinho. A meu pai Cezar pelo seu apoio e incentivo. A meu amor, meu noivo Adilson Rigo, por estar comigo nesse projeto e em tantos outros mais, sempre acreditando nas minhas escolhas.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	i
<b>LISTA DE QUADROS</b>	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iv
<b>RESUMO</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 OBJETIVOS</b>	3
<b>2.1 Objetivo geral</b>	3
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	4
<b>3.1 <i>Zymomonas mobilis</i>: características e metabolismo</b>	4
<b>3.2 Meios e condições de cultivo para <i>Zymomonas mobilis</i></b>	5
<b>3.3 Complexo enzimático GFOR/GL de <i>Zymomonas mobilis</i></b>	6
<b>3.4 Características, produção e aplicações do ácido lactobiônico e sorbitol</b>	7
<b>3.5 Biorreatores e regimes de condução de bioprocessos</b>	8
<b>3.6 Concentração da biomassa e separação de produtos da fermentação</b>	10
<b>3.7 Membranas</b>	10
<b>3.8 Processos de separação por membranas</b>	12
3.8.1 <i>Fouling</i> e polarização por concentração	15
<b>3.9 Utilização de membranas em bioprocessos</b>	17
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
<b>4.1 Microrganismo</b>	20
<b>4.2 Meio de cultura</b>	20
<b>4.3 Esquema da metodologia experimental</b>	21

<b>4.4 Ativação celular</b>	22
<b>4.5 Definição do teor e forma de inoculação</b>	22
<b>4.6 Concentração de substrato no meio de fermentação</b>	24
<b>4.7 Batelada com reciclo de células</b>	24
4.7.1 Reciclo de células através de centrifugação	24
4.7.2 Bateladas por meio de cortes	25
4.7.3 Reciclo celular via membranas	25
<b>4.8 Ensaio de bioconversão de substrato em produto</b>	30
<b>4.9 Metodologia analítica</b>	30
4.9.1 Concentração de células	30
4.9.2 Determinação de açúcares redutores	30
4.9.3 Quantificação de etanol	31
4.9.4 Determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidorreductase e glicono-lactonase (GFOR)	31
4.9.5 Estimativa da concentração de produtos em ensaios de bioconversão	31
4.9.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
<b>4.10 Parâmetros de avaliação do processo</b>	32
4.10.1 Fator de conversão de glicose em células	32
4.10.2 Fator de conversão de substrato em produtos	32
4.10.3 Velocidade específica de crescimento	33
4.10.4 Rendimento em produto	33
4.10.5 Produtividade volumétrica na fermentação	33
4.10.6 Velocidade específica de formação de ácido lactobiônico	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	35
<b>5.1 Avaliação da etapa de ativação da cultura de <i>Zymomonas mobilis</i></b>	35

<b>5.2 Efeito da concentração de glicose no meio de fermentação</b>	37
<b>5.3 Determinação do percentual de inóculo e forma de inoculação</b>	39
<b>5.4 Reciclo de células através de centrifugação</b>	42
<b>5.5 Cultivos em batelada por meio de cortes</b>	43
<b>5.6 Reciclo de células através de membranas</b>	46
5.6.1 Caracterização das membranas	46
5.6.2 Reciclo através da membrana cerâmica	52
5.6.3. Ensaio de bioconversão	60
5.6.4. Reciclo através de membrana polimérica	62
<b>6 CONCLUSÕES</b>	66
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	68



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Resultados gerais de crescimento celular, obtidos nos ensaios de ativação da cultura de <i>Zymomonas mobilis</i> com diferentes percentuais de inóculo, fontes de extrato de levedura e tempos de incubação	36
<b>Tabela 2.</b> Resultados gerais de consumo de substrato, obtidos nos ensaios de ativação da cultura de <i>Zymomonas mobilis</i> com diferentes percentuais de inóculo, fontes de extrato de levedura e tempos de incubação	36
<b>Tabela 3.</b> Resultados gerais obtidos nos cultivos de <i>Zymomonas mobilis</i> , em regime descontínuo, com diferentes concentrações de substrato	38
<b>Tabela 4.</b> Resultados gerais obtidos nos cultivos de <i>Zymomonas mobilis</i> , em regime descontínuo, com diferentes proporções de inóculo, obtido a partir de biomassa úmida concentrada	40
<b>Tabela 5.</b> Resultados gerais obtidos nos ensaios fermentativos de <i>Zymomonas mobilis</i> , em regime descontínuo, com diferentes proporções de inóculo	42
<b>Tabela 6.</b> Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de <i>Zymomonas mobilis</i> em três bateladas repetidas com reciclo de células através de centrifugação	43
<b>Tabela 7.</b> Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de <i>Zymomonas mobilis</i> em três bateladas repetidas por meio de cortes (15% v/v)	44

<b>Tabela 8.</b> Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de <i>Zymomonas mobilis</i> em três bateladas repetidas por meio de cortes (20% v/v)	45
<b>Tabela 9.</b> Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de <i>Zymomonas mobilis</i> com reciclo de células através de membrana cerâmica tubular, Ensaio 1	53
<b>Tabela 10.</b> Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de <i>Zymomonas mobilis</i> com reciclo de células através de membrana cerâmica tubular, Ensaio 2	53
<b>Tabela 11.</b> Balanço de massa de células de <i>Zymomonas mobilis</i> na permeação pela membrana cerâmica	55
<b>Tabela 12.</b> Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de <i>Zymomonas mobilis</i> com reciclo de células através de membranas poliméricas, Ensaio 1	62
<b>Tabela 13.</b> Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de <i>Zymomonas mobilis</i> com reciclo de células através do módulo de membranas poliméricas, Ensaio 2	63
<b>Tabela 14.</b> Balanço de massa de células de <i>Zymomonas mobilis</i> na permeação pelas membranas poliméricas	64

**LISTA DE QUADRO**

<b>Quadro 1.</b> Caracterização dos diferentes processos de filtração	13
---	----

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Aspecto morfológico de <i>Zymomonas mobilis</i>	4
<b>Figura 2.</b> Bioconversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glicônico, respectivamente, pelas enzimas glicose frutose oxidoreductase e glucono- $\delta$ -lactonase de <i>Zymomonas mobilis</i>	6
<b>Figura 3.</b> Estruturas de membranas isotrópicas e anisotrópicas	12
<b>Figura 4.</b> Representação do fluxo tangencial e convencional em uma membrana	14
<b>Figura 5.</b> Variação do fluxo permeado com o tempo de operação ocasionada por polarização de concentração e incrustação ( <i>fouling</i> )	16
<b>Figura 6.</b> Fluxograma dos cultivos de <i>Zymomonas mobilis</i> e das etapas de recuperação e separação dos produtos e de bioconversão	21
<b>Figura 7.</b> Condições de cultivo de <i>Zymomonas mobilis</i> em frascos agitados	22
<b>Figura 8.</b> Sistema utilizado para a produção de biomassa e etanol por <i>Zymomonas mobilis</i> a 30°C, pH 5,5	23
<b>Figura 9.</b> Membranas utilizadas no sistema de reciclo celular	26
<b>Figura 10.</b> Representação do sistema de reciclo de células através de membrana acoplada de forma externa ao biorreator	26
<b>Figura 11.</b> Módulo de membranas de aço inoxidável. Sistema empregado na concentração da biomassa e separação de etanol de <i>Zymomomas mobilis</i>	27

- Figura 12.** Sistema empregado na concentração da biomassa e separação de etanol de *Zymomonas mobilis* através do módulo de membranas poliméricas de fibras ocas, acopladas ao biorreator 28
- Figura 13.** Crescimento celular (A) e consumo de substrato (B) em função do tempo, em cultivos de *Zymomonas mobilis* em batelada, com diferentes concentrações de glicose 37
- Figura 14.** Crescimento celular e consumo de substrato em função do tempo, em cultivos de *Zymomonas mobilis* em batelada, com diferentes proporções de inóculo, obtido a partir de biomassa úmida 39
- Figura 15.** Crescimento celular e consumo de substrato em função do tempo, em cultivos de *Zymomonas mobilis* em batelada, com diferentes tamanhos de inóculo 41
- Figura 16.** Compactação da membrana cerâmica na pressão de operação de 6 bar 47
- Figura 17.** Compactação do módulo de membranas poliméricas na pressão de operação de 3 bar 47
- Figura 18.** Determinação da permeabilidade hidráulica através do coeficiente angular da função entre o fluxo permeado e as pressões de operação testadas para a membrana cerâmica 49
- Figura 19.** Determinação da permeabilidade hidráulica através do coeficiente angular da função entre o fluxo permeado e as pressões de operação testadas para as membranas poliméricas 49
- Figura 20.** Variação do fluxo permeado em função do fator de concentração volumétrico nos testes conduzidos com as membranas cerâmicas e poliméricas 51

<b>Figura 21.</b> Variação do fluxo permeado em função do tempo para as membranas poliméricas e para a membrana cerâmica	52
<b>Figura 22.</b> Permeabilidade hidráulica em distintas pressões de operação para a membrana cerâmica antes da passagem do meio fermentado de <i>Zymomonas mobilis</i>	54
<b>Figura 23.</b> Aspecto da membrana cerâmica antes da utilização e após a permeação do meio fermentado de <i>Zymomonas mobilis</i> ; aparência do meio de fermentação antes e depois da permeação na membrana.	56
<b>Figura 24.</b> Micrografia eletrônica de varredura da superfície de membranas cerâmicas isenta de células de <i>Zymomonas mobilis</i>	57
<b>Figura 25.</b> Micrografia eletrônica de varredura das células de <i>Zymomonas mobilis</i> em contato com a superfície da membrana cerâmica	58
<b>Figura 26.</b> Micrografia eletrônica de varredura da camada de células de <i>Zymomonas mobilis</i> na membrana cerâmica	59
<b>Figura 27.</b> Concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaio de bioconversão com células de <i>Zymomonas mobilis</i>	60
<b>Figura 28.</b> Velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ) em função do tempo, em ensaios de bioconversão com células/enzimas de <i>Zymomonas mobilis</i> recuperadas em membrana cerâmica	61
<b>Figura 29.</b> Permeabilidade hidráulica em distintas pressões de operação para ao módulo de membranas poliméricas antes da passagem do caldo fermentado de <i>Zymomonas mobilis</i>	63

## RESUMO

*Zymomonas mobilis*, bactéria anaeróbia, metaboliza glicose, frutose ou sacarose gerando quantidades equimolares de etanol e CO<sub>2</sub>. A glicose atua como indutor de glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono- $\delta$ -lactonase (GL), enzimas periplasmáticas de *Z. mobilis*, responsáveis por promover a oxidação de aldoses em ácidos aldônicos e a redução de frutose a sorbitol. Para a obtenção de altos rendimentos em biomassa e etanol em cultivos de *Z. mobilis* e posterior utilização das células na etapa de bioconversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, têm sido empregadas técnicas de reciclo celular, com destaque para a utilização de membranas. Neste trabalho foi comparado o reciclo de células através de sistemas de membranas cerâmica tubular e polimérica (fibras ocas), ambas de microfiltração e comparadas com os ensaios realizados em bateladas por cortes e por centrifugação. Na etapa inicial, foram realizados testes para definição do tempo de ativação da cultura celular, da forma de inoculação, porcentagem de inóculo empregada e, ainda, como teste preliminar, a determinação da concentração de glicose a ser empregada nos testes. Para a ativação da cultura, foi definido por 10% (v/v) de suspensão celular, onde, em 12 h de cultivo, 4g.L<sup>-1</sup> de biomassa foram obtidos com a utilização do extrato de levedura purificado. Na sequência, os resultados apontaram que, entre os tamanhos de inóculo testados (5 a 20% v/v), maior produção de etanol foi obtido com 15% em volume - em relação ao volume final de meio - ou com a biomassa concentrada. Para a condução dos testes de fermentações, a concentração de substrato empregada foi 80 g.L<sup>-1</sup>, com a obtenção de 3,4 g.L<sup>-1</sup> de células em 6 h de cultivo. O reciclo de células através da centrifugação das células apontou que, nesse sistema de reciclo, foi possível o incremento em termos de crescimento celular e produção de etanol. Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios com reciclo de células nas bateladas por corte. No reciclo através de membranas, com relação ao crescimento celular, aumento médio de 35% foi observado quando realizada a concentração das células com a membrana cerâmica, fato que não foi observado quando utilizada a membrana polimérica. Em função disto, as células recicladas na membrana cerâmica foram submetidas ao ensaio de bioconversão, com a obtenção de 46% de rendimento em ácido lactobiônico.

## ABSTRACT

*Zymomonas mobilis*, anaerobic bacteria, metabolize glucose, fructose or sucrose generating equimolar amounts of CO<sub>2</sub> and ethanol. Glucose behave as an inducer of glucose - fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono - $\delta$ - lactonase (GL), periplasmic enzymes from *Z. mobilis*, promoting the oxidation of aldoses in aldonic acids and reduction of ketoses to polyols. To obtain high yields of biomass and ethanol in cultures of *Z. mobilis* cells and subsequent use in the bioconversion step, cell recycling techniques, with emphasis on the use of membranes have been employed. In this work we compared the recycling of cells through ceramic and polymeric (hollow fiber) membranes with trials in batches by cuts of fermentation and centrifuged batch systems. Earlier, tests for setting the activation time and the cell culture the nutrients needed, defining the shape of inoculation and percentage of inoculum used were performed and, as a preliminary test, the determination of glucose concentration to be employed in the tests. The activation of the cell culture of choice for testing the continuity of the percentage was 10% of cells, where 12 hours of culture, 4 g.L<sup>-1</sup> were obtained with the use of purified yeast extract. Furthermore, the results indicated that under the conditions evaluated, among inoculum sizes tested (5-20%), increased ethanol production was obtained with 15% by volum - compared to the final volume of medium - or the concentrated biomass. To conduct the test fermentations was definitely the best condition with respect to the substrate concentration 80 g.L<sup>-1</sup>, where the tests, it was possible to obtain 3,4 g.L<sup>-1</sup> of cells within 6 hours of cultivation. The recycle of cells by centrifugation of the cells showed that this system can recycle the increase in both cell growth and ethanol production. Similar results were obtained in tests with cell recycle in batches by cut of fermentation. In recycled through membranes with respect to cell growth, average increase of 35% was observed when the concentration of the cells performed with the ceramic membrane and no increase was observed when used polymeric membranes. Because of this, the cells in recycled ceramic membrane were subjected to the test of bioconversion and the results show performance of 46% in terms of production of lactobionic acid.



## 1 INTRODUÇÃO

Para a produção de etanol em larga escala, *Zymomonas mobilis* tem se destacado frente ao uso de leveduras, geralmente empregadas no processo, por apresentar características como a tolerância às altas concentrações de açúcares e etanol e resistência aos meios ácidos e contaminações. Como fontes de carbono para crescimento e produção de etanol, *Z. mobilis* utiliza glicose, frutose ou sacarose. Em média, rendimento em etanol superior a 90% é obtido com o emprego de glicose como substrato na fermentação.

A glicose também atua como indutor da formação do complexo enzimático periplasmático glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glicono- $\delta$ -lactonase (GL), responsável por promover, simultaneamente, a oxidação de aldoses em ácidos aldônicos e a redução de cetoses à polióis. GFOR e GL apresentam potencial de utilização industrial, na bioprodução de compostos de alto valor agregado, como sorbitol e ácido lactobiônico, resultantes da conversão de frutose e lactose, respectivamente. O sorbitol é empregado em xaropes, pastas medicinais e como emoliente na produção de cosméticos. O ácido lactobiônico apresenta importantes aplicações nas áreas cosmética e farmacêutica, em função do poder hidratante, cicatrizante e anti-radicais livres e na área médica, como componente de soluções de conservação de órgãos a serem transplantados e na vetorização de drogas antitumorais.

Para que sejam obtidas células/enzimas e elevados teores de etanol por *Z. mobilis*, inicialmente, é conduzida a etapa fermentativa. No cultivo, com o intuito de aumentar a produtividade em biomassa e etanol, além do regime em batelada, este pode ser conduzido em bateladas por meio de cortes e, ainda, empregando o reciclo de células. Ao final do cultivo, em função de dificuldades em termos de separação da biomassa do meio de fermentação – que restringe o uso de centrífugas devido à dimensão das células bacterianas e da possibilidade de cisalhamento celular - destaca-se o emprego de membranas, com o intuito de separar os produtos da fermentação.

Os processos de separação envolvendo membranas, tais como microfiltração, ultrafiltração e osmose inversa, consolidaram-se em diferentes setores industriais, pois proporcionam simplicidade no modo operacional e no escalonamento, podendo ser incorporadas em processos biotecnológicos. A principal característica que distingue estes processos de outras técnicas de separação é o uso de membranas seletivas em módulos compactos e em condições de baixo consumo de energia.

Estudos realizados no grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul têm focado na bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol, compostos que apresentam importantes aplicações nas áreas médico-farmacêutica e de alimentos. Foi observado que o complexo enzimático GFOR/GL de *Z. mobilis* apresenta afinidade reduzida para o substrato lactose e, deste modo, o sucesso da conversão de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente, dependerá dos títulos de GFOR/GL presentes nas células bacterianas e dos parâmetros do processo que estão diretamente envolvidos.

Neste contexto, este trabalho foi focado em processos de fermentação de *Z. mobilis* associados a membranas. De um modo geral, foi avaliada a utilização de membranas de microfiltração para a concentração de células/enzimas e separação de etanol. As células/enzimas concentradas, uma vez preservada a velocidade reacional, foram conduzidas para a etapa biocatalítica de produção de sorbitol e ácido lactobiônico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Aperfeiçoar os estudos de fermentação de *Zymomonas mobilis* visando à produção de biomassa/enzimas e etanol, integrando processos de separação por membrana para a concentração de células/enzimas, na recuperação de produtos e na síntese biocatalítica de sorbitol e ácido lactobiônico.

### 2.2 Objetivos específicos

- . Avaliar as condições de ativação celular e de preparo do inóculo para a obtenção de maior densidade celular;
- . conduzir cultivos de *Z. mobilis* em regime descontínuo e avaliar, nestes processos, o efeito da concentração de glicose e de nutrientes que proporcione a obtenção de altos rendimentos em biomassa/enzimas e etanol;
- . determinar os parâmetros de microfiltração em membranas cerâmica e polimérica;
- . avaliar as condições de concentração da biomassa e de separação do etanol através de centrifugação, bateladas por corte e com a utilização de membranas cerâmicas e poliméricas;
- . avaliar a bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol com as células/enzimas de *Z. mobilis* previamente concentradas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Zymomonas mobilis*: características e metabolismo

*Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram-negativa, que não forma esporos, possui mobilidade e capacidade de produção de etanol. Apresenta-se na forma de bastonetes, com dimensões de 1 a 6 µm de comprimento e de 1 a 1,4 µm de diâmetro (VIAKARI, 1988) (Figura 1). *Z. mobilis* desenvolve-se preferencialmente em anaerobiose, sendo, entretanto, capaz de tolerar a presença de oxigênio (VIAKARI, 1986).

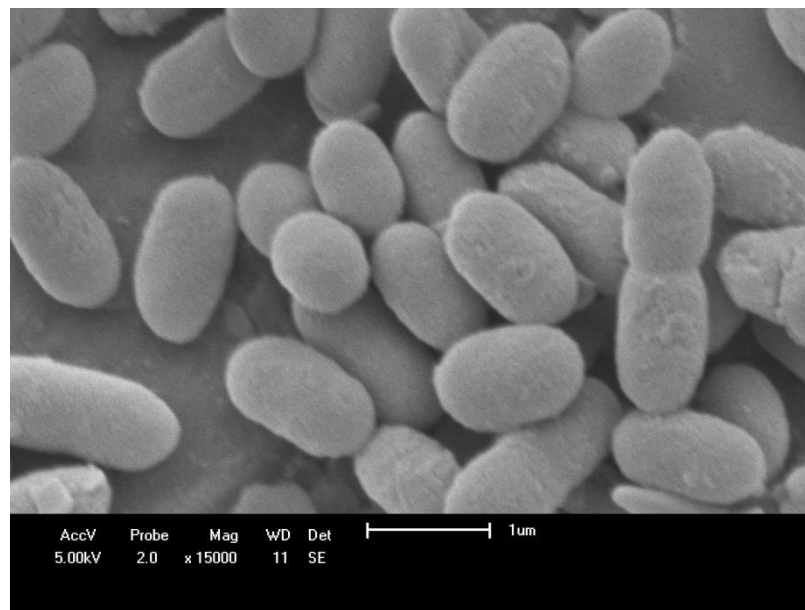


Figura 1. Aspecto morfológico de *Zymomonas mobilis*

Fonte: o autor

A bactéria é quimiorganotrófica e, como fonte de carbono para crescimento e produção de etanol, utiliza glicose, frutose e sacarose. Realiza o catabolismo de açúcares pela via de Entner Doudoroff, sendo a primeira bactéria anaeróbia conhecida a utilizar tal via bioquímica (SWINGS & DE LEY, 1977).

Utilizando glicose como fonte de carbono, a produção de etanol por *Z. mobilis* representa cerca de 95% do valor máximo teórico (ERNANDES, 2009; VIAKARI, 1988). O etanol, ou álcool etílico (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), tem como via de produção a fermentação

de açúcares, naturalmente encontrados em plantas. O maior percentual de etanol industrial continua sendo obtido pelo mesmo processo, podendo ainda ser produzido a partir de eteno, derivado do petróleo (BASTOS, 2007).

A fermentação de 1 mol de glicose produz 1,8 mol de etanol e 1,9 mol de dióxido de carbono além de quantidades mínimas de outros produtos, como lactato, acetaldeído, ácido acético, glicerol, acetoína, sorbitol, di-hidroxiketona e manitol (VIIKARI,1988). Por outro lado, quando se utiliza sacarose ou uma mistura de glicose e frutose, há ainda a formação de gluconolactona e sorbitol. Sorbitol é produzido e acumulado pelas células, como função fisiológica de proteção à pressão osmótica causada pelas altas concentrações de açúcar (LOOS *et al.*, 1994).

### **3.2 Meios e condições de cultivo para *Zymomonas mobilis***

A composição do meio de cultura é fator determinante no crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol, uma vez que *Z. mobilis* é dependente da presença de vitaminas, como biotina e ácido pantotênico no meio, considerado um problema do ponto de vista de uso industrial (SWINGS & DE LEY, 1977). Vários autores destacam o uso de extrato de levedura no meio de cultura de *Z. mobilis* como substituto às vitaminas, porém, devido ao seu preço elevado, a utilização deste componente se limita à escala laboratorial. Como alternativa, Malvessi *et al.* (2006) destacam a utilização de uma fonte comercial de extrato de levedura bruto em substituição ao extrato purificado, usado como fonte de nitrogênio orgânico e vitaminas para o crescimento de *Z. mobilis*. Nestas condições, rendimentos em etanol, cerca de 90% em relação ao máximo teórico, foram alcançados com a utilização de ambos os extratos de levedura.

Com relação às fontes de carbono, Swings & De Ley (1977), em estudos comparativos de diferentes cepas de *Z. mobilis*, observaram que a maioria apresentava capacidade de crescer em meio contendo 30 a 40% (m/v) de glicose. Struch *et al.* (1991) verificaram que a tolerância a concentrações elevadas de açúcares, observada em cultivos com *Z. mobilis*, seria devida à sua capacidade de regulação osmótica e eficiente sistema de transporte de glicose.

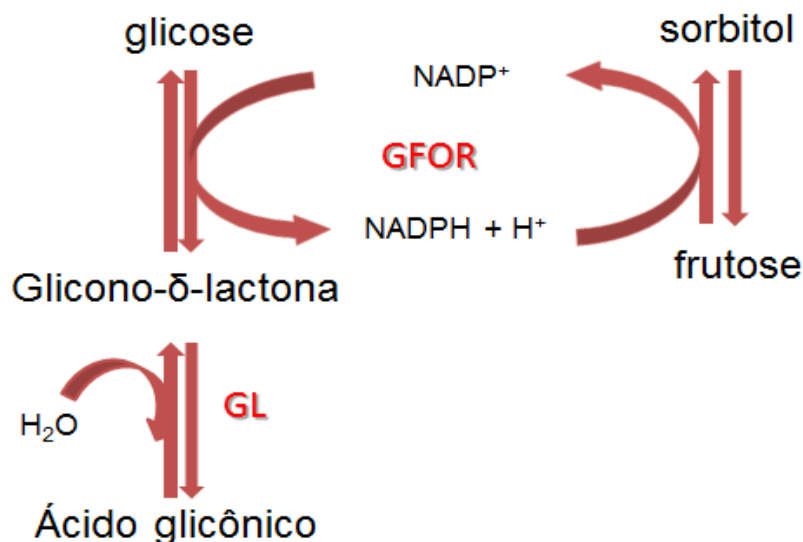
Com relação à temperatura empregada em processos visando ao crescimento, produção de enzimas e etanol por *Z. mobilis*, é relatada entre 25 a 35°C, sendo a cultura

caracterizada por possuir tolerância a meios ácidos e crescer entre pH 3,5 a 7,5 (SWINGS & DE LEY, 1977).

### 3.3 Complexo enzimático GFOR/GL de *Zymomonas mobilis*

O mecanismo bioquímico de obtenção de ácido glicônico e sorbitol por *Z. mobilis* foi descrito por Zachariou & Scopes (1986), que identificaram a presença de glicose-frutose oxidoreductase (GFOR), responsável pela redução de frutose a sorbitol, concomitantemente com a oxidação de glicose a glicono- $\delta$ -lactona. A glicono- $\delta$ -lactona é, então, convertida a ácido glicônico (gliconato) pela ação da enzima glicono- $\delta$ -lactonase. Uma vez que GFOR contém a coenzima  $\text{NADP}^+$  acoplada à sua estrutura, a reação se dá independentemente da adição de qualquer cofator e mesmo com células inviáveis (Figura 2).

Glicose-frutose oxidoreductase, apesar de ter como substratos glicose e frutose, é induzida, em maior grau, pela presença de glicose e concentrações crescentes deste açúcar, proporcionando um aumento da atividade da enzima. Maior atividade catalítica do sistema enzimático é relatado entre 39-42°C e pH na faixa de 6,2 a 6,4 (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).



**Figura 2.** Bioconversão de glicose e frutose em sorbitol e ácido glicônico, respectivamente, pelas enzimas glicose frutose oxidoreductase e glicono- $\delta$ -lactonase de *Zymomonas mobilis*. Adaptado de Zachariou & Scopes (1986).

Satory *et al.* (1997) mostraram que GFOR/GL têm a capacidade de oxidar, além da glicose, outros carboidratos redutores, como maltose, galactose e lactose, levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos (ácido maltobiônico, galactônico e lactobiônico). Na linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório de Bioprocessos do IB/UCS, vem sendo estudada, em maiores detalhes, a formação de ácido lactobiônico, produto de alto valor agregado com importantes aplicações comerciais, através de reação catalisada por GFOR/GL de *Z. mobilis* (CARRA *et al.*, 2003; MALVESSI *et al.*, 2006; MALVESSI, 2008; MALVESSI *et al.*, 2010, 2013).

### 3.4 Características, produção e aplicações do ácido lactobiônico e sorbitol

O ácido lactobiônico (ácido 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glicônico) é composto por uma unidade de galactose quimicamente ligada por um éter a uma molécula de ácido glicônico (BUDAVARI *et al.*, 1996). Pode ser obtido através da oxidação química ou biológica da lactose (MURAKAMI *et al.*, 2006, NORDKVIST *et al.*, 2007, MALVESSI, 2008, MALVESSI *et al.*, 2013).

O ácido lactobiônico é uma substância de alto valor comercial e, devido às suas atividades farmacológicas já comprovadas cientificamente, apresenta possibilidades de aplicações na área médica, sendo empregado como componente de soluções de conservação de órgãos a serem transplantados (SUMIMOTO & KAMADA, 1990), na vetorização de drogas (KIM & KIM, 2002; KIM *et al.*, 2004), na área cosmética (YU & VAN SCOTT, 2004; GREEN *et al.*, 2005; GUTIÉRREZ *et al.*, 2012; TASIC-KOSTOV *et al.*, 2012) e na área de alimentos, como acidulante na produção de queijos (KOKA *et al.*, 2002).

Sorbitol é um composto encontrado na natureza, em algumas espécies vegetais. Trata-se de uma substância não cariogênica, com poder edulcorante de 50 a 60% em relação à sacarose, isenta de odor e de sabor residual (BUDAVARI *et al.*, 1996). Suas aplicações estão focadas na indústria de alimentos, farmacêutica, resinas, papel, entre outras (BUDAVARI *et al.*, 1996; SILVEIRA & JONAS, 2002; VOGEL, 2003; JONAS & SILVEIRA, 2004; RITTER, 2009).

A produção de ácido lactobiônico e sorbitol é relatada por vários autores. Satory *et al.* (1997) mostraram que o complexo enzimático GFOR/GL, extraído de células de *Z. mobilis* cultivadas em glicose, têm a capacidade de oxidar, além da glicose, outras

sete aldoses (xilose, galactose, arabinose, manose, maltose, celobiose e lactose), na presença de frutose, levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos, além de sorbitol. Miyamoto *et al.* (2000), em meio contendo soro de leite ( $\sim 50 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose) e  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de peptona, relataram a obtenção de  $44 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido lactobiônico em 60 h de processo com *Pseudomonas* sp LS13-1. Murakami *et al.* (2006), destacaram a eficiência de *Burkholderia cepacia* na oxidação de diferentes aldoses visando à obtenção de ácidos aldônicos. Malvessi *et al.* (2013), em estudo de produção de diferentes ácidos aldônicos com células/enzimas de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio, destacaram a obtenção de rendimento médio de 75% em ácido lactobiônico, resultado relevante em se tratando de processo biotecnológico.

### 3.5 Biorreatores e regimes de condução de bioprocessos

Biorreatores são usados na realização de bioprocessos em que biocatalisadores são os agentes principais na conversão de substratos em produtos. Estes agentes podem ser imobilizados ou não em algum suporte, podendo ser microrganismos, enzimas ou células animais. Os produtos da reação são separados por extração, membranas, precipitação ou centrifugação (CARSTENSEN, 2012).

Os biorreatores mais usados em bioprocessos são os reatores de mistura completa. Nesse tipo de reator a agitação mecânica é usada, com volume de operação variável e dependente do tipo de processo que vai ser empregado (DORAN, 1997).

Os biorreatores de membranas são objeto de estudo constante, pois provaram ser muito efetivos nos processos de bioconversão, apresentando altas produtividades e facilitando a separação de produtos. As membranas podem operar externa ou internamente ao reator (CARSTENSEN, 2012).

Os principais regimes de condução empregados em processos fermentativos são descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo. O processo em regime descontínuo é caracterizado pelo fato de o substrato ser alimentado todo de uma vez só no biorreator, no início da fermentação; na batelada alimentada o substrato é alimentado de forma controlada e ao longo de toda a reação e, por sua vez, no processo contínuo, a alimentação e a retirada de produtos ocorrem de forma constante (SCHMIDELL, 2001).

O processo em batelada pode levar a baixos rendimentos e produtividade, pois o substrato, que é inserido todo no início do processo, pode exercer efeitos inibitórios. Já



o processo em batelada alimentada evita esse efeito inibidor e favorece as bioconversões (PACHECO, 2010).

Erzinger (1996) e Wisbeck *et al.* (1997) destacam que altas concentrações iniciais de glicose, em processo em batelada com *Z. mobilis*, levaram à significativa redução da produtividade, devido à inibição pela concentração de substrato.

Malvessi *et al.* (2008) relataram que a inibição do crescimento de *Z. mobilis* ATCC 29191 por glicose pode ser evitada com a condução do processo em regime descontínuo alimentado, permitindo, assim, a obtenção de rendimentos em etanol próximos a 95%.

As bateladas com cortes ou pé-de-cuba são usuais em fermentações industriais como na produção de cachaças e vinhos. Baseiam-se no princípio da separação de certa quantidade de caldo fermentado de um fermentador que, acrescido de meio estéril, vai dar início a uma nova etapa de fermentação (LEPE, 1992).

Os reatores com reciclo de células são usuais em fermentações alcólicas e, em alguns casos, no tratamento de efluentes (BELTER *et al.*, 1988).

O reciclo de células microbianas pode ser útil por proporcionar menor custo com reposição de células e melhores condições operacionais, visto que esses microrganismos não demandariam maior quantidade de substrato para a fase de crescimento, em função da prévia adaptação ao meio (LIMA, 2004). Entretanto, o efeito inibitório do etanol e de outros produtos torna-se evidente durante ciclos repetidos de fermentação com reciclo das células, devido ao acúmulo gradual de produtos tóxicos à população microbiana. Este efeito é acentuado quando as fermentações são conduzidas em altas concentrações iniciais de glicose (MARQUES & SERRA, 2004).

O reciclo de células em bioprocessos pode ser realizado também com o intuito de sanar os problemas envolvendo a inibição pelo produto. Dong (2010) relata a utilização do reciclo de células de *Lactobacillus rhamnosus* através da centrifugação visando ao aumento da produtividade em ácido láctico. Nestas condições, o autor destaca a obtenção de produtividade de  $6,73 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em cinco fermentações consecutivas com reciclo de células.

### 3.6 Concentração da biomassa e separação de produtos da fermentação

O processo de separação/concentração das células microbianas pode ser realizado por centrifugação, filtração ou sedimentação. Tradicionalmente, em bioprocessos, é empregada a centrifugação, porém, técnicas alternativas tem sido foco de pesquisas (COUTINHO, 2007). Relatos apontam que a centrifugação poderia encarecer o processo, em função da demanda por energia elétrica (XU *et al.*, 2005).

No caso de fermentações alcoólicas, é usual a utilização de centrífugas na saída das dornas fermentadoras a fim de realizar a concentração e posterior retorno da biomassa para a nova batelada, favorecendo o processamento de maior quantidade de material e necessitando menores quantidades de substrato para a realização do mesmo processo se comparado ao mesmo sem reciclo (COUTINHO, 2007).

Como mencionado anteriormente, em bioprocessos envolvendo bactérias, devido à pequena dimensão celular, a separação da biomassa do meio fermentativo tem sido restringida ao uso de centrífugas. Em função disso, o emprego de processos envolvendo membranas para a separação e concentração *in situ* dos produtos da fermentação - biomassa e metabólitos - tem sido relatados como alternativos à centrifugação (CARMINATTI, 2001; JULBE *et al.*, 2001; CARSTENSEN *et al.*, 2012).

### 3.7 Membranas

Membranas são barreiras que separam duas fases, restringindo total ou parcialmente o transporte das espécies químicas presentes (MULDER, 1996). Para que ocorra o transporte de massa através de uma membrana, é necessário que haja a ação de uma força motriz, que, por sua vez, pode ser o gradiente de potencial químico ou o gradiente de potencial elétrico. O potencial químico é função da pressão, temperatura e concentração, porém, como a maioria dos processos de separação envolvendo membranas é realizada em temperatura constante, os gradientes de concentração e pressão são os mecanismos mais usuais de transporte de espécies através de membranas (BAKER, 2004).

O material a partir do qual as membranas são fabricadas define sua classificação em orgânicas, inorgânicas ou compósitas. As membranas orgânicas são aquelas obtidas a partir de materiais poliméricos como, policarbonato, poliamida, polisulfona, acetato de

celulose, entre outros (CHERYAN, 1998). As membranas inorgânicas apresentam, na sua composição, metais, cerâmicos vítreos e zeolíticos (BAKER, 2004). Já as membranas compósitas são compostas de dois materiais distintos, sendo as mais conhecidas poliacrilato e zircônia, poliamida e polissulfona, entre outros. As membranas inorgânicas apresentam maior estabilidade térmica e química frente às orgânicas (MULDER, 1996; CHERYAN, 1998).

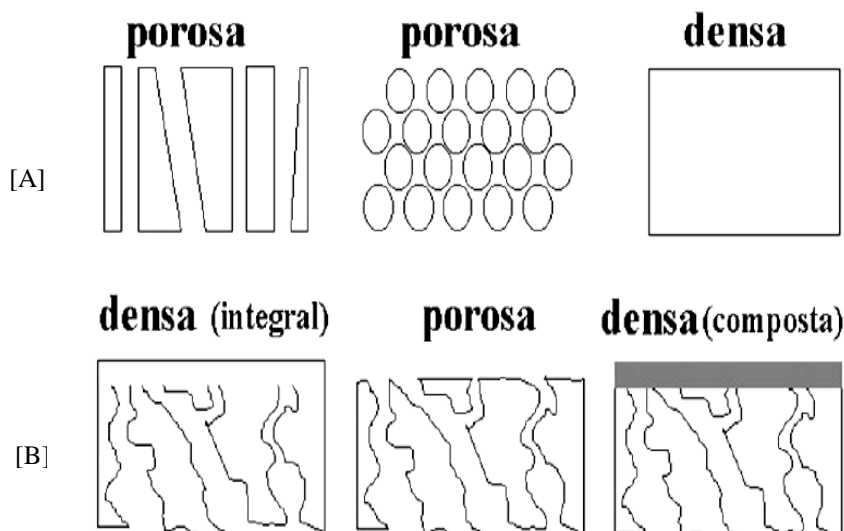
Silva *et al.* (2011) estudaram as propriedades de membranas compostas de celulose e óxido de alumínio. Os autores sugerem que as membranas híbridas são mais resistentes à combustão quando comparadas com as membranas celulósicas puras.

Ke *et al.* (2007) destacaram o uso de membranas à base de paládio, que têm sido o foco de estudos devido à capacidade de separar hidrogênio a partir de outros gases. Neste estudo, as membranas de paládio foram depositadas em suportes de  $\alpha$ -alumina, utilizadas para a separação de hidrogênio. Segundo os autores, a membrana exibiu boa estabilidade térmica quando utilizada nos testes de permeação em longo prazo. Com base nos dados de permeação, concluiu-se que a resistência principal da membrana durante a permeação ocorreu no suporte cerâmico.

As membranas apresentam diferentes morfologias, que são influenciadas pelas aplicações a que se destinam. As duas classificações gerais são relacionadas a membranas densas e porosas, em função da presença ou ausência de poros em sua estrutura. Podem ser também isotrópicas ou anisotrópicas, isto é, apresentar ou não constância de características morfológicas ao longo de sua estrutura (BAKER, 2004).

As membranas são caracterizadas com o intuito de determinar a porosidade superficial, tamanho e distribuição dos poros. Para isto, os métodos mais comumente utilizados são as técnicas de microscopia eletrônica e a porosimetria de mercúrio (BAKER, 2004).

Na Figura 3, são apresentadas as estruturas das membranas isotrópicas e anisotrópicas.



**Figura 3.** Estruturas de membranas isotrópicas (A) e anisotrópicas (B). Fonte: Habert *et al.*(2006)

A estrutura das membranas também apresentam classificações, como integrais ou suportadas, isto é, as membranas integrais são manufaturadas em matriz única, já as membranas suportadas necessitam estar em contato com algum suporte compatível com sua estrutura, para o desenvolvimento das suas atividades de filtração. Esses suportes podem ser em formato de placas planas, tubulares, fibras ocas ou enrolados em espiral (CHERYAN, 1998).

As membranas tubulares e espirais são instaladas em módulos no interior de tubos externos aos biorreatores. As membranas de placas planas e fibras ocas são geralmente acondicionadas internamente aos reatores (CHERYAN, 1998). Esses módulos podem ser construídos em materiais metálicos ou acrílicos, com formatos adequados para acomodar a membrana e garantir o acoplamento aos demais itens pertencentes ao sistema de separação. Devem, ainda, evitar qualquer vazamento entre os compartimentos de alimentação e permeado além de assegurar uma vazão de circulação do fluido (MULDER, 1996; CHERYAN, 1998).

### 3.8 Processos de separação por membranas

Os processos de separação por membranas mais utilizados comercialmente envolvem a difusão do solvente, como a microfiltração, a ultrafiltração, a nanofiltração e a osmose inversa. Cada um destes processos difere dos demais pela pressão a ser aplicada no processo e pela porosidade da membrana. No Quadro 1, são resumidas as principais características inerentes a cada um desses processos.

**Quadro 1.** Caracterização dos diferentes processos de filtração

Processo	Força motriz	Material retido	Material que permeia	Aplicações
<b>Microfiltração (MF)</b>	$\Delta P$ (0,5– 2 atm)	Material em suspensão, bactérias. MM > 500 kDa	Água e sólidos dissolvidos	Esterilização bacteriana, clarificação de vinhos e cervejas, concentração de células, oxigenação de sangue
<b>Ultrafiltração (UF)</b>	$\Delta P$ (1 – 7 atm)	Coloides, macromoléculas MM > 5000Da	Água, sais solúveis de baixa MM	Fracionamento/ concentração de proteínas, recuperação de pigmentos, óleos
<b>Nanofiltração (NF)</b>	$\Delta P$ (5 – 25 atm)	Moléculas de massa molar média 500 < MM < 2000 Da	Água, sais e moléculas de baixa MM	Purificação de enzimas, biorreatores de membranas
<b>Osmose Inversa (OI)</b>	$\Delta P$ (15 -80 atm)	Todo material solúvel ou em suspensão	Água	Dessalinização de água, concentração de sucos de frutas, desmineralização de águas

Fonte: HABERT *et al.* (2006)

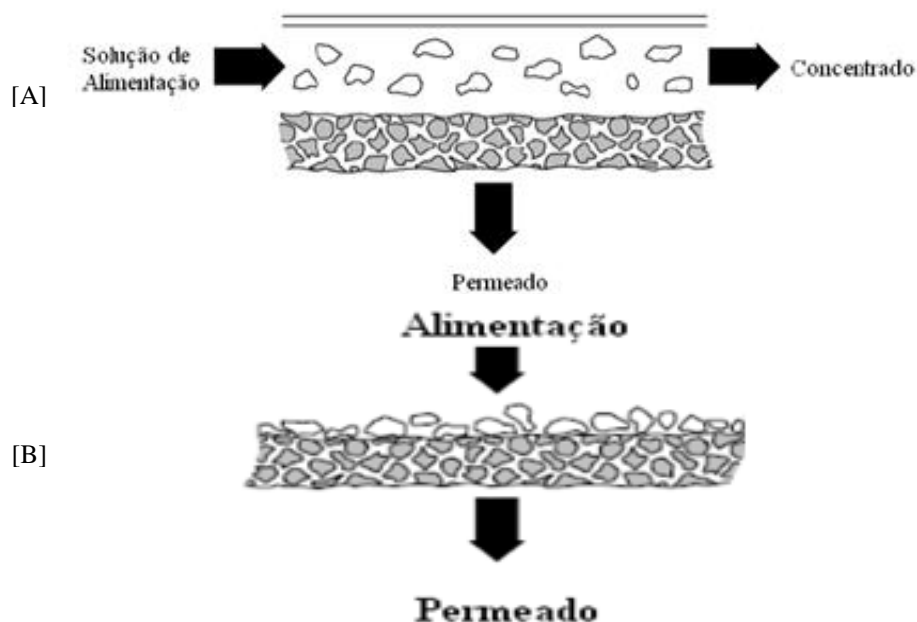
Os dois principais parâmetros que caracterizam os processos de separação por membranas correspondem ao fluxo permeado e a capacidade seletiva. O fluxo permeado é a representação da vazão de permeado por unidade de área membrana e tempo. A capacidade seletiva é medida através do coeficiente de rejeição, que relaciona a concentração da espécie na alimentação com a concentração da espécie no permeado (IUPAC, 1996; HABERT *et al.*, 2006). A medida do fluxo permeado através de membranas porosas é importante para a determinação da permeabilidade hidráulica. Este parâmetro permite quantificar o solvente puro que atravessa a membrana e as variações conforme as condições de operação e tipo de membrana utilizada (HABERT *et al.*, 2006).

Nos processos com membranas que envolvem a concentração de um dado componente, é importante a determinação do fator de concentração volumétrico (FCV), pois durante o processo de permeação, há variação da concentração do soluto em função

do tempo e em função da redução do volume. Esse parâmetro pode ser definido como sendo o quociente entre o volume inicial de operação do processo e o volume retido na membrana. À medida que a solução é concentrada, o fluxo permeado diminui (MULDER, 1996).

Os modos de operação que podem ser aplicados quando se trata de um processo envolvendo membranas correspondem ao tangencial (*cross-flow*) e transversal (*dead-end*), diferindo entre si pela direção do fluxo em relação à membrana. Na filtração tangencial, o fluxo é alimentado paralelamente à membrana, com a formação de duas correntes, do concentrado e do permeado. O concentrado é rico em moléculas de tamanho maior que o poro da membrana, já no permeado a prevalência é de materiais com tamanho de poro inferior ao apresentado pelo meio filtrante. Na filtração convencional, o fluxo é alimentado perpendicularmente à superfície da membrana; o material a ser filtrado se deposita sobre o meio filtrante favorecendo a formação de uma camada de material que ali estagna, aumentando a resistência à transferência de massa (MULDER, 1996).

Na Figura 4, são mostradas representações dos dois modos de fluxo para membranas, tangencial e convencional, respectivamente.



**Figura 4.** Representação do fluxo tangencial (A) e transversal (B) em uma membrana. Adaptado de Baker (2004)

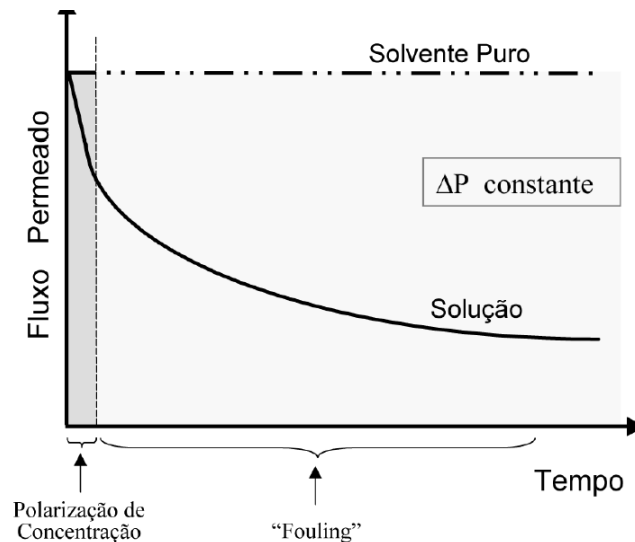
### 3.8.1 *Fouling* e polarização por concentração

Um problema associado ao uso de processos por separação de membranas é denominado *fouling*, que compreende o conjunto de fatores capazes de reduzir o fluxo permeado com o tempo. Esse inconveniente pode ser devido ao bloqueio dos poros da membrana, adsorção de partículas na superfície da membrana ou formação de camada de gel. As características da membrana que se relacionam diretamente com a formação de *fouling* são geometria, porosidade, rugosidade, material de confecção e hidrofobicidade (MULDER, 1996).

A polarização por concentração acontece devido à seletividade, que está intrínseca ao processo de filtração. Caracterizam-se pela concentração das espécies na superfície da membrana, sendo afetada pelas condições de escoamento da corrente de alimentação. À medida que a velocidade tangencial da alimentação aumenta, tende a diminuir a camada polarizada. A polarização por concentração é reversível e os fenômenos de incrustação como o *fouling* são reversíveis ou totalmente irreversíveis, dependendo da forma de limpeza empregada. Para diminuir os efeitos danosos que as incrustações provocam na membrana, é possível o uso de velocidades tangenciais elevadas com pressão mais baixas de operação, uma vez que essa condição de processo é a que favorece a minimização da incrustação (HABERT *et al.*, 2006).

Quando membranas porosas são utilizadas, em geral, o fluxo permeado diminui com o tempo indicando a presença da formação da polarização por concentração e *fouling*. Ocorre uma queda no valor do fluxo do permeado em relação ao valor obtido com o solvente puro. Pode ser observado, na Figura 5, que valores constantes em termos de fluxo demoram a acontecer devido à cinética lenta dos fenômenos que provocam as incrustações.

Apesar do fenômeno de *fouling* ser muito comum quando se trata de processos envolvendo membranas, existem alguns métodos para minimizar tal efeito. Como exemplos, citam-se o pré-tratamento térmico da solução de alimentação, ajuste de pH, adição de agentes de complexação, mudança nas propriedades da membrana, mudança nas condições de processo, como aumento da turbulência e limpezas físicas e químicas (MULDER, 1996).



**Figura 5.** Variação do fluxo permeado com o tempo de operação ocasionada por polarização de concentração e incrustação (*fouling*). Fonte: Habert *et al.* (2006)

Shorrock & Bird (1998) estudaram a eficiência da limpeza de membranas de polietersulfona (0,1  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro), que foram permeadas com suspensão de leveduras. A lavagem das membranas foi realizada com soluções alcalinas e ácidas e comparada com a limpeza com solução de detergente comercial. A completa remoção das incrustações provocadas pela permeação se deu com duas lavagens, alternando a solução de ácido cítrico e hidróxido de sódio por 20 minutos ou com uma única lavagem com o detergente comercial (P3 Ultrasil 11).

Hashino *et al.* (2011) propuseram um estudo sobre a ocorrência de incrustações com o uso de solução de BSA (albumina de soro bovino) em diferentes tipos de membranas poliméricas. Os autores concluíram, nos estudos com membranas de poli (álcool etileno-co-vinílico) (EVOH), poliéter-sulfona (PES) e poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF), que as características de hidrofiliidade e hidrofobicidade inerentes de cada um dos polímeros influenciam a permeação. Salientam, ainda, que estas características devem ser consideradas na escolha da membrana empregada para a permeação de determinada substância, assim como o material de fabricação da mesma, que tem papel relevante sobre o *fouling*.



### 3.9 Utilização de membranas em bioprocessos

A utilização de módulos de membranas abre possibilidades para filtração e separação de produtos, assim como para técnicas como imobilização e confinamento de células em seus poros (SUZUKI, 1996; TOMOTANI & VITOLO, 2007). A imobilização de células bacterianas em membranas pode favorecer a produtividade em bioprocessos e, também, facilitar a recuperação de produtos (LIU *et al.*, 2010).

Membranas podem ser incorporadas aos processos fermentativos para algumas finalidades como, no caso de processos descontínuos, a separação da biomassa, e em processos contínuos, a incorporação de sais e vitaminas termosensíveis durante o processo, de forma asséptica (MULDER, 1996). Kulozik (1992) relata a aplicação de membranas cerâmicas para aumentar a densidade celular e recuperar células em cultivos microbianos. Com o emprego de uma membrana de microfiltração de 1,4  $\mu\text{m}$ , o autor relata o aumento de  $10^{12}$  para  $10^{13}$  UFC/mL de microrganismos provenientes de culturas lácticas.

O emprego de membranas cerâmicas na área de bioprocessos tem se destacado devido às características de resistência aos processos de esterilização, às altas condições de pressão, ao uso de agentes químicos e solventes orgânicos e, ainda, como vantagem, a alta resistência mecânica (MULDER, 1996).

Na década de 80, Chun & Rogers (1988) estudaram a produção de etanol e sorbitol utilizando membrana cerâmica num reator com reciclo de células. Os autores compararam a utilização de membrana cerâmica (0,2  $\mu\text{m}$ ) e da membrana polimérica de polisulfona (5 kDa) sobre as características operacionais de filtração e, ainda, os efeitos da concentração celular, da pressão transmembrana e da temperatura sobre o fluxo permeado. Foi relatada a formação de *fouling* e redução de fluxo inferior na membrana cerâmica em relação à membrana polimérica. Os autores destacaram que o aumento da biomassa presente no caldo a ser permeado ocasionou redução no fluxo permeado em ambas as membranas testadas e que, nestas condições, o emprego de maiores pressões de operação do sistema para ambas as membranas proporcionaram o aumento do fluxo permeado. Os autores complementaram que o aumento da temperatura também favoreceu o fluxo, levando à diminuição da viscosidade do caldo a ser filtrado.

Lu *et al.* (2012) estudaram a produção de ácido láctico em reator acoplado com membrana cerâmica, de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  e área de 6  $\text{m}^2$ . Além da membrana cerâmica, o reciclo foi proposto também com a utilização de uma membrana polimérica

de ultrafiltração, que devido ao tamanho pequeno dos poros e à necessidade de elevadas pressões de trabalho, não proporcionou a obtenção do reciclo de células. Maior produtividade e menor taxa de filtração de células foram obtidas com o emprego de membranas cerâmicas de microfiltração. Nas fermentações sucessivas com as células recuperadas, que totalizaram doze ciclos, incremento em termos de rendimento e a produtividade foram observados, proporcionando aumento médio de 170% em produtividade em células.

Silva & Scheer (2011) estudaram a microfiltração de soluções de pectina em membrana cerâmica com porosidade de 0,44  $\mu\text{m}$ . Os autores concluíram que o fluxo de permeado e a resistência por polarização elevam-se com o aumento da temperatura e da concentração. O coeficiente de retenção mínimo observado foi de 93,4% e a resistência mais significativa foi a do *fouling*. A pectina apresenta comportamento de torta compressível e o aumento da pressão tende a elevar o fluxo até um ponto limite. A partir deste ponto, a compactação da torta superficial aumenta significativamente a resistência à permeação, reduzindo o fluxo; é possível que esse comportamento também se dê com outras substâncias orgânicas, as quais podem apresentar comportamento semelhante à solução de pectina quando submetidas à microfiltração.

Como alternativa ao alginato de cálcio como suporte de imobilização, Ferraz *et al.* (2000), relatam o uso da técnica que consiste em confinar as células nos microporos de membranas de fibras ocas. Neste caso, os poros da membrana são menores que as células e oferecem baixa resistência ao transporte de substratos e produtos. Segundo os autores, os problemas de transferência de massa foram reduzidos em sistema de membranas quando comparado com bioprocessos conduzidos com células imobilizadas em alginato de cálcio.

Kwon *et al.* (2005) relataram a produção de xilitol via reciclo de células de *Candida tropicalis* cultivadas em reator de membranas submersas de fibras ocas (porosidade de 0,4  $\mu\text{m}$ , sob pressão de 0,9 bar). Em fermentação descontínua com alimentação de 260  $\text{g.L}^{-1}$  de xilose, a produção de xilitol foi de 234  $\text{g.L}^{-1}$ , durante 48 h, correspondendo a uma produtividade de 4,88  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Para aumentar a produtividade em termos de xilitol, as células foram recicladas em um biorreator de membrana submersa. Para cada rodada de reciclo de células, a concentração média de xilitol produzida, rendimento, tempo de fermentação e produtividade volumétrica foram, respectivamente, 180  $\text{g.L}^{-1}$ , 85%, 19,5 h e 8,5  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . O reciclo de células foi realizado por 10 rodadas consecutivas, com a obtenção de produtividade de cerca de 12  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Os autores destacam que o reciclo das células proporcionou o aumento da produtividade em três vezes em comparação com a fermentação em batelada.

Giorno *et al.* (2002) avaliaram o emprego de membranas de ultrafiltração no processo de produção de ácido lático por *Lactobacillus bulgaricus*. Membranas poliméricas de distintas porosidades foram utilizadas e, nestas condições, os autores destacam que a membrana de poliamida sofreu menor redução do fluxo permeado que a membrana de polissulfona, e que as células em fase exponencial de crescimento levaram à maior formação de *fouling* que as células em fase de declínio.

O emprego de membranas cerâmicas na filtração de rejeitos provenientes da indústria têxtil foi verificada por Stroher *et al.* (2012). Os autores concluíram que o processo de filtração em membrana com porosidade de 0,01  $\mu\text{m}$ , na pressão de 3 bar e temperatura de 30°C proporcionou a redução de parâmetros importantes como DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (demanda química de oxigênio), de 80,10 e 73,97% respectivamente, além de redução no teor de sólidos totais, corantes e turbidez.

Ebrahimi *et al.* (2010) analisaram o sistema composto por um reator de membrana cerâmica integrado ao fermentador para imobilizar as enzimas  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces lactis*, com o objetivo de produzir galactosil-oligossacarídeos (GOS) através da conversão enzimática de lactose. A membrana utilizada foi uma membrana cerâmica de ultrafiltração com 20000 Da. Os dados obtidos mostram que a enzima imobilizada pode executar a produção contínua de GOS da lactose como substrato. Os autores destacam que o processo foi eficiente na imobilização da enzima, separação e otimização do tempo de processo.

Hwang & Yu (2014) relataram um processo de membrana para a purificação de bioetanol a partir de fermentação. As células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram separadas da glicose e do etanol a partir da microfiltração. A membrana apresentava um tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . O caldo de levedura foi filtrado no sistema e retornou ao fermentador enquanto a glicose e o etanol foram permeados. Os efeitos das condições de operação, tais como a velocidade de fluxo, a pressão transmembrana, o fluxo de filtração, as propriedades do *fouling* e rejeições de soluto foram determinados. Os autores relatam o aumento de 50% no fluxo de permeação com o aumento da pressão na membrana de 20 para 100 KPa, mantendo-se a velocidade de escoamento fixa em 0,5 m/s. A torta de leveduras que se formou sobre a membrana correspondeu à resistência à filtração ali instalada. Um aumento da pressão transmembrana ou a velocidade de fluxo cruzado levou a um maior fluxo de filtração.

Ainda, os autores observaram que a estrutura da camada de levedura sobre a membrana tornou-se mais compacta quando sob compressão mais acentuada.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo

A linhagem bacteriana usada neste estudo foi *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (DSM 3580), adquirida do *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (RFA).

As culturas foram mantidas em meio líquido, repicadas mensalmente e estocadas a 4°C (MALVESSI *et al.*, 2006).

### 4.2 Meio de cultura

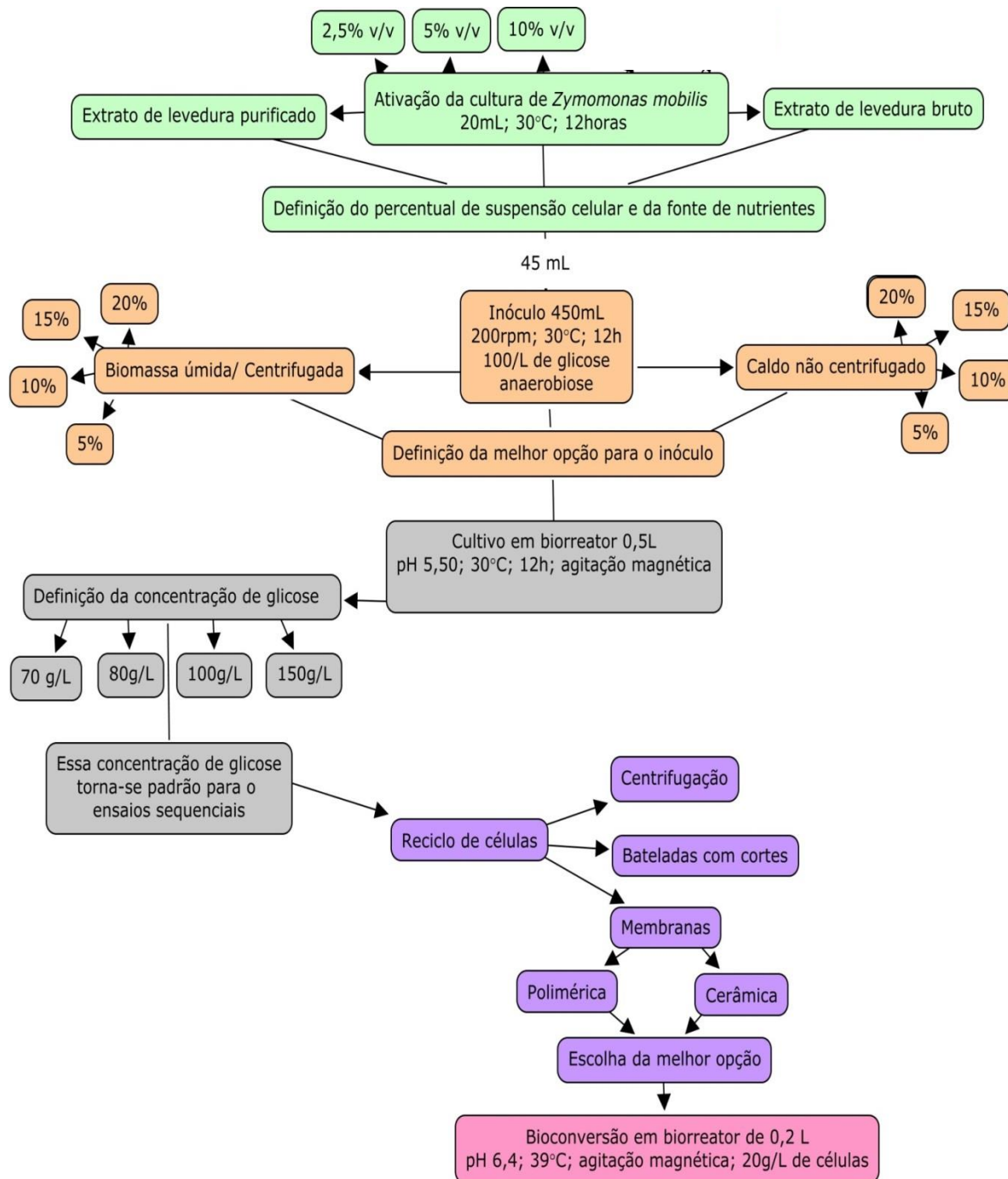
O meio líquido utilizado para conservação, obtenção de inóculo e ensaios em biorreator continha em sua composição (g.L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5; extrato de levedura bruto (Prodex Lac<sup>®</sup>, Prodesa S.A, Brasil), 7,5 (Malvessi *et al.*, 2006). Como comparação ao extrato bruto, foi avaliado o uso de extrato de levedura purificado (Himedia, Índia), na concentração de 5 g.L<sup>-1</sup> (Carra *et al.*, 2007).

No preparo do meio de ativação e conservação da cultura, foram adicionados 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e o pH ajustado para 5,5. Na obtenção de inóculo, a concentração de glicose utilizada foi de 100 g.L<sup>-1</sup> e o pH do meio foi controlado com a adição de CaCO<sub>3</sub> (5 g.L<sup>-1</sup>). Para os ensaios de fermentação em biorreator, foram empregadas concentrações de glicose entre 70 e 150 g.L<sup>-1</sup>. Para o inóculo e os cultivos em biorreator, foi preparada uma solução de glicose (500 g.L<sup>-1</sup>), sendo adicionado ao meio o volume necessário desta solução para atingir-se a concentração desejada em cada condição.

A esterilização de todos os meios foi feita em autoclave, a 1 atm, por 15 min.

### 4.3 Fluxograma do procedimento experimental

Na Figura 6, é apresentado o fluxo do procedimento experimental empregado na etapa fermentativa de *Zymomonas mobilis*, de separação e recuperação dos produtos e de bioconversão.



**Figura 6.** Fluxograma dos cultivos de *Zymomonas mobilis* e das etapas de recuperação e separação dos produtos e de bioconversão.

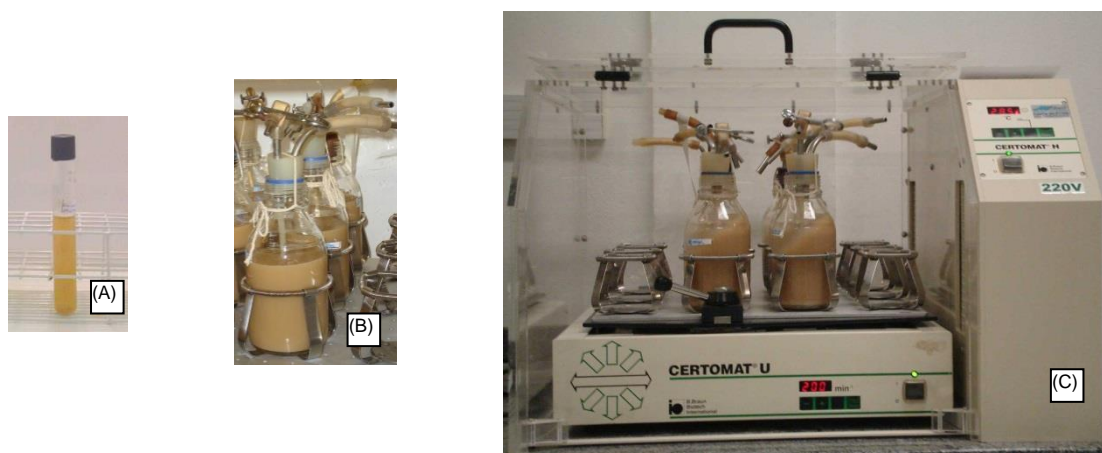
#### 4.4 Ativação celular

Para a ativação das células mantidas em estoque à temperatura de 4°C, foi avaliada a influência de nutrientes e da proporção de suspensão celular empregadas no meio, em função do tempo de incubação. Foram usados na ativação, extrato de levedura bruto e extrato de levedura purificado como fontes de vitaminas e nitrogênio orgânico e inóculo de 2,5, 5,0, 10 % (v/v).

Partindo da condição padrão de reação com volume final de 20 mL, dispostos em tubos de ensaio com tampa rosqueada, diferentes volumes de meio e de suspensão celular foram adicionados nos respectivos tubos. Posteriormente, os tubos foram incubados a 30°C e avaliados quanto ao crescimento e consumo de substrato após 6, 8, 12 e 15 h de ativação.

#### 4.5 Definição do teor e da forma de inoculação

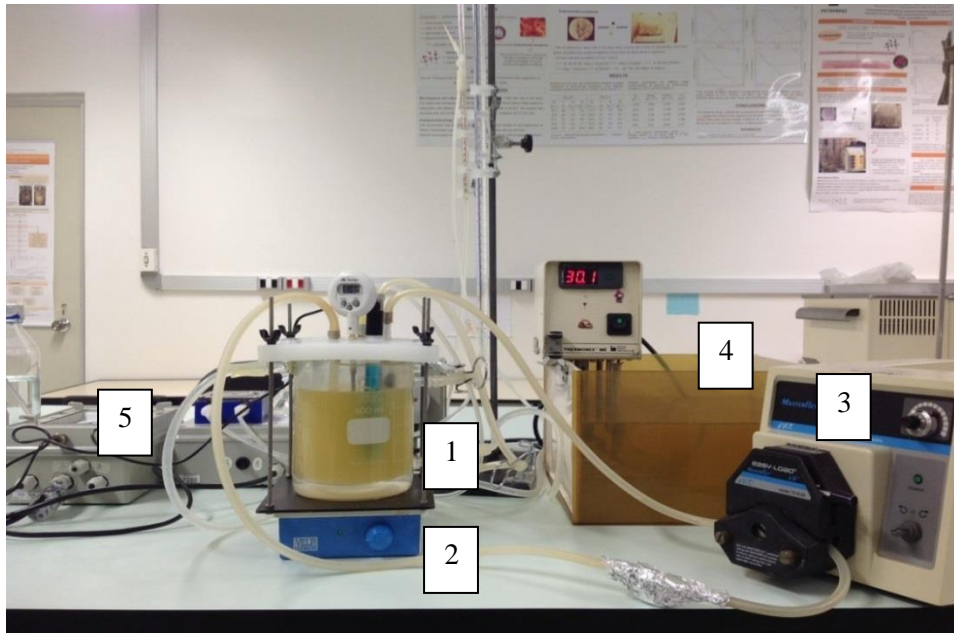
Uma vez definida a etapa de obtenção de células a serem empregadas na ativação, foram executados os ensaios de produção de inóculo. Nestes cultivos, foram usados frascos de 500 mL, contendo 450 mL de volume reacional total. Os meios foram inoculados com 45 mL da cultura previamente ativada, mantidos sob agitação orbital de 200 rpm, em agitador de bancada Certomat U/H (B. Braun Biotech, Sartorius), sob anaerobiose, a 30°C, por cerca de 12 h (Figura 7).



**Figura 7.** Condições de cultivo de *Zymomonas mobilis* em frascos agitados: (A) cultura de *Zymomonas mobilis* previamente ativada; (B,C) meios de cultivo inoculados, mantidos sob condições de crescimento em agitador de bancada.

O efeito do teor de inóculo - empregado na forma de biomassa úmida ou em percentual de caldo fermentado – foi avaliado sobre a densidade celular e a produção de etanol por *Z. mobilis*. Os estudos cinéticos foram conduzidos com diferentes proporções de inóculo, de 5, 10, 15 e 20% (v/v) de volume de meio em relação ao volume final de fermentação. A inoculação para os cultivos em biorreator foi realizada de duas formas distintas: i) os volumes de meio fermentado foram diretamente introduzidos no reator; ii) determinadas alíquotas do meio fermentado foram primeiramente centrifugadas e apenas a respectiva biomassa úmida introduzida no reator. A separação da biomassa por centrifugação foi realizada a 5836 G por 10 minutos (centrífuga Sigma, modelo 4-15). O etanol, presente no sobrenadante, foi destilado e, posteriormente, quantificado.

Os cultivos foram realizados em biorreator de bancada encamisado, de volume útil de 0,5 L, a 30°C, pH controlado em 5,5 pela adição automática de NaOH 2,5mol.L<sup>-1</sup>, sob agitação magnética. Durante cerca de 20 minutos, nitrogênio gasoso foi borbulhado no meio de cultivo, à vazão de 0,5 L.min<sup>-1</sup>, com a finalidade de garantir a anaerobiose. Na Figura 8, é mostrado o biorreator sendo operado durante o cultivo celular.



**Figura 8.** Sistema utilizado para a produção de biomassa e etanol por *Zymomonas mobilis*. (1) Reator encamisado de 0,5 L, (2) agitador magnético, (3) bomba peristáltica, (4) sistema de controle da temperatura; (5) controlador de pH.

Para a condução dos ensaios, um circuito fechado de fermentação foi montado, contendo conexões para o reservatório de glicose, de meio de cultivo e de solução de NaOH, adicionados e/ou recarregados de acordo com a condição de processo definida, e um sistema de amostragem. O circuito era conectado à parte superior do biorreator (tampa), de modo que amostras e/ou determinado volume de fermentação pudessem ser coletados do interior do biorreator.

#### **4.6 Concentração de substrato no meio de fermentação**

Inicialmente, foi avaliada a concentração de glicose a ser empregada no meio de cultivo que levasse à obtenção de alta densidade celular e etanol e, ainda, em tempo de processo que fosse condizente com a etapa posterior de concentração da biomassa e separação de etanol. Foram avaliadas concentrações entre 70 e 150 g.L<sup>-1</sup> de glicose, nas condições de fermentação descritas no item 4.4.

#### **4.7 Bateladas com reciclo de células**

Cultivos em batelada com reciclo de células, em que a população microbiana do cultivo anterior era aproveitada como inóculo, foram realizados buscando a obtenção de maior produtividade em termos de biomassa e produto (etanol). Foram realizadas três formas de reciclo de células entre os cultivos: i) bateladas sequenciais com reciclo através de centrifugação das células; ii) bateladas sequenciais por meio de cortes; iii) bateladas sequenciais com reciclo de células por membranas cerâmica e polimérica.

##### **4.7.1. Reciclo de células através de centrifugação**

As condições de cultivo empregadas nesta etapa foram descritas no item 4.4. No final de cada batelada, quando a concentração de glicose no meio era praticamente nula, o caldo fermentado era coletado com uma bomba peristáltica e separada a biomassa e o sobrenadante por centrifugação, a 5836 G por 10 minutos. Posteriormente, o biorreator era recarregado com volume definido de meio e de solução de glicose, inoculada com a biomassa ressuspensa em água destilada, completando volume final de 0,5 L. A segunda



batelada era então iniciada, com monitoramento e coleta de amostras durante o cultivo. O procedimento foi realizado em três bateladas sequenciais.

#### 4.7.2. Bateladas por meio de cortes

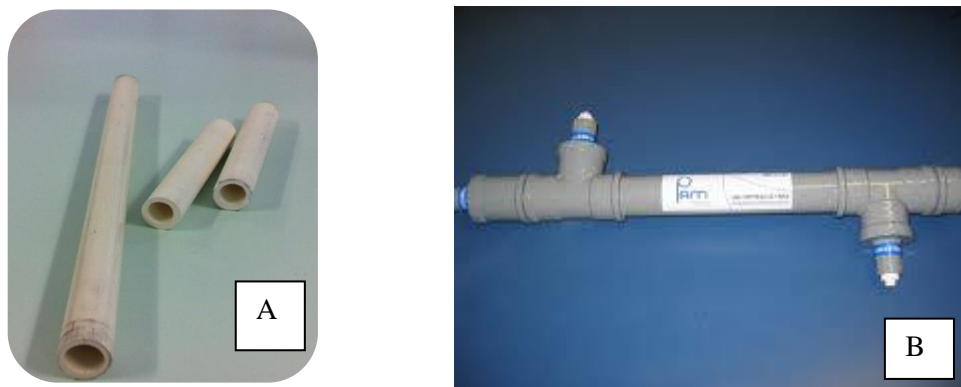
Em um processo fermentativo, os cortes, também denominados “pé-de-cuba”, podem ser feitos na fase de crescimento mais intensa, quando se deseja propagar o inóculo, ou ao término da fermentação. Ao final de cada batelada, foi considerada a manutenção de 15% do volume total de meio no interior do reator e, posteriormente, completado o volume com meio de cultura fresco para dar início à nova batelada. Este procedimento foi realizado em cada uma das três bateladas realizadas em sequência. Nos meios, foi utilizado  $80 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e o processo conduzido nas condições descritas no item 4.4.

#### 4.7.3 Reciclo celular via membranas

Ao final de cada batelada, as células foram concentradas na membrana e o permeado, meio de cultura isento de células, foi separado para posterior determinação de etanol. As células retidas na membrana foram removidas pela passagem de água destilada esterilizada (média de 50% v/v em relação ao volume final de fermentação) em fluxo invertido. A suspensão de células foi então reintroduzida no reator, ressuspensa em meio de fermentação, totalizando volume final de 0,5 L de meio reacional. O cultivo foi conduzido com a concentração inicial de glicose de  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e pH controlado em 5,5. Ao final de cada batelada, o processo de concentração de células e separação de etanol foi reproduzido visando ao aumento da densidade celular e da produção de etanol.

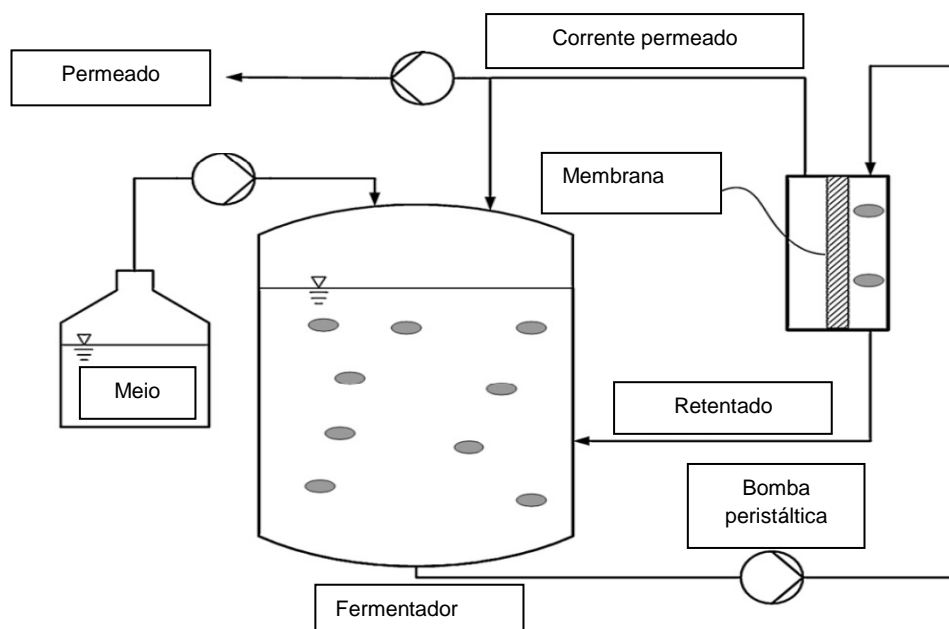
Os testes foram realizados com a utilização de duas membranas distintas. Foram utilizadas membranas cerâmicas de  $\alpha$ -alumina, fornecida pela Tecnicer-Cetebra (São Carlos/SP), conformados na forma de tubos microporosos (tamanho médio de poros de  $0,64 \text{ }\mu\text{m}$ ), área permeante de  $0,0052 \text{ m}^2$ , com diâmetros interno de 8 mm e externo de 12 mm e 210 mm de comprimento e um módulo de membrana polimérica de poli (éter imida), fornecida pela empresa PAM membranas (Rio de Janeiro), conformada na forma de fibras ocas (tamanho médio de poros de  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ ), área permeante de  $0,027 \text{ m}^2$ ,

diâmetro de 25 mm e comprimento útil de 260 mm, já inserida no tubo de PVC. Ambas as membranas são apresentadas na Figura 9.



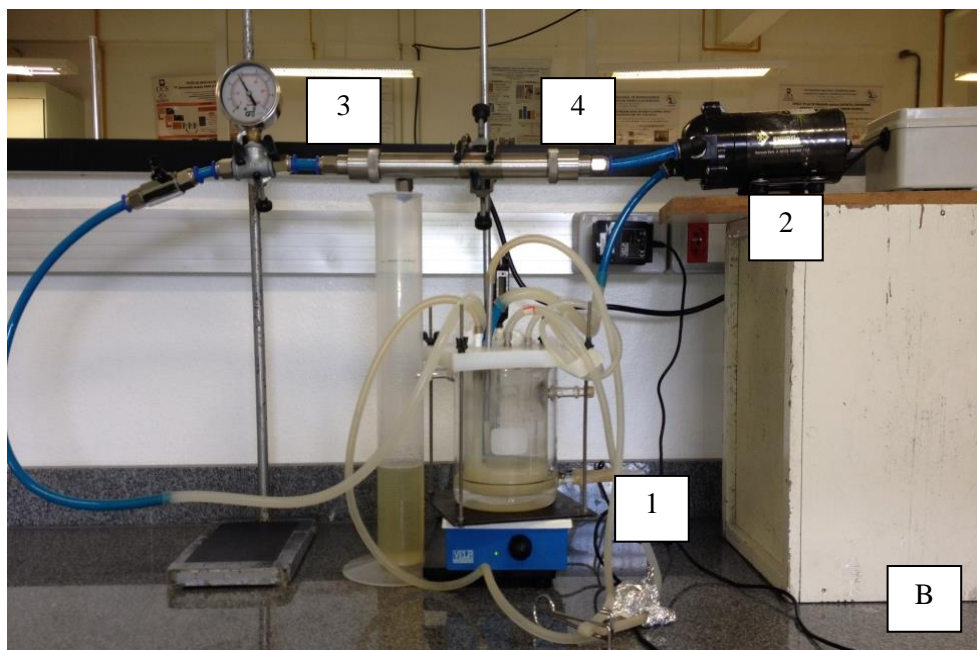
**Figura 9.** Membranas utilizadas no sistema de reciclo celular, (A) membrana cerâmica tubular; (B) módulo de membranas poliméricas tipo fibras ocas.

O sistema empregado no reciclo de células através de membranas foi composto de uma bomba diafragma (Shurflo, modelo Gold Series, 24 VAC), manômetro e módulo de membrana, que foi acoplado externamente ao reator, baseado no modelo proposto por Carstensen *et al.* (2012) (Figura 10).



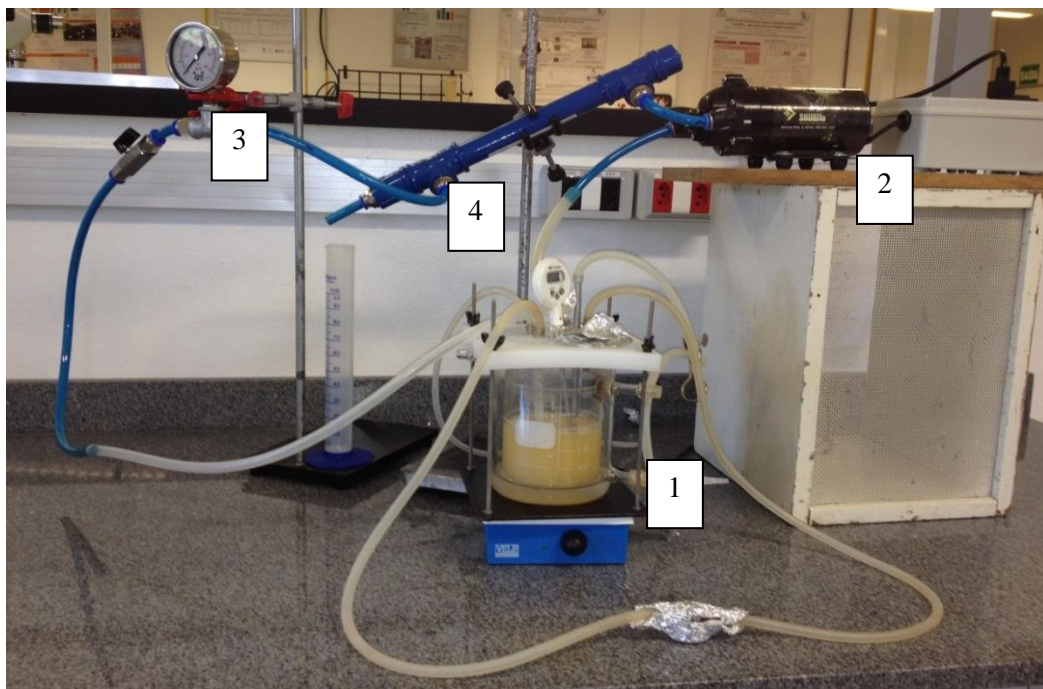
**Figura 10.** Representação do sistema de reciclo de células através de membrana acoplada de forma externa ao biorreator. Fonte: adaptado de Carstensen *et al.* (2012)

Para a condução dos testes com a membrana cerâmica, esta foi acondicionada dentro de um módulo, construído em aço inoxidável, de 2,3 cm de diâmetro externo, 1,2 cm de diâmetro interno e 22 cm de comprimento. O módulo foi adaptado ao biorreator, sendo conectado ao mesmo através de mangueiras de PU (poliuretano) ligadas a uma bomba de diafragma (Figura 11).



**Figura 11.** Módulo de membranas de aço inoxidável (A); Sistema empregado na concentração da biomassa e separação de etanol de *Zymomonas mobilis* (B). (1) reator; (2) bomba de diafragma; (3) manômetro; (4) módulo de aço inoxidável contendo a membrana cerâmica.

As membranas poliméricas de fibras ocas utilizadas nos experimentos foram acondicionadas em um módulo de PVC. Este módulo então foi conectado ao biorreator através de mangueiras de PU ligadas a bomba de diafragma, seguindo o modelo proposto para a adaptação da membrana cerâmica. Neste caso, a corrente de entrada de células entra na parte externa das fibras ocas (escoando pela carcaça) e permeia para o interior, axialmente, como mostrado na Figura 12.



**Figura 12.** Sistema empregado na concentração da biomassa e separação de etanol de *Zymomomas mobilis* através do módulo de membranas poliméricas de fibras ocas, acopladas ao biorreator. (1) reator; (2) bomba de diafragma; (3) manômetro; (4) módulo contendo membranas poliméricas.

Visando à preparação prévia da membrana antes de sua utilização no processo de separação da biomassa para reciclo das células e etanol, resultantes do processo fermentativo, foi realizada a etapa de compactação.

A compactação das membranas foi realizada passando por estas água destilada a uma pressão constante de 6 bar para o caso da membrana cerâmica e 3 bar para o caso do módulo de membrana polimérica. Esta diferença foi devida às características intrínsecas ao módulo de membranas. Na ficha técnica do módulo de membrana polimérica, esta seria a maior pressão de operação possível do produto. A compactação é definida quando a membrana é submetida à pressão, causando o adensamento de sua microestrutura pela deformação mecânica. Nestas condições, o fluxo é avaliado até que não sejam observadas variações em função do tempo. O volume do permeado, foi medido em intervalos de 5 minutos, transformados em vazão volumétrica por área de membrana ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^2$ ). Antes de cada utilização da membrana para separação e concentração celular, o procedimento para a compactação era reproduzido. As medidas do fluxo de permeado foram realizadas pelo método volumétrico direto; os dados de

fluxo foram calculados a partir da medida de tempo que o fluido leva para preencher o volume fixo de uma proveta.

A quantificação do *fouling* e da camada de polarização foi realizada por balanço de massa, onde, através de massa seca de células, foi possível quantificar a quantidade de células de *Z. mobilis* que permanece no sistema depois da passagem do caldo fermentado. O *fouling* foi mensurado através da equação proposta por Manttari *et al.* (2006), que relaciona os coeficientes angulares das retas de permeabilidade com água antes e depois dos reciclos de células, conforme apresentado na Equação 1.

$$Fouling (\%) = \left(1 - \frac{DwPa}{dwPb}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

Sendo:

DwPa, coeficiente angular antes da passagem do caldo fermentado

DwPb, coeficiente depois da passagem do caldo fermentado

O fator de concentração volumétrico foi calculado segundo a Equação 2

$$FCV = \frac{V_o}{V_r} = \frac{V_o}{(V_o - V_f)} \quad (2)$$

Sendo:

FCV, fator de concentração volumétrico

V<sub>o</sub>, Volume inicial (L)

V<sub>r</sub>, Volume retido (L)

V<sub>f</sub>, Volume da solução permeada (L)

Durante a etapa de permeação do meio, foi necessária a limpeza da membrana para a manutenção do fluxo do permeado. Para a limpeza, o fluxo do permeado foi invertido, fazendo-se passar água destilada pela membrana.

Nos períodos sem utilização, onde ocorre o relaxamento da microestrutura, a membrana foi mantida imersa em uma solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1,0% (v/v) por cerca de 12 h. Para facilitar a remoção das células, a membrana também foi

submetida à limpeza em banho ultrassônico por 30 minutos, alternando a imersão em solução aquosa 0,5% (m/v) de ácido cítrico e  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de hidróxido de sódio.

#### **4.8 Ensaios de bioconversão de substratos em produtos**

Os ensaios foram realizados em reator de 600 mL de volume total e volume reacional de 200 mL. As condições padrão de pH e temperatura foram pH 6,4 e  $39 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. O reator encamisado foi unido a um banho termostatizado, sob agitação magnética, com pH controlado pela adição automática de solução de  $\text{NaOH } 7,0 \text{ mol.L}^{-1}$ , contido em uma bureta de 50 mL, acoplado ao controlador de pH. Como biocatalisador, foram utilizadas células/enzimas livres provenientes de bateladas sequenciais, previamente concentradas com a utilização de membrana cerâmica tubular de microfiltração, na concentração de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ .

#### **4.9 Metodologia analítica**

##### **4.9.1 Concentração de células**

A concentração celular nos meios de ativação, de produção de inóculo e nas fermentações foi determinada pela medida da absorbância, a 560 nm em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV -210), de suspensões diluídas de células. Estes valores foram convertidos em concentração, massa de matéria seca por unidade de volume, por uma curva de calibração. A quantificação celular foi realizada em duplicata.

##### **4.9.2 Determinação de açúcares redutores**

Em amostras do processo fermentativo, a glicose foi quantificada pelo método do ácido 3,5-di-nitro-salicílico - DNS (MILLER, 1959).

#### 4.9.3 Quantificação do etanol

A quantificação do etanol do caldo de fermentação foi determinada, após a destilação, em equipamentos acoplados Densimat e Alcomat (Gibertini, Italy), em que a concentração do etanol é obtida com base na densidade da solução.

#### 4.9.4 Determinação da atividade enzimática do complexo glicose-frutose oxidorreductase/glicono-lactonase (GFOR/GL)

Para a determinação da atividade de GFOR/GL, foi utilizada a técnica que estima a atividade conjunta de GFOR/GL em células permeabilizadas e imobilizadas de *Z. mobilis*, em solução de lactose e frutose como substratos, sendo a atividade definida pela massa de ácido lactobiônico produzida nas condições padronizadas (MALVESSI *et al.*, 2006). Uma unidade enzimática de GFOR/GL (U) é definida como quantidade de enzima capaz de formar 1 mmol. L<sup>-1</sup> de ácido lactobiônico, por hora, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células em base seca (U/g).

#### 4.9.5 Estimativa da concentração de produtos em ensaios de bioconversão

A concentração de ácido lactobiônico formado nos ensaios de bioconversão com concentrações equimolares de substratos, foi calculada de acordo com o volume e concentração de base utilizada durante a reação. A concentração de sorbitol foi estimada a partir da concentração de ácido lactobiônico formado, considerado que os produtos são formados em base equimolar (Equação 3).

$$C = \frac{V_b \cdot M \cdot MM}{1000 \cdot (V_m + V_b)} \quad (3)$$

Sendo:

C, concentração (g.L<sup>-1</sup>)

V<sub>b</sub>, volume de base (mL)

M, concentração da solução de base (mol.L<sup>-1</sup>)

MM, massa molecular do ácido (g.mol<sup>-1</sup>)

V<sub>m</sub>, volume do meio da biotransformação (L)

#### 4.9.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície da sessão transversal da amostra de membrana foi realizada em microscópio Shimadzu modelo SSX 550. Para o preparo das amostras, foi utilizada a metodologia descrita por Fernandes (2013).

### 4.10 Parâmetros de avaliação do processo

Para fins de cálculo dos fatores de conversão, rendimentos e produtividades, foram efetuados cálculos diretamente com as concentrações, uma vez que o volume de amostra retirado do fermentador e o volume de base inserido no mesmo foram inferiores a 10% (v/v) do volume útil do mesmo.

#### 4.10.1 Fator de conversão de glicose em células.

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_o)}{(S_o - S_f)} \quad (4)$$

Sendo:

$Y_{x/s}$ , fator de conversão de glicose (substrato) em células ( $\text{g.g}^{-1}$ )

$X_o$ , concentração inicial de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$X_f$ , concentração final de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_o$ , concentração inicial de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_f$  concentração final de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )

#### 4.10.2 Fator de conversão de substrato em produto

$$Y_{P/s} = \frac{(P_f - P_o)}{(S_o - S_f)} \quad (5)$$

Sendo:

$Y_{P/s}$ , fator de conversão de glicose (substrato) em produto ( $\text{g.g}^{-1}$ )



$P_0$ , concentração inicial de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$P_f$ , concentração final de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_0$ , concentração inicial de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_f$  concentração final de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )

#### 4.10.3 Velocidade específica de crescimento

Para o cálculo da máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{x,m}$ ) em cultivos de *Z. mobilis*, foram traçadas curvas relacionando os logaritmos naturais das concentrações de células obtidas experimentalmente e seus respectivos tempos de fermentação. A fase exponencial de crescimento possui um comportamento linear, sendo o coeficiente desta reta o próprio valor de  $\mu_{x,m}$ . A velocidade específica foi calculada em  $\text{h}^{-1}$ .

#### 4.10.4 Rendimento em produto

Para o cálculo do rendimento em etanol em cultivos de *Z. mobilis*, foi empregada a equação 6.

$$\rho = \frac{Y_{P/S}}{f} \cdot 100 \quad (6)$$

Sendo:

$P$ , rendimento (%)

$Y_{P/S}$ , fator de conversão de glicose (substrato) em produto ( $\text{g.g}^{-1}$ )

$f$ , fator estequiométrico máximo (0,511 para glicose)

#### 4.10.5 Produtividade volumétrica

Na determinação da produtividade volumétrica em etanol, foi empregada a equação 7

$$p = \frac{Pf - P_0}{t} \quad (7)$$

Sendo:

p, produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$P_0$ , concentração inicial de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$P_f$ , concentração final de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ )

t, tempo de processo (h)

#### 4.10.6 Velocidade específica de formação de ácido lactobiônico

A velocidade específica de formação de produto ( $\mu_P$ ) foi determinada apenas nos ensaios de bioconversão (Equação 8).

$$\mu_P = \frac{1}{M_x} \times \frac{dM_P}{dt} \quad (8)$$

Sendo:

$\mu_P$ , velocidade específica de formação de produto ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$M_x$ , massa de células (g)

$dM_P/dt$ , derivada do produto em função do tempo ( $\text{g.h}^{-1}$ )

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são inicialmente apresentados e discutidos em relação ao processo de fermentação de *Z. mobilis* e, posteriormente, em termos de concentração de biomassa e recuperação de etanol por processos de separação através de centrifugação, bateladas com cortes e membranas. Na sequência, são apresentados os testes relacionados à avaliação das membranas empregadas na concentração de biomassa, separação de etanol e na etapa de bioconversão.

### 5.1 Avaliação da etapa de ativação da cultura de *Zymomonas mobilis*

Os testes de ativação celular foram realizados com extrato de levedura bruto (ELB) e extrato de levedura purificado (ELP), empregados como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico por *Z. mobilis*. Ao meio de ativação previamente preparado (item 4.2), foi testado o efeito do uso de diferentes percentuais de suspensão celular, entre 2,5 e 10% (v/v), sobre o crescimento celular e o consumo de substrato em função do tempo de incubação. Salienta-se que estes testes tiveram a finalidade de definir, além da fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico, o tempo necessário para que fosse atingida a fase exponencial de crescimento, uma vez que esta suspensão celular seria usada na produção de inóculo.

Os meios foram inoculados com o volume definido de suspensão celular de *Z. mobilis* e mantidos sob incubação entre 6 e 15 h a 30°C, sob condições estáticas de crescimento.

Entre as condições avaliadas, o crescimento microbiano foi menos efetivo em menores percentuais de inóculo, sendo observado, também, o efeito da fonte de nitrogênio empregada, purificada ou não. O percentual de suspensão celular que levou à obtenção de resultados superiores em termos de biomassa foi de 10% (v/v), obtendo-se 4 g.L<sup>-1</sup>, atingida em 12 h de incubação, com o uso do extrato de levedura purificado. Para o período de incubação de 15 h, os resultados em termos de biomassa foram superiores, cerca de 4,3 g.L<sup>-1</sup> para o extrato de levedura purificado, porém o substrato disponível para crescimento já estava perto do fim (0,2 g.L<sup>-1</sup>) na condição de 12 h não sendo, portanto relevante a utilização de células incubadas por 15 h. Os resultados

comparativos em termos de crescimento celular e consumo de substrato são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Resultados gerais de concentração celular, obtidos nos ensaios de ativação da cultura de *Zymomonas mobilis* com diferentes percentuais de inóculo, fontes de extrato de levedura e tempos de incubação ( $S_0 = 20 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , ELB = extrato de levedura bruto; ELP = extrato de levedura purificado)

Suspensão celular (%)	Extrato de levedura	Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ )			
		Tempo de incubação			
		6h	8h	12h	15h
2,5	ELB	1,3	1,2	2,2	3,4
	ELP	1,8	2,0	2,8	3,9
5	ELB	2,1	2,1	3,0	3,6
	ELP	2,2	3,0	3,3	4,2
10	ELB	2,3	2,6	3,5	4,1
	ELP	2,7	3,1	4,0	4,3

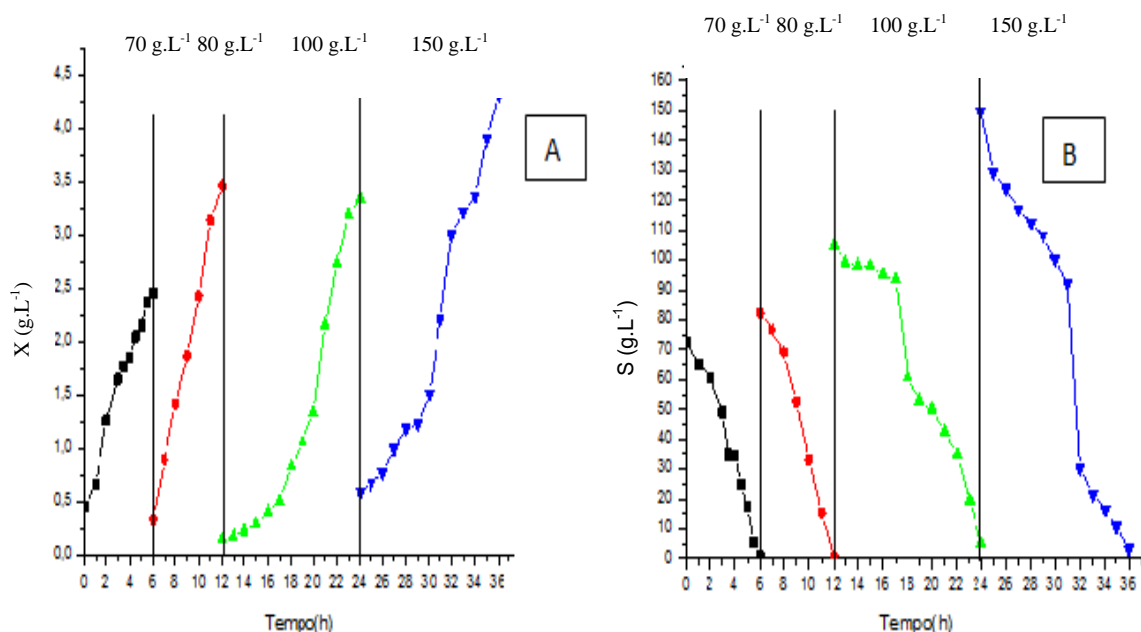
**Tabela 2.** Resultados gerais de consumo de substrato, obtidos nos ensaios de ativação da cultura de *Zymomonas mobilis* com diferentes percentuais de inóculo, fontes de extrato de levedura e tempos de incubação ( $S_0 = 20 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , ELB = extrato de levedura bruto; ELP = extrato de levedura purificado)

Suspensão celular (%)	Extrato de levedura	Substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )			
		Tempo de incubação			
		6h	8h	12h	15h
2,5	ELB	20	19,0	2,2	0,3
	ELP	18	16,9	1,8	0,1
5	ELB	15	14	0,3	0,2
	ELP	14	13,2	0,2	0,1
10	ELB	13,2	10,7	0,3	0,2
	ELP	12,5	10,4	0,2	0,1

Esta condição foi definida para a continuidade dos testes de produção de inóculo.

## 5.2 Efeito da concentração de glicose no meio de fermentação

Inicialmente, foram realizados ensaios de fermentação de *Z. mobilis* para produção de células/enzimas e etanol com diferentes concentrações de glicose como fonte de carbono, variando de 70 a 150 g.L<sup>-1</sup>. A cinética de crescimento e de consumo de substrato nas distintas condições é mostrada na Figura 13 e os dados gerais dos cultivos são apresentados na Tabela 3.



**Figura 13.** Concentração celular (A) e consumo de substrato (B) em função do tempo, em cultivos de *Zymomonas mobilis* em batelada, com diferentes concentrações de glicose ( $S_0 = 70$  a  $150$  g.L<sup>-1</sup> de glicose, pH 5,5, 30°C).

Como pode ser observado na Figura 13A, concentração celular superior foi atingida no cultivo realizado com 150 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 4,3 g.L<sup>-1</sup> em 23 h de processo. Perfis semelhantes de biomassa foram identificados nos ensaios em que foram empregadas concentrações de 80 e 100 g.L<sup>-1</sup> de glicose, média de 3,4 g.L<sup>-1</sup>, embora atingidas em tempos de cultivo diferentes. O substrato foi totalmente consumido pela população bacteriana em todos os ensaios, em tempo de processo mais longo em função do aumento da concentração de glicose no meio (Figura 13B).

Na Tabela 3, pode ser observado que a produtividade foi superior no cultivo com 80 g.L<sup>-1</sup> de glicose inicial, cerca de 6,3 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, assim como os resultados de

rendimento, conversão de substratos em células, de substrato em produto e de máxima velocidade específica de crescimento, cerca de 90%, 0,038 g.g<sup>-1</sup>, 0,46 g.g<sup>-1</sup> e 0,48 h<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabela 3.** Resultados gerais obtidos nos cultivos de *Zymomonas mobilis*, em regime descontínuo, com diferentes concentrações de substrato ( $S_0 = 70$  a 150 g.L<sup>-1</sup> de glicose, pH 5,5, 30 °C).

Concentração de substrato (g.L <sup>-1</sup> )	S <sub>0</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	μ <sub>xm</sub> (h <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	t (h)	p (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	ρ (%)
<b>70</b>	72	0,35	0,027	0,46	6	5,6	90
<b>80</b>	82	0,48	0,038	0,46	6	6,3	90
<b>100</b>	105	0,4	0,032	0,43	12	3,6	84
<b>150</b>	152	0,18	0,024	0,46	23	3,0	90

S<sub>0</sub> - concentração inicial de glicose; μ<sub>max</sub> - máxima velocidade específica de crescimento celular; Y<sub>x/s</sub> - fator de conversão de glicose em células; Y<sub>p/s</sub> - fator de conversão de glicose em etanol; t - tempo final de cultivo; p - produtividade volumétrica. ρ - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,511 g.g<sup>-1</sup>).

Nowak (2000), em estudo sobre a produção de etanol com duas linhagens de *Z. mobilis*, relatou a obtenção de rendimentos em etanol entre 92-94% em meios contendo 100 e 150 g.L<sup>-1</sup> de glicose, em cultivos em batelada. Em concentrações superiores, entre 200 e 250 g.L<sup>-1</sup>, maior tempo de cultivo foi relatado, entretanto, com as linhagens de *Z. mobilis* empregadas, não foi constatado efeito de inibição pelo substrato. Kesava *et al.* (1995) relataram, para diferentes concentrações iniciais de glicose, de 100 e 150 g.L<sup>-1</sup>, valores semelhantes de conversão de substratos em células, de 0,02 g.g<sup>-1</sup>, e de substrato em produto de 0,46 e 0,5 g.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Segundo os autores, os altos valores de Y<sub>p/s</sub> eram esperados, uma vez que *Z. mobilis* utiliza a produção de etanol como, praticamente, a única rota bioquímica de formação de energia.

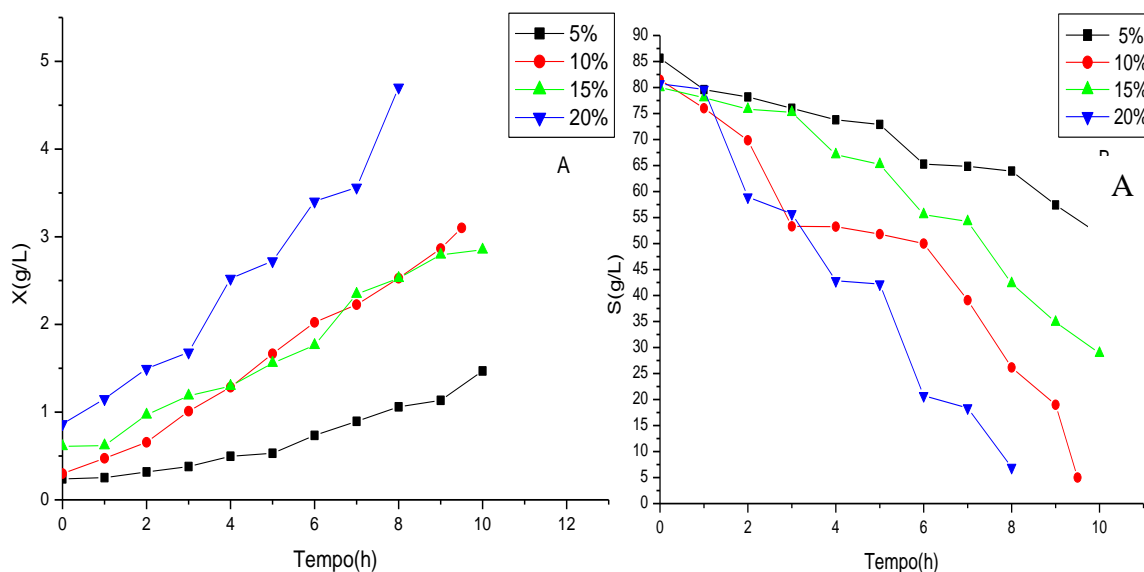
Entre as condições avaliadas, resultados superiores foram atingidos com o uso de 80 g.L<sup>-1</sup> de glicose no meio, definida, então, para a sequência dos cultivos.

Erzinger *et al.* (2003) relatam que a produção de etanol pode ser incrementada e a inibição pelo substrato pode ser diminuída quando se utiliza o regime descontínuo alimentado como forma de operação das bateladas.

### 5.3 Determinação do percentual de inóculo e forma de inoculação

Uma vez determinado o tempo necessário para a ativação da cultura de *Z. mobilis*, foi avaliado o teor de inóculo e a forma de inoculação, se biomassa úmida, previamente concentrada por centrifugação, ou em percentual de volume de meio de inóculo/meio de fermentação. Com o intuito de verificar o efeito do uso de biomassa concentrada sobre o perfil de crescimento microbiano e de formação de produto, foram realizados testes utilizando o inóculo proveniente da centrifugação de 5%, 10%, 15% ou 20% (v/v) de meio previamente fermentado. Salienta-se que, neste caso, o inóculo na forma de biomassa úmida não interferiria na estimativa de açúcar e etanol inicial.

Na Figura 14, é apresentada a cinética de crescimento e de consumo de substrato com o emprego de biomassa úmida como inóculo no cultivo de *Z. mobilis*. Foi observado crescimento celular mais acentuado e, conseqüentemente, maior velocidade de consumo de substrato em função do aumento do teor de inóculo de *Z. mobilis*. Salienta-se que a concentração de glicose de 80 g.L<sup>-1</sup> foi empregada na etapa fermentativa com o intuito de permitir o acompanhamento da cinética de processo, com a determinação da velocidade específica de crescimento e de consumo de substrato em cada condição. Entretanto, o cultivo com 5% (v/v) de inóculo foi conduzido por um tempo maior com o intuito de proporcionar a total conversão do substrato em etanol (cerca de 22 h).



**Figura 14.** Crescimento celular (A) e consumo de substrato (B) em função do tempo, em cultivos de *Zymomonas mobilis* em batelada, com diferentes proporções de inóculo, obtido a partir de biomassa úmida ( $X = 5, 10, 15$  e 20% do volume em biomassa úmida concentrada;  $S_0 = 80 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, pH 5,5, 30°C)

Os dados dos principais parâmetros cinéticos envolvidos na produção de biomassa e de etanol por *Z. mobilis*, em regime descontínuo, estão compilados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados gerais obtidos nos cultivos de *Zymomonas mobilis*, em regime descontínuo, com diferentes proporções de inóculo, obtido a partir de biomassa úmida concentrada ( $S_0 = 80 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, pH 5,5;  $30^\circ\text{C}$ ).

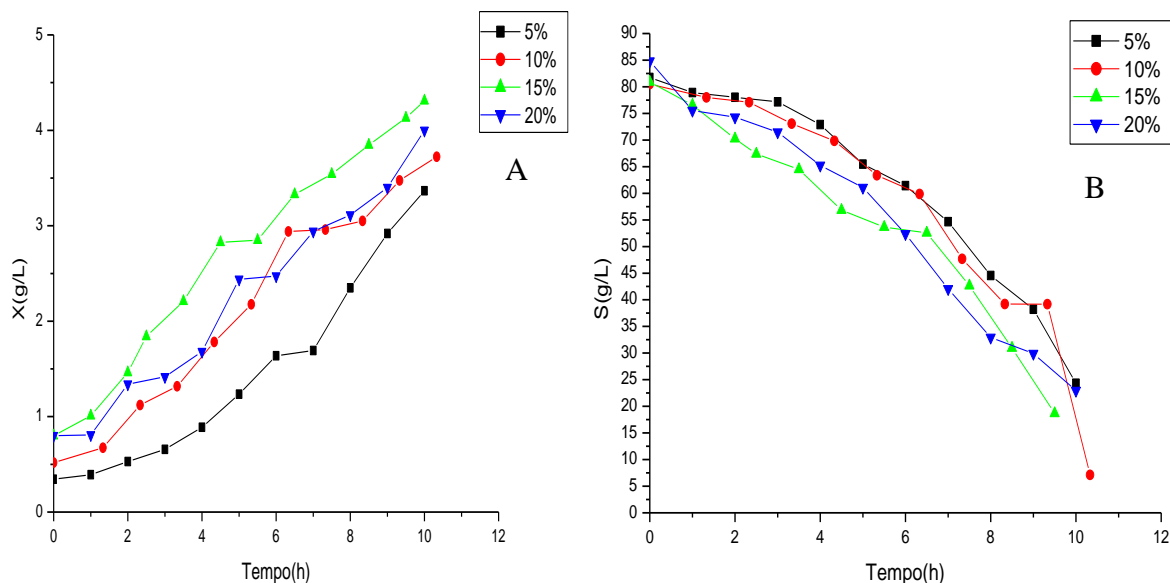
<b>Inóculo</b> <b>(% de biomassa</b> <b>úmida)</b>	<b><math>S_0</math></b> <b>(<math>\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b><math>\mu_{xm}</math></b> <b>(<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b><math>Y_{x/s}</math></b> <b>(<math>\text{g.g}^{-1}</math>)</b>	<b><math>Y_{p/s}</math></b> <b>(<math>\text{g.g}^{-1}</math>)</b>	<b>t</b> <b>(h)</b>	<b>p</b> <b>(<math>\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b><math>\rho</math></b> <b>(%)</b>
<b>5</b>	86	0,21	0,037	0,32	22	1,1	63
<b>10</b>	81	0,32	0,034	0,40	9,5	4,4	78
<b>15</b>	80	0,32	0,038	0,45	10	3,7	88
<b>20</b>	81	0,28	0,038	0,43	8	4,0	84

$S_0$  - concentração inicial de glicose;  $\mu_{max}$  - máxima velocidade específica de crescimento celular;  $Y_{x/s}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{p/s}$  - fator de conversão de glicose em etanol; t - tempo final de cultivo; p - produtividade volumétrica.  $\rho$  - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico ( $0,511 \text{ g.g}^{-1}$ ).

Nas condições testadas, a produção de etanol foi superior quando utilizada biomassa úmida proveniente da centrifugação de 15% do volume de meio, cerca de  $37 \text{ g.L}^{-1}$ , com rendimento de 88%, em 10 h de processo. Foi observado o incremento em termos de máxima velocidade específica de crescimento entre 5 e 15% de biomassa, sendo atingido, nesta última condição,  $\mu_{xm}$  de  $0,32 \text{ h}^{-1}$ . Os dados médios de  $Y_{p/s}$  na faixa de  $0,40 \text{ g}$  de etanol/ $\text{g}$  de glicose estão relacionados com a forma de obtenção de energia por *Z. mobilis* em função da produção de etanol, como discutido anteriormente. Com relação à produtividade, valores semelhantes foram determinados quando utilizados 15% e 20% e superior,  $4,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , com inóculo de 10% (Tabela 4).

Na Figura 15, são apresentados os resultados obtidos para a cinética de crescimento e de consumo de substrato, em cultivos de *Z. mobilis* conduzidos em regime descontínuo, com inóculo relativo a 5, 10, 15 ou 20% (v/v) em relação ao volume de meio reacional.





**Figura 15.** Crescimento celular (A) e consumo de substrato (B) em função do tempo, em cultivos de *Zymomonas mobilis* em batelada, com diferentes tamanhos de inóculo ( $X = 5, 10, 15$  e  $20\%$  volume inóculo/volume reacional;  $S_0 = 80 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, pH 5,5,  $30^\circ\text{C}$ ).

Incremento em termos de biomassa foi observado com o aumento do teor de inóculo até  $15\%$  (v/v). Entretanto, quando empregado  $20\%$  (v/v) de inóculo, a diminuição do crescimento foi constatada (Figura 15A). Apesar de terem sido observados valores semelhantes de biomassa inicial, tanto com inóculo proveniente da biomassa centrifugada (Figura 14A) ou em volume de meio (Figura 15A), sugere-se que a diminuição do crescimento no segundo caso seja devida à presença de etanol residual do inóculo (em média  $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) ou, ainda, em função da limitação da fonte de nitrogênio orgânico e vitaminas, como já observado em trabalhos anteriores com *Z. mobilis* (MALVESSI, 2008).

Os resultados dos principais parâmetros cinéticos envolvidos na produção de biomassa e etanol por *Z. mobilis* com o inóculo proveniente de diferentes percentuais de meio, de  $5$  a  $20\%$  (v/v), são apresentados na Tabela 5.

A produtividade e o rendimento em etanol foram superiores quando utilizado inóculo de  $15\%$  (v/v), cerca de  $3,9 \text{ g.L}^{-1}$  e  $94\%$ , em  $10 \text{ h}$  de processo. A velocidade específica de crescimento foi incrementada até o emprego de  $15\%$  (v/v) de inóculo, seguido de perfil de queda em cultivo com  $20\%$  (v/v) de inóculo, de  $0,33$  e  $0,31 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Como já observado no ensaio anterior, no cultivo com o emprego de

menor proporção de inóculo, o tempo de processo foi mais longo, média de 22 h, para que fosse alcançado o total consumo de substrato.

**Tabela 5.** Resultados gerais obtidos nos ensaios fermentativos de *Zymomonas mobilis*, em regime descontínuo, com diferentes proporções de inóculo ( $S_0 = 80 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, pH 5,5, 30°C)

Percentual de inóculo (% v/v)	$S_0$ (g.L <sup>-1</sup> )	$\mu_{xm}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$Y_{p/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	t (h)	p (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\rho$ (%)
5	81	0,28	0,049	0,35	22,25	1,3	68
10	80	0,33	0,044	0,44	10,3	3,4	86
15	81	0,33	0,048	0,48	10	3,9	94
20	85	0,31	0,048	0,43	12	3,2	84

$S_0$  - concentração inicial de glicose;  $\mu_{max}$  - máxima velocidade específica de crescimento celular;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em etanol; t - tempo final de cultivo; p - produtividade volumétrica;  $\rho$  - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,511g.g<sup>-1</sup>).

#### 5.4 Reciclo de células através de centrifugação

Nesta primeira etapa, são apresentados e discutidos os ensaios com reciclo de células e separação de etanol por centrifugação. Após a etapa de fermentação inicial, o caldo proveniente da batelada foi centrifugado em sua totalidade e as células foram, então, novamente inoculadas no reator juntamente com meio de cultura e solução de glicose, dando início a uma nova batelada.

Na Tabela 6, são mostrados os resultados gerais obtidos nestes ensaios. Pode ser observado cerca de 41% de incremento em termos de biomassa ao final de três bateladas realizadas. Para a concentração final de etanol, uma tendência de aumento da produtividade foi observada, de cerca de 5%. No estudo da atividade enzimática, foi observada a redução média de 18% na atividade ao final das bateladas 1, 2 e 3, cujos dados foram 3,9; 3,6 e 3,2 U.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Esta queda da atividade pode ter sido provocada por danos em sua estrutura durante a centrifugação ou em função do atrito que as células sofrem no sistema, como o cisalhamento.

**Tabela 6.** Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis* em três bateladas repetidas com reciclo de células através de centrifugação ( $S_0 = 80 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 5,5, 30°C)

Bateladas	t (h)	$S_0$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$X_f$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$\rho$ (%)
1	12	80	3,0	36,3	0,037	0,453	89
2	12	80	4,1	38,1	0,051	0,475	93
3	12	80	4,2	38,0	0,052	0,475	93

t – tempo final de cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $X_f$  – concentração celular final;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em etanol;  $\rho$  - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico ( $0,511 \text{ g.g}^{-1}$ ).

No trabalho desenvolvido por Palha *et al.* (2002), os autores verificaram a influência da centrifugação sobre a agregação de *Z. mobilis* e constataram que a centrifugação a 2500 G provoca uma alteração na estrutura das células, possivelmente devido à remoção da camada externa, denominada glicocálice; este fato pode estar relacionado às forças de cisalhamento impostas.

Em estudo de produção de glicerol por *Candida krusei* em repetidas bateladas, Liu & Liu (2004) relatam o uso da centrifugação como forma de reciclo celular. Neste estudo, as células foram previamente cultivadas em meio contendo  $200 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, a 35°C e, quando cerca de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose residual foi estimada, em cerca de 24 h, o cultivo foi encerrado e o caldo centrifugado por 5 minutos. Os autores relatam o efeito positivo do procedimento de lavagem das células após a centrifugação, uma vez que a concentração celular e a produção de glicerol foram superiores em comparação com os cultivos em bateladas repetidas realizados com células não lavadas. Este fato, segundo os autores, estaria relacionado ao possível efeito inibidor da permanência de produtos residuais nas células centrifugadas e não lavadas.

### 5.5. Cultivos em bateladas por meio de cortes

Na etapa seguinte, foram avaliados os cultivos em bateladas repetidas por meio de cortes, ou pé-de-cuba, nos quais 15 ou 20% de volume de meio foi mantido no reator ao final de cada batelada. Essas proporções foram definidas para os testes, uma vez que

é relatado o uso de 0,5 a 50% de volume no reator como inóculo, sendo valores próximos a 10% os mais usuais (BORZANI *et al.*, 1975). Os resultados gerais são apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Foi observado para o cultivo com 15% (v/v) de corte, isto é, quando houve a manutenção de 15% de volume de meio ao final de cada batelada, aumento da biomassa e produção de etanol, em três bateladas sequenciais, sendo atingidos, neste último caso, valores médios de 96% de rendimento em etanol (Tabela 7). Nestas condições, não foi identificado o efeito inibidor do etanol residual presente no caldo usado como inóculo em cada etapa dos cortes. Apesar do aumento da biomassa atingida em cada etapa, não foi avaliado, neste momento, a necessidade de suplementação de nutrientes no meio. Na avaliação da atividade enzimática de GFOR/GL, foram obtidos valores de 5,3, 5,8 e 7,7 U.g<sup>-1</sup>, ao final das bateladas 1, 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 7.** Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis* em três bateladas repetidas por meio de cortes (15% de volume de inóculo, S<sub>0</sub>= 80 g.L<sup>-1</sup>, pH 5,5, 30°C).

Bateladas	t (h)	S <sub>0</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>f</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	ρ (%)
1	12	82,3	3,4	41,0	0,039	0,463	90,6
2	12	80,1	4,1	42,4	0,048	0,49	95,8
3	12	80,8	4,3	43,0	0,049	0,493	96,4

t – tempo final de cultivo; S<sub>0</sub> - concentração inicial de glicose; X<sub>f</sub> – concentração celular final; Y<sub>X/S</sub> - fator de conversão de glicose em células; Y<sub>P/S</sub> - fator de conversão de glicose em etanol; ρ - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,511 g.g<sup>-1</sup>).

Observa-se que, na sequência de cultivos realizados com a manutenção de 20% (v/v) do caldo antes fermentado, não ocorreu obtenção de biomassa na mesma proporção que no caso estudado de 15% (v/v) de corte, o mesmo não sendo observado em termos de rendimento em etanol (Tabela 8), onde valores predominantemente mais altos de rendimento em etanol foram obtidos. Este fato pode estar indicando que ocorreu, com 20% de corte, inibição do crescimento microbiano entre as bateladas devido, possivelmente, ao etanol residual presente.

Segundo Erzinger *et al.* (2003) a atividade da enzima GFOR/GL é mais alta quando os cultivos de *Z. mobilis* são conduzidos com altas concentrações de glicose, porém o potencial catalítico dessas enzimas pode ser reduzido devido à exposição às elevadas concentrações de etanol.

**Tabela 8.** Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis* em três bateladas repetidas por meio de cortes (20% de volume de inóculo,  $S_0 = 80 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 5,5,  $30^\circ\text{C}$ ).

Bateladas	t (h)	$S_0$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$X_f$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$\rho$ (%)
1	12,0	86,1	3,0	39,9	0,034	0,46	90
2	11,5	83,0	3,4	41,7	0,041	0,50	97
3	11,0	81,0	3,6	39,1	0,044	0,483	94

t – tempo final de cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $X_f$  – concentração celular final;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em etanol;  $\rho$  - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico ( $0,511 \text{ g.g}^{-1}$ ).

A condição de reciclo de células através de bateladas com cortes na proporção de 15% (v/v) de volume de meio propiciou um aumento de 16% em termos de biomassa entre a primeira e a terceira batelada sequencial. Em termos de produção de etanol, com a manutenção de 15% (v/v) no reator, resultado cerca de 10% superior foi obtido entre as bateladas quando comparado com 20% (v/v).

Nos cultivos realizados com o corte de 15% (v/v), cada batelada foi inoculada com aproximadamente  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa e nos cultivos realizados com o corte de 20% (v/v), cada batelada, o inóculo consistiu em aproximadamente  $0,6 \text{ g.L}^{-1}$  de células. Nos estudos realizados por Barros *et al.* (2003), melhores rendimentos em termos de produto foram obtidos com  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa, porém, os autores constataram que  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  favoreceram o crescimento celular de *Z. mobilis*.

Clebsch *et al.* (1996) constataram que na concentração de  $0,23 \text{ g.L}^{-1}$  de inóculo, a atividade de GFOR foi superior quando comparada com concentrações iniciais de células de  $0,04, 0,08 \text{ g.L}^{-1}$ , testadas para uma cepa floculante de *Z. mobilis*.

## 5.6 Reciclo de células através de membranas

Na primeira etapa, foi realizada uma avaliação preliminar das membranas para a condução dos experimentos de concentração e reciclo de células. Uma membrana, para ser considerada apropriada, deve apresentar a capacidade de reter as células em sua estrutura, permear um fluxo adequado para a realização dos testes e, também, apresentar facilidade de limpeza e conservação.

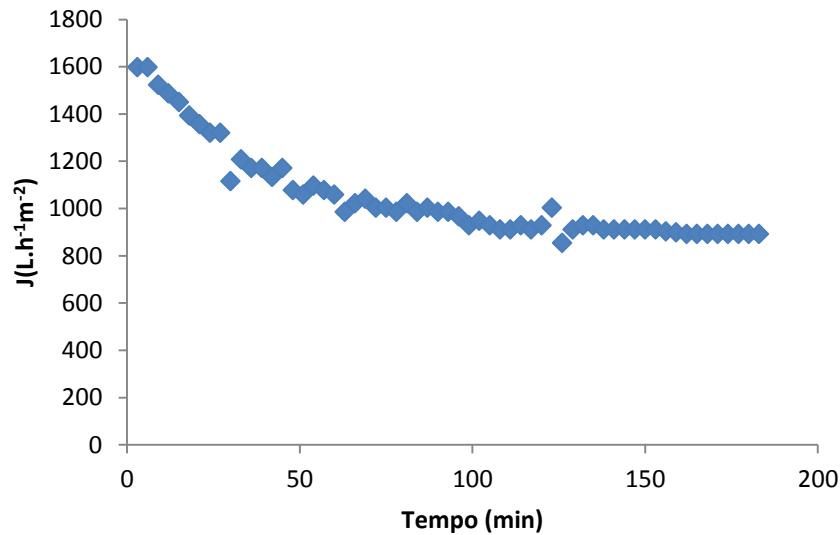
Foram testadas membranas cerâmica de  $\alpha$ -alumina e módulo de membranas poliméricas de poli(éter-imida), de fibras ocas, descritas no item 4.6.3.

### 5.6.1 Caracterização das membranas

As membranas foram caracterizadas através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e através de testes de microfiltração que compreenderam três etapas: compactação, permeabilidade à água e permeabilidade ao caldo fermentado.

No teste de compactação das membranas, comportamento similar foi observado para ambos os tipos de membranas. O processo de permeação da água destilada iniciou com altos valores de fluxo permeado, que decresceram até valores constantes, comportamento esse, indicativo do fim da compactação das membranas.

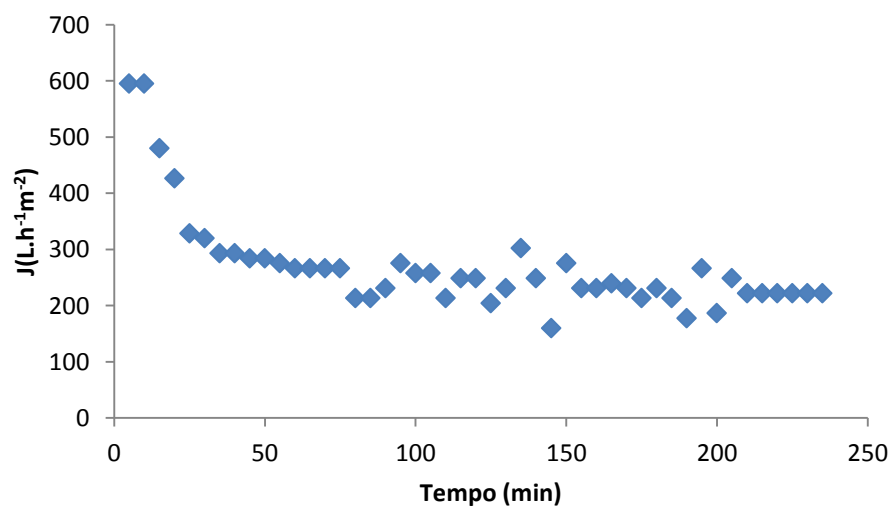
Para a compactação da membrana cerâmica foi realizada a passagem de água, com velocidade de escoamento constante, sob pressão de 6 bar e duração de 3 h, a 25°C, quando foi atingido um fluxo constante de permeado em função do tempo de operação (Figura 16).



**Figura 16.** Compactação da membrana cerâmica na pressão de operação de 6 bar.

Para compactação das membranas poliméricas, a passagem da água destilada foi realizada à pressão de 3 bar, em função de ser a máxima pressão de trabalho suportada pelo sistema (informação fornecida pelo fabricante). A temperatura de operação foi 25°C, com duração de 3,4 h, período necessário para que o fluxo constante de permeado fosse atingido (Figura 16).

Em ambos os sistemas com membranas testados, o tempo de compactação foi semelhante, cerca de 3 h, porém o fluxo permeado pela membrana cerâmica foi 2,5 vezes maior do que o fluxo permeado nas membranas poliméricas, devido ao maior tamanho de poros na membrana cerâmica em comparação às membranas poliméricas de fibras ocas.



**Figura 17.** Compactação do módulo de membranas poliméricas na pressão de operação de 3 bar.

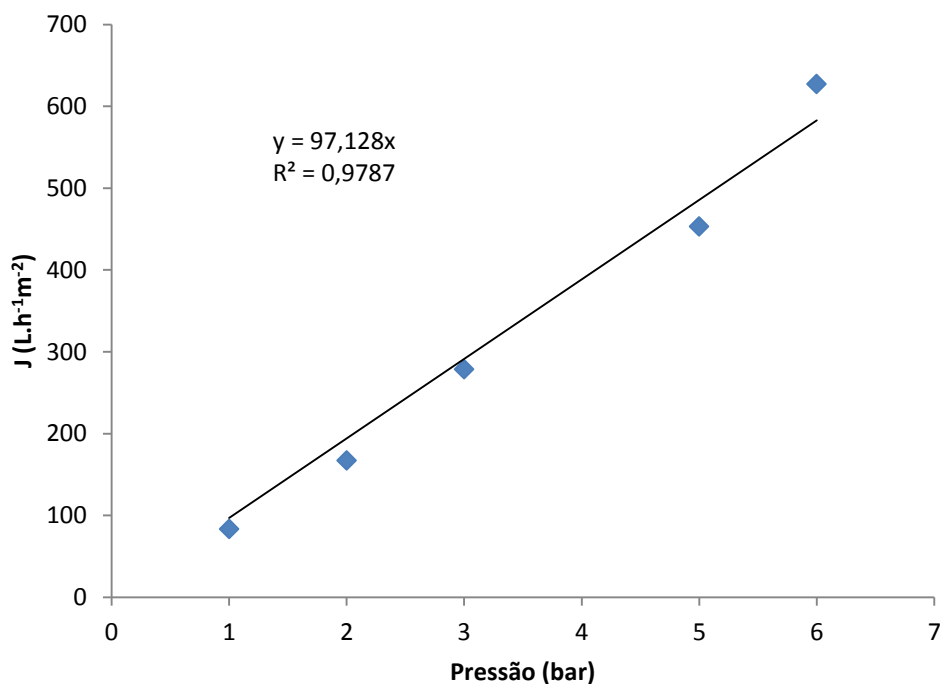
O teste seguinte, de permeabilidade hidráulica, consistiu na passagem de água destilada, com velocidade de escoamento constante, em diferentes pressões de trabalho (1, 2, 3, 4, 5 e 6 bar) para a membrana cerâmica e (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 bar) para a membrana polimérica, onde, em intervalos de tempo de 3 minutos, foram coletadas amostras do permeado e quantificados em termos de fluxo volumétrico. Essas pressões mais baixas requisitadas pelo módulo de membranas polimérica de fibras ocas, são recomendações do fabricante das mesmas, que garante que a pressão de operação nesse caso não poderia exceder 3 bar.

A permeabilidade hidráulica foi determinada para ambas as membranas, a 25°C. É definida em função do declive da reta, resultante da função gráfica entre fluxo permeado (J) e pressão de operação, apresentada nas Figuras 18 e 19 para membrana cerâmica e polimérica, respectivamente.

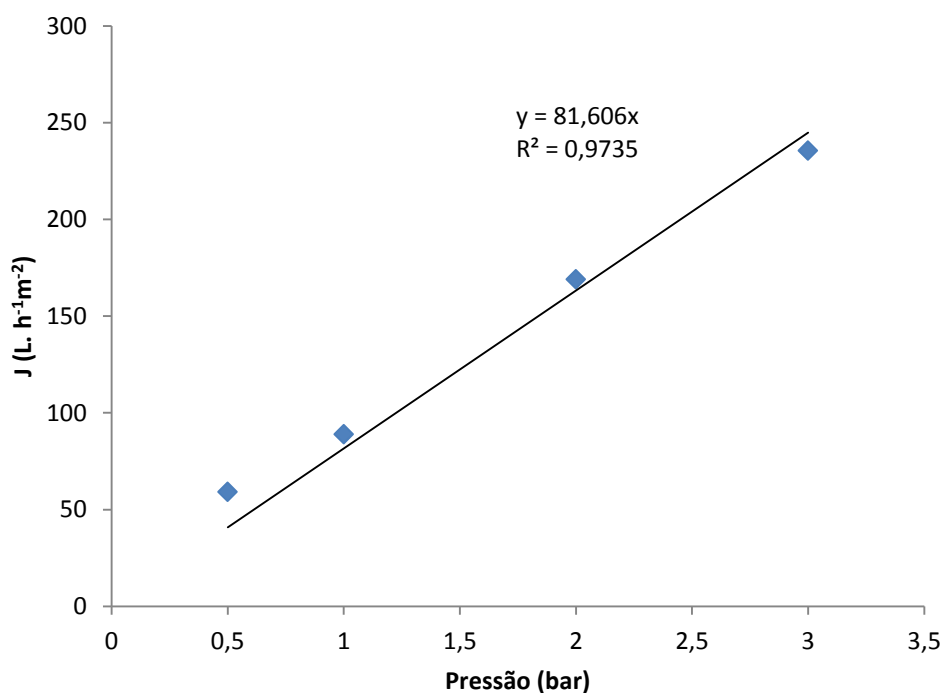
Pode ser observado o aumento da resistência à água destilada proporcionalmente à pressão aplicada, independente do tipo de membrana utilizada. Maior permeabilidade hidráulica foi obtida nos testes realizados com a membrana cerâmica ( $97,12 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ ) e quando comparado às membranas poliméricas ( $81,6 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ ), devido à maior porosidade da membrana cerâmica, permitindo assim maior passagem da água a ser permeada.

O fabricante das membranas poliméricas, em sua especificação técnica, aponta que a permeabilidade da membrana de poli(imida) é de  $122 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ . A discrepância entre os resultados encontrados no teste de microfiltração realizado e na informação do fabricante pode ser devido às diferenças existentes entre as condições físicas empregadas nos testes, como bomba e mangueiras, ocasionando perda de carga.





**Figura 18.** Determinação da permeabilidade hidráulica através do coeficiente angular da função entre o fluxo permeado e as pressões de operação testadas para a membrana cerâmica.



**Figura 19.** Determinação da permeabilidade hidráulica através do coeficiente angular da função entre o fluxo permeado e as pressões de operação testadas para as membranas poliméricas

Cabe ressaltar que em ambos os testes de permeabilidade hidráulica, as retas características não têm origem no ponto (0,0) do gráfico, como seria esperado,

possivelmente devido à perdas de cargas que ocorreram ao longo das mangueiras e na válvula utilizada nos distintos experimentos, ou até mesmo devido aos erros experimentais.

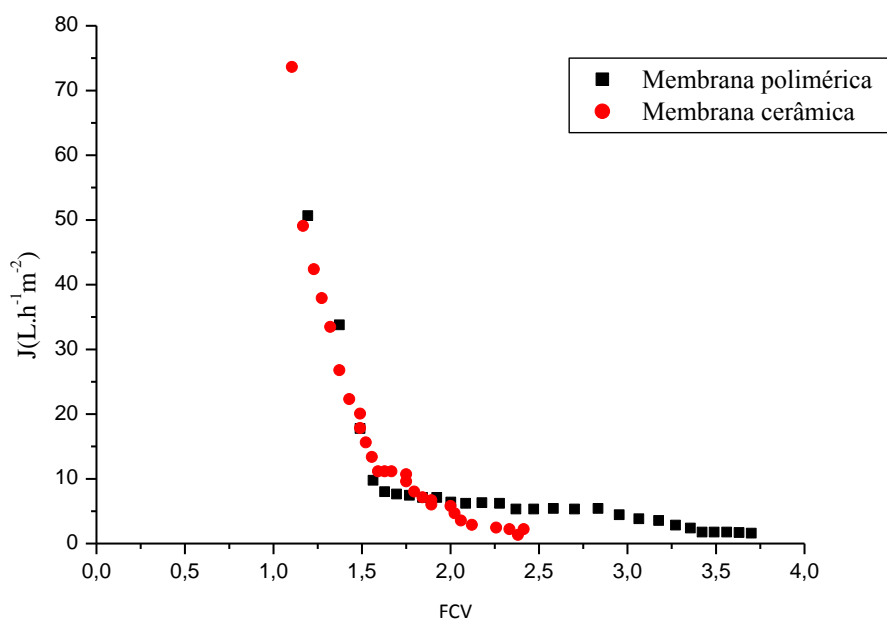
De acordo com Diel *et al.* (2010), o tempo para que ocorra o adensamento da estrutura de uma membrana ou compactação, é característica de cada estrutura e depende do tamanho de poro, pois quanto maior o tamanho de poro, menor o tempo de compactação. Em estudos sobre caracterização de membranas cerâmicas tubulares, os autores relataram a obtenção de 99 e 186 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>.bar<sup>-1</sup>, respectivamente, para membranas cerâmicas de  $\alpha$ -alumina de 0,1 $\mu$ m e 0,4  $\mu$ m de tamanho de poros. Tais resultados aproximam-se, em ordem de grandeza, dos obtidos no presente estudo

Wallberg *et al.* (2003) obtiveram valores experimentais de permeabilidade hidráulica para membranas cerâmicas na ordem de 90 L. h<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>. Tais membranas foram usadas em experimentos de ultrafiltração e apresentavam massa molecular de corte de 15 KDa.

Os estudos referentes à permeação do caldo proveniente do cultivo de *Z. mobilis* em membranas consistiram da passagem deste meio fermentado pelos módulos de membrana cerâmica e membranas poliméricas. O caldo foi obtido a partir de cultivos conduzidos nas condições descritas no item 4.4 e foi permeado nas membranas com o intuito de avaliar o comportamento das membranas frente a essa permeação. As duas membranas foram testadas nas mesmas condições, com velocidade de escoamento de 1,5.10<sup>-6</sup> m.s<sup>-1</sup>, pressão de operação de 2 bar e temperatura de operação de 25°C. O volume médio inicial de caldo permeado nas membranas foi de 350 mL.

Na Figura 20, é apresentada a variação do fluxo de permeado em função do fator de concentração volumétrico para as duas membranas testadas. Em ambas as membranas testadas, observou-se uma tendência à redução do fluxo da corrente permeada com o aumento do fator de concentração.

O máximo fator de concentração volumétrico encontrado para a membrana cerâmica foi 2,4 e, para as membranas poliméricas foi 3,7, em função das limitações inerentes aos módulos filtrantes.

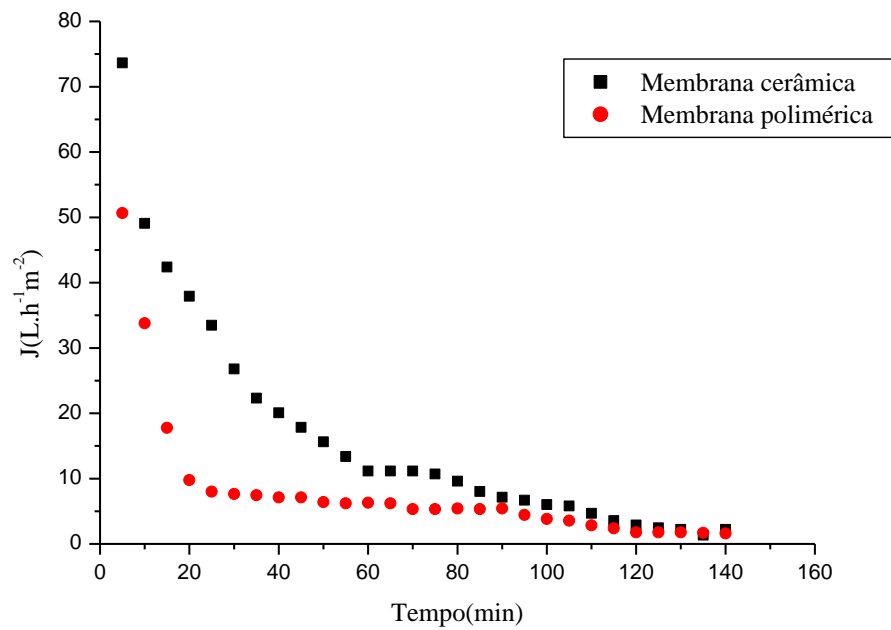


**Figura 20.** Variação do fluxo permeado em função do fator de concentração volumétrico nos testes conduzidos com as membranas cerâmicas e poliméricas (temperatura de 25°C e pressão de 2 bar)

Miranda (2005) observou que o efeito de *fouling* é amenizado com a redução da pressão utilizada. Assim, mesmo para soluções com diferentes composições, o efeito do *fouling* geralmente é menos acentuado quando se trabalha a menores pressões. Entretanto, a redução do fluxo de permeado, provocada pela diminuição da pressão, pode tornar o processo economicamente inviável, devido à baixa produtividade do sistema.

Na Figura 21, é apresentada a variação do fluxo permeado do caldo fermentado em função do tempo para as membranas testadas. Pode ser observado o perfil de queda do fluxo permeado nos testes conduzidos com ambas as membranas. Para a membrana polimérica, o fluxo inicial foi estimado em aproximadamente 57 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> após 140 minutos, fluxo final de 1,5 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. No caso da membrana cerâmica, os fluxos inicial e final determinados foram de 33 e 2,5 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente.

A queda do fluxo observada em ambos os casos pode ser devida à polarização por concentração e também ao *fouling* que ocorre durante a permeação do caldo pela membrana. Salienta-se que a redução do fluxo permeado é um dos fatores que limitam o processo.



**Figura 21.** Variação do fluxo permeado em função do tempo para as membranas poliméricas e para a membrana cerâmica (temperatura de 20°C e pressão de 2 bar).

### 5.6.2 Reciclo através da membrana cerâmica

Em se tratando de utilização das membranas na etapa de reciclo de células e separação de etanol, inicialmente, foi realizada a fermentação em biorreator e, ao final do processo, o caldo foi permeado pela membrana cerâmica até o seu esgotamento, com velocidade de  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ m.s}^{-1}$  e pressão de 2 bar.

Posteriormente, as células retidas na membrana foram recirculadas para o interior do fermentador e o volume completado com o meio de cultura para dar início a uma nova batelada. Para o primeiro reciclo, o tempo de permeação na membrana foi de aproximadamente 3 h e para o segundo, de 4 h.

Os testes foram realizados em duplicata e a compilação dos principais resultados é apresentada nas Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9.** Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis* com reciclo de células através de membrana cerâmica tubular ( $S_0= 80 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 5,5, 30 °C), Ensaio 1.

Ensaio 1							
Bateladas	$S_0$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	t (h)	$X_f$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$\rho$ (%)
1	80,4	12	2,9	37,6	0,036	0,470	92
2	80,3	12	3,6	37,8	0,045	0,472	92
3	80,8	12	4,3	39,3	0,054	0,49	96

t – tempo final de cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $X_f$  – concentração celular final;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em etanol;  $\rho$  - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico ( $0,511 \text{ g.g}^{-1}$ ).

**Tabela 10.** Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis* com reciclo de células através de membrana cerâmica tubular ( $S_0= 80 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 5,5, 30 °C), Ensaio 2.

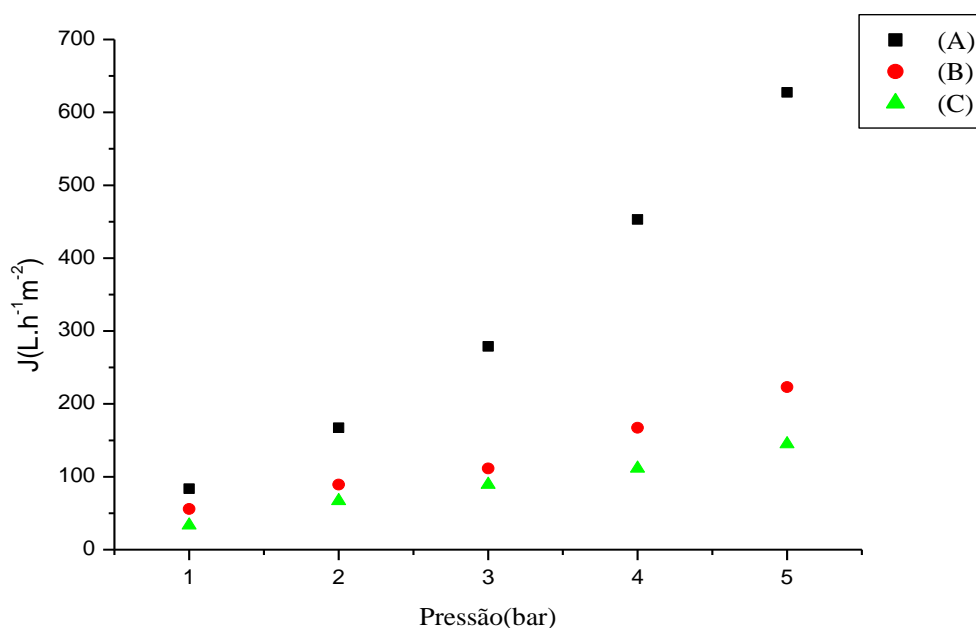
Ensaio 2							
Bateladas	$S_0$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	t (h)	$X_f$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$\rho$ (%)
1	80,6	12	3,1	38,9	0,038	0,482	94,4
2	80,1	12	4,4	39,1	0,054	0,489	96
3	80,7	12	4,7	39,7	0,058	0,490	96

t – tempo final de cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $X_f$  – concentração celular final;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em etanol;  $\rho$  - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico ( $0,511 \text{ g.g}^{-1}$ ).

Nos cultivos visando ao reciclo de células através da membrana cerâmica, foi observado o aumento em termos de biomassa nas três bateladas. O aumento médio da biomassa entre a primeira e a terceira batelada foi de 48% no primeiro ensaio e de 51% no segundo ensaio. Em termos de produto também foi observada uma tendência de aumento de rendimento, cerca de 10% em cada ensaio entre os reciclos.

A atividade da enzima GFOR/GL foi verificada em todas as bateladas e apresentou tendência à redução entre uma batelada e outra, de cerca de 65% entre as bateladas 1, 2 e 3 respectivamente. Esse comportamento pode ter sido devido ao efeito de forças de cisalhamento que promovem a inativação da enzima, pois afetam a estrutura da mesma. O efeito das forças de cisalhamento é expresso pela rotação das moléculas num ambiente turbulento, onde elas absorvem energia suficiente para quebrar as ligações químicas (KRSTIC *et al.*, 2007).

A membrana cerâmica utilizada nos testes foi submetida aos testes de permeação com água antes e depois de sua utilização. O objetivo foi verificar se houve a completa remoção das células da membrana após a retrolavagem para o reciclo. Na Figura 22, observa-se a variação do fluxo de água durante a passagem do caldo fermentado, antes do reciclo e após o primeiro e segundo reciclo de células.



**Figura 22.** Permeabilidade hidráulica em distintas pressões de operação para a membrana cerâmica antes da passagem do meio fermentado de *Zymomonas mobilis* (A); depois do 1º reciclo celular; (B) depois do 2º reciclo celular (C).

Confrontando os valores das permeabilidades hidráulicas da membrana pós-uso, foi constatado que a permeabilidade hidráulica apresentou redução de 62% depois da primeira utilização e 76% depois da segunda utilização, evidenciando, assim, a presença de células remanescentes na estrutura da membrana e que não foram removidas pela retrolavagem das mesmas.

Em função disso, foi realizado um balanço de massa do material que permeou através da membrana cerâmica a fim de possibilitar a quantificação desse material. O balanço de massa da unidade experimental de reciclo celular através de membrana cerâmica foi realizado com a massa seca proveniente do caldo nas três correntes envolvidas no processo: corrente de alimentação, corrente permeada e corrente concentrada. Salienta-se que no balanço de massa não foi considerado a eventual lise celular que poderia contribuir com o aumento do *fouling* na membrana.

O balanço de massa do processo foi realizado segundo a Equação 9 e está apresentado na Tabela 11. Através desta determinação, foi possível realizar a quantificação das células de *Z. mobilis* que permaneceram aderidas na estrutura da membrana cerâmica.

$$\text{Massa que entra} - \text{M permeado} - \text{M concentrado} = \text{M acumulado} \quad (9)$$

**Tabela 11.** Balanço de massa de células de *Zymomonas mobilis* na permeação pela membrana cerâmica

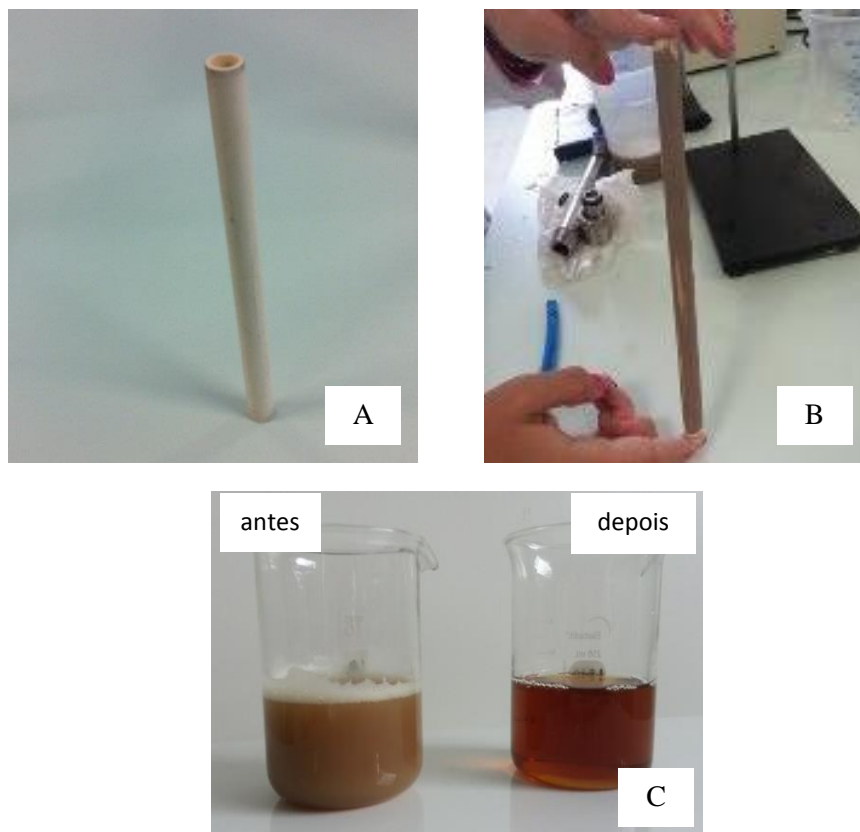
Reciclo	M entra	M permeado	M concentrado	M acumulado
1	0,344g/h	0	0,183g/h	0,161g/h
2	0,468g/h	0	0,20g/h	0,268g/h

M entra – massa de células a serem permeadas, M permeado - massa de células que permearam na membrana cerâmica, M concentrado - massa de células que retornaram ao fermentador após o ciclo de filtração, M acumulado - massa de células que ficaram impregnadas na membrana cerâmica.

Em ambos os reciclos, ocorreu retenção de cerca de 50% das células, isto é, 50% das células que permeiam através da membrana permaneceram aderidas à estrutura da mesma e não foram removidas pela simples passagem de água.

Foi, então, determinado o percentual de *fouling*, calculado através da Equação 1. Os resultados apontam que o *fouling* foi representado por cerca de 70% da retenção das células no primeiro reciclo e de 80% no segundo reciclo com a utilização da membrana cerâmica.

Na Figura 23 é apresentada a membrana cerâmica tubular antes da utilização nos experimentos e posterior à permeação do meio fermentado de *Z. mobilis*, na qual pode ser observada a formação de uma camada de células sobre a superfície da membrana



**Figura 23.** Aspecto da membrana cerâmica tubular antes da utilização (A) e após a permeação do meio fermentado de *Zymomonas mobilis* (B); aparência do meio de fermentação antes e depois da permeação na membrana (C).

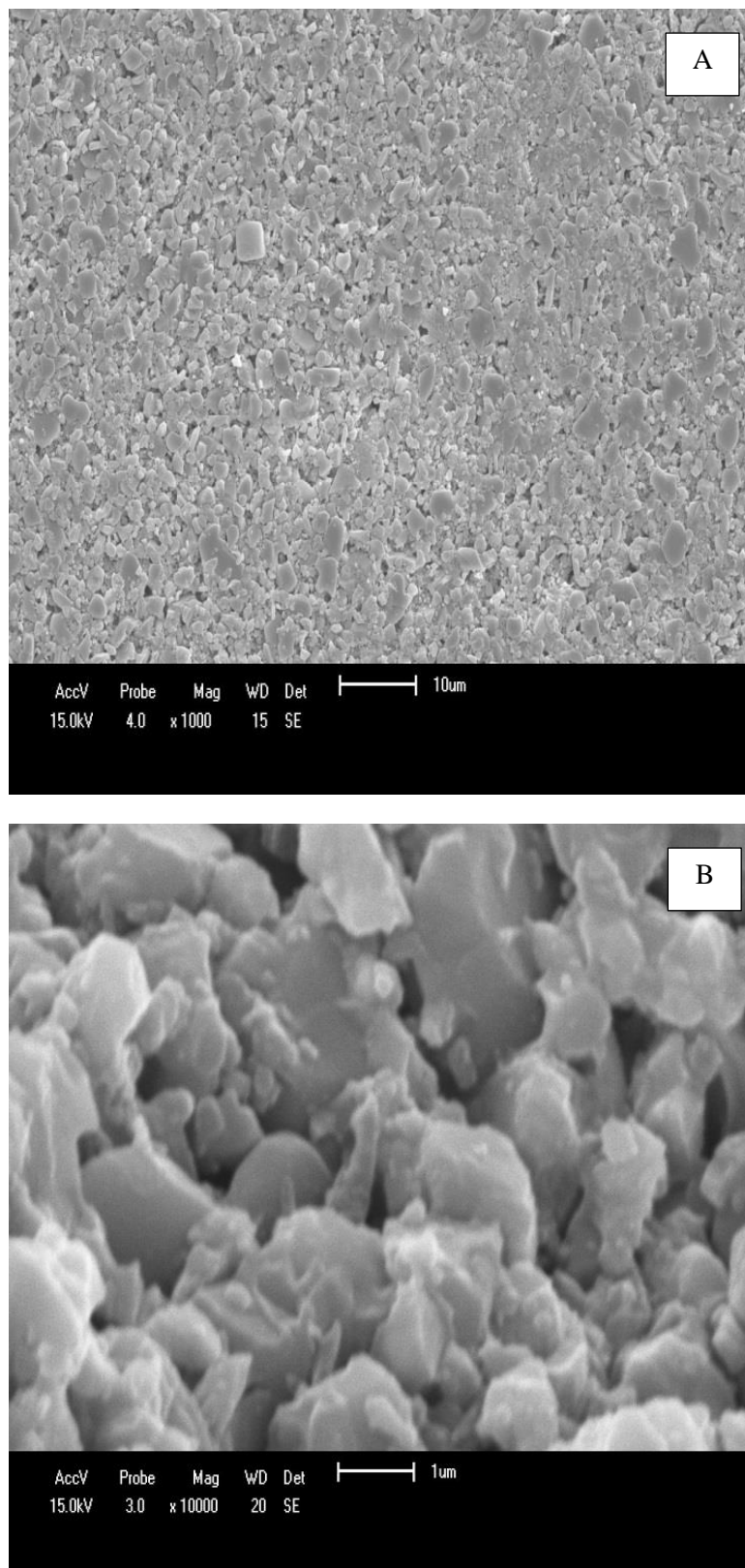
Fragmentos da membrana cerâmica utilizada nos experimentos foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV) e comparados aos fragmentos de membrana do mesmo lote de fabricação e não empregados nos processos de microfiltração. As imagens obtidas em MEV são apresentadas em diferentes ampliações e ângulos (Figuras 24, 25 e 26).

Nas Figuras 24A e 24B, é possível observar o topo do fragmento de membrana onde se identificam os poros da camada filtrante da mesma, caracterizada pela assimetria, isto é, não se observa a regularidade em termos de tamanho dos poros apresentados na membrana cerâmica.

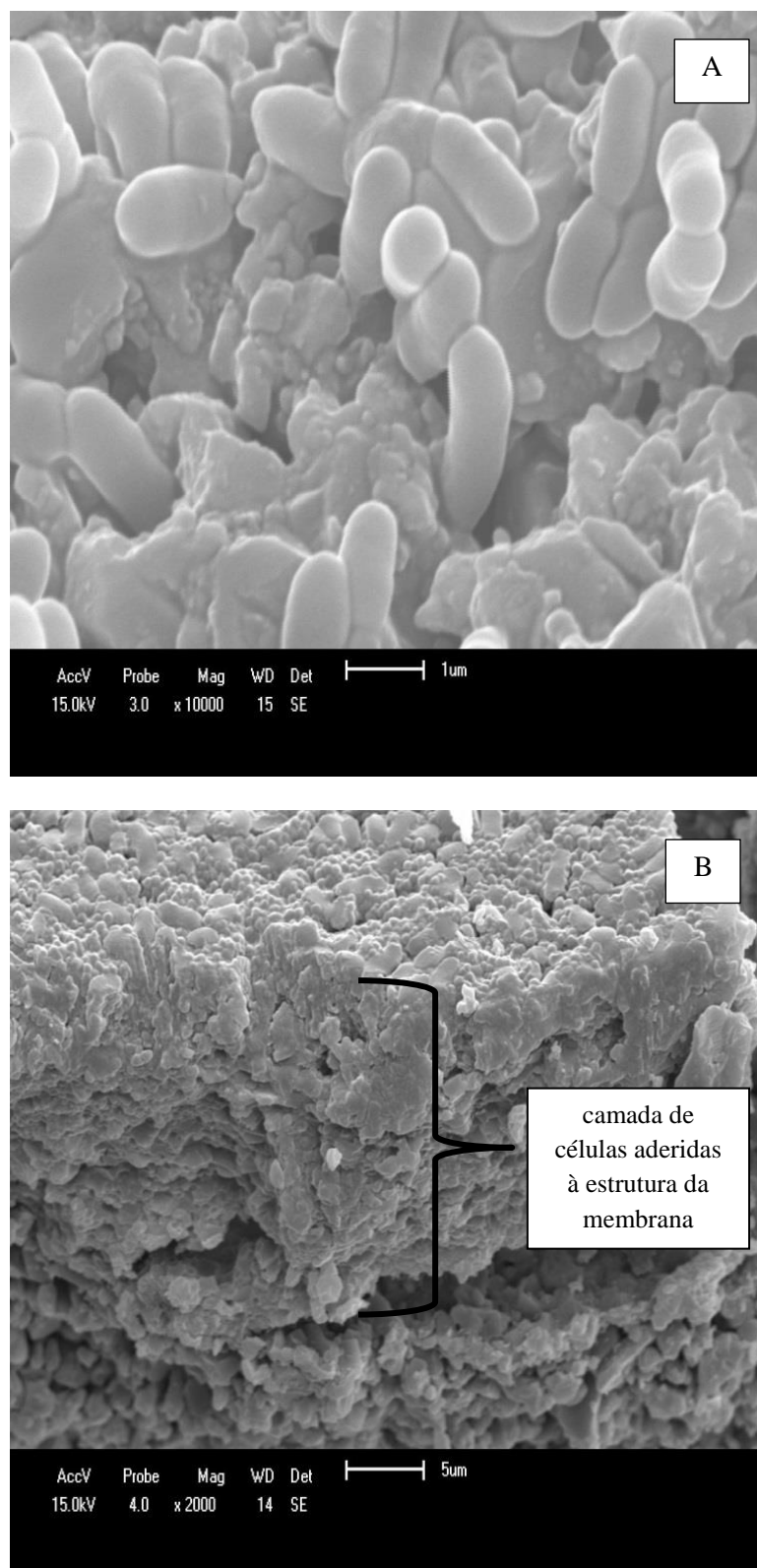
Nas Figuras 25A e 25B, observam-se a deposição das células de *Z. mobilis* sob a camada da membrana. Pode ser verificado que, devido aos diferentes tamanhos de poros da membrana, algumas células ficaram aprisionadas ou na forma de uma camada.

A formação de uma camada de células na superfície da membrana pode, também, ser observada nas Figuras 26A e 26B.

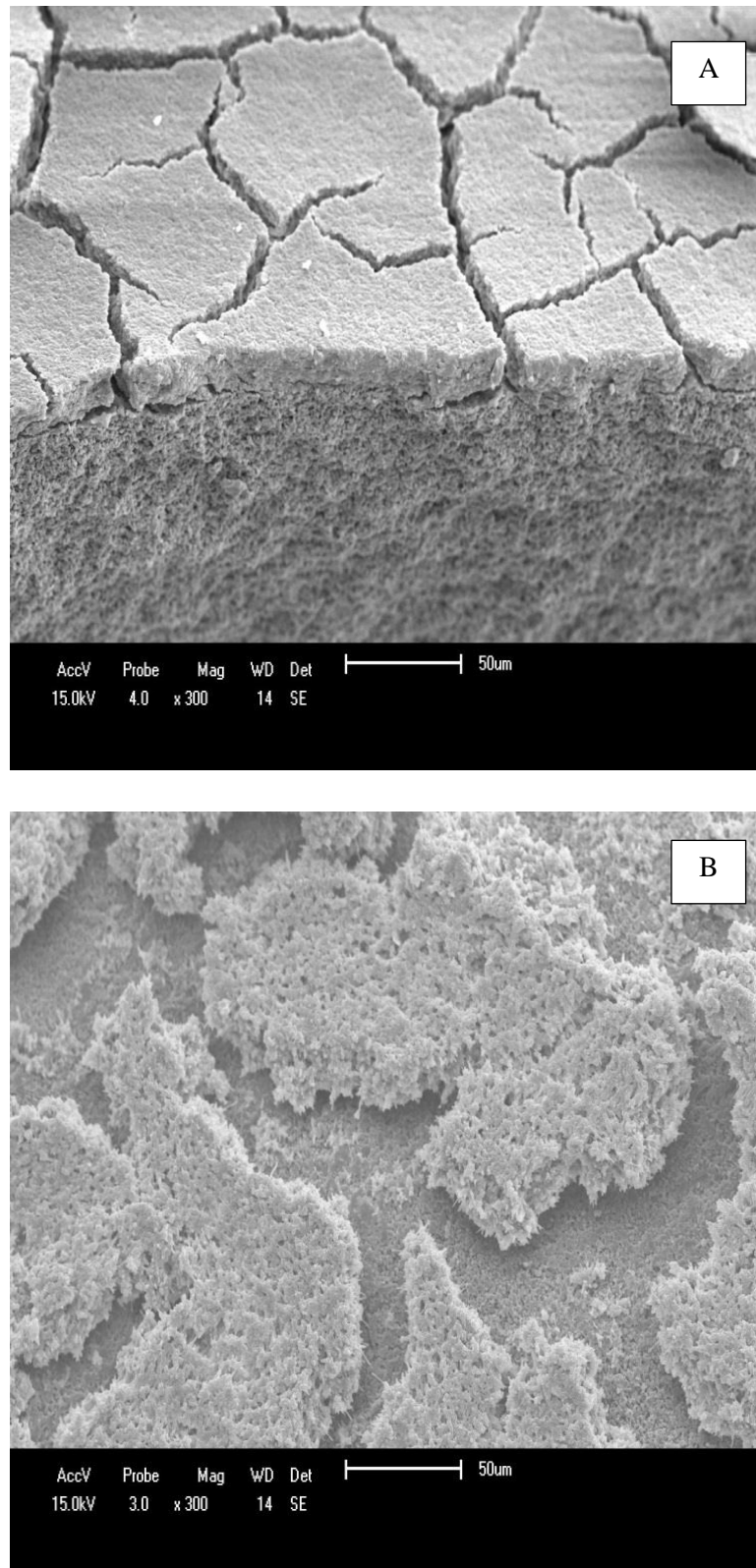




**Figura 24.** Micrografia eletrônica de varredura da superfície de membranas cerâmicas isenta de células de *Zymomonas mobilis*. Tamanho 1µm (A); 10µm (B), magnificação de 1000 e 10000x, respectivamente.



**Figura 25.** Micrografia eletrônica de varredura das células de *Zymomonas mobilis* em contato com a superfície da membrana cerâmica (A) superfície; (B) vista lateral, magnificação de 10000 e 2000 x, respectivamente.

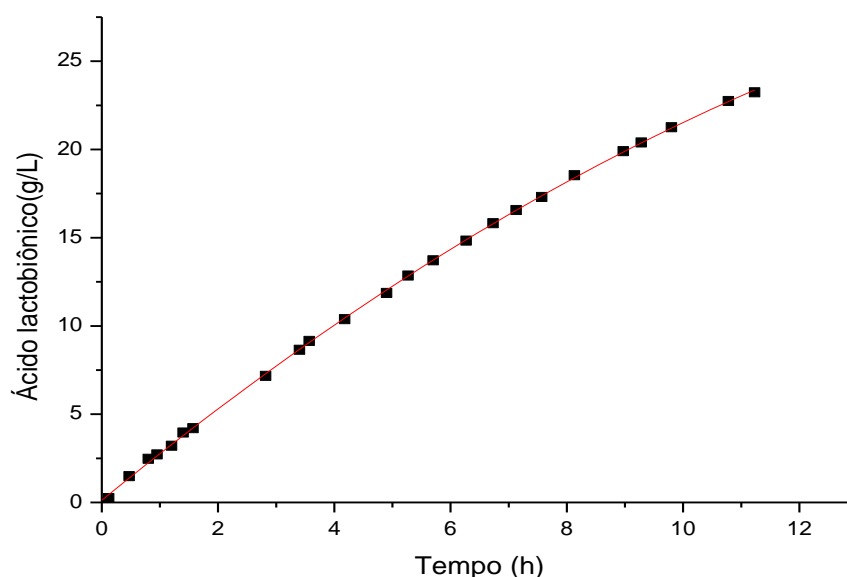


**Figura 26.** Micrografia eletrônica de varredura da camada de células de *Zymomonas mobilis* na membrana cerâmica. (A) vista lateral e (B) superfície, magnificação de 300 x.

### 5.6.3 Ensaio de bioconversão

Visando ao uso da biomassa/enzimas nos experimentos de bioconversão, foram realizadas novas bateladas sequenciais com reciclo de células através da utilização da membrana cerâmica de microfiltração.

A solução de substratos empregada foi  $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$  de lactose/frutose,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de biocatalisador, em reação conduzida a  $39^\circ\text{C}$  e pH controlado em 6,4. Na Figura 27, é apresentado o perfil cinético de formação do ácido lactobiônico em função do tempo, empregando as células de *Z. mobilis*.

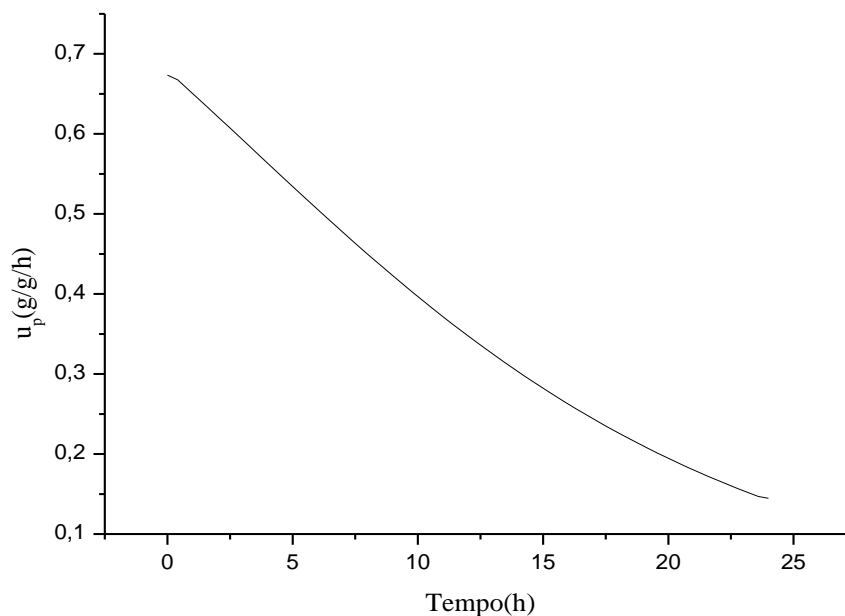


**Figura 27.** Concentração de ácido lactobiônico em função do tempo, em ensaio de bioconversão com células de *Zymomonas mobilis* (solução  $0,7 \text{ mol/L}$  de lactose/frutose,  $39^\circ\text{C}$ , pH 6,4).

Na Figura 27, é mostrado o perfil de bioprodução por 12 h, com a obtenção de  $24 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido lactobiônico. Entretanto, mesmo com o baixo consumo de NaOH, indicando a atividade catalítica reduzida, o processo de bioconversão foi mantido por 25h, ao final do qual, conversão média de 46% de lactose em ácido lactobiônico foi atingida.

Foi verificada, também, a velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ), para identificar a influência que o tempo exerce sobre a formação do ácido, cujos dados

são apresentados na Figura 28. Pode ser observada a queda gradual em termos de  $\mu_p$ , indicando que a ação catalítica de GFOR/GL, como já apresentado anteriormente, foi afetada na etapa de recuperação das células via membrana cerâmica.



**Figura 28.** Velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ) em função do tempo, em ensaio de bioconversão com células/enzimas de *Zymomonas mobilis* recuperadas em membrana cerâmica (solução 0,7 mol/L de lactose/frutose,  $X = 20\text{g.L}^{-1}$ , a  $39^\circ\text{C}$  e pH 6,4).

Carra (2011), em estudo com células de *Z. mobilis* centrifugadas e permeabilizadas, relata a obtenção de valor médio de 75% de conversão e aproximadamente  $1,91\text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para velocidade específica de formação de produto quando utilizado  $20\text{ g.L}^{-1}$  de células/enzimas.

Os resultados apresentados apontam que o tempo prolongado de exposição do sistema enzimático às condições de permeação - como a pressão de operação, pelo fato de se tratarem de enzimas periplasmáticas, e a temperatura, neste caso, não controlada, pois o módulo foi mantido à temperatura ambiente - podem ser considerados fatores que levaram à perda da eficiência catalítica do sistema enzimático GFOR/GL, recuperado pelo sistema de membrana cerâmica.

### 5.6.4 Reciclo através da membrana polimérica

Assim como realizado com a membrana cerâmica, a etapa de reciclo com a membrana polimérica foi antecedida pela condução de um cultivo de *Z. mobilis* para a obtenção de meio fermentado. Este foi passado pela membrana até seu esgotamento, com velocidade de  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ m.s}^{-1}$  e pressão de 2 bar.

Posteriormente, as células foram recirculadas para o fermentador e o volume completado com o meio de cultura para iniciar uma nova batelada. O tempo de permeação foi de 3,3 h para o primeiro reciclo e de 4,2 h para o segundo reciclo.

Os resultados gerais são apresentados nas Tabelas 12 e 13. No reciclo de células através da utilização do módulo de membranas poliméricas, não foi verificado o aumento da biomassa entre as bateladas e, como consequência, o mesmo foi revelado em termos de produção de etanol. Isto pode ter sido devido à retenção das células nas fibras constituintes da membrana, impedindo a recirculação para o fermentador e gerando, portanto, reciclo incompleto de células.

**Tabela 12.** Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis*, com reciclo de células através de membrana polimérica ( $S_0 = 80 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 5,5, 30°C), Ensaio 1.

Ensaio 1							
Bateladas	$S_0$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	t (h)	$X_f$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$\rho$ (%)
1	80,1	12	3,5	33,5	0,043	0,41	80
2	80,2	12	2,5	28,3	0,031	0,35	68

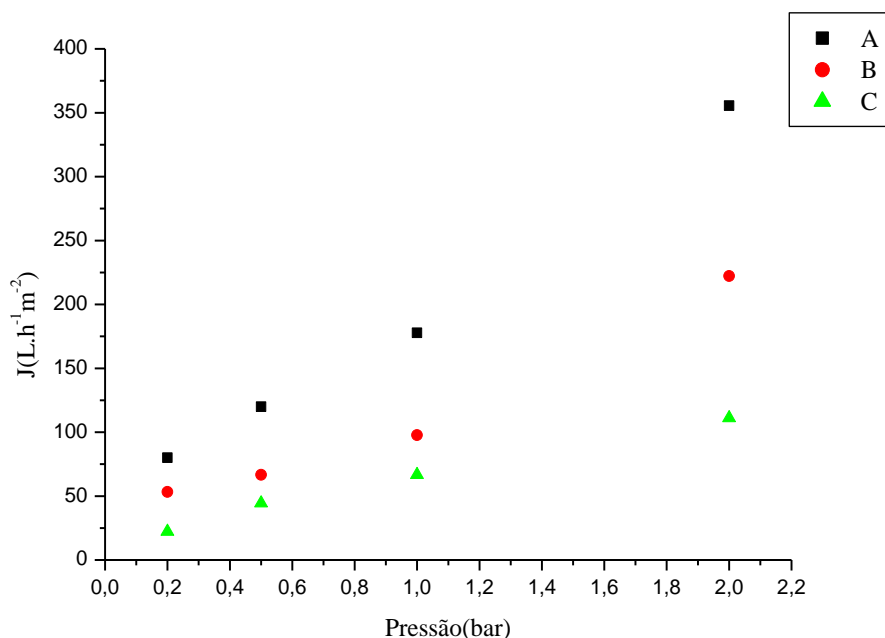
t – tempo final de cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $X_f$  – concentração celular final;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em etanol;  $\rho$  - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico ( $0,511 \text{ g.g}^{-1}$ ).

**Tabela 13.** Resultados gerais obtidos nos ensaios de fermentação de *Zymomonas mobilis*, com reciclo de células através de membrana polimérica ( $S_0= 80 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 5,5,  $30^\circ\text{C}$ ), Ensaio 2.

Ensaio 2							
Bateladas	$S_0$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	t (h)	$X_f$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$\rho$ (%)
1	80,2	12	3,3	33,8	0,041	0,422	82
2	80,4	12	3,1	31,9	0,038	0,398	78
3	80,1	12	3,0	29,8	0,037	0,372	73

t – tempo final de cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $X_f$  – concentração celular final;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em etanol;  $\rho$  - rendimento em etanol em relação ao máximo teórico ( $0,511 \text{ g.g}^{-1}$ ).

Para corroborar essa informação, é apresentado, na Figura 29, o teste de permeabilidade hidráulica antes e depois das etapas de reciclo de células de *Z. mobilis* nas membranas poliméricas.



**Figura 29.** Permeabilidade hidráulica em distintas pressões de operação para o módulo de membrana polimérica antes da passagem do caldo fermentado de *Zymomonas mobilis* (A); depois do 1º reciclo celular (B); depois do 2º reciclo celular (C).

Pode ser observada a redução da permeabilidade hidráulica com a passagem das células na membrana (Figura 29). Depois do primeiro reciclo de células, ocorreu a redução de 38% na permeabilidade de água na membrana e, após o segundo reciclo, foi constatada a redução de 69%. Entretanto, a diminuição do fluxo após a passagem das células de *Z. mobilis* foi menos acentuada que a obtida com a cerâmica, possivelmente devido à diferença do tamanho dos poros.

Foi realizado o balanço de massa do material que permeou nas membranas poliméricas, proporcionando a quantificação das células de *Z. mobilis* que permaneceram aderidas na estrutura. O balanço de massa do processo é apresentado na Tabela 14.

**Tabela 14.** Balanço de massa de células de *Zymomonas mobilis* na permeação pela membrana polimérica

<b>Reciclo</b>	<b>M entra</b>	<b>M permeado</b>	<b>M concentrado</b>	<b>M acumulado</b>
1	0,35g/h	0	0,06g/h	0,29g/h
2	0,32g/h	0	0,075g/h	0,24g/h

M entra – massa de células a serem permeadas, M permeado - massa de células que permearam na membrana cerâmica, M concentrado - massa de células que retornaram ao fermentador após o ciclo de filtração, M acumulado - massa de células que ficaram impregnadas na membrana cerâmica.

Nos reciclos efetuados com as membranas poliméricas foi observado o acúmulo de cerca de 80% das células, isto é, 80% das células que permearam através das membranas permanecem aderidas a estrutura da mesma e não foram removidas pela simples passagem de água. Esse resultado comprova que a estrutura das membranas poliméricas foi mais suscetível ao *fouling*, resultante da agregação das células de *Z. mobilis*, do que a estrutura cerâmica.

O *fouling* foi calculado, de acordo com Monttari *et al.* (2006), conforme apresentado na equação 10, correspondendo, para o caso das membranas poliméricas, de 38% e 69%.

Amaral *et al.* (2013) em estudos de filtração de efluente têxtil com membranas poliméricas da PAM membranas de poli(imida), com tamanho de poro de 0,5  $\mu\text{m}$  e área de 0,05  $\text{m}^2$ , destacaram a obtenção de permeabilidade de 127,6  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}$ . Os autores relataram a ocorrência de 75% de incrustações irreversíveis nas membranas,



além de retenção de 99% do efluente nas fibras das membranas, produzindo permeado com baixa concentração de sólidos.

Lee *et al.* (2013), em estudo sobre o *fouling* em membranas cerâmicas e poliméricas de microfiltração concluíram que existem diferenças críticas nestes processos de microfiltração. O *fouling* nas membranas poliméricas é mais irreversível que nas membranas cerâmicas, possivelmente devido a maior natureza hidrofílica das membranas cerâmicas. Os autores afirmaram que a maior parte das incrustações verificadas em membranas poliméricas só pode ser removida por ação de limpezas químicas.

Nas condições avaliadas, foi verificada a possibilidade de utilização de membranas associadas a bioprocessos. Neste estudo, as etapas de reciclo de células e separação de etanol de cultivos de *Z. mobilis* foram mais eficientes com a utilização de membranas cerâmicas de microfiltração.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, listam-se as conclusões abaixo.

Para a ativação celular de *Z. mobilis*, o emprego de meio contendo extrato de levedura purificado proporciona a obtenção de maior densidade celular em menor tempo de cultivo. Nestas condições, o teor de células definido para a ativação das células é 10% (v/v).

Na avaliação do percentual de inóculo empregado nos cultivos em batelada, a melhor condição é o emprego de 15% (v/v) de suspensão celular, sem a prévia separação celular por centrifugação.

Na etapa de fermentação de *Z. mobilis*, o meio formulado com 80 g.L<sup>-1</sup> de glicose favorece a produção de biomassa e de etanol em menor tempo de processo.

Para o reciclo de células através de centrifugação, realizada após a etapa fermentativa, se obtém o aumento da biomassa entre os cultivos realizados. Entretanto, é observada a redução da atividade das enzimas, possivelmente devido aos danos que a força de cisalhamento causa na estrutura celular de *Z. mobilis* durante o processo de centrifugação.

No reciclo de células através de bateladas por cortes, a manutenção de 15% (v/v) do volume dentro do reator é a melhor condição em termos de aumento de biomassa entre as bateladas

Com ambas as membranas, cerâmica e polimérica, é possível a obtenção do caldo permeado isento de células, podendo ser usadas como alternativas à etapa de separação tradicionalmente efetuada por centrífugas.

Nas condições testadas, é verificado o aumento da biomassa com a utilização da membrana cerâmica. Esse fato pode ser explicado pela dificuldade de retirada das células concentradas nas membranas poliméricas, em função da estrutura de fibras ocas.

Através dos testes de balanço de massa e *fouling* percentual, nas condições testadas, é possível concluir que a incrustação presente no módulo para membranas cerâmicas tubulares foi predominantemente decorrente do *fouling* irreversível.

Quanto à bioprodução de ácido lactobiônico e sorbitol com o emprego de células provenientes de reciclo celular de processos envolvendo membranas cerâmicas, os dados indicam a necessidade de maiores estudos sobre os efeitos da etapa de permeação sobre a atividade catalítica de GFOR/GL.

Como perspectivas para os trabalhos futuros, salienta-se a utilização de outros tipos de membranas de microfiltração cerâmicas, poliméricas ou ainda, de outras composições e com características distintas das empregadas neste trabalho para a concentração de biomassa e separação de etanol em cultivos de *Z. mobilis*.

Também sugere-se a avaliação do controle da temperatura no processo de permeação por membranas para minimizar os efeitos sobre a ação catalítica de GFOR/GL, uma vez que tem influência direta na etapa de síntese de ácido lactobiônico e sorbitol, a partir de lactose e frutose, respectivamente, com células/enzimas previamente concentradas em membranas de microfiltração.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M. C. S.; ANDRADE, L. H.; LANGE, L. C.; BORGES, C. P. Avaliação do emprego de microfiltração para remoção de fibras do efluente de branqueamento de polpa celulósica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Belo Horizonte, 18(1):65-74, 2013.

BAKER, R. **Membrane technology and applications**. Wiley: John Wiley & Sons, 2004.

BARROS, M.; VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. C. Estudo da concentração do inóculo inicial visando à produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* ATCC29191 em meio de sacarose. **In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, Florianópolis, 2003.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, 25:5-38, 2007.

BELTER, A.; CUSSTER, L.; HU, S. Bioseparation: downstream processing for technologies. **United States of America: John Wiley & Sons**, 368p, 1988.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Biotecnologia: tecnologia das fermentações**. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda, 28 p., 1975.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; KINNEARY, J. F., eds. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12th ed., Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, p.757, 5352, 8871, 1996.

CLEBSCH, D. P.; FURIGO, A.; SILVEIRA, M. M. Influência do teor de inóculo e da concentração de substrato na produção de glicose-frutose oxidoreductase por linhagem floculante de *Zymomonas mobilis*, **In: XI Simpósio Nacional de Fermentações**, São Paulo, 1996.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase de *Kluyveromyces lactis***. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CARRA, S.; CONCATTO, K.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Cinética da ação de glicose-frutose oxidoreductase e glucono-lactonase de *Zymomonas mobilis* na presença de diferentes carboidratos. **In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, Florianópolis, 2003.

CARRA, S. **Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis***. 147f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

CARRA, S.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Cinética do cultivo de *Zymomonas mobilis* em meios com diferentes concentrações de extrato de levedura. **In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Curitiba, 2007.

CARSTENSEN, F.; APEL, A.; WESSLING, M. In situ product recovery: submerged membranes vs. external loop membranes. **Journal of Membrane Science**, 394-395:1-36, 2012.

CHUN, U. H.; ROGERS, P. L. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 29(1):19-24, 1988.

COUTINHO FILHO, U. **Engenharia bioquímica**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Apostila, 2007.

DA SILVA, M. **Biorreatores com membranas: uma alternativa para o tratamento de efluentes**. 196 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

DIEL, J. L.; TESSARO, I. C.; MORCELLI, A. S.; CASSINI, A. S.; SILVA, M. K. Caracterização de membranas cerâmicas tubulares. **In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Foz do Iguaçu, p.8211-8220, 2010.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. London: Ed Academic Press Ltda, 439 p., 1997.

EBRAHIMI, M.; PLACIDO, L.; ENGEL, L.; ASHAGHI, K. S.; CZERMAK, P. A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Desalination**, 250(3):1105–1108, 2010.

ERNANDES, F. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 167f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia e Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, São Paulo, 2009.

ERZINGER, G. S. **Influência da concentração de glicose e de etanol sobre a atividade de glicose-frutose oxirredutase em *Zymomonas mobilis* ATCC 29191**. 99f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ERZINGER, G. S.; SILVEIRA, M. M.; LOPES DA COSTA, J. P. C.; VITOLO, M.; JONAS, R. Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34:329-333, 2003.

FERNANDES, D. Avaliação do uso de módulo de membrana cerâmica em processos fermentativos para a separação de etanol e concentração de biomassa de *Zymomonas mobilis*. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Caxias do Sul: 2013.

FERRAZ, H. C.; BORGES, C.P.; ALVES, T. L. M. Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 89:43-53, 2000.

GIORNO, L.; CHOJNACKA, K.; DONATO, L.; DRIOLI, E. Study of a cell-recycle membrane fermentor for the production of lactic acid by *Lactobacillus bulgaricus*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 41:433-440, 2002.

GREEN, B. After 30 year the future of hydroxyacids. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 4:44-45, 2005.

GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **International Dairy Journal**, 26(2):103-111, 2012.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda. 3. ed, 180p., (Série Escola Piloto em Engenharia Química COPPE/UFRJ), 2006.

HASHINO, M.; HIRAMI, K.; ISHIGAMI, T.; OHMUKAI, Y.; MARUYAMA, T.; KUBOTA, N.; MATSUYAMA, H. Effect of kinds of membrane materials on membrane fouling with BSA. **Journal of Membrane Science**, 384:175-165, 2011.

HWANG, K. J.; YU, C. Model development for estimating microfiltration performance of bio-ethanol fermentation broth. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 823:1-8, 2014.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. Terminology for Membranes and Membrane Processes. **Journal of Membrane Science**, 120:149-159, 1996.

JONAS, R.; SILVEIRA, M. M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 118:321-336, 2004.

JULBE, A.; FARRUSSENG, D.; GUIZARD, C. Porous ceramic membranes for catalytic reactors - overview and new ideas. **Journal of Membrane Science**, 181:3-20, 2001.

ZHANG, K.; HUIYUAN, G.; ZEBAO, R.; YUESHENG, L.; YONGDAN, L. Preparation of thin palladium composite membranes and application to hydrogen/nitrogen separation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 15(5):643-647, 2007.

KESAVA, S.; RAKSHIT, K.; PANDA, T. Production of ethanol by *Zymomonas mobilis*: the effect of batch step-feeding of glucose and relevant growth factors. **Process Biochemistry**, 30:41-47, 1995.

KIM, I.; KIM, S. Development of polymeric nanoparticulate drug delivery systems: evaluation of nanoparticles based on biotinylated poly(ethylene glycol) with sugar moiety. **International Journal of Pharmaceutics**, 257:1995-203, 2003.

KIM, I. S.; KIM, S.H. Development of a polymeric nanoparticulate drug delivery system: In vitro characterization of nanoparticles based on sugar-containing conjugates. **International Journal of Pharmaceutics**, 245:67-73, 2002.

KIM, T.H.; PARK, I.K.; NAH, J.W.; CHOI, Y.J.; CHO, C.S. Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. **Biomaterials**, 25(17):3783-3792, 2004.

KOKA, R.; MEHNERT, D. W.; FRITSCH, R.J.; STEFFAN, W.; HABERMEIER, P.; BRADBURY, A. G. W.; POMBO, A. W.; ROSE, M.; LYNGLLEV, G. B.; HANSEN, H. P. H. Processo para fabricar um produto de queijo contendo ácido lactobiônico, produto de queijo, processo para fabricar um produto laticínio contendo ácido lactobiônico, queijo do processo, e, processo para preparar o queijo do processo. **Patente de Invenção**. INPI, PI0209467, Brasil, 2002.

KULOZIK, U. **New applications of membrane processes**. Germany: Boer, R. de; Jelen, P.; Puhán, Z. (Technical University of Munich, Institute for Dairy Science and Food Process Engineering). p.141-160, 1992.

KWON, S. G.; PARK, S. W.; OH, D. K. Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101:13-18, 2005.

KRSTIC, D, *et al.* The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution **Biochemical Engineering Journal**, 33:10-15, 2007.

LEE, S. J.; DILAVAR, M.; PARK, P. K.; KIM, J. H. Comparative analysis of fouling characteristics of ceramic and polymeric microfiltration membranes using filtration models. **Journal of Membrane Science**, 432:97-105, 2013.

LEMONS, E.; STRADIOTTO, N. **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 1072p, 2012.

LEPE S., LEAL, J., IÑIGO B. **Microbiologia Enológica – Fundamentos de vinificación**. 2° e 3° edición. Madrid: Mundi Prensa, 1992.

LIMA, G. A; SANTANA, M. F; SOUZA, R. R. Otimização do processo de recuperação e concentração da bromelina utilizando membranas cerâmicas. **Scientia Plena**, 11, 2009.

LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular**. 158 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

LIU, L.; LIU, S.; TAN, X. Zirconia microbial hollow fiber bioreactor for *Escherichia coli* culture. **Ceramics International**, 36:2087–2093, 2010.

LIU, Y.; LIU, D. Kinetic study on glycerol production by repeated batch fermentation using free *Candida krusei*. **Process Biochemistry**, 39:1507–1510, 2004.

LOOS, H.; KRAMER, R.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence from a physiological function of glucose- fructose oxidoreductase in osmoprotection. **Journal of Bacteriology**, 176:7688-7693, 1994.

LU, Z.; WEI, M.; YU, L. Enhancement of pilot scale production of L(+)-lactic acid by fermentation coupled with separation using membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, 47:410-415, 2012.

MALVESSI, E.; CARRA, S.; PASQUALI, F. C.; KERN, D. B.; SILVEIRA, M. M.; AYUB, M. A. Z. Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 40:1-40, 2013.

MALVESSI, E.; CARRA, S.; SILVEIRA, M. M.; AYUB, M. A. Z. Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase/glucono- $\delta$ -lactone present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, 51:1-6, 2010.



MALVESSI, E.; CONCATTO, K.; CARRA, S.; SILVEIRA, M. M. Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49:139-144, 2006.

MALVESSI, E. **Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis***. 2008. 210 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MANTTARI, M.; VIITIKKO, K.; NYSTROM, M. Nanofiltration of biologically treated effluents from the pulp and paper industry. **Journal of Membrane Science**, 152-160:1-2, 2006.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, 24(4):532-535, 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31:426-428, 1959.

Miranda, S.; Henriques, P.; Monteggia, O. A full-scale UASB reactor for treatment of pig and cattle slaughterhouse wastewater with a high oil and grease content. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 22:601-610, 2005.

MIYAMOTO, Y., OOI, T. & KINOSHITA, S. Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas* sp. LS13-1. **Biotechnology Letters**, 22:427-430, 2000.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. 2. ed, 564p. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.

MURAKAMI, H.; SEKO, A.; AZUMI, M.; UESHIMA, N.; YOSHIKUNI, H.; NAKANO, H.; KITAHATA, S. Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. **Journal of Applied Glycoscience**, 50:117-120, 2003.

MURAKAMI, H.; SEKO, A.; AZUMI, M.; KISO, T.; KIRYU, T.; KITAHATA, S.; SHIMADA, Y.; NAKANO, H. Microbial conversion of lactose to lactobionic acid by resting cells of *Burkholderia cepacia*. **Journal of Applied Glycoscience**, 53:7-11, 2006.

NIDETZKY, B.; FURLINGER, M.; GOLLHOFER, D.; SCOPES, R. K.; HALTRICH, D.; KULBE, K. D. Improved operational stability of cell-free glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* for the efficient synthesis of sorbitol and gluconic acid in a continuous ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 53:623-629, 1997.

NORDKVIST, M.; NIELSEN, P. M.; VILLADSEN, J. Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. **Biotechnology and Bioengineering**, 97(4):694-707, 2007.

NOWAK, J. Ethanol yield and productivity of *Zymomonas mobilis* in various fermentation methods. **Journal of Polish Agricultural Universities**, 2000.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcóolica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PALHA, M. A. P. F.; LOPES, C. E.; LIMA, M. A. G. A.; JUNIOR, N. P. The influence of centrifugation on *Zymomonas mobilis* aggregation. **Electronic Journal of Biotechnology**, 5(3):272-278, 2002.

PURCHAS, D. B. **Filter Media Membranes**. Oxford: Elsevier Science e Technology Books, 577 p., 1996.

RITTER, C. E. **Produção de celulase e xilanases por *Penicilium echinulatum* em processo submerso utilizando biorreatores de mistura completa e airlift de circulação interna**. . 154 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, D. E.; PARADA, J. L.; MEDEIROS, A. B. P.; CARVALHO, J. C.; LACERDA, L. G.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, C. R. Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, 48:374–379, 2013.

SATORY, M.; FÜRLINGER, M.; HALTRICH, D.; KULBE, K.D.; PITTNER, F.; NIDETZKY, B. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in a membrane reactor. **Biotechnology Letters**, 19(12):1205-1208, 1997.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, vol. 2, 2001.

SHORROCK, C. J.; BIRD, M. R. Membrane cleaning: chemically enhanced removal of deposits formed during yeast cell harvesting. **Department of Chemical Engineering, University of Bath**, Bath, UK, v. 76, Part C, March 1998.

SILVA, V. R.; SCHEER, A. P. Estudo do processamento por microfiltração de soluções aquosas de pectina em membranas cerâmicas. **Acta Scientiarum Technology**, 33(2):215-220, 2011.

SILVEIRA, M. M.; MALVESSI, E.; CARRA, S.; PASQUALI, F. C.; POLIDORO, T. A. Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácidos orgânicos ou seus sais, preparação de elevada pureza isomérica de ácidos orgânicos ou seus sais. **Patente de Invenção**. INPI, PI 0700421-4, Brasil, 2007.

SILVEIRA, M. M.; JONAS, R. The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59:400-408, 2002.

STRÖHER, A. P.; MENEZES, M. L.; CAMACHO, F. P.; PEREIRA, N. C. Tratamento de efluente têxtil por ultrafiltração em membrana cerâmica. **Exacta, Belo Horizonte**, 5(1):39-44, 2012.

STRUCH, T.; BURKARD, N.; BRINGER- MEYER, S.; SAHAM, H. Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 34:518-523, 1991.

STRUCH, T.; NEUSS, B.; BRINGER- MEYER, S.; SAHAM, H. Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 23:201-211, 1991.

SUMIMOTO, R.; KAMADA, N. Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. **Transplantation Proceedings**, 22:2198-2199, 1990.

SUMIMOTO, R.; JAMIESON, N. V.; KAMADA, N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. **Transplantation**, 50:573-576, 1990.

SUZUKI, T.; SATO, T.; KOMINAMI, M. A dense cell retention culture system using a stirred ceramic membrane reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 44:1186-1192, 1996.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**. 41:1-46, 1977.

TASIC-KOSTOV, M.; PAVLOVIC, D.; LUKIC, M.; JAKSIC, I.; ARSIC, I.; SAVIC, S. Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside-based topical emulsions: the colloidal structure, stability and efficacy evaluation. **International Journal of Cosmetic Science**, 34(5):424-34, 2012.

TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, 80:662-667, 2007.

VIKARI, L. By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Technical Research Centre of Finland**, 27:3-29, 1986.

VIIKARI, L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, 7:237-261, 1988.

VIIKARI, L. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 20(2):118-123, 1984.

VOGEL, R. Sorbitol. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Wiley-VCH**, Weinheim, 34:492-498, 2003.

XU, T.J.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermenters. **Enzyme and Microbial Technology**, 37:634-640, 2005.

ZACHARIOU, M; SCOPES, R K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **Journal of Bacteriology**. 3:863-869, 1986.

WALLBERG, O.; JONSSON, A.; WIMMERSTEDT, R. Ultrafiltration of kraft black liquor with a ceramic membrane. **Desalination**, 145-153:1-3, 2003.

WISBECK, E.; SILVEIRA, M. M.; NINOW, J.; JONAS, R. Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. **Journal of Basic Microbiology**, 6:445-449, 1997.

YU, J. R; VAN SCOTT, E. J. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 3:76-87, 2004.