

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ASPECTOS DA UTILIZAÇÃO DE *Zymomonas mobilis*
Z1-81 FLOCULANTE NA PRODUÇÃO DE ETANOL
E GLUCOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE**

DANIEL PAULO CLEBSCH

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química

Orientador : Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Co-Orientador : Dr. Maurício Moura da Silveira.

FLORIANÓPOLIS

1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ASPECTOS DA UTILIZAÇÃO DE *Zymomonas mobilis*
Z1-81 FLOCULANTE NA PRODUÇÃO DE ETANOL
E GLUCOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química .

Orientador : Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

Co-Orientador : Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira.

DANIEL PAULO CLEBSCH

FLORIANÓPOLIS, 1998

**ASPECTOS DA UTILIZAÇÃO DE *Zymomonas mobilis* Z1-81
FLOCULANTE NA PRODUÇÃO DE ETANOL E DE GLUCOSE-
FRUTOSE OXIDORREDUTASE**

Por

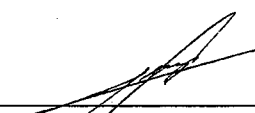
Daniel Paulo Clebsch

Essa dissertação foi julgada para a obtenção do título de

Mestre em Engenharia Química,

área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos,**

e aprovada em sua forma final pelo curso de Pós-graduação



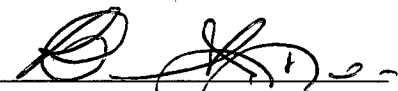
Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

Orientador



Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

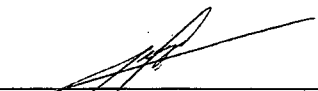
Co-orientador



Prof. Dr. Humberto Jorge José

Coordenador do Curso de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSC

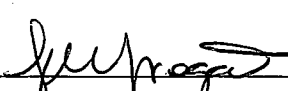
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior



Dr. Maurício Moura da Silveira



Profª Dra. Gláucia M. F. de Aragão



Profª Dra. Lorena B. Tavares

Florianópolis (SC), setembro de 1998

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Agenor Furigo Jr. pela orientação prestada durante a realização e na conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Maurício Moura da Silveira, um agradecimento especial por todo o empenho, motivação e auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

À Diretoria do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, em especial Dr. Rainer Jonas, pela oportunidade de desenvolver o trabalho experimental neste local, meus sinceros agradecimentos.

A minha esposa, Ivy, por todo o empenho e apoio nas horas de dificuldades e a sempre presença ao meu lado motivando e estimulando a realização deste trabalho.

Aos colegas do grupo de trabalho, Elisabeth, Gilmar, Patrick, Marília, Adriane, José Paulo, Paulo Ivo, pela atenciosa colaboração e companheirismo, o meu muito obrigado.

Agradeço aos demais colegas e funcionários do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico e da Universidade Federal de Santa Catarina, que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Meus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

RESUMO

Zymomonas mobilis é um microorganismo muito conhecido pela sua capacidade e velocidade de produção de etanol. Essa bactéria apresenta-se, também, como uma alternativa viável para a obtenção de sorbitol, em substituição ao processo químico tradicional que envolve altas pressões e temperaturas. O processo de produção de sorbitol a partir de glucose e frutose, com *Zymomonas mobilis* resulta ainda na produção de ácido glucônico como co-produto. Com pequenas variações, o processo é realizado basicamente, em duas fases: (i) obtenção de massa celular, com alta atividade enzimática, e sua concentração por centrifugação e (ii) biotransformação de glucose e frutose em ácido glucônico e sorbitol. O interesse em linhagens de *Zymomonas mobilis* com capacidade de floculação deve-se ao apelo econômico da substituição das etapas de centrifugação por decantação natural quando da aplicação industrial do processo.

O objetivo do presente trabalho é estudar aspectos do processo de produção da linhagem floculante de *Zymomonas mobilis* Z1-81 e seus produtos: a enzima glucose-frutose oxidoredutase (GFOR) e etanol, a partir de glucose, visando e contribuindo para o melhoramento do processo e sua melhor aplicabilidade industrial.

Devido ao caráter floculante do microorganismo e conseqüente não homogeneidade das suspensões celulares dentro do biorreator, desenvolveu-se uma metodologia de retirada de amostras que possibilita a obtenção de dados cinéticos de crescimento celular. O índice de floculação mostra ser dependente do cisalhamento provocado pela agitação.

Avaliou-se a influência da concentração inicial de glucose sobre os produtos desejados, etanol e GFOR, em ensaios descontínuos. A atividade específica de GFOR aumenta com o aumento da concentração de glucose. Para concentrações de glucose acima de 200 g/L há uma drástica queda da atividade global da enzima GFOR, devido à um menor crescimento celular. A produtividade em GFOR e a conversão de glucose a etanol não variam de maneira substancial para concentrações iniciais de glucose menores que 150 g/L (2,5 – 2,8 U/(L.h) e 0,46 – 0,49 g/g, respectivamente). A produtividade em etanol apresenta seus valores máximos para concentrações iniciais de glucose em torno de 150 g/L, obtendo-se aproximadamente 5 g/(L.h) de etanol. A produtividade em GFOR, bem como a produtividade em etanol, também caem drasticamente para concentrações iniciais de glucose maiores que 200 g/L.

Aspectos tais como: o cultivo em batelada alimentada do microorganismo para diminuição da inibição, desenvolvimento do inóculo e influência da concentração inicial de células, grau de floculação, alternativas econômicas para a substituição do extrato de levedura e a modelagem do crescimento celular e formação de produtos também são abordados e discutidos no trabalho.

Conclui-se que a utilização da enzima glucose-frutose oxidoredutase sem nenhuma etapa de purificação é viável atingindo conversão de glucose e frutose a, respectivamente, ácido glucônico e sorbitol da ordem de 97 % nos testes de biotransformação.

ABSTRACT

Zymomonas mobilis is a well known microorganism in its capacity and velocity of ethanol production. This bacteria is shown as a viable alternative for the traditional chemical sorbitol production that involves high pressure and temperature. This proposed way of sorbitol production from glucose and fructose with *Zymomonas mobilis*, results in the production of gluconic acid as a by-product. This process, with small variations is made basically, in two steps: (i) production of the cell mass, with high enzymatic activity, and concentration by centrifugation and (ii) bioconversion of glucose and fructose to gluconic acid and sorbitol. The interest of use strains of *Zymomonas mobilis* flocculant is due to the economic point of view, in which it is possible to substitute the centrifugation step for the natural settling of the flocs when used in an industrial scale.

The objective of this work is to study some aspects of the production process of the flocculant strain of *Zymomonas mobilis* Z1-81 and its products: the enzyme Glucose-Fructose Oxidoreductase (GFOR) and Ethanol, from glucose, aiming for the improvement of the process and its industrial applicability.

Due to the flocculant characteristic of this microorganism there is no homogeneity of the cell suspension in the bioreactor, therefore, a methodology for the sampling was developed that allowed to obtain kinetic data for cell growth. The flocculation fraction (if) shows to be dependent on the shear of the agitator.

The influence of the initial concentration of glucose on the desired products, GFOR and ethanol were evaluated in batch fermentations. The specific activity of GFOR increase with the increase of the initial concentration of glucose. For initial concentration of glucose above 200 g/L global activity goes down drastically, because of a low cell growth. The productivity of GFOR and the conversion of glucose to ethanol do not change substantially for initial glucose concentration below 150 g/L (2,5 - 2,8 (U/L.h) and 0,46 - 0,49 g/g, respectively). The productivity in ethanol shows its maximum value for initial glucose concentration close to 150 g/L, obtaining approximately 5 g/(L.h) of ethanol. The productivity in GFOR, as the ethanol productivity, goes down drastically for initial concentration of glucose above 200 g/L.

Aspects involving: fed-batch process to avoid inhibition with glucose, development of the inoculum step and the influence of the initial cell concentration, the flocculation fraction, economical alternatives for the yeast extract and a modeling of the cell growth and product formation are discussed in this work.

Finally, the utilization of glucose-fructose oxidoreductase without any purification is a viable way to produce sorbitol and gluconic acid from fructose and glucose respectively, reaching a yield close to 97 %.

ÍNDICE

NOMENCLATURA	i
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
II.1. MICROORGANISMO	5
II.2. FLOCULAÇÃO	6
II.3. CONDIÇÕES AMBIENTAIS	7
II.3.1. Características do floco e sedimentação	7
II.4. FATORES QUE AFETAM O PROCESSO FERMENTATIVO	10
II.4.1. Temperatura	10
II.4.2. pH	11
II.4.3. Meio de crescimento	11
II.4.4. Concentração inicial de substrato	12
II.4.5. Concentração de etanol	13
II.5. GLUCOSE FRUTOSE OXIDORREDUTASE	17
II.6. SORBITOL E ÁCIDO GLUCÔNICO: PRODUÇÃO E APLICAÇÕES	20
II.6.1. SORBITOL	20
II.6.1.1. Produção convencional	20
II.6.1.2. Aplicações	21
II.6.2. ÁCIDO GLUCÔNICO	21
II.6.2.1. Produção convencional	22
II.6.2.2. Aplicações	23
II.6.3. PRODUÇÃO POR <i>Zymomonas mobilis</i>	23

III. MATERIAL E MÉTODOS	27
III.1. MICROORGANISMO	28
III.2. MEIO DE CULTURA	28
III.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	29
III.3.1. Coleta e preparo das amostras	29
III.3.2. Concentração celular	30
III.3.3. Concentração de glicose	31
III.3.4. Atividade enzimática	32
III.3.5. Concentração de etanol	32
III.3.6. Ácido glucônico	33
III.3.7. Concentração dos açúcares na biotransformação	36
III.4. ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO	37
III.4.1 Preparo do inóculo	38
III.4.2. Ensaio em regime descontínuo	38
III.4.3. Ensaio em regime Batelada Alimentada	39
III.4.4. Ensaio de biotransformação	39
III.5. METODOLOGIA UTILIZADA NOS CÁLCULOS	40
III.5.1. Índice de floculação	40
III.5.2. Atividade enzimática	40
III.5.2.1. Atividade específica	40
III.5.2.2. Atividade global	40
III.5.3. Rendimentos	41
III.5.3.1. Etanol	41
III.5.3.2. Sorbitol e ácido glucônico	41
III.5.4. Fatores de conversão	42
III.5.5. Produtividades	44
III.5.6. Velocidades específicas	46

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
IV.1. OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	49
IV.2. PRODUÇÃO DE GLUCOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE	56
IV.3. DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE CULTIVO DO INÓCULO	62
IV.4. ALTERNATIVAS ECONÔMICAS DE PRODUÇÃO DA ENZIMA GFOR	65
IV.5. ENSAIOS EM REGIME DE BATELADA ALIMENTADA	69
IV.6. SIMULAÇÃO DA CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO	74
IV.7. BIOTRANSFORMAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE EM ÁCIDO GLUCÔNICO E SORBITOL	81
V. CONCLUSÕES	84
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO-RESULTADOS EXPERIMENTAIS	96

NOMENCLATURA

A	atividade específica de glucose-frutose oxidorreductase	(U/g)
A _i	atividade específica de glucose-frutose oxidorreductase no início da alimentação	(U/g)
A _{GF}	atividade global de células floculantes	(U/L)
A _{GT}	atividade global de células totais	(U/L)
ag _o	concentração inicial de ácido glucônico	(g/L)
ag _f	concentração final de ácido glucônico	(g/L)
dE/dt	velocidade de formação de etanol	(g/L.h)
dS/dt	velocidade de consumo de substrato	(g/L.h)
dX/dt	velocidade de crescimento de células totais	(g/L.h)
E , P	concentração de etanol	(g/L)
Esat	concentração de etanol na saturação	(g/L)
F _o	massa inicial de frutose	(g)
F _f	massa final de frutose	(g)
G _o	massa inicial de glicose	(g)
G _f	massa final de glicose	(g)
if	índice de floculação	(%)
K _m	constante de Michaelis-Menten para glicose-frutose oxidorreductase	(g/L)
p	produtividade em etanol	(g/L.h)
P _o	concentração inicial de etanol	(g/L)
P _f	concentração final de etanol	(g/L)
pA _{GF}	produtividade em atividade enzimática global nas células floculantes	(U/L.h)
pA _{GT}	produtividade em atividade enzimática global nas células totais	(U/L.h)
p _{ag}	produtividade específica em ácido glucônico	(g/g.h)
p _{sor}	produtividade específica em sorbitol	(g/g.h)
pX _F	produtividade em células floculantes	(g/L.h)
pX _L	produtividade em células livres	(g/L.h)
pX _T	produtividade em células totais	(g/L.h)
R	rendimento em etanol	(%)
R _{ag}	rendimento em ácido glucônico	(%)
R _{sor}	rendimento em sorbitol	(%)

S	concentração de glicose	(g/L)
S _o	concentração inicial de glicose	(g/L)
S _f	concentração final de glicose	(g/L)
Sor _o	massa inicial de sorbitol	(g)
Sor _f	massa final de sorbitol	(g)
t	tempo de fermentação	(h)
U	unidades de glicose-frutose oxidoredutase	(g/h)
V _{máx}	velocidade máxima de reação para glicose-frutose oxidoredutase	(U/g)
X _{Fo}	concentração inicial de células floculantes	(g/L)
X _{Ff}	concentração final de células floculantes	(g/L)
X _F	massa de células floculantes	(g)
X _{Lo}	concentração inicial de células livres	(g/L)
X _{Lf}	concentração final de células livres	(g/L)
X _{To}	concentração inicial de células totais	(g/L)
X _{Tf}	concentração final de células totais	(g/L)
Y _{AGF/S}	conversão de glicose em atividades enzimática global nas células floculantes	(U/g)
Y _{AGT/S}	conversão de glicose em atividade enzimática global nas células totais	(U/g)
Y _{ag/G}	conversão de glicose em ácido glucônico	
Y _{P/S}	conversão de glicose em etanol	
Y _{sor/F}	conversão de frutose em sorbitol	
Y _{XF/S}	conversão de glicose em células floculantes	
Y _{XL/S}	conversão de glicose em células livres	
Y _{XT/S}	conversão de glicose em células totais	
μ _P	Velocidade específica de produção de etanol	(h ⁻¹)
μ _S	velocidade específica de consumo de substrato	(h ⁻¹)
μ _X	velocidade específica de crescimento	(h ⁻¹)
μ _{Xmáx}	máxima velocidade específica de crescimento das células totais	(h ⁻¹)

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Diante da crescente necessidade da procura de opções denominadas “ecologicamente corretas” para a industrialização de produtos, diversos trabalhos vêm sendo realizados para a substituição de processos químicos. Estes processos, muitas vezes perigosos, normalmente envolvem altas temperaturas e pressões, e a formação de subprodutos indesejáveis.

A produção convencional de sorbitol é realizada através de processo químico pela hidrogenação catalítica de xarope de glucose. Este processo envolve temperaturas e pressões altas e uso de catalisadores, o que implica em custos elevados de instalação e purificação do produto. O presente trabalho visa contribuir para a alternativa de produção de sorbitol e ácido glucônico por processos biotecnológicos.

Zymomonas mobilis, já há quase duas décadas, vem sendo utilizada para a produção de etanol em fermentações com glucose como única fonte de carbono. O grande interesse da produção de etanol por essa bactéria, em substituição aos processos tradicionais com leveduras, é devido à velocidade de produção de etanol, que pode, em alguns casos, ser até duas vezes superior à da levedura. Porém, procurando utilizar outras fontes de carbono como sacarose e frutose, com o objetivo de minimizar os custos relativos à glucose, verifica-se a formação de quantidades maiores de subprodutos como levana, sorbitol e ácido glucônico.

A formação de ácido glucônico e sorbitol ocorre através da ação de duas enzimas, glucose-frutose oxidoreductase (GFOR) e gluconolactonase (GL), presentes em linhagens de *Zymomonas mobilis*. O processo de biotransformação simultânea de glucose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, utilizando-se células de *Z. mobilis*, tem sido aprimorado nos últimos anos. A partir desta constatação, aumentou-se o interesse e o estudo da obtenção simultânea destes produtos por processo de biotransformação utilizando células de *Zymomonas mobilis*.

O processo é realizado, basicamente, em duas etapas: crescimento e concentração de células, por centrifugação, e biotransformação dos açúcares a sorbitol e ácido glucônico. Diferentes linhagens não floculantes de *Z. mobilis* vem sendo empregadas nestes

processos. Contudo, um dos pontos críticos do processo é a recuperação e concentração das células contendo GFOR para uso na segunda etapa (biotransformação). Numa eventual ampliação de escala, a utilização de tais métodos encareceria sobremaneira o processo.

Considerando-se a boa capacidade de floculação de certas linhagens de *Z. mobilis*, pretende-se utilizar estas cepas na produção de sorbitol e ácido glucônico de modo a substituir a centrifugação, até aqui empregada, por um método de sedimentação natural que permita reduzir custos do processo. Além disso, linhagens de *Z. mobilis* capazes de agregar-se e formar flocos, podem ser utilizadas em processos contínuos onde é possível manter uma alta concentração celular, resultando em produtividades superiores quando comparadas aos processos convencionais com linhagens não floculantes.

Neste trabalho será utilizada a linhagem floculante Z1-81 de *Zymomonas mobilis*, pois apresenta índices de floculação e valores de atividade enzimática suficientemente altos para a sua aplicação neste processo.

O objetivo do presente trabalho é estudar aspectos do processo de produção da linhagem floculante de *Zymomonas mobilis* Z1-81 e seus produtos: a enzima Glucose-Frutose Oxidorredutase (GFOR) e etanol, visando e contribuindo para a aplicação industrial do processo.

Para tanto, foram realizados estudos sobre a influência da concentração inicial de células e da concentração inicial de glucose na atividade da enzima GFOR e, também, de inibição por excesso de glucose.

Para contornar dificuldades experimentais foram realizados desenvolvimentos no processo de cultivo de inóculo e, também, na metodologia de amostragem das células.

Análises de alternativas para a substituição do extrato de levedura por matérias primas mais baratas e de utilização de modelos cinéticos foram realizados e visaram abordar diversas frentes da engenharia para colaborar na otimização econômica e operacional do processo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 MICROORGANISMO

Microrganismo do gênero *Zymomonas* são bactérias gram-negativas, anaeróbias, sem capacidade de esporulação, pertencentes à família *Pseudomonadaceae*. Estas bactérias normalmente são encontradas em extratos de plantas tropicais, principalmente em cana-de-açúcar (SWINGS e DE LEY, 1977; VIIKARI, 1986a). Possuem de 1 a 6 µm de comprimento e 1 a 1,5 µm de largura. Comparando-se *Z. mobilis* com outras bactérias anaeróbias, esta é relativamente insensível ao oxigênio (VIIKARI, 1986a).

Este gênero apresenta somente uma espécie com duas subespécies: *Z. mobilis* subespécie *mobilis* e *Z. mobilis* subespécie *pommacii* (KRIEG & HOLT, 1984; LAWFORD et al., 1982).

Algumas linhagens de *Z. mobilis* apresentam formas agregadas com poder de floculação, células em cadeia, células curvas ou filamentosas (VIIKARI, 1986a).

A bactéria gram-negativa *Zymomonas mobilis* é utilizada e estudada como uma das mais rápidas e eficientes produtoras de etanol utilizando sacarose, glucose ou frutose como fonte única de carbono e energia (ERZINGER, 1996; WISBECK, 1995). DOELLE et al. (1993) também descrevem *Z. mobilis* como sendo uma bactéria única neste universo, utilizando sacarose, glucose e frutose na via de Entner-Duodoroff (ED), que é normalmente utilizada por organismos aeróbios como as *Pseudomonas*. *Z. mobilis* é classificado como um microrganismo anaeróbio, mesmo apresentando algumas partes estruturais que estão presentes em microrganismos aeróbios e poder crescer muito bem em condições aeróbias (PANKOVA et al., 1985).

De acordo com FALCÃO et al. (1983), linhagens gram-negativas, móveis e capazes de sintetizar o etanol são consideradas como *Zymomonas* sp. Além disto, devido à capacidade de floculação de algumas linhagens, a identificação de *Z. mobilis* torna-se mais simples.

Várias das linhagens de *Z. mobilis* utilizadas na produção de álcool foram isoladas a partir de fermentações espontâneas de mostos de caldo de cana (RODRÍGUEZ & CALLIERI, 1986; MORAIS et al., 1983). RODRÍGUEZ & CALLIERI (1986) isolaram a partir de caldo de cana uma linhagem floculante de *Z. mobilis*.

As linhagens de *Z. mobilis* apresentam uma grande tolerância ao etanol (VEERAMALLU & AGRAWAL, 1990; LEITE & FRANÇA, 1989; SAHM et al., 1986). Além disto, possuem motilidade muito grande, comparada a leveduras produtoras de etanol.

II.2 FLOCULAÇÃO

O uso de linhagens floculantes de microrganismos para recuperação de biomassa por sedimentação é uma das técnicas mais antigas de separação (LOPES et al., 1991; GALAMBRE et al., 1988). Este método de separação é utilizado em diversos processos industriais e esta habilidade é uma propriedade extremamente interessante sob o ponto de vista industrial (LEE et al., 1982; LOPEZ et al., 1993).

Pode-se destacar a utilização de processos industriais em que a recuperação de produtos é favorecida pela floculação natural da biomassa, como a produção de cerveja, produção de vinho, tratamento de águas, digestão anaeróbia e recuperação de enzimas (LOPES et al., 1991; LEE et al., 1982).

Segundo LOPEZ et al. (1993), como o processo de separação da massa microbiana de um caldo fermentativo é uma operação básica na indústria de bioprocessos, a utilização de linhagens floculantes facilita estes processos permitindo, assim, a operação de separação com procedimentos mais simples, como a técnica da gravidade, hidrociclone, centrifugação de baixa velocidade, etc.

Desta forma, com o objetivo de melhorar ou aprimorar processos já conhecidos na indústria, a utilização de microrganismos floculantes tem recebido uma atenção especial, principalmente na produção de álcool com a bactéria *Zymomonas mobilis*.

FEIN et al. (1983) obtiveram um mutante floculante e estável, baseado em variantes de *Z. mobilis* isoladas da natureza. A linhagem obtida pode ser utilizada como alternativa em substituição a sistemas existentes, como reciclo de células, filtração, imobilização de células, fermentadores de leito fluidizado e em processos de fermentação à vácuo. Estes processos se assemelham aos processos utilizados com leveduras (LAWFORD et al., 1982).

SCOTT (1983) descreve a utilização de um biorreator de leito fluidizado para a produção de álcool utilizando *Z. mobilis*, com reciclo de biomassa. De um modo geral as partículas ativas destes biorreatores são normalmente microrganismos imobilizados. Entretanto, de acordo com este autor, é possível a utilização de linhagens floculantes de *Z. mobilis* neste tipo de sistema, tendo como partículas ativas os flocos de microrganismos formados durante o seu crescimento. Estes flocos são suficientemente estáveis nas condições de estresse para serem usados neste tipo de biorreator, com algumas vantagens quando comparadas a processos com células não-imobilizadas, como: facilidade de “saírem” do reator em altas taxas de diluição, melhor resistência às forças de cisalhamento.

Linhagens floculantes de *Z. mobilis* são também utilizadas para a produção da enzima Glucose Frutose Oxidorredutase conforme WISBECK (1995). Neste trabalho a autora descreve a forma de recuperação da enzima (intracelular) facilitada pela sedimentação natural da bactéria.

II.3 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

II.3.1 Características do Floco e Sedimentação

Segundo LOPES et al. (1991), o tamanho do floco, a sua forma, a temperatura, a densidade do floco, a viscosidade do fluido, a interação entre os flocos na suspensão, são fatores que devem ser considerados no processo de sedimentação.

O tamanho do floco pode variar de acordo com as condições do processo e do meio de cultivo. Alguns autores reportam que o tamanho médio do floco pode variar de

1 mm, no início do processo, até um tamanho de 2-4 mm (GALAMBRE et al., 1988; RODRÍGUEZ & CALLIERI, 1986; FEIN et al., 1983).

GALAMBRE et al., 1988; LOPEZ et al., 1993 demonstraram que no cultivo de *Z. mobilis*, em reatores contínuos, a distribuição do tamanho dos flocos pode ser determinada pela velocidade de sedimentação, uma grandeza de fácil determinação.

Procurando encontrar um parâmetro de comparação para diferentes microrganismos floculantes, GALAMBRE et al. (1988) propõem a determinação da intensidade de floculação pela turbidimetria do sobrenadante, após a sedimentação, e pelo volume de flocos que sedimentam. Esta técnica é favorecida pela alta velocidade de sedimentação das linhagens floculantes de *Z. mobilis*, conforme LOPES et al. (1991).

De acordo com resultados da literatura (LOPES et al., 1991), o aumento da temperatura, variada entre 30 e 40 °C, provoca um pequeno aumento na velocidade de sedimentação. Porém, os resultados mostraram que a velocidade de sedimentação é praticamente independente do pH (variado entre 3.0 e 5.0). Contudo, como ainda demonstrado por LOPES et al. (1991), a influência do meio de crescimento no processo de sedimentação é bem mais importante do que a temperatura e o pH.

LOPEZ et al. (1993) publicaram resultados relacionados à capacidade de floculação de diferentes cepas comparadas com diferentes fontes de carbono (sacarose, glucose e frutose). Neste trabalho, os autores relatam que os flocos dos meios que continham glucose e frutose possuem uma velocidade de sedimentação maior que os flocos de meios que continham sacarose. Esta observação foi constatada para diferentes cepas a pH e temperatura constantes de 5.5 e 30 °C, respectivamente.

FEIN et al. (1983a) relatam que a condução de processos contínuos com células imobilizadas *Z. mobilis* (floculante) pode ser realizado com velocidades de agitação de baixas a moderadas, uma vez que a própria alta velocidade de diluição necessária para a condução do processo realiza parte do trabalho de mistura. A operação com menores velocidades de agitação contribuem para o acúmulo intercelular, proporcionando uma boa floculação.

Quanto à relação entre a capacidade de floculação e o meio de cultivo existem poucos trabalhos na literatura. Porém, RODRÍGUEZ & CALLIERI (1986) observaram que a ausência de íons Ca^{++} no meio de cultura favorecia a capacidade de floculação da cepa de *Z. mobilis* estudada. Contudo, a literatura ainda carece de trabalhos que relatem como induzir ou melhorar a floculação durante o processo fermentativo (WISBECK, 1995).

FEIN et al. (1983) observaram que na utilização de sistemas contínuos em processos biotecnológicos, freqüentemente ocorriam mudanças morfológicas espontâneas das células. Estas mudanças, em muitos casos, resultavam no aparecimento e acumulação de flocos no fermentador. Além disto, a formação de flocos era acompanhada de um aumento gradual da biomassa no reator, dificultando a obtenção do estado estacionário, importante na condução de um processo contínuo.

LEE et al. (1982) estudaram a produção de álcool através de *Z. mobilis* ZM401. Esta cepa, floculante, foi isolada após mutação com nitrosoguanadina (NTG). NTG foi adicionado a uma cultura de *Z. mobilis* ZM4, uma cepa não floculante, onde, após incubação foram verificadas culturas de *Z. mobilis* em forma de agregados celulares. Estes autores observaram que a utilização da cepa floculante leva a algumas vantagens no processo de produção de etanol como, altas produtividades devido ao acúmulo de células dentro do reator e a separação por sedimentação dos flocos e do produto final.

FEIN et al. (1983) realizaram fermentações em quimiostato, equipamento bastante utilizado e conhecido pela sua capacidade de selecionar mutações bacterianas e outras variações genéticas, uma mutante espontânea e estável a partir da cepa ATCC 29191. Esta nova mutante apresentava a característica antes mencionada, ou seja, formava flocos ao longo da sua fermentação. Esta nova linhagem de *Z. mobilis* recebeu o nome de WR6.

As características dos flocos formados na bactéria *Z. mobilis* são de origem ainda não totalmente esclarecida. Contudo, FEIN et al. (1983) descrevem que a bactéria em forma de bastonete é envolvida por um material extracelular com características fibrosas que tem a função de agregar as células umas às outras. Estas fibrilas que envolvem as

células floculantes de *Z. mobilis* são de provável composição celulósica. Esta conclusão foi alcançada através de hidrólise enzimática para determinar a natureza química destas fibrilas. Também, afirmam FEIN et al. (1983), muitas outras bactérias gram-negativas, como *Z. mobilis*, têm sido reportadas como capazes de sintetizar fibrilas celulósicas extracelulares que vão aparecendo junto com a formação dos flocos e a adesão célula-célula. Outros autores (ZEVENHUIZEN & DEINEMA, 1971) também relatam que a floculação de *Z. mobilis* deve estar relacionada com fibrilas celulósicas na parede celular.

Estes mesmos autores (FEIN et al., 1983) reportam ainda que, dentro dos flocos da cepa WR6, existe em volta de cada bactéria espaço suficiente para permitir a livre circulação e difusão de substratos e produtos dentro e fora dos flocos. Isto confirma as altas produtividades compatíveis com resultados obtidos em outros trabalhos com esta cepa (RODRÍGUEZ & CALLIERI, 1986, FEIN et al., 1983a) e com linhagens não floculantes.

Apesar de todos os estudos já realizados em nível molecular ou microscópico, os mecanismos de ligação célula-célula não são completamente elucidados. Macroscopicamente, não existe ainda maiores informações relacionadas à formação e evolução dos flocos (GALAMBRE, H. et al., 1988).

II.4 FATORES QUE AFETAM O PROCESSO FERMENTATIVO

II.4.1 TEMPERATURA

Segundo TORRES & BARATTI (1987), na fermentação de sacarose por *Z. mobilis*, na faixa de temperatura de 30 a 36°C, não ocorrem mudanças na cinética e nos parâmetros relacionados aos rendimentos. Para uma temperatura de 38°C, a hidrólise da sacarose é inibida sem entretanto afetar o crescimento celular. Este resultado, obtido utilizando-se a linhagem ZM4, difere quando comparado com outras linhagens, em que a temperatura interfere na concentração dos subprodutos, como levana e sorbitol.

A grande maioria dos trabalhos publicados na literatura adota uma temperatura próxima a 30°C para o cultivo de *Z. mobilis*, independentemente do meio de crescimento

e da fonte de carbono (LOPEZ et al., 1993; SCOTT, 1983; FEIN et al., 1983; SILVEIRA et al., 1995).

II.4.2 pH

TORRES & BARATTI (1987) concluíram que a utilização de um pH levemente ácido (4,0 - 5,5) proporciona melhores resultados, devido a uma melhor hidrólise da sacarose. Na grande maioria das fermentações com *Z. mobilis*, o pH utilizado é de 5,5 (ERZINGER, 1996; WISBECK, 1995; FEIN et al., 1983).

II.4.3 Meio de Crescimento

A composição do meio de cultivo varia pouco nos trabalhos encontrados na literatura. ROGERS et al., (1982), STARR et al., (1981) e TOH et al., (1993) definiram as composições dos meios de cultivo com sais de fosfato e amônio, extrato de levedura, e traços de sais de magnésio. Alguns trabalhos utilizam também pequenas quantidades de biotina e pantotenato de cálcio como fatores de crescimento (FEIN et al., 1983; LAWFORD et al., 1982).

Em alguns casos de reatores de regime contínuo para a produção de etanol, verificou-se a possibilidade de utilizar-se somente como fonte de nutriente a fonte de carbono na alimentação do processo contínuo (SCOTT, 1983; FEIN et al., 1983a), adicionando os demais nutrientes somente no período transiente do cultivo, até atingir-se a fase estacionária e iniciar-se o regime contínuo. Contudo, os resultados de produtividade obtidos mostram a necessidade e importância da alimentação também de nutrientes.

É de conhecimento geral que os microrganismos necessitam de energia, além da necessária ao crescimento, para a manutenção das suas funções como o transporte do material celular, atividade osmótica e mobilidade celular. A utilização de sistemas contínuos para a determinação da energia de manutenção é muito adequada (OLIVEIRA et al., 1992). De acordo com os resultados obtidos por estes autores, existe uma linearidade entre a velocidade específica de consumo de substrato (q_s) e a velocidade de

diluição do meio (D), o que permite a determinação do coeficiente de manutenção através de regressão linear. Estes mesmos autores concluem que para concentrações iniciais de substrato maiores, a energia necessária para manutenção é significativamente maior. A explicação para este fenômeno pode ser o aumento da pressão osmótica e da concentração de etanol no meio.

II.4.4 Concentração inicial de substrato

RODRÍGUEZ & CALLIERI (1986) realizaram vários ensaios utilizando uma linhagem floculante isolada do caldo-de-cana e comparando seus resultados com os obtidos por uma linhagem conhecida de *Z. mobilis* (a linhagem não floculante ATCC 10988). Nestes ensaios os autores verificaram a capacidade da bactéria de converter diferentes concentrações de glucose e sacarose em etanol. Quando utilizada glucose como substrato principal, em concentrações de 100 e 200 g/L, as duas linhagens apresentaram valores muito próximos de biomassa e de etanol, resultando em rendimentos praticamente idênticos. Entretanto, quando foi utilizada sacarose como fonte principal de carbono, os resultados ficaram muito favoráveis para a linhagem floculante, principalmente na concentração de 200 g/L, onde a linhagem floculante utilizou cerca de 87 % do total de sacarose, contra apenas 25 % de sacarose consumidos pela linhagem ATCC 10988. Este resultado pode indicar um maior poder de hidrólise da sacarose pela linhagem floculante e/ou um mecanismo de transporte mais eficiente, e também uma possível menor produção de subprodutos pela cepa floculante. (vide Tabela II.1)

LEE et al., (1983) compararam os resultados entre as duas cepas de *Z. mobilis*, ZM4 e ZM401. A linhagem ZM401 foi obtida após um trabalho de seleção para obtenção de uma cultura floculante. Os valores de etanol e biomassa obtidos foram praticamente iguais. Entretanto, as velocidades específicas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de glucose foram menores para a linhagem floculante. O decréscimo destas velocidades específicas, segundo os autores, é resultado do incremento da resistência difusional associada com a formação do floco.

Concentrações de glucose de até 150 g/L parecem não ser inibitórias no cultivo de *Z. mobilis* para processos em batelada, sendo utilizadas por diversos autores (LOPES et al., 1991; TORRES & BARATTI, 1987; SCOTT, 1983).

II.4.5 Concentração de Etanol

Quando uma solução de glucose ou frutose é utilizada como fonte de carbono no processo de produção de etanol por *Z. mobilis*, mais que 95% do rendimento teórico em etanol é obtido, já que a fermentação produz praticamente só etanol e dióxido de carbono (SWINGS & DE LEY, 1977). Quando sacarose, um produto industrialmente interessante e barato, é utilizada, o rendimento em etanol resulta em um valor de aproximadamente 75-80% do teórico, devido à formação de subprodutos. Cerca de 10 % da sacarose utilizada é convertida em levana, não sendo este polissacarídeo produzido a partir de glucose e frutose (VIAKARI, 1986a; ROGERS et al., 1982).

TORRES & BARATTI (1987), utilizando sacarose em reator contínuo, verificaram a possibilidade de adequação da linhagem floculante de *Z. mobilis* conhecida como ZM4F, para a produção de etanol. Este tipo de fermentação leva à formação de subprodutos (LAWFORD et al., 1982) como a levana e sorbitol, dentre outros. Sendo assim, devido ao interesse de obter-se somente etanol, estes autores procuraram determinar as condições de crescimento que favorecessem a produção de etanol, evitando ao máximo a formação destes subprodutos. Seus resultados indicam que este processo atinge os maiores valores de produtividade em etanol para alimentações de sacarose próximas a 150 g/L. Neste caso, 98% da sacarose é convertida em etanol com uma produtividade volumétrica de 24 g/(L.h), tendo ainda como conversão em etanol 0,4 g de etanol/g de sacarose, para esta concentração. Estes autores ainda sugerem a possibilidade de um melhoramento genético para a melhoria na fermentação da sacarose em etanol por *Z. Mobilis*.

Para a produção de etanol em batelada, RODRÍGUEZ & CALLIERI (1986) descrevem um ensaio comparativo entre uma cepa floculante de *Z. mobilis*, isolada do caldo de cana, e uma cepa largamente conhecida como produtora de etanol, a

ATCC10988. Os rendimentos em etanol são favoráveis à cepa floculante conforme mostra a Tabela II.1.

Nesta fermentação, quando glucose foi utilizada como fonte de carbono, não foram encontradas diferenças significativas entre a cepa floculante e cepa *Z. mobilis* ATCC10988. Quando foi utilizada sacarose como fonte de carbono, para a concentração de 100 g/L, o procedimento e os resultados foram similares aos da glucose, apesar da formação de subprodutos com já citado anteriormente. Porém, quando a concentração de sacarose foi elevada para 200 g/L, os resultados forma extremamente favoráveis a cepa floculante. Com esta concentração a cepa ATCC10988, utilizou apenas 25 % da concentração inicial, enquanto que, a cepa floculante, utilizou cerca de 87 %. Os melhores resultados obtidos com sacarose com a cepa floculante, na concentração de 200 g/L, podem indicar uma melhor capacidade de hidrólise pela cepa isolada do caldo de cana-de-açúcar.

Tabela II.1: Resultados obtidos da fermentação de duas cepas diferentes de *Z. mobilis* em duas fontes distintas de carbono (RODRÍGUEZ & CALLIERI, 1986).

Açúcar	Glucose				Sacarose			
	100		200		100		200	
Concentração de Açúcar (g/L)	A	F	A	F	A	F	A	F
Linagem								
Etanol (g/L)	45,2	46,4	85,5	86,9	44,1	47,6	24,2	82,5
Açúcar residual (g/L)	3,7	4,2	17,2	24,3	9,5	2,7	149,4	26,0
Biomassa (ps) (g/L)	1,0	1,1	0,9	1,2	0,7	1,2	0,6	1,3
Etanol (rendimento %)	88,4	91,3	83,6	85,0	86,2	93,0	23,6	80,7

(A) - Cepa ATCC 10988;

(F) - Cepa Floculante isolada do caldo de cana-de-açúcar

A produção de etanol em um reator de leito fluidizado utilizando uma linhagem de *Z. mobilis* floculante com reciclo da biomassa é descrito por SCOTT (1983). Neste trabalho o autor, utilizando diferentes concentrações de glucose, conclui que em

concentrações maiores que 140 g/l de glucose começa a haver inibição no processo de produção de etanol, provavelmente devido à própria concentração de etanol.

A utilização de sistemas em regime contínuo, para a obtenção de altas produtividades em etanol, parece ser muito apropriada quando utilizadas bactérias de *Z. mobilis* com capacidade de floculação (FEIN et al., 1983a). Estes autores relatam neste trabalho que alcançaram uma concentração de biomassa próxima a 35 g/l, com uma alimentação de 100 g/L de glucose, sendo a velocidade de diluição do meio (D) quase 9 vezes maior do que com bactérias não floculantes como a cepa ATCC 29191. A tabela II.2 demonstra os resultados obtidos e calculados a partir dos dados da fermentação.

Os autores relatam que os resultados são muito favoráveis e equivalentes a outros sistemas projetados para a obtenção de altas produtividades em etanol, devido à alta concentração celular mantida dentro do reator. Um dos pontos observado nos diversos trabalhos em reatores contínuos é a preocupação com as baixas concentrações de substrato residual, devido aos maiores custos do processo em caso de um projeto de maior escala (TOH et al., 1993; ROELS et al., 1987 ; ROGERS et al., 1982). Estes trabalhos também relatam uma preocupação na obtenção de concentrações em etanol altas, objetivando facilitar os processos de recuperação do produto.

Tabela II.2: Cinética de fermentação para *Z. mobilis* ATCC29191 e a sua mutante floculante WR6 em um reator contínuo simples. (FEIN et al., 1983a)

Linhagem	Parâmetros Cinéticos a Dmax						
	S _R (g/L)	D _{MÁX} (h ⁻¹)	X (g/L)	P (g/L)	VP (g/L/h)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/g/h)
ATCC 29191	100	0,196	2,88	42,50	8,32	0,44	2,89
WR6	100	1,68	36,00	47,60	80,00	0,50	2,22
	130	0,90	27,60	61,80	57,53	0,50	2,11

S_R – Concentração de glucose do meio de alimentação;

D_{MÁX} – Máxima velocidade de diluição do meio;

VP – Produtividade volumétrica em etanol;

Q_P – Velocidade específica de formação de etanol.

LEE et al. (1983) relatam em um trabalho semelhante ao publicado por FEIN et al. (1983a), a utilização de uma linhagem floculante de *Z. mobilis* ZM401 em reatores contínuos, utilizando glucose como fonte de carbono. Os resultados de produtividade são muito bons devido à alta concentração celular atingida dentro do reator (próxima a 20 g/L).

O próprio etanol atua como agente inibitório no processo de crescimento celular e conseqüentemente na própria produção de etanol, tanto em bactérias como em leveduras. Uma das maiores concentrações em etanol conseguidas para *Z. mobilis* foi na faixa de 110 g/L. (ROGERS et al., 1982, BURRIL et al., 1983).

O etanol tem um efeito prejudicial sobre a membrana celular de *Z. mobilis*, diminuindo sua eficácia como barreira semi-permeável e permitindo a saída de cofatores e coenzimas essenciais (VIKARI, 1986a, BURRIL et al., 1983). De acordo com BRINGER et al. (1985), a membrana precisa permitir uma alta velocidade de difusão para fora do citoplasma e, ao mesmo tempo, necessita opor-se às suas propriedades solventes.

A formação de dióxido de carbono (CO₂) durante o processo de produção de etanol é mencionado como um fator inibitório por diversos autores (VEERAMALLU & AGRAWAL, 1986; LAWFORD et al., 1982; TOH et al., 1993). Em reatores com células não floculantes (ERZINGER, 1996; SILVEIRA et al., 1995) é possível utilizar altas velocidades de agitação, promovendo assim a saída do CO₂ do meio de cultivo. Vários autores (VORE & TALBURT, 1993; FEIN et al., 1983a), mencionam a utilização do gás N₂ inerte ao meio de cultivo, durante o processo fermentativo para auxiliar a retirada do CO₂ e, conseqüentemente, contribuir na melhoria dos rendimentos do processo.

Estudos realizados no Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (CDB, 1994) demonstraram que freqüências de agitação altas promoviam uma eficiente remoção de CO₂ do meio permitindo um bom desenvolvimento da cultura de *Z. mobilis*. Neste trabalho foi observado que com o uso de vácuo, ou o aumento da velocidade de agitação, se obtinha uma conversão de células 44 % maior que no cultivo em presença apenas de nitrogênio.

II.5 GLUCOSE FRUTOSE OXIDORREDUTASE

A enzima glucose-frutose oxidorredutase (GFOR) promove a conversão de Glucose e Frutose em Gluconolactona e Sorbitol. Um dos primeiros estudos propostos sobre a produção de sorbitol pela bactéria *Zymomonas mobilis* foi publicado por LEIGH et al., 1984. Estes autores acreditavam que esta reação ocorria pela presença de duas desidrogenases.

Segundo ZACHARIOU & SCOPES (1986), duas enzimas, glucose-frutose oxidorredutase e gluconolactonase (Figura II.1), são responsáveis pela biotransformação de glucose e frutose em sorbitol e ácido glucônico. A enzima glucose-frutose oxidoreductase (GFOR) é capaz de converter mais do que 99 % de uma solução equimolar de frutose e glucose em uma solução próxima a 50 % de sorbitol e gluconato de sódio quando o pH é controlado com carbonato de sódio a um valor próximo de 6,2.

A enzima GFOR encontra-se na região periplasmática de *Z. mobilis*, constituindo mais de 1% das proteínas solúveis. Esta proteína tetrâmica possui sub-unidades de peso molecular próximo a 40 KDa (LOSS et al., 1993), determinado por eletroforese. Cada sub-unidade contém uma molécula de NADP(H) não dissociável que transfere os equivalentes para a redução de glucose e frutose (HARDMAN & SCOPES, 1988). Desta forma, não é necessário a presença de nenhum cofator para a sua atividade.

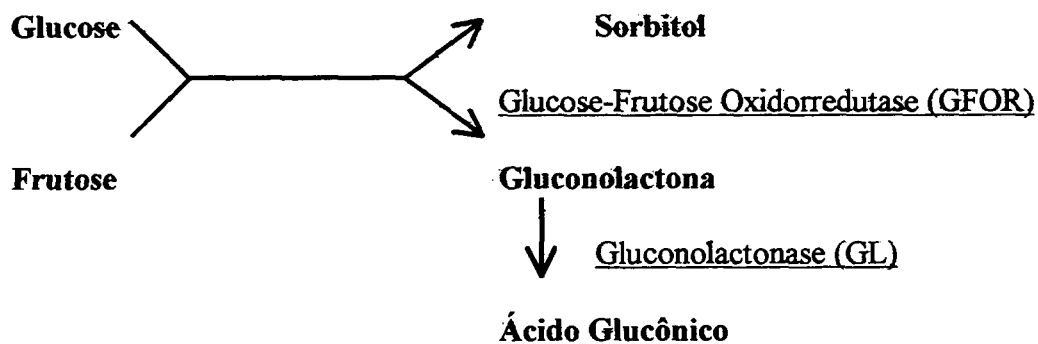


Figura II.1: Conversão de Glucose e Frutose em Ácido Glucônico e Sorbitol pelas enzimas Glucose Frutose Oxidorredutase e Gluconolactonase.

Esta enzima possui uma alta especificidade e uma baixa afinidade pelos substratos frutose e glucose (ZACHARIOU & SCOPES, 1986). A enzima GFOR opera com uma cinética comumente denominada de mecanismo “ping-pong” (ZACHARIOU & SCOPES, 1986; HARDMAN & SCOPES, 1988).

Vários autores estudaram a influência na atividade específica da enzima GFOR para diferentes linhagens de *Z. mobilis*, crescidas em diferentes fontes de carbono (SILVEIRA et al., 1995; REHR et al., 1991). Dentre estes autores, podemos destacar um dos primeiros trabalhos publicados neste assunto, em que ZACHARIOU & SCOPES (1986) verificaram que utilizando-se somente glucose como fonte de carbono, obtém-se maiores atividades específicas.

ERZINGER et al. (1995), utilizando células de *Z. mobilis* CP1, desenvolveram uma metodologia que possibilitou determinar a atividade de GFOR em células íntegras. Neste trabalho, ficou demonstrado que a enzima apresenta melhor atividade em temperatura de 39 a 42°C e a um pH de 6,2 a 6,4. Estes resultados são idênticos aos encontrados por ZACHARIOU & SCOPES (1986) para a enzima GFOR purificada.

WISBECK (1995) descreve que a atividade específica em GFOR tende a aumentar com o aumento da concentração inicial de substrato. Neste trabalho, são publicados os melhores parâmetros cinéticos para este processo, temperatura de 39°C e pH de 6,4. Este estudo também conclui que esta enzima, obtida por linhagem floculante de *Z. mobilis* Z1-81, sofre inibição em concentrações equimolares de glucose e frutose superiores a 300 g/L.

Conforme dados publicados por ZACHARIOU & SCOPES (1986), para diferentes concentrações de glucose e frutose no meio de crescimento com *Z. mobilis* ATCC29191, diferentes atividades da enzima GFOR foram encontradas. Na tabela II.3, é possível verificar que a atividade de GFOR atinge seus valores máximos em meios de cultivo onde a fonte de carbono foi somente glucose.

Tabela II.3 : Níveis de enzimas em extratos de *Z. mobilis* ATCC29191 crescidas com diferentes fontes de carbono (ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

Açúcar no meio de crescimento (% p/v)		Atividade específica (U/mg de proteína)	
Glucose	Frutose	GFOR*	GL*
10	0	1.06	0.70
15	0	1.41	0.66
20	0	1.87	0.67
9	1	0.73	0.60
1	9	0.57	0.60
5	5	0.64	0.54
7.5	7.5	0.84	0.64
10	10	0.72	0.72
0	10	0.64	0.64
0	15	0.66	0.67
0	20	0.59	0.67

* GFOR = Glucose frutose oxidorreductase; GL = gluconolactonase

SILVEIRA et al. (1995), comparando diferentes linhagens de *Z. mobilis*, observaram que a atividade de GFOR em células íntegras varia de acordo com a linhagem utilizada. Os resultados deste trabalho (Tabela II.4) mostraram que a atividade de glucose-frutose oxidorreductase varia, dependendo da linhagem de *Z. mobilis* utilizada.

Tabela II.4: Comparação de diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis* quanto à atividade de GFOR (SILVEIRA et al., 1995).

Linhagem	Atividade específica de GFOR (U/g células)	Rendimento em GFOR (U/g glucose)
CP1	8.3	0.18
CP2	6.6	0.20
CP3	8.7	0.22
CP4	6.5	0.18
Ag11	9.0	0.16
ATCC 29191	14.9	0.54

II.6 SORBITOL E ÁCIDO GLUCÔNICO: PRODUÇÃO E APLICAÇÕES

II.6.1 Sorbitol

O sorbitol é um produto da natureza que pode ser encontrado em várias frutas como a ameixa, cereja, maçã, pêra, pêssego. Os frutos do gênero *Sorbus* são os mais ricos em sorbitol (GETEC, 1993).

O sorbitol (D-Sorbitol, D-glucitol, Sorbita), de peso molecular 182,17 e fórmula molecular $C_6H_{14}O_6$, é quimicamente um hexitol contendo uma hidroxila em cada átomo de carbono. Como poliol, o Sorbitol guarda semelhança estrutural com os membros de menor peso molecular do grupo: glicerina e propilenoglicol. Esta semelhança é a razão das propriedades físico-químicas similares, sobretudo a afinidade com a água, mais intensa para o sorbitol que para os outros dois membros do grupo, e representa assim uma das causas de muitas aplicações industriais semelhantes. (GETEC, 1993; Química e Derivados, 1994).

II.6.1.1 Produção convencional

A extração industrial do sorbitol a partir de suas fontes naturais não é economicamente viável. Assim, o sorbitol é produzido industrialmente através da hidrogenação catalítica da glucose.

A tecnologia convencional para a produção de sorbitol é baseada na hidrogenação, a uma alta pressão (40-50 atm.), do xarope de glucose a uma concentração de 70 %, catalisado por Ni^{+2} , a uma temperatura de 140-150°C. Este processo envolve a geração e o armazenamento do hidrogênio produzido pela eletrólise da água. O xarope resultante passa por várias colunas de troca iônica para reduzir a concentração Ni^{+2} a níveis inferiores a 5 ppm, para poder ser utilizado na indústria de alimentos. (PHILLIPS, 1963; CHUN & ROGERS, 1988).

II.6.1.2 Aplicações

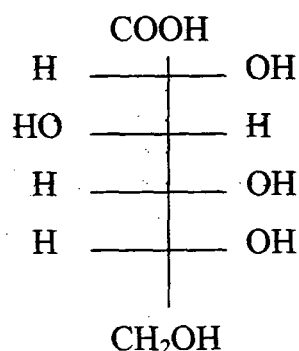
O sorbitol tem seu uso crescentemente difundido face às aplicações em diversos setores industriais como alimentícios, cosméticos, farmacêuticos e químicos. Dentre estas aplicações podemos citar (FREITAS, 1990; GETEC, 1993):

- sua utilização como matéria-prima básica para a produção de ácido ascórbico;
- na indústria de alimentos é indicado para condicionar a umidade, inibir a cristalização de açúcares, controlar a textura e aperfeiçoar o sabor; também atua como endocolorante em produtos alimentícios dietéticos, principalmente nos isentos de açúcares, onde se evidencia a sua não cariogenicidade;
- em cosméticos funciona como umectante e emoliente na produção de cremes, emulsões, loções; sua utilização em cremes dentais para estabilizar o conteúdo de água na preparação, proporciona plasticidade e aperfeiçoa o sabor;
- nos medicamentos, dada a sua alta reatividade com drogas e outros ingredientes farmacêuticos, o sorbitol é usado como agente de corpo e condicionador da umidade em preparações líquidas, sólidas e semi-sólidas;
- no fumo, é empregado para estabilizar o conteúdo de umidade durante as secagens e processamento do fumo, preservando seu aroma e paladar.
- sorbitol pode, ainda, ser utilizado na produção de resinas e adesivos, nas indústrias têxtil e de papéis e em galvanoplastia.

II.6.2. Ácido glucônico

O ácido glucônico ou ácido-D-glucônico, de peso molecular de 196,16 ($C_6H_{12}O_7$), foi descoberto em 1870 por HLASIWETS & HABERMANN durante a oxidação de glucose com cloro (HUSTEDE et al., 1985).

O ácido glucônico possui a seguinte fórmula estrutural:



Uma das principais propriedades químicas do ácido glucônico é devida a sua mais importante característica: é um ácido fraco, porém capaz de dissolver óxidos, hidróxidos e carbonatos, sem afetar as superfícies não metálicas ou metálicas (HUSTEDE et al., 1985).

II.6.2.1 Produção convencional

Para fins comerciais, o ácido glucônico e seus sais de cálcio e sódio, são preparados exclusivamente pela oxidação da glucose ou matérias-primas que contenham glucose. O método pode ser químico, eletrolítico, catalítico ou bioquímico.

Para a produção do ácido glucônico (ou seus sais), pela via bioquímica, o processo fermentativo tem sido desenvolvido baseado principalmente em linhagens de *Gluconobacter suboxydans* ou *Aspergillus niger* (CHUN & ROGERS, 1988). Um processo contínuo foi apresentado pelo grupo farmacêutico FUJISAWA, capaz de converter uma solução de glucose a 35 % a gluconato de sódio com um rendimento de 95%.

Neste processo, utilizando *Aspergillus niger*, a glucose é desidrogenada pela ação da enzima glucose oxidase, a uma temperatura de 30-32°C e com um pH de 5,5-6,5. Desta forma obtêm-se valores de 20-30mmol de ácido glucônico por hora para cada grama de biomassa (TAKAMATSU et al., 1981, FRÖHLICH et al., 1986).

II.6.2.2 Aplicações

O ácido glucônico ou seus sais tem sido utilizados em indústrias de alimentos, bebidas e farmacêuticas. Dentre as diversas aplicações do ácido glucônico podemos destacar (HUSTEDE et al., 1985):

- em fármacos por formar complexos com vários cátions, como por exemplo Ca^{++} e Fe^{++} , estes complexos são utilizados em fármacos para reposição de cálcio e ferro (MILSON & MEERS, 1985);
- gluconato de magnésio é um excelente padrão para a determinação de magnésio no soro (MILSON & MEERS, 1985);
- seu excepcional uso para a remoção de depósitos calcáreos e metais ou outras superfícies, como ferro galvanizado e aço inox nas indústrias de leite e cerveja;
- utilizado em indústrias têxteis juntamente com os sais de magnésio como estabilizante durante a etapa de branqueamento;
- em concreto também tem sido usado gluconato de sódio como agente de retardamento da cura.

II.6.3 Produção por *Zymomonas mobilis*

Durante o crescimento de *Zymomonas mobilis* em meio contendo soluções de sacarose, ou misturas de glicose e frutose, ocorre a formação de sorbitol como maior subproduto junto ao etanol e CO_2 . Assim, mais de 11 % das fontes de carbono foram convertidas a sorbitol (LOSS et al., 1994).

LEIGH et al. (1984), em um dos primeiros estudos publicados sobre este tipo de produção, confirmaram que o sorbitol provinha exclusivamente da frutose, já que somente os meios que continham frutose, podia ser detectada a presença de sorbitol (VIKARI, 1984).

ZACHARIOU & SCOPES (1986), após identificarem a enzima responsável pela formação de sorbitol com sendo glicose frutose oxidoredutase, chegaram à conclusão que esta única enzima era responsável pela redução de frutose a sorbitol. Estes mesmos

autores afirmam que esta biorreação somente ocorre na presença de glucose e frutose, formando ainda ácido glucônico. Entretanto, as quantidades de ácido glucônico (ou gluconato), eram muito pequenas ao final da fermentação, devido ao fato do ácido glucônico ser fosforilado pela enzima gluconatoquinase e, após, metabolizado pela via de Entner-Doudoroff a etanol (BARROW et al., 1984 ; REHR et al., 1994 ; SILVEIRA et al., 1995).

CHUN & ROGERS (1988) desenvolveram uma metodologia que consiste em três etapas bem definidas: (1) crescimento celular e meios contendo glucose/ou frutose; (2) concentração e permeabilização das células com tolueno; (3) biotransformação de glucose e frutose em ácido glucônico (ou gluconato) e sorbitol. Com esta metodologia e utilizando soluções de glucose e frutose a 300 g/l (de cada substrato) atingiram rendimentos globais próximos a 95 %. Com o tratamento (permeabilização) com tolueno, a produção de etanol a partir do ácido glucônico foi minimizada, obtendo valores individuais de sorbitol e ácido glucônico muito próximos.

A permeabilização da parede celular com tolueno foi realizada para inibir a via de Entner-Doudoroff, pela liberação de alguns cofatores, fazendo com que a bactéria perdesse a capacidade de formação de etanol e outros produtos do catabolismo (CHUN & ROGERS, 1988).

Diferentes autores têm utilizado a técnica de permeabilização da parede celular e atingiram valores semelhantes aos obtidos por CHUN & ROGERS (1988). Dentre estes podemos citar a técnica de congelamento e descongelamento, proposta por BRINGER-MEYER & SAHN (1991), e a técnica utilizando detergente como agente permeabilizante – Cteíl-trimetil-amônio (CTAB) – citado por REHR et al. (1991).

De forma semelhante outros autores propõe pequenas variações neste processo, porém sempre realizando como 1ª etapa o crescimento celular de *Z. mobilis* em meio contendo glucose, frutose ou ambas (SILVEIRA et al., 1995).

Em 1994, SILVEIRA et al., patentearam o processo de produção e recuperação de sorbitol e ácido glucônico ou gluconato, utilizando células livres e não

permeabilizadas de *Z. mobilis* CP1. Estes autores relatam que quando foram utilizadas altas concentrações de açúcares (>600g/l), o consumo de gluconato foi inibido.

WISBEK (1995), utilizando linhagem floculante de *Z. mobilis*, com uma alta concentração de açúcares (>600g/l) obteve rendimentos em sorbitol e ácido glucônico da ordem de 95 % do máximo teórico. A grande vantagem competitiva da linhagem floculante a simplicidade da recuperação da massa microbiana por sedimentação.

Na tabela a seguir encontram-se resultados gerais de vários trabalhos publicados referentes à produção de sorbitol e ácido glucônico por *Z mobilis*, a partir de glucose e frutose.

Tabela II.5 : Resultados gerais encontrados na literatura, para a produção de sorbitol e ácido glucônico por *Zymomonas mobilis* em processos de biotransformação.

Tratamento das células e linhagem	Células (g/l)	Glucose e frutose (inicial) (g/l)	Etanol (g/l)	Sorbitol (g/l)	Ácido glucônico (g/l)	Rendimento em sorbitol ¹ (%)	Rendimento o em ácido glucônico ¹ (%)	Referência
Permeabilização com CTAB (ATCC 29191)	14.4	105.0+105.0	0.8	103.0	110.0	97.0	99.0	REHR & SAHM, (1992)
Permeabilização com CTAB (ATCC29191)	39.6	281.0+292.0	0.8	285.0	295.0	97.0	96.5	REHR & SAHM, (1992)
Permeabilização por congelamento e descongelamento	43.0	234.0+234.0	-	233.0	247.0	99.1	99.9	BRINGER-MEYER & SAHM, (1991)
Nenhum CPI	26	185.0+171.0	9.0	163.0	136.0	99.8 ²	68.9 ²	CDB, 1994
Nenhum CPI	26	360.0+325.0	0	303.0	325.0	100.0 ²	99.5 ²	CDB, 1994
Permeabilização com tolueno e imobilização com alginato de cálcio (ATCC 31821)	37.3	200.0+200.0	0	-	-	90.9	87.5	CHUN & ROGERS, (1988)
Permeabilização com tolueno (ATCC 31821)	34.9	200.0+200.0	2.5	-	-	93.7	90.3	CHUN & ROGERS, (1988)

1- Rendimento em relação ao máximo teórico.

2- Os resultados foram corrigidos em função da diluição que o meio sofre, durante o processo, pela adição de base para o controle de pH.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Microorganismo

Zymomonas mobilis Z1-81 foi o microorganismo utilizado em todos os experimentos deste trabalho. Esta linhagem foi cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. *Z. mobilis* Z1-81 é uma linhagem floculante e foi isolada em mosto de caldo de cana-de-açúcar (FALCÃO DE MORAIS et al., 1983).

Para a manutenção da cultura, a cepa foi, numa periodicidade de trinta dias, repicada em meio de conservação líquido SDL (SWINGS & DE LEY, 1977) e conservada sob refrigeração a 4°C.

III.2 Meio de Cultura

O meio para manutenção e ativação da cepa, tinha a seguinte composição (g/L):

Glucose	20,0
extrato de levedura	5,0

O meio utilizado tanto para o pré-inóculo, inóculo e meio de fermentação, foi o meio SSF, que tinha a seguinte composição (g/L):

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
Extrato de levedura	5,0

Quando da realização do inóculo, o meio em questão foi tamponado com os seguintes compostos (g/L):

MES ^{*1}	27,0
MES-K ^{*2}	14,0

^{*1} MES – ácido 2-[N-morfolino]etano-sulfônico

^{*2} MES.K – Sal potássico do MES.

Na preparação dos meios de inóculo a concentração de glucose foi de 100 g/L. Nos ensaios em fermentador foi preparada uma solução concentrada de glucose (500 g/L) e adicionada ao meio o volume necessário, de acordo com as condições definidas para cada ensaio.

A esterilização dos meios de manutenção, ativação, pré-inóculo, inóculo, meio de fermentação, bem como da solução de glucose, foi feita em autoclave, a 121 °C por 20 min.

III.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

III.3.1 Coleta e preparo das amostras

Durante o processo fermentativo foram retiradas, a cada ponto da fermentação, duas amostras, sendo que para curva de massa seca foram retiradas amostras separadas, em intervalos maiores. O intervalo de amostragem variou de acordo com a necessidade do processo fermentativo em questão. Instantes antes da amostragem a velocidade do agitador era aumentada de 70 para 250 min^{-1} , conforme metodologia desenvolvida (Artigo 1 do capítulo IV).

As amostras foram retiradas assepticamente através do auxílio de uma bomba peristáltica. A bomba situava-se abaixo do vaso do fermentador, assim as amostras foram retiradas através da técnica conhecida como sifão. Isto foi realizado para que os flocos não necessitassem passar através da bomba peristáltica e assim pudessem ser destruídos, interferindo nos resultados relativos ao índice de floculação. A bomba foi acionada até o instante em que a amostra pudesse ser retirada por gravidade, desligando-se então a bomba e, assim, retirava-se as amostras necessárias. Na primeira amostra foi retirado um volume de 10 mL para a determinação da concentração de células totais. Esta amostra foi passada sucessivas vezes através de uma agulha de pequeno calibre (0,9x40mm) para que ocorresse o total rompimento dos flocos, e a obtenção de uma suspensão homogênea, para uma determinação da absorvância da amostra mais eficaz. Para a segunda amostra foi retirado um volume de 5 mL, utilizado para a determinação da concentração de células livres presentes no sobrenadante. A determinação da concentração de células livres foi realizada pela medida da absorvância do sobrenadante, após 10 minutos de repouso, para a total decantação das células floculantes. A concentração de células floculantes foi então determinada pela diferença das concentrações de células totais e livres.

III.3.2 Concentração Celular

As concentrações de células totais e livres foram determinadas pela medida da absorbância das suspensões celulares a 560 nm e posteriormente convertidas em concentração (grama de matéria seca por litro) por uma curva de calibração. O procedimento completo está descrito a seguir:

- amostras de 10-20 mL foram retiradas do vaso do fermentador, e em seguida passava-se a amostra através de um agulha de pequeno calibre (0,9x40 mm) por 3 vezes para o total rompimento dos flocos, e distribuição mais homogênea da suspensão.
- em seguida a amostra foi filtrada com um sistema de filtração à vácuo, com membranas de 0,2 µm, previamente pesadas (membranas úmidas), e lavadas por 3 vezes com água destilada.
- as membranas foram colocadas em estufa à 80°C, por 24 horas, sendo que a cada ponto foram tiradas e preparadas amostras em duplicata.
- juntamente ao final da fermentação foram pesadas quatro membranas e colocadas em estufa por 24 horas para a determinação da umidade presente.
- ao final das 24 horas as quatro membranas sem células foram pesadas e determinou-se a quantidade de água presente nas mesmas.

Também as membranas com células foram pesadas, sendo então a massa celular determinada da seguinte forma:

Massa celular = (massa da membrana seca mais células) - (massa da membrana úmida) + (massa da água perdida)

Ao final da fermentação, volumes maiores eram colocados em cadinho de porcelana, que passavam por tratamento semelhante ao descrito acima para a confirmação da concentração final de células totais e livres.

III.3.3 Concentração de Glucose

A concentração de glucose foi determinada em todos os ensaios de fermentação através do método enzimático glucose E enzimática (CELM, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos). Este método consiste na oxidação da glucose pela enzima glucose-oxidase (GOD - β D - Glucose: oxigênio 1 - oxidorreductase; EC 1.1.3.4) a ácido glucônico e água oxigenada: A água oxigenada em presença de peroxidase (POD, doador: hidrogênio peróxido oxidorreductase; EC 1.11.1.7) produz a copulação oxidativa do fenol com a 4 - aminofenazona (4-AF) dando lugar à formação de um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade da cor é proporcional à quantidade de glucose presente, com uma máximo de absorção a 505 nm. O esquema abaixo ilustra as reações:



A partir da amostra retirada para a determinação das células livres descrita no item III.3.1, a amostra seguia o seguinte procedimento:

- a 1,0 mL da amostra adicionava-se 1,0 mL da solução reativa preparada com as instruções contidas no manual do produto, com algumas modificações nos volumes da amostra e do reativo;
- incubava-se por 30 minutos, a 37 °C;
- media-se a absorbância da solução, tendo como referência um “branco” preparado da mesma forma e utilizando água em lugar da amostra.

As medidas de absorbância foram feitas a 505 nm, em espectrofotômetro SHIMADZU modelo UV 160-A.

Juntamente com as amostras foram colocadas amostras com concentrações conhecidas de valores aproximados de 0,8, 0,4 e 0,2 g/L.

A concentração de glucose foi calculada por meio de equações que descreviam curvas de calibração correlacionando a absorbância encontrada com a concentração de glucose nas amostras de concentração previamente conhecidas.

III.3.4 Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada com base no método desenvolvido por ERZINGER et al. (1995). Este método baseia-se na capacidade de biotransformação de glucose e frutose por uma suspensão celular de *Zymomonas mobilis* em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, em reações catalisadas pelas enzimas glucose-frutose oxidoreductase e gluconolactonase, a 39 °C e pH de 6,4.

A metodologia completa para a determinação da atividade de GFOR em células íntegras é apresentado a seguir (ERZINGER, 1996):

- a amostra, proveniente do fermentador, foi centrifugada a 5500min^{-1} ($5039 \times g$) por 20 minutos e ressuspensa a uma concentração de 10 g/L com solução tampão de McLLVAINE (fosfato dissódico e ácido cítrico) (MORITA, 1983), 1,0M e pH 6,4;
- 0,4 mL da suspensão celular foi adicionado a 1,6 mL da solução de glucose e frutose preparada em tampão McLLVAINE pH 6,4, contendo 180 g/L de glucose e 180 g/L de frutose;
- os testes foram realizados em banho termostatzado, sob agitação magnética de 500min^{-1} , a 39 °C por 20 minutos;
- transcorrido o tempo de reação, a amostra foi levada a banho fervente por 1 minuto para interrupção da reação;
- o material foi, então, centrifugado a 12000min^{-1} ($12879 \times g$) por 10 minutos e o sobrenadante conservado a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise de ácido glucônico produzido.

Uma unidade de GFOR (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 g de ácido glucônico por hora, nas condições do teste

III.3.5 Concentração de Etanol

Etanol produzido durante as fermentações foi quantificado através de cromatografia em fase gasosa. O cromatógrafo era equipado com um detetor de ionização de chama (HEWLETT-PACKARD, modelo HP 5890 serie II). O sistema era composto, ainda, de um injetor automático de amostra HP 7673, um “disc-drive” HP 9114B e de um integrador de áreas HP 3396 serie II que, através de um programa de análise e quantificação, permitia a apresentação dos picos e o cálculo das concentrações das substâncias analisadas.

As condições de operação eram as seguintes:

- coluna capilar HP FFAP Cross-linked modificada Polyethylene Glycol - TPA Phase;
- diâmetro da coluna - 0,53 mm;
- comprimento da coluna - 50 m;
- temperatura de operação da coluna - 75 °C;
- temperatura do injetor - 210 °C;
- temperatura do detetor - 230 °C;
- vazão do gás principal de arraste (Hélio) - 15 mL/min;
- vazão do gás auxiliar de arraste (Nitrogênio) - 25 mL/min;
- vazão do hidrogênio - 35 mL/min;
- vazão do ar sintético - 380 mL/min;
- volume de injeção - 1,0 µL;
- padrão interno - isobutanol (1,0 g/L).

Uma curva de calibração era feita para as análises de etanol. Foram preparadas varias soluções com uma faixa de concentração de 0,5 a 3,0 g/L. A cada amostra, em igual volume, era adicionado uma solução de isobutanol como padrão interno. As soluções eram preparadas em balança analítica e conservadas sob refrigeração. A solução de padrão interno continha 1,0 g/L de isobutanol.

O equipamento realizava as injeções automaticamente e, após os devidos procedimentos de integração das áreas dos picos, a concentração de etanol era calculada também pelo próprio equipamento.

III.3.6 Ácido Glucônico

A concentração do ácido glucônico foi determinada, para a quantificação da atividade enzimática, pelo teste enzimático UV/glucokinase (BOEHRINGER MANNHEIM) e utilizado por ERZINGER (1996). O método proposto por MÖELLERING & BERGERMEYER (1984), baseia-se na capacidade da adenosina 5-trifosfato (ATP) fosforilar o ácido glucônico, na presença da enzima gluconato quinase, formando 6-P-gluconato e adenosina 5-difosfato (ADP) (1).



O 6-P-gluconato é, então, oxidado por nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺) para 5-P-ribulose, com formação de nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) (2), catalisada pela enzima 6-Pgluconato desidrogenase (6-PGDH).



A quantidade de NADPH formado nesta reação (2) é estequiometricamente proporcional à quantidade de gluconato, cuja absorvância é lida à 340 nm.

Para a quantificação do ácido glucônico, o seguinte procedimento foi adotado visando, a completa hidrólise da gluconolactona eventualmente acumulada durante os ensaios e sua conseqüente conversão à gluconato:

- 0,1 mL da amostra foi tratado com 0,1 mL de KOH 1 M, por 30 minutos;
- após a hidrólise, as amostras eram diluídas com água deionizada, de modo que as concentrações de gluconato estivessem entre 0,1 e 0,6 g/L.

A leitura desta reação foi realizada em sistema MICROTITER READER (SLT LAB INSTRUMENTS, RFA), em placas com 96 poços de 400µl. Cada poço foi preenchido com 160 µL de tampão trietanolamina (NADP⁺, ATP, sulfato de magnésio e estabilizante), 20 µL de amostra ou padrão e 20 µL de enzima 6-PGDH.

A placa foi, em seguida, colocada sob agitação durante 5 minutos e, a leitura do “branco” foi realizada pelo sistema Microtiter Reader. O sistema de forma automática iniciava uma contagem regressiva de 30 minutos para a leitura final da reação. Logo após a leitura do “branco”, foram adicionados, a cada poço, 20 µL de enzima gluconato quinase. A placa, neste espaço de tempo permanecia sob agitação até a leitura final pelo sistema. O sistema fornecia as absorvâncias a 340 nm, do branco, da reação final, bem como a diferença entre estas medições.

Através de uma curva de calibração, correlacionado a absorvância com a concentração de gluconato de sódio, foi definida uma equação, por regressão linear. Os resultados foram então calculados em g/L de gluconato de potássio, por esta equação. Para transformar os resultados obtidos em gluconato de potássio a ácido glucônico, os valores foram multiplicados por um fator de conversão de 0,838.

No ensaio de biotransformação as concentrações de ácido glucônico foram quantificadas através de cromatografia líquida (HPLC). O sistema utilizado continha os seguintes componentes:

- detetor de índice de refração 7515A (ERC);
- bomba inteligente L-6200 (MERCK-HITACHI);
- termostato para a coluna T-6300 (MERCK-HITACHI);
- integrador D-2000 (MERCK-HITACHI);

O equipamento foi operado nas seguintes condições:

- coluna – PRP-X300 (HAMILTON);
- diâmetro da coluna – 4,1 mm;
- comprimento da coluna – 250 mm;
- temperatura de operação da coluna – 50 °C;
- fluxo de eluente – 0,5 mL/min;
- eluente – água ultra pura e degaseificada;
- volume de injeção – 20 µL
- padrão externo.

Para a determinação das concentrações foi construída uma curva de calibração, correlacionando as áreas obtidas para cada pico com as respectivas concentrações em g/L.

Nos ensaios para a determinação da atividade enzimática não foi utilizado o método cromatográfico para a quantificação do ácido glucônico devido à interferência que o tampão fosfato/ácido cítrico exerce sobre este método.

III.3.7 Concentração dos açúcares na biotransformação

Os açúcares utilizados e produzidos durante o processo de biotransformação foram quantificados através de cromatografia em fase líquida (HPLC). O cromatógrafo utilizado, MERK-HITACHI, possuía a seguinte configuração:

- detetor de índice de refração RID-6A (SHIMADZU);
- bomba inteligente 1-6210 (MERK-HITACHI);
- interface D-6000 (MERK-HITACHI);
- injetor automático AS-2000 (MERK-HITACHI);
- termostato para coluna T-6300 (MERK-HITACHI);
- software modelo D-6000 (MERK-HITACHI);
- microcomputador PC-45III (COMMODORE).

As condições de operação eram as seguintes:

- coluna Eurokat-Pb (KANUER);
- diâmetro da coluna – 8,0 mm;
- comprimento da coluna 300 mm;
- temperatura de operação da coluna – 60 °C;
- fluxo de eluente – 0,8 mL/min;
- eluente – água ultra-pura e degaseificada;
- volume de injeção – 20 µL;
- padrão interno – rhamnose (3 g/L).

Foi construída uma curva de calibração com concentrações aproximadas de 0,5 , 1,0 , 1,5 , 2,0 , 2,5 , 3,0 g/L de glucose, frutose e sorbitol, preparadas da mesma forma que as amostras. As amostras foram diluídas de modo que as concentrações dos produtos a serem analisados ficassem dentro da curva acima descrita.

III.4 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Todos os experimentos foram realizados em fermentador de bancada da B.BRAUN, modelo MD, com volume total de 5 L e volume útil de 4 L. A temperatura em todos os experimentos foi de 30°C e o pH foi mantido em 5,5 pela adição de NaOH 3M. A velocidade do agitador foi de 70 rpm, com 3 turbinas de pás planas (tipo Rushton). As turbinas ficam separadas entre si por uma distância de 6 cm tendo um comprimento de 6,3 cm.

O fermentador foi esterilizado vazio, em autoclave a gás a 121 °C por 30 minutos, sendo então colocado, de forma asséptica, o eletrodo de pH previamente calibrado e desinfetado com etanol 70 %. Em seguida adicionava-se o meio de fermentação juntamente com glucose. Minutos antes de inocular o fermentador, passava-se gás N₂ para eliminar toda a presença de oxigênio, garantindo o meio anaeróbio.

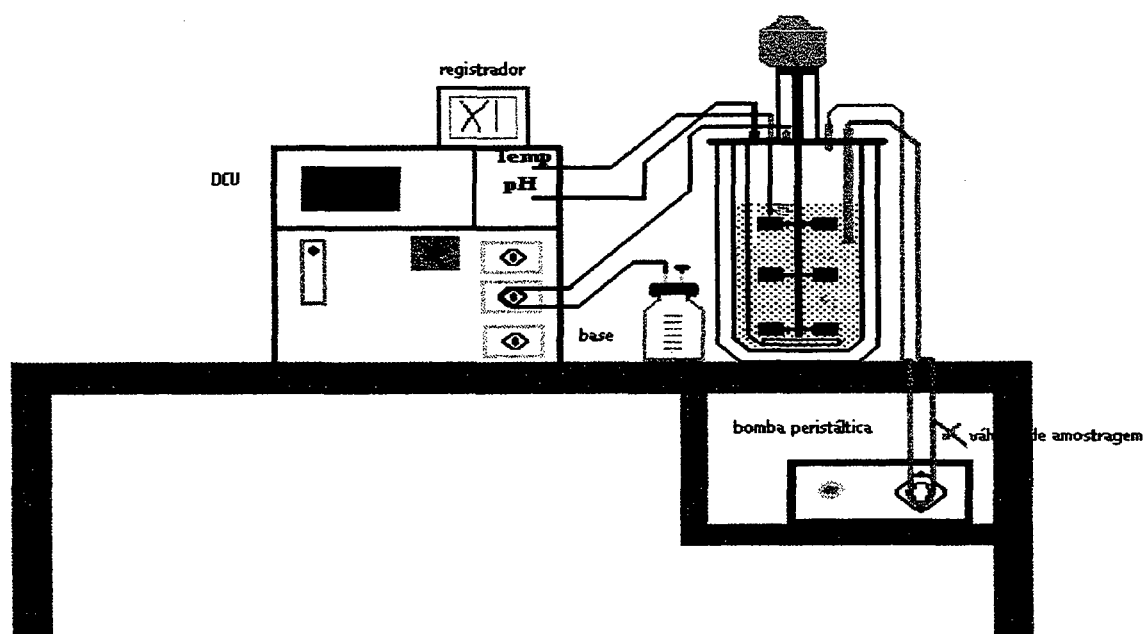


Figura III.1: Esquema do sistema utilizado nos ensaios de fermentação em regime descontínuo.

III.4.1 Preparo do Inóculo

O preparo de inóculo para todos os ensaios de fermentação seguia um procedimento que consistia de 3 etapas^{*1}:

- ativação da cultura que estava estocada sob refrigeração (4 tubos ; 2 g/L de glucose ; 5 mL ; 72 horas ; 30 °C);
- pré-inóculo (8 tubos ; 100 g/L de glucose ; 10 mL ; 24 horas ; 30 °C);
- inóculo (frasco com 400 mL ; 100 g/L de glucose; 30 °C)^{*2}

III.4.1 Ensaios em Regime Descontínuo

Foram realizados em regime descontínuo três conjuntos de ensaios, sempre procurando avaliar os efeitos sobre a produção e produtividade de GFOR, etanol e o índice de floculação^{*3}.

- Num primeiro conjunto, foram realizados ensaios para verificar a influência da concentração inicial celular. Estes ensaios foram realizados com uma concentração inicial de glucose em torno de 150 g/L.
- No segundo conjunto foi avaliado a influência da concentração inicial de glucose. Nestes ensaios procurou-se manter os melhores parâmetros obtidos nos ensaios do primeiro conjunto. Utilizaram-se concentrações iniciais de glucose de, aproximadamente, 50, 100, 150 e 210 g/L.
- O terceiro conjunto teve por objetivo avaliar alternativas econômicas para este processo.

^{*1} Os meios de crescimento estão descritos no item III.2

^{*2} Procedimento completo descrito no item V.3

^{*3} Definido como a relação, em base percentual, entre as concentrações de células floculantes e total.

III.4.2 Ensaios em Regime Batelada Alimentada

Na realização dos ensaios em regime semi-contínuo, as seguintes alterações foram realizadas:

- Volume inicial de fermentação – 3,5 L;
- Foi adicionado durante a fermentação um volume de 500 mL de acordo com os procedimentos descritos no item IV.5.

Estes ensaios visaram diminuir os fatores inibitórios pela alta concentração inicial de substrato.

III.4.3 Ensaios de Biotransformação

O ensaio de biotransformação teve por objetivo confirmar a capacidade de células de *Zymomonas mobilis* Z1-81 de produzir sorbitol e ácido glucônico a partir de frutose e glucose, respectivamente.

As células foram obtidas de uma fermentação em que foram utilizadas as melhores condições de produção obtidas nos experimentos em regime descontínuo (150g/L de glucose e alta concentração inicial celular).

Após a decantação das células no reator, retirou-se o sobrenadante e o restante das células, após lavagem com água deionizada, foi resuspensa em água num volume de 100 mL.

Durante o processo de biotransformação, foi utilizado um reator encamisado de 300 mL de volume total, mantido a 39 °C através de um banho termostatizado. O controle de pH foi realizado pela adição automática de uma solução de NaOH 14 M. O volume de base foi medido através de uma bureta de 50 mL. O sistema foi mantido sob agitação de 300 min⁻¹.

A concentração inicial de glucose e frutose foi de, aproximadamente, 300 g/L de cada açúcar. A concentração inicial de células de *Z. mobilis* foi de, aproximadamente, 30 g/L.

III.5 METODOLOGIA UTILIZADA NOS CÁLCULOS

III.5.1 Índice de Floclulação

O índice de floclulação (if), foi definido como sendo a razão entre a concentração de células floclulantes e a concentração de células totais.

III.5.2 Atividade Enzimática

III.5.2.1 Atividade específica

Atividade específica (A) foi definida como sendo unidades de GFOR (U) produzidas por g de células (g cél.)

III.5.2.2 Atividade global

A atividade global, isto é, a quantidade de enzima produzida num ensaio, foi assim definida:

$$A_{GT} = A * X_{Tf} , \text{ para células totais; } \quad (\text{III.1})$$

Onde: A_{GT} = atividade global para células totais (U/L);

A = atividade específica (U/g cél.)

X_{Tf} = concentração celular final para células totais (g cél/L).

$$A_{GF} = A * X_{Ff} , \text{ para células floclulantes. } \quad (\text{III.2})$$

Onde: A_{GF} = atividade global para células floclulantes (U/L);

A = atividade específica (U/g cél.)

X_{Ff} = concentração celular final para células floclulantes (g cél/L).

III.5.3 Rendimentos

III.5.3.1 Etanol

Na fermentação alcoólica de *Z. mobilis* tendo glucose como fonte de carbono, esta produz, estequiometricamente, 2 moles de etanol por mol de glucose. Sendo assim são formados teoricamente 0,511g de etanol para cada grama de glucose consumida. Assim a fórmula para o rendimento em etanol é a seguinte:

$$R = \frac{P_f - P_0}{(S_0 - S_f) * 0,51} * 100 \quad (\text{III.3})$$

Onde: R = rendimento em etanol (%);

P_f e P_0 = concentração final e inicial de etanol (g/L), respectivamente;

S_0 e S_f = concentração inicial e final de glucose (g/L), respectivamente.

III.5.3.2 Sorbitol e Ácido Glucônico

Para o cálculo dos produtos obtidos durante a biotransformação por *Z. mobilis* foram utilizadas as seguintes equações:

$$R_{ag} = \frac{ag_f - ag_0}{(G_0 - G_f) * 1,09} * 100 \quad (\text{III.4})$$

Onde: R_{ag} = rendimento em ácido glucônico;

ag_f e ag_0 = massa final e inicial de ácido glucônico (g), respectivamente;

G_0 e G_f = massa inicial e final de glucose (g), r respectivamente.

$$R_{sor} = \frac{sor_f - sor_0}{(F_0 - F_f) * 1,01} * 100 \quad (\text{III.5})$$

Onde: R_{sor} = rendimento em ácido sorbitol;

sor_f e sor_0 = massa final e inicial de sorbitol (g), respectivamente;

F_0 e F_f = massa inicial e final de frutose (g), respectivamente.

As equações são obtidas pela estequiometria que nos fornece a seguinte base molar: para cada um mol de glucose e frutose são formados um mol de ácido glucônico e um mol de sorbitol, respectivamente. Em base de massa, isto significa, que para cada grama de glucose e frutose consumidos são produzidos, teoricamente, 1,09g de ácido glucônico e 1,01 g de sorbitol, respectivamente.

Os cálculos para sorbitol e ácido glucônico foram realizados em base de massa devido à adição de base para controle de pH da reação, que diluía o meio.

III.5.4 Fatores de Conversão

Os fatores de conversão de substrato em produtos nos processos fermentativos e de biotransformação foram assim calculados:

❖ Conversão de glucose em células floculantes ($Y_{XF/S}$):

$$Y_{XF/S} = \frac{X_{Ff} - X_{F0}}{S_0 - S_f} \quad (\text{III.6})$$

Onde: X_{F0} = concentração inicial de células floculantes (g/L);

❖ Conversão de glucose em células totais ($Y_{XT/S}$):

$$Y_{XT/S} = \frac{X_{Tf} - X_{T0}}{S_0 - S_f} \quad (\text{III.7})$$

Onde: X_{T0} = concentração inicial de células totais (g/L);

❖ Conversão de glucose em células livres ($Y_{XL/S}$):

$$Y_{XL/S} = \frac{X_{Lf} - X_{L0}}{S_0 - S_f} \quad (\text{III.8})$$

Onde: X_{L0} e X_{Lf} = concentração inicial e final de células livres (g/L), respectivamente;

- ❖ Conversão de glucose em etanol ($Y_{P/S}$):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{III.9})$$

- ❖ Conversão de glucose em atividade enzimática global nas células floculantes em U/g ($Y_{AGF/S}$):

$$Y_{AGF/S} = \frac{AGF}{S_0 - S_f} \quad (\text{III.10})$$

- ❖ Conversão de glucose em atividade enzimática global nas células totais em U/g ($Y_{AGT/S}$):

$$Y_{AGT/S} = \frac{AGT}{S_0 - S_f} \quad (\text{III.11})$$

- ❖ Conversão de glucose em ácido glucônico ($Y_{ag/G}$):

$$Y_{ag/G} = \frac{ag_f - ag_0}{G_0 - G_f} \quad (\text{III.12})$$

- ❖ Conversão de frutose em sorbitol ($Y_{sor/F}$):

$$Y_{sor/F} = \frac{sor_f - sor_0}{F_0 - F_f} \quad (\text{III.13})$$

III.5.5 Produtividades

As produtividades para cada produto formado durante o processo fermentativo e na biotransformação foram calculadas por:

❖ Etanol em g/(L.h) (p):

$$p = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (\text{III.14})$$

onde: t = tempo de fermentação;

❖ Células floculantes em g/(L.h) (pX_F):

$$pX_F = \frac{X_{Ff} - X_{F0}}{t} \quad (\text{III.15})$$

❖ Células totais em g/(L.h) (pX_T):

$$pX_T = \frac{X_{Tf} - X_{T0}}{t} \quad (\text{III.16})$$

❖ Células livres em g/(L.h) (pX_L):

$$pX_L = \frac{X_{Lf} - X_{L0}}{t} \quad (\text{III.17})$$

- ❖ Atividade enzimática global nas células floculantes (pA_{GF}) e totais (pA_{GT}), respectivamente em U/(L.h):

$$pA_{GF} = \frac{A_{GF}}{t} \quad (\text{III.18})$$

$$pA_{GT} = \frac{A_{GT}}{t} \quad (\text{III.19})$$

Conforme observado em experiências anteriores com este tipo de processo (WISBECK, 1995), o final da fermentação podia ser estimado com maior precisão por meio da curva de variação da concentração do substrato com o tempo. Nos instantes finais do processo, os valores, na curva, formavam um segmento de reta com o qual era possível estabelecer uma equação de primeiro grau e determinar o tempo em que ocorreu o esgotamento do substrato. Este tempo era atribuído como o final da fermentação.

- ❖ Produtividade específica em Ácido glucônico:

$$p_{ag} = \frac{ag_t - ag_0}{X_F * t} \quad (\text{III.20})$$

- ❖ Produtividade específica em Sorbitol:

$$p_{sor} = \frac{sor_t - sor_0}{X_F * t} \quad (\text{III.21})$$

III.5.6 Velocidades Específicas

As velocidades instantâneas de crescimento para células totais (dX_T/dt), consumo de substrato (dS/dt), e de formação dos produtos dP/dt , foram calculados pelo método proposto por LE DUY & ZAJIC (1973). Estes valores, divididos pela concentração celular no mesmo instante, forneciam as velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de formação de etanol (μ_P).

Os valores das concentrações de células, substrato e produto utilizados nos cálculos das velocidades eram retirados das curvas (concentrações em função do tempo) que melhor se ajustavam aos pontos experimentais.

As máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{X,máx}$), foram calculadas a partir do gráfico que correlacionava o logaritmo neperiano das concentrações celulares com os respectivos tempos de fermentação. A existência de um trecho de reta, com a maior inclinação, indicava a ocorrência de uma fase exponencial de crescimento celular. O coeficiente angular desta reta representava o próprio valor de $\mu_{X,máx}$.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados do estudo de aspectos do processo de produção da cepa floculante de *Zymomonas mobilis* estudada e seus produtos. Esta apresentação é realizada através de 2 artigos e 5 seções abordando assuntos específicos.

O primeiro artigo (seção IV.1) apresenta uma metodologia desenvolvida para a obtenção de dados cinéticos de concentração celular ao longo do tempo no processo de crescimento de *Z. mobilis*, uma vez que o baixo nível de agitação dificulta a retirada de amostras homogêneas.

Aspectos da influência da concentração de células no inóculo e da concentração inicial de glucose no crescimento, floculação e produção de enzimas e etanol são discutidos no artigo da seção IV.2.

A seção IV.3 discute os resultados alcançados no cultivo de inóculo de forma agitada, em substituição à forma estática que vinha sendo realizada em projetos anteriores.

Testes de alternativas econômicas para a substituição do extrato de levedura, visando a aplicação industrial, são apresentados e discutidos na seção IV.4.

Uma tentativa de diminuir a inibição constatada por excesso de glucose é realizada na seção IV.5 com os ensaios em regime de batelada alimentada.

A seção IV.6 apresenta um teste de um modelo matemático desenvolvido na literatura para *Z. mobilis* que pode auxiliar no processo de otimização das condições de cultivo.

Finalizando, testes de biotransformação de glucose e frutose, realizados para avaliar e confirmar a eficiência do uso das enzimas GFOR e GL, não purificadas, obtidas neste trabalho para a produção de ácido glucônico e sorbitol, que nortearam a realização deste estudo, são apresentados na seção IV.7.

IV.1 – OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

ARTIGO 1:

“MÉTODO DE MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO CELULAR DE *Zymomonas mobilis* FLOCULANTE CULTIVADA EM BIORREATOR DE MISTURA COMPLETA”

MÉTODO DE MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO CELULAR DE *Zymomonas mobilis* FLOCULANTE CULTIVADA EM BIORREATOR DE MISTURA COMPLETA

D. P. Clebsch, A. Furigo Jr., M.M. Silveira

1 Introdução

Zymomonas mobilis é uma bactéria conhecida pela sua alta capacidade de produzir etanol. Existem vários trabalhos que demonstram esta capacidade, realizados, em sua maioria, com linhagens não floculantes (DOELLE et al., 1993). Entretanto, tem-se conseguido bons resultados quando foram utilizadas linhagens de *Z. mobilis* capazes de agregar-se e formar flocos, visto que, desta forma, em processos contínuos é possível manter-se uma alta concentração celular, resultando em produtividades superiores quando comparadas aos processos convencionais com linhagens não floculantes (FEIN et al., 1983).

O processo de biotransformação simultânea de glucose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, utilizando-se células de *Z. mobilis*, tem sido aprimorado nos últimos anos. Segundo ZACHARIOU & SCOPES (1986), duas enzimas, glucose-frutose oxidoreductase (GFOR) e gluconolactonase (GL) são responsáveis por estas reações. Este processo é realizado em duas fases distintas: crescimento de uma massa celular, com alta atividade enzimática, e sua concentração, e em seguida a biotransformação dos açúcares em produtos (SILVEIRA et al., 1994). Neste caso a utilização de uma linhagem floculante de *Z. mobilis* é atrativa considerando a não necessidade da etapa de centrifugação, já que a concentração das células ocorre pela sedimentação natural dos flocos.

Em casos em que o estudo da cinética do crescimento de *Z. mobilis* é importante, como nos exemplos citados, a obtenção de medidas de concentrações celulares confiáveis é fundamental. Todavia, devido ao caráter floculante do microorganismo é difícil a obtenção de amostras homogêneas do meio fermentativo, como descrito por WISBECK (1995).

Assim, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para a medida da concentração de suspensões celulares de linhagens floculantes de *Z. mobilis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Zymomonas mobilis* Z1-81, linhagem floculante cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas são mantidas a 4°C em meio líquido SDL e a manutenção é realizada mensalmente.

2.2 Meios

Para a conservação do microrganismo foi utilizado o meio de "Swings and DeLey" (SDL), contendo, 20 g/L de glucose e 5 g/L de extrato de levedura.

No processo de produção do inóculo a composição do meio foi a seguinte: 100 g/L de glucose, 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/L de KH_2PO_4 , 5 g/L de extrato de levedura, 27 g/L de MES e 14 g/L de MES-K.

O meio de fermentação tinha a seguinte composição: 150 g/L de glucose, 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/L de KH_2PO_4 e 5 g/L de extrato de levedura.

2.3 Métodos analíticos

Glucose foi medida enzimaticamente pelo método GOD-POD (CELM). As concentrações celulares foram determinadas pela medida da absorbância de suspensões celulares a 560 nm e posteriormente convertidas em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume), via curva de calibração.

Para a determinação da concentração celular foram retiradas em cada ponto da fermentação duas amostras, como descrito a seguir: uma foi destinada à determinação da concentração de células totais (10 mL) e outra à determinação da concentração de células livres (5 mL). Na primeira amostra o volume foi passado sucessivas vezes através de uma seringa com agulha (0,9x40mm) para que ocorresse o total rompimento dos flocos, obtendo-se, assim, uma suspensão homogênea, sendo então possível medir a absorbância da mesma. A determinação da concentração de células livres foi realizada após a decantação das células floculantes, pela medida da absorbância do sobrenadante na segunda amostra. A concentração de células floculantes foi então determinada pela diferença das concentrações de células totais e livres.

2.4 Condições de operação

Os experimentos foram realizados em fermentador de bancada da B.BRAUN, modelo MD, com volume útil de 4 L. A temperatura em todos os experimentos foi de 30°C e o pH foi mantido em 5,5 pela adição de NaOH 3M. A velocidade do agitador foi de 70 min⁻¹, com 3 turbinas de pás planas (tipo Rushton).

3 Resultados e Discussão

Nos experimentos utilizando-se células floculantes, a velocidade do agitador deve ser relativamente branda, a fim de que não haja destruição dos flocos por cisalhamento, reduzindo assim a sua boa capacidade de recuperação. Entretanto, mantendo-se tais velocidades ocorre a formação de um gradiente de concentração ao longo do eixo vertical do fermentador dificultando a retirada de amostras homogêneas (WISBECK, 1995).

Estudou-se, então, a possibilidade do aumento da velocidade do agitador por alguns instantes (< 1 min), durante a amostragem, objetivando conseguir uma mistura mais homogênea para a retirada de amostras representativas, sem no entanto prejudicar a relação entre células floculantes e totais.

O método desenvolvido consiste no aumento da velocidade do agitador para 250 min^{-1} , 30 segundos antes da retirada da amostra. As amostras são retiradas e, logo em seguida, a velocidade é novamente ajustada a 70 min^{-1} .

A Tabela 1 apresenta as concentrações de células livres obtidas antes do aumento da velocidade do agitador (70 min^{-1}) e durante o aumento da velocidade do agitador (250 min^{-1}) em função do tempo, segundo a metodologia desenvolvida.

Os valores da Tabela 1 demonstram que esta metodologia é adequada, já que os valores das concentrações de células livres retiradas antes e após o aumento da velocidade do agitador não apresentam diferenças importantes.

Tabela 1 – Influência da agitação na concentração de células livres para diferentes velocidades do agitador.

Tempo (h)	Concentração Celular (g/L)	
	70 min^{-1}	250 min^{-1}
0	0,015	0,015
1,5	0,025	0,025
3	0,046	0,046
4,5	0,076	0,072
6	0,11	0,12
7,5	0,23	0,25
9	0,37	0,37
10,5	0,48	0,52
12	0,82	0,84
12,5	0,82	0,84

A Figura 1 representa uma fermentação cuja amostragem foi conduzida de acordo com esta metodologia desenvolvida.

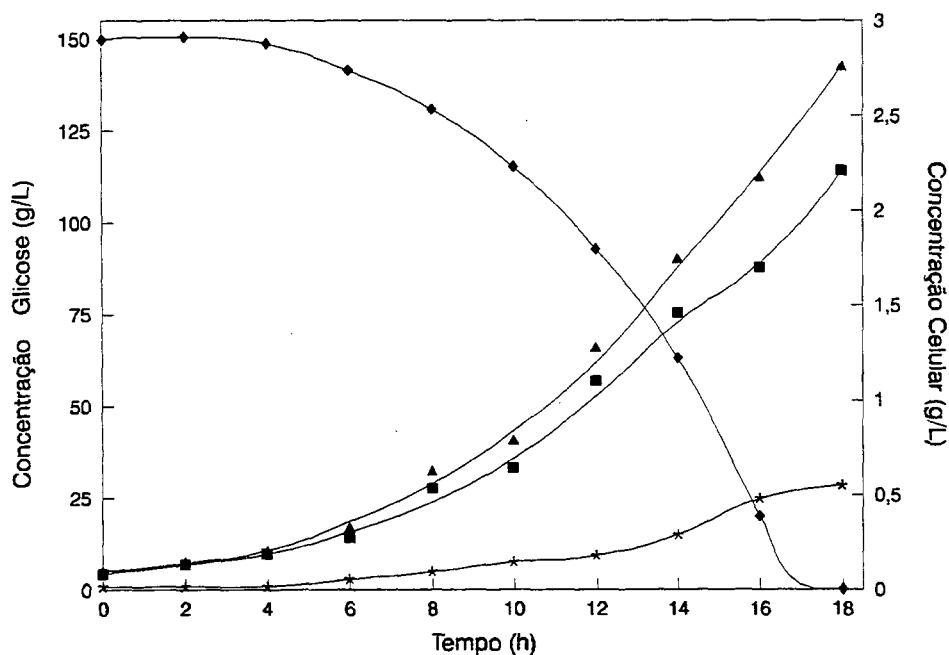


FIGURA 1 - Concentração de células totais (▲), células floculantes (■), células livres (*), e glicose (◆) com o tempo (velocidade do agitador 70 min^{-1} , pH 5,5, temperatura 30°C).

A partir dos resultados experimentais obtidos com a ajuda da metodologia desenvolvida pode-se calcular os parâmetros cinéticos da fermentação ao longo do tempo. A Tabela 2 apresenta um resumo de alguns parâmetros e variáveis da fermentação realizada.

Tabela 2 - Resultados da fermentação em regime batelada com concentração inicial de glicose de 150 g/L .

Concentração de células totais final	2,8	(g/L)
Concentração de células floculantes final	2,2	(g/L)
Concentração de células livres final	0,55	(g/L)
Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)	0,28	(h^{-1})
Fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$)	0,018	(g/g)
Índice de floculação (conc.cél. floculantes/conc.cél totais)	80,1	(%)

4 Conclusões

A metodologia desenvolvida tornou possível, nas fermentações com esta linhagem floculante de *Z. mobilis*, obter-se dados cinéticos confiáveis durante todo processo fermentativo, auxiliando na determinação dos parâmetros e condições ótimas para este microorganismo e para o processo global.

5 Referências Bibliográficas

- DOELLE, H.W.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. Critical Reviews in Biotechnology, 13(1):57-98. 1993
- FEIN, J.E.; LAW FORD, H.G.; LAW FORD, G.R. Biotech. Letters, 5(1):19-24. 1983
- SILVEIRA, M.M.; LOPES DA COSTA, J.P.C.; JONAS, R. P.I. 9403981-0 N/Ref:P 51912, 1994.
- WISBECK, E. Tese de Mestrado, UFSC. 1995.
- ZACHARIOU, M & SCOPES, R.K. J. Bacteriol., 1677:863-869, 1986.

IV.2 – PRODUÇÃO DE GLUCOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE

ARTIGO 2:

**“INFLUÊNCIA DO TEOR DE INÓCULO E DA CONCENTRAÇÃO DE
SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE GLUCOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE
POR LINHAGEM FLOCULANTE DE *Zymomonas mobilis*”**

INFLUÊNCIA DO TEOR DE INÓCULO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE GLUCOSE-FRUTOSE OXIDORREDUTASE POR LINHAGEM FLOCULANTE DE *Zymomonas mobilis*

D. P. Clebsch, A. Furigo Jr., M.M. Silveira

1. INTRODUÇÃO

Através da ação de duas enzimas glucose-frutose oxidorredutase (GFOR) e gluconolactonase (GL), a bactéria *Zymomonas mobilis* é capaz de converter uma mistura de glucose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente (1). A partir desta constatação a obtenção simultânea destes produtos, por processo de biotransformação utilizando células de *Zymomonas mobilis*, passou a ser estudado por diferentes autores (2,3). Com pequenas variações, o processo é realizado, basicamente, em duas fases: (i) obtenção de massa celular, com alta atividade enzimática, e sua concentração por centrifugação e (ii) biotransformação dos açúcares em produtos.

Diferentes linhagens não floculantes de *Z. mobilis* vem sendo empregadas nestes estudos. Considerando, porém, as características do processo de biotransformação, a utilização de uma linhagem floculante de *Z. mobilis* é interessante, tanto técnica quanto economicamente, já que a etapa de centrifugação seria dispensável.

Segundo WISBECK (4), a linhagem floculante Z1-81 de *Z. mobilis* apresenta valores de atividade enzimática suficientemente altos para a sua aplicação neste processo. Entretanto, durante a produção de biomassa, a produtividade em células floculantes é fortemente prejudicada pela agitação branda do sistema, exigida para a preservação da integridade dos flocos, que leva à retenção no meio de níveis elevados de CO₂, um forte inibidor do crescimento *Z. mobilis*. Em seu trabalho WISBECK (4) mostrou, ainda, que o crescimento de *Z. mobilis* Z1-81 é inibido por concentrações elevadas de glucose que, por outro lado, favorecem a atividade de GFOR para esta linhagem.

Neste trabalho foram realizados ensaios em batelada, com diferentes concentrações iniciais de células e glucose, tendo como objetivo principal reduzir o tempo de fermentação e melhorar, deste modo, a produtividade em GFOR contida em células floculantes de *Z. mobilis* Z1-81.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Zymomonas mobilis Z1-81, linhagem floculante cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, foi o microorganismo utilizado.

O meio de fermentação e preparo de inóculos tinha a seguinte composição (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; KH_2PO_4 , 1,0; Extrato de levedura, 5,0. No preparo de inóculos o meio continha 100 g/l de glucose e tampão MES/MES.K 0,2M (2-n-morfolino etano – sulfônico/sal potássico), para controlar o pH em 5,5. Nos ensaios de fermentação, as diferentes concentrações de glucose utilizadas são citadas no texto. As esterilizações foram feitas a 121 °C por 15 minutos.

Os experimentos foram realizados em fermentador de bancada da B.BRAUN, modelo MD, com volume útil de 4 litros, com a temperatura controlada em 30 °C e o pH mantido em 5,5 pela adição de NaOH 3M. A frequência do agitador foi de 70 min^{-1} , com três turbinas tipo Rushton.

A concentração de glucose foi medida pelo método enzimático GOD-POD (CELM). A atividade GFOR/GL, em células floculantes de *Z. mobilis*, foi determinada pelo método descrito por ERZINGER et al. (5), sendo uma unidade (U) de GFOR/GL definida como a massa de ácido glucônico produzido por hora, nas condições do teste (temperatura, 39°C; pH, 6,4; tempo, 20 minutos). Ácido glucônico foi quantificado pelo método enzimático BOERINGER-MANNHEIN. As concentrações celular foram determinadas pela medida de absorvância de suspensões celulares a 560 nm, posteriormente convertida em concentração (g de matéria seca por litro) por uma curva de calibração. Para a determinação total de células, os flocos eram rompidos por passagem através de uma agulha de pequeno calibre. Uma outra fração das amostras era deixada em repouso por 10 minutos, para decantação das células floculantes, sendo feita, então, a medição da concentração de células livre. A concentração de células floculantes foi estimada pela diferença das concentrações de células totais e livres. O índice de floculação foi definido pela relação, em base percentual, entre as concentrações de células floculantes e total.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados e discutidos neste item foram calculados considerando-se, somente, a fração floculante do cultivo (que será recuperada numa eventual ampliação do processo, para a produção de Sorbitol e Ácido glucônico).

A influência do teor de inóculo sobre a atividade de GFOR/GL pode ser avaliada pelos dados da Tabela 1, obtidos em ensaios com concentração inicial de glucose de cerca de 150 g/L. Como mostrado nesta tabela, a produtividade em GFOR/GL foi sensivelmente favorecida quando a concentração celular inicial foi de 0,23 g/L. Este resultado deve ser atribuído a um efeito combinado do menor tempo de processo e do maior índice de floculação alcançado neste caso. O índice de floculação, por sua vez, é dependente do cisalhamento provocado pelo sistema de agitação que, em ensaios com maior duração, levam a um maior grau de destruição dos agregados celulares. Os valores mais altos de conversão neste ensaio podem ser explicados pelos mesmos motivos.

Tabela 1 – Influência do teor de inóculo sobre a atividade de glucose-frutose oxidorreductase em células floculante de *Zymomonas mobilis* Z1-81 cultivadas em batelada.

Ensaio	01	02	03
Conc. celular inicial (g/L)	0,04	0,08	0,23
Índice de floculação (%)	79,1	80,0	86,8
Atividade específica (U/g cél.)	14,1	13,7	14,0
Atividade total (U/L)	33,4	30,3	35,0
Produtividade (U/L.h)	1,67	1,68	2,50
Conversão (U/g glucose)	0,21	0,20	0,24
$Y_{XF/S}$ (g cél. floc / g glucose)	0,013	0,014	0,016

Os ensaios que visaram avaliar a influência da concentração inicial de glucose (S_0), sobre os resultados do processo, foram feitos com concentrações celulares iniciais próximas a 0,25 g/L.

A Tabela 2 mostra uma tendência de aumento da atividade específica de GFOR/GL com o aumento da concentração inicial de substrato (S_0) até 200 g/L. Estes resultados confirmam os de WISBECK (4) e estão de acordo, também, com as conclusões de ZACHARIOU & SCOPES (1), para a enzima livre.

Entretanto, ERZINGER et al. (6) relatam que as altas concentrações de etanol, atingidas com S_0 superiores a 150 g/L, levam a uma drástica redução da atividade de GFOR/GL em células integras de *Z. mobilis* ATCC-29191 (não floculante) devido a modificações na estrutura da parede celular do microrganismo que prejudicariam o transporte dos substratos à enzima GFOR/GL. Estas modificações na estrutura da parede celular podem estar sendo minimizadas pelo material que promove a agregação das bactérias protegendo a enzima GFOR/GL no processo com *Z. mobilis* Z1-81.

Tabela 2 – Influência da concentração inicial de glucose sobre a atividade de glucose-frutose oxidoreductase em células floculantes de *Zymomonas mobilis* Z1-81 cultivadas em batelada.

Ensaio	01	02	03	04
Conc. inicial de glucose (g/L)	48	107	146	203
Índice de floculação (%)	89,8	87,8	86,8	64,2
Atividade específica (U/g cél.)	10,2	12,6	14,0	14,5
Atividade total (U/L)	17,9	30,6	35,0	16,1
Produtividade (U/L.h)	2,75	2,83	2,50	0,16
Conversão GFOR/GL (U/g glucose)	0,37	0,29	0,24	0,08
$Y_{XF/S}$ (g cél. floc / g glucose)	0,031	0,021	0,016	0,005

As produtividades em GFOR/GL, com S_0 até 146 g/L, foram, em média, dezessete vezes mais altas que a alcançada com $S_0=203$ g/L. Além da já mencionada dependência que tem a produtividade com índice de floculação e do tempo de processo que nestes ensaios foi influenciado, também, pela inibição pelo substrato, a indução da atividade enzimática pela glucose desempenhou um papel importante na definição destes valores. No caso da conversão de substrato em atividade enzimática, devido à inibição pelo substrato observou-se um decréscimo com o aumento da concentração inicial de glucose, embora os índices de floculação com S_0 até 146 g/L tenham sido semelhantes e as atividades específicas crescentes.

4. CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios com diferentes teores de inóculo demonstram ser vantajoso, tanto em termos de produtividade quanto em termos de rendimento, o emprego de concentrações celulares iniciais elevadas. Neste caso um processo com reaproveitamento de parte de parte da cultura flocculante, para inocular a batelada seguinte, parece ser adequado. Testes preliminares (dados não publicados) mostram que esta modalidade de processo é perfeitamente viável, principalmente tendo-se em conta a estabilidade genética de *Z. mobilis* e o fato de cultivos desta bactéria, devido ao seu antagonismo contra vários microorganismos, dificilmente apresentarem contaminação.

Com relação à influência da concentração de glucose, os dados deste trabalho sugerem que, para a produção em batelada de biomassa com alta atividade em GFOR/GL, concentrações de glucose em torno de 150 g/l devam ser utilizadas. Por outro lado, o etanol produzido, em associação ao crescimento celular, pode se constituir num subproduto importante para a economia do processo de produção de sorbitol e ácido glucônico. Esta possibilidade é reforçada pela capacidade que tem a linhagem Z1-81 de gerar concentrações elevadas de álcool (93 g/L com $S_0=203$ g/L), sem prejuízo da atividade enzimática. Nesta hipótese, porém, face à forte inibição do crescimento microbiano por concentrações de substrato desta ordem, a execução do processo em regime descontínuo alimentado é indicada.

5. REERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ZACHARIOU, M. ; SCOPES, R. K. . Glucose-Fructose Oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.3, n.167, p.863-869, 1986.
- (2) CHUN, U. H. ; ROGERS, P. L. . The simultaneous production of Sorbitol from Fructose and Gluconic Acid from Glucose using na oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, v.29, p.19-24, 1988
- (3) SILVEIRA, M.M. ; COSTA, J. P. ; JONAS, R. . Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, Joinville-BR. Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácido glucônico ou gluconato. P.I. 9403981-0, N/Ref:P.51912, outubro, 04, 1994.
- (4) WISBECK, E. **Estudo da produção de glucose-frutose oxidoreductase por linhagem flocculante de *Zymomonas mobilis***. Florianópolis, 1995. 119p. (Dissertação, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina).
- (5) ERZINGER, G. S. ; SILVEIRA, M. M. ; VITOLO, M. ; JONAS, R. . Determination of Glucose-Fructose Oxidoreductase activity in whole cells of *Zymomonas mobilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1995.
- (6) ERZINGER, G. S. ; SILVEIRA, M. M. ; VITOLO, M. ; JONAS, R. . Influência da concentração de glucose sobre a formação de glucose-frutose oxidoreductase por *Zymomonas mobilis*. 2º Seminário Nacional sobre Tecnologia Enzimática/ENZITEC 1995. Rio de Janeiro- RJ, 25-27/10/95.

IV.3 DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE CULTIVO DO INÓCULO

No estudo de WISBECK (1995), com a bactéria *Zymomonas mobilis* Z1-81, para a produção de ácido glucônico e sorbitol, a autora descreve a realização da etapa de inóculo de forma estática. Este procedimento não proporciona uma boa transferência de massa, dificultando a assimilação de substratos e a eliminação de produtos. Este retrospecto foi o ponto de partida para o início dos estudos deste capítulo, visando otimizar esta etapa.

Conforme já descrito por vários autores (DOELLE et al., 1993; ERZINGER, 1996; CDB, 1994), a formação de CO₂ em um processo de conversão de glucose em etanol por *Z. mobilis* é muito intensa tornando-se inibitória ao crescimento celular. Outros autores (VEERAMALLU & AGRAWAL, 1986) reportam que retirando-se continuamente o CO₂ formado, obtiveram resultados cerca de 12 % maiores na massa total de células produzidas.

Outro parâmetro importante a ser avaliado nesta etapa (com inóculo realizado de forma estática) é a aglutinação/agregação de toda a população floculante na superfície do frasco (devido à grande quantidade de gás CO₂), dificultando, desta forma, ainda mais, os mecanismos de transferência de massa (condição de idealidade) necessários a um bom desenvolvimento celular e formação dos produtos desejáveis.

Desta forma, foi desenvolvido um processo em que o inóculo cresce sob agitação. Por outro lado é necessário ter em consideração que a agitação tem uma influência negativa na agregação de células com características floculantes (WISBECK, 1995). Assim, foi estabelecida uma agitação para esta etapa considerada moderada (agitação circular de 150 min⁻¹), quando comparada a processo de inóculo com células de *Zymomonas mobilis* não-floculantes (400 min⁻¹) (ERZINGER, 1996).

Foram realizados, então, dois ensaios para a determinação da concentração celular e, também, para a determinação do tempo ideal para inoculação no fermentador principal, isto é, a obtenção da fase exponencial de crescimento. A Figura IV.3.1 apresenta os dois ensaios realizados em frasco agitado.

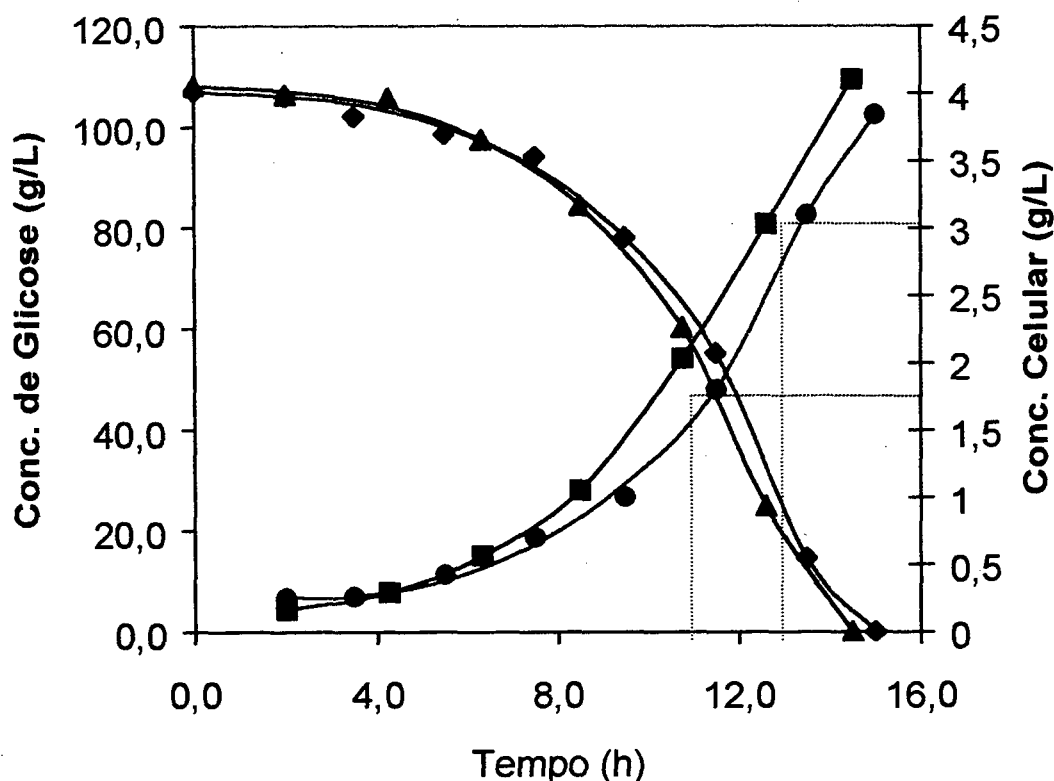


Figura IV.3.1: Concentração de células totais e de glicose em função do tempo, em frasco agitado Ensaio 1 (♦ •); Ensaio 2 (■ ▲) ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5,5$; agitação circular de 150 min^{-1}).

Desta forma foi possível determinar o tempo necessário para atingir-se a quantidade e a qualidade de células para cada estudo cinético deste trabalho. Ficou definido pela curva resultante da Figura IV.3.1 que o tempo de fermentação de inóculo ideal, para uso no fermentador principal, é entre 10 a 13 horas. Para este intervalo de tempo a concentração celular do inóculo está entre 1,8 e 3,0 g/L, aproximadamente. Assim, dependendo da concentração celular inicial necessária no fermentador principal, tomava-se parte ou todo o volume do frasco de inóculo e procedia-se a inoculação. Os valores dos resultados experimentais na Figura IV.3.1 encontram-se no Anexo A 3.

Com o intuito de comparar o desempenho do inóculo estático e com agitação, foram realizados dois ensaios completos (inóculo + etapa de fermentação). Os resultados finais da etapa de fermentação são apresentados na Tabelas IV.3.1.

Tabela IV.3.1 : Resultados finais das fermentações em que foram utilizados o inóculo estático e o inóculo com agitação.

	Inóculo estático	Inóculo com agitação
Rendimento Etanol (%)	81,0	84,0
ΔX_t (g/L)	2,68	2,80
IF (%)	72,0	78,0
Tempo de processo (h)	21,0	13,0

O desenvolvimento do processo de fermentação com a utilização do inóculo com agitação apresentou melhores resultados que o processo em que foi utilizado o inóculo de forma estática, pois a concentração celular atingida (proporcional à concentração inicial do fermentador) com agitação é aproximadamente 3 vezes superior que de forma estática, na etapa de produção do inóculo. Nota-se, também, que não houve prejuízo no índice de floculação. Além disto, o tempo de desenvolvimento do inóculo com agitação (~12 horas) foi inferior ao tempo de desenvolvimento do inóculo estático (~17 horas).

A maior concentração celular obtida utilizando o inóculo com agitação reflete-se numa maior produtividade em células e produtos sem o prejuízo do índice de floculação (Tabela IV.3.1).

IV.4 ALTERNATIVAS ECONÔMICAS DE PRODUÇÃO DA ENZIMA GFOR

Diante da possibilidade da produção em escala industrial de Glucose-Frutose Oxidorredutase (GFOR) e etanol, foram realizados 3 ensaios com o intuito de avaliar alternativas para a substituição do extrato de levedura utilizado no meio nutriente. A principal razão para a substituição do extrato de levedura é a sua influência no custo final do processo, já que há fontes de nutrientes nacionais disponíveis e de baixo custo, como resíduos agro-industriais.

Foram estudados dois produtos disponíveis no mercado como alternativa ao extrato de levedura. Um resíduo da indústria do amido de milho, rico também em nitrogênio, conhecido como milhocina, e outro, resíduo da indústria alcooleira, que consiste, basicamente, num extrato de levedura com um teor de pureza menor, com um certo grau de umidade, comercializado como Prodex.

A Tabela IV.4.1 mostra os custos de cada um destes produtos. Pode-se verificar a grande diferença em relação ao extrato de levedura.

Tabela IV.4.1 : Comparação de custos da utilização de Extrato de levedura, Prodex e Milhocina (Dados de 1995).

Composto	Kg (por Ton de meio de crescimento)	Custo aproximado em \$ por kg
Extrato de levedura	5	3,00
Prodex	6	0,60
Milhocina	20	0,15

Os ensaios foram realizados com concentrações de milhocina de 17,5 e 20,0 g/L. Estas quantidades foram definidas como suficientes em outros trabalhos realizados no CDB (1994) (uma relação de 4 vezes a quantidade de extrato de levedura) para a condução de um processo idêntico ao discutido neste trabalho, porém, com cepas diferentes de *Zymomonas mobilis*. Também foi realizado um ensaio em que foi utilizado, como substituto ao extrato de levedura, 6,0 g/L de Prodex (condição definida

pela umidade presente no composto, em torno de 20 %). Assim, o meio de crescimento no fermentador principal foi alterado, retirando-se o extrato de levedura e adicionando-se estes compostos.

A Tabela IV.4.2 apresenta a variação dos valores iniciais e finais das variáveis e os parâmetros obtidos nos ensaios realizados. Inclui-se nessa tabela um resultado experimental utilizando extrato de levedura para efeitos comparativos. Os perfis cinéticos dos ensaios realizados são detalhados no anexo A 4.

A maior concentração celular obtida em todos os ensaios realizados neste trabalho foi no ensaio com 20,0 g/L de milhocina, onde atingiu-se 3,2 g/L, o que corresponde a um ganho de 10 % quando comparado ao processo de fermentação com extrato de levedura. Entretanto o índice de floculação foi um pouco menor, gerando assim, ao final do ensaio uma quantidade um pouco menor de células floculantes (<5%).

Os rendimentos e produtividades em etanol também atingiram valores próximos aos demais ensaios com extrato de levedura, alcançando-se valores de rendimento maiores que 85%. Em alguns casos o rendimento menor em etanol pode estar associado a alguma perda durante o processo devido a problemas no resfriamento dos gases de saída do fermentador, carregando, assim, algumas frações de etanol junto com os gases resultantes do processo.

Os resultados em atividade específica, nos ensaios com milhocina, apresentaram valores inferiores aos demais ensaios. Estes valores de atividade específica, independentemente da concentração inicial deste composto foram em torno de 11 U/g, demonstrando assim, a falta de algum composto básico ou inibição por algum produto no composto para a formação da enzima GFOR. Contudo são necessários ensaios com concentrações maiores de milhocina para a verificação da utilização deste produto na produção de GFOR, que pode estar sendo prejudicado pela falta de alguma vitamina/nutriente.

Porém, no ensaio com Prodex, os valores de atividade específica foram muito próximos aos demais (próximo a 14 U/g), entretanto, devido à obtenção de uma menor massa celular floculante, a atividade global floculante foi em torno de 20% menor.

Os tempos de fermentação nestes ensaios tiveram uma pequena variação, quando comparados aos ensaios com extrato de levedura (item IV.2). Esta variação muito provavelmente está associada à uma variação na concentração inicial da concentração celular, que não foi igual para todos os ensaios e, também, a uma variação na concentração inicial de glucose.

De acordo com a tabela dos custos (Tabela IV.4.1) e os resultados experimentais obtidos (Tabela IV.4.2) podemos concluir que milhocina e extrato de levedura Prodex são bastante promissores e podem, sem maiores problemas, serem utilizados neste tipo de processo.

Tabela IV.4.2: Resultados gerais dos ensaios com meios alternativos ao Extrato de Levedura.

Ensaio	T (h)	Subst. EL(g/L)	ΔS (g/L)	ΔP (g/L)	X_{dt} (g/L)	ΔX_T (g/L)	ΔX_F (g/L)	ΔX_L (g/L)	IF (%)	A (U/g)	A_{GT} (U/L)	A_{GF} (U/L)
Ext. lev	14,0	5,0	143,3	69,8	0,230	2,61	2,28	0,33	86,8	13,97	40,37	35,06
Prodex	16,0	6,0	154,0	70,6	0,267	2,41	1,85	0,56	78,5	14,45	38,73	30,34
Milhocina	16,5	20	173,0	74,5	0,160	3,04	2,19	0,85	72,1	10,49	33,57	24,34
Milhocina	14,5	17,5	157,9	69,1	0,233	2,75	2,10	0,64	76,5	11,65	34,71	26,44

Tabela IV.4.2 (Cont.): Resultados gerais dos ensaios com meios alternativos ao Extrato de Levedura (EL).

Ensaio	R (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/T/S}$	$Y_{X/F/S}$	$Y_{X/L/S}$	$Y_{AGT/S}$ (U/g)	$Y_{AGF/S}$ (U/g)	P (g/L.h)	P_{AGT} (U/L.h)	P_{AGF} (U/L.h)
Ext. lev	93	0,49	0,018	0,016	0,002	0,28	0,24	4,99	2,88	2,50
Prodex	93	0,46	0,016	0,012	0,004	0,25	0,20	4,41	2,42	1,90
Milhocina	78	0,40	0,018	0,013	0,005	0,20	0,14	4,20	2,03	1,47
Milhocina	86	0,44	0,017	0,013	0,004	0,21	0,18	4,80	2,39	1,82

IV.5 - ENSAIOS EM REGIME DE BATELADA ALIMENTADA

Neste item estão descritos os ensaios que tiveram por objetivo avaliar o efeito do etanol sobre o crescimento celular, e a atividade da glucose-frutose oxidoreductase, visto que, como já descrito neste trabalho, *Zymomonas mobilis* Z1-81 sofre inibição em concentrações iniciais de substrato próximas a 200 g/L.

Desta forma, foram realizados dois ensaios em regime batelada alimentada objetivando alcançar-se uma maior produtividade em etanol do que as alcançadas no ensaio com $S_0 = 200$ g/L, porém evitando-se as inibições durante a fase de crescimento microbiano pelo substrato. A obtenção de resultados de atividade enzimática compatíveis com os resultados já obtido em ensaios de batelada também foi avaliada. Ensaio semelhantes foram realizados por outros autores (ERZINGER, 1996 ; SILMAN, 1984 ; ROELS et al., 1987),

Os parâmetros como temperatura, pH, frequência de agitação e meio de crescimento estão descritos no capítulo Materiais e Métodos. A concentração dos nutrientes no meio de alimentação foi a mesma do meio de crescimento.

As condições para estes ensaios foram determinadas de acordo com os principais resultados obtidos nos ensaios em batelada até aqui realizados. Assim, a concentração inicial de substrato foi em torno de 150 g/L, já que, com estes valores, foram obtidos bons resultados de atividade enzimática (próximas a 14 U/L), um maior crescimento celular (2,8 – 2,9 g/L) e bons rendimentos em etanol (~90 %). O início da dosagem foi estabelecida quando a concentração de glucose no fermentador atingiu uma concentração próxima a 100 g/L. A vazão de meio nutriente e glucose foi mantida constante a 0,114 L/h. Este valor foi determinado de acordo com as velocidades de consumo de substrato nos ensaios com $S_0 = 150$ g/L. Somente foram realizados ensaios com estes parâmetros, visto que, de acordo com SILMAN (1983) a velocidade de alimentação não influencia significativamente a produção de etanol em regime descontínuo alimentado por *Z. mobilis*.

Na Tabela IV.5.1 são apresentados os resultados gerais obtidos ao final de cada ensaio e, também, o resultado de um ensaio já discutido no item IV.2, como valores de comparação. Nas Figuras IV.5.1 e IV.5.2 são mostrados os perfis cinéticos obtidos.

Tabela IV.5.1: Resultados gerais dos ensaios em batelada alimentada.

Ensaio	T (h)	ΔS (g/L)	ΔP (g/L)	ΔX_T (g/L)	ΔX_F (g/L)	ΔX_L (g/L)	IF (%)	A_i (U/g)	A (U/g)	A_{GT} (U/L)	A_{GF} (U/L)
Ensaio 1	30,0	204,0	101,6	2,51	2,02	0,49	81,1	14,91	13,64	38,19	30,96
Ensaio 2	30,5	197,2	99,7	2,65	2,06	0,59	78,8	-	-	-	-
Refer	99,0	203,3	93,0	1,55	0,96	0,59	64,2	-	14,46	25,01	16,05

Tabela IV.5.1 (cont): Resultados gerais dos ensaios em batelada alimentada.

Ensaio	R (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{XT/S}$	$Y_{XF/S}$	$Y_{XL/S}$	$Y_{AGT/S}$ (U/g)	$Y_{AGF/S}$ (U/g)	P (g/L.h)	P_{AGT} (U/L.h)	P_{AGF} (U/L.h)
Ensaio 1	97,6	0,50	0,012	0,010	0,002	0,19	0,15	3,39	1,27	1,03
Ensaio 2	99,1	0,50	0,013	0,010	0,003	-	-	3,27	-	-
Refer.	90,0	0,46	0,008	0,005	0,003	0,12	0,08	0,94	0,25	0,16

Nos ensaios aqui discutidos, foram alcançados valores de concentração celular e atividade enzimática muito próximos aos obtidos nos ensaios em regime descontínuo com $S_0 = 150$ g/L. Esses resultados são 2,8 g/L e 13,64 U/g, para concentração celular e atividade específica, respectivamente.

Comparando-se a batelada alimentada realizada com o ensaio em batelada com $S_0 = 200$ g/L, pode-se notar a eficiência da batelada alimentada. Obteve-se 2,8 g/L de concentração celular contra 1,7 g/L em regime batelada. Apesar da alta atividade específica em GFOR no processo batelada, a atividade global em GFOR é o dobro maior no processo batelada alimentada.

Outro parâmetro de grande variação, quando comparamos o processo descontínuo e o processo em discussão (batelada alimentada), são os valores de produtividades. No processo em regime descontínuo com $S_0 = 203$ g/L a produtividade em atividade presente nas bactérias floculantes e a produtividade em etanol foram de 0,16 U/L.h e 0,94 g/L.h, respectivamente, enquanto que nos ensaios em regime de batelada alimentada, os respectivos valores foram de 1,03 U/L.h e 3,33 g/L.h (6,4 e 3,5 vezes maiores, respectivamente).

O crescimento celular alcançou valores próximos aos alcançados nos ensaios com $S_0 = 100$ e 150 g/L ($\sim 2,8$ g/L), confirmando a inibição do crescimento celular por concentrações de glucose maiores que 200 g/L. Contudo, a obtenção de uma maior concentração celular, o que determinaria uma maior quantidade de GFOR, parece estar associada à quantidade de nutrientes presentes no meio de crescimento/alimentação e também à concentração de etanol+CO₂, conforme já discutido em capítulos anteriores.

Nestes ensaios, da mesma forma que no ensaio já discutido com $S_0 = 200$ g/L, a diminuição/parada do crescimento celular ocorre em concentrações de etanol próximas a 80 g/L. Estes resultados também foram discutidos por ERZINGER (1996), em que, para um ensaio idêntico ao aqui discutido, porém, utilizando-se um reator com extração de etanol (vácuo), obteve concentrações celulares de *Z. mobilis* 30 % maiores. Isto devido ao fato da concentração dentro do reator não atingir valores acima de 70 g/L. Este mesmo autor obteve valores muito superiores em atividade enzimática, em ensaios realizados com vácuo.

Como conclusão dos testes e análises realizadas pode-se afirmar que se o objetivo for produzir apenas GFOR a operação em batelada alimentada não é compensadora, pois apresenta valores de produtividades em GFOR menores que os em batelada, apesar de os níveis de GFOR serem semelhantes nos dois primeiros processos. Porém, se o objetivo for produzir não só GFOR, mas também etanol, o processo batelada alimentada é compensador pois obtêm-se uma maior produtividade em etanol que o batelada.

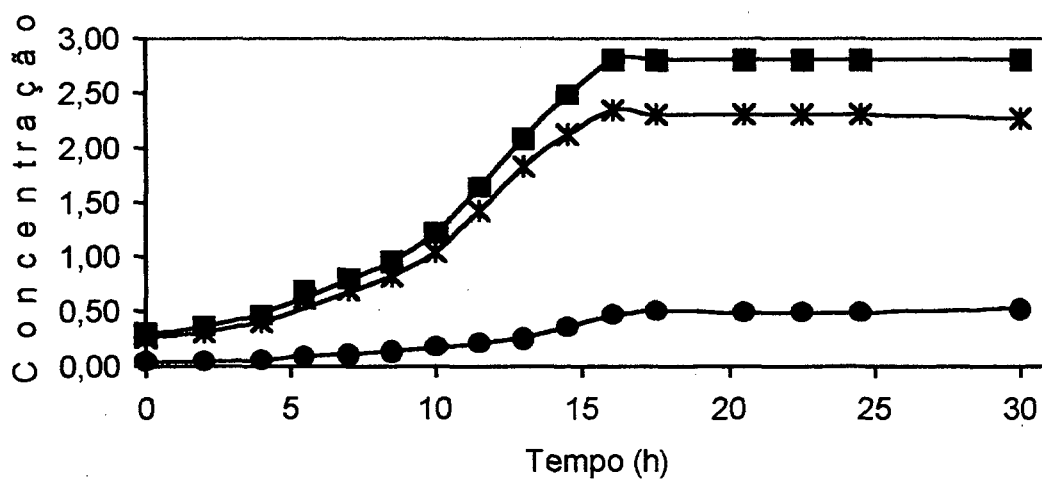
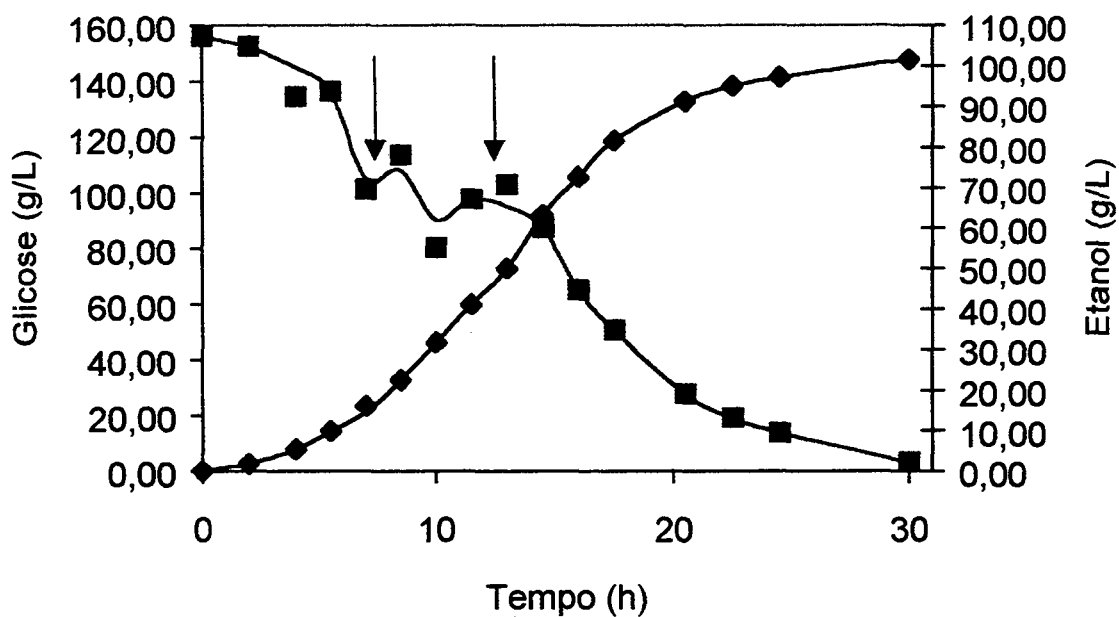


Figura IV.5.1 : Concentração de glucose (■), etanol (◆) e concentração de células totais (■), floculantes (*) e livres(●) em função do tempo. Ensaio 1, em regime batelada alimentada ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$; frequência do agitador = 70 min^{-1}). As setas indicam o início e o final da alimentação.

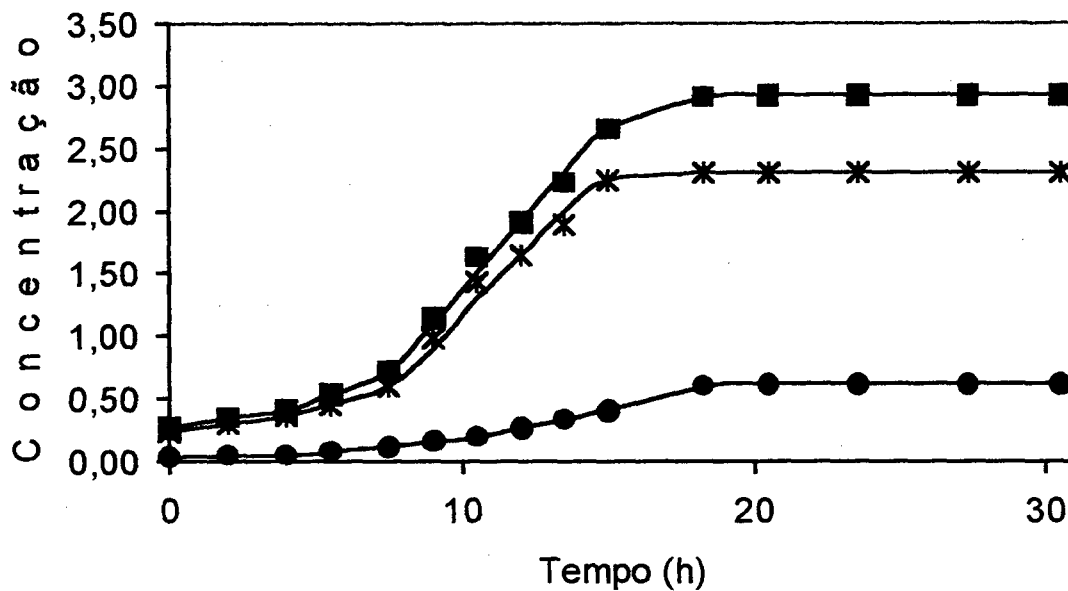
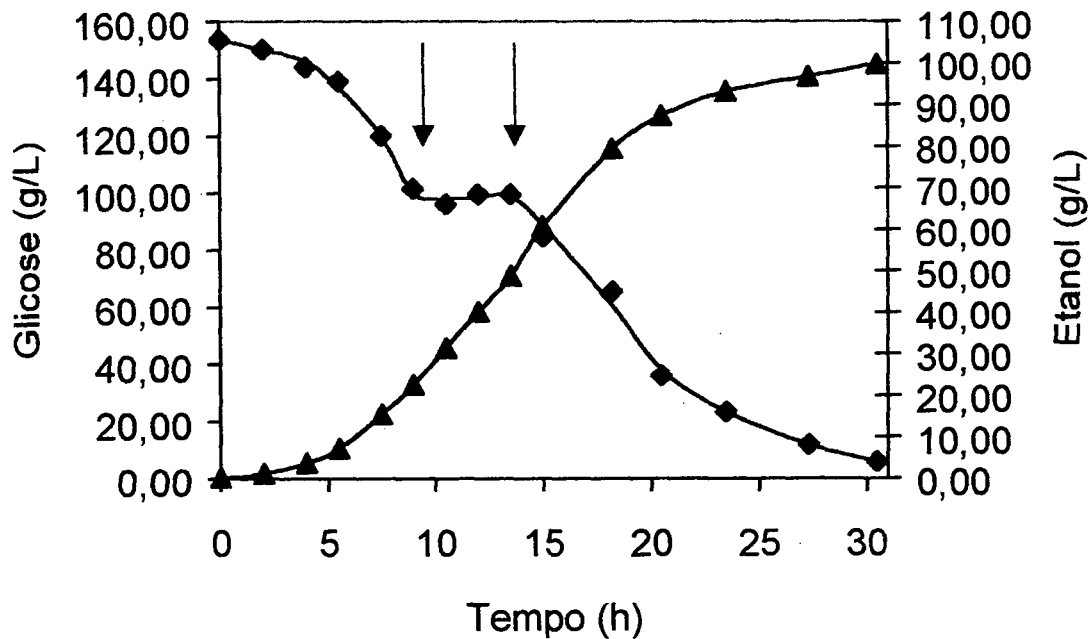


Figura IV.5.2: Concentração de glicose (■), etanol (◆) e concentração de células totais (■), floculantes (*) e livres (●) em função do tempo. Ensaio 2, em regime batelada alimentada ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$; frequência do agitador = 70min^{-1}). As setas indicam o início e o final da alimentação.

IV.6 SIMULAÇÃO DA CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO

Verificou-se neste capítulo, a possibilidade da utilização de um modelo matemático já conhecido, para a realização de uma simulação numérica dos ensaios em que variou-se a concentração inicial de substrato (S_0) em regime batelada (item IV.2). O desenvolvimento de um modelo cinético tem como principal objetivo fornecer informações básicas para o processo de produção de etanol e células (consequentemente Glucose-Fructose Oxidorredutase (GFOR)) por *Zymomonas mobilis*, bem como, de estabelecer estratégias ótimas para atingir a melhor performance deste processo.

De acordo com a literatura encontrada, poucos são os modelos matemáticos descritos para o estudo cinético de *Z. mobilis*. O modelo adotado para este item foi o descrito por ALVES (1993), em que o autor descreve o modelo não estruturado proposto por VEERAMALU & AGRAWAL (1990), que foi utilizado para descrever a fermentação da cepa ATCC10988.

Este modelo não estruturado desenvolvido pelos autores acima citados apresenta os seguintes pressupostos básicos (ALVES, 1993; VEERAMALU & AGRAWAL, 1990):

- crescimento balanceado;
- microorganismo já adaptado ao meio de cultura;
- glucose é o substrato limitante do crescimento, todos os outros nutrientes e micronutrientes encontram-se em excesso no meio de cultura.

As equações de balanço material para reatores perfeitamente agitados em operação batelada de volume constante são descritas como segue:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{IV.6.1})$$

$$-\frac{dS}{dt} = \theta X \quad (\text{IV.6.2})$$

$$\frac{dE}{dt} = \pi X \quad (\text{IV.6.3})$$

Onde: $X(0) = X_0$;

$S(0) = S_0$;

$E(0) = E_0$;

e:

- X concentração mássica de células, g de células secas/L
- S concentração de glucose, g/L
- E concentração de etanol g/L
- μ velocidade específica de crescimento celular, gX/(gX.h)
- θ velocidade específica de consumo de glucose, gS/(gX.h)
- π velocidade específica de produção de etanol, gE/(gX.h)
- t tempo, h
- X_0 , S_0 e P_0 relativos à valores de condição inicial.

O modelo cinético proposto utiliza o modelo de Monod como base para montagem do modelo da velocidade específica de crescimento celular.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_m + S} \quad (\text{IV.6.4})$$

Este modelo é limitado, pois não considera fenômenos causados por concentrações elevadas de substrato e produto. Sabe-se que o crescimento de *Z. mobilis* é inibido em concentrações elevadas de glucose e etanol.

Uma modificação do modelo de Monod que considera a inibição por etanol e representa bem os dados experimentais é descrita como segue:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{k_1/X + S} (1 - E/E_{\text{sat}}) \left[1 - \exp(-k_2 X/S) \right] \left\{ 1 - \exp[-k_3(S + k_4)/E^m] \right\} \quad (\text{IV.6.5})$$

$$\theta = \frac{\mu_{\max} S}{k_1/X + S} \frac{1}{Y_{x/s}} (1 - E/E_{\text{sat}}) \left\{ 1 - \exp\left[-k_5 \frac{(S + k_4)}{E}\right] \right\} \quad (\text{IV.6.6})$$

$$\pi = \theta Y_E / S \quad (\text{IV.6.7})$$

onde:

$Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$ são coeficientes globais de conversão de glucose em biomassa e de glucose em etanol, respectivamente. k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , E_{sat} e m são parâmetros do modelo.

O termo (k_1/X) ajusta os dados experimentais da dinâmica do reator batelada, para concentrações reduzidas de glucose. O termo $(1-E/E_{\text{sat}})$ representa a inibição no crescimento celular e na assimilação de substrato causado pelo etanol. O termo $[1-\exp(-k_2 X/S)]$ torna a velocidade de crescimento específica mais lenta quando a relação entre a concentração de células e a concentração de glucose é elevada. Esta situação geralmente ocorre no início das fermentações em batelada. O parâmetro k_2 pode ser entendido como um reflexo da qualidade do inóculo na dinâmica de crescimento do microorganismo. Nas simulações, este parâmetro é utilizado para ajustar o modelo aos diferentes experimentos. Os termos $\{1-\exp[-k_3(S+k_4)/E^m]\}$ e $\{1-\exp[-k_5(S+k_4)/E]\}$ tornam mais lentas as taxas específicas de crescimento celular e de consumo de glucose no final da fermentação em batelada, quando a concentração de glucose é baixa e a de etanol é relativamente alta.

O autor (ALVES, 1993) relata que os termos k_3 e k_5 que são utilizados nas equações para indicarem diminuições nas velocidades de consumo de substrato e de crescimento celular no final da fermentação, podem ser considerados infinitos, não sendo necessário definir e utilizar estes termos no modelo.

Os valores do fator de conversão foram obtidos experimentalmente sendo:

- $Y_{X/S}$ no ensaio com $S_0 = 50 \text{ g/L} = 0,035$
- $Y_{X/S}$ no ensaio com $S_0 = 100 \text{ g/L} = 0,023$
- $Y_{X/S}$ no ensaio com $S_0 = 150 \text{ g/L} = 0,018$

Os parâmetros k_1 , k_2 e E_{sat} foram ajustados visualmente através de simulações em computador das fermentações, utilizando o programa Polymath. Os valores desses parâmetros obtidos para o presente trabalho são os seguintes:

- k_1 foi constante em todos os ensaios $= 0,025 \text{ (g/L)}^2$
- k_2 no ensaio com $S_0 = 50 \text{ g/L} = 350$
- k_2 no ensaio com $S_0 = 100 \text{ g/L} = 450$
- k_2 no ensaio com $S_0 = 150 \text{ g/L} = 375$
- E_{sat} foi estabelecido entre 140-160 (g/L)

As Figuras IV.6.1, IV.6.2 e IV.6.3 a seguir mostram os pontos experimentais e os resultados obtidos nas simulações numéricas.

Conclui-se que o modelo de crescimento, consumo de substrato e formação de produtos desenvolvido por ALVES (1993) pode representar bem a cinética do processo fermentativo por *Z. mobilis*. Sugere-se um trabalho mais completo envolvendo estimativa de parâmetros e análise de sensibilidade desses parâmetros para o desenvolvimento do modelo.

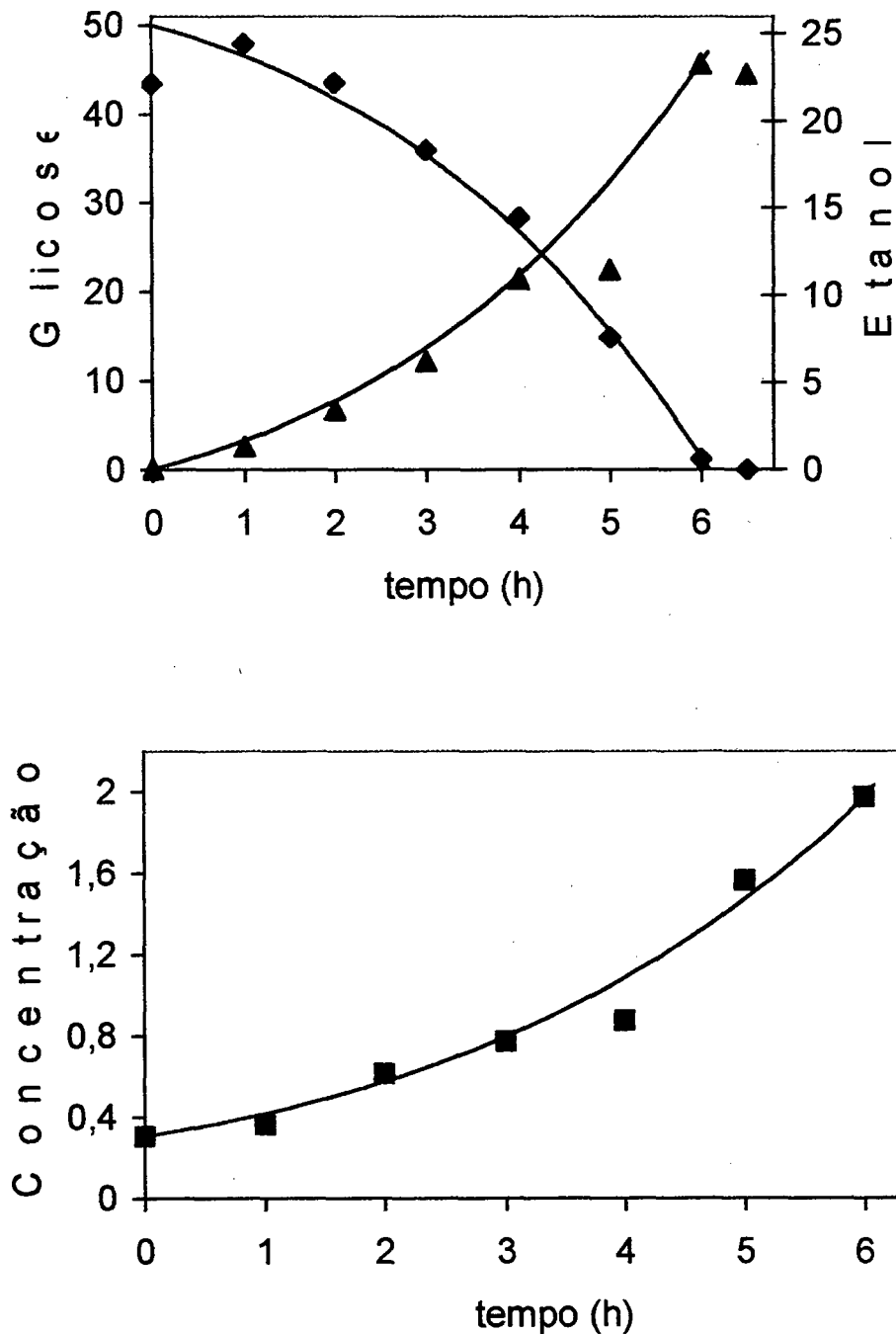


Figura IV.6.1 : Concentração de glucose (\diamond), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), em função do tempo, para os dados experimentais . As linhas correspondem ao perfil resultante da simulação numérica. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1} ; $S_0 = 50 \text{ g/L}$).

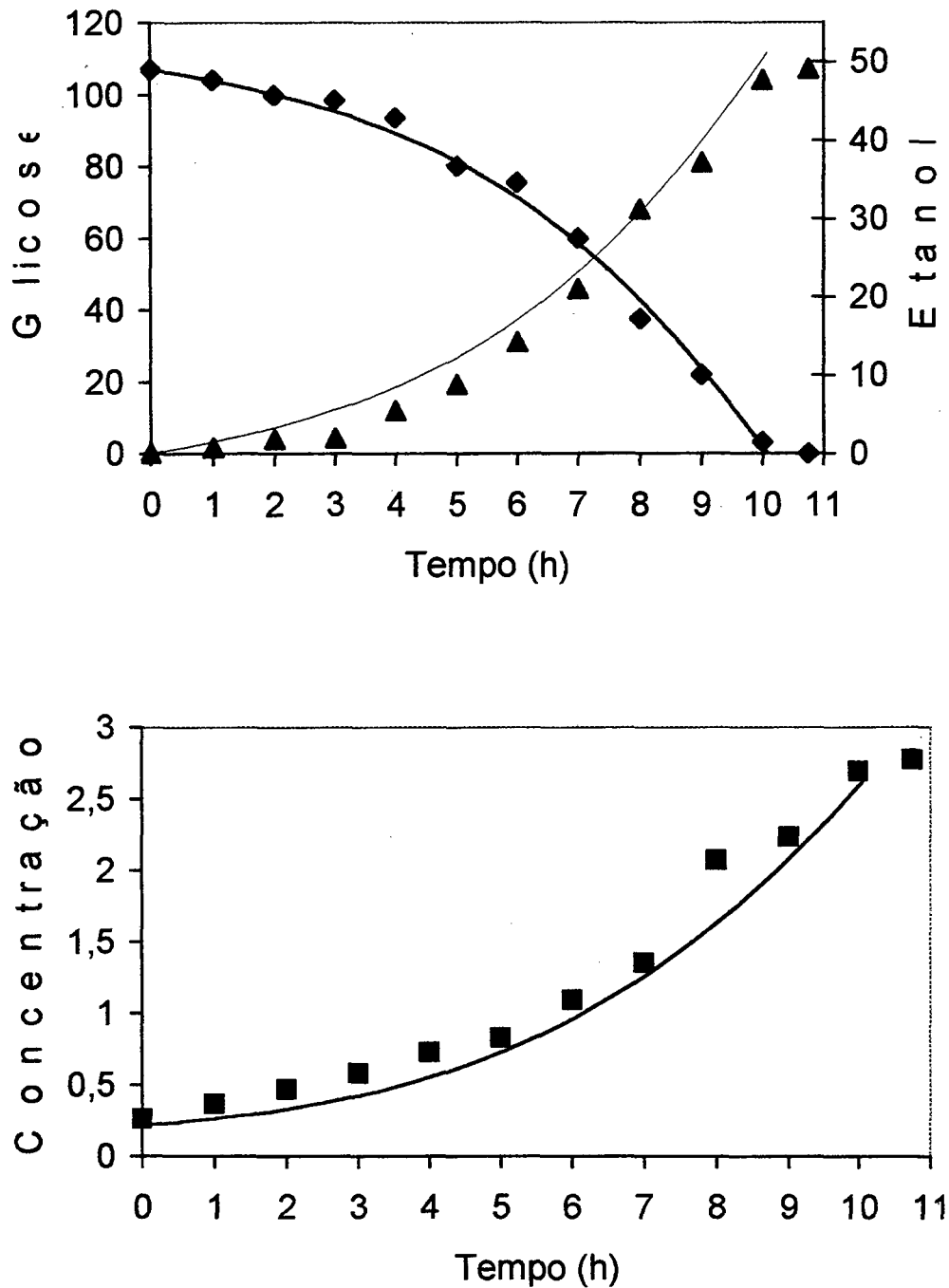


Figura IV.6.2 : Concentração de glicose (\diamond), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare) em função do tempo, para os dados experimentais . As linhas correspondem ao perfil resultante da simulação numérica. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1} ; $S_0 = 100 \text{ g/L}$).

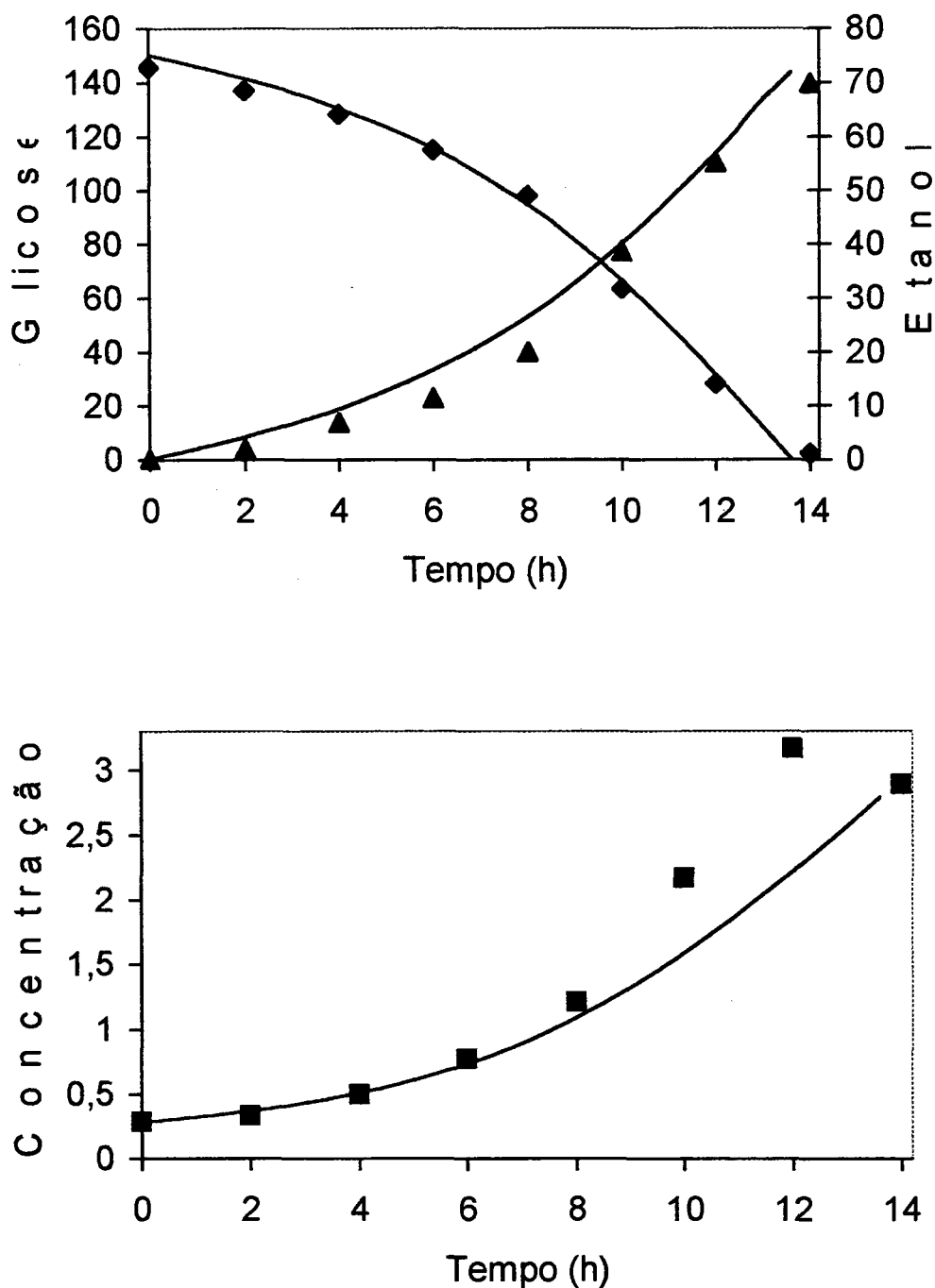


Figura IV.6.3 : Concentração de glucose (\diamond), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare) em função do tempo, para os dados experimentais . As linhas correspondem ao perfil resultante da simulação numérica. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1} ; $S_0 = 150 \text{ g/L}$).

IV.7 BIOTRANSFORMAÇÃO DE GLUCOSE E FRUTOSE EM ÁCIDO GLUCÔNICO E SORBITOL.

Foi realizado, como conclusão aos tópicos até aqui estudados, um ensaio de biotransformação com a finalidade de verificar o comportamento da enzima Glucose-frutose Oxidorredutase na biotransformação de glucose e frutose a ácido glucônico e sorbitol, respectivamente com células de *Zymomonas mobilis* Z1-81, crescidas em processo de fermentação com concentração inicial de glucose de 150 g/L. Esta condição foi a escolhida por ter apresentado os melhores resultados no índice de floculação e nos valores de atividade específica em fermentações em regime descontínuo.

Para a realização deste ensaio, foi utilizada uma solução contendo cerca de 28 g/L de células floculantes de *Z. mobilis* Z1-81, 300 g/L de glucose e 300 g/L de frutose, num volume inicial de 300 mL. Estas concentrações de açúcares foram escolhidas baseadas no trabalho de SILVEIRA et al. (1994), que observaram que concentrações acima destes valores inibiam a formação de etanol e o consumo de gluconato formado quando eram utilizadas células integras de *Z. mobilis* num processo de biotransformação.

A temperatura foi mantida constante em 39 °C e o pH, através da adição de NaOH 14 M, foi mantido em 6,4. Estes valores de temperatura e pH foram estabelecidos como ótimos para a GFOR por ERZINGER et al. (1995) para a linhagem de *Z. mobilis* CP1.

A Tabela IV.7.1 apresenta os resultados finais dos ensaios de biotransformação, e a Figura IV.7.1 apresenta a cinética do processo de conversão de glucose e frutose a ácido glucônico e sorbitol, respectivamente.

Os resultados experimentais obtidos foram bons, pois apresentam conversão de glucose e frutose a, respectivamente, ácido glucônico e sorbitol da ordem de 97 %.

As altas conversões e rendimentos obtidos demonstram a alta eficiência e especificidade do processo de transformação de glucose e frutose, embora não tenha nenhuma etapa de purificação da enzima. A possibilidade de aplicação da enzima não purificada (com células) é animadora do ponto de vista da aplicação industrial.

Os resultados experimentais encontrados são bastante semelhantes aos encontrados por WIESBECK (1995) e, também, aos encontrados por ERZINGER (1996) que utilizou linhagem não floculante de *Z. mobilis*.

Tabela IV.7.1 - Resultados gerais obtidos no ensaio de biotransformação ($T^{\circ} = 39^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,4$).

ΔG (g/L)	293,9
ΔF (g/L)	296,6
Δag (g/L)	285,3
Δsor (g/L)	286,5
$Y_{ag/G}$	0,97
$Y_{sor/F}$	0,97
R_{ag} (%)	98,5
R_{sor} (%)	95,6
p_{ag} (g/g.h)	1,3
p_{sor} (g/g.h)	1,3
t (h)	10

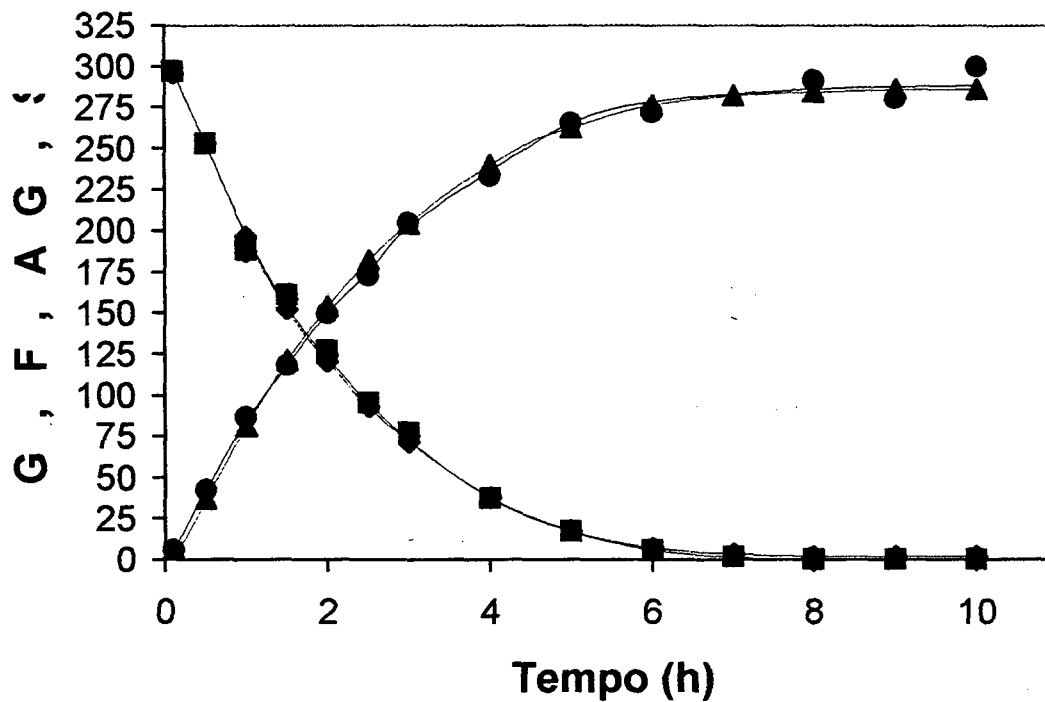


Figura IV.7.1 : Variação das concentrações de glicose (■ - G), ácido glucônico (● - AG), frutose (◆ - F) e sorbitol (▲ - SOR) com o tempo. Ensaio de biotransformação. Células provenientes de ensaio com concentração de glicose de 150 g/L (T=39°C; pH 6,4).

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

Os estudos mostraram que a elevação da velocidade de agitação de 70 para 250 min^{-1} em um curto período de tempo (~ 30 segundos) não altera de maneira significativa o grau de floculação. Essa metodologia permitiu retiradas de amostras homogêneas ao longo do tempo, colaborando na obtenção de dados cinéticos confiáveis.

A produtividade em glucose-frutose oxidorredutase (GFOR) é favorecida para concentrações iniciais elevadas de células. Esse resultado foi atribuído a um efeito combinado de menor tempo do processo e de um maior índice de floculação.

O índice de floculação mostrou ser dependente do cisalhamento provocado pela agitação. Ensaio de maior duração levam a um maior grau de destruição dos agregados celulares.

Pode-se afirmar que a atividade específica de GFOR/GL aumenta com o aumento da concentração inicial de glicose. Porém, para concentrações de glicose acima de 200 g/L há uma drástica queda da atividade global da enzima GFOR, devido a um menor crescimento celular. Concentrações iniciais de glicose acima de 200 g/L também causam uma drástica diminuição no índice de floculação das bactérias.

Nas condições de cultivo descontínuo de *Z. mobilis* conclui-se que a concentrações de glicose próximas a 150 g/L levam a uma maior atividade global floculante em GFOR (em torno de 35,0 U/L).

A produtividade em GFOR não varia de maneira substancial para concentrações iniciais de glicose menores que 150 g/L (2,5 – 2,8 U/(L.h)). Porém, para concentrações maiores que 200 g/L a produtividade em GFOR cai drasticamente para 0,16 U/(L.h).

Quando o interesse é no produto etanol, pode-se afirmar que a conversão de glicose a etanol não varia com a concentração inicial de substrato (0,46 – 0,49 g/g). Porém, a

produtividade em etanol apresenta seus valores máximos para concentrações iniciais de glicose em torno de 150 g/L, obtendo-se aproximadamente 5 g/(L.h) de etanol. Da mesma maneira que a produtividade em GFOR, a produtividade em etanol também cai drasticamente para 0,94 g/(L.h) em concentrações iniciais de glicose maiores que 200 g/L.

Os resultados demonstram que concentrações de glicose iniciais maiores que 200 g/L levam a uma grande inibição no crescimento celular e queda na produtividade em GFOR e etanol. Os ensaios em batelada alimentada conseguem evitar esta inibição por excesso de glicose. Porém, não conseguem evitar a inibição do crescimento celular quando a concentração de etanol atinge valores superiores a 70 g/L.

Os ensaios em batelada alimentada mostram ainda que se o objetivo for produzir GFOR e etanol este tipo de condução do processo tem vantagens sobre o processo descontínuo. Porém, se o objetivo for produzir somente GFOR, os valores de produtividade da fermentação descontínua são mais vantajosos.

O desenvolvimento do inóculo com agitação apresentou melhores resultados que o inóculo estático. A concentração celular obtida no inóculo com agitação foi aproximadamente três vezes superior que o sem agitação. Além disso, a produtividade em células foi maior e não houve prejuízo do índice de floculação. Conclui-se que deve-se optar por processo de condução do inóculo com agitação.

Um resultado interessante é que a concentração celular atingida nos ensaios de desenvolvimento do inóculo em frascos agitados foram maiores que em fermentadores com as mesmas condições nutricionais.

Os testes utilizando milhocina e Prodex como substitutos do extrato de levedura mostraram que estes nutrientes são bem assimilados por *Z. mobilis*, tendo resultados aceitáveis de produtividade em GFOR e etanol e de índice de floculação, sendo assim, uma alternativa para a produção industrial destes produtos.

O modelo de crescimento, consumo de substrato e formação de produto utilizado no trabalho apresenta resultados animadores de previsão do comportamento cinético do processo fermentativo. Sugere-se um trabalho mais completo envolvendo estimativa de parâmetros, análise de sensibilidade dos parâmetros e desenvolvimento do modelo.

Os testes de biotransformação de glicose e frutose a ácido glucônico e sorbitol, respectivamente, confirmam os resultados da literatura de alta conversão e especificidade da enzima GFOR advinda da cepa floculante de *Z. mobilis*, mesmo esta não estando purificada. Esses resultados confirmam o potencial, especialmente econômico, de aplicação industrial do processo e coroam os estudos realizados no presente trabalho

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, T. L. M. **Estudo da Produção de Etanol por *Zymomonas mobilis***. Rio de Janeiro, RJ. 122p. (Tese - COPE/UFRJ, D.Sc, Engenharia Química). 1993.
- BARROW, K. D. ; COLLINS, J. G. ; LEIGH, D. A. ; ROGERS, P. L. ; WARR, R. G. . Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.20, p.225-232, 1984.
- BRINGER, S. ; HÄRTNER, T. ; PORALLA, K. ; SAHM, H. . Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v.140, p-312-316, 1985.
- BRINGER-MEYER, S. ; SAHM, H. . Process for obtaining sorbitol and gluconic acid by fermentation, and cell material suitable for this purpose. **U.S. Pat.**, nº448.334, 1991.
- BURRIL, H. ; DOELLE, H. W. ; GREENFIELD, P. F. . The inhibitory effects of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, Kew, v.5, n.6, p.423-428, 1983.
- CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo. **Instruções para a determinação enzimática de glicose pelo método Glicose-E**. s.d. (manual)
- CDB – Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, **Relatório anual**, 1994
- CHUN, U. H. ; ROGERS, P. L. . The simultaneous production of Sorbitol from Fructose and Gluconic Acid from Glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.29, p.19-24, 1988.
- DOELLE, M. B. . *Zymomonas mobilis* – Science and industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, n.1, p.57-98, 1993.

- ERZINGER, G. S. ; SILVEIRA, M. M. ; VITOLO, M. ; JONAS, R. . Determination of Glucose-Fructose Oxidoreductase activity in whole cells of *Zymomonas mobilis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 1995.
- ERZINGER, G. S. **Influência da concentração de glicose e de etanol sobre a atividade de glicose-frutose oxidoreductase em *Zymomonas mobilis* ATCC 29191.** São Paulo, 1996.112p. (Dissertação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 1996.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O. ; ARAUJO, J. M. ; RIOS, E. M. ; MELLO, B. R. . Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações alcoólicas industriais. **Revista de Microbiologia**, São Paulo. V.1, n.14, p.6-10, 1983.
- FEIN, J. E., LAW FORD, H. G., LAW FORD, R. High productivity continuous ethanol fermentation with a flocculating mutant strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.5, n.1, p.19-24, 1983 (a).
- FEIN, J. E., ZAWADSKI, B. C., LAW FORD, H. G., LAW FORD, R. Controlling morphological instability of *Zymomonas mobilis* strains in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.6, p.1899-1904, 1983 .
- FREITAS, V. A. **Produção de sorbitol: análise técnico-econômica dos processos eletroquímico e catalítico. Proposta de um projeto básico.** São Paulo: USP, 1990, 153p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1990).
- FRÖHLICH, S. Inst. Fermentation U. Brauwesen. Diploma Arbeite. **U.T.B.**, 1981. In: HUSTEDE, H. ; HABERSTROH, H. J. ; SCHINZIG, E. . Gluconic Acid. **Apud ULLMANN'S Encyclopedia of industrial chemistry.** WEINHEIM : Verlag-Chemie. V.A12, p.449-456. 1985.
- GALAMBRE, H., GHOMMIDH, C., NAVARRO, J. Characterization of flocculation in a strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.10, n.10, p.751-754, 1988.

- GETEC, **Sorbitol**, Rio de Janeiro, 1993 (folheto).
- HARDMAN, M. J. ; SCOPES, R. K. . The kinetics of Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.173, p.203-209, 1988.
- HUSTEDE, H. ; HABERSTROH, H. J. ; SCHINZIG, E. . Gluconic Acid. **Apud ULLMANN'S Encyclopedia of industrial chemistry**. WEINHEIM : Verlag-Chemie. V.A12, p.449-456. 1985.
- KRIEG, N. R., HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, 9^a ed., p.576-580, 1984.
- LAWFORD, G.R., LAVERS, B.H., GOOD, D., CAHRLEY, R., FEIN, J. *Zymomonas* Ethanol fermentation's: biochemistry and bioengineering. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ETHANOL FROM BIOMASS**, Royal Society of Canada, October, Ottawa, 1982.
- LE DUY, A. ; ZAJIC, J. E. . A geometrical approach for differentiation of experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnol. Bioeni.**, New York, v.25, p.805-810, 1973
- LEE, J. H., SKOTNICKI, M. L., ROGERS, P. L. Kinetics studies on a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.4, n.9, p.615-620, 1982.
- LEIGH, D. ; SCOPES, R. K. , ROGERS, P. L. ; A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.20, p.413-415, 1984.
- LEITE, S. G. F. ; de FRANÇA, F. P. Intracellular ethanol and cell viability of *Zymomonas mobilis* during Fed-batch alcoholic fermentation. **Micern Journal**, v.5, p.43-48, 1989.

- LOPES, C. E., CALAZANS, G. M. T., RIOS, E. M. M. M., CARLOS, T. F. On the effect of temperature and pH in the settling behavior of a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.13, n.1, p.43-46, 1991.
- LÓPEZ, J. A., CALAZANS, G. M. T., SILVEIRA, M. M., JONAS, R., LOPES, C. E. Floculação de *Zymomonas mobilis* cultivada em diferentes substratos. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO Y NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA. Santiago-Chile, 1993.
- LOSS, H. ; SAHM, H. ; SPRENGER, G. A. . Glucose-Fructose Oxidoreductase, a periplasmatic enzyme of *Zymomonas mobilis*, is active in its precursor form. **Microbiology Letters**, v.107, p.293-298, 1993.
- LOSS, H. ; KRÄMER, R. ; SAHM, H. ; SPRENGER, G. A. . Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugars: Evidence for a physiological function of Glucose-Fructose Oxidoreductase in osmoprotection. **Journal of Bacteriology**, p.7688-7693, Dec. 1994.
- MOELLERING, H. ; BERGMAYER, H. U. In: BERGMAYER, H. U. ed. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinheim Verlag Chemie, v.6, p.220-227. 1984.
- MORITA, M. ; ASSUMPÇÃO, M. V. ; **Manual de soluções reagentes e solventes**. 2.ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1988
- OLIVEIRA, E. G., MORAIS, J. O., PEREIRA, N. Determination of the energy maintenance coefficient of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.14, n.11, p. 1081-1084, 1992.
- PANKOVA, L. M., SHVINKA, Y. É., BEKER, M. E., SLAVA, É. É. Effect of aeration on *Zymomonas mobilis* metabolism. **Mikrobioloiya**, v.54, n.1, p.141-145, 1985.

PHILLIPS, M. A. . Catalytic hydrogenation of glucose to sorbitol using a highly active catalyst. **Br. Chem. Eng.**, v.8, n.11, p.767-769, 1963. **Apud**, CHUN, U. H. ; Rogers, P. L., 1988.

QUÍMICA e DERIVADOS, Revista, setembro, 1994.

REHR, B. ; WILHELM, C. ; SAHM, H. . Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.35, p.144-148, 1991.

REISS, M., HARTMEIER, W. Levan production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Food Biotechnology**, v.4, n.1, p.69-75, 1990.

RODRÍGUEZ, E., CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas sp* isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters**, v.8, n.10, p.745-748, 1986.

ROELS, J. A. ; HIEMSTRA, H. C. H. ; JÖBSES, I. M. L. . Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* near zero growth rate. **Biotechnol. Bioengin.**, v.29, p.502-512, 1987.

ROGERS, P. L., LEE, K., SKOTNICKI, M.E., TRIBE, D. E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.**, Berlin v.23, p.37-84, 1982.

RÖHR, M. ; KUBICEK, C. P. . Gluconic acid. In: REHM, H. J. ; REDD, G. ed. **Biotechnology**, VHC. V.4, p.455-465. 1981.

SAHM, H. ; SCHMIDT, A. ; BRINGER-MEYER, S. ; PORALLA, K. . Effect of alcohol's and temperature on the hopanoid contend of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.32-36, 1986.

SCOTT, C.D. Ethanol production in a fluidized-bed bioreactor utilizing flocculating *Zymomonas mobilis* with biomass recycle. **Biotechnology and Bioengineering Symp**, n.13, p.287-298, 1983.

- SILMAN, R. W. . Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in fed-batch fermentation. **Biotechnol. Bioengin.**, New York, v.26, p.247-251, 1984.
- SILVEIRA, M.M. ; COSTA, J. P. ; JONAS, R. . Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, Joinville-BR. Processo de produção e recuperação de sorbitol e ácido glucônico ou gluconato. **P.I. 9403981-0, N/Ref:P.51912**, outubro, 04, 1994.
- SILVEIRA, M.M. ; SALES, R. ; LEMMEL, C. ; JONAS, R. . Glucose-fructose oxidoreductase activity in six strains of *Zymomonas mobilis*. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v.38, n.2, 1995.
- STARR, M. P. ; STOLP, H. ; TRÜPPER, H. G. ; BALOWS, A. ; SCHLEGEL, H.G.. The PROKARYOTES. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Volume II, section N, Chapter 106. **SPRINGER-VERLAG**, 1981.
- SWINGS, J., De LEY, J. The biology of *Zymomonas mobilis*, **Bacteriological Reviews**, v.41, p.1-46, 1977.
- TAKAMATSU, T. ; SHIOYA, S. ; FURUYA, T. . **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v31, p.697, 1981. HUSTEDE, H. ; HABERSTROH, H. J. ; SCHINZIG, E. . Gluconic Acid. **Apud ULLMANN'S Encyclopedia of industrial chemistry**. WEINHEIM : Verlag-Chemie, V.A12, p.449-456. 1985.
- TOH, H. ; DOELLE, H. W. ; KIRK, L. ; CRITTENDEN, R. . *Zymomonas mobilis* – Science and industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, p.57-58, 1993
- TORRES, E. F., BARATTI, J. The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.121-128, 1987.

- VEERAMALLU, U. K. ; AGRAWAL, P. . The effect of CO₂ ventilation on kinetics and yields of cell-mass and ethanol in batch cultures of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.8, n.11, p.811-816, 1986.
- VEERAMALLU, U. K. ; AGRAWAL, P. . Ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* ATCC10988 in repeated batch cultures. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v47, p1-14, 1990.
- VIKARI, L. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.118-123, 1984.
- VIKARI, L. By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Technical Research Center of Finland, Espoo, Publications 27**, p.3-29, 1986.
- VORE, R. P. ; TALBURT, D. E. . The effect of gas sparging on growth and glucose utilization of *Zymomonas mobilis* at low glucose concentrations. **Biotechnology Letters**, v.15, n.10, p.1067-1070, 1993.
- WISBECK, E. **Estudo da produção de glicose-frutose oxidoreductase por linhagem floculante de *Zymomonas mobilis***. Florianópolis, 1995. 119p. (Dissertação, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina).
- ZACHARIOU, M. ; SCOPES, R. K. . Glucose-Fructose Oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.3, n.167, p.863-869, 1986.
- ZEVENHÜIZEN, L. P. T. M. ; DEINEMA, M. H. . Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. **Arch. Mikrobiol.**, v.78, p.42-57, 1971.

ANEXO

ANEXO A.1 – EFEITO DO TEOR DE INÓCULO

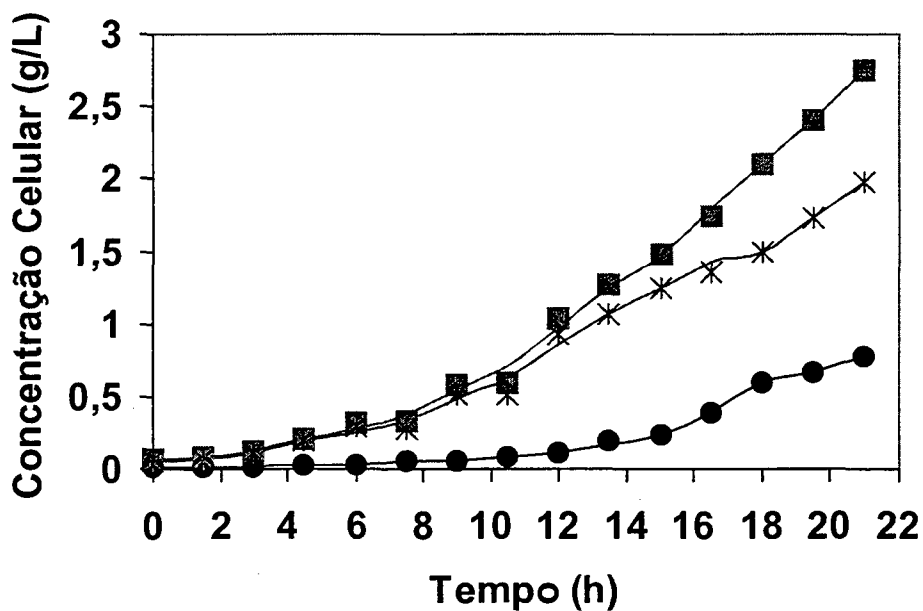
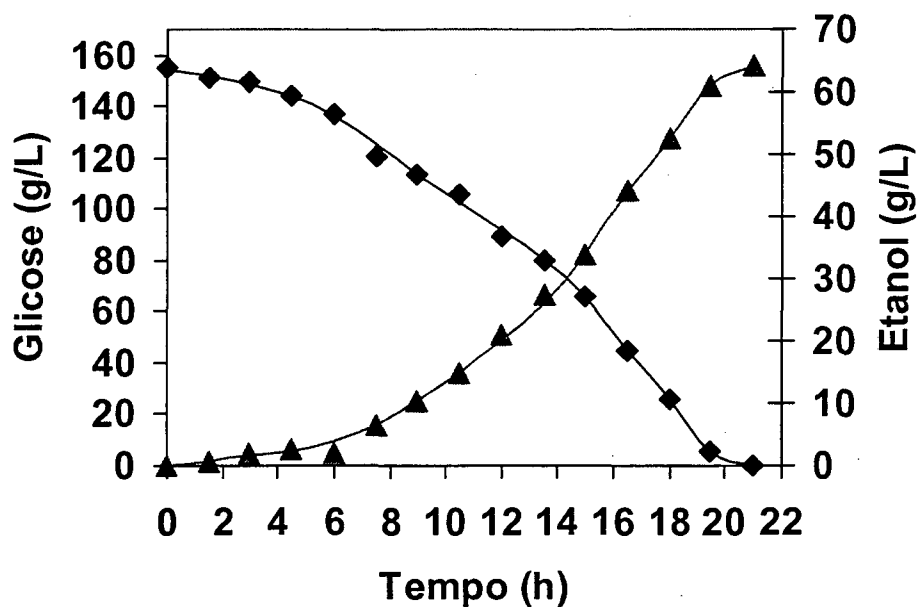


Figura A.1.1 : Concentração de glicose (◆), etanol (▲), células totais (■), células flocculantes (*) e células livres (●) em função do tempo. Ensaio em regime batelada, inóculo sem agitação ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.1.1 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada, **inóculo sem agitação**. (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	155,5	0,00	0,070	0,015	0,055
1,50	151,1	0,52	0,086	0,015	0,071
3,00	150,0	2,00	0,130	0,017	0,113
4,50	144,3	2,71	0,214	0,025	0,189
6,00	137,2	1,93	0,318	0,034	0,284
7,50	120,3	6,57	0,327	0,050	0,277
9,00	113,6	10,35	0,575	0,058	0,517
10,50	105,4	14,81	0,597	0,080	0,517
12,00	89,4	20,90	1,039	0,106	0,933
13,50	80,0	27,28	1,270	0,200	1,070
15,00	65,8	33,91	1,486	0,238	1,248
16,50	44,5	44,05	1,739	0,382	1,357
18,00	25,6	52,66	2,100	0,600	1,500
19,50	5,3	60,87	2,400	0,667	1,733
21,00	0,1	64,26	2,752	0,777	1,975

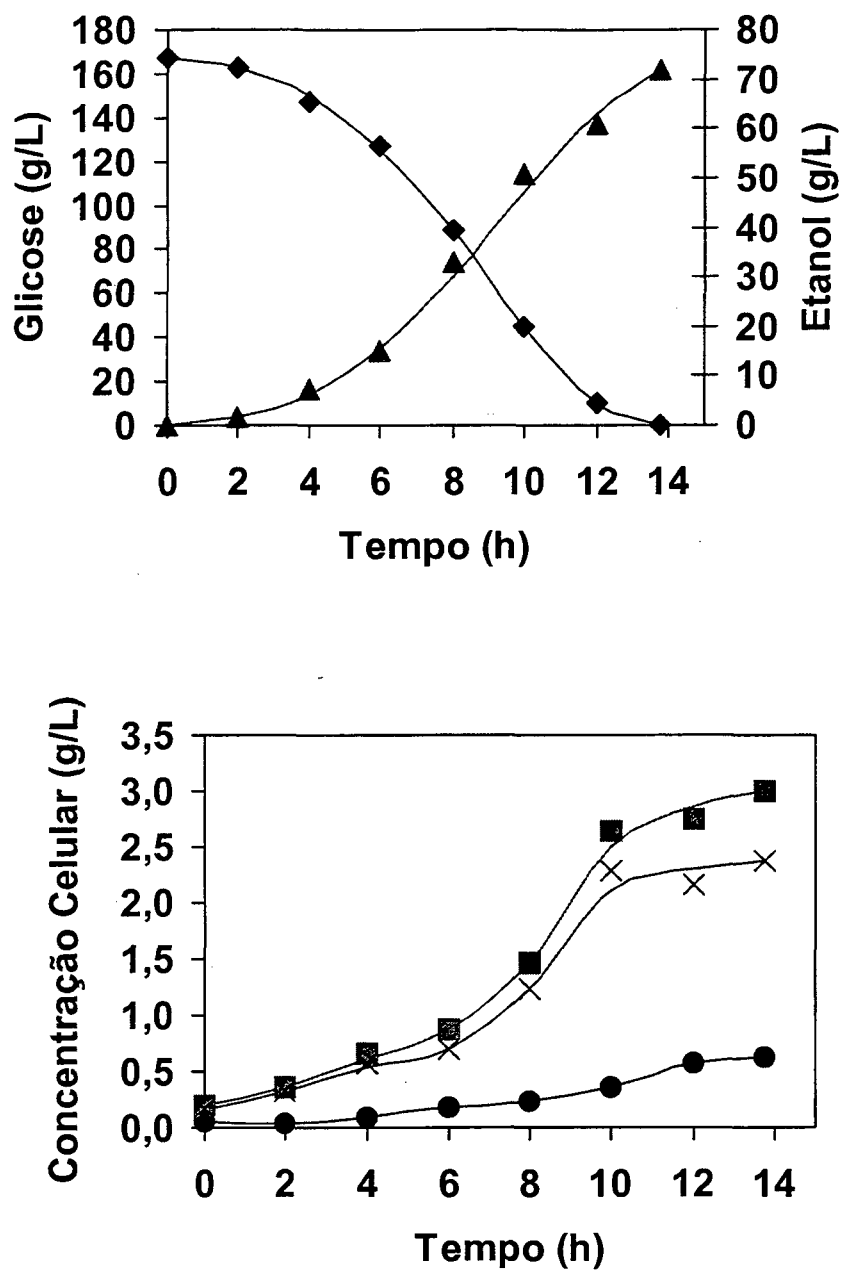


Figura A.1.2: Concentração de glucose (\blacklozenge), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), células floculantes (\times) e células livres (\bullet) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.1.2 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial. (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	167,6	0,00	0,204	0,046	0,158
2,00	162,4	1,75	0,366	0,037	0,329
4,00	147,1	7,35	0,660	0,096	0,564
6,00	127,4	14,85	0,880	0,175	0,705
8,00	88,7	32,85	1,456	0,225	1,231
10,00	45,0	50,85	2,640	0,361	2,280
12,00	9,6	60,75	2,744	0,577	2,167
13,00	0,0	71,95	3,000	0,617	2,380

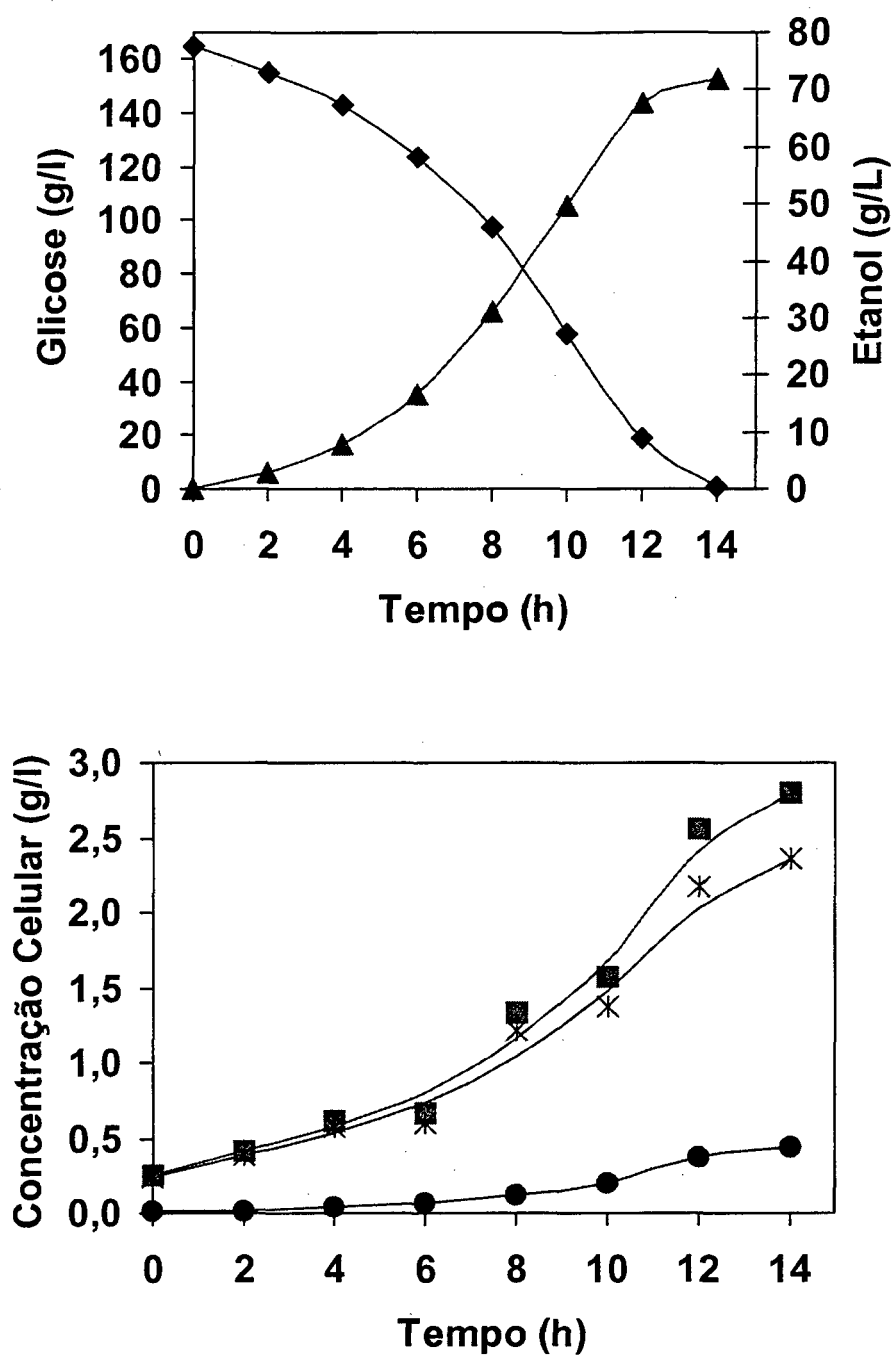


Figura A.1.3 : Concentração de glucose (\blacklozenge), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), células floculantes ($*$) e células livres (\bullet) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.1.3 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (XI) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial. (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	XI (g/L)	Xf (g/L)
0,00	164,8	0,00	0,254	0,016	0,238
2,00	154,7	2,96	0,410	0,020	0,390
4,00	142,9	7,73	0,620	0,040	0,580
6,00	123,8	16,54	0,670	0,070	0,600
8,00	97,3	31,04	1,330	0,120	1,210
10,00	58,0	49,84	1,570	0,200	1,370
12,00	19,0	67,59	2,560	0,380	2,180
14,00	0,8	72,04	2,800	0,440	2,360

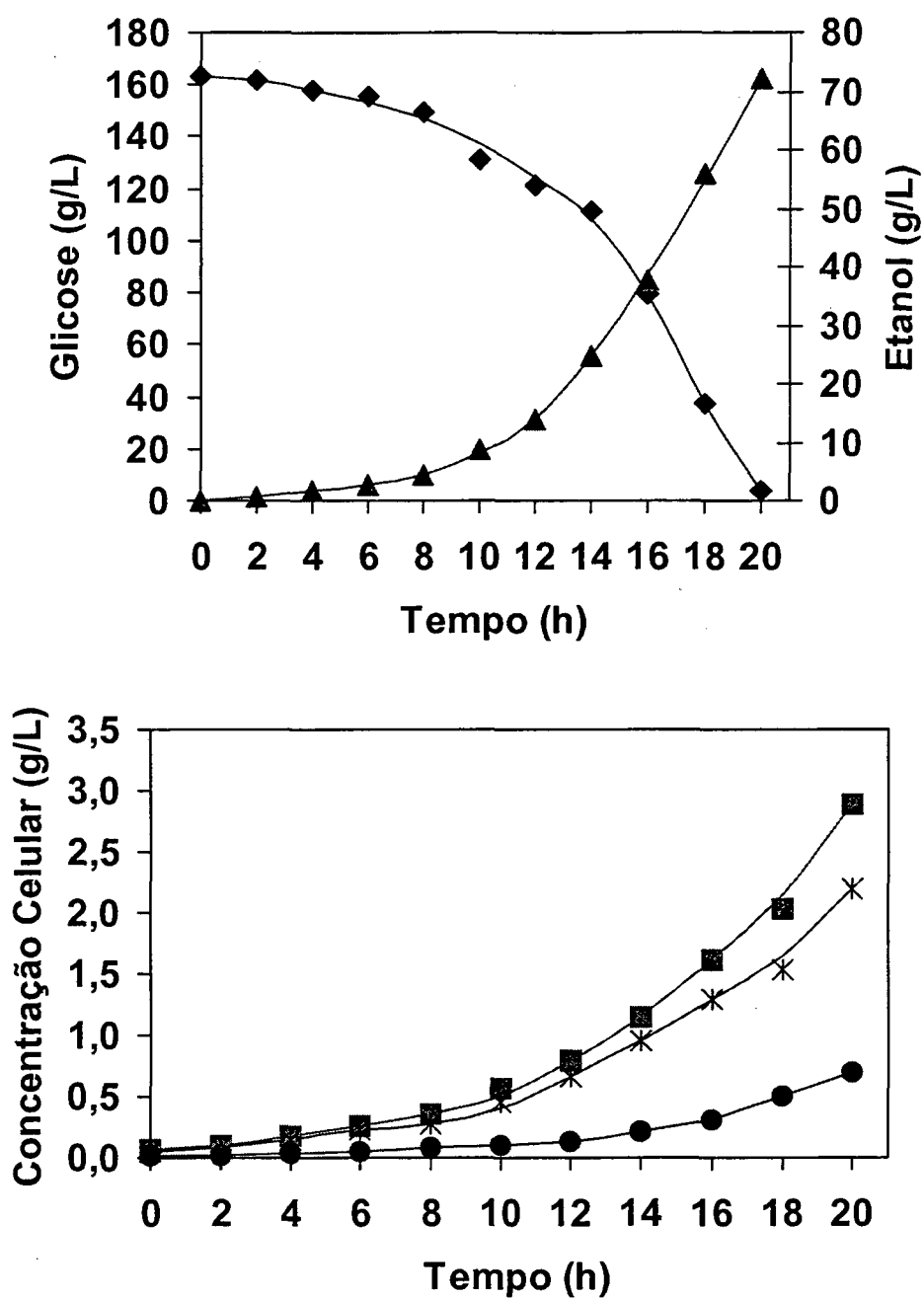


Figura A.1.4 : Concentração de glicose (\blacklozenge), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), células floculantes ($*$) e células livres (\bullet) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com baixa concentração celular inicial ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.1.4 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com baixa concentração celular inicial. (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/l)	P (g/l)	Xt (g/l)	Xl (g/l)	Xf (g/l)
0,00	163,0	0,00	0,061	0,019	0,042
2,00	161,5	0,66	0,090	0,016	0,074
4,00	158,0	1,60	0,170	0,027	0,143
6,00	155,5	2,80	0,260	0,041	0,219
8,00	149,5	4,46	0,360	0,081	0,279
10,00	131,5	8,80	0,560	0,104	0,456
12,00	121,0	14,00	0,790	0,136	0,654
14,00	111,5	24,80	1,150	0,203	0,947
16,00	79,5	37,56	1,610	0,314	1,296
18,00	37,0	55,90	2,040	0,502	1,538
20,00	3,8	72,08	2,890	0,701	2,189

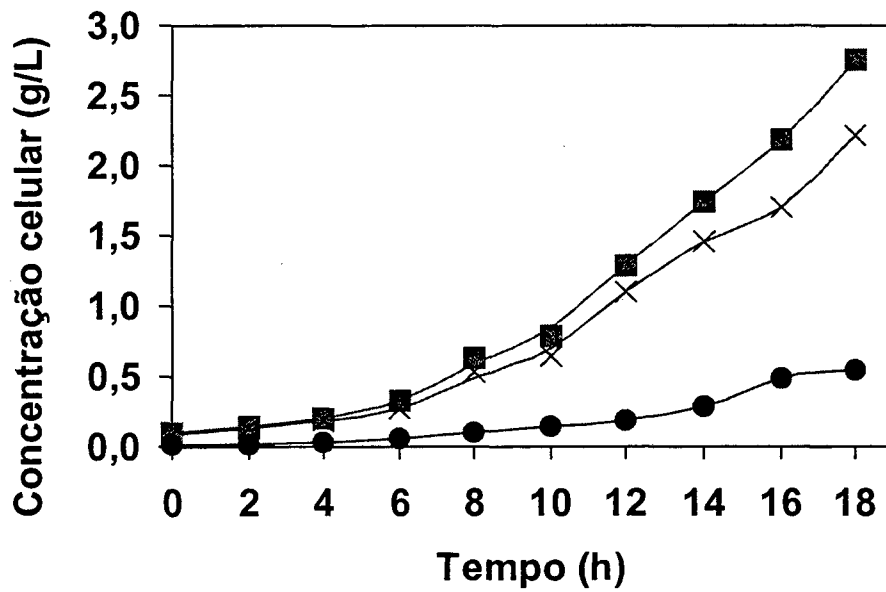
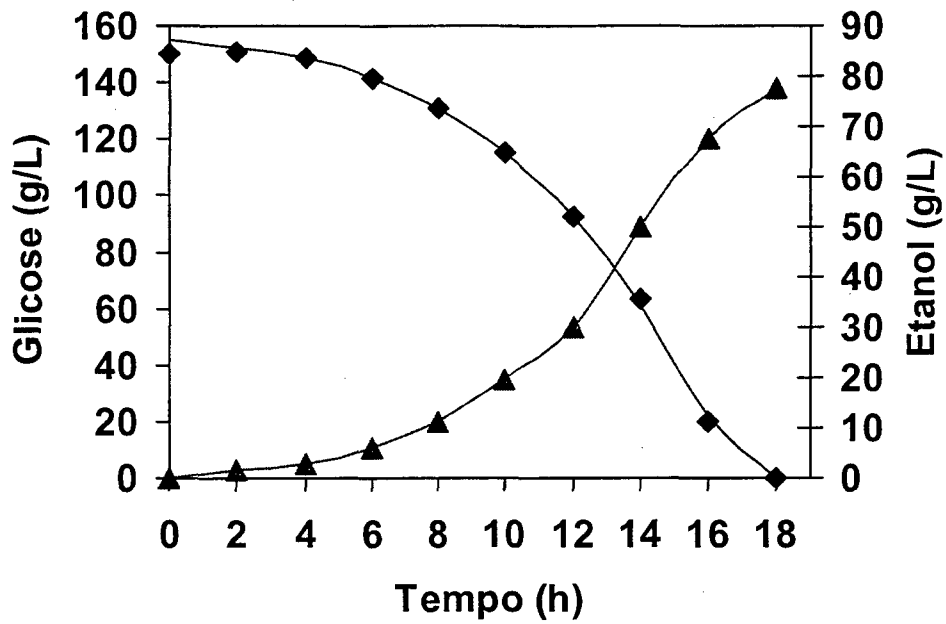


Figura A.1.5 : Concentração de glicose (◆), etanol (▲), células totais (■), células flocculantes (*) e células livres (●) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com média concentração celular inicial ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.1.5 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (XI) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com média concentração celular inicial. (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	XI (g/L)	Xf (g/L)
0,00	155,0	0,00	0,098	0,015	0,083
2,00	152,0	1,69	0,150	0,016	0,134
4,00	148,6	2,90	0,206	0,027	0,179
6,00	141,3	6,19	0,330	0,055	0,275
8,00	130,8	11,30	0,630	0,096	0,534
10,00	115,2	19,50	0,790	0,146	0,644
12,00	92,8	29,90	1,280	0,180	1,100
14,00	61,0	49,90	1,750	0,290	1,460
16,00	22,0	67,76	2,180	0,480	1,700
18,00	0,2	77,44	2,760	0,550	2,210

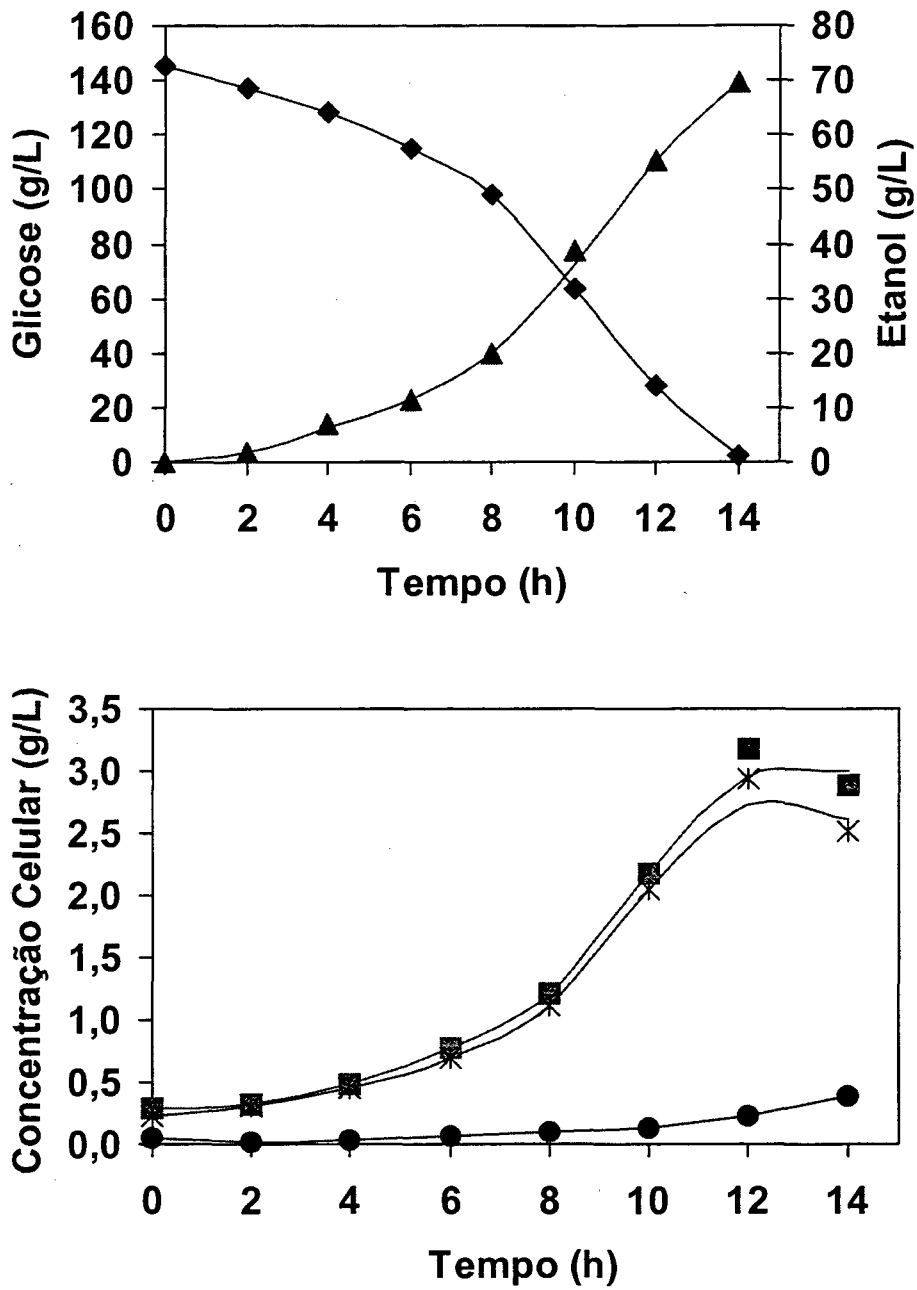


Figura A.1.6 : Concentração de glicose (\blacklozenge), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), células floculantes ($*$) e células livres (\bullet) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 5,5$; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.1.6 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial. (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	145,6	0,00	0,283	0,053	0,230
2,00	137,1	1,86	0,330	0,018	0,312
4,00	128,2	6,85	0,490	0,038	0,452
6,00	114,8	11,43	0,770	0,072	0,698
8,00	97,8	20,00	1,210	0,094	1,116
10,00	63,4	38,70	2,170	0,124	2,046
12,00	28,1	55,20	3,170	0,227	2,943
14,00	2,3	69,80	2,890	0,380	2,510

**ANEXO A.2- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE
SUBSTRATO**

Tabela A.2.1 : Resultados gerais dos ensaios realizados para o estudo do efeito da concentração inicial de substrato e com alta concentração celular inicial.

T (h)	ΔS (g/L)	ΔP (g/L)	ΔX_T (g/L)	ΔX_F (g/L)	ΔX_L (g/L)	IF (%)	A (U/g)	A_{GT} (U/L)	A_{GF} (U/L)
14	164,0	72,0	2,55	2,12	0,42	84,3	15,18	42,5	35,82
14	143,3	69,8	2,61	2,28	0,33	86,8	13,97	40,37	35,06
6,5	45,8	25,2	1,59	1,43	0,11	90,5	9,66	18,35	16,61
99	203,3	93,0	1,55	0,96	0,59	64,2	14,46	25,01	16,05
10,7	106,9	49,1	2,51	2,20	0,31	87,8	12,60	34,9	30,64

Tabela A.2.1 (cont.) : Resultados gerais dos ensaios realizados para o estudo do efeito da concentração inicial de substrato e com alta concentração celular inicial.

R (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{XT/S}$	$Y_{XF/S}$	$Y_{XL/S}$	$Y_{AGT/S}$ (U/g)	$Y_{AGF/S}$ (U/g)	P (g/L,h)	P_{AGT} (U/L,h)	P_{AGF} (U/L,h)
92	0,47	0,016	0,013	0,003	0,26	0,22	5,15	3,03	2,56
93	0,49	0,018	0,016	0,002	0,28	0,24	5,00	2,88	2,50
97	0,49	0,035	0,033	0,002	0,40	0,36	3,87	2,82	2,56
90	0,46	0,008	0,005	0,003	0,12	0,08	0,94	0,25	0,16
90	0,46 ^{*1}	0,023	0,020	0,003	0,32	0,28	4,57	3,24	2,85

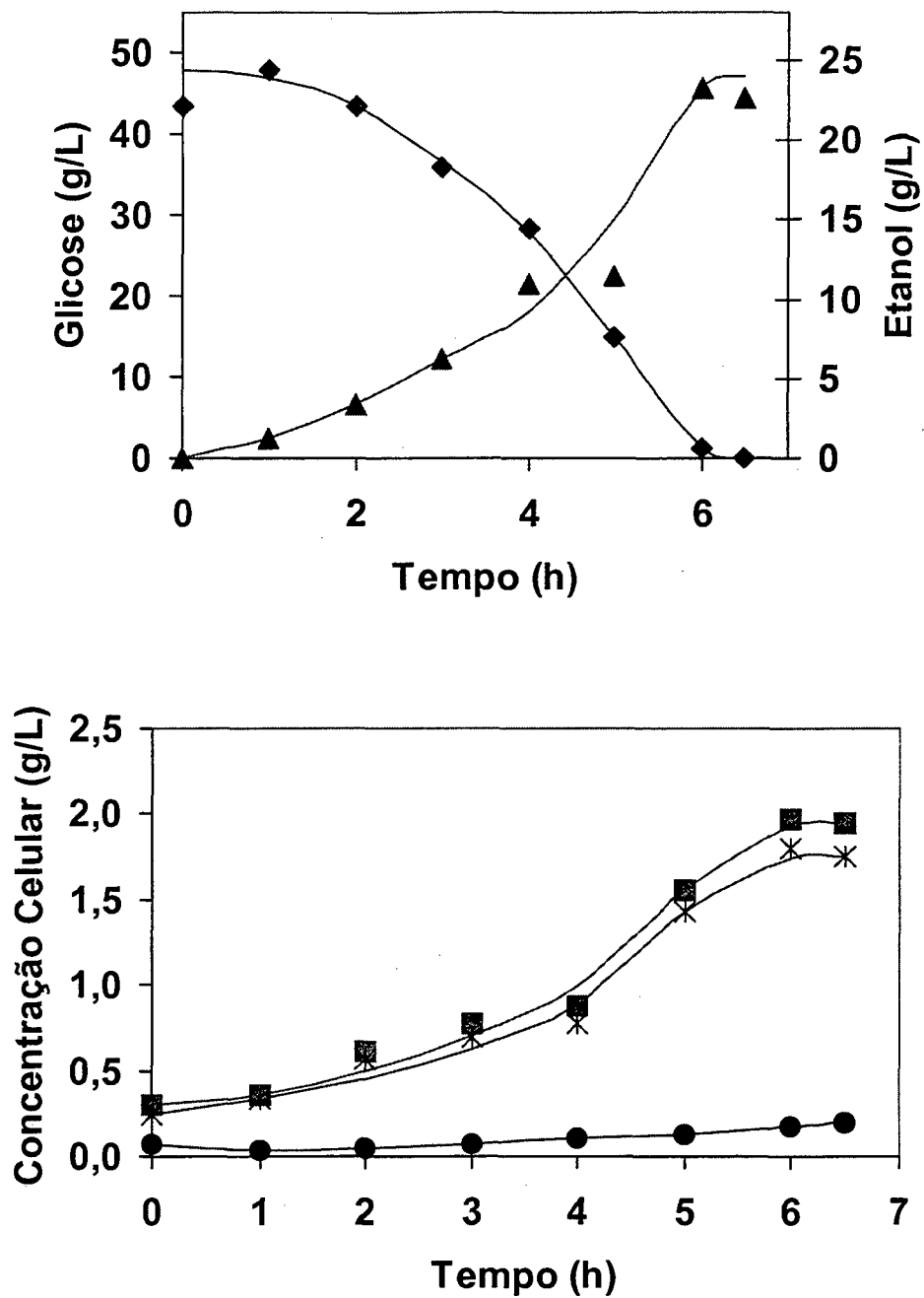


Figura A.2.1 : Concentração de glucose (◆), etanol (▲), células totais (■), células floculantes (*) e células livres (●) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($S_0 = 50$ g/L; $T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; -frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.2.2 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial. ($S_0 = 50\text{g/L}$; $T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	43,4	0,00	0,305	0,067	0,238
1,00	47,8	1,30	0,360	0,030	0,330
2,00	43,5	3,40	0,610	0,047	0,563
3,00	35,9	6,20	0,770	0,074	0,696
4,00	28,3	10,90	0,870	0,099	0,771
5,00	14,9	11,45	1,560	0,130	1,430
6,00	1,2	23,26	1,975	0,177	1,798
6,50	0,0	22,70	1,950	0,199	1,751

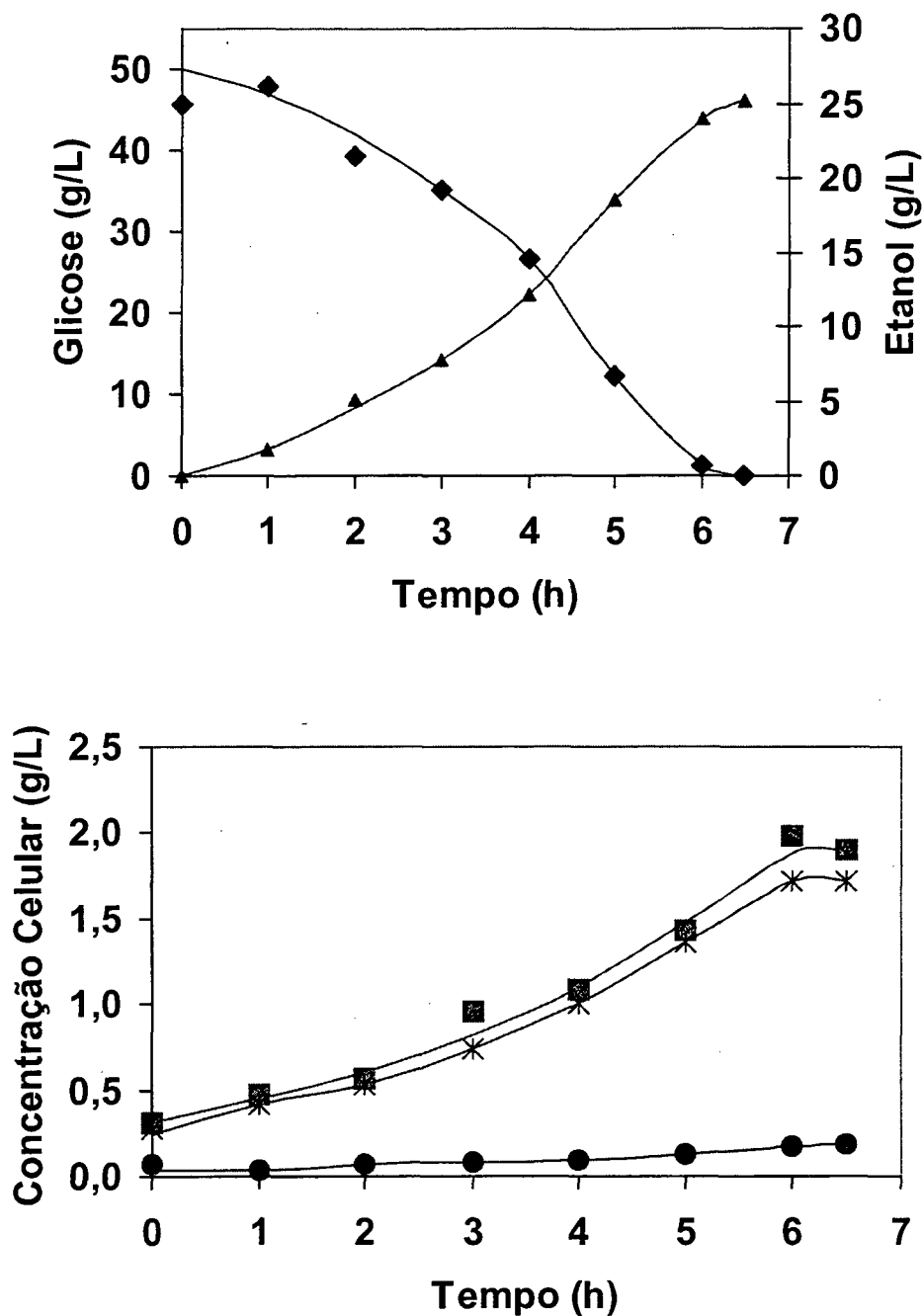


Figura A.2.2 : Concentração de glicose (◆), etanol (▲), células totais (■), células floculantes (*) e células livres (●) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($S_0 = 50$ g/L; $T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.2.3 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (XI) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial. ($S_0 = 50\text{g/L}$; $T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	XI (g/L)	Xf (g/L)
0,00	45,8	0,00	0,310	0,072	0,238
1,00	48,0	1,70	0,470	0,035	0,415
2,00	39,3	5,10	0,560	0,071	0,529
3,00	35,3	7,80	0,960	0,084	0,736
4,00	26,6	12,20	1,080	0,092	1,008
5,00	12,2	18,60	1,430	0,126	1,354
6,00	1,3	23,98	1,980	0,169	1,711
6,50	0,0	25,20	1,900	0,180	1,720

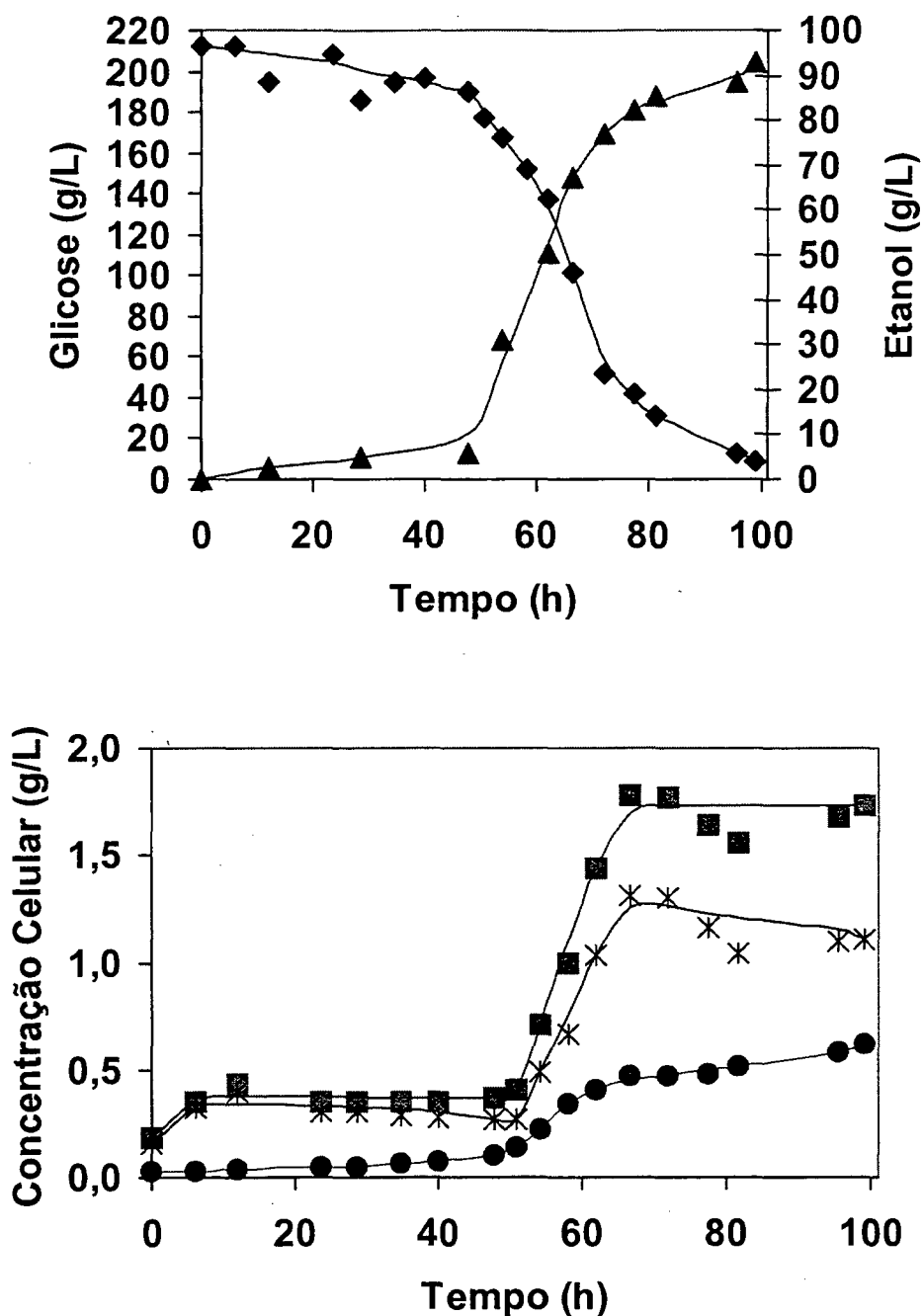


Figura A.2.3 : Concentração de glucose (\blacklozenge), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), células floculantes ($*$) e células livres (\bullet) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração de substrato $S_0 = 200$ g/L; ($T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.2.4 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração de substrato $S_0 = 200\text{g/L}$; ($T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	212,0	0,00	0,184	0,030	0,154
6,00	212,5	-	0,353	0,030	0,323
12,00	194,3	2,64	0,434	0,040	0,394
23,50	208,5	-	0,353	0,050	0,303
28,50	186,4	4,70	0,350	0,050	0,300
34,66	195,0	-	0,350	0,060	0,290
40,00	196,5	-	0,350	0,070	0,280
47,66	190,3	5,66	0,370	0,100	0,270
50,75	176,8	-	0,410	0,140	0,270
54,00	167,1	30,78	0,710	0,220	0,490
58,00	152,3	-	1,000	0,340	0,660
62,00	137,0	50,44	1,440	0,410	1,030
66,50	101,0	67,38	1,780	0,470	1,310
72,00	51,5	76,77	1,770	0,470	1,300
77,50	41,6	82,38	1,640	0,480	1,160
81,50	31,6	85,47	1,560	0,520	1,040
95,50	12,5	88,45	1,680	0,580	1,100
99,00	8,7	92,99	1,730	0,620	1,110

-- Não foram coletadas as amostras para Etanol.

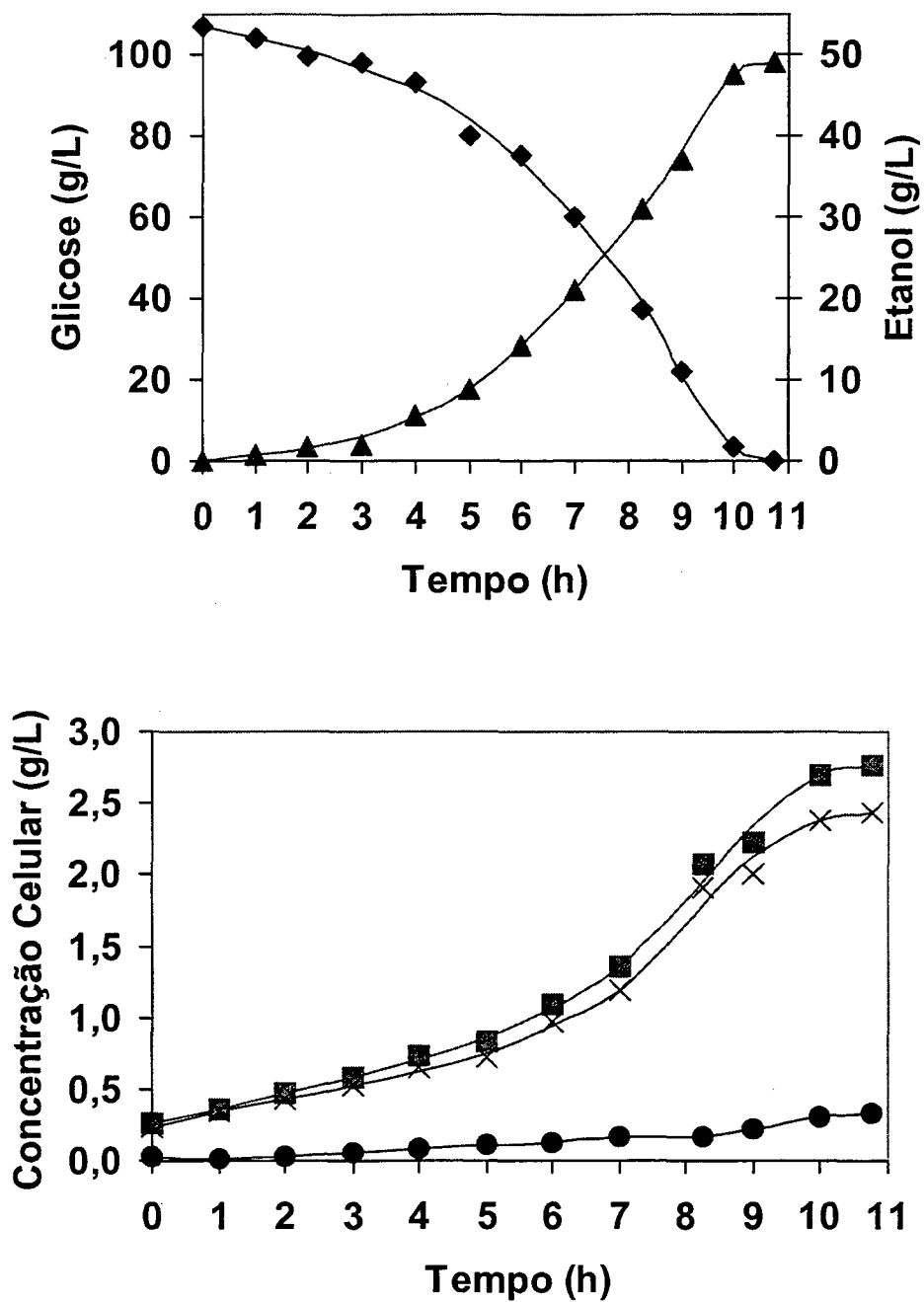


Figura A.2.4 : Concentração de glucose (\diamond), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), células floculantes ($*$) e células livres (\bullet) em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial ($S_0 = 100$ g/L; $T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.2.5 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com alta concentração celular inicial; ($S_0 = 100\text{g/L}$; $T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	106,9	0,00	0,264	0,031	0,233
1,00	104,1	0,73	0,362	0,019	0,343
2,00	99,9	1,81	0,464	0,029	0,435
3,00	98,4	2,04	0,579	0,052	0,527
4,00	93,5	5,51	0,728	0,080	0,648
5,00	80,0	8,84	0,828	0,107	0,721
6,00	75,5	14,21	1,092	0,130	0,962
7,00	60,0	20,97	1,350	0,159	1,191
8,25	37,4	31,11	2,070	0,168	1,902
9,00	22,0	37,21	2,230	0,220	2,010
10,00	3,2	47,65	2,690	0,310	2,380
10,75	0,0	49,09	2,770	0,338	2,432

**ANEXO A.3- DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE
CULTIVO DO INÓCULO**

Tabela A.3.1 : Concentração de glucose e de células totais nos ensaios 1 e 2 para a determinação do processo de cultivo de inóculo.

Tempo	Glucose 1	Glucose 2	XT 1	XT 2
0,0	107,0	108		
2,0	106,0	106,2	0,25	0,16
3,5	102,1		0,26	
4,3		105,6		0,29
5,5	98,6		0,42	
6,3		97,4		0,56
7,5	94,2		0,70	
8,5		84,5		1,05
9,5	78,2		1,00	
10,8		60,37		2,03
11,5	55,2		1,80	
12,6		24,9		3,03
13,5	14,6		3,10	
14,5		0		4,1
15,0	0,0		3,84	

**ANEXO A.4 – ALTERNATIVAS ECONÔMICAS DE PRODUÇÃO
DA ENZIMA GFOR**

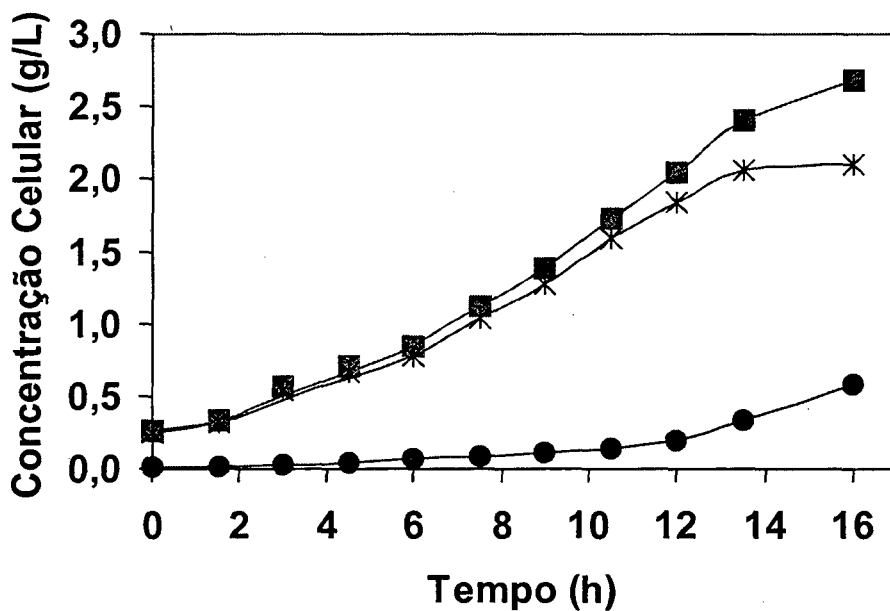
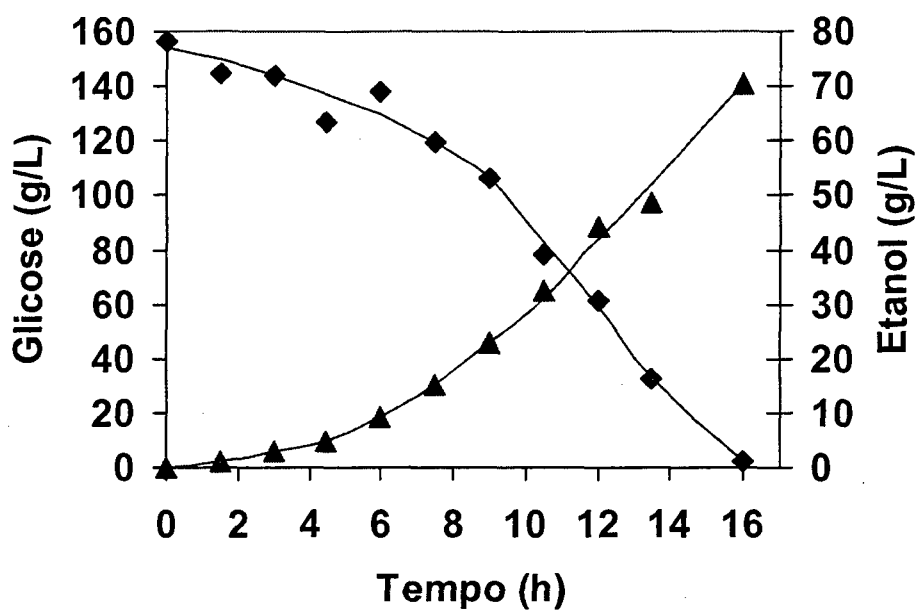


Figura A.4.1: Concentração de glicose (\blacklozenge), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), células flocculantes ($*$) e células livres (\bullet) em função do tempo. Ensaio em regime batelada, ensaio com meio de crescimento alternativo, 6,0 g/L de Prodex; ($T=30^{\circ}\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.4.1 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com meio de crescimento alternativo, 6,0 g/L de PRODEX; (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	156,0	0,00	0,267	0,019	0,248
1,50	144,5	1,23	0,330	0,016	0,314
3,00	143,7	2,92	0,560	0,025	0,535
4,50	126,5	4,72	0,700	0,041	0,659
6,00	137,7	9,40	0,840	0,064	0,776
7,50	119,7	15,04	1,120	0,082	1,038
9,00	106,3	22,77	1,380	0,105	1,275
10,50	78,1	32,41	1,730	0,135	1,595
12,00	61,4	44,23	2,040	0,195	1,845
13,50	32,3	48,62	2,400	0,337	2,063
16,00	2,0	70,58	2,680	0,577	2,103

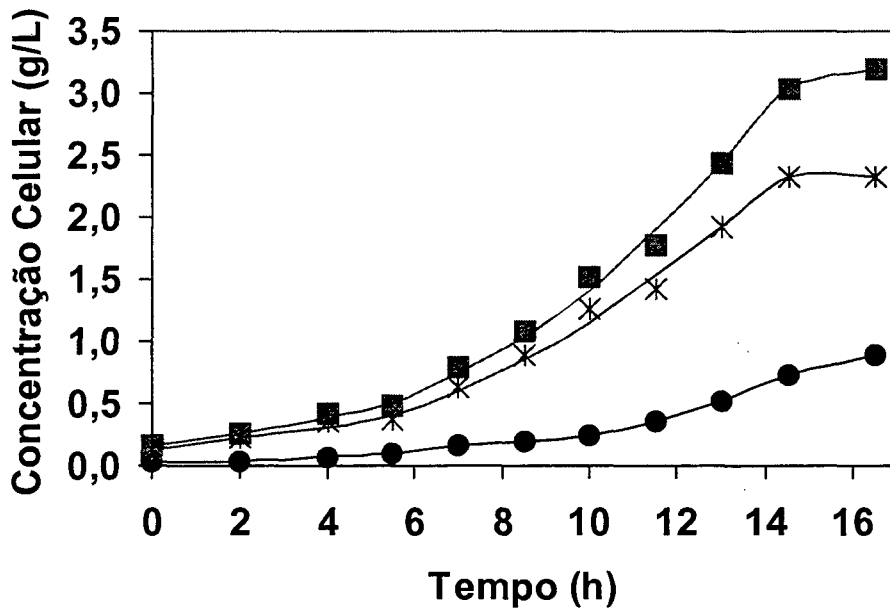
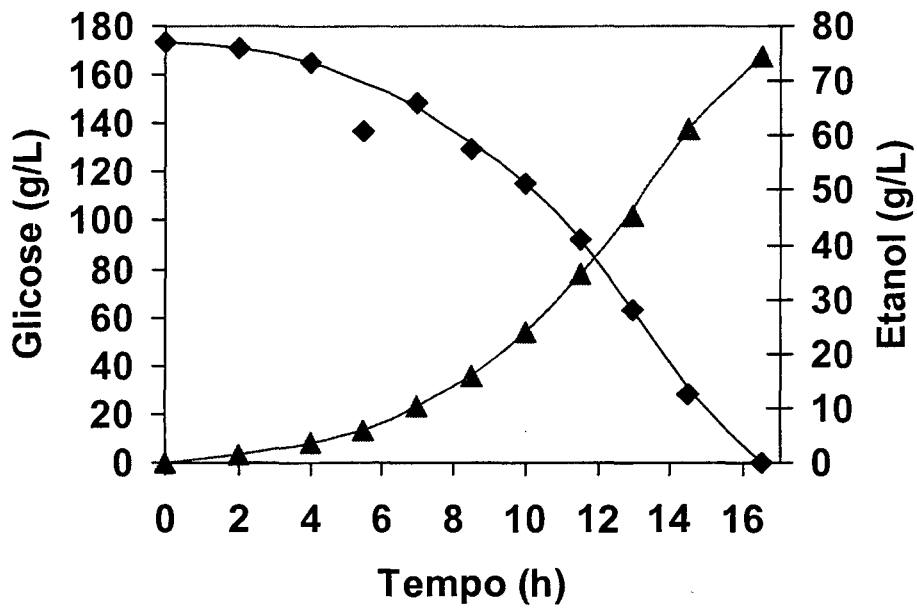


Figura A.4.2: Concentração de glicose (◆), etanol (▲), células totais (■), células flocculantes (*) e células livres (●) em função do tempo. Ensaio em regime batelada, ensaio com meio alternativo de crescimento, milhocina 17,5 g/L; ($T=30^{\circ}\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.4.2 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com meio de crescimento alternativo, Milhocina 17,5 g/L; (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	173,0	0,00	0,160	0,033	0,127
2,00	171,1	1,52	0,252	0,034	0,218
4,00	164,7	3,67	0,418	0,057	0,361
5,50	136,5	5,89	0,479	0,100	0,379
7,00	148,7	10,45	0,790	0,158	0,632
8,50	129,1	15,77	1,080	0,190	0,890
10,00	115,6	24,14	1,510	0,250	1,260
11,50	92,4	34,62	1,780	0,360	1,420
13,00	63,2	45,48	2,430	0,510	1,920
14,50	27,9	61,19	3,040	0,720	2,320
16,50	0,0	74,52	3,200	0,880	2,320

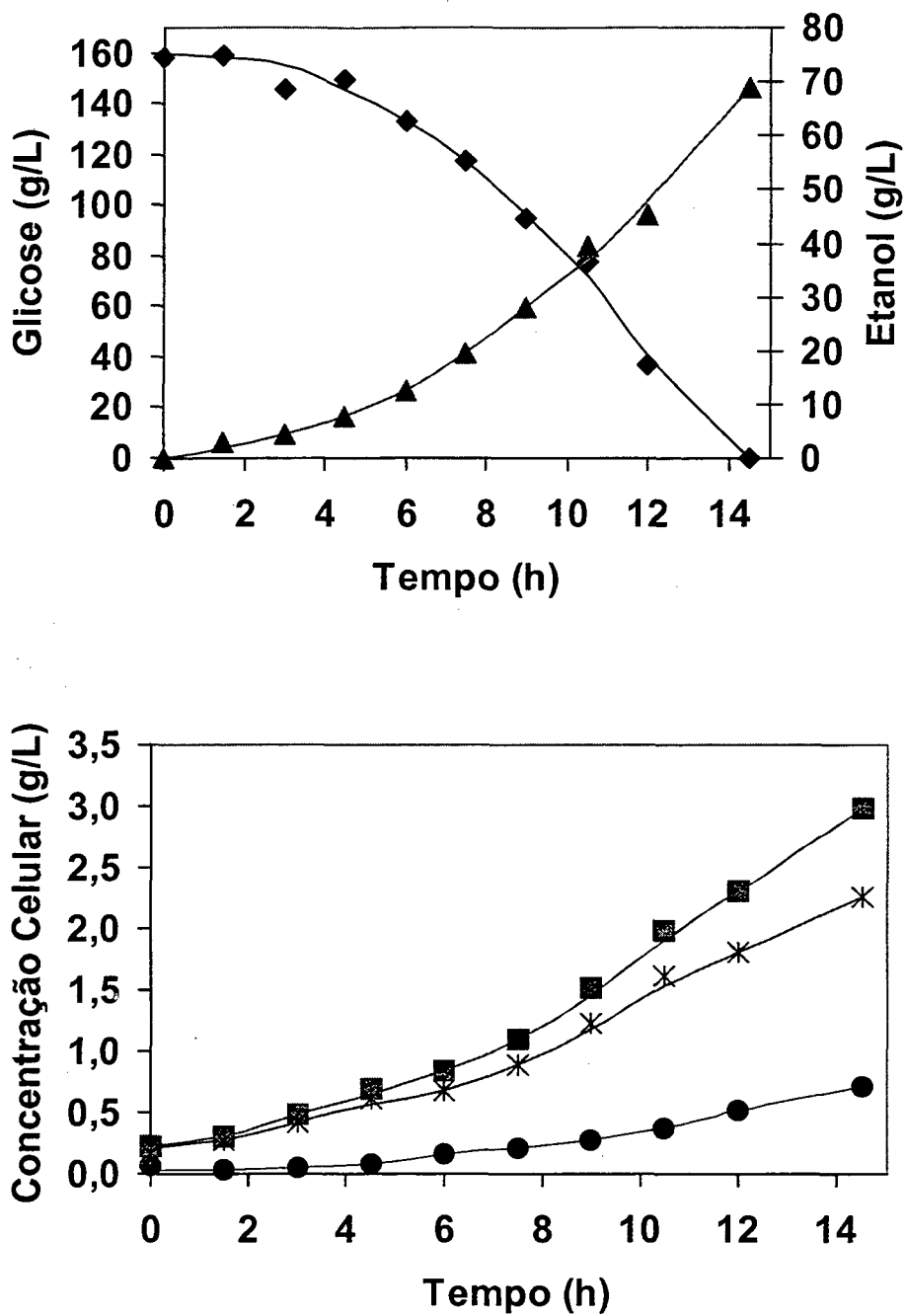


Figura V.4.3 : Concentração de glicose (\blacklozenge), etanol (\blacktriangle), células totais (\blacksquare), células floculantes ($*$) e células livres (\bullet) em função do tempo. Ensaio em regime batelada, ensaio com meio alternativo de crescimento, milhocina 20 g/L; ($T=30^{\circ}\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tabela A.4.3 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio em regime batelada com meio de crescimento alternativo, Milhocina 20,0 g/L; (T=30°C; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min⁻¹).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	158,1	0,00	0,233	0,071	0,162
1,50	159,1	2,91	0,313	0,035	0,278
3,00	145,6	4,42	0,480	0,053	0,427
4,50	149,9	7,63	0,690	0,083	0,607
6,00	133,4	12,71	0,840	0,160	0,680
7,50	117,7	19,64	1,100	0,210	0,890
9,00	94,5	27,91	1,510	0,280	1,230
10,50	77,9	39,49	1,980	0,370	1,610
12,00	36,8	45,42	2,310	0,510	1,800
14,50	0,2	69,09	2,980	0,714	2,266

**ANEXO A.5 – ENSAIOS EM REGIME DE BATELADA
ALIMENTADA**

Tabela A.5.1 : Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio 1 em regime batelada alimentada; ($S_0=150$ g/L; $T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	156,0	0,00	0,290	0,038	0,252
2,00	152,3	1,71	0,350	0,040	0,310
4,00	134,4	5,33	0,450	0,047	0,403
5,50	136,2	9,84	0,690	0,082	0,608
7,00	101,0	14,60	0,800	0,108	0,692
8,50	113,4	22,41	0,950	0,131	0,819
10,00	80,0	31,67	1,210	0,168	1,042
11,50	97,5	41,05	1,630	0,207	1,423
13,00	102,7	49,93	2,080	0,259	1,821
14,50	87,2	63,15	2,470	0,356	2,114
16,00	64,7	72,51	2,800	0,460	2,340
17,50	50,6	81,54	2,800	0,497	2,303
20,50	27,7	91,30	2,800	0,495	2,305
22,50	19,0	95,04	2,800	0,495	2,305
24,50	13,7	97,25	2,800	0,495	2,305
30,00	3,1	101,57	2,800	0,530	2,270

Tabela A.5.2 - Concentração de glucose (S), etanol (P), células totais (Xt), células livres (Xl) e células floculantes (Xf), em função do tempo. Ensaio 2 em regime batelada alimentada; ($S_0=150$ g/L; $T=30^\circ\text{C}$; pH 5,5; frequência do agitador de 70 min^{-1}).

Tempo (h)	S (g/L)	P (g/L)	Xt (g/L)	Xl (g/L)	Xf (g/L)
0,00	153,6	0,00	0,270	0,030	0,240
2,00	150,2	1,15	0,340	0,038	0,302
4,00	144,0	3,66	0,410	0,045	0,365
5,50	139,0	7,11	0,530	0,080	0,450
7,50	120,0	15,42	0,720	0,120	0,600
9,00	101,5	22,49	1,140	0,160	0,980
10,50	96,1	31,42	1,620	0,190	1,430
12,00	99,6	40,11	1,910	0,270	1,640
13,50	99,4	48,75	2,220	0,330	1,890
15,00	84,6	60,59	2,650	0,410	2,240
18,25	65,4	79,36	2,900	0,600	2,300
20,50	36,0	87,34	2,920	0,620	2,300
23,50	23,3	93,21	2,920	0,620	2,300
27,33	11,8	96,74	2,920	0,620	2,300
30,50	5,9	99,73	2,920	0,620	2,300

**ANEXO A.6 – BIOTRANSFORMAÇÃO DE GLUCOSE E FRUTOSE
EM ÁCIDO GLUCÔNICO E SORBITOL**

Tabela A.6.1 : Resultados gerais do ensaio de biotransformação.

Tempo (h)	Glucose (g/L)	Frutose (g/L)	Sorbitol (g/L)	Ác. Gluc. (g/L)
0,10	295,60	296,60	5,62	5,47
0,25				13,58
0,50	253,00	252,40	42,09	36,50
0,75				58,63
1,00	187,00	187,60	84,00	80,83
1,25				101,48
1,50	158,20	161,00	117,94	120,68
1,75				137,80
2,00	124,10	126,70	149,29	153,70
2,50	92,80	94,90	175,00	181,48
3,00	75,00	76,70	202,00	203,99
3,50				223,67
4,00	37,40	36,80	236,00	239,59
4,50				253,82
5,00	17,50	17,00	265,00	262,50
5,50				269,89
6,00	6,80	5,90	278,00	276,04
6,50				279,36
7,00	3,20	1,40		281,56
7,50				283,21
8,00	2,12	0,00	286,00	284,30
8,50				284,84
9,00	1,96	0,00	287,00	285,39
9,50				285,39
10,00	1,70	0,00	288,00	285,39