

**LEONARDO DE ALMEIDA FERREIRA E SILVA**

**EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS E OPERACIONAIS PARA A  
PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA IQ-Ar/45-1 A  
PARTIR DO MELAÇO EM BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Química

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cecília Laluce  
Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Reinaldo Marchetto

Araraquara  
2010

LEONARDO DE ALMEIDA FERREIRA E SILVA


Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 26 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr<sup>a</sup> Cecília Laluece (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Prof. Dr. Douglas Wagner Franco  
Instituto de Química – USP, São Carlos

**Dedico este trabalho a Deus, a meus  
pais, meu irmão e amigos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS pela minha saúde e por me dar coragem para enfrentar os maus momentos de minha vida. Agradeço a ELE também pela ótima família e excelentes amizades.

Agradeço a meus pais por sua presença e por sempre me apoiarem nas minhas decisões. Agradeço à minha mãe pela força e garra. Agradeço a meu irmão pelos longos papos intelectuais aos quais ele me submetia.

Agradeço aos meus amigos da graduação e da Academia de kung fu Garra de Águia. Sou grato aos amigos do laboratório Daniel “Aspira”, Estela, Fernando Delfino, Jéssica, Karen, Maria Olívia, Meline e Tarcísio pelo grande convívio dos últimos dois anos.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cecília Laluze por ter me acolhido como mestrando e ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Leinig Perazolli pelas correções da dissertação e a todos os demais professores do Instituto de Química pelo aprendizado.

Agradeço também a todos os colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Química, da Graduação em Química e a todos os outros.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

**“Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.”  
(Fernando Pessoa)**

**"Há homens que perdem a saúde para juntar  
dinheiro e depois perdem o dinheiro para  
recuperar a saúde. Por pensarem  
ansiosamente no futuro, esquecem o presente,  
de tal forma que acabam por nem viver no  
presente nem no futuro. Vivem como se nunca  
fossem morrer e morrem como se nunca  
tivessem vivido..."  
(Confúcio)**

## RESUMO

Os resultados descritos neste trabalho para a produção de etanol utilizando-se a levedura IQ-AR/45-1, forneceram informações sobre os melhores suplementos nutricionais e melhor tamanho de inóculo para a fermentação em batelada alimentada. Dadas as variações na composição do melaço e o uso de uma nova levedura, faz-se necessário o estudo de suas exigências nutricionais em processos fermentativos. Experimentos preliminares em batelada simples mostraram que a adição de DAP diminuiu o tempo de fermentação, estimulou o acúmulo da biomassa e produção de etanol enquanto o  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  diminuiu o tempo da fermentação, e aumentou o acúmulo de etanol elevando a produtividade. A adição de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  produziu mais etanol, melhorou o rendimento alcoólico e a produtividade. Estes resultados obtidos em batelada simples foram transferidos para o sistema em batelada alimentada. A melhor vazão do melaço 20 % em ART foi de  $0,40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  para um volume final de trabalho de 100,0 mL. O aumento da temperatura de fermentação de  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em meio suplementado com DAP e  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou DAP e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  diminuiu o tempo da fermentação e a biomassa produzida, porém, com menor rendimento e maior produtividade de etanol. O tamanho do inóculo foi estudado com meio suplementado a  $34^\circ\text{C}$ . As melhores condições foram obtidas no processo em batelada alimentada a  $34^\circ\text{C}$  no qual foi utilizado melaço clarificado com ácido sulfúrico e uma quantidade de inóculo de  $(23,7 \pm 0,1) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  que levou a um tempo de fermentação de 5 horas. Nestas condições, o rendimento alcoólico foi de  $(79,1 \pm 0,7) \%$  e a produtividade de  $(16,17 \pm 0,56) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** leveduras, melaço, fermentação em batelada alimentada.

## ABSTRACT

The results of the fermentative processes for ethanol production using the yeast IQ-AR/45-1, provided information about the best nutritional supplementation and inoculum size for the batch fermentation. Due to the differences in the sugarcane molasses and the use of a new yeast strain, it was necessary to study the nutritional requirements of the new yeast. Previous experiments in batch fermentation showed that the DAP addition reduced the fermentation time, enhanced the biomass and ethanol production while the  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  reduced the fermentation time and increased both the ethanol production and productivity. The addition of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  to the molasses increased the ethanol yield and enhanced the productivity. These results obtained in batch cultures were assayed in fed-batch fermentation. Using 20 % molasses (TRS), the best flow was  $0.40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  for a final working volume of 100.0 mL. When molasses supplemented with DAP and  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  or DAP and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  was used in the fed-batch experiments, the raise in the temperature from 34 °C to 37 °C led to decreases in the fermentation time, production of biomass, and ethanol yield followed by increases in ethanol productivity. The best inoculum size to the ethanol fermentation was  $(23.7 \pm 0.1) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  which led to a yield of  $(79.1 \pm 0.7) \%$  and productivity of  $(16.17 \pm 0.56) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

**Keywords:** yeast, sugarcane molasses, fed-batch fermentation

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Composição e estrutura da parede celular da *S. cerevisiae*: (a) manoproteína; (b)  $\beta$ -1,6 glucana; (c)  $\beta$ -1,36 glucana; (d) quitina; (e) cadeia N glicosídica; (f) cadeia O-glicosídica; (g) enzimas periplasmáticas; (h) membrana plasmática** 21
- Figura 2: Componentes protéicos da membrana plasmática** 23
- Figura 3: Micrografia eletrônica de varredura apresentando: (a) célula-mãe com brotamento e (b) cicatriz causada pelo brotamento** 25
- Figura 4: Fisiologia do crescimento de brotos na superfície da levedura, mostrando o anel de quitina formado e a migração de organelas para o broto.** 26
- Figura 5: Ciclo de vida da *S. cerevisiae*. Em (A) as células haplóides podem se multiplicar indefinidamente por mitose desde que sejam nutridas e não permaneçam em contato; em (B) duas células haplóides se conjugam formando uma célula diplóide; em (C) a célula diplóide pode se multiplicar por mitose indefinidamente; em (D) a célula sofre esporulação na falta de nutrientes** 28
- Figura 6: Sequencia das reações enzimáticas de conversão da glicose a etanol** 30
- Figura 7: Curva típica de crescimento de leveduras** 36
- Figura 8: Curva padrão de calibração de açúcares redutores totais** 44
- Figura 9: Absorbância medida em função da massa seca de células** 45
- Figura 10: Curva padrão de absorbância em função do número de células presentes em 1,0 mL de solução** 47
- Figura 11: Curva de enchimento do reator em função do tempo para vazão constante de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> (■) e 0,2 mL.min<sup>-1</sup> (●)** 52



Figura 12: Curvas de consumo de substrato (■), formação de biomassa (●) e de etanol (▲) para as fermentações do melão em batelada simples a 34°C. Melão: (A) sem suplementação; (B) suplementado com 0,5 g.L<sup>-1</sup>; (C) suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup>; (D) suplementado com 2,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP. Condições: melão clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup> contendo 20 % em ART, inóculo de 2,0 g.L<sup>-1</sup>, e agitação de 125 rpm 54

Figura 13: Curvas de consumo de substrato (■), formação de biomassa (●) e de etanol (▲) para as fermentações em batelada simples do melão suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP a 34°C. Suplementação: (A) sem adição de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; (B) com adição de 0,1 g.L<sup>-1</sup>; (C) com adição de 0,2 g.L<sup>-1</sup>; (D) com adição de 0,3 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Condições: melão clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, contendo 20 % de ART, inóculo de 2,0 g.L<sup>-1</sup>, e agitação de 125 rpm 57

Figura 14: Curvas de consumo de substrato (■), formação de biomassa (●) e de etanol (▲) para as fermentações em batelada simples do melão a 34°C. Suplementação com MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: (A) sem adição; (B) com adição de 0,1 g.L<sup>-1</sup>; (C) com adição de 0,2 g.L<sup>-1</sup>. Condições: melão 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, inóculo de 2,0 g.L<sup>-1</sup> e agitação de 125 rpm 60

Figura 15: Efeito da vazão de alimentação sobre as curvas de tempo massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) para as fermentações em batelada alimentada: (A) vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup>; (B) vazão (F) = 0,20 mL.min<sup>-1</sup>. Condições: melão 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, inóculo de 31,6 g.L<sup>-1</sup>, a 34°C e agitação de 125 rpm, tempo de alimentação de 3 horas em (A) e de 6 horas em (B) 63

Figura 16: Efeito das mudanças de pH na clarificação do melão sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) para as fermentações em batelada alimentada do melão clarificado com 1,48 g.L<sup>-1</sup> de dihidrogeno fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): ajuste de pH a 4,5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup> antes da clarificação (A) e após a clarificação(B).  
Condições de fermentação: Melão 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup>, inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup>, agitação de 125 rpm e tempo de alimentação de 3 horas 65

Figura 17: Efeito da temperatura sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) para as fermentações em batelada alimentada: (A) 34°C; (B) 37°C. Condições: inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup>, vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup>, agitação de 125 rpm, melação 20 % em ART clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup> e suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e tempo de alimentação de 3 horas 68

Figura 18: Efeito da temperatura sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) para as fermentações em batelada alimentada: (A) 34°C; (B) 37°C. Condições: inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup>, vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup>, agitação de 125 rpm, melação 20 % em ART clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup> e suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, tempo de alimentação de 3 horas 70

Figura 19: Efeito do uso de um inóculo de 15,1 g.L<sup>-1</sup> e das adições de suplementos (1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) a 34°C sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) nos experimentos: (A) sem e (B) com adição de suplementos. Condições: melação 20% em ART; vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup> e 125 rpm de agitação 72

Figura 20: Efeito do uso de um inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup> e das adições de suplementos (1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) a 34°C sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) nos experimentos: (A) sem e (B) com adição de suplementos. Condições: melação 20% em ART; vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup> e 125 rpm de agitação 74

Figura 21: Efeito do inóculo de 29,1 g.L<sup>-1</sup> e das adições de suplementos (1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) a 34°C sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) nos experimentos: (A) sem e (B) com adição de suplementos. Condições: melação 20% em ART; vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup> e 125 rpm de agitação 75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Funções fisiológicas da parede celular das leveduras (WALKER, 1998)</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 2: Equivalente em açúcar consumido para produtos e subprodutos da fermentação com rendimento de 85-92%</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 3: Elementos nutricionais das leveduras e suas funções (WALKER, 1998)</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 4: Concentração ótima de cátions para o crescimento de leveduras (WALKER, 1998)</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 5: Comparação entre métodos de clarificação do melão</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 6: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 12</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 7: Parâmetros de fermentação calculados com os dados da Tab. 6</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 8: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 13</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 9: Parâmetros de fermentação calculados com os dados da Tab. 8.</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 10: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 14</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 11: Parâmetros de fermentação calculados com os dados da Tab. 10.</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 12: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 15</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 13: Parâmetros calculados com os dados da Tab. 12</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 14: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 16</b>	<b>66</b>

<b>Tabela 15: Parâmetros calculados com os dados da Tab. 14</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 16: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 17</b>	<b>69</b>
<b>Tabela 17: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 18</b>	<b>70</b>
<b>Tabela 18: Parâmetros calculados com os dados das Tabs. 16 e 17</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 19: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 19</b>	<b>73</b>
<b>Tabela 20: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 20</b>	<b>74</b>
<b>Tabela 21: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 21</b>	<b>76</b>
<b>Tabela 22: Efeito do tamanho de inóculo e da adição de suplementos sobre os parâmetros calculados com os dados das Tabs. 19, 20 e 21</b>	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Fig.	Figura
Tab.	Tabela
DAP	diamônio hidrogeno fosfato
EDTA	ácido etileno diamino tetra acético
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
Pi	fosfato inorgânico
V	volume do reator
m	massa
ART	açúcares redutores totais
P	concentração do etanol no fim da fermentação
Pr	produtividade de etanol
R	rendimento fermentativo
S <sub>0</sub>	concentração do substrato que alimenta o reator
X	biomassa no reator

## LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Dalton
nm	nanômetro
$A_{546nm}$	absorbância em 546 nm
$\lambda$	comprimento de onda da radiação eletromagnética
$A_{570nm}$	absorbância em 570 nm
RPM	rotações por minuto
t	tempo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>A levedura <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>20</b>
2.1.1	As células da levedura <i>S. cerevisiae</i>	20
2.1.2	A estrutura dos envoltórios celulares	20
2.1.2.1	<i>A parede celular</i>	20
2.1.2.2	<i>Fenômenos da superfície celular</i>	22
2.1.2.3	<i>Membrana plasmática</i>	23
2.1.2.4	<i>O citoplasma e o citoesqueleto</i>	24
<b>2.2</b>	<b>Transporte através de membranas</b>	<b>24</b>
2.2.1	Transporte de açúcares	24
2.2.2	Transporte de alcoóis	24
<b>2.3</b>	<b>Genética das leveduras</b>	<b>25</b>
2.3.1	Genética da reprodução assexuada ou mitose via formação de brotos	25
2.3.2	Genética da reprodução sexuada ou meiose via esporulação	27
2.3.2.1	<i>A esporulação das leveduras</i>	27
2.3.2.2	<i>A recombinação ou formação de célula híbrida</i>	27
2.3.3	Geração de heterogeneidade na população de leveduras em fermentações industriais	28
<b>2.4</b>	<b>Metabolismo de leveduras</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Nutrição das leveduras</b>	<b>31</b>
2.5.1	Os meios de cultivo	33
2.5.2	Matérias – primas industriais	34
2.5.2.1	<i>Preparo de mostos de cana-de-açúcar</i>	34
2.5.2.2	<i>Preparo de mostos de melaço</i>	35
<b>2.6</b>	<b>Leveduras e contaminantes</b>	<b>35</b>
<b>2.7</b>	<b>Cinética dos processos fermentativos</b>	<b>36</b>
<b>2.8</b>	<b>Processos industriais de fermentação</b>	<b>38</b>
2.8.1	Processo em batelada	38

2.8.2	Processo em batelada alimentada	38
2.8.3	Processo semicontínuo	39
2.8.4	Processo contínuo	39
<b>2.9</b>	<b>A produção de etanol em destilarias</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Levedura utilizada</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Condições de fermentação</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Ensaio analíticos</b>	<b>42</b>
4.3.1	Ensaio do etanol	42
4.3.2	Ensaio dos açúcares redutores	42
4.3.2.1	<i>Curva padrão de açúcar redutor</i>	43
<b>4.4</b>	<b>Ensaio microbiológicos</b>	<b>44</b>
4.4.1	Determinação da biomassa por massa seca	44
4.4.2	Determinação da biomassa por turbidimetria	45
4.4.3	Determinação do número de células por contagem em câmara de Neubauer	46
4.4.4	Determinação do fator de conversão de medida turbidimétrica em número de células	46
<b>4.5</b>	<b>Propagação do inóculo e preparo do leite de levedura</b>	<b>47</b>
4.5.1	Propagação do inóculo	47
4.5.2	Preparo do leite de levedura	47
<b>4.6</b>	<b>Método de esterilização</b>	<b>48</b>
<b>4.7</b>	<b>Métodos de clarificação do melaço</b>	<b>48</b>
4.7.1	Clarificação do melaço com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	48
4.7.2	Clarificação do melaço com KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	48
<b>4.8</b>	<b>Fermentação em batelada simples</b>	<b>49</b>
<b>4.9</b>	<b>Fermentação em batelada alimentada com vazão de alimentação constante</b>	<b>49</b>
<b>4.10</b>	<b>Cálculos dos produtos de fermentação e parâmetros cinéticos</b>	<b>50</b>
4.10.1	Cálculos dos acúmulos de massa em função do tempo para as fermentações	50
4.10.1.1	<i>Batelada simples</i>	50
4.10.1.2	<i>Batelada alimentada</i>	50



4.10.2 Critérios de cálculos dos valores finais de biomassa, produto e açúcar residual	50
4.10.3 Cálculos dos parâmetros de fermentação	50
<b>4.11 Perfil de uma curva de volume do bioreator em função do tempo para uma batelada alimentada com diferentes vazões de alimentação</b>	<b>52</b>
<b>4.12 Reagentes utilizados</b>	<b>52</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Clarificação do melaço</b>	<b>53</b>
<b>5.2 Batelada simples: suplementação nutricional</b>	<b>54</b>
5.2.1 Efeito da suplementação nutricional do melaço sobre a fermentação em batelada simples a 30°C	54
5.2.1.1 <i>Suplementação do melaço com diamônio hidrogeno fosfato (DAP)</i>	54
5.2.1.2 <i>Efeito da adição de sulfato de zinco heptahidratado ao melaço contendo diamônio hidrogeno fosfato (DAP) sobre a fermentação do melaço em batelada simples a 30°C</i>	56
5.2.1.3 <i>Efeito da adição de sulfato de magnésio heptahidratado ao melaço contendo diamônio hidrogeno fosfato (DAP) sobre a fermentação do melaço a 30°C em batelada simples</i>	59
<b>5.3 Batelada alimentada</b>	<b>62</b>
5.3.1 Efeito da vazão de alimentação do melaço suplementado com diamônio hidrogeno fosfato (DAP) sobre a fermentação em batelada alimentada a 34°C	62
5.3.2 Efeito do uso de estratégias diferentes de ajuste de pH na clarificação do melaço sobre a fermentação em batelada alimentada a 34°C	65
5.3.3 Efeito das temperaturas de 34°C e 37°C sobre a fermentação do melaço suplementado com diamônio hidrogeno fosfato (DAP) e sulfato de magnésio heptahidratado em batelada alimentada	67
5.3.4 Efeito das temperaturas de 34°C e 37°C sobre a fermentação do melaço suplementado com diamônio hidrogeno fosfato (DAP) e sulfato de zinco heptahidratado em batelada alimentada	69
5.3.5 Efeito da suplementação do melaço associado ao aumento do inóculo em batelada alimentada a 34°C	72
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A cana de açúcar (*Saccharum spp.*) é de grande importância para o Brasil, pois é utilizada na produção de açúcar e de etanol, que representa uma alternativa como substituto de combustíveis provenientes do petróleo. Este álcool é uma fonte renovável de energia e seu uso reduz as emissões de gás carbônico, um dos gases causadores do efeito estufa, comparativamente aos combustíveis fósseis, pois o CO<sub>2</sub> produzido na combustão do etanol é utilizado para o crescimento da cana de açúcar.

No Brasil, as indústrias de produção de etanol utilizam o caldo da cana de açúcar e melaço como matérias-primas na produção de etanol. A sacarose é obtida a partir da cristalização do caldo de cana, gerando como subproduto o melaço, que é um meio quimicamente complexo e mais pobre em nutrientes do que o caldo da cana de açúcar e, por este motivo, precisa ser suplementado com fontes nutrientes para otimizar as condições de crescimento e produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae*.

A nutrição dos micro-organismos utilizados nos processos fermentativos industriais depende de seu tipo e linhagem. Essencialmente todos os nutrientes podem limitar a velocidade da fermentação, estando presentes em elevada ou pequena concentração. Em baixas concentrações há um pequeno crescimento celular e em altas ocorre um efeito inibitório sobre os micro-organismos.

O presente projeto teve por objetivo principal estabelecer condições para o uso de uma levedura IQ-Ar/45-1 construída a partir de leveduras isoladas de bioreatores de fermentação industrial.

Os objetivos específicos foram: estudar as exigências nutricionais da nova levedura quanto à suplementação do melaço visando maior tolerância ao etanol produzido, aumentar o consumo de açúcar com retenção de viabilidade utilizando sais de amônio, de zinco e de magnésio e o estabelecimento das condições de fermentação a serem mantidas nos processos tais como, vazão de alimentação, tamanho do inóculo e temperatura do processo.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 A levedura *S. cerevisiae***

#### **2.1.1 As células da levedura *S. cerevisiae***

Leveduras são células eucarióticas unicelulares contendo núcleo, mitocôndria, aparelho de Golgi, vesículas de secreção, retículo endoplasmático, vacúolos, ribossomos, membrana plasmática, periplasma, parede celular e outras organelas. Tais microorganismos são usados como modelo em estudo de células eucarióticas em geral, pois eles apresentam características estruturais e funcionais de eucariotos superiores. No entanto, uma célula animal não apresenta parede celular rígida como a levedura.

#### **2.1.2 A estrutura dos envoltórios celulares**

O envelope celular é a estrutura que envolve o citoplasma da levedura, sendo constituído por parede celular, membrana plasmática, e periplasma. Em algumas leveduras há também uma cápsula envolvendo este envelope. Na levedura *S. cerevisiae*, o envelope celular representa cerca de 15% do total do volume da célula e desempenha o importante papel de controlar propriedades osmóticas e de permeabilidade da célula.

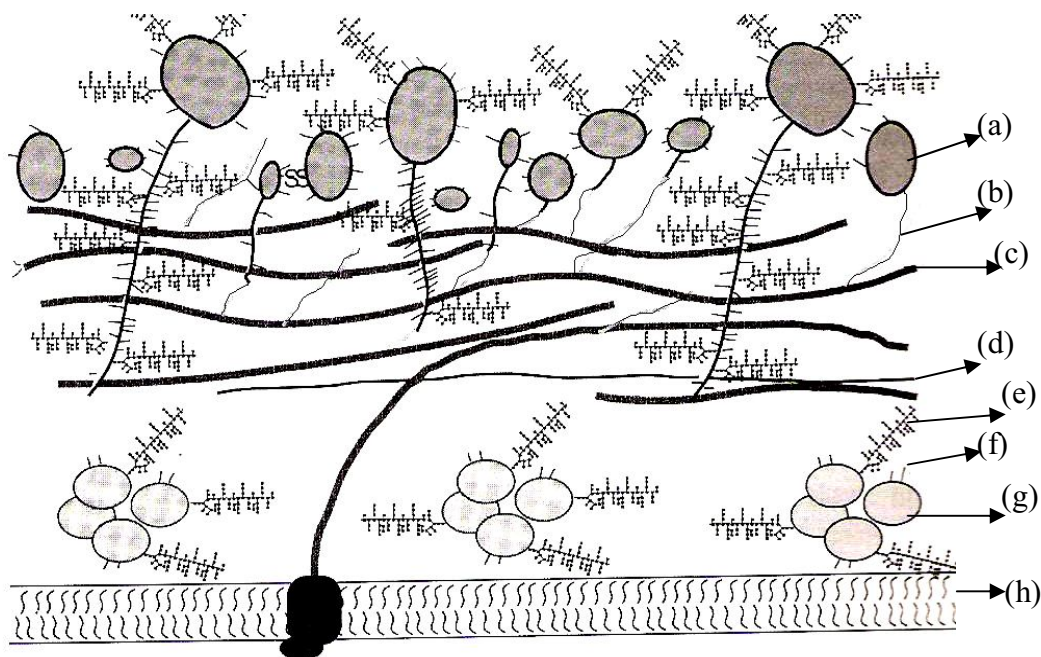
##### **2.1.2.1 A parede celular**

A parede celular das leveduras apresenta, em geral, de 100 a 200 nm de espessura, compreendendo de 15-25% do total da massa seca da célula.

Os polissacarídeos são os principais constituintes estruturais da parede celular (80-90 % da parede). Estes são, principalmente, glucanas e mananas e menor proporção de quitina. A resistência da parede celular das leveduras deve-se aos componentes da glucana da parede celular e que são parcialmente arranjados em forma de uma rede microfibrilar. Ambas as glucanas  $\beta$ -1,6 e  $\beta$ -1,3 estão presentes na parede celular e são distinguidas por sua diferença de solubilidade em meio ácido e básico. Nas manoproteínas as unidades de glicose estão ligadas por

ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6,  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3. A quitina é um polímero de N-acetilglucosamina que está presente em pequenas quantidades na parede celular da *S. cerevisiae* (2-4%) principalmente no local das cicatrizes dos brotos. A parede celular de leveduras inclui também proporções variáveis de proteínas, lipídios e fosfatos inorgânicos, sendo que tais proporções variam com a linhagem da levedura, bem como a idade e condições de crescimento.

A Fig. 1 apresenta a estrutura da parede celular. É consenso geral de que a espécie de levedura *S. cerevisiae* apresenta uma parede celular constituída por manoproteínas com ligações glicosídicas cruzadas. As manoproteínas são ligadas entre si por interações hidrofóbicas ou por ligações de dissulfeto (ponte de enxofre) ligando-se à rede de glucana por ligações covalentes. As manoproteínas podem ser importantes na determinação de porosidade da parede celular da levedura (WALKER, 1998).



**Figura 1: Composição e estrutura da parede celular da *S. cerevisiae*:** (a) manoproteína; (b)  $\beta$ -1,6 glucana; (c)  $\beta$ -1,3 glucana; (d) quitina; (e) cadeia N glicosídica; (f) cadeia O-glicosídica; (g) enzimas periplasmáticas; (h) membrana plasmática

A quitina, além de ser encontrada em cicatriz de brotos, também é localizada em pequenas quantidades por toda a parede celular da levedura *S. cerevisiae*

atuando como receptores de toxinas 'killer' e garantir a manutenção da integridade morfológica e osmótica.

A Tab. 1 apresenta as funções fisiológicas da parede celular das leveduras.

**Tabela 1: Funções fisiológicas da parede celular das leveduras (WALKER, 1998)**

<b>Função</b>	<b>Comentários</b>
Proteção física	Parede celular protege o protoplasma e mantém a forma das células das leveduras
Estabilidade osmótica	A remoção da parede celular resulta na lise do protoplasma na ausência de um estabilizador osmótico
Permeabilidade	Solutos maiores que 600 Da não permeiam a parede celular, sendo a entrada e saída de água das células controlada pela parede celular
Imobilização de enzimas	Enzimas como a glucanase e invertase são imobilizadas na parede celular das leveduras
Suporte de cátions	Muitos cátions, incluindo de metais potencialmente tóxicos se aderem à parede celular das leveduras
Reconhecimento célula-célula	Sítios de reconhecimento para união de feromônios relacionados à reprodução sexuada e às toxinas 'killer'
Adesão célula-célula	Aglutinação sexual levedura-levedura, floculação e aglomeração

Em resumo, a parede celular das leveduras é uma organela multifuncional envolvida na proteção celular, manutenção da forma, interações celulares, receptores, suporte e atividade enzimática especializada.

### **2.1.2.2 Fenômenos da superfície celular**

A parede celular confere, ainda, propriedades de floculação e adesão às leveduras sendo estes fenômenos de relevância em processo industriais.

A floculação de leveduras é um fenômeno de agregação celular e que ocorre quando as células aderem-se, de maneira reversível, para formar flocos macroscópicos e que ficam em suspensão. Em geral, a floculação das leveduras

está associada com o início da fase estacionária, porém, o tempo e o grau de floculação não estão precisamente estabelecidos. Este fenômeno é importante em fermentação de bebidas, pois se a floculação for rápida, a fermentação terminará prematuramente, deixando açúcar residual no reator. A floculação das leveduras está baseada nas interações que ocorrem entre lectinas ativadas por cálcio e receptores de manose na parede celular das leveduras.

A aglomeração celular é algumas vezes confundida com floculação que, por sua vez, é um fenômeno irreversível de grande importância em linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas na panificação e para diferenciá-las, basta adicionar solução de EDTA, que complexa os íons  $\text{Ca}^{2+}$  dos flocos, dispersando os mesmos.

### 2.1.2.3 Membrana plasmática

As leveduras não existiriam como entidades unicelulares sem a membrana plasmática, isto porque essas estruturas representam a primeira barreira para a passagem de moléculas hidrofílicas e, portanto, impedem o conteúdo citoplasmático de misturar-se livremente com o meio aquoso.

A membrana plasmática da *S. cerevisiae* possui 7,5 nm de espessura e apresenta ainda, eventuais invaginações. Esta membrana, assim como outras membranas biológicas, é descrita por meio do modelo da bicamada lipídica contendo proteínas globulares hidrofóbicas que formam o chamado 'Modelo do Mosaico Fluido'. Os componentes lipídicos compreendem principalmente fosfolipídios e esteróis, sendo provável que esses últimos conferem rigidez às membranas, ao passo que os primeiros conferem fluidez.

Os componentes protéicos incluem aqueles envolvidos em transporte de solutos (ATPase, permeases e canais), síntese de parede celular (glucana e quitina sintases), transdução de sinal através da membrana e ancoradores do citoesqueleto como mostra a Fig. 2.



**Figura 2: Componentes protéicos da membrana plasmática**

A membrana plasmática das leveduras não é estática, pelo contrário, ela sofre mudanças estruturais e funcionais dependendo das condições de crescimento.

#### **2.1.2.4 O citoplasma e o citoesqueleto**

O citoplasma da levedura é um fluido coloidal contendo compostos de massas moleculares baixas e intermediárias, proteínas, glicogênio e outras moléculas solúveis. O citossol contém organelas tais como ribossomos e lipídios que atuam como reserva de energia e precursores da biossíntese das membranas da levedura.

O citoesqueleto das leveduras compreende microtubos e microfilamentos. Estas são estruturas dinâmicas que realizam trabalho mecânico nas células através da união e separação de subunidades protéicas que estão envolvidas com vários aspectos da morfologia das leveduras, incluindo mitose, meiose e septação.

## **2.2 Transporte através de membranas**

### **2.2.1 Transporte de açúcares**

O transporte de monossacarídeos ocorre por difusão facilitada, em pequena proporção, e por proteínas de transporte. Vinte transportadores de monossacarídeos foram descritos para a levedura *S. cerevisiae* (WALKER, 1998).

A absorção de glicose pela levedura *S. cerevisiae* é rápida em direção a um menor gradiente de concentração e os transportadores são estereoespecíficos. Este tipo de transporte não é cumulativo, ocorrendo até que se atinja o equilíbrio e, a energia do metabolismo ou fosforilação do ADP a ATP não é exigida na entrada de glicose na célula (WALKER, 1998).

O transporte de dissacarídeos ocorre com gasto de energia. Na maioria das leveduras, a sacarose é hidrolisada à glicose e frutose na parede celular pela invertase e estes produtos são transportados para o interior da célula. Em menor proporção, ocorre transporte da sacarose para o interior da levedura, com gasto de energia, onde esta é quebrada nos seus monossacarídeos glicose e frutose.

### **2.2.2 Transporte de álcoois**

Moléculas pequenas e solúveis em lipídios, como glicerol, metanol e etanol são transportados por difusão passiva. O etanol pode entrar na célula por difusão



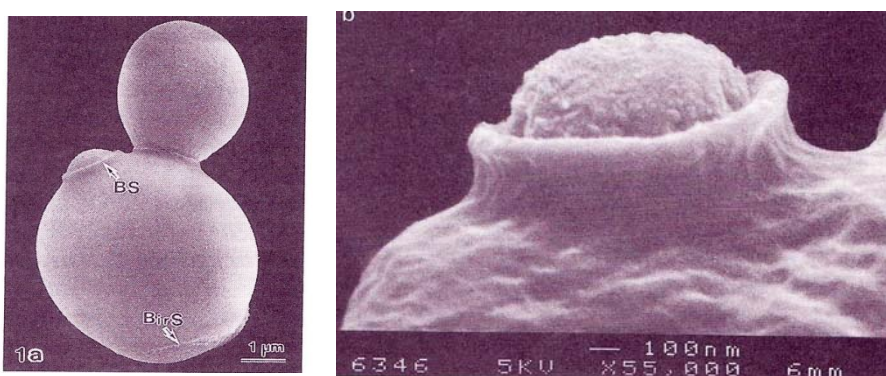
passiva durante o crescimento aeróbico em meio contendo glicose. No entanto, em elevadas concentrações, o etanol influencia na integridade da membrana e pode ser tóxico às proteínas da membrana celular, resultando em inibição do crescimento e mesmo morte celular (DING et al., 2009)

## 2.3 Genética das leveduras

### 2.3.1 Genética da reprodução assexuada ou mitose via formação de brotos

Durante a propagação de uma cultura, as células se dividem por mitose formando células exatamente idênticas a célula mãe por processo de brotamento.

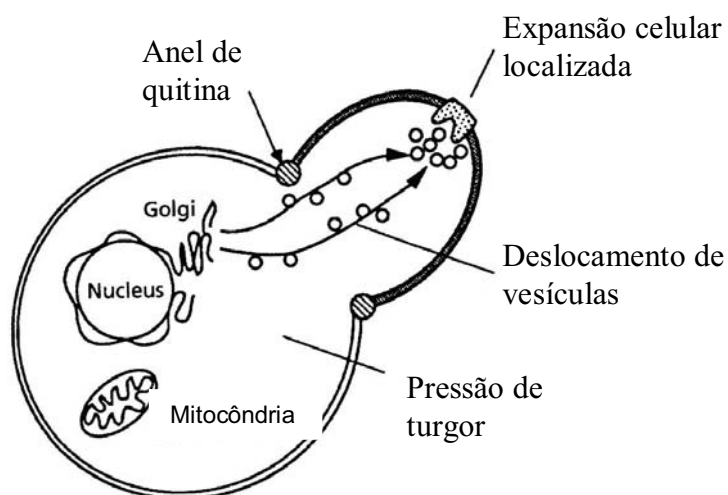
Cicatrizes de brotos são protuberâncias convexas, em forma de anel, ricas em quitina e que permanecem na superfície da célula-mãe após o brotamento da célula-filha. A Fig. 3 apresenta micrografias eletrônicas de varredura de uma célula-mãe em brotamento e da cicatriz formada após o brotamento (WALKER, 1998).



(a) (b)  
**Figura 3: Micrografia eletrônica de varredura apresentando: (a) célula-mãe com brotamento e (b) cicatriz causada pelo brotamento**

Brotos de levedura são iniciados quando a célula-mãe atinge um tamanho crítico de forma elipsoidal e coincidente com o início da síntese de DNA. Na *S. cerevisiae* tais brotos ocorrem geralmente na região de máxima curvatura da superfície celular. Em seguida ocorre uma fragilização localizada da parede celular e isto, juntamente com a tensão exercida pela uma pressão osmótica interna, denominada pressão de turgor, leva à expansão do citoplasma formando uma nova área ou broto resultante da ação de glucana e quitina sintases (WALKER, 1998).

A quitina forma um anel na junção entre a célula-mãe e o broto (Fig. 4). Este anel de quitina irá conferir as características da cicatriz do broto após a divisão celular em um processo no qual o núcleo e outras organelas se dividem e migram em direção ao broto, ocorrendo a clivagem do mesmo na região entre a célula-mãe e o broto (WALKER, 1998).



**Figura 4: Fisiologia do crescimento de brotos na superfície da levedura, mostrando o anel de quitina formado e a migração de organelas para o broto**

Quando o brotamento da célula-filha se inicia, o crescimento da superfície da célula-mãe é interrompido durante o tempo restante da divisão celular.

Na levedura *S. cerevisiae*, o tamanho das células-mãe e das células-filha variam de forma assimétrica durante a divisão celular. Os brotos são menores que a célula-mãe no momento da clivagem, que é realizada por proteínas específicas denominadas septinas.

A porcentagem de leveduras em estado de brotamento em uma população de células pode ser calculada utilizando a micrografia de contraste de fase. Populações que se dividem rapidamente têm índice de brotamento por volta de 50%. Quando a célula-filha finalmente se destaca da célula-mãe, aparece uma região de cicatriz nas superfícies das duas células. Na parede da célula-mãe é formada a cicatriz do broto, rica em quitina, e na célula-filha é formada a cicatriz de nascimento do broto, que é pobre em quitina. Na levedura *S. cerevisiae*, os locais de brotamento podem, ocasionalmente, se sobrepor à cicatriz de nascimento, mas nunca se sobrepoem à uma antiga cicatriz de brotamento (CHANT; PRINGLE, 1995 apud WALKER, 1998).

Em leveduras com brotamento multilateral, o número de cicatrizes determina a idade celular ou tempo de vida, indicando o número de vezes que a célula sofreu divisão. O limite de Hayflick (HAYFLICK, 1965 apud WALKER, 1998) refere-se a esta capacidade máxima de divisão de uma única célula e 25 divisões podem ser realizadas para a levedura *S. cerevisiae*.

### **2.3.2 Genética da reprodução sexuada ou meiose via esporulação**

#### **2.3.2.1 A esporulação das leveduras**

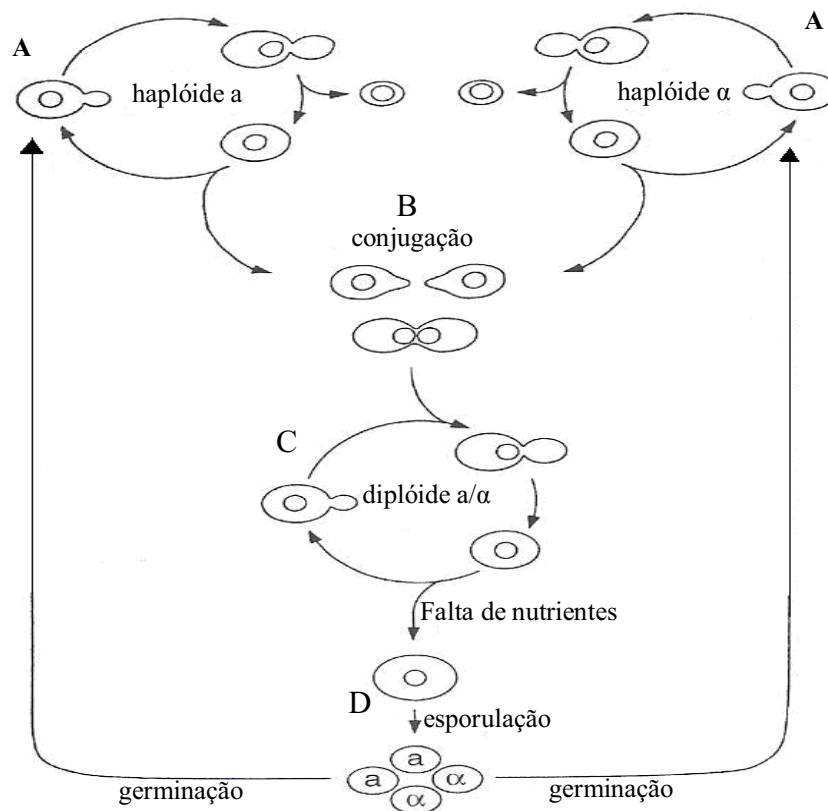
A esporulação envolve meiose e desenvolvimento de asci na célula, que podem ser produzidos, privando as células diplóides de *S. cerevisiae* de fonte de nitrogênio e fornecendo acetato como fonte de carbono. Sempre que as condições são adversas, a levedura entra em meiose e recombinação ocorre como uma tentativa de formar células mais resistentes às agressões ambientais (WALKER, 1998).

A divisão meiótica ou formação de gametas está envolvida com a reprodução sexuada. A levedura *S. cerevisiae* se divide formando quatro núcleos a partir dos quais quatro esporos são gerados e após a meiose se completar, obtém-se um asco derivado de uma única célula.

Após a reprodução sexuada, ocorre a conjugação de duas células haplóides de células diferentes, denominadas células **a** e **α**, que são induzidas à conjugação através de fatores de conjugação denominados fator **a** e fator **α**.

#### **2.3.2.2 A recombinação ou formação de célula híbrida**

A fusão dos dois núcleos haplóides resulta em um núcleo diplóide. O zigoto diplóide dará continuidade ao ciclo mitótico da divisão celular em meio de crescimento. Na falta de nutrientes nitrogenados e na presença de fonte de carbono não-fermentecível como etanol ou acetato, a levedura *S. cerevisiae* sofre meiose e a esporulação resulta na formação de quatro esporos haplóides, dois **a** e dois **α**. Os esporos podem germinar em meio rico e essas células haplóides se conjugam formando células diplóides. A Fig. 5 apresenta o ciclo de vida da levedura *S. cerevisiae* (WALKER, 1998).



**Figura 5: Ciclo de vida da *S. cerevisiae*.** Em (A) as células haplóides podem se multiplicar indefinidamente por mitose desde que sejam nutridas e não permaneçam em contato; em (B) duas células haplóides se conjugam formando uma célula diplóide; em (C) a célula diplóide pode se multiplicar por mitose indefinidamente; em (D) a célula sofre esporulação na falta de nutrientes

### 2.3.3 Geração de heterogeneidade na população de leveduras em fermentações industriais

A tolerância ao etanol e altas concentrações de açúcares, a adaptação à acidez elevada e outros fatores de estresse são as causas do aparecimento de mutantes e variantes fenotípicos (variantes fisiológicos). Os variantes fenotípicos tendem a desaparecer durante o processo de fermentação (THORNTON, 1991; MORAIS et al., 1997). Sabe-se que a população microbiana desenvolve heterogeneidade durante processos de fermentação (SUMNER; AVERY, 2002; MORAIS et al., 1997) e podem levar às seguintes situações: a) coexistência de células de diferentes tamanhos que se encontram em diferentes estágios do processo de divisão celular e expressando genes de forma diferenciada; b)

diferenças de idade entre células que passam a apresentar distinções em parâmetros fisiológicos e sensibilidade a agentes mutagênicos; c) diferenças em duração do ciclo de divisão celular, sendo que a parede das células passa a apresentar resistência elevada a enzimas líticas e redução da velocidade de crescimento em fase estacionária; d) aparecimento de variantes fenotípicas (sensíveis à elevação do estresse) por adaptação às condições de estresses.

## 2.4 Metabolismo das leveduras

A reação global da fermentação, em que a glicose é convertida em etanol é dada por:



na qual ADP é a adenosina difosfato, Pi é o fosfato inorgânico e ATP é adenosina trifosfato.

Assim, o objetivo da levedura ao metabolizar anaerobicamente a glicose, é produzir a molécula energética ATP que será utilizada nos diversos trabalhos celulares e de biossíntese.

A transformação de glicose em etanol envolve 12 reações em sequência ordenada, cada uma catalisada por uma enzima específica. Estas reações, apresentadas na Fig. 6, sofrem a ação de diversos fatores como nutrientes, minerais, pH, temperatura, entre outros e ocorrem a nível de citoplasma, logo, é nessa região da célula que o etanol é produzido.

Uma molécula de glicose é convertida a duas outras de ácido pirúvico através da glicólise que consiste em uma sequência de 10 reações enzimáticas. O ácido pirúvico pode ser utilizado no processo respiratório ou fermentativo. No processo fermentativo, duas enzimas são de fundamental importância para a produção de etanol: a enzima piruvato descarboxilase contém um átomo de magnésio e catalisa a reação em que o ácido pirúvico é descarboxilado a aldeído. Por outro lado, a enzima álcool desidrogenase, que contém um átomo de zinco, é responsável pela conversão do aldeído ao etanol.

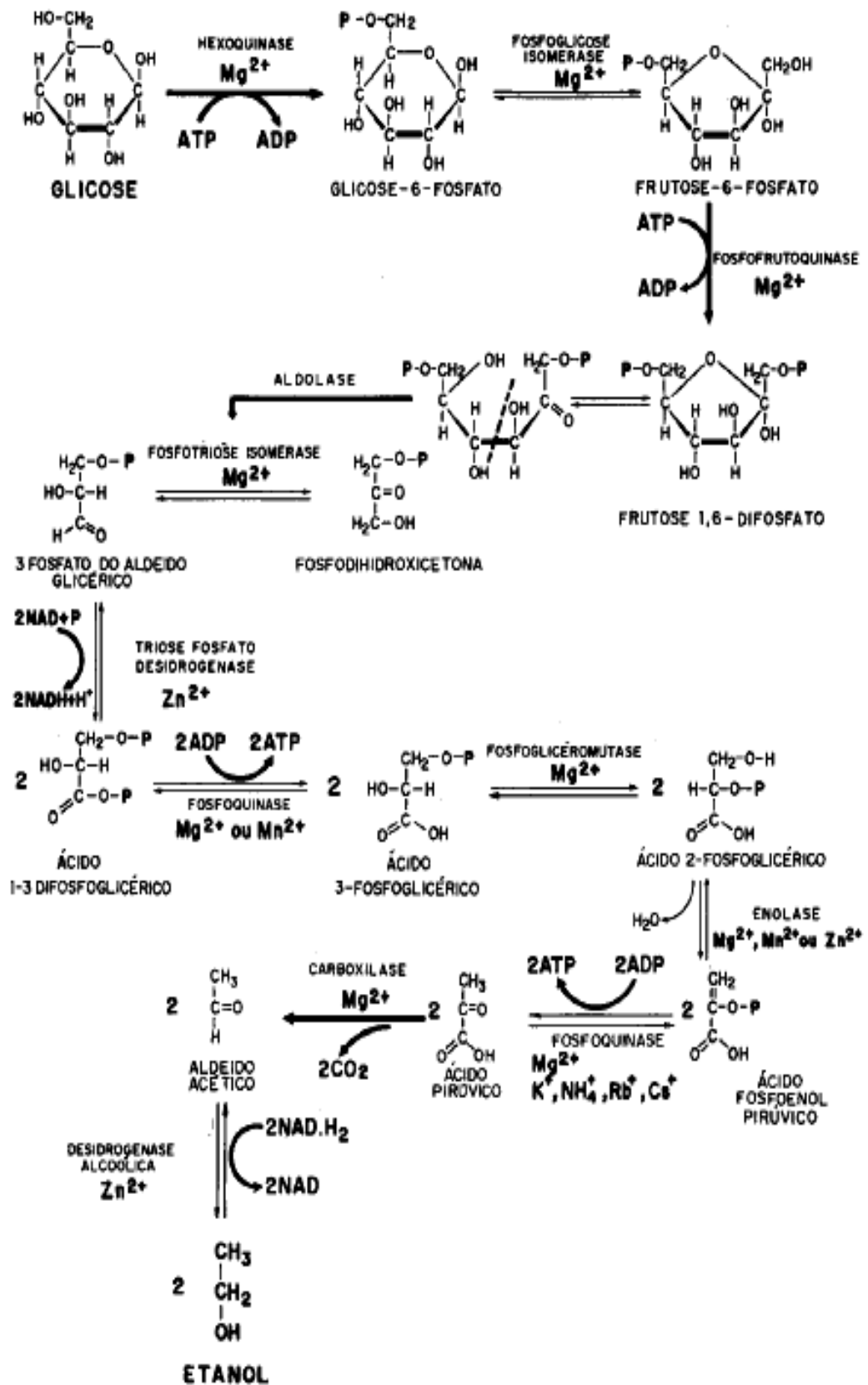


Figura 6: Sequência das reações enzimáticas de conversão da glicose a etanol (adaptado de VOLPE, 1997).

No final da metabolização de açúcares pela levedura são obtidos biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em aerobiose (presença de O<sub>2</sub>) e etanol e CO<sub>2</sub> em anaerobiose (ausência de O<sub>2</sub>).

Na fermentação alcoólica, juntamente com a produção de etanol e de biomassa, as leveduras produzem subprodutos de interesse metabólico como glicerol (relacionado a uma resposta ao estresse osmótico), ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, entre outros. Pode-se calcular o equivalente em açúcar consumido para a formação de cada um dos produtos e subprodutos da fermentação, levando-se em conta a estequiometria das reações, conforme Tab. 2 (BASSO, 2010).

**TABELA 2: Equivalente em açúcar consumido para produtos e subprodutos da fermentação com rendimento de 85-92%**

<b>Produtos e subprodutos da fermentação</b>	<b>Açúcar consumido (%)</b>
Etanol	46,0 - 47,0
Gás carbônico	41,0 – 45,0
Biomassa	1,0 – 5,0
Glicerol	2,0 – 9,0
Ácido succínico	0,3 – 1,2
Ácido acético	0,1 – 0,7
Óleo fúsel	0,2 – 0,6

## 2.5 Nutrição das leveduras

As leveduras são compostas principalmente de C, H, O, N, S e P presentes em macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios), junto com íons inorgânicos (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, entre outros) e elementos traço que desempenham papel estrutural e funcional no metabolismo celular. A Tab. 3 apresenta as principais necessidades e funções de tais elementos nas leveduras.

**Tabela 3: Elementos nutricionais das leveduras e suas funções (WALKER, 1998)**

<b>Elemento</b>	<b>Fonte</b>	<b>Funções celulares</b>
Carbono	Açúcares	Estrutura e fonte de energia
Hidrogênio	Prótons provenientes de meio ácido	Força motriz para transporte de prótons através da membrana
Oxigênio	O <sub>2</sub> , ar	Substrato para respiração envolvendo enzimas oxidativas, bem como síntese de ergosterol e outros ácidos graxos insaturados
Nitrogênio	Sais de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , uréia, aminoácidos	Presentes em proteínas, enzimas e ácidos nucléicos
Fósforo	Fosfatos	Estrutura de membrana e ácidos nucléicos
Potássio	Sais de K <sup>+</sup>	Balanço iônico e atividade enzimática
Magnésio	Sais de Mg <sup>2+</sup>	Estrutura celular de organelas e atividade enzimática
Enxofre	Sulfatos	Aminoácidos e vitaminas
Cálcio	Sais de Ca <sup>2+</sup>	Mensageiro na modulação de respostas de crescimento e metabolismo
Cobre	Sais de Cu <sup>2+</sup>	Cofatores de enzimas da cadeia respiratória
Ferro	Sais de Fe <sup>3+</sup>	Citocromos, cofatores de enzimas da cadeia respiratória
Manganês	Sais de Mn <sup>2+</sup>	Atividade enzimática
Zinco	Sais de Zn <sup>2+</sup>	Atividade enzimática
Níquel	Sais de Ni <sup>2+</sup>	Atividade da urease
Molibdênio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Metabolismo do nitrato e vitamina B <sub>12</sub>

A Tab. 4 apresenta as concentrações ótimas para o crescimento das leveduras, no entanto, estes valores podem mudar devido aos fatores tais como diferenças entre linhagens e interações iônicas.



**Tabela 4: Concentração ótima de cátions para o crescimento de leveduras (WALKER, 1998)**

<b>Cátion</b>	<b>Concentração</b>
H <sup>+</sup>	1,0 µmol.L <sup>-1</sup>
K <sup>+</sup>	2-4 mmol.L <sup>-1</sup>
Mg <sup>2+</sup>	2-4 mmol.L <sup>-1</sup>
Mn <sup>2+</sup>	2-4 µmol.L <sup>-1</sup>
Ca <sup>2+</sup>	< 1 µmol.L <sup>-1</sup>
Cu <sup>2+</sup>	1,5 µmol.L <sup>-1</sup>
Fe <sup>2+</sup>	1-3 µmol.L <sup>-1</sup>
Zn <sup>2+</sup>	4-8 µmol.L <sup>-1</sup>
Ni <sup>2+</sup>	10-90 µmol.L <sup>-1</sup>
Mo <sup>2+</sup>	1,5 µmol.L <sup>-1</sup>
Co <sup>2+</sup>	0,1 µmol.L <sup>-1</sup>
B <sup>+</sup>	0,4 µmol.L <sup>-1</sup>

A levedura necessita ainda de fatores de crescimento como vitaminas, purinas e pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos, aminoácidos, ácidos graxos e esteróis. Quando uma espécie de levedura necessita de um fator de crescimento e não ocorre a adição deste fator ao meio de cultura, então ocorre um crescimento pobre e diminuição da velocidade dos processos metabólicos. Em geral, são utilizadas vitaminas como a biotina, ácido pantotênico, ácido nicotínico (na forma de nicotinamida), tiamina e vitamina B.

### **2.5.1 Os meios de cultivo**

Devido às necessidades nutricionais relativamente simples das leveduras, torna-se muito fácil seu cultivo e crescimento. Para um crescimento vigoroso das leveduras, o extrato de malte é um meio complexo tradicionalmente empregado e pode ser preparado adicionando-se 1-2% (m/v) ao meio. Também como meio complexo pode ser utilizado o meio contendo extrato de levedura suplementado com peptona e glicose.

Na preparação do meio seletivo, muitos agentes antibacterianos e antifungos podem ser incorporados a este para inibir a proliferação desses microorganismos.

Algumas considerações são pertinentes quanto ao uso de meios de cultivo para a levedura na indústria. Para a produção de biomassa a partir do melaço, a concentração de açúcares deve ser mantida baixa por alimentação controlada (fermentação em batelada alimentada) para impedir o efeito da repressão pela glicose e promover a respiração das leveduras. Para a produção de etanol, a partir do melaço, as concentrações de açúcares devem ser mais elevadas para promover a fermentação alcoólica.

## **2.5.2 Matérias-primas industriais**

O caldo obtido pela moagem de cana-de-açúcar e que também pode ser utilizado como uma matéria-prima para a produção de etanol, possui cerca de 78-86% de água, 10-20% de sacarose, 0,1-2% de açúcares redutores, 0,3-0,5% de cinzas e entre 0,5-1,0% de compostos nitrogenados, sendo que seu pH varia de 5,2 a 6,8. Melaços são os subprodutos da fabricação de açúcar e que não são mais utilizados para a cristalização da sacarose. Sua composição varia de acordo com o processo de produção, mas pode-se admitir que seja composto de até 62% de açúcares, 20% de água, 8% de cinzas, 3% de matérias nitrogenadas e 7% de outros como gomas e ácidos. Na fração de açúcares há 32% de sacarose, 14% de dextrose e 16% de levulose. De maneira geral, o melaço possui cerca de 50% de açúcares fermentescíveis (LIMA et al., 2001, v.3).

### **2.5.2.1 Preparo de mostos de cana-de-açúcar**

O caldo que se obtém da moagem da cana-de-açúcar, misturado com a água de embebição, é rico em sacarose e açúcares redutores e está convenientemente diluído para sofrer a fermentação alcoólica. Embora se possa fazer a fermentação do caldo com o caldo bruto, normalmente ele é clarificado por meio de aquecimento, decantação e posterior filtração para separar colóides, gomas e materiais nitrogenados. Assim, este caldo clarificado fermenta melhor, espuma menos e suja menos as colunas de destilação (LIMA et al., 2001, v.3).

### **2.5.2.2 Preparo de mostos de melaço**

O mosto, líquido pronto para a fermentação, do melaço é obtido pela sua diluição com água. Os melaços têm ar ocluso, temperaturas diferentes e viscosidade variável ao longo dos dias de produção, que dificultam seu escoamento uniforme. As concentrações dos mostos utilizados nas destilarias brasileiras são medidas em graus Brix, definido como a massa de sólidos solúveis em 100 mL de solução, diluídos entre 15 e 20 °Brix (LIMA et al., 2001, v.3).

Mostos muito diluídos fermentam mais rápido e sujam menos os aparelhos de destilação, porém, exigem maior volume útil de fermentadores, mais espaços para eles, maior consumo de vapor, mais água para diluição e favorecem as infecções. Mostos concentrados, por sua vez, ocasionam maiores perdas em açúcares não fermentados, temperaturas mais levadas durante a fermentação, sujam mais os aparelhos de destilação, no entanto diminuem o volume útil dos reatores e há um menor gasto com água para diluição (LIMA et al., 2001, v.3). Quando as concentrações de açúcares no mosto fermentativo são muito elevadas pode ocorrer diminuição da fermentação devido ao aumento da pressão osmótica e da alta toxicidade do etanol para as leveduras (BISSON; BUTZKE, 2000), pois o etanol em elevadas concentrações pode destruir a membrana destas e causar queda da viabilidade celular ou mesmo a morte das células.

## **2.6 Leveduras e contaminantes**

A presença de contaminantes na fermentação resulta em sérios prejuízos para as leveduras refletindo-se de modo direto sobre a produtividade e o rendimento do processo produtivo.

Pode-se definir levedura contaminante como qualquer levedura presente no processo fermentativo, que não seja a levedura selecionada para a condução da produção de álcool.

Leveduras contaminantes podem se apresentar em maior número do que o fermento inicialmente empregado em poucos dias, já no início da safra, devido à fatores como agressividade na competição por nutrientes, maior velocidade de multiplicação, pressão de seleção favorável e proporção inicial significativa (TAVARES, 1992 apud CABRINI, 2010).

Tais leveduras podem trazer sérios prejuízos ao processo fermentativo, como redução no rendimento, maior tempo de fermentação, problemas operacionais, etc. Contudo, as leveduras contaminantes podem, ao contrário dos efeitos prejudiciais citados anteriormente, apresentar bom desempenho fermentativo, podendo ser selecionadas para atuarem como as leveduras de processo numa safra posterior.

Os maiores problemas causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação de ácidos orgânicos (ácidos como o acético, láctico e butírico) e de gomas dextrana e levanas que ocasionam a perda de açúcar e a intoxicação das leveduras.

A contaminação bacteriana, principalmente por *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*, está sempre presente e, dependendo de sua intensidade, compromete o rendimento do processo fermentativo. A contaminação bacteriana é favorecida por altas temperaturas e associa-se ao aumento da formação de ácido láctico (AMORIM, 2001 apud BRAGA, 2006).

## 2.7 Cinética dos processos fermentativos

A Fig. 7 mostra uma curva de crescimento obtida quando as leveduras são inoculadas em um meio nutriente adequado e sob condições ótimas de crescimento (WALKER, 1998).

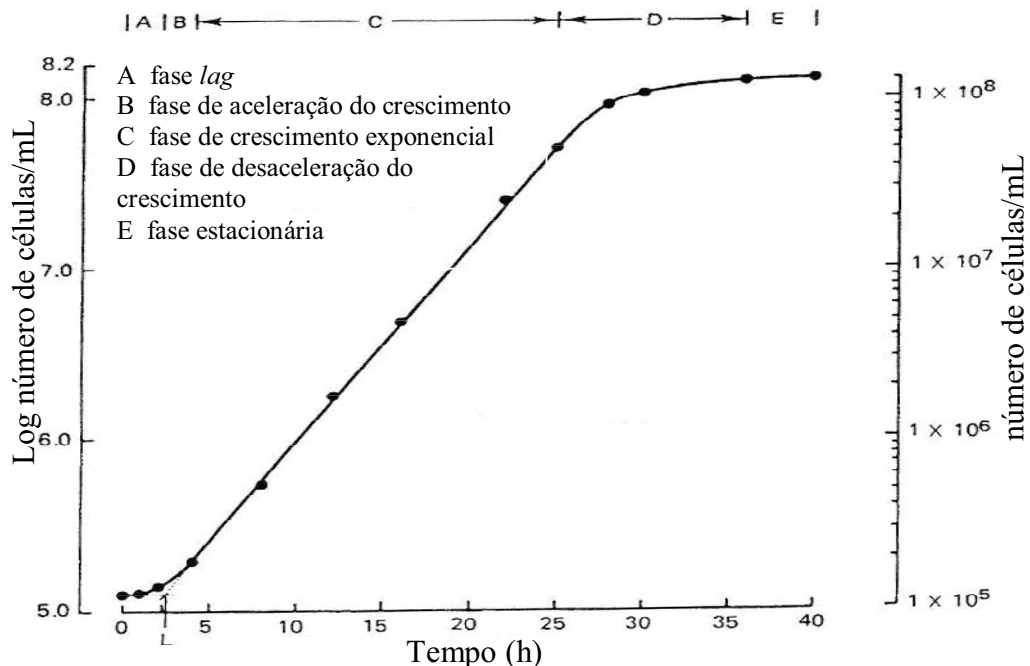


Figura 7: Curva típica de crescimento de leveduras

A curva de crescimento obtida de uma cultura em batelada compreende a fase lag, exponencial e por fim a fase estacionária. A fase lag representa um período de crescimento nulo (derivada igual a zero) e ocorre devido às mudanças em nutrientes do meio e alterações em condições físicas tais como temperatura e pH. Sua duração depende não apenas de condições de crescimento, mas também da densidade de inoculação e do histórico de crescimento do inóculo. A fase lag representa o tempo necessário para que os micro-organismos se adaptem a seus novos meios químicos e físicos de crescimento, sintetizando neste período os ribossomos e as enzimas necessárias a uma alta taxa de crescimento (WALKER, 1998).

O ponto em que a fase lag termina é estimado a partir da extrapolação de duas retas tangentes àquelas desta e da fase exponencial. No ponto de intersecção dessas duas retas (Fig. 7) ocorre o fim da fase lag. A duração e o padrão desta fase são influenciados pela linhagem da levedura, pela idade das células antes da inoculação e pela composição, tanto do meio no qual a levedura vinha sendo cultivada quanto do novo meio em que foi inoculada. À medida que a levedura se adapta ao meio e às condições físicas, sintetiza componentes celulares e só então começa a metabolizar os nutrientes do meio e multiplicar-se. Quando as células saem da fase lag e iniciam o processo de divisão, elas entram na fase de crescimento acelerado (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

O crescimento exponencial das leveduras é finito, mas pode ser prolongado em processos de batelada alimentada nos quais incrementos de nutrientes são adicionados ao meio durante a fermentação. Nas culturas em batelada, a fase exponencial é de curta duração devido à diminuição da quantidade dos nutrientes essenciais, acúmulo de metabólitos ou excesso de floculação.

Eventualmente, o número de células que morrem excede o número de células novas e, então, a cultura entra na fase de declínio. Para as leveduras, morte significa a perda irreversível da capacidade de se reproduzirem. A rapidez com que as células morrem ou sobrevivem por mais tempo é ditada pela composição do meio (esgotamento de nutrientes, acúmulo de metabólitos, etc.) e pelas condições físicas e químicas do meio (pH, temperatura, etc.) (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

## **2.8 Processos industriais de fermentação**

O etanol pode ser produzido por quatro principais tipos de operações industriais: processo em batelada, batelada alimentada, semicontínuo e contínuo (KEIM, 1983; PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007).

### **2.8.1 Processo em batelada**

Na fermentação em batelada (ou descontínuo), o substrato e as células da levedura são adicionados juntos ao bioreator (KEIM, 1983) conjuntamente com os nutrientes. Durante o processo, ocorre apenas a troca de gases e soluções para controle de pH e anti-espumantes são adicionados. Terminada a fermentação, descarrega-se o reator, e o meio fermentado segue para os tratamentos finais. Então, deve-se lavar o bioreator, esterilizá-lo e recarregá-lo com mosto e inóculo. Uma das vantagens da operação em batelada (processo descontínuo) é a maior flexibilidade que pode ser alcançada usando diversos reatores, em série ou não. (ÇAYLAK; SUKAN, 1996). Esse processo apresenta como vantagens, os baixos custos de produção e uma pequena necessidade de controle de processo.

### **2.8.2 Processo em batelada alimentada**

O processo descontínuo alimentado (ou batelada alimentada) é definido como uma técnica na qual um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos permanecem no fermentador até o final da fermentação (KEIM, 1983). Em alguns casos, todos os nutrientes são gradualmente alimentados ao reator. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo assim como a adição de mosto pode ocorrer de forma contínua ou intermitente, sendo que uma escolha adequada da vazão de alimentação leva a melhores resultados de produtividade e rendimento do processo (CHENG, et al. 2009; ANDRIETTA; FERREIRA; ANDRIETTA, 2010) . A mudança de volume pode ou não ocorrer, dependendo da concentração do substrato e da taxa de evaporação do sistema. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento de bioreatores com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo seja deslocado para uma

determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico. Tal processo é largamente utilizado para a produção de biomassa microbiológica, etanol, ácidos orgânicos, antibióticos, vitaminas, enzimas entre outros. O processo de batelada alimentada, em comparação ao processo de batelada simples possui vantagens como baixa concentração de açúcar residual, diminuição no tempo de fermentação e maior produtividade. Quando uma porção do caldo de fermentação é retirada em intervalos de tempo e parte desta cultura é utilizada como inóculo para a próxima fermentação, então o sistema é operado como fermentação em batelada alimentada com reciclo de células. Este processo, por sua vez, tem a vantagem de não necessitar de propagação do inóculo evitando contaminações e perda de tempo com a propagação do inóculo (ROUKAS, 1996).

### **2.8.3 Processo semicontínuo**

Em processos semicontínuos, uma porção da cultura é retirada em intervalos de tempos e meio fresco é adicionado ao sistema de forma intermitente havendo, também, variação no volume da cultura. Este método mostra algumas vantagens em relação às operações contínuas e em batelada. Não há necessidade de se ter um reator separado para o inóculo, exceto no início do processo. Neste, não são perdidos tempo com limpeza e esterilização. É necessário pequeno controle de processo, no entanto há um alto risco de contaminação e mutação devido a longos períodos de cultivo e periódicos manuseios. Por outro lado, são necessários reatores de volumes maiores e os custos de investimento são levemente mais elevados (ÇAYLAK; SUKAN, 1996).

### **2.8.4 Processo contínuo**

No processo contínuo, o material nutriente (o qual contém a fonte de carbono e outros nutrientes) é bombeado continuamente dentro de um bioreator, onde os microrganismos estão ativos e ao mesmo tempo, o produto é retirado do sistema. O produto final contém etanol, células e açúcar residual (ÇAYLAK; SUKAN, 1996). A manutenção de um volume constante de líquido no reator é de primordial importância, para que o sistema atinja a condição de estado estacionário, condição

nas quais as variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema.

Na indústria, este processo é do tipo múltiplo estágio, com 4 ou 5 reatores cônicos de tamanhos variados. O meio de fermentação é alimentado no topo do primeiro fermentador conjuntamente com as leveduras. Este meio fermentado é continuamente retirado do fundo de cada bioreator e adicionado a uma meia altura do próximo estágio e assim, sucessivamente. Este processo geralmente resulta em produtividade de  $7,9 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ZANIN et al., 2000).

## **2.9 A produção de etanol em destilarias**

Cerca de 79% do etanol produzido no Brasil é obtido a partir da fermentação da caldo de cana-de-açúcar e o restante é proveniente do melaço da cana-de-açúcar (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). As destilarias brasileiras operam em processo de batelada alimentada ou processo contínuo com reutilização de uma suspensão com altas densidades de células, denominada leite de levedura

Alimentação contínua é utilizada em processos de batelada alimentada até o enchimento do reator. A reutilização de células evita os custos com a propagação do inóculo, os quais incluem consumo adicional de matéria prima e levam a tempos mais longos de fermentação com formação de menos subprodutos. As altas densidades de células minimizam os efeitos da inibição pelo produto (RIESENBERG; GUTHKE, 1999), tornando possível a realização das fermentações rápidas com menor tempo de exposição aos estresses gerados pelo processo. As destilarias brasileiras operam em altas concentrações de açúcares com 15% a 20% de açúcar total (m/v), altas densidades de células com 7% a 14% de biomassa úmida (v/v) tempos de fermentação relativamente curtos 8 a 10 horas. Diminuições em produção de etanol ocorrem sempre que a formação da biomassa for significativa. Em destilarias brasileiras, o excedente de biomassa é retirado antes do início de cada novo ciclo de fermentação e utilizado no preparo de ração animal (LALUCE, 1991).



### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo principal estabelecer condições para o uso da nova levedura IQ-Ar/45-1 construída a partir de leveduras isoladas de bioreatores de fermentação industrial. Os objetivos específicos foram:

- Estudar as exigências nutricionais da nova levedura quanto a suplementação do melaço visando maior tolerância ao etanol produzido, aumentar o consumo de açúcar com retenção de viabilidade utilizando-se sais de amônio, zinco e magnésio.
- Estabelecimento das condições de fermentação a serem mantidas nas fermentações em batelada alimentada: vazão de alimentação do melaço, tamanho do inóculo e temperatura do processo.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Levedura utilizada

Foi utilizada a levedura híbrida *Saccharomyces cerevisiae* IQ-Ar/45-1 (protocolo nº 01808004893, INPI Brasil) construída a partir de leveduras isoladas de bioreatores de fermentação industrial e acondicionadas em meio YPD sólido, constituído de 1% (m/v) de extrato de levedo, 2% (m/v) de peptona, 2% (m/v) de glicose e 2% (m/v) de agar. Culturas frescas desta levedura foram utilizadas nos experimentos.

#### 4.2 Condições de fermentação

Estudou-se a suplementação do melaço com DAP (diamônio hidrogeno fosfato),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . O DAP é uma fonte de nitrogênio e está ligado à produção de proteínas e ácidos nucléicos. Os átomos de zinco e magnésio estão presentes em enzimas que catalisam as reações de transformação da glicose a etanol.

Foram utilizadas vazões de alimentação de  $0,40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e  $0,20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , que simula as condições industriais de enchimento dos reatores. Utilizaram-se tamanhos de inóculo de 15 a  $31,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de células para as fermentações em

batelada alimentada, sendo que o inóculo de  $23,7 \text{ g.L}^{-1}$  (9% (v/v)) é o usado na indústria. Nas indústrias brasileiras de produção de etanol, a temperatura dos processos fermentativos pode aumentar, principalmente no verão, dependendo da eficiência dos trocadores de calor utilizados (dados técnicos), em vista disto, foram estudadas as fermentações a  $34^{\circ}\text{C}$  e a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3 Ensaios analíticos**

#### **4.3.1 Ensaio do etanol**

Para a determinação da concentração de etanol presente no vinho obtido após a fermentação, foram feitas soluções nas concentrações de 0,5 e de 1,0 % (v/v) utilizado etanol anidro absoluto e, estas foram utilizadas como padrão no Cromatógrafo à gás com um detector de ionização de chama (FID - modelo CG-37; Instrumentos Científicos, São Paulo, Brasil), com coluna empacotada PAD/2499, e equipado com um integrador-processador CG 300 da CG INSTRUMENTOS CIÊNTÍFICOS.

O vinho obtido é centrifugado a 10000 rpm por 2 minutos para retirada das células e, em seguida, diluído 10 vezes. As concentrações de etanol nas amostras são obtidas após a injeção de  $4,0 \mu\text{L}$  deste líquido fermentado diluído 10 vezes no cromatógrafo gasoso. As análises foram feitas em duplicata.

As medidas do etanol em % (v/v) foram convertidas em massa (g) da seguinte maneira:

$$m(g) = \%(v/v) \cdot 10 \cdot 0,789 \cdot V(L)$$

na qual  $0,789 \text{ g.mL}^{-1}$  é a densidade do etanol, o fator 10 é utilizado para transformar a % (v/v) em mL de etanol por litro de solução e V é o volume do reator, em litros.

#### **4.3.2 Ensaio dos açúcares redutores**

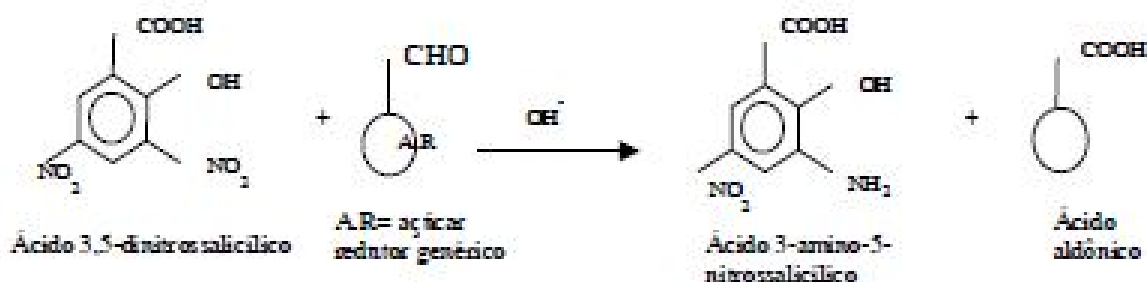
O açúcar redutor total foi determinado através do método baseado na redução do açúcar pelo ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959) com medidas em duplicata.

#### 4.3.2.1 Curva padrão de açúcar redutor

Para o a determinação da curva padrão dos açúcares redutores, foram utilizadas as seguintes soluções:

- Reagente de ácido 3,5 - dinitrosalicílico (100 mL) contendo: 30 g de tartarato de sódio e potássio, 1,6 g de hidróxido de sódio e 1 g de ácido 3,5 - dinitrossalicílico.
- Solução padrão de sacarose 0,1%.
- Solução de ácido clorídrico 6,0 mol.L<sup>-1</sup>.
- Solução de hidróxido de sódio 2,4 mol.L<sup>-1</sup>.

A reação colorimétrica entre o ácido 3,5 – dinitrosalicílico e o açúcar redutor é uma reação de óxido-redução na qual o grupo nitro do ácido é reduzido a um grupo amino, conforme reação a seguir:



A mistura de reação (1,0 mL) foi obtida com a adição de 0,8 mL de amostra (solução de sacarose ou sobrenadante de cultura) mais água destilada e 0,20 mL de solução de ácido clorídrico 6 mol.L<sup>-1</sup> em tubos de ensaio. Em seguida, estes tubos foram incubados a 60 °C durante 7 min. A reação foi interrompida com adição de 1,0 mL de hidróxido de sódio 2,4 mol.L<sup>-1</sup>. A reação colorimétrica ocorreu com a adição de 2,0 mL do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico, seguido por aquecimento a 100 °C durante 5 minutos em banho de água fervente. As leituras foram feitas no espectrofotômetro BIOSPECTRO, modelo SP-22 com  $\lambda = 546$  nm. A Fig. 8 apresenta a curva padrão para a determinação de açúcares redutores totais. O fator de conversão, inverso do seu coeficiente angular da curva, é dado por  $1/b = 0,06762$ , sendo que a concentração de ART, em g.100mL<sup>-1</sup>, é dada por:

$$ART = \Delta A_{546nm} \cdot diluição \cdot 0,06762$$

na qual  $\Delta A_{546\text{nm}}$  é a diferença da medida de absorvância entre os tubos contendo água (controle) e os tubos contendo as soluções padrão de sacarose, em concentrações variadas, medidas a 546 nm.

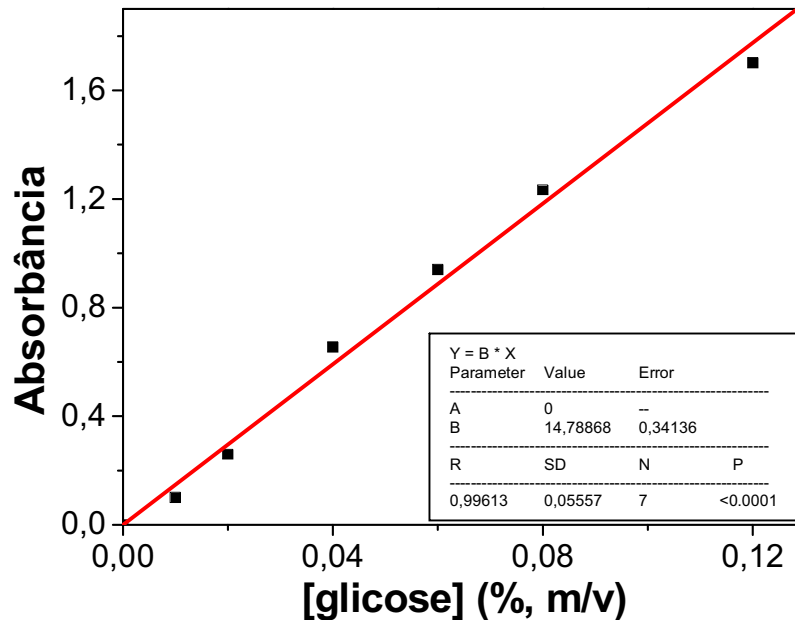


Figura 8: Curva padrão de calibração de açúcares redutores totais

#### 4.4 Ensaios microbiológicos

##### 4.4.1 Determinação da biomassa por massa seca

As medidas de massa seca foram realizadas com suspensões de células de levedura de diferentes concentrações lavadas com água destilada em membranas de éster de celulose com 25 mm de diâmetro e 0,65  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno dos poros (Millipore, DAWP 02500). Para tanto, volumes de 1,0 mL das suspensões de células foram colocadas nas membranas, previamente pesadas, e em seguida lavadas com 4,0 mL de água destilada. Depois de lavadas, as células foram secas sob luz infravermelha por 3 horas. As medidas das massas celulares foram realizadas em uma balança analítica após a secagem de células e a diferença entre a massa final e a massa inicial das membranas indicou a massa seca das células.

#### 4.4.2 Determinação da biomassa por turbidimetria

Das suspensões com diferentes concentrações celulares as quais tiveram calculadas suas massas secas, foram retirados 3,0 mL e medidas suas absorbâncias no espectrofotômetro BIOSPECTRO, modelo SP-22 com  $\lambda = 570 \text{ nm}$ , com a finalidade de se produzir uma curva analítica da absorbância medida em função da massa seca. A Fig. 9 apresenta a curva padrão obtida para a determinação da massa seca por turbidimetria e o inverso do seu coeficiente angular é dado por  $1/b = 0,409$ , sendo que biomassa, em  $\text{g.L}^{-1}$ , é dada por:

$$\text{Biomassa} = \Delta A_{570\text{nm}} \cdot \text{diluição} \cdot 0,409$$

na qual  $\Delta A_{570\text{nm}}$  é a diferença da medida de absorbância entre o tubo-controle e o tubo contendo suspensões de células medidas a 570 nm. As suspensões celulares, em duplicata, foram diluídas de modo a resultarem em absorbâncias de, no máximo, 0,800 no espectrofotômetro.

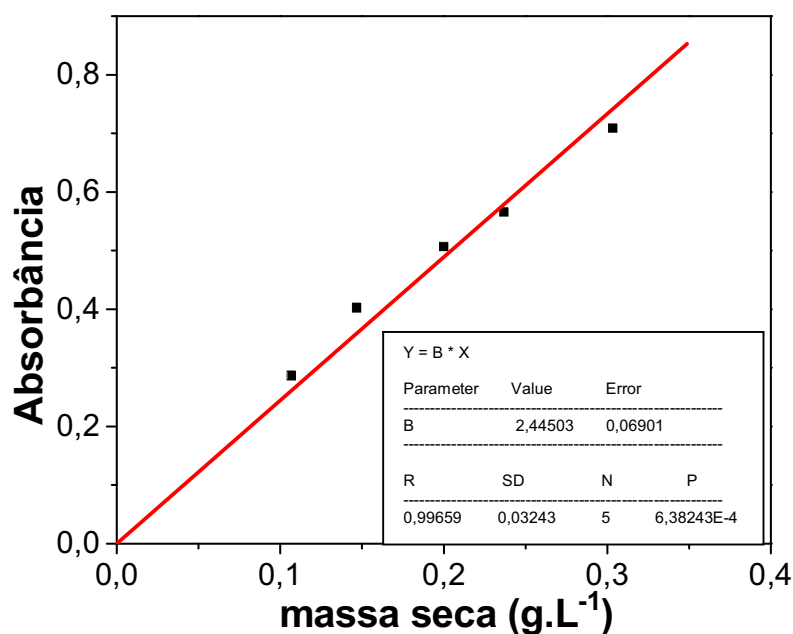


Figura 9: Absorbância medida em função da massa seca de células

#### 4.4.3 Determinação do número de células por contagem em câmara de Neubauer

A viabilidade celular foi determinada pelo método de azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981) com contagem de células em câmara de Neubauer, em duplicatas.

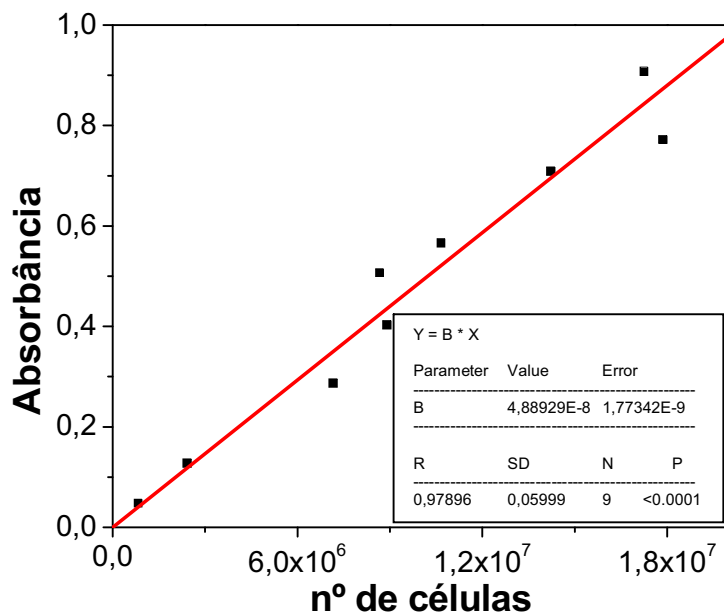
A composição do reagente azul metileno usado para dar contraste nas células é: 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 0,42 g.L<sup>-1</sup> de KCl; 0,48 g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,2 g.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>; 9,0 g.L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,25 g.L<sup>-1</sup> de azul de metileno e água deionizada.

#### 4.4.4 Determinação do fator de conversão de medida turbidimétrica em número de células

Para a determinação do fator de conversão de medida de turbidez em número de células, foi plotada uma curva padrão de absorbância em função do número de células, contadas utilizando-se uma câmara de Neubauer BOECO, com 1/10 mm de profundidade, em microscópio CARL ZEISS com aumento de 400x. A curva padrão da absorbância em função do número de células, a  $\lambda = 570$  nm, contido em 1,0 mL de solução é apresentada na Fig. 10. A determinação do número de células por volume, em mL, é dada por:

$$N^{\circ} \text{ céll/ mL} = \Delta A_{570\text{nm}} \cdot \text{diluição} \cdot 2,045 \cdot 10^7$$

sendo  $\Delta A_{570\text{nm}}$  a diferença da medida de absorbância entre o tubo-controle e o tubo contendo suspensões de células medidas a 570 nm e o fator  $1/b = 2,045 \cdot 10^7$  é o inverso da tangente da curva da absorbância em função do número de células.



**Figura 10: Curva padrão de absorbância em função do número de células presentes em 1,0 mL de solução**

## 4.5 Propagação do inóculo e preparo do leite de levedura

### 4.5.1 Propagação do inóculo

O pré-inóculo foi preparado com a inoculação de uma alça de cultura pura e fresca da levedura IQAR-45/01 em volumes de 100 ml de melaço 5% (m/v) de ART contidas em Erlenmeyers de 250 mL. Este pré-inóculo foi cultivado numa mesa agitadora operando a 125 rpm por 24h a 30 °C. Após este intervalo de tempo, este meio contendo células foi centrifugado a 4700 rpm por 5 minutos e as células foram recolhidas e lavadas com água destilada esterilizada. Esta suspensão foi novamente centrifugada a 4700 rpm e as células foram transferidas para 100 ml de melaço 10% (m/v) de ART em Erlenmeyers de 250 mL com agitação de 125 rpm por 24h a 30 °C.

### 4.5.2 Preparo do leite de levedura

O leite de levedura consiste em suspensão concentrada de células. Após a propagação, as células foram coletadas por centrifugação a 4700 rpm durante cinco minutos a 4 °C e re-suspensas com água deionizada esterilizada. Este processo foi repetido, resultando no denominado leite de levedura

com 15 a 31,6 g.L<sup>-1</sup> de células, medidos por turbidimetria. O leite de levedura obtido desta maneira foi então utilizado para inocular os mini-reatores.

#### **4.6 Método de esterilização**

Todos os materiais de vidraria, pipetas, água e também o melaço foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos para evitar contaminações bacterianas nos processos fermentativos. Volumes de 100,0 mL do melaço foram esterilizados em Erlenmeyer de 250,0 mL.

#### **4.7 Métodos de clarificação do melaço**

##### **4.7.1 Clarificação do melaço com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

A clarificação teve por objetivo retirar partículas insolúveis e partículas coloidais presentes no melaço. A clarificação foi realizada, inicialmente, diluindo-se previamente o melaço duas vezes e corrigindo seu pH para 4,5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup> em Erlenmeyer (ÇAYLAK; SUKAN, 1996; HARALDSON; ROSÉN, 1982; CONVERTI et al., 2003), seguido de aquecimento em autoclave por cerca de 30 minutos a 100 °C. Em seguida, o melaço ficou em repouso por 24 horas a 40 °C. Passado este período, o sobrenadante foi retirado do Erlenmeyer por uso de uma bomba à vácuo e kitassato.

##### **4.7.2 Clarificação do melaço com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**

Com a finalidade de se obter uma menor concentração final de açúcares redutores totais residuais após a fermentação, foi realizado um segundo experimento para a clarificação do melaço com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de acordo com BRAGA, 2006, modificado. Neste experimento, ao melaço diluído duas vezes, foi adicionado KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> na concentração de 1,48 g.L<sup>-1</sup>, seguido de aquecimento em autoclave por 30 minutos a 100 °C e, corrigindo o pH para 4,5 com ácido sulfúrico 1,0 mol.L<sup>-1</sup> antes e após a clarificação. Este melaço ficou em repouso por 24 horas a 40 °C e após este período, o sobrenadante foi retirado do Erlenmeyer por uso de uma bomba à vácuo e kitassato.



#### **4.8 Fermentação em batelada simples**

O processo em batelada simples ou descontínuo ocorreu em Erlenmeyers, com capacidade para 250 mL, fechados com espuma, para permitir entrada de oxigênio no processo. O volume inicial dos fermentadores foi de 100 mL, com  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de quantidade inicial de células.

Os Erlenmeyers foram colocados em uma mesa agitadora operando numa rotação de 125 rpm a  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ . Alíquotas de cerca de 0,5 mL das amostras foram retiradas, em duplicatas, em determinados intervalos de tempo para as medidas de biomassa, concentração do produto, açúcar residual total e viabilidade.

#### **4.9 Fermentação em batelada alimentada com vazão de alimentação constante**

Os estudos em batelada alimentada com vazão de alimentação constante foram realizados no sistema de fermentação projetado e desenvolvido pela Marconi, S.A., modelo MA5002/200. O sistema é composto por quatro mini-reatores de 200 mL para um volume de trabalho de 100 mL, e equipado com dispositivos independentes para leitura de pH e de temperatura e, com agitador magnético com rotação aproximada de 125 rpm, com controle de temperatura fornecido por um banho de água refrigerada circulante a  $4^\circ\text{C}$ , pois este processo fermentativo é exotérmico. Um volume de melaço de 70,0 mL foi adicionado com vazão constante ao sistema por meio de bomba peristáltica Masterflex, modelo 7518-00 da COLEPARMER, utilizando-se vazões de alimentação de  $0,20 \text{ mL.min}^{-1}$  e de  $0,40 \text{ mL.min}^{-1}$ .

Um volume de 30,0 mL do leite de levedura, com concentração celular variando de 15 a  $31,6 \text{ g.L}^{-1}$  foi colocado no mini-reator e, em seguida, o melaço de concentração 20 % (m/v) em ART e com pH 4,5, previamente clarificado e esterilizado em autoclave, foi adicionado com vazão constante ao sistema. Alíquotas de 0,5 mL do meio de fermentação foram retiradas, em duplicatas, periodicamente para medidas de biomassa, concentração do produto, açúcar residual total e viabilidade.

## **4.10 Cálculos dos produtos de fermentação e parâmetros cinéticos**

### **4.10.1 Cálculos dos acúmulos de massa em função do tempo para as fermentações**

#### **4.10.1.1 Batelada simples**

As medidas foram realizadas da seguinte forma em cada tempo: Massas de etanol, células e açúcar residual: as concentrações em  $\text{g.L}^{-1}$  foram multiplicadas pelo volume do reator, que foi constante, de maneira que foram obtidas as massas em cada tempo  $t$ . Todas as medidas foram feitas a partir de duplicata de amostras para cada ponto.

#### **4.10.1.2 Batelada alimentada**

Para as fermentações em batelada alimentada, os cálculos de massas foram realizados da mesma maneira que para batelada simples. As massas totais instantâneas de açúcar residual, etanol e biomassa foram calculadas multiplicando-se as concentrações em  $\text{g.L}^{-1}$  pelo volume do reator no instante  $t$  (CARVALHO, 1994). Todas as medidas foram feitas a partir de duplicata de amostras para cada ponto.

### **4.10.2 Critérios de cálculos dos valores finais de biomassa, produto e açúcar residual**

Os cálculos foram realizados considerando como final de fermentação, o ponto a partir do qual a curva de produção etanol deixou de variar ou passou a variar muito lentamente.

#### **4.10.3 Cálculos dos parâmetros de fermentação**

Os seguintes parâmetros foram calculados utilizando-se as massas finais das curvas de tempo:

- a) Alimentação do reator: foi realizada em aproximadamente 3 horas com vazão de alimentação (F) constante.
- b) A produtividade de etanol ( $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) foi calculada da seguinte maneira (LIMA et al., 2001, v.2):

$$Pr = \frac{P}{t_F}$$

na qual P é a concentração do etanol no fim da fermentação em  $\text{g.L}^{-1}$  e  $t_F$  é o tempo de duração da fermentação em horas.

- c) Cálculo do rendimento R (%) da fermentação sobre o açúcar (SIQUEIRA et al., 2008)

$$R = \frac{P}{S_0 \cdot 0,511}$$

na qual  $S_0$  é a concentração do substrato, em  $\text{g.L}^{-1}$ , que está alimentando o fermentador. O fator 0,511 é devido à estequiometria da fermentação alcoólica, pois 100 g de glicose produzem 51,1 g de etanol.

- d) Os fatores de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) e de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) foram calculados da seguinte maneira:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

na qual  $\Delta X$  é a variação da concentração de biomassa em  $\text{g.L}^{-1}$ ,  $\Delta S$  é diferença entre a concentração final e inicial de substrato, em  $\text{g.L}^{-1}$ , e  $\Delta P$  é a variação na concentração de etanol em  $\text{g.L}^{-1}$ .

- e) Fator de variação da biomassa no final da fermentação:

$$\text{Fator de aumento da biomassa} = \frac{\text{biomassa final}}{\text{biomassa inicial}}$$

#### 4.11 Perfil de uma curva de volume do bioreator em função do tempo para uma batelada alimentada com diferentes vazões de alimentação

Plotando-se uma curva em que no eixo das ordenadas está o volume do meio de fermentação do bioreator e na abscissa está o tempo de fermentação, obtém-se a curva de variação do volume da bioreator em função do tempo, apresentada na Fig. 11. Nota-se que quanto maior a vazão de alimentação do reator, maior será a inclinação da curva de enchimento do reator e, portanto, mais rápido o enchimento do fermentador.

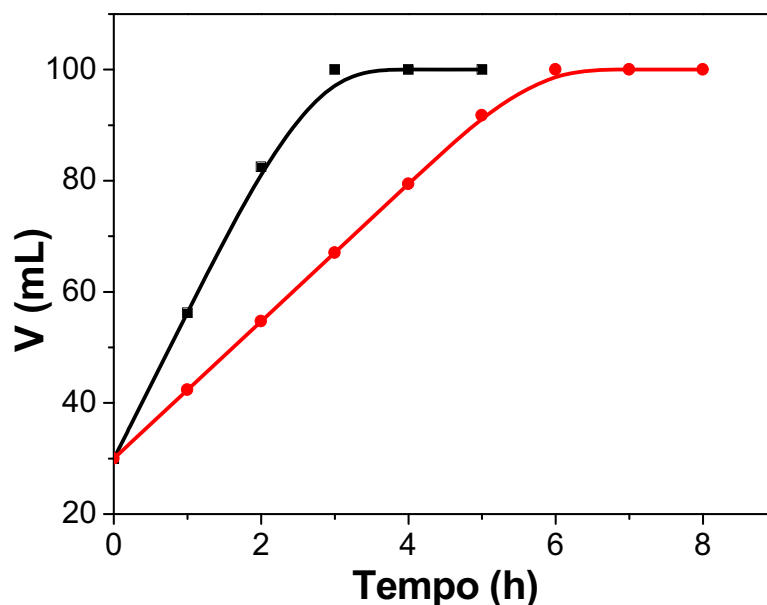


Figura 11: Curva de enchimento do reator em função do tempo para vazão constante de  $0,40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (■) e  $0,20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (●)

#### 4.12 Reagentes Utilizados

$\text{H}_2\text{SO}_4$  - Mallinckrodt Baker S.A., lote T20D06 - utilizado para a clarificação do melaço;

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Sigma, lote 114K0240 - utilizado para clarificação do melaço;

Ácido 3,5-dinitrosalicílico -  $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$  P.A. Vetec, lote HX007800309 - utilizado para ensaio de açúcares redutores totais;

Etanol anidro - Mallinckrodt Baker S.A., lote V568V02D55 - utilizado para levantamento de curva padrão de etanol em espectrômetro gasoso;

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – Diamônio hidrogeno fosfato (DAP). MERCK, lote 1388248 - utilizado como fonte de nitrogênio para suplementação do melaço;

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – Sigma-Aldrich, lote 015K0204 - utilizado como fonte de íons zinco para suplementação do melaço;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - Merck, S.A., lote 025K0204 - utilizado como fonte de íons magnésio para suplementação do melaço;

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Clarificação do melaço

A Tab. 5 apresenta os indicadores de clarificação do melaço obtidos após o tratamento do mesmo, em três métodos diferentes.

**Tabela 5: Comparação entre métodos de clarificação do melaço<sup>a</sup>**

Experimento	Tratamento do melaço em autoclave	Indicador de clareamento	
		Precipitado formado	Açúcar redutor após fermentação (g.L <sup>-1</sup> )
<b>A</b>	Ajuste do pH a 4,5 com $\text{H}_2\text{SO}_4$	(+ + +)	3,60
<b>B</b>	Adição de 1,48 g.L <sup>-1</sup> de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e ajuste de pH a 4,5 antes da clarificação	(++)	4,13
<b>C</b>	Adição de 1,48 g.L <sup>-1</sup> de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e ajuste de pH a 4,5 após clarificação	(++)	4,03

(a) Fermentação em batelada alimentada com vazão de alimentação constante do melaço.

Fermentações foram realizadas usando-se os tratamentos A, B, e C, sendo que destes, o melhor foi o A, pois quantitativamente levou a uma menor concentração de ART residual medido após as fermentações e produziu mais precipitado, indicando qualitativamente uma maior retirada de impurezas presentes no melaço.

## 5.2 Batelada simples: suplementação nutricional

### 5.2.1 Efeito da suplementação nutricional do melaço sobre a fermentação em batelada simples a 34°C

#### 5.2.1.1 Suplementação do melaço com diamônio hidrogeno fosfato (DAP)

A Fig. 12 apresenta as curvas de tempo da fermentação com melaço com e sem suplementação com DAP (diamônio hidrogeno fosfato) em processo de batelada simples.

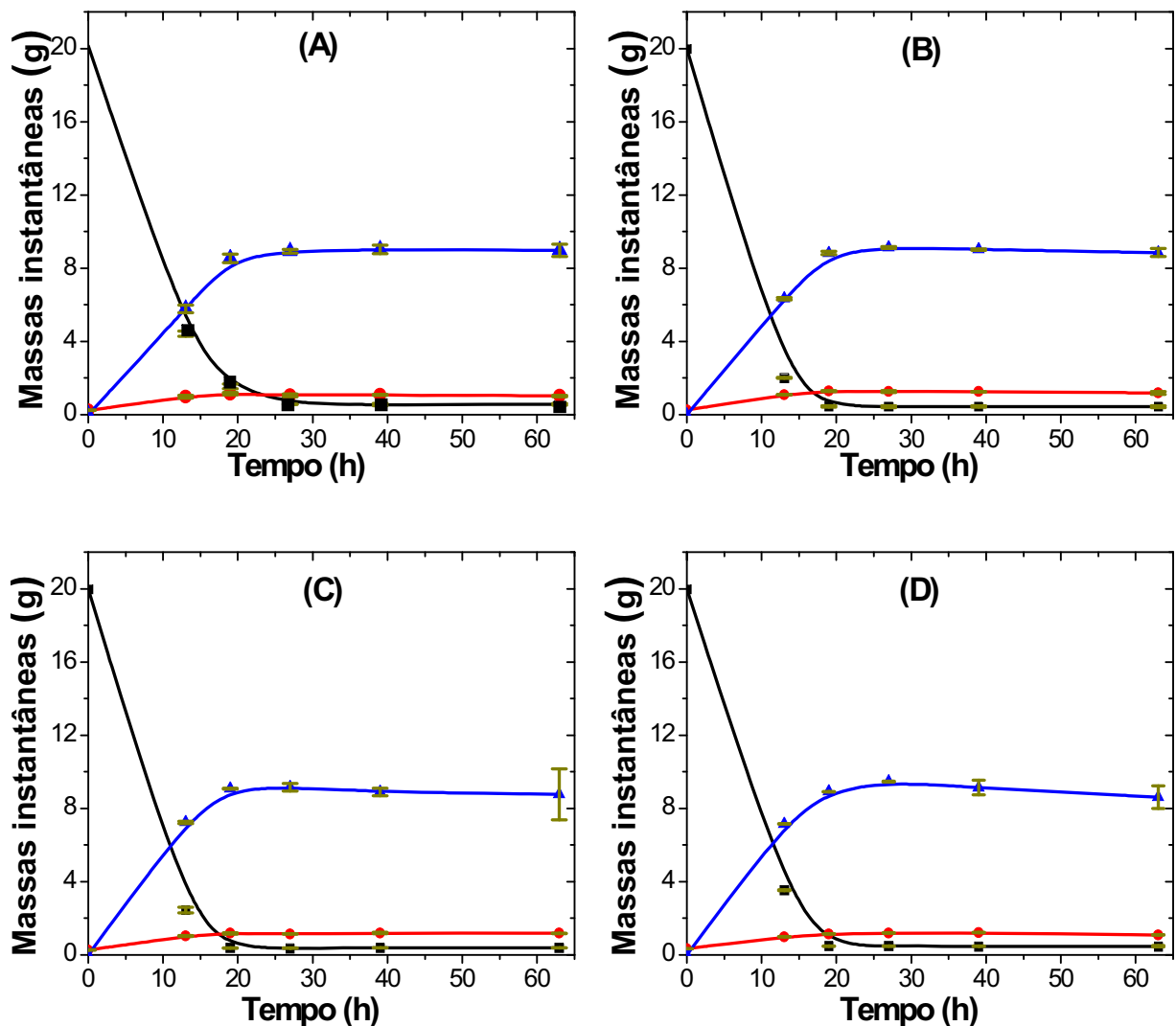


Figura 12: Curvas de consumo de substrato ( $\blacksquare$ ), formação de biomassa ( $\bullet$ ) e de etanol ( $\blacktriangle$ ) para as fermentações do melaço em batelada simples a 34°C. Melaço: (A) sem suplementação; (B) suplementado com  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ; (C) suplementado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ; (D) suplementado com  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP. Condições: melaço clarificado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  contendo 20% em ART, inóculo de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ , e agitação de 125 rpm

A Fig. 12 ilustra que o açúcar foi consumido em grande quantidade nas 13 primeiras horas de fermentação, sendo que o maior consumo deste ocorreu nos reatores com melaço suplementado com DAP. Os açúcares redutores totais se mantiveram constantes após 19 horas de fermentação, nas fermentações utilizando DAP como suplemento, indicando o fim do processo. Em todos os fermentadores nos quais houve a suplementação do melaço com DAP, a concentração de etanol atingiu um máximo e depois sofreu uma queda, possivelmente devido à evaporação do etanol do sistema, ou mesmo à sua assimilação pelas leveduras *S. cerevisiae* como uma fonte nutricional, o que é indicado pela diminuição da biomassa.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada simples, com e sem a adição de DAP, são apresentados na Tab. 6.

**Tabela 6: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 12**

DAP (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo <sup>(a)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
0,0	27	1,06±0,07	0,57±0,01	8,15±0,09	99,2±0,5
0,5	19	1,28±0,02	0,45±0,05	8,83±0,09	98,4±1,2
1,0	19	1,17±0,03	0,38±0,01	9,07±0,02	96,5±0,8
2,0	19	1,14±0,02	0,48±0,01	8,91±0,01	96,5±1,3

(a) início da fase estacionária de produção de etanol.

A análise da Tab. 6 indica que a adição de diamônio hidrogeno fosfato (DAP) diminuiu o tempo de fermentação, aumentou a biomassa produzida no fim do processo e levou a um menor açúcar residual presente no reator, com aumento na concentração de etanol produzido. A melhor suplementação do melaço com DAP foi de 1,0 g.L<sup>-1</sup>, pois foi produzido mais etanol no processo. A suplementação do melaço com 2,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP levou a um efeito inibitório da produção de etanol, pois provavelmente os íons amônio em excesso passaram a ser tóxicos para a levedura, o que pode ser verificado pela diminuição da biomassa com a adição crescente de DAP.

Os parâmetros da fermentação do melaço 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP são apresentados na Tab. 7.

**Tabela 7: Parâmetros de fermentação calculados com os dados da Tab. 6**

DAP (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Biomassa <sup>(a)</sup> [final]/[inicial]	Y <sub>x/s</sub> (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	Y <sub>p/s</sub> (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )
0,0	3,02±0,03	79,9±0,9	4,4±0,3	0,044	0,419
0,5	4,64±0,05	86,4±0,9	4,8±0,1	0,051	0,451
1,0	4,78±0,01	88,8±0,0	4,4±0,0	0,046	0,462
2,0	4,69±0,01	87,2±0,0	3,4±0,0	0,041	0,456

Y<sub>x/s</sub> = fator de conversão de substrato em biomassa; Y<sub>p/s</sub> = fator de conversão de substrato em etanol. (a) Aumento em relação à biomassa inicial.

De acordo com a Tab. 7, a suplementação do meloço com concentrações crescentes de DAP aumentou a produtividade e o rendimento do processo. A melhor suplementação do meloço com o sal de amônio com 1,0 g.L<sup>-1</sup>, pois esta levou a melhores resultados de produtividade, rendimento e fator de conversão de substrato em etanol (Y<sub>p/s</sub>). A adição de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP ao meloço resultou em um efeito inibitório para a levedura, o que pode ser notado pela diminuição do fator conversão de substrato em biomassa (Y<sub>x/s</sub>) e pelo baixo aumento relativo da biomassa em relação às outras suplementações do meloço com DAP.

Nos demais processos fermentativos presentes neste trabalho foi adicionado 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP ao meloço, pois esta suplementação forneceu melhores resultados.

### **5.2.1.2 Efeito da adição de sulfato de zinco heptahidratado ao meloço contendo diamônio hidrogeno fosfato (DAP) sobre a fermentação do meloço em batelada simples a 34°C**

A Fig. 13 apresenta as curvas de tempo da fermentação com meloço suplementado com DAP e com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O no processo de batelada simples.



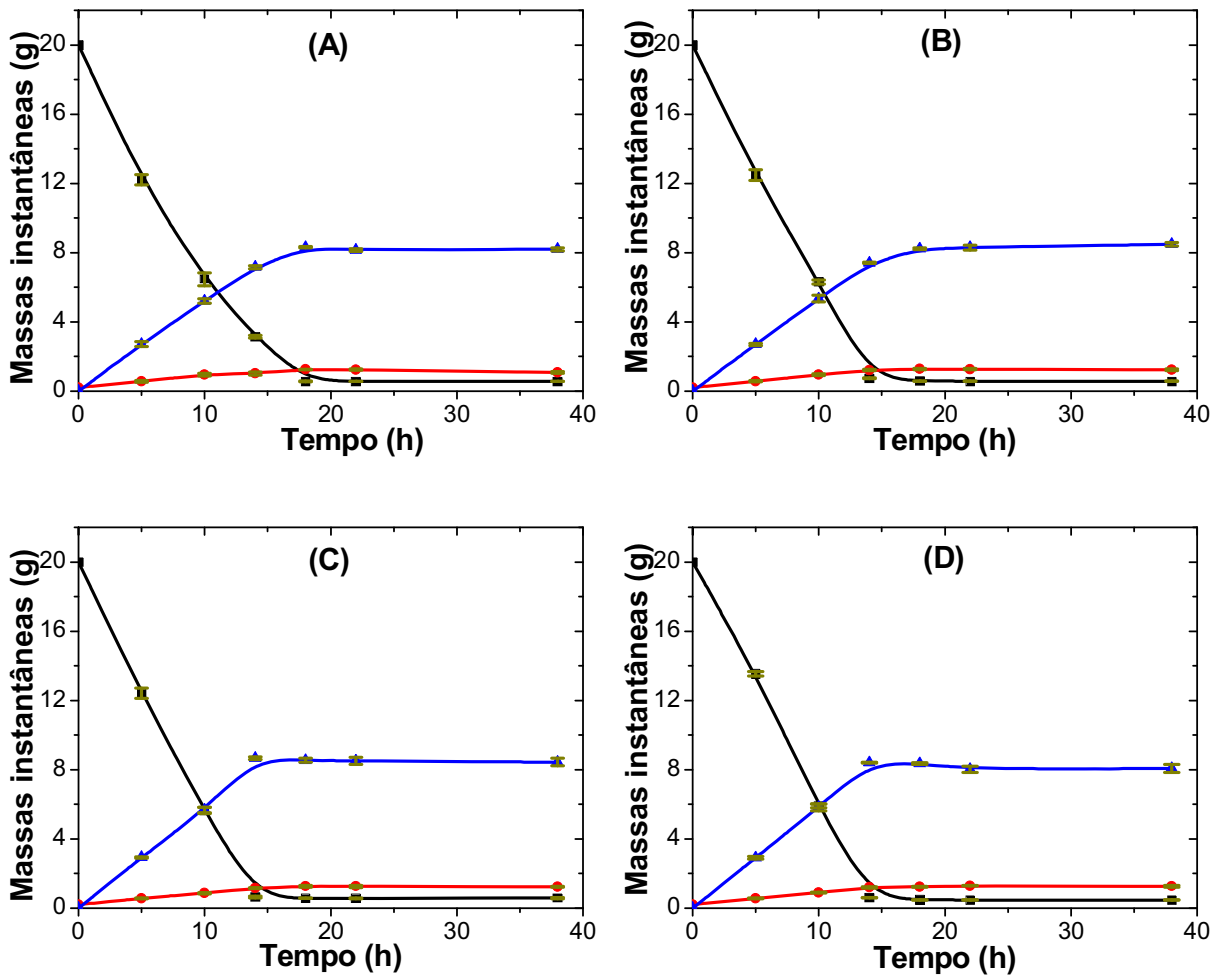


Figura 13: Curvas de consumo de substrato (■), formação de biomassa (●) e de etanol (▲) para as fermentações em batelada simples do meloço suplementado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP a  $34^\circ\text{C}$ . Suplementação: (A) sem adição de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; (B) com adição de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ; (C) com adição de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ; (D) com adição de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Condições: meloço clarificado com  $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ , contendo 20 % de ART, inóculo de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ , e agitação de 125 rpm

A Fig. 13 ilustra que o açúcar foi consumido em grande quantidade nas primeiras 14 horas de fermentação, com maior consumo nos reatores com meloço suplementado com íons zinco. As massas de substrato constantes após 18 horas de fermentação, nos fermentadores com meloço suplementado com o sal de zinco, indicam o fim do processo fermentativo.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada simples, com e sem a adição de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ao meloço suplementado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP, são apresentados na Tab. 8.

**Tabela 8: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 13**

Adição de zinco <sup>(a)</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo <sup>(b)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
0,0	22	1,25±0,04	0,56±0,01	8,16±0,08	100,0±0,0
0,1	18	1,28±0,05	0,58±0,02	8,23±0,05	96,3±3,2
0,2	18	1,26±0,01	0,57±0,01	8,53±0,01	100,0±0,0
0,3	18	1,23±0,02	0,48±0,02	8,35±0,05	97,2±2,1

(a) sulfato de zinco heptahidratado; (b) início da fase estacionária de produção de etanol.

A análise da Tab. 8 indica que a adição de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ao melão suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP diminuiu o tempo de fermentação e aumentou a massa de etanol produzido. A massa de células no fim dos processos não foi alterada pela suplementação do melão com íons Zn<sup>2+</sup>, pois os resultados finais foram estatisticamente iguais ao processo fermentativo sem a suplementação do melão com estes íons. Com a adição de 0,2 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foi acumulado mais etanol nos reatores no fim da fermentação.

Os parâmetros da fermentação do melão 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, com e sem suplementação com ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O são apresentados na Tab.9.

**Tabela 9: Parâmetros de fermentação calculados com os dados da Tab. 8.**

Adição de zinco <sup>(a)</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Biomassa <sup>(b)</sup> [final]/[inicial]	Y <sub>x/s</sub> (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	Y <sub>p/s</sub> (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )
0,0	3,71±0,03	79,8±0,8	6,2±0,2	0,054	0,420
0,1	4,57±0,03	80,5±0,4	6,4±0,2	0,056	0,424
0,2	4,74±0,06	83,5±1,1	6,3±0,2	0,054	0,439
0,3	4,64±0,03	81,7±0,5	6,1±0,1	0,053	0,428

Y<sub>x/s</sub> = fator de conversão de substrato em biomassa; Y<sub>p/s</sub> = fator de conversão de substrato em etanol.  
(a) sulfato de zinco heptahidratado. (b) aumento em relação à biomassa inicial.

Os resultados contidos na Tab. 9 indicam que a suplementação do melão com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e sulfato de zinco heptahidratado resultou em aumento na produtividade, rendimento e no fator de conversão de substrato em etanol (Y<sub>p/s</sub>). A melhor suplementação do melão com íons Zn<sup>2+</sup> foi a de 0,2 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ao melão contendo 1,0 g.L<sup>-1</sup> DAP, pois esta suplementação levou a maiores rendimento,

produtividade e fator de conversão de substrato em produto. Maiores concentrações adicionadas de sal de zinco têm efeito inibitório sobre a fermentação do lote de melaço, pois ocorre uma diminuição da produtividade e rendimento do processo, bem como diminuição do fator de conversão de substrato em produto ( $Y_p/s$ ).

Devido às pequenas diferenças em produtividade e rendimento do processo utilizando-se 0,1 e 0,2  $g.L^{-1}$  de  $ZnSO_4.7H_2O$  e por questões de economia de reagentes, optou-se pela suplementação do melaço com 0,1  $g.L^{-1}$  de sulfato de zinco heptahidratado nos experimentos de fermentação em batelada alimentada.

### **5.2.1.3 Efeito da adição de sulfato de magnésio heptahidratado ao melaço contendo diamônio hidrogeno fosfato (DAP) sobre a fermentação do melaço a 34°C em batelada simples**

A Fig. 14 apresenta as curvas de tempo da fermentação com melaço suplementado com DAP e diferentes concentrações de  $MgSO_4.7H_2O$  no processo de batelada simples.

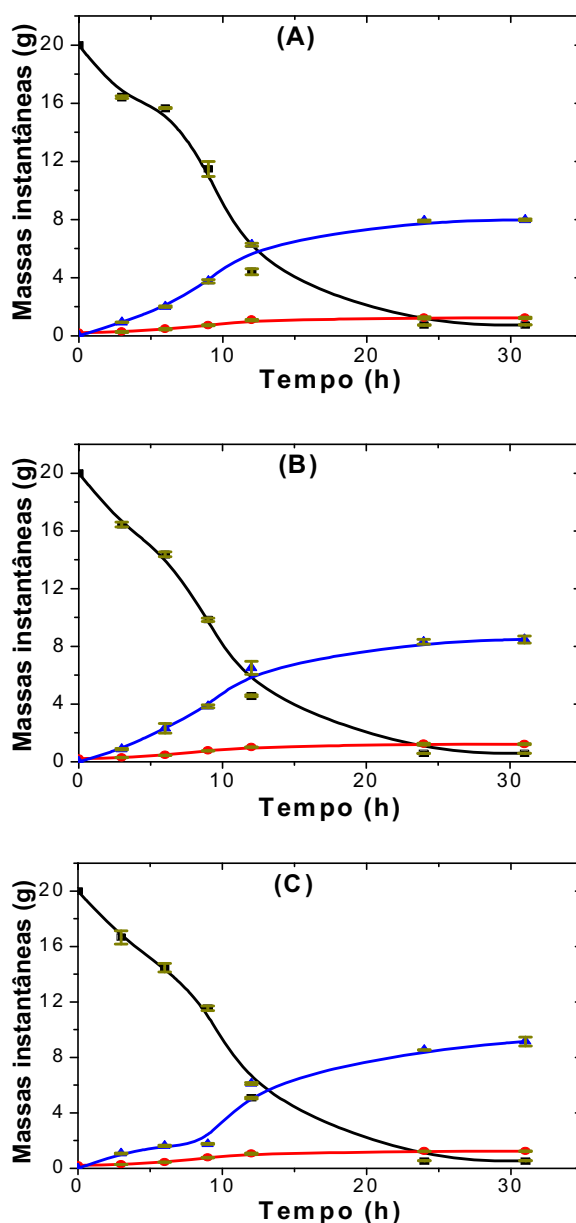


Figura 14: Curvas de consumo de substrato (■), formação de biomassa (●) e de etanol (▲) para as fermentações em batelada simples do melão a 34°C. Suplementação com  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : (A) sem adição; (B) com adição de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ; (C) com adição de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ . Condições: melão 20 % em ART suplementado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP e clarificado com  $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ , inóculo de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  e agitação de 125 rpm

A Fig. 14 indica que a fermentação terminou em 24 horas (açúcares redutores totais constantes) em todos os processos. Mesmo após a concentração de substrato se manter constante, nas fermentações suplementadas com íons  $\text{Mg}^{2+}$ , houve um aumento da massa do etanol produzido.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada simples, com e sem a adição de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , são apresentados na Tab. 10.

**Tabela 10: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 14**

Adição de magnésio <sup>(a)</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo <sup>(b)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
0,0	24	1,24±0,07	0,75±0,02	7,91±0,07	100,0±0,0
0,1	24	1,23±0,06	0,58±0,02	8,31±0,17	100,0±0,0
0,2	24	1,24±0,00	0,55±0,01	8,54±0,03	100,0±0,0

(a) sulfato de magnésio heptahidratado; (b) início da fase estacionária de produção de etanol.

A Tab. 10 indica que a adição de íons magnésio ao melaço, no processo fermentativo em batelada simples, não diminuiu o tempo de fermentação, no entanto resultou em uma menor concentração de ART no fim do processo e a uma maior concentração de etanol. A adição de 0,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O resultou em menor acúmulo de ART no fim do processo e, por conseguinte, maior massa produzida de etanol.

Os parâmetros da fermentação do melaço 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, com e sem suplementação com MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O são apresentados na Tab. 11.

**Tabela 11: Parâmetros de fermentação calculados com os dados da Tab. 10.**

Adição de magnésio <sup>(a)</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Biomassa <sup>(b)</sup> [final]/[inicial]	Y <sub>x/s</sub> (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	Y <sub>p/s</sub> (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )
0,0	3,30±0,03	77,4±0,7	6,2±0,3	0,054	0,411
0,1	3,46±0,07	81,3±1,6	6,1±0,3	0,053	0,428
0,2	3,56±0,01	83,6±0,2	6,2±0,0	0,053	0,439

Y<sub>x/s</sub> = fator de conversão de substrato em biomassa; Y<sub>p/s</sub> = fator de conversão de substrato em etanol. (a) sulfato de magnésio heptahidratado. (b) aumento em relação à biomassa inicial.

Os resultados da Tab. 11 indicam que a suplementação do melaço com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e sulfato de magnésio heptahidratado resultou em um aumento na produtividade em etanol, no rendimento alcoólico e no fator de conversão de substrato em etanol (Y<sub>p/s</sub>). O aumento relativo da biomassa e dos fatores de conversão de substrato em biomassa (Y<sub>x/s</sub>) são muito semelhantes e, portanto, pode-se dizer que a adição de íons Mg<sup>2+</sup> não influi sobre estes parâmetros. Melhores resultados para produtividade e rendimento foram obtidos com a suplementação do melaço com

0,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, no entanto, como estes valores foram próximos daqueles obtidos para fermentação com adição de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e por questões de economia de reagentes, foi escolhida esta última como sendo a concentração de sulfato de magnésio heptahidratado nos processos de fermentação em batelada alimentada.

As suplementações do melaço com DAP, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foram estudadas em processos fermentativos de batelada simples. As suplementações do melaço com DAP e íons zinco diminuíram o tempo da fermentação, com aumento da produtividade, do rendimento e do Y<sub>p/s</sub>. A adição de íons magnésio ao melaço melhorou a produtividade, rendimento e Y<sub>p/s</sub> dos processos em batelada simples. Nos processos em batelada alimentada estas substâncias foram utilizadas como suplementação do melaço nas concentrações de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

### 5.3 Batelada alimentada

#### 5.3.1 Efeito da vazão de alimentação do melaço suplementado com diamônio hidrogeno fostato (DAP) sobre a fermentação em batelada alimentada a 34°C

A Fig. 15 apresenta as curvas de tempo para as massas de substrato, de biomassa e de produto acumuladas no reator para fermentação a 34°C do melaço 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP. Foi utilizada vazão aproximadamente constante de 0,40 mL.min<sup>-1</sup> (Fig. 15A) e de 0,20 mL.min<sup>-1</sup> (Fig. 15B), que simula as condições industriais de enchimento de reator. O inóculo utilizado foi de 31,6 g.L<sup>-1</sup> em 30,0 % do volume de trabalho do reator (30,0 mL).

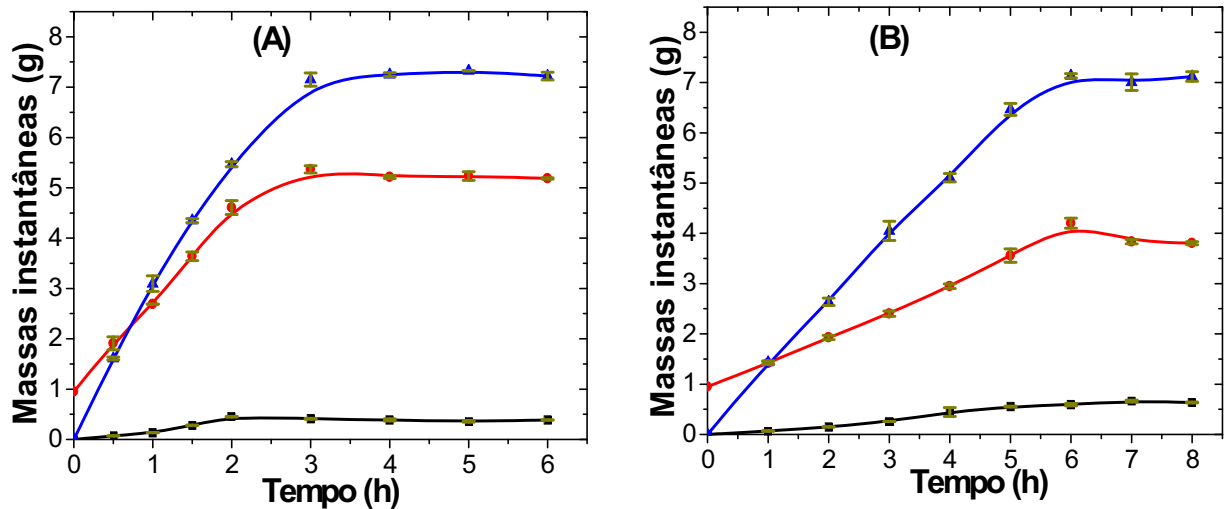


Figura 15: Efeito da vazão de alimentação sobre as curvas de tempo massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) para as fermentações em batelada alimentada: (A) vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup>; (B) vazão (F) = 0,20 mL.min<sup>-1</sup>. Condições: melação 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, inóculo de 31,6 g.L<sup>-1</sup>, a 34°C e agitação de 125 rpm, tempo de alimentação de 3 horas em (A) e de 6 horas e (B)

A Fig. 15A ilustra que em 3 horas de processo, praticamente o mesmo tempo da alimentação do fermentador com o melação suplementado, houve um grande aumento da massa de etanol e de biomassa acumuladas e a massa de substrato torna-se aproximadamente constante. Os açúcares se acumulam no reator até 2 horas e depois têm sua massa diminuída até o fim do processo, que teve uma duração de 5 horas. A Fig. 15B ilustra que houve um grande acúmulo de massa de etanol e de biomassa em 6 horas de processo, praticamente o mesmo tempo da alimentação do fermentador com o melação. Também é mostrado que os açúcares redutores se acumulam lentamente no reator. A fermentação terminou em 8 horas. Nota-se na Fig. 15 que nas duas vazões utilizadas ocorreu acúmulo semelhante de etanol, no entanto, no processo utilizando vazão de 0,40 mL.min<sup>-1</sup> houve maior produção de biomassa e, por consequência, a massa acumulada de ART no reator foi menor. Nas condições utilizadas nota-se que a levedura assimila os açúcares a uma taxa aproximadamente igual à vazão de alimentação do reator, o que é indicado devido ao fato de que não são acumulados açúcares no reator durante o período de alimentação deste.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada alimentada, com diferentes vazões de alimentação, são apresentados na Tab. 12.

**Tabela 12: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 15**

Vazão de alimentação (mL.min <sup>-1</sup> )	Tempo <sup>(a)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
0,40	5	4,48±0,09	0,36±0,08	7,32±0,00	98,2±0,9
0,20	8	3,80±0,03	0,64±0,01	7,12±0,09	98,1±1,9

(a) início da fase estacionária de produção de etanol.

Os resultados apresentados na Tab. 12 indicam que com a utilização de maior vazão de alimentação do reator (0,40 mL.min<sup>-1</sup>) o tempo de fermentação é menor. Também é observado que com maior vazão de alimentação, ocorreu um maior acúmulo de biomassa e de etanol no reator após a fermentação e isto pode ser confirmado pela menor concentração de ART final, indicando que os açúcares fornecidos foram utilizados em maior quantidade, para produção de biomassa e de etanol, quando utilizou-se maior vazão de alimentação do reator.

Os parâmetros da fermentação em batelada alimentada do melaço 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP são apresentados na Tab. 13.

**Tabela 13: Parâmetros calculados com os dados da Tab. 12**

Vazão de alimentação (mL.min <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Biomassa (% de aumento)	Y <sub>x/s</sub> (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	Y <sub>p/s</sub> (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )
0,40	14,65±0,00	71,7±0,0	41,8±2,7	0,067	0,373
0,20	8,90±0,12	69,7±0,0	20,4±0,8	0,033	0,368

Y<sub>x/s</sub> = fator de conversão de substrato em biomassa; Y<sub>p/s</sub> = fator de conversão de substrato em etanol

A Tab. 13 indica que a fermentação em batelada alimentada realizada com uma vazão de alimentação de 0,40 mL.min<sup>-1</sup> resultou em um aumento da biomassa e dos fatores de conversão de substrato em biomassa (Y<sub>x/s</sub>) e de conversão de substrato em etanol (Y<sub>p/s</sub>). A produtividade deste processo, com vazão de 0,40 mL.min<sup>-1</sup>, foi maior do que a obtida nos processos industriais que chega a 12 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (dados técnicos) e esta vazão foi a escolhida para ser a utilizada nos demais experimentos de batelada alimentada.



### 5.3.2 Efeito do uso de estratégias diferentes de ajuste de pH na clarificação do melão sobre a fermentação em batelada alimentada a 34°C

A Fig. 16 apresenta as curvas de tempo de massa de substrato, massa de células e massa de produto para a fermentação em batelada alimentada do melão suplementado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP, clarificado com  $1,48 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e ajuste de pH antes da passagem em vapor de autoclave (Fig. 16A) e após passagem em vapor de autoclave (Fig. 16B). O melão foi adicionado a uma vazão de alimentação de  $0,40 \text{ mL.min}^{-1}$  e foram utilizados  $23,7 \text{ g.L}^{-1}$  de inóculo ocupando 30% do volume de trabalho do reator (30,0mL). Este experimento foi utilizado com a finalidade de que se acumulasse menos açúcar redutor no fim do processo, o que indicaria uma melhor clarificação do melão e uma maior retirada de impurezas e partículas coloidais.

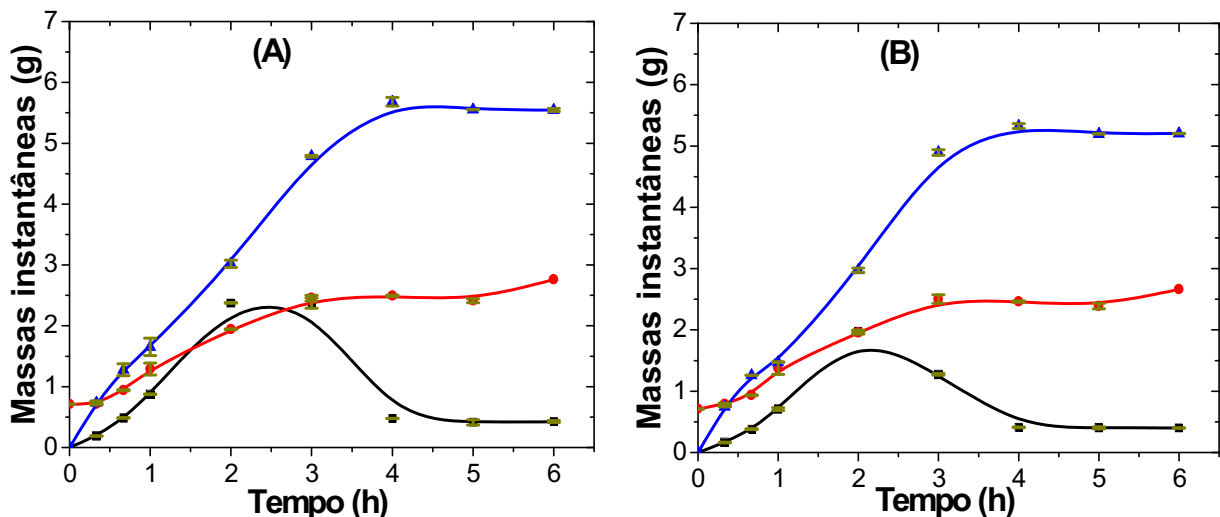


Figura 16: Efeito das mudanças de pH na clarificação do melão sobre as curvas de tempo de massa de substrato ( $\blacksquare$ ), massa de células ( $\bullet$ ) e massa de etanol ( $\blacktriangle$ ) para as fermentações em batelada alimentada do melão clarificado com  $1,48 \text{ g.L}^{-1}$  de dihidrogeno fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): ajuste de pH a 4,5 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  antes da clarificação (A) e após a clarificação(B).

Condições de fermentação: Melão 20 % em ART suplementado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP, vazão (F) =  $0,40 \text{ mL.min}^{-1}$ , inóculo de  $23,7 \text{ g.L}^{-1}$ , agitação de 125 rpm e tempo de alimentação de 3 horas

A Fig. 16A ilustra que houve acúmulo de substrato durante a alimentação do reator (aproximadamente 3 horas) e, em seguida, ocorreu o seu consumo. A Fig. 16B ilustra que o substrato acumulou-se durante as 2 horas iniciais e, em seguida, foi consumido pelas leveduras. Nos dois processos, o acúmulo de massa de etanol

ocorreu praticamente até 4 horas e a fermentação terminou em 5 horas. Também se pode verificar que no processo com o ajuste de pH antes da clarificação (Fig. 16A) foi produzido mais etanol e que houve maior acúmulo de açúcares no reator durante seu período de alimentação.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada alimentada, com os diferentes tipos de clarificação, são apresentados na Tab.14.

**Tabela 14: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 16**

<b>Ajuste de pH a 4,5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Tempo<sup>(a)</sup> (h)</b>	<b>Biomassa (g)</b>	<b>ART (g)</b>	<b>Etanol (g)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
Antes de passagem por vapor	5	2,41±0,04	0,43±0,04	5,55±0,13	95,2±3,9
Após a passagem por vapor	5	2,39±0,05	0,44±0,00	5,20±0,10	98,4±2,2

(a) início da fase estacionária de produção de etanol.

Na Tab. 14 pode-se observar que ambos os tipos de clarificação do melão resultaram em fermentações com baixa concentração de etanol produzido, quando comparados à fermentação do melão clarificado somente com ácido sulfúrico e aquecimento em vapor de autoclave e que, além disso, ocorreu menor aumento da biomassa. A diferença entre as clarificações somente com ácido sulfúrico e com dihidrogeno fosfato de potássio pode estar no fato de não haver enxofre para a levedura em quantidade suficiente na forma de sulfato, quando o melão foi clarificado com o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Os parâmetros da fermentação em batelada alimentada do melão 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP são apresentados na Tab.15.

Tabela 15: Parâmetros calculados com os dados da Tab. 14

Ajuste de pH a 4,5 com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Biomassa (% de aumento)	Y <sub>x/s</sub> (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	Y <sub>p/s</sub> (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )
Antes de passagem por vapor	11,10±0,01	54,3±0,0	1,9±1,1	0,002	0,284
Após a passagem por vapor	10,39±0,00	50,8±0,0	8,7±2,3	0,001	0,266

Y<sub>x/s</sub> = fator de conversão de substrato em biomassa; Y<sub>p/s</sub> = fator de conversão de substrato em etanol

Na Tab.15 pode ser verificado que a clarificação do melaço utilizando-se KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> resultou em pequena produtividade, rendimento e aumento da biomassa, além de baixos fatores de conversão de substrato em biomassa (Y<sub>x/s</sub>) e de substrato em produto (Y<sub>p/s</sub>), quando comparados com a fermentação do melaço clarificado com ácido sulfúrico (ver Tab. 13).

Devido aos melhores resultados dos processos fermentativos utilizando-se melaço clarificado somente com ácido sulfúrico a pH 4,5, optou-se por sua utilização para a clarificação do melaço nos demais ensaios de fermentação em batelada alimentada.

### 5.3.3 Efeito das temperaturas de 34°C e 37°C sobre a fermentação do melaço suplementado com diamônio hidrogeno fosfato (DAP) e sulfato de magnésio heptahidratado em batelada alimentada

Na Fig. 17 são apresentadas as curvas de tempo de massa de substrato, de biomassa e de produto para a fermentação em batelada alimentada a 34°C (Fig. 17A) e a 37°C (Fig. 17B), com 70,0 mL de melaço 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O com vazão alimentação de 0,40 mL.min<sup>-1</sup> e inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup> ocupando 30,0% do volume de trabalho do reator.

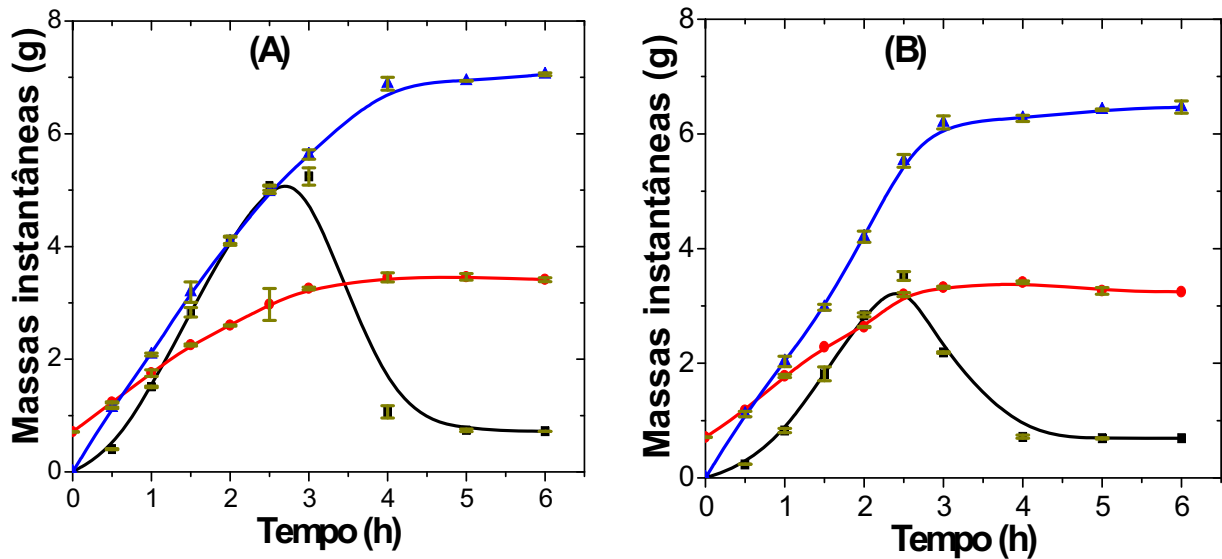


Figura 17: Efeito da temperatura sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) para as fermentações em batelada alimentada: (A) 34°C; (B) 37°C. Condições: inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup>, vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup>, agitação de 125 rpm, melão 20 % em ART clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup> e suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e tempo de alimentação de 3 horas

A Fig. 17B ilustra que a fermentação do melão foi mais rápida a 37°C, pois a massa de substrato permanece constante em um menor tempo, após o início do processo. Nota-se também que a fermentação a uma maior temperatura resultou em menor concentração de etanol produzido, bem como de biomassa. Utilizando-se temperatura de 34°C na fermentação, ocorreu um maior acúmulo de massa de substrato no reator durante a sua alimentação, que foi de aproximadamente 3 horas. No processo com menor temperatura, os açúcares redutores totais são assimilados mais lentamente pelas leveduras, haja vista que as velocidades das reações químicas são maiores quando as temperaturas são mais elevadas.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada alimentada, com as diferentes temperaturas do processo, são apresentados na Tab. 16.

**Tabela 16: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 17**

Temperatura (°C)	Tempo <sup>(a)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
34	6	3,41±0,03	0,52±0,00	7,05±0,02	98,3±0,6
37	5	3,26±0,06	0,69±0,01	6,42±0,01	97,2±0,6

(a) início da fase estacionária de produção de etanol.

A Tab. 16 indica que a fermentação a 37°C foi mais rápida e terminou em 5 horas. O aumento da temperatura do processo levou a uma menor produção de etanol e de biomassa, o que explica a maior massa de açúcares redutores totais acumulada no reator.

#### **5.3.4 Efeito das temperaturas de 34°C e 37°C sobre a fermentação do melaço suplementado com diamônio hidrogeno fosfato (DAP) e sulfato de zinco heptahidratado em batelada alimentada**

Na Fig. 18 são apresentadas as curvas de tempo de massa de substrato, de biomassa e de produto para a fermentação em batelada alimentada a 34°C (Fig. 18A) e a 37°C (Fig. 18B), com 70,0 mL de melaço 20 % em ART suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O com vazão alimentação de 0,40 mLmin<sup>-1</sup> e inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup> ocupando 30,0% do volume de trabalho do reator.

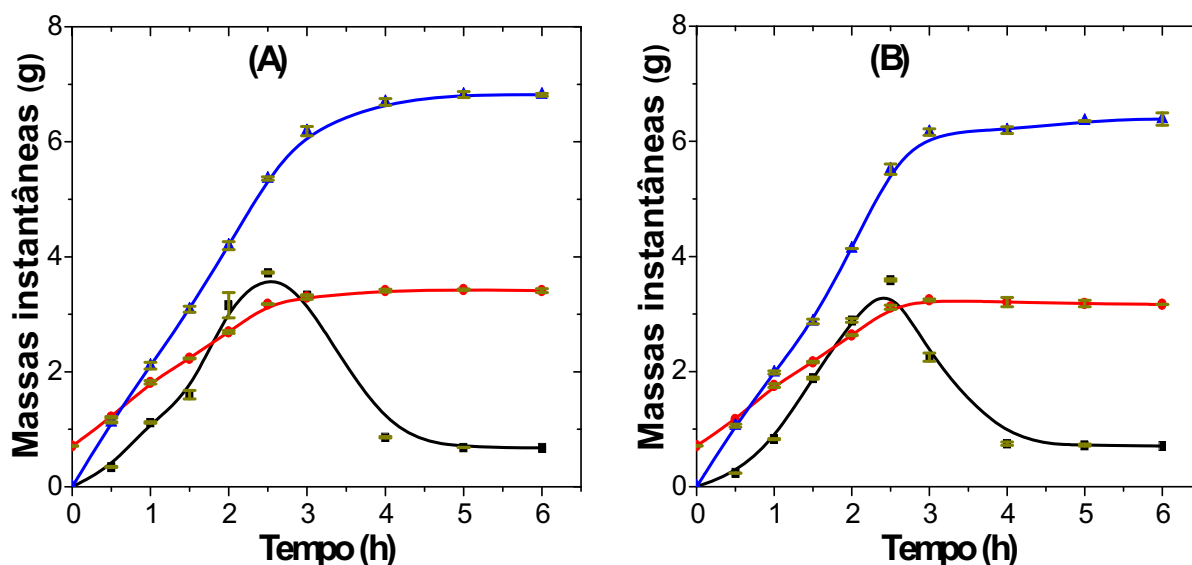


Figura 18: Efeito da temperatura sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) para as fermentações em batelada alimentada: (A) 34°C; (B) 37°C. Condições: inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup>, vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup>, agitação de 125 rpm, melação 20 % em ART clarificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup> e suplementado com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, tempo de alimentação de 3 horas

A fig. 18B ilustra que a fermentação a 37°C foi mais rápida e que, no entanto, produziu menos etanol e biomassa do que no processo a 34°C. Utilizando-se temperatura de 34°C na fermentação, ocorreu um maior acúmulo de massa de substrato no reator durante a sua alimentação, que foi de aproximadamente 3 horas. No processo com menor temperatura, os açúcares redutores totais são assimilados mais lentamente pelas leveduras, haja vista que as velocidades das reações químicas são maiores quando as temperaturas são mais elevadas.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada alimentada, com as diferentes temperaturas do processo, são apresentados na Tab. 17.

Tabela 17: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 18

Temperatura (°C)	Tempo <sup>(a)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
34	6	3,41±0,03	0,68±0,00	6,82±0,02	98,3±0,6
37	5	3,18±0,06	0,72±0,02	6,36±0,01	97,2±0,6

(a) início da fase estacionária de produção de etanol.

A Tab. 17 indica que a fermentação do melaço foi mais rápida a 37°C e terminou em 5 horas. O aumento da temperatura do processo levou a uma menor produção de etanol e de biomassa, o que explica a maior massa de açúcares redutores totais acumulada no reator.

Os parâmetros da fermentação do melaço em batelada alimentada nas temperaturas de 34 e 37°C são apresentados na Tab.18.

**Tabela 18: Parâmetros calculados com os dados das Tabs. 16 e 17**

T (°C)	Suplementos associados ao DAP	Aumento de biomassa (%)	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Y <sub>x/s</sub> (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	Y <sub>p/s</sub> (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )
34°C	Zn <sup>2+</sup>	43,9±2,3	11,36±0,04	66,7±0,2	0,054	0,353
	Mg <sup>2+</sup>	46,0±5,3	11,76±0,04	69,0±0,2	0,053	0,362
37°C	Zn <sup>2+</sup>	34,3±3,2	12,71±0,01	62,2±0,1	0,042	0,330
	Mg <sup>2+</sup>	37,7±3,3	12,84±0,02	62,8±0,0	0,046	0,332

Y<sub>x/s</sub> = fator de conversão de substrato em biomassa; Y<sub>p/s</sub> = fator de conversão de substrato em produto

A Tab. 18 indica que as fermentações a 37°C resultaram em uma maior produtividade do processo, no entanto, com mais baixos rendimentos em etanol. Os fatores de conversão de substrato em biomassa (Y<sub>x/s</sub>) e de substrato em produto (Y<sub>p/s</sub>) foram maiores para as fermentações a 34°C. Pode ser verificado também que a suplementação do melaço com DAP e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O resultou em uma melhora de todos os parâmetros calculados em relação ao melaço suplementado com DAP e ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Nota-se que nos processos fermentativos com temperatura mais elevada houve um menor acúmulo de biomassa no reator. Finalmente, tem-se que a suplementação do melaço com sulfato de magnésio heptahidratado e DAP resultou em melhores parâmetros fermentativos.

Os resultados do efeito da temperatura sobre a fermentação do melaço pela levedura *S. cerevisiae* indicam que a melhor temperatura de processo foi de 34°C, pois foi produzido mais etanol nos processos, logo, esta foi escolhida para ser a utilizada nos outros estudos de fermentação.

### 5.3.5 Efeito da suplementação do melaço associado ao aumento do inóculo em batelada alimentada a 34°C

Na Fig. 19 são apresentadas as curvas de tempo de massa de substrato, de biomassa e de etanol para a fermentação em batelada alimentada a 34°C, com melaço 20 % em ART sem suplementação (Fig. 19A) e com suplementação de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Fig. 19B). Foram utilizados vazão de alimentação de 0,40 mL.min<sup>-1</sup> e inóculo de 15,1 g.L<sup>-1</sup> ocupando 30% do volume de trabalho do reator.

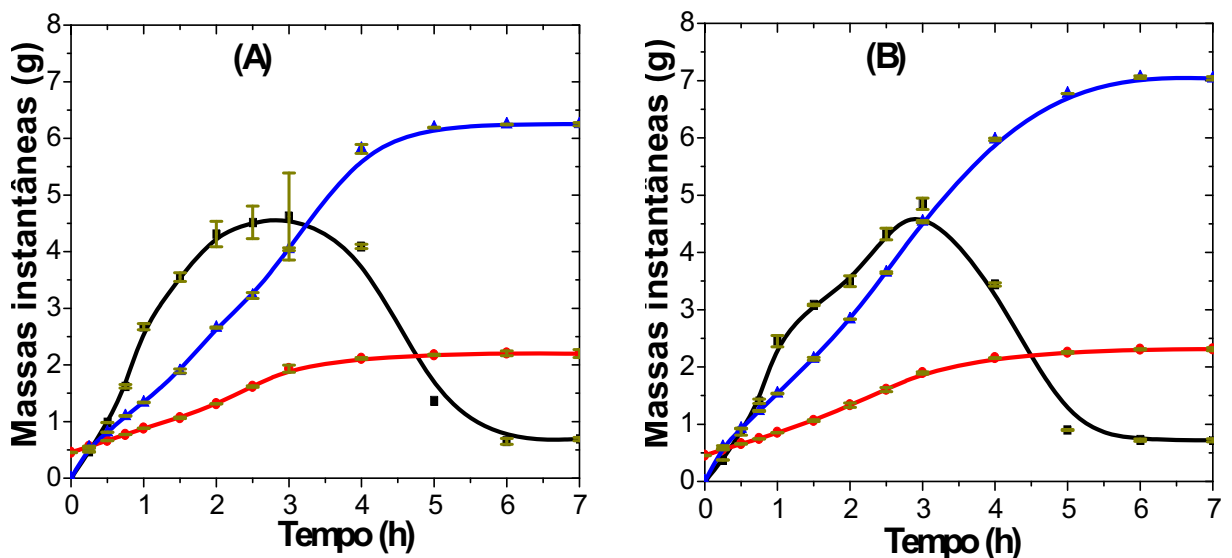


Figura 19: Efeito do uso de um inóculo de 15,1 g.L<sup>-1</sup> e das adições de suplementos (1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) a 34°C sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) nos experimentos: (A) sem e (B) com adição de suplementos. Condições: melaço 20% em ART; vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup> e 125 rpm de agitação

A Fig. 19 ilustra que houve um grande acúmulo de substrato no reator até 3 horas de processo, pois a velocidade de assimilação deste pelas leveduras foi menor que a vazão de alimentação e isto está diretamente relacionado à baixa quantidade de células presentes no reator. Após este período, os açúcares redutores totais foram consumidos. Pode-se observar também que a suplementação do melaço resultou em uma maior concentração de etanol produzida, bem como de biomassa. Nota-se na Fig. 19B que no intervalo entre uma e duas horas de fermentação, a curva de acúmulo de substrato é diferente daquela apresentada na Fig. 19A e apresenta menor inclinação, indicando que neste intervalo de tempo, houve uma maior assimilação dos açúcares pelas leveduras quando o melaço foi



suplementado e isto pode ser verificado pelo fato de que nestes instantes as massas acumuladas de célula e etanol são maiores no processo suplementado.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada alimentada, com e sem suplementação e inóculo de  $15,1 \text{ g.L}^{-1}$ , são apresentados na Tab. 19.

**Tabela 19: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 19**

Meio	Tempo <sup>(a)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
<b>Não suplementado</b>	6	2,20±0,04	0,72±0,02	6,24±0,00	98,6±0,6
<b>Suplementado</b>	6	2,31±0,01	0,65±0,05	7,06±0,02	98,7±0,9

(a) início da fase estacionária de produção de etanol.

Na Tab. 19 está indicado que a suplementação do melaço não diminuiu o tempo da fermentação e resultou em uma maior massa de biomassa e de etanol produzidos, o que pode ser verificado pela menor massa acumulada de açúcares no reator, pois estes foram utilizados tanto para incrementar o crescimento quanto a produção de etanol.

Na Fig. 20 são apresentadas as curvas de tempo de massa de substrato, de biomassa e de etanol para a fermentação em batelada alimentada a  $34^{\circ}\text{C}$ , com melaço 20 % em ART sem suplementação (Fig. 20A) e com suplementação de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP,  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 20B). Foram utilizadas vazão de alimentação de  $0,40 \text{ mL.min}^{-1}$  e inóculo de  $23,7 \text{ g.L}^{-1}$  ocupando 30% do volume de trabalho do reator.

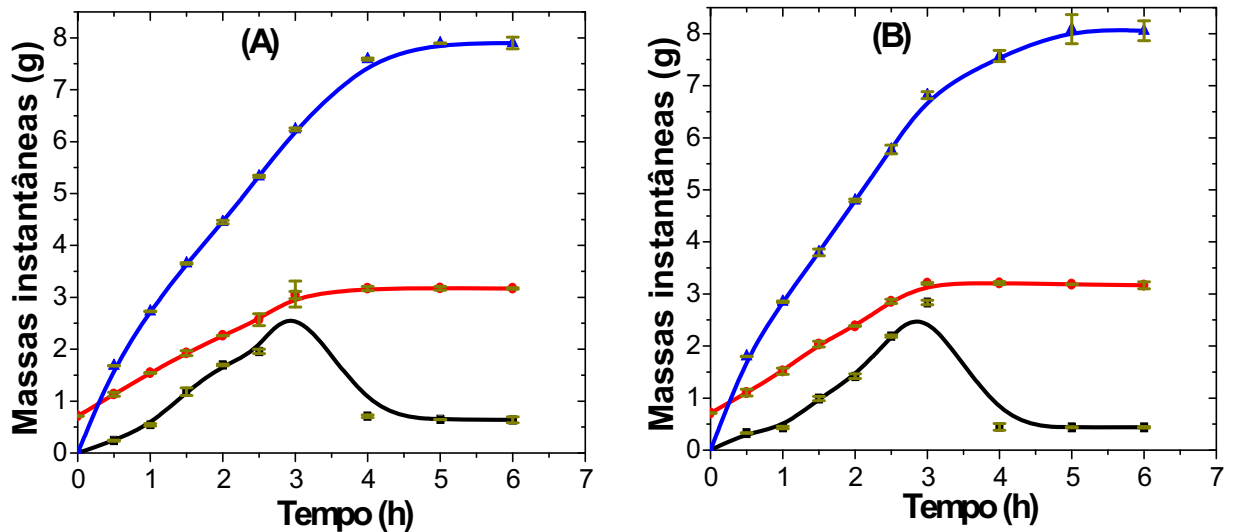


Figura 20: Efeito do uso de um inóculo de  $23,7 \text{ g.L}^{-1}$  e das adições de suplementos ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP,  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a  $34^\circ\text{C}$  sobre as curvas de tempo de massa de substrato ( $\blacksquare$ ), massa de células ( $\bullet$ ) e massa de etanol ( $\blacktriangle$ ) nos experimentos: (A) sem e (B) com adição de suplementos. Condições: melação 20% em ART; vazão (F) =  $0,40 \text{ mL.min}^{-1}$  e 125 rpm de agitação

A Fig. 20 ilustra que houve acúmulo de substrato no reator até 3 horas de processo, aproximadamente o mesmo tempo de alimentação do reator, pois a taxa de assimilação dos açúcares pelas leveduras foi menor que a vazão de alimentação. Após este período, os açúcares redutores totais acumulados foram consumidos pelas leveduras, com aumento na massa de etanol e de células no reator. A Fig. 20B indica que a suplementação do melação com DAP, íons zinco e magnésio, resultou em uma maior concentração de etanol produzida.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada alimentada, com e sem suplementação e inóculo de  $23,7 \text{ g.L}^{-1}$ , são apresentados na Tab. 20.

Tabela 20: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 20

Meio	Tempo <sup>(a)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
Não suplementado	5	$3,17 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,00$	$7,90 \pm 0,01$	$98,5 \pm 0,8$
Suplementado	5	$3,19 \pm 0,00$	$0,44 \pm 0,02$	$8,09 \pm 0,08$	$99,0 \pm 0,4$

(a) início da fase estacionária de produção de etanol.

Observa-se na Tab. 20 que a suplementação do melão não diminuiu o tempo da fermentação e resultou em uma maior massa de etanol acumulado, o que pode ser verificado pela menor massa de açúcares acumulada no reator, pois estes foram utilizados para a produção de etanol.

Na Fig. 21 são apresentadas as curvas de tempo de massa de substrato, de biomassa e de etanol para a fermentação em batelada alimentada a 34°C, com melão 20 % em ART sem suplementação (Fig. 21A) e com suplementação de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Fig. 21B). Foi utilizada azão de alimentação de 0,40 mL.min<sup>-1</sup> e inóculo de 29,1 g.L<sup>-1</sup> ocupando 30% do volume de trabalho do reator.

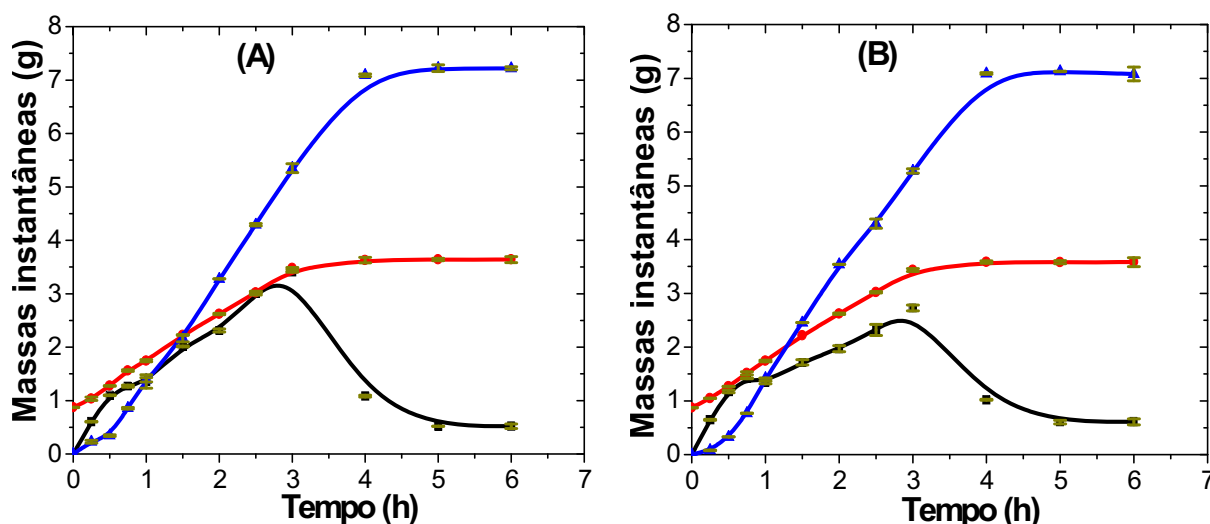


Figura 21: Efeito do inóculo de 29,1 g.L<sup>-1</sup> e das adições de suplementos (1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) a 34°C sobre as curvas de tempo de massa de substrato (■), massa de células (●) e massa de etanol (▲) nos experimentos: (A) sem e (B) com adição de suplementos. Condições: melão 20% em ART; vazão (F) = 0,40 mL.min<sup>-1</sup> e 125 rpm de agitação

As Figs. 21A e 21B indicam que a suplementação do melão levou a resultados semelhantes de biomassa e de etanol produzidos, no entanto, no processo em que se utilizou melão suplementado (Fig. 21B), a massa de substrato acumulada no reator foi menor e isto indica que a suplementação do melão faz com que as leveduras consumam mais açúcares durante o período de alimentação do reator.

Comparando-se as Figs. 20 e 21 observa-se que com o aumento da quantidade de inóculo (de 23,7 g.L<sup>-1</sup> para 29,1 g.L<sup>-1</sup>) foi produzido menos etanol e que a massa de açúcares no reator durante o período de sua alimentação é maior.

Estes fatores indicam que há uma quantidade ótima de células que deve ser utilizada no processo, pois em fermentações com elevadas concentrações celulares ocorre uma competição das leveduras pelo substrato, o que resulta em uma diminuição do aumento relativo da biomassa.

Os resultados obtidos após o término da fermentação em batelada alimentada, com e sem suplementação e inóculo de  $29,1 \text{ g.L}^{-1}$ , são apresentados na Tab. 21.

**Tabela 21: Viabilidade, acúmulo de biomassa, etanol e açúcar residual expressos em g totais em 100 mL de volume final de trabalho conforme descrito na Fig. 21**

Meio	Tempo <sup>(a)</sup> (h)	Biomassa (g)	ART (g)	Etanol (g)	Viabilidade (%)
<b>Não suplementado</b>	5	3,64±0,02	0,52±0,00	7,22±0,06	96,5±1,0
<b>Suplementado</b>	5	3,58±0,03	0,60±0,03	7,13±0,05	98,9±0,4

(a) início da fase estacionária de produção de etanol.

Os resultados da Tab. 21 indicam que a suplementação do melaço levou a uma diminuição da biomassa e do etanol produzidos quando foi utilizado um inóculo de  $29,1 \text{ g.L}^{-1}$ .

Na Tab. 22 são apresentados os resultados das fermentações com diferentes quantidades de inóculo, vazão de alimentação de  $0,40 \text{ mL.min}^{-1}$ , a  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  e melaço 20% em ART, clarificado com ácido sulfúrico com e sem suplementação usando-se  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP.

**Tabela 22: Efeito do tamanho de inóculo e da adição de suplementos sobre os parâmetros calculados com os dados das Tabs. 19, 20 e 21**

Meios	Aumento de biomassa (%)	ART final (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol final (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento alcoólico (%)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Y <sub>p/s</sub> (g/g)
15,1 g.L <sup>-1</sup> de inóculo, sem suplemento	46,0±4,0	7,2±0,2	62,4±0,0	10,40±0,01	61,1±0,0	0,036	0,322
15,1 g.L <sup>-1</sup> de inóculo, com suplemento	52,8±0,7	6,5±0,5	70,6±0,2	11,77±0,04	69,1±0,2	0,041	0,366
23,7 g.L <sup>-1</sup> de inóculo, sem suplemento	33,9±0,7	6,4±0,0	79,0±0,1	15,80±0,02	77,2±0,1	0,041	0,408
23,7 g.L <sup>-1</sup> de inóculo, com suplemento	34,4±0,6	4,4±0,2	80,9±0,8	16,18±0,56	79,1±0,7	0,042	0,414
29,1 g.L <sup>-1</sup> de inóculo, sem suplemento	25,1±1,4	5,2±0,0	72,2±0,6	14,44±0,13	70,7±0,6	0,037	0,371
29,1 g.L <sup>-1</sup> de inóculo, com suplemento	23,0±1,6	6,0±0,3	71,3±0,0	14,26±0,01	69,8±0,0	0,034	0,368

Os resultados descritos na Tab. 22 mostram que quanto menor a quantidade inicial de inóculo, maior o crescimento da biomassa e menor a concentração final de etanol, pois os açúcares são utilizados em maior proporção para o crescimento celular. Nos experimentos em que foram utilizados 15,1 e 23,7 g.L<sup>-1</sup> de inóculo, com melaço suplementado, todos os parâmetros sofreram uma melhora, tais como aumento da biomassa, aumento da concentração de etanol produzido, aumento da produtividade e do rendimento da fermentação. Além disso, com o inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup> e 29,1 g.L<sup>-1</sup> foram obtidas maiores produtividades do processo em relação ao que se obtém na indústria, que atinge 12 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de produtividade do etanol. O inóculo de 23,7 g.L<sup>-1</sup> utilizado resultou em maior concentração final de etanol presente no fermentador, com menor concentração de substrato, que foi utilizado para uma maior produção do etanol.

Na fermentação em batelada alimentada, o a clarificação do melaço com ácido sulfúrico a pH 4,5 resultou em maior massa de etanol produzido, além de maior consumo dos açúcares residuais no fermentador. A vazão de alimentação dos reatores que simula aproximadamente o dobro daquela utilizada pela indústria mostrou-se adequada, pois levou a um menor tempo de fermentação e foram acumuladas praticamente as mesmas massas de etanol, ou seja, com o dobro da

vazão de alimentação da indústria houve um ganho em produtividade do processo. As fermentações em menor temperatura (34°C) resultaram em maior tempo de fermentação, no entanto foi produzido mais etanol no processo, com maior rendimento. O melhor tamanho de inóculo estudado foi aquele que simula as condições industriais de 12 % (v/v) e equivalem a 23,7 g.L<sup>-1</sup> de células.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões quanto ao uso da levedura IQ-Ar/45-1 na fermentação do melaço em batelada simples:

- Os suplementos diamônio hidrogeno fosfato (DAP), sulfato de zinco e sulfato de magnésio melhoraram a produtividade e o rendimento em etanol das fermentações em batelada simples;
- A adição de íons zinco diminuiu o tempo de fermentação, com aumento de produtividade e rendimento;
- A adição de íons magnésio melhorou o rendimento em etanol e a produtividade;

Os processos fermentativos do melaço em batelada alimentada utilizando-se a levedura IQ-Ar/45-1 permitem as seguintes conclusões:

- Os melhores resultados em processo de batelada alimentada foram obtidos com melaço clarificado com ácido sulfúrico a pH 4,5 com passagem em vapor de autoclave por 30 minutos;
- A melhor vazão de alimentação em batelada alimentada foi de 0,40 mL.min<sup>-1</sup>;
- A elevação da temperatura de fermentação em batelada alimentada diminuiu a produção de biomassa e de etanol, com um menor tempo de fermentação, logo a melhor temperatura para estes processos é de 34°C;
- Comparando-se as fermentações em batelada alimentada com e sem a adição dos suplementos DAP, íons zinco e magnésio, verifica-se que a suplementação do melaço é um fator que aumenta a massa de etanol produzida, bem como produtividade e rendimento;
- O melhor tamanho de inóculo foi de 23,7 g.L<sup>-1</sup>, pois levou a uma maior produção de etanol, com maior produtividade e rendimento alcoólico.

Utilizando-se melaço suplementado, houve um aumento de 2,40% na concentração de etanol e na produtividade das fermentações;

- Os resultados obtidos em batelada alimentada indicam que a fermentação do melaço 20% em ART clarificado com ácido sulfúrico, suplementado com  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de DAP,  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , com vazão de alimentação de  $0,40 \text{ mL.min}^{-1}$ , temperatura de  $34^\circ\text{C}$  e inóculo inicial de  $23,7 \text{ g.L}^{-1}$  resultou em maior produção de etanol, rendimento e produtividade.

### **PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS**

Fermentações com leveduras comerciais devem ser realizadas, nas mesmas condições, para comparação destas com a nova levedura IQ-Ar/45-1. Além disto, devem ser realizados ciclos sucessivos de fermentações com reciclo de células para se avaliar o resistência das leveduras ao processo.

## REFERÊNCIAS

- ANDRIETTA, S. R.; FERREIRA, E.; ANDRIETTA, M. G. S. **Avaliação da influência da velocidade de alimentação sobre o rendimento e produtividade dos processos de produção de etanol operando em batelada alimentada**. Campinas. Disponível em: <[http://www.enq.ufc.br/eventos/sinaferm/trabalhos\\_complexos/t043.doc](http://www.enq.ufc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_complexos/t043.doc)>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- BASSO L. C. **Fisiologia e ecologia da fermentação alcoólica**. Disponível em: <[http://www.apta.sp.gov.br/.../Workshop\\_etanol\\_sessao%20\\_Luiz%20Basso.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/.../Workshop_etanol_sessao%20_Luiz%20Basso.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para a produção de cachaça**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) -. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- BISSON, L.; BUTZKE, C. E. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentation. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v. 51, n. 2, p.168-177, 2000.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 56, n. 1, 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90161999000100028&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161999000100028&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 25 jan. 2010.
- CARVALHO, J. C. M. **Contribuição ao estudo dos processos descontínuo e descontínuo alimentado de fermentação alcoólica**. 1994. 334 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- CHENG, N. G. et al. Production of ethanol by fed-batch fermentation. **Pertanika J. Sci. & Technol.**, Selangor, v. 17, n. 2, p. 399-408, 2009.
- CONVERTI, A. et al. Simplified modeling of fed-batch alcoholic fermentation of sugarcane blackstrap molasses. **Biotechnol. Bioeng.**, Hoboken, v. 84, n. 1, p. 88-95, 2003.
- ÇAYLAK, B.; SUKAN, V. Comparison of different production processes for bioethanol. **Turk. J. Chem.**, Ankara, v. 22, n. 4, p. 351-359, 1996.
- DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, New York, v. 85, n. 2, p. 253-263, 2009.



FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochem. Eng. J.**, Lausanne, v. 44, n. 1, p. 2-12, 2009.

HARALDSON, Å.; ROSÉN, C. G. Studies on continuous ethanol fermentation of sugar cane molasses. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, New York, v. 14, n. 4, p. 220-224, 1982.

JAQUET, L.; JAUNIAUX, J. C. Disruption and basic functional analysis of five chromosome X novel ORFs of *Saccharomyces cerevisiae* reveals YJL125c as an essential gene for vegetative growth. **Yeast**, Chichester, v. 15, n. 1, p. 51-61, Jan. 1999.

KEIM, C. R. Technology and economics of fermentation alcohol-an update. **Enz. Microb. Technol.**, New York, v. 5, n. 2, p. 103-114, 1983.

LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol production. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Boca Raton, v. 11, p. 149-161, 1991.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 11, n. 3, p. 641-649, 1981.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, cap. 10, p. 205-216.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-20.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, P. B. et al. Short communication: characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, London, v. 13, n. 2, p. 241-243, Mar. 1997.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas-UNESP, 2005.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resour. Conservat. Recycl.**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 1-39, 2007.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell density cultivation of microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, New York, v. 51, n. 4, p. 422-430, 1999.

ROUKAS, T. Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. **J. Food Eng.**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 87-96, 1996.

SIQUEIRA, P. L. et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technol.**, Oxford, v. 99, n. 17, p. 8156-8163, 2008.

SUMNER, E. R.; AVERY, S. V. Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* mini review. **Microbiology**, Berks, v. 148, parte 2, p. 345-351, Feb. 2002.

THORNTON, R. J. Wine yeast research in New-Zealand and Australia. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Boca Raton, v. 11, n. 4, p. 327-345, 1991.

VOLPE, P. L. O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 5, n. 20, p. 528-534, 1997.

WALKER, G. W. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley and Sons, 1998.

ZANIN, G. M. et al. Brazilian bioethanol program. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.

## APÊNDICE

Tabela referente à Fig. 12 (a): melão sem suplementação com DAP

Tempo (h)	Biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	30	0,198	2,4	10	0,0	500	0,592	200,0
13	30	0,756	9,8	10	57,7	500	0,128	44,2
19	40	0,674	11,4	10	80,7	100	0,215	15,4
27	40	0,619	10,6	10	81,5	50	0,167	5,7
39	40	0,651	10,8	10	81,0	25	0,425	5,5
63	40	0,608	10,2	10	80,5	20	0,623	5,5

Tabela referente à Fig. 12 (b): melão com 0,5 g.L<sup>-1</sup> de DAP

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	30	0,216	2,7	10	0,0	500	0,592	200,0
13	30	0,885	11,0	10	63,4	200	0,149	20,1
19	40	0,772	12,8	10	88,3	50	0,133	4,5
27	40	0,753	12,6	10	88,3	50	0,167	4,5
39	40	0,758	12,5	10	88,3	25	0,455	4,5
63	40	0,692	11,8	10	86,9	20	0,539	4,5

Tabela referente à Fig. 12 (c): melão com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	30	0,22	2,7	10	0,0	500	0,592	200,0
13	30	0,864	10,4	10	72,5	200	0,189	25,6
19	40	0,731	11,7	10	90,7	50	0,112	3,8
27	40	0,702	11,4	10	90,0	50	0,176	3,7
39	40	0,745	12,0	10	88,9	25	0,433	3,9
63	40	0,722	11,8	10	87,7	20	0,542	3,8

Tabela referente à Fig. 12 (d): melão com 2,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	30	0,269	3,30	10	0,0	500	0,592	200,0
13	30	0,81	9,9	10	71,5	200	0,261	35,3
19	40	0,69	11,4	10	89,1	50	0,142	4,8
27	40	0,735	12,0	10	88,5	50	0,151	4,8
39	40	0,745	12,2	10	88,2	25	0,513	4,7
63	40	0,67	10,9	10	87,7	20	0,559	4,7

Tabela referente à Fig. 13 (a): melão sem suplementação com  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	20	0,244	2,0	10	0,0	500	0,592	200,0
5	20	0,697	5,7	10	27,2	500	0,361	122,2
10	40	0,587	9,6	10	52,2	200	0,478	64,6
14	40	0,583	10,2	10	71,7	250	0,183	31,5
18	40	0,759	12,5	10	79,9	50	0,172	5,8
22	40	0,744	12,5	10	81,5	50	0,165	5,6
38	40	0,642	10,9	10	81,5	20	0,504	5,6

Tabela referente à Fig. 13 (b): melão com suplementação de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	20	0,244	2,0	10	0,0	500	0,592	200,0
5	20	0,697	5,7	10	27,0	500	0,369	124,8
10	40	0,581	9,5	10	53,5	200	0,467	63,2
14	40	0,726	12,2	10	74,1	50	0,219	7,4
18	40	0,798	12,8	10	82,3	50	0,172	5,8
22	40	0,792	12,7	10	81,5	50	0,138	5,7
38	40	0,736	12,4	10	81,8	20	0,530	5,8

Tabela referente à Fig. 13 (c): melão com suplementação de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	20	0,244	2,0	10	0,0	500	0,592	200,0
5	20	0,684	5,6	10	29,4	500	0,367	124,2
10	40	0,532	8,7	10	56,7	200	0,418	56,5
14	40	0,717	11,6	10	83,6	50	0,192	6,5
18	40	0,792	12,6	10	85,4	50	0,168	5,7
22	40	0,795	12,6	10	85,1	50	0,139	5,7
38	40	0,741	12,4	10	84,4	20	0,518	5,8

Tabela referente à Fig. 13 (d): melação com suplementação de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	20	0,244	2,0	10	0,0	500	0,592	200,0
5	20	0,697	5,7	10	29,1	500	0,399	135,3
10	40	0,556	9,1	10	58,3	200	0,437	59,1
14	40	0,722	12,1	10	82,5	50	0,180	6,1
18	40	0,742	12,3	10	83,5	50	0,142	4,8
22	40	0,797	13,0	10	80,3	50	0,143	4,7
38	40	0,743	12,6	10	80,7	20	0,511	4,7

Tabela referente à Fig. 14 (a): melação sem suplementação com  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	20	0,244	2,0	10	0,0	500	0,592	200,0
3	30	0,354	2,7	10	9,4	500	0,485	164,1
6	30	0,626	4,7	10	20,2	500	0,463	156,6
9	30	0,858	7,3	10	37,6	500	0,340	114,9
12	30	0,788	10,9	10	62,8	200	0,327	44,2
24	40	0,780	12,4	10	79,1	20	0,562	7,6
31	40	0,242	12,4	10	79,8	20	0,562	7,6

Tabela referente à Fig. 14 (b): melação com suplementação de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	20	0,242	2,0	10	0,0	500	0,592	200,0
3	30	0,240	2,9	10	8,8	500	0,486	164,4
6	30	0,364	4,6	10	23,2	500	0,425	143,7
9	30	0,628	7,6	10	38,4	500	0,291	98,4
12	30	0,824	10,2	10	65,1	200	0,338	45,7
24	40	0,774	12,3	10	83,1	20	0,429	5,8
31	40	0,760	12,2	10	84,8	20	0,436	5,9

Tabela referente à Fig. 14 (c): melação com suplementação de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	20	0,242	2,0	10	0,0	500	0,592	200,0
3	30	0,241	3,0	10	10,7	500	0,493	166,6
6	30	0,354	4,5	10	16,2	500	0,428	144,7
9	30	0,619	7,7	10	17,6	500	0,342	115,5
12	30	0,829	10,5	10	61,1	200	0,376	50,8
24	40	0,758	12,4	10	85,4	20	0,406	5,5
31	40	0,749	12,4	10	91,5	20	0,406	5,5

Tabela referente à Fig. 15 (a):  $F = 0,40 \text{ mL.min}^{-1}$

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	500	0,515	31,6	-	0,0	-	-	0,0
0,5	500	0,493	42,4	10	37,8	20	0,282	1,6
1	500	0,415	47,8	10	53,1	20	0,316	2,3
1,5	500	0,395	53,3	10	63,1	20	0,459	4,1
2	500	0,331	54,6	10	65,8	40	0,246	5,4
3	500	0,262	54,1	10	72,4	50	0,122	4,1
4	500	0,255	51,9	10	72,7	50	0,120	4,0
5	500	0,256	51,7	10	73,2	50	0,106	3,6
6	500	0,253	51,7	10	72,7	10	0,577	3,9

Tabela referente à Fig. 15 (b):  $F = 0,20 \text{ mL.min}^{-1}$

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	500	0,516	31,6	-	0,0	-	-	0,0
1	500	0,387	33,5	10	33,8	10	0,567	1,6
2	500	0,315	35,2	10	48,2	10	0,743	2,7
3	500	0,261	35,7	10	60,3	20	0,426	3,8
4	500	0,229	37,1	10	64,3	20	0,523	5,6
5	500	0,207	38,7	10	70,4	20	0,487	6,0
6	500	0,206	42,0	10	71,3	20	0,437	5,9
7	500	0,188	38,3	10	70,0	10	0,981	6,6
8	500	0,186	38,0	10	71,1	10	0,940	6,4

Tabela referente à Fig. 16 (a): ajuste de pH com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> antes de clarificação em vapor de autoclave

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	500	0,386	23,6	-	0,0	-	-	0,0
0,333	500	0,236	18,6	10	19,1	40	0,477	4,9
0,667	500	0,208	20,0	10	27,1	40	0,828	10,3
1	500	0,205	23,2	10	29,7	40	1,065	15,7
2	400	0,181	24,0	10	37,3	40	1,368	29,3
3	400	0,150	24,5	10	47,8	40	0,878	23,7
4	400	0,152	24,9	10	56,8	10	0,706	4,7
5	400	0,147	24,0	10	55,5	10	0,611	4,1
6	300	0,225	27,6	10	55,4	10	0,631	4,2

Tabela referente à Fig. 16 (b): ajuste de pH com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> após clarificação em vapor de autoclave

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	500	0,386	23,7	-	0,0	-	-	0,0
0,333	500	0,260	20,5	10	19,4	40	0,408	4,2
0,667	500	0,207	19,9	10	26,8	40	0,651	8,1
1	500	0,218	24,8	10	26,5	40	0,863	12,8
2	400	0,182	24,2	10	36,7	40	1,135	24,4
3	400	0,153	25,0	10	48,9	40	0,472	12,8
4	400	0,150	24,5	10	53,2	10	0,608	4,1
5	400	0,146	23,9	10	51,9	10	0,600	4,0
6	300	0,217	26,6	10	52,0	10	0,599	4,0

Tabela referente à Fig. 17 (a): 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 34°C

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	300	0,644	23,7	-	0,0	-	-	0,0
0,5	300	0,519	28,0	10	25,8	20	0,681	9,2
1	300	0,425	30,2	10	35,9	50	0,770	26,0
1,5	200	0,354	31,3	10	44,3	100	0,456	30,8
2	200	0,430	30,2	10	47,6	100	0,708	47,9
2,5	200	0,363	29,7	10	49,7	100	0,751	50,8
3	200	0,398	32,6	10	56,3	100	0,642	43,4
4	200	0,422	34,5	10	68,9	20	0,787	10,6
5	200	0,423	34,6	10	69,4	20	0,399	5,4
6	200	0,417	34,1	10	70,5	20	0,384	5,2

Tabela referente à Fig. 17 (b): 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e  
0,1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 37°C

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	300	0,644	23,7	-	0,0	-	-	0,0
0,5	300	0,495	26,7	10	25,3	20	0,399	5,4
1	300	0,431	30,7	10	35,0	50	0,422	14,3
1,5	300	0,359	31,7	10	41,3	100	0,373	25,2
2	200	0,435	30,6	10	48,9	100	0,489	33,1
2,5	200	0,391	31,9	10	55,3	100	0,521	35,2
3	200	0,407	33,2	10	62,0	50	0,647	21,9
4	200	0,417	34,1	10	62,7	20	0,533	7,2
5	200	0,399	32,6	10	64,2	20	0,510	6,9
6	200	0,399	32,6	10	64,2	20	0,510	6,9

Tabela referente à Fig. 18 (a): 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e  
0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 34°C

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	500	0,387	23,7	-	0,0	-	-	0,0
0,5	300	0,509	27,5	10	25,4	20	0,581	7,8
1	300	0,440	31,3	10	36,3	50	0,570	19,3
1,5	300	0,351	31,0	10	42,9	100	0,329	22,2
2	200	0,445	31,3	10	48,8	100	0,543	36,7
2,5	200	0,88	31,8	10	53,6	100	0,551	37,3
3	200	0,403	33,0	10	61,8	100	0,492	33,3
4	200	0,417	34,1	10	66,9	20	0,637	8,6
5	200	0,417	34,1	10	68,2	20	0,507	6,8
6	200	0,417	34,1	10	68,2	20	0,501	6,8

Tabela referente à Fig. 18 (b): 1,0 g.L<sup>-1</sup> de DAP e  
0,1 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 37°C

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	g.L <sup>-1</sup>	Dil.	Abs.	g.L <sup>-1</sup>
0	300	0,644	23,7	-	0,0	-	-	0,0
0,5	300	0,409	26,4	10	24,1	20	0,397	5,4
1	300	0,425	30,3	10	34,2	50	0,422	14,3
1,5	300	0,341	30,1	10	39,9	100	0,388	26,2
2	200	0,435	30,6	10	48,1	100	0,497	33,6
2,5	200	0,381	31,2	10	55,2	100	0,531	35,9
3	200	0,397	32,4	10	61,6	50	0,665	22,5
4	200	0,392	32,1	10	61,9	20	0,553	7,5
5	200	0,389	31,8	10	63,6	20	0,535	7,2
6	200	0,389	31,8	10	63,6	20	0,534	7,2



Tabela referente à Fig. 19 (a): melão sem suplementação e  $X_0=15 \text{ g.L}^{-1}$ 

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	300	0,410	15,1	-	0,0	-	-	0,0
0,25	399	0,273	15,8	10	15,3	20	0,973	13,2
0,5	300	0,325	16,3	10	19,9	100	0,356	24,0
0,75	200	0,441	16,7	10	23,8	100	0,519	35,1
1	200	0,392	16,8	10	25,5	100	0,754	51,0
1,5	200	0,336	17,1	10	30,4	100	0,843	57,0
2	200	0,300	17,9	10	36,4	100	0,872	58,9
2,5	200	0,281	19,3	10	38,5	100	0,797	53,9
3	200	0,264	20,4	10	42,7	100	0,722	48,8
4	200	0,259	21,1	10	58,2	100	0,605	40,9
5	200	0,266	21,8	10	61,9	20	1,010	13,7
6	200	0,268	22,0	10	62,4	20	0,532	7,2
7	200	0,268	22,0	10	62,4	20	0,532	7,2

Tabela referente à Fig. 19 (b): melão suplementado e  $X_0=15 \text{ g.L}^{-1}$ 

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	300	0,410	15,1	-	0,0	-	-	0,0
0,25	399	0,320	15,7	10	17,0	20	0,785	10,6
0,5	300	0,426	16,0	10	22,6	100	0,316	21,3
0,75	200	0,378	16,1	10	26,7	100	0,449	30,3
1	200	0,334	16,2	10	29,3	100	0,690	46,7
1,5	200	0,305	17,0	10	34,4	100	0,732	49,5
2	200	0,279	18,2	10	38,8	100	0,708	47,8
2,5	200	0,259	19,2	10	43,5	100	0,763	51,6
3	200	0,263	21,5	10	48,0	100	0,758	51,3
4	200	0,275	22,5	10	59,7	100	0,509	34,4
5	200	0,279	22,8	10	67,7	20	0,665	9,0
6	200	0,282	23,1	10	70,6	20	0,480	6,5
7	200	0,282	23,1	10	70,4	20	0,480	6,5

Tabela referente à Fig. 20 (a): melação sem suplementação e  $X_0 = 23,7 \text{ g.L}^{-1}$ 

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	300	0,644	23,7	-	0,0	-	-	0,0
0,5	300	0,530	27,1	10	40,3	20	0,425	5,8
1	300	0,442	28,9	10	51,2	20	0,757	10,2
1,5	300	0,371	29,6	10	56,2	50	0,538	18,2
2	200	0,470	29,5	10	58,1	50	0,655	22,1
2,5	200	0,402	29,1	10	60,4	50	0,656	22,2
3	200	0,372	30,4	10	62,4	50	0,906	30,6
4	200	0,381	31,2	10	75,9	20	0,523	7,1
5	200	0,387	31,7	10	79,0	20	0,476	6,4
6	200	0,387	31,7	10	79,0	20	0,476	6,4

Tabela referente à Fig. 20 (b): melação suplementado e  $X_0 = 23,7 \text{ g.L}^{-1}$ 

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	300	0,644	23,7	-	0,0	-	-	0,0
0,5	300	0,518	26,5	10	43,2	20	0,583	7,9
1	300	0,434	28,4	10	53,6	50	0,241	8,2
1,5	300	0,392	31,3	10	59,2	100	0,226	15,2
2	200	0,496	31,1	10	62,8	100	0,274	18,5
2,5	200	0,447	32,3	10	66,0	100	0,367	24,8
3	200	0,391	32,0	10	67,7	100	0,420	28,4
4	200	0,392	32,1	10	76,4	50	0,136	4,6
5	200	0,390	31,9	10	80,9	20	0,326	4,4
6	200	0,390	31,9	10	80,9	20	0,326	4,4

Tabela referente à Fig. 21 (a): melação sem suplementação e  $X_0=29 \text{ g.L}^{-1}$ 

Tempo (h)	biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	300	0,790	29,1	-	0,0	-	-	0,0
0,25	300	0,668	30,3	10	6,4	100	0,252	17,0
0,5	300	0,618	31,8	10	8,4	100	0,396	26,8
0,75	300	0,586	34,5	10	18,3	100	0,404	27,3
1	300	0,524	34,7	10	26,6	100	0,385	26,0
1,5	300	0,454	35,2	10	34,2	100	0,472	31,9
2	200	0,582	35,3	10	44,1	100	0,461	31,2
2,5	200	0,508	35,4	10	50,3	100	0,523	35,3
3	200	0,458	36,1	10	55,5	100	0,524	35,4
4	200	0,443	36,3	10	70,9	20	0,800	10,8
5	200	0,445	36,4	10	72,2	20	0,384	5,2
6	200	0,445	36,4	10	72,2	20	0,384	5,2

Tabela referente à Fig. 21 (b): melação suplementado e  $X_0=29 \text{ g.L}^{-1}$ 

Tempo (h)	Biomassa			Etanol		ART		
	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	$\text{g.L}^{-1}$	Dil.	Abs.	$\text{g.L}^{-1}$
0	300	0,790	29,1	-	0,0	-	-	0,0
0,25	300	0,676	29,5	10	2,2	100	0,270	18,2
0,5	300	0,615	31,0	10	8,0	100	0,424	28,6
0,75	300	0,568	32,5	10	16,5	100	0,450	30,4
1	300	0,523	33,4	10	27,3	100	0,381	25,8
1,5	300	0,452	35,1	10	38,9	100	0,402	27,2
2	200	0,582	35,3	10	47,7	100	0,393	26,6
2,5	200	0,508	35,4	10	50,4	100	0,403	27,2
3	200	0,452	35,6	10	54,8	100	0,419	28,3
4	200	0,438	35,8	10	70,9	20	0,755	10,2
5	200	0,438	35,8	10	71,3	20	0,448	6,0
6	200	0,438	35,8	10	71,3	20	0,448	6,0