

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS CEPAS DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE CCT 1530 E CCT 1531
PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UNICELULARES A PARTIR
DE HIDROLISADO DE AMIDO DE MANDIOCA**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Co-orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

RITA DE CÁSSIA SIQUEIRA CURTO

FLORIANÓPOLIS, SETEMBRO DE 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS CEPAS DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE CCT 1530 E CCT 1531
PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UNICELULARES A PARTIR
DE HIDROLISADO DE AMIDO DE MANDIOCA**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Co-orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

RITA DE CÁSSIA SIQUEIRA CURTO

FLORIANÓPOLIS, SETEMBRO DE 1998

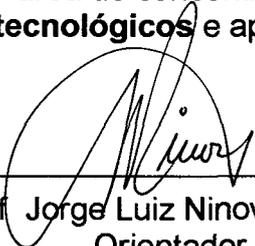
Termo de aprovação

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
CCT 1530 E CCT 1531 PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UNICELULARES A
PARTIR DE HIDROLISADO DE AMIDO DE MANDIOCA**

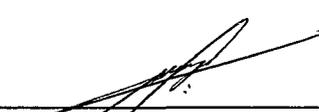
Por

Rita de Cássia Siqueira Curto

Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**,
área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e
Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação



Prof. Jorge Luiz Ninow, Dr. Eng.
Orientador.

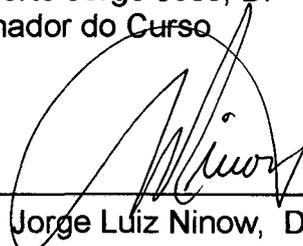


Prof. Agenor Furigo Júnior, Dr.
Co-orientador

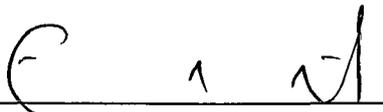


Prof. Humberto Jorge José, Dr.
Coordenador do Curso

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Jorge Luiz Ninow, Dr. Eng. (Presidente)



Profª. Edna Regina Amante, Dra.



Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr



Prof. Agenor Furigo Júnior, Dr.

AGRADECIMENTOS

Ao meu namorado, José Alexandre, pelo companheirismo, paciência, amizade, apoio, e, acima de tudo pelo seu amor.

Aos meus pais, Antonio e Bernadete, que com seu carinho, sempre tiveram uma palavra de estímulo e incentivo.

Aos meus irmãos Kleber e Guto pela força, atenção e por estarem sempre presentes nos momentos necessários.

Ao prof. Jorge Luiz Ninow, pela orientação e amizade demonstrada ao longo de anos de trabalho.

Ao prof. Agenor Furigo Jr., pela sua colaboração no decorrer da supervisão de meus trabalhos.

Aos meus amigos Denise, Marcinha, Rodrigo, Michaela, Júlio, etc., pela colaboração na execução deste trabalho, valeu a força.

Aos profs. Boris e Edna por aceitarem revisar este trabalho e participar da banca de defesa desta dissertação.

As profas. Gláucia e Gisela agradeço pela valiosa contribuição para a execução da parte experimental deste trabalho.

Aos profs. do curso de Pós-graduação da Engenharia Química e da Biotecnologia, pelo conhecimento transmitido.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, em especial ao Edivilson, secretário do CPGENQ, pelo atendimento e simpatia durante o convívio.

A todos os amigos que, embora não citados, foram importantes durante o trajeto percorrido.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E acima de tudo a Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xii
NOMENCLATURA	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
1 – MANDIOCA.....	04
2 – RESÍDUOS DE MANDIOCA.....	06
3 – AMIDO DE MANDIOCA PARA A OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA.....	10
4 – HIDRÓLISE DO AMIDO.....	12
5 – ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	12
5.1 – ENZIMA α -AMILASE.....	13
5.2 – ENZIMA AMILOGLICOSIDASE.....	14
5.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	16
6 – CULTURA DE CÉLULAS.....	17
6.1 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
6.1.1 – METABOLISMO DA GLICOSE.....	19
6.1.2 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO <i>S. cerevisiae</i>	20
6.2 – FORMAS DE CULTIVO EM BIORREACTORES.....	21
6.3 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	24
CAPÍTULO 2 - MATERIAL E MÉTODOS	28
1 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	28
2 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	29
2.1 – SUBSTRATO.....	29
2.2 – ENZIMAS.....	29
2.3 – TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.....	30
2.3.1 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE AMIDO LIQUEFEITO – SOLUÇÃO-	

MÃE.....	30
2.3.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – MÉTODO DAS VELOCIDADES INICIAIS.....	31
2.4 – TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE.....	32
3 – CULTURAS DE CÉLULAS.....	33
3.1 – MICRORGANISMOS.....	33
3.2 – MANUTENÇÃO DAS CULTURAS.....	33
3.3 – ENSAIOS FERMENTATIVOS EM “SHAKER”.....	34
3.4 – CULTURAS EM BATELADA SIMPLES.....	35
3.4.1 – PREPARO DO MEIO DE CULTIVO.....	36
3.4.1.1 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE GLICOSE DE MANDIOCA.....	36
3.4.1.2 – MEIOS DE CULTIVO.....	37
3.4.2 – PREPARO DO INÓCULO.....	37
3.4.3 – CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO.....	38
3.4.4 – METODOLOGIA DE CÁLCULO DO PROCESSO EM BATELADA SIMPLES.....	39
3.5 – CULTURA EM BATELADA ALIMENTADA (“FED-BATCH”).....	40
3.5.1 – ESTRATÉGIA DE ALIMENTAÇÃO.....	41
3.5.2 – METODOLOGIA PARA CÁLCULO DO PROCESSO EM BATELADA ALIMENTADA.....	41
4 – MÉTODOS ANALÍTICOS.....	42
4.1 – AMOSTRAGEM.....	42
4.2 – DETERMINAÇÃO DE GLICOSE.....	43
4.3 – DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA.....	43
4.4 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	44
4.5 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL.....	45
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
1 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	49
1.1 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA AMILOGLICOSIDASE – TESTE DAS VELOCIDADES INICIAIS.....	49
1.2 – TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA AMILOGLICOSIDASE.....	53
2 – CULTURA DE CÉLULAS EM “ SHAKER”.....	55
3 – CULTURAS DE CÉLULAS EM BIORREATOR.....	57
3.1 – CULTURA EM BATELADA SIMPLES.....	57

3.1.1 – ENSAIOS COM A CEPA CCT 1530.....	58
3.1.1.1 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO – CEPA CCT 1530.....	58
3.1.1.2 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE NITROGÊNIO – CEPA CCT 1530.....	63
3.1.1.3 – CULTURA DA CEPA CCT 1530 COM CONTROLE DE PH..	64
3.1.1.4 – ENSAIO COM MEIO COMPLEXO YM – CEPA CCT 1530..	66
3.1.2 – ENSAIOS COM A CEPA CCT 1531.....	68
3.1.2.1 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO.....	68
3.1.2.2 – ENSAIO COM MEIO YM – CEPA CCT 1531.....	71
3.1.3 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CULTURAS DAS CEPAS CCT 1530 E CCT 1531.....	73
3.2 – CULTURAS EM BATELADA ALIMENTADA.....	76
3.2.1 – “FED-BATCH” - CEPA CCT 1531.....	76
3.2.2 – “FED-BATCH” - CEPA CCT 1530.....	79
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXO I – RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	94
ANEXO II – RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ENSAIOS DE CULTURAS EM “SHAKER”	106
ANEXO III – RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ENSAIOS EM BATELADA SIMPLES.....	111
ANEXO IV – RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ENSAIOS EM BATELADA ALIMENTADA.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Mandioca pronta para o consumo.....	5
Figura 1.2 – Planta de mandioca.....	5
Figura 1.3 – Esquema do processo aberto para a obtenção do amido de mandioca.....	7
Figura 1.4 – Fórmula estrutural da unidade de glicose.....	10
Figura 1.5 – Representação esquemática da estrutura do amido com suas unidades estruturais, amilose e amilopectina.....	11
Figura 1.6 – Representação esquemática da ação da amiloglicosidase na molécula de amilopectina.....	15
Figura 1.7 – Direções que a glicose-6-fosfato pode tomar no metabolismo da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figura 2.1 – Plano de retirada de amostra para as culturas em “shaker”.....	35
Figura 2.2 – Esquema da hidrólise do amido.....	37
Figura 2.3 – Biorreator BIOFLO III, New Brunswick, e cromatógrafo CG 90 com microcomputador acoplado para integração das curvas cromatográficas..	38
Figura 2.4 – Exemplo de uma curva de calibração de etanol com concentrações entre 0,3 e 4,0 g/l.....	46
Figura 2.5 – Exemplo de uma curva de calibração de etanol com concentrações entre 0,1 e 1,5 g/l.....	47
Figura 2.6 – Apresentação de um cromatograma típico de análise de amostras com telas de aquisição de dados e de relatório.....	48
Figura 3.1 – Concentração de glicose formada (g/l) contra o tempo (min), com concentrações iniciais de amido liquefeito de 1,5; 3,0; 6,0 e 15,0 g/l.....	50
Figura 3.2 – Concentração de glicose formada (g/l) contra o tempo (min), com concentrações iniciais de amido liquefeito de 30,0; 60,0; 90,0 e 300,0 g/l.....	50
Figura 3.3 – Atividade específica (U/mg) em função da concentração inicial da solução de amido liquefeito para a enzima amiloglicosidase – pH 4,5 e temperatura de 55-57°C	53
Figura 3.4 – Formação de glicose (g/l) contra o tempo (min) para concentrações de 0,5 e 1,0 ml/l de enzima amiloglicosidase - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	54
Figura 3.5 – Concentração final de biomassa (g/l) para as diferentes concentrações de extrato de levedura e solução vitamínica.	56
Figura 3.6 – Fator de conversão de substrato em células (g/g) para as diferentes concentrações de extrato de levedura e solução vitamínica.....	56

Figura 3.7 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 5 g/l de glicose inicial.....	59
Figura 3.8 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 10 g/l de glicose inicial.....	60
Figura 3.9 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 15 g/l de glicose inicial.....	60
Figura 3.10 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra o tempo (h), para processo em batelada simples com 15 g/l de substrato inicial e 20 g/l de fonte de nitrogênio ((NH ₄) ₂ SO ₄).....	63
Figura 3.11 Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada em meio de WIN et al. (1996) modificado simples com 10 g/l de glicose inicial com controle de pH.....	65
Figura 3.12 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com meio YM contendo 10 g/l de substrato inicial.....	67
Figura 3.13 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 5 g/l de glicose inicial.....	69
Figura 3.14 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 10 g/l de glicose inicial.....	69
Figura 3.15 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 15 g/l de glicose inicial.....	70
Figura 3.16 – Cinética da cultura de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1531 em meio YM, com valores de concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 10 g/l de glicose inicial e pH controlado.....	72
Figura 3.17 – Fatores de conversão de glicose em célula (g/g) para as culturas de células de <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530 e CCT 1531.....	74
Figura 3.18 – Rendimento (%) das culturas com as cepas CCT 1530 e CCT	

1531 sobre o valor estimado de fator de conversão de glicose em célula $Y_{X/G}^{est}$ de 0,652 g/g.....	74
Figura 3.19 - Produtividade das culturas com as cepas CCT 1530 e CCT 1531 (g/l.h).....	75
Figura 3.20 – Cinética de crescimento em batelada alimentada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1531 em meio YM.....	77
Figura 3.21 – Variação do volume do reator (l) versus tempo (h) de processo batelada alimentada da cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1531 com meio YM.....	78
Figura 3.22 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1531 em batelada alimentada com meio YM.....	78
Figura 3.23 – Determinação do fator de conversão de glicose em célula (g/g) para cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1531 em processo batelada alimentada com meio YM.....	79
Figura 3.24 – Cinética de crescimento em batelada alimentada da cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado.....	80
Figura 3.25 - Variação do volume do reator (l) versus tempo (h) de processo batelada alimentada da cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado.....	80
Figura 3.26 – Determinação de velocidade específica máxima de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 em processo batelada alimentada com meio de WIN et al. (1996) modificado.....	81
Figura 3.27 – Determinação do fator de conversão de glicose em célula (g/g) para cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 em processo batelada alimentada com meio de WIN et al. (1996) modificado.....	82
Figura AI 1 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 1,5 g/l de amido liquefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	96
Figura AI 2 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 3,0 g/l de amido liquefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	97
Figura AI 3 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 6,0 g/l de amido liquefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	98
Figura AI 4 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 15,0 g/l de amido liquefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	99

Figura AI 5 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 30,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	100
Figura AI 6 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 60,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	101
Figura AI 7 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 90,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	102
Figura AI 8 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 150,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	103
Figura AI 9 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 300,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	104
Figura AI 10 – Determinação da atividade (U) da amiloglicosidase nos experimentos 1 e 2, sobre uma concentração de 300,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.....	105
Figura AII 1 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) com solução vimamínica – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente....	108
Figura AII 2 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 0,5 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.....	108
Figura AII 3 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 1,0 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.....	109
Figura AII 4 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 2,0 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) Demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.....	109
Figura AII 5 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 3,0 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.....	110
Figura AII 6 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 4,0 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b)	

demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.....	110
Figura AIII 1 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1530, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 5 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	123
Figura AIII 2 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1530, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	123
Figura AIII 3 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1530, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 15 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	124
Figura AIII 4 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1530, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 15 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca suplementado com 20 g/l de sulfato de amônia.....	125
Figura AIII 5 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1530, em meio YM com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	125
Figura AIII 6 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1531, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 5 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	126
Figura AIII 7 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1531, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	127
Figura AIII 8 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1531, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 15 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	128
Figura AIII 9 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1531, em meio YM com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	129
Figura AIII 10 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT1531, em meio de YM com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição da água residual da Fleishmann-Royal (Conchal – SP).....	08
Tabela 1.2 – Carga poluidora de líquido residual em termos de equivalente populacional para atividade de produção de fécula de farinha no estado de Santa Catarina.....	09
Tabela 1.3 – Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos por diversos autores em processos tipo batelada.....	23
Tabela 1.4 – Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos por diversos autores em processos tipo batelada alimentada.....	24
Tabela 1.5 – Composição de aminoácidos de leveduras e outros alimentos proteicos.....	26
Tabela 2.1 – Equações das curvas de calibração linearizadas para as diferentes condições de cultivo.....	45
Tabela 3.1 – Velocidade inicial da reação da enzima amiloglicosidase em função da concentração de substrato, pH 4,5 e temperatura de 55-57° C.....	51
Tabela 3.2 – Parâmetros cinéticos determinados nos ensaios em batelada simples com a cepa CCT 1530, para o estudo da influência da concentração inicial de substrato.....	62
Tabela 3.3 – Parâmetros cinéticos determinados nos ensaios em batelada simples com a cepa 1530, para o estudo da influência da concentração de nitrogênio.....	64
Tabela 3.4 – Parâmetros cinéticos determinados nos ensaios em batelada simples com a cepa CCT 1530 com controle de pH.....	66
Tabela 3.5 – Parâmetros cinéticos determinados nos ensaios em batelada simples com a cepa CCT 1530 sobre meio YM.....	67
Tabela 3.6 – Parâmetros cinéticos determinados nas culturas em batelada simples com a cepa CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, para o estudo da influência da concentração inicial substrato.....	71
Tabela 3.7 – Parâmetros cinéticos determinados no ensaio em batelada simples com a cepa CCT 1531 em meio YM e pH controlado.....	72
Tabela AI 1 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 1,5 g/l de amido liqüefeito.....	96
Tabela AI 2 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 3,0 g/l de amido liqüefeito.....	97
Tabela AI 3 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 6,0 g/l de amido liqüefeito.....	98
Tabela AI 4 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial	

de substrato de 15,0 g/l de amido liqüefeito.....	99
Tabela AI 5 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 30,0 g/l de amido liqüefeito.....	100
Tabela AI 6 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 60,0 g/l de amido liqüefeito.....	101
Tabela AI 7 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 90,0 g/l de amido liqüefeito.....	102
Tabela AI 8 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 150,0 g/l de amido liqüefeito.....	103
Tabela AI 9 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 300,0 g/l de amido liqüefeito.....	104
Tabela AI 10 – Dados de concentrações de glicose em g/l e μmol formadas durante as hidrólises realizadas às concentrações de 1 ml AMG/ l de amido liqüefeito (experimento 1) e a 0,5 ml AMG/ l de amido liqüefeito (experimento 2).....	105
Tabela AIII 1 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 5 g/l de glicose inicial.....	113
Tabela AIII 2 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 10 g/l de glicose inicial.....	114
Tabela AIII 3 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 15 g/l de glicose inicial.....	115
Tabela AIII 4 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 15 g/l de glicose inicial e 20 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	116
Tabela AIII 5 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 10 g/l de glicose inicial e pH controlado.....	117
Tabela AIII 6 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em meio YM e 10 g/l de glicose inicial.....	118
Tabela AIII 7 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1531 em 5 g/l de glicose inicial.....	119
Tabela AIII 8 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1531 em 10 g/l de glicose inicial.....	120
Tabela AIII 9 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1531 em 15 g/l de glicose inicial.....	121
Tabela AIII 10 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1531 em meio YM com 10 g/l de glicose PA inicial e pH controlado.....	122
Tabela AIV 1 - Dados do processo de batelada e batelada alimentada para cultura e células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1531 em meio YM.....	132
Tabela AIV 2 - Dados do processo de batelada e batelada alimentada para cultura e células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado.....	133

NOMENCLATURA

A – atividade da enzima amiloglicosidase [U/ml];

A_e – atividade específica da enzima amiloglicosidase [U/mg];

ABS_p – absorvância da solução de proteína;

ETOH_t – concentração de etanol a partir do tempo em que inicia o consumo de etanol pela célula [g/l];

G – concentração de glicose [g/l];

G_{AL} – concentração de glicose na solução de alimentação [g/l];

G_t – concentração de glicose no tempo t [g/l];

G₄ – polissacarídeo composto de 4 unidades de glicose;

G₅ – polissacarídeo composto de 5 unidades de glicose;

[P] – concentração de proteína [g/l];

PA – para análise;

PM – peso molecular [mg/μmol];

P_x – produtividade em célula [g/l.h];

r – coeficiente de correlação da reta;

t – tempo [h, min];

t_{máx} – tempo em que a concentração de célula é máxima;

U – unidade de amiloglicosidase [μmol glicose/min];

UA – unidade de área do cromatograma;

V_{AL} – volume de solução de glicose alimentado [l];

V_e – volume de enzima utilizada [ml];

v_p – velocidade de formação de produto [μmol glicose/min];

V_r – volume da reação enzimática no tempo considerado [ml];

V_{Rt} – volume total do meio reacional no tempo t [l];

X_{máx} – concentração máxima de células [g/l];

X_t – concentração de célula no tempo t [g/l];

$X_{t\text{ETOH}}$ – concentração de célula à partir do tempo em que se inicia o consumo de etanol [g/l];

$Y_{X/G}$ – fator de conversão de glicose em células [g/g];

$Y_{X/ETOH}$ – fator de conversão de etanol em células [g/g];

$\mu_{X/G}$ – velocidade máxima específica de crescimento de células sobre glicose [h⁻¹];

$\mu_{X/ETOH}$ – velocidade máxima específica de crescimento de células sobre etanol [h⁻¹];

RESUMO

A utilização de proteínas unicelulares como substituto parcial do farelo de soja em rações de animais vem sendo testada com sucesso por vários pesquisadores. Com o objetivo de utilização futura do amido contido em resíduos de fecularias, foram realizados experimentos usando amido de mandioca comercial (polvilho doce). A escolha do amido de mandioca deve-se ao fato de ser esta uma planta largamente cultivada e também à grande quantidade de pequenas e médias indústrias de farinha e fécula desse tubérculo no país, especialmente na região Sul. Para ser utilizado como substrato de cultura de *Saccharomyces cerevisiae* o amido (300 g/l) foi liquefeito com uma enzima α -amilase (EC 3.2.1.1) termoestável em presença de 70 ppm de Ca^{2+} , a 80-90°C e pH de 6,5. A solução de amido liquefeito foi sacarificado com amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) à 55-57°C e pH de 4,5. O tempo de hidrólise era de 3,5 horas aproximadamente, obtendo-se nesse período uma concentração de glicose em torno de 215 g/l. Um estudo comparativo entre as cepas CCT 1530 e CCT 1531 foi realizado, com o levantamento de parâmetros cinéticos sob várias condições de cultivo. As leveduras foram cultivadas em batelada simples, variando-se a concentração inicial de glicose de amido de mandioca hidrolisado (5, 10 e 15 g/l) para a verificação deste parâmetro na cinética de crescimento do microrganismo. Foram testadas também, a influência do meio de cultivo, do pH e da concentração de nitrogênio no meio. Das três concentrações de glicose testadas, a de 10 g/l foi a que apresentou melhores resultados. A velocidade específica de crescimento sobre a glicose ($0,48 \text{ h}^{-1}$) e a produtividade ($0,27 \text{ g/l.h}$) foram 15,2 e 9,4 % maiores para a cepa CCT 1530, respectivamente. Os valores dos fatores de conversão de células sobre glicose ($Y_{X/G}$) obtidos foram de 0,44 g/g para a cepa CCT 1530 e de 0,16 g/g para a cepa CCT 1531. Em termos de concentração final de células a cepa CCT 1531 apresentou melhor resultado com 6,15 g/l contra 5,5 apresentado pela cepa CCT 1530. Culturas em batelada alimentada foram realizadas visando-se a maximização da produção de célula pela minimização de efeitos inibitórios por parte do substrato. O controle da alimentação se deu através do monitoramento do etanol produzido pela levedura, de forma que a concentração

deste metabólito não ultrapassasse a concentração crítica de 0,5 g/l, acima do qual começa a haver inibição pelo produto. Como resultados, encontramos fatores de conversão de glicose em célula de 0,5 g/g para a cepa CCT 1531 cultivada em meio complexo YM e de 0,33 g/g para a cepa CCT 1530 cultivada em meio de sais.

ABSTRACT

The use of unicellular proteins as a partial substitute for soy bran in animal food, has been tested successfully by several researchers. Several experiments were conducted using cassava commercial starch aiming to discover whether the results provided by de experiments allows for future use of starch contained in starch industry wastewater in order to produce biomass. Cassava starch was the element chosen for the experiments due to several reasons: first, it is widely cultivated; second, because it is produced by a large number of small and medium flour industries and finally, because cassava is largely cultivated in the South region of Brazil. In order to be used as substrate of culture of *Saccharomyces cerevisiae* the starch (300 g/l) was liquefied with an enzyme α -amylase (EC 3.2.1.1) thermostable in presence of 70 ppm of Ca^{2+} , to 80-90°C and pH of 6,5. The solution of liquefied starch was saccharified with amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) to 55-57°C and pH of 4,5. The time of hidolyse was approximately 3,5 hours, resulting from this period a glucose concentration around 215 g/l. A comparative study between the strains CCT 1530 and CCT 1531 and a survey of kinetic parameters were developed under several cultivation conditions. The yeasts were cultivated in batch process, by varying the initial concentration of glucose syrup of cassava starch (5, 10 and 15 g/l) in order to verify the influence of this parameter in the kinetics of the microorganism growth. In the batch process, several other factors were also tested such as the influence of the means of cultivation, the influence of pH and the influence of nitrogen concentration in the means of cultivation. From the three glucose concentration tested, the 10 g/l was the one that presented better results. The maximum specific

growth rate on the glucose ($0,48 \text{ h}^{-1}$) and the cell productivity ($0,27 \text{ g/l.h}$) were 15,2 and 9,4% larger than the strain CCT 1530, respectively. The values of the cell yield coefficient ($Y_{X/G}$) obtained were of 0,44 g cell/g glucose for the strain CCT 1530 and of 0,16 g cell/g glucose for the strain CCT 1531. In terms of the final concentration of cells, the strain CCT 1531 presented better result with 6,15 g/l against 5,5 g/l presented by the strain CCT 1530. Cultures in fed batch were developed aiming at the maximization the cell production through the minimization of inhibitories effects caused by the substrate. The control of the feeding was conducted by the monitoring of the ethanol produced by the yeast, in a way such that the concentration of this metabolit was controlled in order not to surpass the critical concentration of 0,5 g/l, above which it shows inibition for the product. As a result, it was found a cell yield coefficient of 0,5 g cell/g glucose for the strain CCT 1531 cultivated in complex media YM and of 0,33 g cell/g glucose for the strain CCT 1530 cultivated in media of salts.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A mandioca é uma planta originária da América do Sul e largamente cultivada em solos brasileiros. O estado de Santa Catarina se enquadra entre os principais produtores do país.

O maior interesse por este tubérculo vem da indústria feculeira com a extração da fécula destinada a diversos fins, entre eles a preparação de amido industrial, xaropes de glicose, produção de gomas, etc., uma vez que a planta tem em sua raiz uma reserva energética, que contém cerca de 40% de amido em sua constituição.

O processamento da mandioca demanda grande volume de água com conseqüente geração de resíduos líquidos (3,68 m³/tonelada de raiz), contendo quantidades apreciáveis de carbono orgânico na forma de amido e outros açúcares de cadeias menores, bem como proteínas e ácido cianídrico, constituindo-se num sério problema ambiental.

Quando este efluente não é descartado diretamente nos mananciais, seu tratamento tem um custo elevado para o empresariado. Por isto, uma solução atraente é buscar utilizações viáveis e econômicas para os inevitáveis resíduos gerados, de forma que o efluente deixe de ser rejeito para ser subproduto, ou seja, se tornar matéria-prima para um novo processo.

O resíduo amiláceo proveniente de fecularias pode ser aproveitado como fonte de carbono para a produção de biomassa de alto valor protéico ("Single Cell Protein" - SCP), para incorporação em ração de animais como substituto parcial do farelo de soja, ou até mesmo produção de leveduras para panificação e outros fins. Como os processos fermentativos com materiais crus são pouco produtivos e levam a um produto de baixa qualidade, uma alternativa é o cultivo submerso onde pode se ter uma prévia conversão do amido em glicose, substrato assimilável por uma gama de microrganismos.

A hidrólise do amido com uso de enzimas amilolíticas (α -amilase e amiloglicosidase) reduz o amido em seus constituintes básicos, glicose e maltoligossacarídeos, facilmente transportados através da membrana celular e metabolizados pelas leveduras.

Este trabalho tem como objetivo central o estudo cinético do crescimento em batelada simples e alimentada de duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, CCT 1530 e CCT 1531, utilizando amido de fécula de mandioca hidrolisado para a produção de biomassa.

Para tanto, a fim de chegar ao aproveitamento do resíduo de fecularias, em uma primeira etapa, foram realizados estudos com hidrólise enzimática do amido de mandioca comercial, para a posterior utilização da solução de glicose obtida como substrato carbonado para o cultivo das duas cepas de *S. cerevisiae*.

Um estudo de meio foi realizado com ensaios de culturas de células em "shaker" a fim de verificar a viabilidade de substituição da solução de vitamina por extrato de levedura do meio proposto por WIN et al. (1996), fazendo-se ensaios com diferentes concentrações de extrato de levedura.

Um comparativo entre as duas cepas foi realizado, com levantamento de parâmetros cinéticos sob várias condições de cultivo. As leveduras foram cultivadas em batelada simples (biorreator), variando-se a concentração de substrato inicial para a verificação deste parâmetro na cinética de crescimento do microrganismo. Foram testadas também a influência do meio de cultivo, do pH e da concentração de nitrogênio no meio.

Em uma última etapa, visando-se a maximização da produção de células pelo controle da concentração de glicose no meio e minimização do efeito Crabtree do metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*, foram realizados cultivos em batelada alimentada, utilizando-se o etanol, metabólito deste tipo de fermentação, como variável de controle.

No Capítulo 1 deste trabalho, foi realizada uma revisão bibliográfica pertinente ao assunto, onde estão apresentados tópicos contendo descrições sobre mandioca e seus resíduos gerados pelas indústrias feculeiras, bem como sobre o amido e as enzimas utilizadas para sua hidrólise. Na sequência tem-se mencionado referências sobre *Saccharomyces cerevisiae*, seu metabolismo e dados de parâmetros cinéticos de crescimento levantados por diversos pesquisadores com processos em batelada e batelada alimentada.

A metodologia e os equipamentos usados para a realização dos experimentos, assim como as leveduras e os meios de cultura selecionados para o cultivo, estão descritos no Capítulo 2 – Material e Métodos. Neste capítulo estão relacionados ainda, as técnicas analíticas utilizadas para a obtenção das

concentrações de célula, glicose e etanol, que permitiram o estabelecimento das cinéticas de crescimento e determinação dos parâmetros cinéticos dos processos.

O Capítulo 3 apresenta e discute os resultados dos ensaios realizados com a enzima amiloglicosidase, com as culturas em “shaker”, com as culturas das cepas CCT 1530 e CCT 1531 em batelada simples e com os processo em batelada alimentada. Os dados experimentais estão apresentados nos anexos no final do trabalho.

As conclusões finais do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros estão descritas no Capítulo 4.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – MANDIOCA

A mandioca é uma planta nativa da América do Sul cultivada entre os trópicos e menos intensamente nos subtropicais, normalmente em locais de clima quente e úmido. É um arbusto perene de aproximadamente 2 m de altura. A planta de cultivo tem um tempo médio de crescimento de 1 ano e sua época de colheita se situa entre março e setembro.

A cultura agrícola de mandioca é amplamente difundida por todo território nacional, por constituir a base alimentar de uma parte considerável da população e por apresentar bons rendimentos agrícolas, mesmo em solos esgotados (3 a 5 ton/ha em cultivo intenso, CANNIATTI-BRAZACA et al., 1994). A dimensão do cultivo é variada indo das plantações de fundo de quintal, até as extensivas, mais comuns no sul do país (CEREDA, 1994).

O local de reserva energética da planta é a raiz com cerca de 25 – 40% de amido (O'HAIR, 1998). A partir do tubérculo são obtidos farinhas, geralmente direcionadas ao uso doméstico e amido com finalidades diversas como culinária, produção de gomas, bases para a indústria de colas, etc..

A Figura 1.1 ilustra a raiz de mandioca pronta para uso e na Figura 1.2 pode-se ver a planta de mandioca sendo retirada do solo no momento da colheita.

Dados do Instituto CEPA, 1995, demonstram que em 1994 foi colhida uma área de 15.819.000 ha de mandioca no mundo. O Mercosul contribuiu com 2.027.000 ha, sendo a área 1.849.257 ha de mandioca colhidos no Brasil. A região Sul colheu uma área referente a 325.882 ha perfazendo 17,6% da área de mandioca colhida no Brasil naquele ano.

Em toneladas o Brasil colheu 24.009.000, se enquadrando entre os primeiros produtores dessa raiz. Entre os estados brasileiros, Santa Catarina foi a sétima

produtora em 1994, com 937.735 toneladas/ano, apresentando um rendimento de 17.615 kg/ha, considerado bom.



Figura 1.1 - Mandioca pronta para o consumo.



Figura 1.2 - Planta de mandioca sendo colhida.

As fecularias e farinheiras do Brasil, de um modo geral, utilizam como matéria-prima a mandioca brava ou amarga (*manihot esculenta*), o que faz do Brasil o maior produtor dessa espécie (TELES, 1987; ANDRADE e LIMA, 1989).

2 – RESÍDUOS DE MANDIOCA

A utilização da mandioca pode ser direta, através de preparações culinárias, ou industrializada, a qual se dá primeiramente na forma de fécula ou farinha. A primeira forma não gera resíduos significativos; já a utilização industrial causa sérios problemas ambientais, pois, mesmo as pequenas unidades fabris, como as casas de farinhas, produzem quantidades razoáveis de rejeitos lançados em mananciais.

As farinheiras e fecularias no país, estão geralmente, localizadas de forma concentrada devido às características edafoclimáticas, agravando o problema de poluição nessas regiões.

Os resíduos da mandioca são partes constituintes da própria planta, gerados em função do processo tecnológico adotado. Considerando os principais tipos de processamento de raízes de mandioca no Brasil, como a fabricação de farinha e extração da fécula, os resíduos podem ser sólidos ou líquidos.

Alguns dos resíduos sólidos são a casca marrom, entrecasca, descartes, crueira, fibra, bagaço e varredura, que podem ser incorporados na ração animal, ou utilizados como adubo, ou ainda, como substratos para fermentações sólidas.

Entre os resíduos líquidos, cita-se a manipueira, que se trata da água de constituição da raiz, extraída da prensagem da massa ralada (Figura 1.3) durante a confecção de farinha (CEREDA, 1996). Em Tupi-guarani, manipueira significa “o que brota da mandioca”.

Na extração da fécula é usada água para lavagem e purificação, a qual dilui a manipueira diluindo a carga orgânica e o teor de cianeto, constituinte dos glicocianetos presentes na mandioca, mas aumentando enormemente o volume. Segundo CEREDA (1994), são gerados, em média, 3,68 m³ de água de extração de fécula por tonelada de raiz.

A água de lavagem de raízes, também considerada como resíduo líquido, carrega uma suspensão de terra e cascas que podem ser separadas por peneiragem e decantação. Uma vez separados os sólidos, esta água contém baixo teor de matéria orgânica, podendo ser descartada sem problemas (CEREDA, 1994).

A Figura 1.3 apresenta um fluxograma ilustrativo da produção de amido de mandioca.

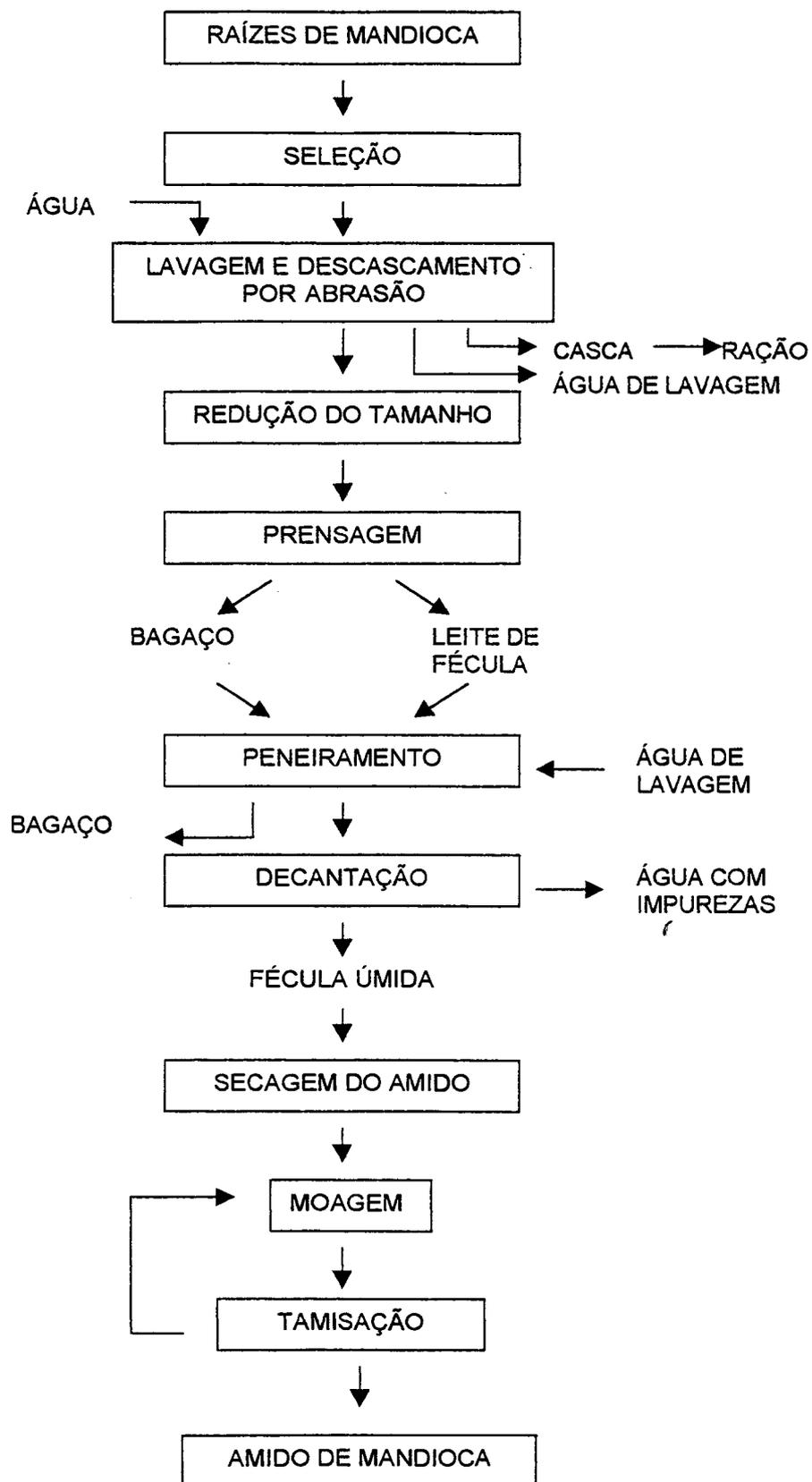


Figura 1.3 – Esquema do processo de obtenção do amido de mandioca (ANDRADE e LIMA, 1989).

A composição da manipueira é variável, principalmente no que diz respeito ao teor de cianeto (característica do cultivar) e da carga orgânica (MENEZES, 1994), dependendo do processo industrial. A manipueira se caracteriza por conter a maioria das substâncias solúveis e algumas em suspensão. Contém apreciável percentagem de amido (9,42% para farinheira e 6,12% para fecularia – CEREDA, 1996), parte sedimentável e parte em suspensão coloidal, bem como glicose (HESS, 1962). A análise dos carboidratos solúveis apontam a presença de glicose e maltose e muitas vezes apenas glicose, entre 40 e 45 g/l (CEREDA, 1996). Praticamente a totalidade do glicosídeo cianogênico (Iotraustalina e linamarina) existente na massa de raiz desintegrada é carregado por este resíduo. O teor de cianeto potencial total fica ao redor de 364 mg/l, com 50% de cianeto livre (CEREDA, 1996).

O teor de minerais é elevado, predominando o fósforo (CEREDA, 1996), e a concentração de nitrogênio é suficiente para manter a vida de microrganismos (HESS, 1962), o que faz da manipueira um substrato atraente e barato para a produção de biomassa. A Tabela 1.1 apresenta a composição das águas residuais do processamento de mandioca.

Tabela 1.1 – Composição da água residual da Fleishmann-Royal (Conchal-SP).

Análises	mínimo	máximo
pH	3,8	5,2
DQO* (mg/l)	6.280	51.200
DBO* *(mg/l)	1.400	34.300
Sólidos totais (mg/l)	5.800	56.460
Sólidos solúveis (mg/l)	4.900	20.460
Sólidos em suspensão (mg/l)	950	16.000
Sólidos fixos (mg/l)	1.800	20.460
Matéria orgânica (mg/l)	1.500	30.000
Açúcares redutores (mg/l)	2.800	8.200
Fosfatos totais (mg/l)	155	598
Nitrogênio total (mg/l)	140	1.150
Teor de cinza (mg/l)	350	800
Sólidos sedimentáveis (mg/l)	11	33
Teor de HCN (mg/l)	22	27

* Demanda Bioquímica de Oxigênio

** Demanda Química de Oxigênio

Fonte: LAMO e MENEZES, 1979.

Muitos autores apontam as agroindústrias de alimentos como grandes poluidoras, devido às elevadas vazões com que geram os resíduos, avaliadas pela

carga orgânica, mensurada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) ou Demanda Química de Oxigênio (DQO). A poluição causada pode ser equivalente a uma cidade de médio porte (150.000 a 200.000 habitantes) dependendo do tamanho da indústria, que é extremamente variável (FERNADES Jr. e TAKAHASHI, 1994). A Tabela 1.2 mostra a carga poluidora de líquido residual em termos de equivalente populacional para fecularias do Estado de Santa Catarina.

Tabela 1.2 – Carga poluidora de líquido residual em termos de equivalente populacional para atividade de produção de fécula e farinha no Estado de Santa Catarina.

Atividade	Matéria-prima t/dia	Equivalente Populacional (1 EP=0,54 Kg DBO/dia)	
		EP/t	EP
Fecularia de mandioca	2.935,1	460	1.350.146
Engenho de farinha	502,9	200	100.580
Amidonaria de milho	150,0	900	135.000
Fecularia de araruta/batata	16,6	200	3.320

* FATMA: Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente de Santa Catarina
Fonte: FERNADES Jr. e TAKAHASHI, 1994.

De forma geral a manipueira constitui um problema para o empresário, que de certa forma, tem que oferecer um destino final adequado, sendo fator agravante a poluição causada ao meio ambiente. Normalmente o que se vem utilizando é o depósito por tempo indeterminado em valas de deposição (FERNANDES e TAKAHASHI, 1994), as quais geralmente não atendem à vazão com que a manipueira é gerada, e novamente o excesso tem como destino rios e córregos. Neste caso a redução da carga orgânica é praticamente nula. Contudo, o fato de apenas tratar o resíduo para o descarte tem um custo elevado em relação ao custo de produção de farinha e fécula (polvilho doce e azedo) de mandioca.

Como opção de aproveitamento de resíduos líquidos de indústrias processadoras de mandioca tem-se o uso da bioconversão, onde através de processos fermentativos pode-se obter proteínas microbianas e outros compostos

que podem ser utilizados como matéria-prima para outras indústrias e assim tornar o resíduo uma fonte de lucro e resolver o problema ambiental que vêm causando.

Vários pesquisadores têm se interessado pela manipueira como substrato para a produção de biomassa protéica (MENEZES et al., 1972; NINOW et al., 1994; LAMO e MENEZES, 1979; SALES e MENEZES, 1976; JAMUNA e RAMAKRISHNA, 1989; BALAGOPAL et al., 1977; MANILAL et al., 1991; NOPARATNARAPORN et al., 1987; WIN et al., 1996) para produção de levedura de panificação (EJIOFOR et al., 1996) e para produção de compostos secundários como etanol, enzimas, etc. (LALUCE et al., 1988; ATTHASAMPUNNA, 1987; LIU e LIANG, 1983).

3. AMIDO DE MANDIOCA PARA A OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA

Por se constituir em uma das fontes mais abundantes de polímeros de glicose na natureza, o amido se apresenta como uma excelente fonte energética. Contudo para se tornar assimilável por *S. cerevisiae*, se faz necessário uma hidrólise prévia para a obtenção de uma solução de glicose disponível para o metabolismo da levedura.

Quimicamente é um carboidrato composto de carbono, hidrogênio e oxigênio na razão de 6:10:5 ($C_6H_{10}O_5$), podendo ser considerado como um polímero de condensação de glicose (homopolímero), constituindo-se de unidades de anidroglicose ligadas entre si por meio de ligações glicosídicas dos carbonos C_1 de uma molécula e o carbono C_4 da outra (Figura 1.4).

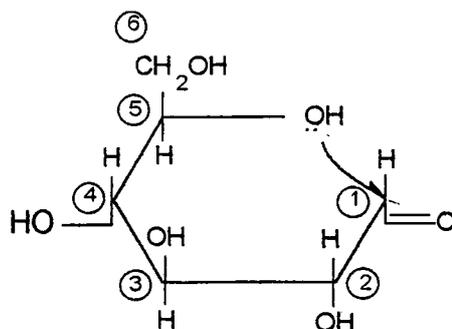


Figura 1.4 – Fórmula estrutural da unidade de glicose.

A unidade de glicose terminal da cadeia polimérica tem um grupo aldeído latente, e este é conhecido como grupo redutor ou extremidade redutora do amido (ZANIN, 1989).

O amido possui em sua constituição dois polissacarídeos; a amilose, polímero linear contendo de 200 a 6.000 unidades de glicose ligadas entre si por ligações α - 1,4, e amilopectina, molécula ramificada formada por 20-30 unidades de glicose ligadas entre si por ligações α - 1,4, unidas à cadeia de amilose por meio de ligações α - 1,6 (Figura 1.5). O comprimento médio da cadeia externa de amilopectina, antes da ramificação é de aproximadamente 12 unidades de glicose (ZANIN, 1989).

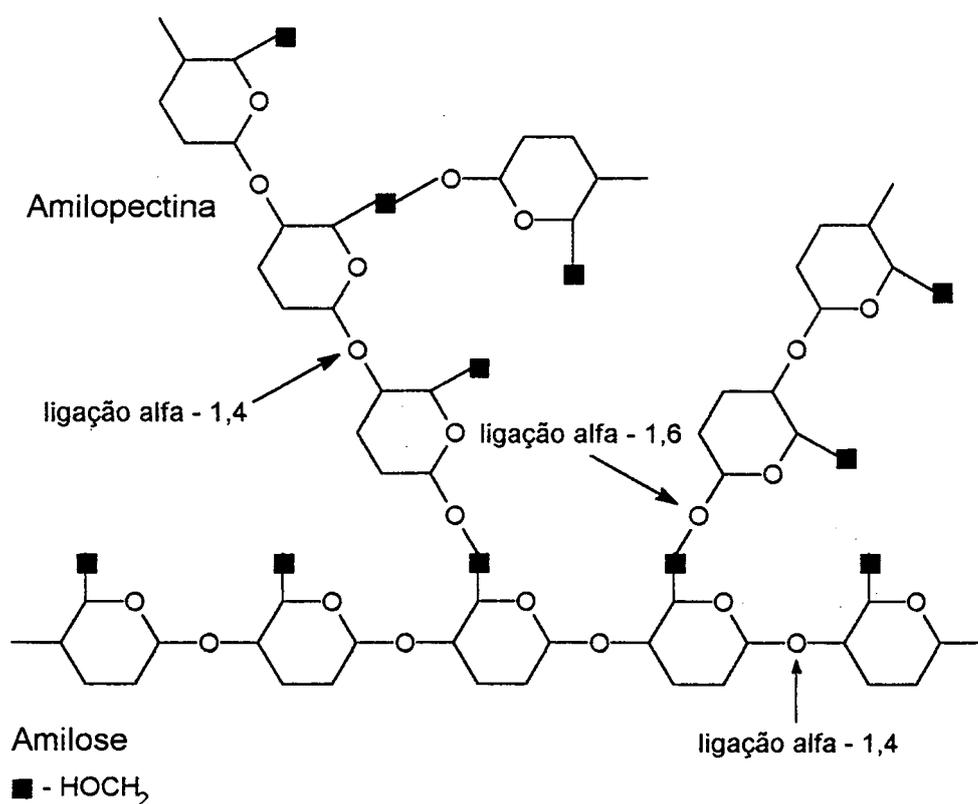


Figura 1.5 – Representação esquemática da estrutura do amido com suas unidades estruturais, amilose e amilopectina.

O peso molecular, estrutura e relativa abundância das duas frações, amilose e amilopectina, causam diferenças morfológicas e reológicas no amido, propriedade do amido de cada variedade botânica (HOWLING, 1989).

Os teores de amilose e amilopectina variam de acordo com a origem do amido. No caso da mandioca, a ocorrência é de 17% (p/p) de amilose e 83% (p/p) de amilopectina (ZANIN, 1989; EJOIFOR et al., 1996).

Existem regiões do grânulo de amido onde há alinhamentos paralelos de segmentos lineares da molécula e formação de pontes de hidrogênio entre os grupos OH. Essas pontes de hidrogênio são as responsáveis pela insolubilidade do amido em água fria, o que possibilita uma tecnologia simples para a fabricação da fécula de mandioca.

4 – HIDRÓLISE DO AMIDO

A hidrólise do amido pode ser conduzida por via ácida ou enzimática.

Para a hidrólise ácida são usados ácidos minerais a quente, podendo haver formação de fases intermediárias, dextrinas e maltose, até ocorrer a hidrólise à glicose.

Apesar do processo ácido ter menor tempo de sacarificação, apresenta desvantagens com problemas de corrosão dos equipamentos, provoca certa destruição dos açúcares e gera açúcares não fermentecíveis, o que contribui para um baixo rendimento (MACCARI Jr., 1997).

Na hidrólise enzimática são usadas enzimas denominadas amilases. O processo é subdividido em duas etapas: liquefação e sacarificação. Maiores detalhes serão comentados posteriormente.

Em ambos os processos se obtém como produto glicose e maltoligossacarídeos (maltose e isomaltose), os quais são facilmente transportados através da membrana da célula e metabolizados por leveduras (EJOIFOR, 1996).

5 – ENZIMAS AMIOLÍTICAS

Enzimas são catalisadores biológicos formados por proteínas que participam das reações metabólicas de todos os organismos vivos. Atuam diminuindo a energia

de ativação da reação sob condições suaves de pressão e temperatura (LEHNINGER, NELSON e COX, 1995).

Devido à sua natureza protéica e sua conformação tridimensional as enzimas apresentam uma altíssima especificidade ao substrato, característica que elimina a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo, desta forma, os custos de separação dos produtos e resolvendo o problema de tratamento de efluentes.

No processo de degradação completa do amido, obtendo-se como produto D-glicose, a hidrólise deve ocorrer em duas etapas: primeiro a liquefação do amido, utilizando-se a enzima α -amilase, e a segunda com a produção de glicose, a qual se dá com a enzima amiloglicosidase. Ambas pertencem ao grupo das hidrolases glicosídicas.

5.1 – ENZIMA α -AMILASE

A enzima α -amilase é uma endoenzima responsável pela hidrólise dos encadeamentos 1,4- α -glicosídeos em amilose e amilopectina, com ação essencialmente casual (REED, 1975; HOWLING, 1989), decompondo o amido em dextrinas e oligossacarídeos solúveis – açúcares redutores (NOVO, 1996) e tornando o substrato mais susceptível à enzima subsequente.

Liquefação é o termo usado para descrever a dispersão das moléculas de amido em solução aquosa, seguida de uma hidrólise parcial.

A ação da α -amilase na porção amilose do amido procede em duas etapas. Inicialmente, uma completa e rápida degradação da amilose até maltose e maltotriose, sendo o resultado de um ataque casual sobre o substrato pela enzima. O resultado dessa quebra é uma rápida diminuição da viscosidade. O segundo estágio é muito mais lento que o primeiro, envolvendo uma lenta hidrólise dos oligossacarídeos com a formação de maltose e pouca glicose (REED, 1975).

A α -amilólise de amilopectina rende pouca glicose, maltose e uma série de α -dextrinas limites, oligossacarídeos de 4 ou mais glicoses residuais, todas contendo ligações α -1,6. Em particular a α -amilase proveniente de *Bacillus licheniformis* tende a produzir dextrinas limites com 5 unidades de glicose (HOWLING, 1989).

O fato de a segunda etapa da α -amilólise ser mais lenta é explicado por ZANIN (1989) com a observação do aumento contínuo de K_m (constante de Michaelis-Menten) com a diminuição da cadeia e da diminuição de $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima de formação de glicose) a partir de um substrato de 8 unidades de glicose unidas. Conclui-se que o sítio catalítico é composto por 8 subsítios, sendo que o ponto de clivagem situa-se entre o sexto e o sétimo subsítio, e desta forma, os substratos que não são suficientemente longos não conseguem preencher todos os subsítios de alta energia de ligação.

A temperatura de liquefação do amido deve ser mantida suficientemente alta de forma a prevenir a retrogradação, processo físico-químico que ocorre nas dispersões de amido, onde há uma reassociação das moléculas, sobretudo de amilose. O uso de enzima α -amilase termoestável, com temperaturas ótimas entre 80 – 100°C, previne esse tipo de problemas sem a sua inativação.

O peso molecular da α -amilase de *Bacillus licheniformis* é da ordem de 50.000. O pH ótimo, tanto para a atividade como para a estabilidade é entre 5,5 e 6,5 na presença de Ca^{+2} entre 50-70 ppm (NOVO, 1996).

Efeito do Cálcio

O cálcio está presente na estrutura da enzima e sua completa remoção leva a uma inativação, diminuição da estabilidade por desnaturação pelo calor, ácido ou uréia.

O íon não participa diretamente na formação do complexo enzima-substrato, mas mantém a molécula da enzima em conformação ótima para o máximo de atividade e estabilidade (REED, 1975).

5.2 – ENZIMA AMILOGLICOSIDASE

Com uma denominação sistemática de glucohidrolase 1,4 - α - D-glucano é uma exoenzima pertencente ao grupo das amiloglicosidas. Essa enzima catalisa a hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 do amido. Durante sua ação elimina-se gradualmente as unidades de glicose do extremo não redutor da molécula do

substrato (NOVO, 1996; REED, 1975). Contudo, a velocidade de hidrólise das ligações α -1,6 é da ordem de 40 vezes menor que as ligações α -1,4 (ZANIN, 1989).

Apesar da ação da enzima não impedida pela ligação α -1,6 em moléculas ramificadas, uma completa degradação não é efetuada. Parece haver um bloqueio na molécula de substrato. É possível que algumas ligações α -1,6 estejam presentes em algum tipo de arranjo que dificulta a ação da enzima. Na presença de α -amilase ou com liquefação prévia, a degradação do amido é completa (REED, 1975).

A clivagem das ligações α -1,6 somente ocorre quando a glicose se encontra na posição tridimensional, como em G₄ e não é a única glicose da cadeia – G₅ (Figura 1.6).

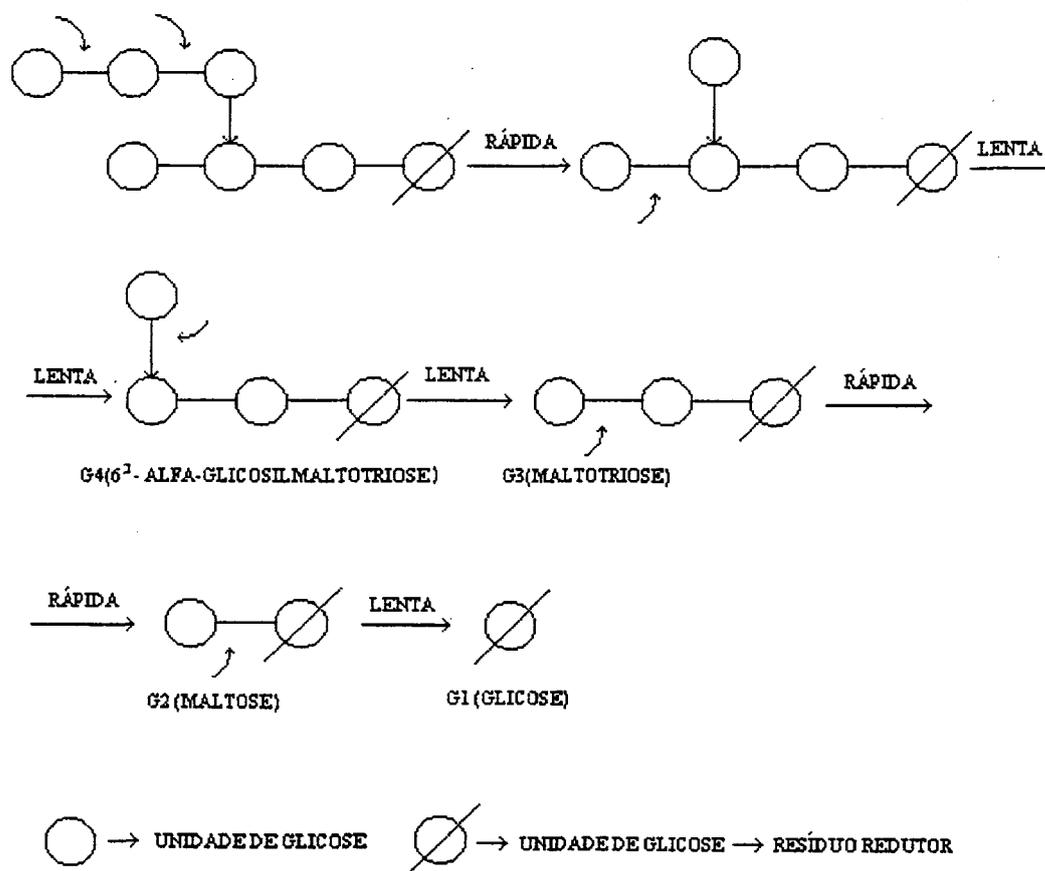


Figura 1.6 - Representação esquemática da ação da amilglicosidase na molécula de amilopectina (FRENCH, 1980).

A amilglicosidase de *Aspergillus niger* apresenta máxima atividade em pH entre 3,5 e 5 (ZANIN, 1989; NOVO, 1996). A empresa NOVO (1996) recomenda

como temperatura mais estável a faixa entre 55 e 60°C, e informa que os produtos AMG estão isentos de atividade transglucosidase, a qual ocasionaria a formação da panose e isomaltose de resíduos glicosídicos desde uma posição α -1,4 até uma posição de α -1,6.

5.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Como a principal característica das enzimas é catalisar reações químicas e biológicas que ocorrem nos seres vivos, o estudo de sua função catalítica baseia-se na medida quantitativa da velocidade de reação em que participam. Devido à sua natureza protéica, são altamente sensíveis às variações de pH, temperatura, concentração da própria enzima, etc., portanto, o conhecimento da atuação destes parâmetros sobre a reação enzimática permite a melhor utilização das propriedades catalíticas da enzima. Assim, quando se determina a atividade enzimática de uma enzima deve-se estar atento às condições de temperatura e pH a que se está submetendo esta enzima. Contudo, quando se trata de amido, existe um outro fator que pode afetar a cinética de reação: a forma física da molécula (HOWLING, 1989).

A determinação da atividade enzimática envolve a medida da velocidade da reação, portanto, a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, citado por ZANIN (1989), recomenda as seguintes definições:

- ✓ Atividade: “uma unidade (U) é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μ mol de substrato, ou a formação de 1 μ mol de produto, por minuto, por ml de solução enzimática utilizada” nas condições de ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato, etc.).
- ✓ Atividade específica: é expressa em termos da atividade por miligrama de proteína (U/mg).

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO – MÉTODO DAS VELOCIDADES INICIAIS

A curva de progresso da maioria das reações enzimáticas apresenta a forma de uma hipérbole retangular (REED, 1975), onde a velocidade de reação diminui

com o tempo. Os fatores que podem contribuir para essa diminuição são (ZANIN, 1989):

- a) os produtos da reação inibem a enzima;
- b) o grau de saturação da enzima com o substrato pode diminuir devido ao decréscimo da concentração de substrato à medida que a reação avança;
- c) as reações reversas podem se tornar mais importantes à medida que a concentração de produto aumenta, e
- d) a enzima, ou coenzima, pode sofrer inativação pela temperatura e/ou pelo pH.

Estes fatores podem agir isoladamente ou em conjunto, e portanto, a curva de reação não segue exatamente as equações das reações químicas homogêneas (HAWCROFT, 1987).

ZANIN (1989) comprova que à medida que a concentração de amido liqüefeito aumenta, a atividade enzimática da enzima amiloglicosidase é inibida, sendo esta inibição bastante acentuada em concentrações de substrato superiores a 50 g/l. Quando se trata de maltose como substrato, a inibição é menos acentuada obedecendo à cinética proposta por Michaelis-Menten até a concentração de 50 g/l.

A atividade enzimática é determinada a partir da medida da velocidade inicial da reação, uma vez que no início da reação os fatores acima mencionados não tiveram tempo de se manifestar e, conseqüentemente, as condições em que a reação se processa são conhecidas (ZANIN, 1989).

A velocidade inicial de reação pode ser obtida através da tangente à curva (produção de produto ou consumo de substrato versus tempo) no ponto de origem (REED, 1975).

6. – CULTURA DE CÉLULAS

6.1 - *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura aeróbia facultativa, e como tal, quando em aerobiose, a respiração permite a oxidação total (até água e CO₂) do substrato carbonado pelas vias da glicólise e do ciclo de Krebs acoplado à fosforilação oxidativa; e em condições de anaerobiose a oxidação do substrato

carbonado é incompleta e pouco energética, levando a formação do etanol e gás carbônico.

O favorecimento do metabolismo respiratório ou fermentativo é dependente das condições de cultura e disponibilidade do substrato limitante, suplementação de minerais e nitrogênio e outras condições físicas (EJIOFOR et al., 1996 -b)

Contudo as vias aeróbias e anaeróbias não estão separadas e são reguladas por um sistema enzimático complexo (GHOUL, 1983). A regulação do metabolismo de leveduras depende dos efeitos inibidores ou ativadores dos substratos (glicose e oxigênio) e dos produtos formados durante o crescimento.

A assimilação dos substratos carbonados pelas leveduras está relacionada a dois sistemas principais de regulação: o efeito Pasteur e o efeito Crabtree.

O efeito Pasteur se manifesta enquanto as leveduras em fermentação se encontram em presença de oxigênio, se traduzindo numa diminuição da atividade das enzimas da glicólise, reduzindo a velocidade de utilização da glicose sem haver a produção de etanol. Contudo este fenômeno somente se manifesta em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições especiais como ausência de nitrogênio ou concentrações muito baixas de açúcar (LAGUNAS, 1986)

O efeito Crabtree se traduz por uma utilização da glicose por via fermentativa em cultura aeróbia enquanto a concentração de glicose no meio reacional for superior a valores críticos estimados entre 0,2 – 0,6 g/l (OLIVEIRA, 1995). Em *Saccharomyces cerevisiae* a respiração é reprimida em presença de glicose e seu metabolismo se orienta, então, em direção a uma degradação preferencialmente via fermentativa.

Pesquisadores tem identificado que o catabolismo oxidativo e fermentativo da glicose ocorrem simultaneamente (EJIOFOR et al. 1994). A repressão catabólica e a baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio favorecem a formação de etanol. Quando a concentração de etanol formado aumenta no meio, além de constituir num desperdício de energia para os processos de produção de biomassa, intervém por seus efeitos inibitórios, resultantes de seu acúmulo ou de sua reassimilação pelos microrganismos, constituindo-se num inibidor do catabolismo respiratório (GHOUL, 1983).

6.1.1 - Metabolismo da Glicose

A glicose ao passar pelo plasmalema é fosforilada se transformando em glicose 6-fosfato e daí pode ser metabolizada de duas maneiras: uma pela via glicolítica, que produzirá ácido pirúvico e etanol, e outra pela via pentose fosfato que tem como objetivo produzir NADPH reduzido e pentose (Figura 1.7). O NADPH será utilizado para a síntese de ácidos graxos, aminoácidos e esteróides, e as pentoses, ácidos nucleicos (AMORIM, 1977).

A diferença entre a respiração e fermentação não consiste somente na produção de álcool e CO_2 (fermentação) e H_2O e CO_2 (respiração). Na fermentação cada molécula de glicose produz 2 moléculas de ATP, e na respiração cada molécula de glicose produz 36 moléculas de ATP (AMORIM, 1977). Se o meio possui oxigênio e a respiração ocorre, uma grande quantidade de ácidos orgânicos vai se formar no ciclo de Krebs, e dois deles principalmente (ácido oxaloacético e α -cetoglutárico) poderão produzir o esqueleto carbônico das proteínas. Para que isto ocorra, logicamente é necessário que haja nitrogênio no meio. Leveduras em meio aeróbio podem produzir de dez a vinte vezes mais o peso daquelas que crescem em meio sem oxigênio, considerando a mesma quantidade de oxigênio consumida (AMORIM, 1977).

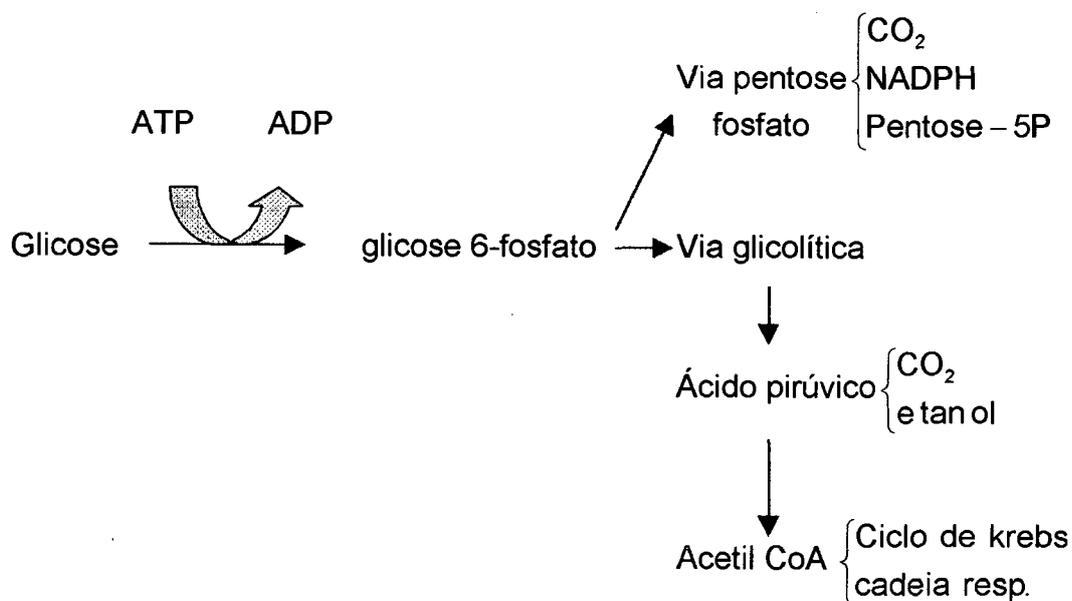


Figura 1.7 - Direções que a glicose-6-fosfato pode tomar no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* (AMORIM, 1977).

6.1.2 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *S. cerevisiae*

A cinética de crescimento de leveduras sobre um substrato carbonado é um resultado de atitudes fisiológicas do microrganismo e das condições do meio. O conhecimento desta cinética é indispensável em uma parte para o desenvolvimento de processo mediante o jogo das reações biológicas, de outra, para definir os procedimentos de uma conduta ótima conforme o objetivo visado.

O crescimento em reator descontínuo se inicia com um alto consumo de glicose e a *S. cerevisiae* cresce rapidamente em uma primeira fase de crescimento exponencial. A velocidade de crescimento está compreendida entre 0,1-0,5 h⁻¹ dependendo da cepa e das condições de processo. A forte produção de etanol e o elevado (>1) Quociente Respiratório (QR = razão molar entre CO₂ livre e o oxigênio consumido), indicam um tipo de metabolismo fermentativo (OLIVEIRA 1995). Nesta fase, as células reprimidas pela glicose em excesso produzem CO₂, etanol, glicerol e ácidos orgânicos, sendo apenas 13% da glicose assimilada nos constituintes celulares (revisto por STAMBUK, 1995).

Uma fase de latência é em seguida observada como sendo aquela em que a levedura se adapta ao meio isento de glicose, mas rico em etanol. Uma segunda fase exponencial de crescimento é verificada com uma velocidade de crescimento específica entre 0,14 e 0,2 h⁻¹. Nesta fase se observa um QR compreendido entre 0,4 – 0,7 indicando um metabolismo oxidativo do etanol.

Em processo fermentativo “fed-batch”, WU et al. (1995) mostraram que a concentração de etanol pode ser mantida constante em valores abaixo de 0,4 % (v/v), enquanto a velocidade específica de crescimento sobre a glicose for igual à 0,21 h⁻¹, e o metabolismo da glicose fica sendo todo oxidativo. Em contrapartida, o etanol tende a se acumular a velocidades específicas de crescimento iguais ou superiores à 0,22 h⁻¹.

Enquanto a glicose é oxidada em fermentação batelada alimentada, o QR é próximo de 1 e o rendimento é da ordem de 0,5 g de biomassa por g de glicose.

6.2 – FORMAS DE CULTIVO EM BIORREATORES

Os processos fermentativos podem ser conduzidos em batelada (“batch”), contínuo e batelada alimentada (“fed-batch”). O modo de operação a ser escolhido está relacionado ao tipo de produto a ser produzido.

A batelada é um exemplo de sistema de cultura fechado contendo uma quantidade inicial limitada de nutrientes. O inóculo pode passar pelas fase de adaptação, de crescimento exponencial, desaceleração e estacionária, típicas do crescimento microbiano (STANBURY e WHITAKER, 1984). No caso do crescimento *Saccharomyces cerevisiae* em “batch” em meio de cultura, contendo glicose como fonte de carbono,, verifica-se uma fase inicial de crescimento logarítmico, onde as células, reprimidas pela glicose, realizam o metabolismo anaeróbico produzindo CO₂, etanol, glicerol e ácidos orgânicos. A seguir ocorre uma fase de transição ou diauxia, que geralmente começa quando 50% da glicose foi consumida, e se caracteriza por uma parada no crescimento e início da de-repressão das células. Finalmente, ocorre uma Segunda fase de crescimento aeróbio, às custas dos compostos produzidos na primeira fase de crescimento, que apesar de ser mais eficiente (aproximadamente 39% da fonte de carbono é assimilada), ocorre com uma velocidade menor (revisto por STAMBUK, 1995).

A cultura em batelada alimentada ocorre quando há uma alimentação contínua ou sequencial, com o meio ou parte dele, sem a remoção do meio reacional, resultando num aumento do volume do reator com o tempo.

O uso de batelada alimentada tem vantagens em relação a concentração residual de substrato que pode ser mantida a níveis muito baixos num sistema. Um baixo nível residual de substrato pode ser vantajoso para:

- ✓ eliminar efeitos repressivos da fonte de carbono utilizada rapidamente e manter as condições de cultura dentro da capacidade de aeração do fermentador.
- ✓ evitar efeitos tóxicos de um ou mais componentes do meio.

Quando o objetivo do processo fermentativo é a produção de levedura, o processo descontínuo leva à grandes perdas no rendimento e na produtividade, pois o microrganismo utiliza a glicose tanto por via fermentativa (com maior produção de etanol), quanto por via respiratória (maior produção de célula). Após a exaustão do principal substrato carbonado, a glicose, as leveduras irão utilizar o etanol e

continuar a crescer. No entanto, a produção e depois o consumo do etanol leva à perdas energéticas enormes, que seriam evitadas se o metabolismo fosse dirigido unicamente para a reprodução celular (NINOW, 1994).

O objetivo do processo batelada alimentada é a otimização da produção da biomassa pela minimização da repressão catabólica que induz a produção de etanol (OLIVEIRA, 1995). Para atingir este objetivo não se pode ultrapassar valores críticos na concentração de açúcares (0,1 g/l - NINOW, 1994; 0,5 g/l - OLIVEIRA, 1995; 0,25 g/l - EJIOTOR et al., 1996), de forma a evitar um acúmulo de etanol, favorecendo assim o metabolismo respiratório das leveduras.

Existem algumas estratégias para controlar a entrada de substrato (alimentação) no processo "fed-batch", podendo ser através de balanços materiais de células dentro do fermentador, sendo para tanto, necessário o conhecimento da concentração de biomassa inicial, do fator de conversão biomassa/substrato e da velocidade específica de crescimento. Outra forma de controlar a alimentação é através da medida de parâmetros relacionados diretamente com a fonte de carbono, como por exemplo substâncias tóxicas do metabolismo, Quociente Respiratório (QR) (AIBA et al., 1976; PONS, 1985; WILIANS et al., 1986), determinação da concentração de etanol (NAMBA et al., 1981; NINOW, 1994; OLIVEIRA, 1995; WIN et al., 1996) e a própria concentração de biomassa (GHOUL, 1995). Outros autores fizeram uso do monitoramento da velocidade específica de crescimento, a qual deveria ficar em valores inferiores a $0,21 \text{ h}^{-1}$ (WU et al., 1984; EJIOTOR et al., 1996); monitoramento da concentração de oxigênio, controle do limite da capacidade respiratória (SONNLEITNER e KÄPPELI, 1986) e controle da concentração de açúcares redutores no meio (WIN et al., 1996).

A determinação da concentração de etanol na cultura durante a fermentação pode ser empregada para o controle do sistema devido a produção de etanol ser a maior razão para o decréscimo do rendimento celular máximo (WIN et al., 1996).

NAMBA et al. (1981) e WIN et al. (1996) obtiveram fatores de conversão de 0,5 e 0,47 g célula/g glicose, respectivamente, mantendo a concentração de etanol a 200 ppm; OLIVEIRA (1995) apresenta um fator de conversão de 0,51 g célula/g glicose, monitorando a concentração de etanol (0,1 e 0,5 g/l). Nestes trabalhos foi usado somente a concentração de etanol como variável de observação, com auxílio de um sensor "on line" de compostos voláteis, e a vazão da solução de alimentação como variável manipulada.

Monitorando a concentração de açúcares redutores no meio, provenientes de hidrolisado de amido de mandioca, WIN et al. (1996) mantendo-os em valores entre 0,1 – 0,3 g/l, obtiveram valores de produtividade e fator de conversão de 3,12 g/l.h e 0,52 g célula/g glicose, respectivamente.

As Tabelas 1.3 e 1.4 apresentam valores obtidos em fermentações do tipo batelada e batelada alimentada, respectivamente, usando *Saccharomyces cerevisiae* e diferentes substratos.

Tabela 1.3 – Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos por diversos autores em processos tipo batelada.

Substrato	Concentração inicial de substrato (g/l)	μ_{max} (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g/g)	P_x (g/l.h)	Referência
Melaço	45	---	0,18	0,22	WIN et al., 1996
Hidrolisado de mandioca	45	---	0,23	0,31	WIN et al., 1996
Hidrolisado de mandioca	10	0,22	0,15	---	NINOW et al., 1994
Glicose	5	0,2	0,15	---	OLIVEIRA, 1995
Glicose	10	0,28	0,164	---	OLIVEIRA, 1995
Glicose	15	0,20	0,118	---	OLIVEIRA, 1995
Glicose	10	0,45	0,15	---	ORLOWSKI e BARFORD, 1991
Frutose	10	0,43	0,17	---	ORLOWSKI e BARFORD, 1991
Sacarose	10	0,55	0,16	---	ORLOWSKI e BARFORD, 1991
Glicose + Sacarose	5+5	0,32	0,149	---	OLSSON et al.(1997)

Tabela 1.4 – Resumo dos parâmetros cinéticos obtidos por diversos autores em processos tipo batelada alimentada.

Substrato	μ_{max} (h ⁻¹)	Y_{xs} (g/g)	P_x (g/l.h)	Referência
Melaço	—	0,46	2,33	WIN et al., 1996
Hidrolisado de mandioca	—	0,52	3,12	WIN et al., 1996
Hidrolisado* de mandioca	—	0,47	2,15	WIN et al., 1996
Hidrolisado de mandioca	0,18/0,23	0,49	2,08	EJIOFOR et al., 1996 (a)
Glicose	0,18/0,23	0,49	1,78	EJIOFOR et al., 1996 (a)
Hidrolisado de painço	---	0,70	---	EJIOFOR et al., 1996 (b)
Glicose	---	0,68	---	EJIOFOR et al., 1996 (b)
Glicose	0,16	0,38	---	OLIVEIRA, 1995
Glicose*	0,21	0,51	---	OLIVEIRA, 1995
Glicose	0,45	0,47/0,5	---	SONNLEITNER e KÄPPELI, 1986
Glicose	0,21	---	---	WU et al., 1984
Glicose	0,17	0,5	---	NAMBA et al. 1981
Glicose	0,15/0,19	0,33/0,48	---	WILLIAMS et al., 1976

* Fermentação com controle de etanol

6.3 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Entre os maiores processos fermentativos comercialmente importantes de produção de células microbianas (ou biomassa) como produto encontramos (STAMBURY e WHITAKER, 1984):

- ✓ Produção de levedura para serem usadas na indústria de panificação, e

- ✓ Produção de células microbianas direcionadas à ração animal como fonte de proteína (Single Cell Protein – SCP).

Diversos autores, preocupados com a saúde, agricultura e produção de alimentos e tendo em vista a escassez mundial de proteína, estimularam os estudos e a produção de SCP.

Em comparação com os tradicionais métodos de produção de proteína para a alimentação humana e ração animal, a produção de biomassa em escala industrial apresenta algumas vantagens (BU'LOCK E KRISTIASSEN, 1987):

- ✓ Microrganismos em geral tem alta velocidade de multiplicação;
- ✓ Contém altas concentrações de proteína (em termos de peso seco, pode conter de 30-80% de proteína);
- ✓ Pode-se utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono como substrato, o que se torna mais atraente à medida que a cada dia se tem maiores quantidades de resíduos disponíveis a custo zero;
- ✓ Algumas espécies com alto rendimento e boa composição podem ser selecionadas e produzidas com relativa facilidade;
- ✓ Instalações de produção ocupam áreas limitadas para bons rendimentos, e
- ✓ A exceção de algas, a produção microbiana é independente da sazonalidade e variações climáticas.

Dentre os microrganismos, a levedura, por ter seu pH ótimo de crescimento entre 3,5 e 5,0, tem reduzido risco de contaminação bacteriana, além da célula de levedura poder ser recuperada submetendo-se o meio à centrifugação.

A proteína bruta contida na levedura pode ser de 55-60% e o conteúdo de ácido nucléico superior a 15% em base seca (BU'LOCK e KRISTIASSEN, 1987). A Tabela 1.5 apresenta a composição em aminoácidos de leveduras em comparação com outras fontes de proteína e a referência da FAO. A levedura seca é um dos alimentos mais ricos em lisina e treonina, contudo é pobre em tirosina, cistina e metionina. São praticamente desprovidas de vitamina C e A, mas por outro lado, é a mais rica fonte de vitaminas do complexo B, particularmente niacina, riboflavina e ácido pantotênico (MIYADA e LAVORENTI, 1979)

Devido ao alto conteúdo de ácidos nucléicos, microrganismos não são diretamente saudáveis para a nutrição humana, mas estudos podem confirmar que

são bem utilizadas para ração animal (NETO e SIQUEIRA, 1989; LIMA et al., 1987; CHIQUETTE, 1995).

Tabela 1.5 - Composição de aminoácidos de leveduras e outros alimentos proteicos.

Aminoácidos	Saccharomyces cerevisiae	Peixe	Extrato de soja	Ovo	Ref. FAO
	Conteúdo de aminoácido (g por 16 g de nitrogênio)				
Isoleucina	4,6	4,6	5,4	6,7	4,2
Leucina	7,0	7,3	7,7	8,9	4,8
Fenilalanina	4,1	4,0	5,1	5,8	2,8
Tirosina	----	2,9	2,7	4,2	2,8
Treonina	4,8	4,2	4,0	5,1	2,8
Triptofano	1,0	1,2	1,5	1,6	1,4
Valina	5,3	5,2	5,0	7,3	4,2
Arginina	----	5,0	7,7	----	----
Histidina	----	2,3	2,4	----	----
Lisina	7,7	7,0	6,5	6,5	4,2
Cistina	----	1,0	1,4	2,4	2,0
Metionina	1,7	2,6	1,4	5,1	2,8

Fonte : BU'LOCK e KRISTIASSEN, 1987.

Vários autores vêm pesquisando o uso de leveduras como suplemento proteico em rações de animais. NETO e SIQUEIRA (1989) verificaram que com suplementação de até 37% de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), os bovinos apresentaram ganho de peso em relação aos não suplementados e a utilização de aminoácidos pré-formados das leveduras proporcionou maior energia para as bactérias celulolíticas melhorando a digestibilidade dos ruminantes.

LIMA et al. (1987) em estudos com rações para leitões contendo *Saccharomyces cerevisiae* constataram que a levedura seca possui amplas possibilidades como substituto de farelo de soja. MIYADA e LAVORENTI (1979) indicam o uso de leveduras secas como fonte de proteína em suínos em crescimento e acabamento, em pelo menos 21% da ração.

CHIQUETTE (1995) cita que a composição do leite não é afetada pela adição de *S. cerevisiae* na dieta de vacas em lactação, e a produção pode ser aumentada com esse tipo de dieta. Em seu estudo verificou um aumento da proporção do rendimento do leite sobre a matéria seca ingerida.

Além da possibilidade do uso como suplemento de rações animais, *Saccharomyces cerevisiae* é recomendada como GRAS ("Generally Regarded as Safe") e sua importância industrial é atualmente relacionada com novas aplicações da genética com a produção de proteínas recombinantes, tais como interferon humano, ou antígeno da hepatite B; e está cada vez mais consolidada a sua utilização em panificação e fermentação (GUILLOU, 1996).

A rentabilidade econômica dos processos de produção de leveduras depende da concentração celular obtida no final da fermentação.

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos equipamentos e metodologias utilizadas para a execução dos testes enzimáticos e processos fermentativos. Estão descritas também, as técnicas analíticas adotadas para as determinações das concentrações de células, etanol, proteína e glicose, e os procedimentos experimentais adotados.

1 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

O procedimento experimental foi realizado em 5 etapas:

- 1^a etapa: testes enzimáticos utilizando as enzimas amilolíticas α -amilase e amiloglicosidase. As mesmas enzimas foram empregadas na conversão de amido de mandioca em glicose, substrato carbonado das fermentações;
- 2^a etapa: ensaios fermentativos com *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1530 em “shaker”, com vistas na adaptação do meio usado por WIN et al. (1996);
- 3^a etapa: fermentações batelada simples com *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1530 em três concentrações iniciais de glicose de mandioca (5, 10 e 15 g/l), para o estabelecimento das condições de operação da fermentação batelada alimentada;
- 4^a etapa: fermentações batelada simples com *Saccharomyces cerevisiae* cepa CCT 1531, igualmente à etapa 3, para estabelecer um comparativo entre as cepas CCT 1530 e CCT 1531 utilizada por OLIVEIRA (1995);
- 5^a etapa: fermentações batelada alimentada com *Saccharomyces cerevisiae*, cepas CCT 1530 e CCT 1531.

2 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os ensaios enzimáticos realizados neste item, foram feitos com o intuito de conhecer os efeitos dos parâmetros pH, temperatura, concentração de substrato e concentração de enzima escolhidos, sobre a atividade da amiloglicosidase, de forma a se utilizar as propriedades catalíticas da enzima sobre o amido da melhor maneira.

2.1 - SUBSTRATO

Foi usado como substrato para os testes, amido de mandioca comercial (polvilho doce), adquirido em uma única compra, visando reduzir o erro com respeito à uniformidade da amostra.

2.2 - ENZIMAS

Na etapa de liquefação, processo de hidrólise parcial do amido, foi utilizada a enzima α -amilase TERMAMYL 120L (NOVO NORDISK) obtida de *Bacillus liqueniformis* com atividade declarada pelo fabricante de 120 KNU/g. A empresa define 1 KNU, ou seja, um quilo da unidade Novo de α -amilase como a quantidade de enzima que decompõe 5,26 g de amido por hora nas condições padrão (NOVO NORDISK).

Para o processo de sacarificação, hidrólise total do amido com formação de glicose como produto final, foi usada a enzima amiloglicosidase AMG 200L, procedente da Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil SA., com atividade padrão de 200 AGU/ml, apresentada pelo fabricante AGU ou unidade de amiloglicosidase Novo Nordisk como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa um micromol de maltose por minuto, sob condições padrão de ensaio (NOVO NORDISK). A AMG 200 L é obtida através de fermentação submersa de *Aspergillus niger*.

As duas enzimas se apresentam como um líquido de coloração marrom.

2.3 – TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Foram realizados testes para se estudar o efeito da concentração da solução de amido liquefeito sobre a velocidade inicial da reação. Para tanto, a atividade enzimática da enzima amiloglicosidase AMG 200L (NOVO NORDISK) foi determinada com concentrações de 1,5; 3,0; 6,0; 15,0; 30,0; 60,0; 90,0 e 300,0 g/l de amido de mandioca (polvilho doce) liquefeito. As diferentes concentrações foram obtidas por meio de diluições em água de uma solução-mãe de amido liquefeito de concentração de 300 g/l de amido de mandioca.

A realização dos testes, bem como o preparo da solução-mãe, foram sugeridos por ZANIN (1989).

2.3.1 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE AMIDO LIQUEFEITO – SOLUÇÃO-MÃE

A solução-mãe era preparada com 300 g de amido de mandioca diluído em 800 ml de água destilada acrescida de 0,282 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (70 ppm), sendo o pH ajustado em 6,5 com NaOH 1N, aquecido a 85°C. Após a adição de 330 μl de enzima α -amilase TERMAMYL 120L (equivalente a 1,10 l de enzima/ton. de amido), a solução era mantida sob agitação em agitador magnético e copo Béquer tampado, durante 1 hora. Durante este tempo a temperatura aumentava até a fervura com a finalidade de, inicialmente permitir a completa ação da enzima e numa segunda ação, favorecer sua inativação.

Com a solução já resfriada à temperatura ambiente, o pH era ajustado em 4,5 com HCl 1N, adicionava-se solução-tampão acetato de sódio 2M, pH 4,5, na proporção de 10 ml/l a fim de ter uma concentração final de tampão de 0,02M, e finalmente completava-se o volume para 1.000 ml com água destilada.

A solução mãe era, então, esterilizada a 121°C por 15 min em autoclave de calor úmido e armazenada em geladeira, à 4° C, até o seu uso.

2.3.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – MÉTODO DAS VELOCIDADES INICIAIS

Os testes enzimáticos com a amiloglicosidase AMG 200L eram realizados em duplicatas após o processo de liquefação em agitadores magnéticos (simultaneamente).

A reação se dava a 55-57°C em béquer tampado com vidro de relógio. O volume inicial do meio reacional era de 50,05 ml, sendo 50 ml da solução de amido liquefeito nas concentrações estabelecidas e 50 µl de enzima. O cronômetro era disparado no momento da adição da enzima, onde se iniciava, então, a reação.

A amostragem era feita em volume de 500 µl a cada 2 minutos para as soluções de concentrações iniciais de 1,5; 3,0; 6,0 e 15,0 g/l de amido, durante 25 minutos e para as concentrações superiores a 15,0 g/l de amido a cada 5 minutos durante 60 minutos. A redução do volume de reação era contabilizada.

As amostras eram adicionadas em tubos de ensaio contendo 4,5 ml de água destilada (diluição 1:10) e submetidas à fervura durante 10 minutos com os tubos tampados com septo de borracha. Esse procedimento visava a inativação da enzima, permitindo que as amostras pudessem ser armazenadas em congelador até terem sua concentração de glicose determinada através de um “kit” enzimático (Biodiagnóstica).

Por definição, uma unidade (U) de amiloglicosidase é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de glicose por minuto, em pH de 4,5 e temperatura de 55-57° C.

Para o cálculo da atividade enzimática a glicose determinada em mg/ml, era transformada para µmoles de glicose, por meio da seguinte fórmula:

$$\mu\text{moles de glicose} = \frac{G \times V_r}{PM} \quad (2.1)$$

onde: G: concentração de glicose formada na reação (mg/ml)

V_r: volume da reação no tempo considerado (ml)

PM: peso molecular da glicose (0,180 mg/µmol)

Com os dados obtidos foram construídos gráficos de μmol de glicose versus tempo e, através tangente na origem da melhor reta traçada, se determina o coeficiente angular (v_p) para o posterior cálculo da atividade enzimática.

A atividade enzimática (A) em Unidades/ml é dada pela equação:

$$A = \frac{v_p}{V_e} \quad (2.2)$$

onde: v_p é a velocidade de formação de produto (μmol glicose/min);

V_e é o volume de enzima utilizada (ml).

A atividade específica (A_e) é obtida dividindo-se a atividade (A) pela concentração de proteína da solução enzimática (129,56 mg/ml), determinada através do método de Biureto, descrito no item 4.3.

$$A_e = \frac{A}{[P]} \quad (2.3)$$

onde: [P] é a concentração protéica da solução de enzima

2.4 – TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE

Para obtenção de melhores rendimentos em termos de glicose foram testadas duas concentrações de enzima amiloglicosidase (AMG 200L).

A sacarificação do amido foi realizada com a solução-mãe (300 g/l) sem diluição e com concentrações de enzima de 0,5 e 1,0 ml/l de solução de amido liquefeito.

O teste se deu em agitador magnético, a 55-57° C e pH de 4,5, por 2 horas.



3 – CULTURAS DE CÉLULAS

3.1 – MICRORGANISMOS

Foram utilizadas duas linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a CCT 1530 e a CCT 1531, ambas adquiridas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello – Campinas, SP.

A linhagem CCT 1530 foi utilizada em todas as fermentações: "shaker", batelada simples e batelada alimentada. Com a linhagem CCT 1531 foram feitas fermentações batelada e batelada alimentada para estabelecer comparativo, já que esta última já havia sido utilizada por OLIVEIRA (1995), no próprio Laboratório de Engenharia Bioquímica - UFSC.

Dados recebidos da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello informam que a cepa CCT 1530 é ácido tolerante e é participante da fabricação de cerveja húngara; e a cepa CCT 1531 apresenta atividade da invertase e não apresenta exigências vitamínicas.

3.2 – MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Para a manutenção das leveduras CCT 1530 e CCT 1531 foi feito uso de tubos de ágar inclinado contendo meio complexo (YMA) composto por:

Extrato de levedura	3,0 g/l	marca Oxoid
Extrato de malte	3,0 g/l	marca Oxoid
Bacto peptona	5,0 g/l	marca Difco
Glicose (PA)	10,0 g/l	marca Vetec
Ágar	20,0 g/l	marca Reagen

A incubação das culturas se dava por 48 horas a 30°C em estufa, e a conservação em refrigerador a 4°C.

3.3 – ENSAIOS FERMENTATIVOS EM “SHAKER”

Com intuito de testar o meio proposto por WIN et al. (1996) e propor uma modificação na composição em relação à troca da solução vitamínica por extrato de levedura, foram realizadas fermentações com a *S. cerevisiae* CCT 1530 em frascos Erlenmeyer (quintuplicata) de 300 ml.

Composição do meio:

(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0 g/l	marca Vetec
Glicose (PA)	10,0 g/l	marca Vetec
KH ₂ PO ₄	6,0 g/l	marca Nuclear
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3,0 g/l	marca Ecibra
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1 g/l	marca Riedel-de Haën
NaCl	0,1 g/l	marca Merk

Foram testadas a solução vitamínica (proposta por WIN et al., 1996) e de extrato de levedura em concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g/l.

Solução vitamínica

Tiamina	30,0 mg/l
m-inositol	30,0 mg/l
Pantotenato de cálcio	1,0 mg/l
Biotina	0,5 mg/l
Piridoxina	0,5 mg/l

As pré-culturas eram preparadas com a mesma composição do meio de fermentação e inoculadas com 2 alçadas da cultura. Esta era mantida sob agitação em “shaker” por 12 horas. Os frascos de fermentação eram inoculados com 5 ml da pré-cultura, depois de esterilizados.

Após ter seu pH ajustado em 4,5 com HCl 1N, os Erlenmeyers eram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. A solução vitamínica era esterilizada fazendo-a passar, sob vácuo, em filtro Millipore estéril (porosidade 0,45 µm), e adicionada ao meio sob condições assépticas.

A fermentação ocorria em Erlenmeyer de 300 ml com volume total de 130 ml acondicionados em “shaker” com rotação de 100 min^{-1} , a 30°C por 12 horas. A amostragem era feita a cada 2 horas, a partir da quarta hora de fermentação para a determinação das concentrações de glicose e de células.

Para se assegurar resultados isentos de distorções, quer fosse por variação do volume do fermentado ou por contaminação, a amostragem seguiu um plano (Figura 3.1) em que a cada retirada de amostra fosse “inaugurado” um frasco Erlenmeyer. O frasco que já tivesse sua alíquota retirada, passava a ser amostrado até o final da fermentação (12 horas).

Foram traçadas curvas de concentração de biomassa e glicose versus tempo para o frasco A, para a média dos frascos em cada tempo e para as primeiras amostras retiradas dos respectivos frascos (A-4, B-6, C-8, D-10, E-12).

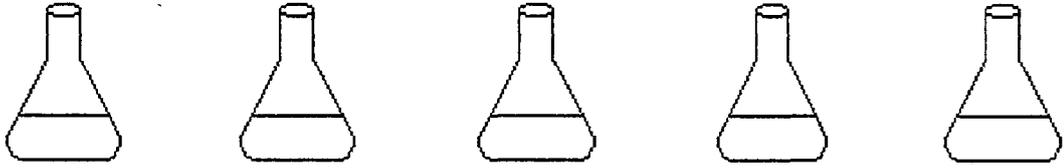
Fracos					
	A	B	C	D	E
Retirada de amostra (h)	4				
	6	6			
	8	8	8		
	10	10	10	10	
	12	12	12	12	12

Figura 2.1 – Plano de retirada de amostra para as culturas em “shaker”.

3.4 – CULTURAS EM BATELADA SIMPLES

Foram realizados ensaios com as duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 e CCT 1531 e testados os meios de WIN et al. (1996) modificado, de

acordo com os resultados obtidos nos ensaios realizados em "shaker" (item 2.3), com três concentrações iniciais de substrato, e o meio YM usado por OLIVEIRA (1995).

3.4.1 – PREPARO DO MEIO DE CULTIVO

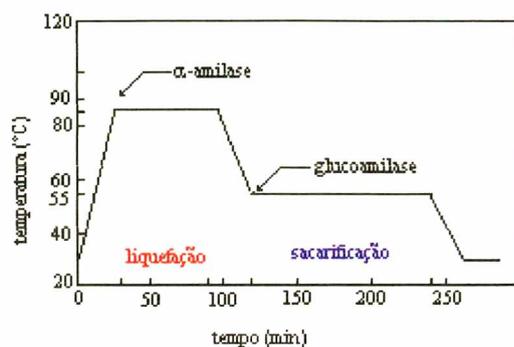
Em todos os ensaios era usado como substrato o hidrolisado de amido de mandioca comercial (polvilho doce) diluído até concentrações de glicose desejada.

3.4.1.1 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE GLICOSE DE MANDIOCA

Amido de mandioca a uma concentração de 300 g/l era hidrolisado à glicose empregando-se dois processos consecutivos, a liquefação e a sacarificação, tendo-se como promotores as enzimas α -amilase (TERMAMYL 120L) e amiloglicosidase (AMG 200L), respectivamente, ambas cedidas pela Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil Ltda.

A solução de amido de mandioca liquefeito (300 g/l) era preparada como descrito no item de preparo da solução-mãe (item 2.3.1) e a sacarificação se dava em presença de 1 ml de enzima amiloglicosidase/litro de solução de amido liquefeito (300 g/l) em solução tampão acetato de sódio 2M, pH 4,5 e temperatura de 55-57° C em agitador magnético. Um resumo esquemático pode ser verificado na Figura 2.2, onde as setas indicam o tempo de adição das enzimas α -amilase e amiloglicosidase.

A solução obtida era esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos para inativação das enzimas e armazenadas sob refrigeração. Antes do uso era feita a análise de glicose para cálculo da diluição.



* As setas indicam os pontos de adição das enzimas.

Figura 2.2 - Esquema da hidrólise do amido.

3.4.1.2 – MEIOS DE CULTIVO

Foi estudada a influência da concentração inicial de substrato, testando-se as concentrações de 5,0; 10,0 e 15,0 g/l de glicose de mandioca no meio de WIN et al. (1996) modificado. Para efeito de comparação foram realizadas fermentações com meio YM.

O meio de WIN et al. (1996) modificado tem em sua composição os elementos citados no item 3.3, tendo como fonte de vitaminas o estrato de leveduras na concentração de 3,0 g/l. E o meio YM é idêntico ao YMA, apresentado no item 3.2, a exceção da exclusão do ágar.

Para verificar a influência da fonte de nitrogênio no rendimento foi realizada uma fermentação com o meio de WIN et al. (1996) modificado com 15,0 g/l de glicose de mandioca, porém com o dobro da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 g/l).

O pH das soluções de meio era ajustado em 4,5 com HCl 1N, e autoclavado a 121°C por 15 minutos dentro do vaso do fermentador.

3.4.2 – PREPARO DO INÓCULO

Para o inóculo eram utilizados exatamente os mesmos meios utilizados nas fermentações.

As culturas eram inoculadas (duas alçadas) em 3 frascos Erlenmeyers de 500 ml contendo 200 ml de meio estéril cada um, e incubados em “shaker” a 100 min^{-1} e

30°C por 24 horas. Para a inoculação do fermentador eram utilizados 2 dos frascos, sendo a transferência realizada com a ajuda de uma bomba peristáltica. O fermentador era, então, inoculado com 400 ml desta pré-cultura.

O terceiro frasco era utilizado para a construção da curva de calibração da concentração de células versus absorbância.

3.4.3 – CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

Todos os ensaios se deram em um biorreator de bancada BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co. Inc. com capacidade total para 6 l, sendo o volume nas fermentações de 4,4 l.

A Figura 2.3 apresenta o biorreator, pHmetro e o cromatógrafo com o microcomputador usado na integração das curvas cromatográficas da determinação de etanol.



Figura 2.3 – Biorreator BIOFLO III, New Brunswick Co. e cromatógrafo CG 90 com microcomputador acoplado para integração das curvas cromatográficas.

A temperatura foi mantida constante a 30°C e a velocidade de agitação e o fluxo de ar eram de 400 min⁻¹ e 3,6 l/min respectivamente. O pH inicial era de 4,5 e no decorrer do processo não houve controle.

A amostragem para a determinação da concentração de etanol, concentração de glicose e concentração de células era feito de hora em hora, sendo as amostras tratadas conforme descrito no item 4.

3.4.4 – METODOLOGIA DE CÁLCULO DO PROCESSO EM BATELADA SIMPLES

a) Velocidades específicas de crescimento em processo batelada

A partir dos perfis de crescimento celular, formação de etanol e consumo de glicose com o tempo, foi possível determinar em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano, formação de produto e consumo de substrato.

As velocidades específicas máximas de crescimento foram calculadas através do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se o logaritmo neperiano da concentração celular com tempo na fase exponencial de crescimento.

Para traçar as curvas e determinar a melhor reta foi feito uso do programa gráfico Microcal Origin 3.78.

b) Fator de conversão de glicose em célula ($Y_{X/G}$) do processo batelada simples

O fator de conversão de glicose em células foi obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da concentração (X_t), contra a concentração de glicose (G_t), equação 2.4:

$$X_t = -Y_{X/G} \cdot G_t \quad (2.4)$$

c) Fator de conversão de etanol em células ($Y_{X/ETOH}$) do processo batelada simples

De forma semelhante à determinação do fator de conversão de glicose em célula, o fator de conversão de etanol em célula é o valor do coeficiente angular da porção linear do gráfico da concentração de célula onde se inicia o consumo de etanol ($X_{t\ ETOH}$) contra a concentração de etanol no tempo t , respectivo ($ETOH_t$). A equação da reta é a seguinte:

$$X_{t\ ETOH} = - Y_{X/ETOH} \cdot ETOH_t \quad (2.5)$$

d) Produtividade em célula (P_x)

A produtividade em célula era calculada dividindo-se a concentração máxima ($X_{m\acute{a}x}$) pelo tempo de fermentação correspondente,

$$P_x = \frac{X_{m\acute{a}x}}{t_{m\acute{a}x}} \quad (2.6)$$

onde: P_x é a produtividade em células;

$X_{m\acute{a}x}$ é a concentração máxima de célula obtida no ensaio;

$T_{m\acute{a}x}$ é o tempo onde se observou a concentração máxima de célula.

3.5 – CULTURA EM BATELADA ALIMENTADA (“FED BATCH”)

Com as duas cepas, CCT 1530 e CCT 1531, foram realizadas fermentações batelada alimentada, sendo utilizado como inóculos meio de WIN et al. (1996) modificado com 10 g/l de glicose de mandioca e meio complexo YM com 10 g/l de glicose PA, respectivamente.

As fermentações batelada, neste caso, serviram de inóculo para as cultura em “fed batch” realizadas.

No decorrer do processo foram determinados as concentrações de células, de glicose e de etanol, sendo estes dois últimos feitos a cada 30 minutos e a análise da concentração de células a cada hora.

3.5.1 – ESTRATÉGIA DE ALIMENTAÇÃO

Para o estabelecimento da estratégia de alimentação foi adotado um “set point” na concentração de etanol de 0,5 g/l (OLIVEIRA, 1995). Quando este valor fosse superado, a alimentação se estagnava, até que as leveduras consumissem o etanol. O fermentador voltava a ser realimentado após o etanol voltar à faixa permitida (0,1 a 0,5 g/l). Havia um monitoramento simultâneo da concentração de glicose de forma a garantir um melhor controle. A concentração de glicose não ultrapassa valores de 0,8 g/l.

A alimentação era realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica Masterflex e mangueira de silicone Masterflex nº 14 (96400-14).

Composição da solução de alimentação

Glicose	150 g/l
KH ₂ PO ₄	5 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,5 g/l

3.5.2 – METODOLOGIA PARA CÁLCULO DO PROCESSO EM BATELADA ALIMENTADA

a) Velocidade específica máxima de crescimento

As velocidades específicas máximas de crescimento foram calculadas através do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se o logaritmo neperiano da concentração celular multiplicado pelo volume de meio reacional contra tempo (h).

Para traçar as curvas e determinar a melhor reta foi feito uso do programa gráfico Microcal Origin 3.78.

b) Fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão de glicose em célula no processo batelada alimentada foi determinado como sendo o coeficiente angular da reta obtida da massa de célula formada versus a massa de glicose consumida pela biomassa, ou seja:

$$Y_{X/G} = \frac{X_t \cdot V_{Rt}}{G_{AL} \cdot V_{AL}} \quad (2.7)$$

onde: X_t é a concentração de célula no tempo t (g/l);

V_{Rt} é o volume total do meio reacional no tempo t (l);

G_{AL} é a concentração de glicose na solução de alimentação (150 g/l);

V_{AL} é o volume de substrato alimentado (l).

4 – MÉTODOS ANALÍTICOS

Neste tópico são descritas as metodologias de amostragem e determinações das concentrações de glicose, etanol, proteína e de células.

4.1 – AMOSTRAGEM

Conforme mencionado nos itens de cada tipo de processo, a amostragem era realizada a cada 2 horas, a partir da quarta hora, para os ensaios em “shaker”, de hora em hora para os processos em batelada e a cada 30 minutos para os processos em batelada alimentada.

O volume das amostras retiradas em todas as culturas foi em torno de 3 a 4 ml, o suficiente para a realização das análises, de forma que não houvesse variações significativas no volume do meio reacional.

Após a coleta, cada amostra era convenientemente diluída para a medida de absorbância de suspensão celular. O restante do volume era centrifugado em uma centrífuga SIGMA 2 K 15 a 15000 min^{-1} por 20 minutos e o sobrenadante separado

em dois tubos de ensaio com septo de borracha e congelado para posteriores análises das concentrações de etanol e glicose.

4.2 – DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A concentração de glicose foi determinada por método enzimático (kit da Bio diagnóstica). O “kit” consta de um reagente contendo enzima glicose-oxidoreductaseperoxidase e solução padrão de glicose com concentração igual a 1 g/l.

O método se fundamenta na oxidação da glicose pela glicose-oxidase (GOD) transformando-a em ácido glucônico e água oxigenada. Esta última é responsável por catalisar a reação do fenol com a 4-aminofenazona, formando um composto chamado quinonimina, de coloração vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose presente na solução analisada.

A determinação foi feita adicionando-se em tubo de ensaio 2 ml do reagente de cor e 20 µl da amostra a ser analisada. Simultaneamente são feitos o branco contendo apenas o reagente de cor e os tubos (duplicata) contendo a solução padrão. Todos os tubos eram incubados por 10 minutos à 37°C em banho termostatizado. A leitura foi feita contra o branco em espectrofotômetro (modelo E225D-CELM) a 500 nm.

Em virtude do equipamento apresentar linearidade para os valores de absorvâncias inferiores a 0,8, as amostras cujos valores de absorvância superassem este valor, eram diluídas e a determinação repetida.

A concentração de glicose era obtida dividindo-se a absorvância da amostra pela do padrão, multiplicada pela diluição, quando esta era realizada.

4.3 - DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

Para a determinação de proteína foi utilizado o método colorimétrico de Biureto. Este método permite determinar o número de ligações peptídicas em solução alcalina pela intensidade de cor gerada da reação da proteína com o Cu^{2+} presente no reagente de Biureto.

O procedimento consiste em adicionar 0,1 ml de solução protéica em 5 ml de reagente de Biureto, deixar reagir durante 30 minutos e fazer a leitura de absorbância em espectrofotômetro (modelo E225D-CELM) a 550 nm.

A concentração protéica da amostra foi estabelecida por comparação com a curva de calibração construída com concentrações entre 0 e 100 g/l de albumina sérica bovina (BSA). A equação matemática que descreve a curva de calibração apresenta coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,999 e é representado pela expressão:

$$[P]=1,64014 + 229,15101ABS_p \quad (2.8)$$

onde: ABS_p : absorbância da solução protéica;

[P]: concentração de proteína [g/l].

4.4 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular foi determinada por turbidimetria. Durante as fermentações eram feitas leituras de absorbância das suspensões de células em espectrofotômetro (modelo E225D-CELM) a 660 nm e convertidas a concentração celular (g/l) por meio de curva de calibração.

Para a construção da curva de calibração, 25 ml da cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, eram coletadas do frasco Erlenmeyer sobressalente de inóculo, filtrada a vácuo em filtro Millipore com membrana de acetato de celulose (0,8 μ m) previamente seca e pesada, e submetida à secagem em estufa a 90-100°C durante 24 horas. A concentração de célula era determinada pela diferença de peso seco.

Outra porção da cultura era retirada e realizadas diluições, lendo-se as absorbâncias em espectrofotômetro. As diluições eram realizadas de forma que o valor lido no espectrofotômetro fosse inferior a 0,8, limite de linearidade do equipamento.

Graficando-se a densidade ótica pela massa seca correspondente às diluições tem-se a curva de calibração de biomassa. Na Tabela 3.1 estão

apresentadas todas as curvas de calibração obtidas para cada cepa nas diferentes condições de cultura.

Tabela 2.1 – Equações das curvas de calibração para as diferentes condições de cultura.

Fermentação em "shaker" <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530		
Concentração de ext. de levedura (g/l)	Equação	Coefficiente de Correlação (r)
0,5	$Y = -0,13794+0,90446X$	0,99186
1,0	$Y = -0,0208+1,03824X$	0,99873
2,0	$Y = -0,05546+0,81004X$	0,99272
3,0	$Y = -0,0235+0,98317X$	0,99929
4,0	$Y = -0,07976+0,82909X$	0,99593
Sol. Vitamínica	$Y = -0,01572+1,12604X$	0,99926
Fermentações em fermentador <i>S. cerevisiae</i> CCT 1530		
Meio	Equação	Coefficiente de correlação (r)
5,0 g/l glicose	$Y = -0,01385+0,51182X$	0,99032
10,0 g/l glicose	$Y = -0,11782+0,73316X$	0,99944
15,0 g/l glicose	$Y = -0,00026+0,423X$	0,9961
15,0 g/l glicose e 20 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	$Y = -0,05961+0,87859X$	0,99355
Meio YM	$Y = -0,03834+0,79193X$	0,99892
Fermentação em fermentador <i>S. cerevisiae</i> CCT 1531		
Concentração de glicose (g/l)	Equação	Coefficiente de correlação (r)
5,0 g/l	$Y = -0,03416+1,15723X$	0,99967
10,0 g/l	$Y = -0,03025+1,57534X$	0,99353
15,0 g/l	$Y = -0,00226+1,1517X$	0,99952

4.5 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL

Foi utilizado para esta análise um cromatógrafo em fase gasosa CG90-DIC, com ionização de chama e coluna em fase estacionária PORAPAK Q – 80-100 mesh, de 1 mm de diâmetro interno e 2 m de comprimento.

As amostras foram injetadas manualmente e analisadas sob as seguintes condições de operação:

- gás de arraste: nitrogênio (N₂) com fluxo de 20 ml/min;

- gás de chama: hidrogênio e ar sintético com vazões de 50 ml/min e 300 ml/min, respectivamente;
- temperatura da coluna: 105°C;
- temperatura do injetor: 185°C;
- temperatura do detector: 230°C;
- volume de injeção: 2 µl.

Para a conversão das áreas obtidas nos cromatogramas das amostras, era construída, a cada série de testes, uma curva de calibração, com 9 pontos, com concentrações de etanol variando entre 0,3 e 4,0 g/l (Figura 2.4). O tempo de análise era de 2 minutos.

No caso da análise de etanol realizada durante as fermentações batelada alimentada, onde as concentrações não deviam exceder a 0,5 g/l, a curva de calibração feita com concentrações que variavam entre 0,1 a 1,5 g/l (8 pontos). Um exemplo da curva de calibração está apresentada na Figura 2.5.

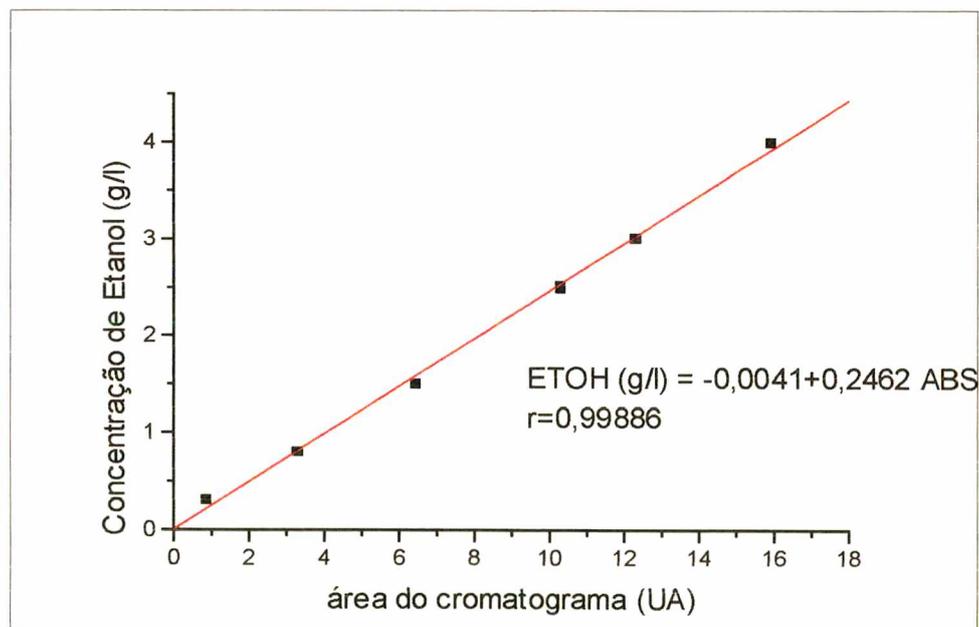


Figura 2.4 - Exemplo de uma curva de calibração de etanol com concentrações entre 0,3 e 4,0 g/l.

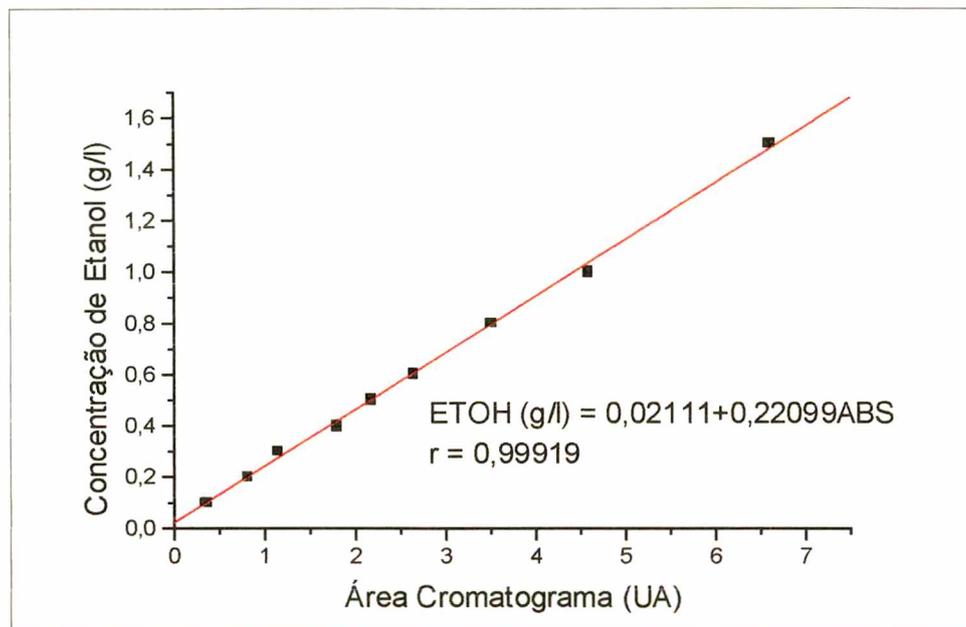
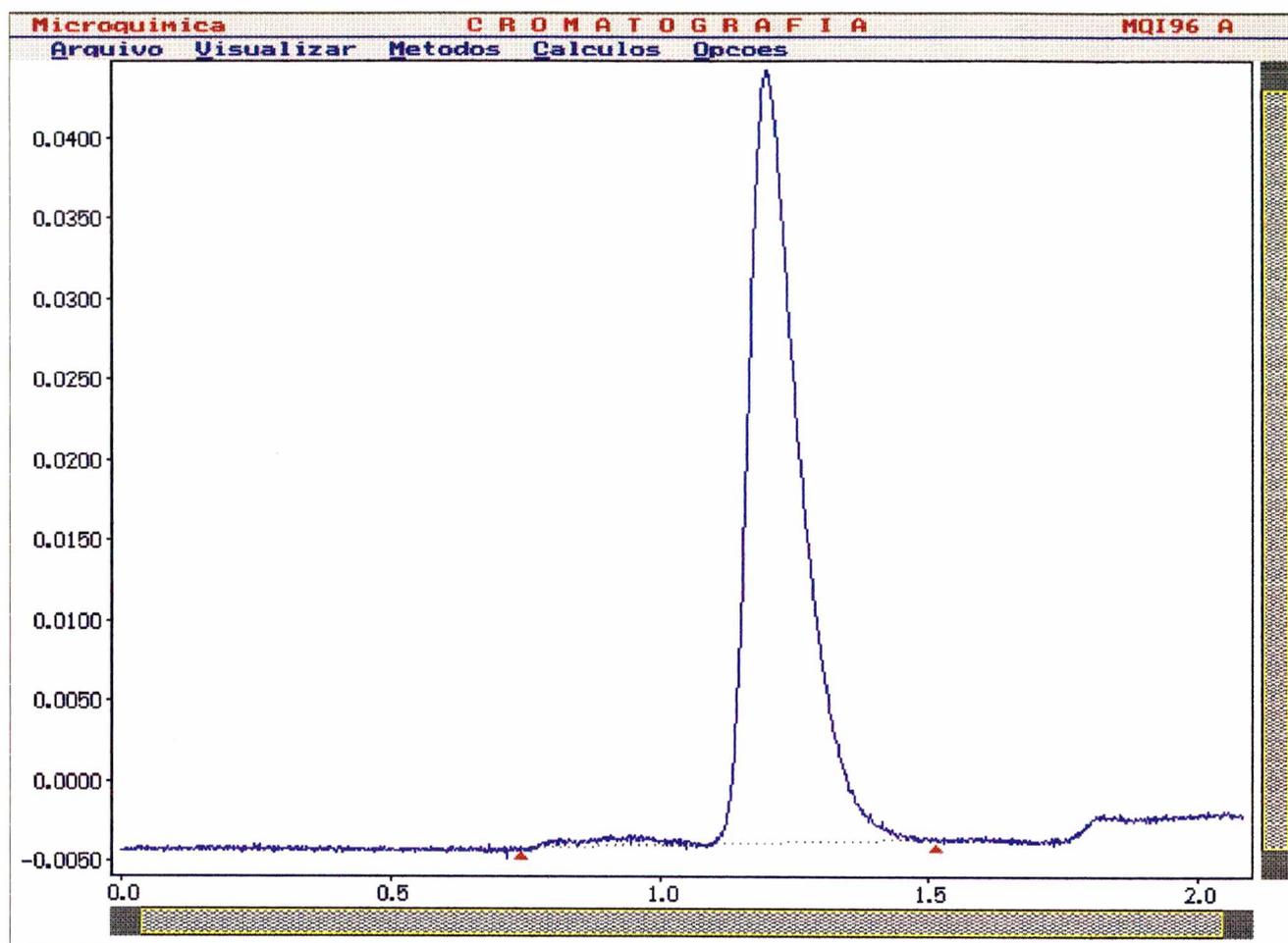


Figura 2.5 - Exemplo de uma curva de calibração de etanol com concentrações entre 0,1 e 1,5 g/l.



Relatorio						
Arquivo						
Nome do arquivo...: C:\CR96\RITA\FERME~2\15T10-1.DAD						
Tipo de amostra...: ETOH						
Nome do operador...: RITA						
Data.....: 20/03/98						
Nº	Nome	Tempo	Area	Area%	Altura	Altura%
1	ETOH	1.198	3.242	100.000	0.0480	100.00

Figura 2.6 – Apresentação de um cromatograma típico de análise de amostras com as telas de aquisição de dados e de relatório.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos experimentos descritos no capítulo de Material e Métodos.

Os resultados apresentados são referentes aos ensaios enzimáticos e ensaios de culturas em “shaker” e em biorreatores com processos batelada e batelada alimentada.

Em anexo são mostradas tabelas e figuras com os resultados experimentais.

1 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Foram realizados dois ensaios enzimáticos com a enzima amiloglicosidase (AMG 200L), sendo um para a verificação da influência da concentração de substrato e outro para determinar a melhor concentração de enzima. Em ambos foi utilizada a solução-mãe de amido liquefeito como substrato.

1.1 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA AMILOGLICOSIDASE - TESTE DAS VELOCIDADES INICIAIS

Os testes foram realizados com diferentes concentrações de amido de mandioca comercial previamente liquefeito com enzima α -amilase, à temperatura de 55-57°C e pH tamponado de 4,5. Em todos os ensaios foi utilizado um volume de enzima de 50 μ l.

As Figuras 3.1 e 3.2 demonstram a evolução da formação de glicose durante a hidrólise de amido liquefeito para concentrações iniciais de 1,5; 3,0; 6,0 e 15,0 e 30,0; 60,0; 90,0 e 300,0 g/l, respectivamente. Todas as curvas partem do zero por ter sido subtraída a concentração de glicose formada no processo de liquefação do

amido, de forma a se obter a concentração de glicose formada somente durante a reação com a amiloglicosidase.

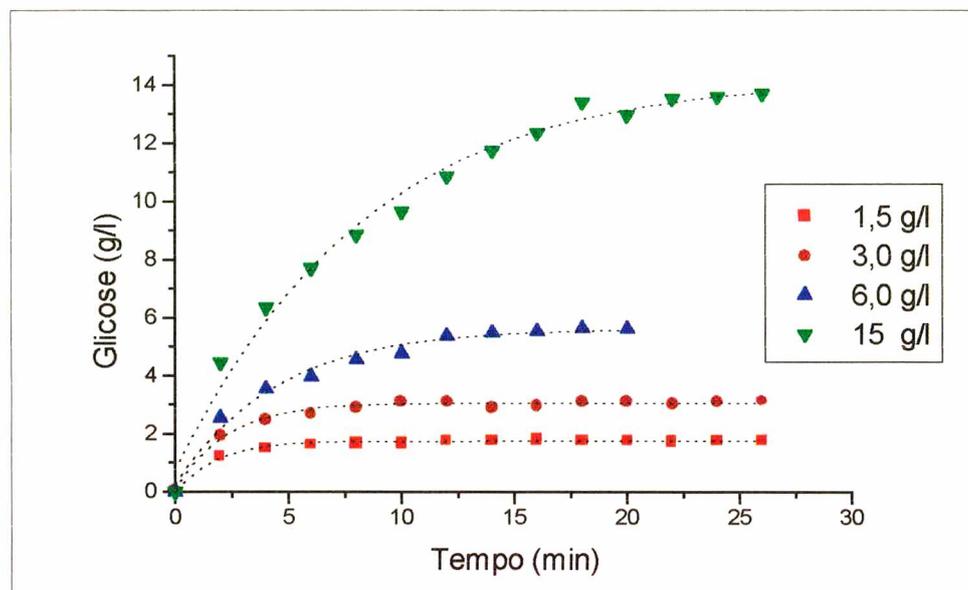


Figura 3.1 – Concentração de glicose formada (g/l) contra o tempo (min), com concentrações iniciais de amido liqüefeito de 1,5; 3,0; 6,0 e 15,0 g/l.

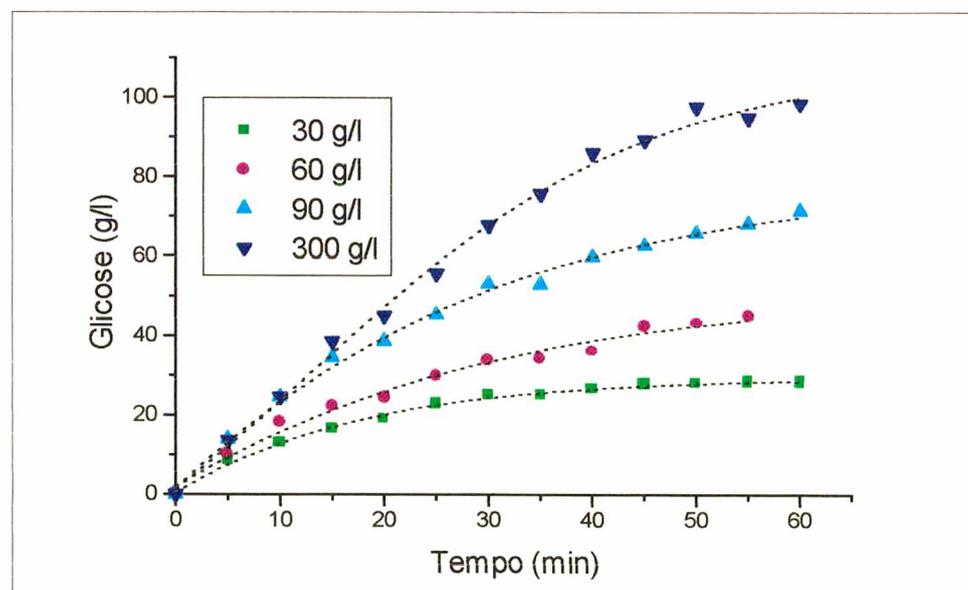


Figura 3.2 – Concentração de glicose formada (g/l) contra o tempo (min), com concentrações iniciais de amido liqüefeito de 30,0; 60,0; 90,0 e 300,0 g/l.

Pode-se verificar, nas Figura 3.1 e 3.2, que com o aumento da concentração de substrato aumenta a velocidade de formação de produto.

A Tabela 3.1 apresenta os valores de velocidades iniciais de reação e unidade de amiloglicosidase para as concentrações testadas. Os cálculos da velocidades iniciais foram realizados de forma que fossem obtidas diretamente o valor da unidade (U) da amiloglicosidase determinada em tampão acetato de sódio 2 M, pH 4,5 e temperatura de 55–57° C. A atividade foi obtida dividindo-se a unidade pelo volume de enzima utilizado nos ensaios e a atividade específica é o quociente da atividade pela concentração de proteína da solução de enzima (129,56 g/l), determinada pelo método de Biureto. As curvas de atividade obtidas com cada concentração inicial de amido liquefeito, bem como as tabelas contendo os valores determinados durante os experimentos, se encontram no Anexo I.

Tabela 3.1 – Velocidade inicial da reação da enzima amiloglicosidase em função da concentração de substrato, pH 4,5 e temperatura de 55-57° C

Concentração de amido liquefeito (g/l)	Velocidade inicial de reação média (g/l.min)	Unidade média (U)	Atividade média (U/ml)	Atividade específica média (U/mg)
1,5	1,28	356,45	7.129,0	55,02
3,0	1,67	520,18	10.403,6	80,30
6,0	1,93	537,84	10.756,8	83,03
15,0	1,96	538,99	10.779,8	83,20
30,0	1,86	512,61	10.252,2	79,13
60,0	2,02	556,18	11.123,6	85,86
90,0	2,02	560,73	11.214,6	86,56
150,0	1,91	549,64	10.992,8	84,85
300,0	2,07	551,77	11.035,4	85,18

Observando-se a Tabela 3.1, pode-se verificar menores velocidades quando se trata de concentrações iniciais baixas de amido liquefeito (1,5 e 3,0 g/l), isso pode ser devido ao fato de que nessas situações não se tem todos os sítios ativos da enzima amiloglicosidase preenchidos, contudo tem-se a transformação completa do amido em glicose no tempo de reação, como pode ser visto na Figura 3.1, ao passo que para a concentração inicial de amido liquefeito de 300,0 g/l não se tem a transformação completa durante o tempo do experimento.

Os valores de velocidade inicial (Tabela 3.1), apresenta-se com uma certa constância a partir de 6,0 g/l de concentração de amido liquefeito, podendo ser atribuído a uma saturação da enzima.

Atribuímos o valor obtido nos ensaios de 30 g/l de amido liquefeito à algum tipo de erro experimental, que pode estar relacionado a falta de controle de temperatura.

Fazendo-se uma média dos valores de atividade específica obtidos após a saturação da enzima temos de 84,5 U/mg se aproxima do valor obtido por ZANIN (1989) que foi de 83,6 U/mg.

Com a construção de um gráfico (Figura 3.3) de atividade específica (U/mg) contra a concentração de amido liquefeito (g/l), pode-se verificar uma boa aproximação a uma cinética de Michaelis-Menten, com uma curva em forma de uma hipérbole. Para o ensaio com a concentração inicial de 300 g/l de amido liquefeito, a atividade específica diminui, podendo isto ser atribuído a uma possível inibição da enzima pelo substrato. ZANIN (1989) verifica efeitos de inibição pelo substrato com concentrações de amido liquefeito a partir de 50 g/l usando uma concentração de amiloglicosidase 20 vezes menor em seus experimentos.

Devemos salientar a dificuldade em se manter constante a temperatura de reação, pois foi utilizado como reator um béquer, sendo este submetido à aquecimento somente em sua parte inferior. Ao se observar as curvas dos experimentos plotadas juntas, Anexo I, nota-se uma pequena diferença que pode ser justificada por variações de temperatura ocorridas durante o processo e por terem sido realizadas em aquecedores diferentes. Contudo pode-se dizer que as hidrólises foram realizadas com sucesso.

Tendo-se observado uma maior velocidade de reação para a concentração de 300 g/l, e ainda apoiado ao fato de se ter um menor volume de reação para uma maior concentração de glicose, foi definido que as hidrólises realizadas para a obtenção de substrato para as fermentações teriam como concentração inicial de amido liquefeito, 300 g/l, o que está de acordo com as recomendações da Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil SA., fabricante das enzimas.

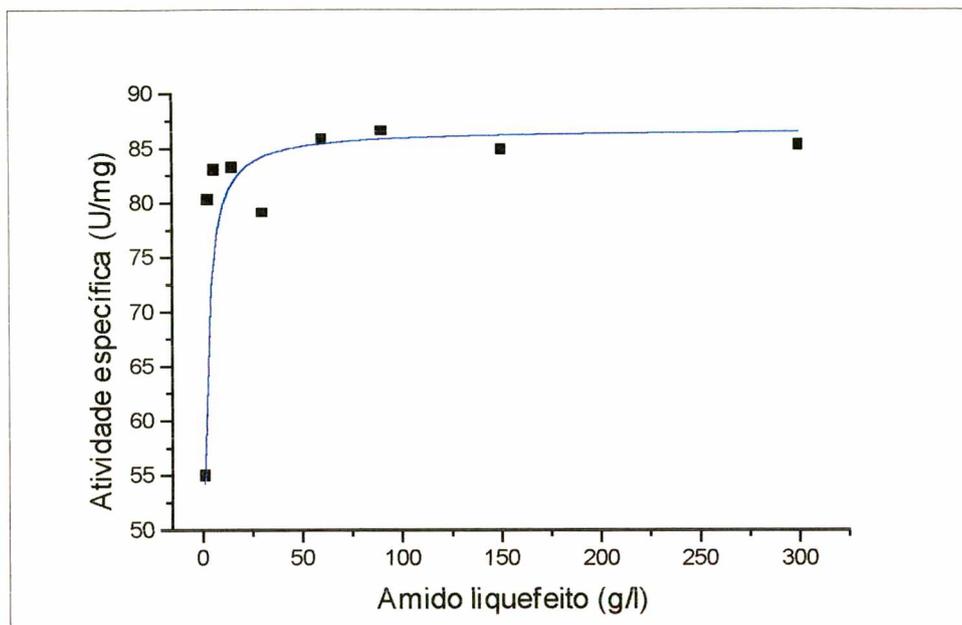


Figura 3.3 – Atividade específica (U/mg) em função da concentração inicial da solução de amido liqüefeito (g/l) para a enzima amiloglicosidase – pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

1.2 – TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA AMILOGLICOSIDASE

Visando um melhor rendimento em glicose, testou-se a influência da concentração de enzima amiloglicosidase AMG 200L. Os ensaios foram realizados sobre uma concentração inicial de substrato de 300 g/l (solução-mãe).

Os resultados podem ser verificados na Figura 3.4.

A formação de glicose (g/l) foi acompanhada desde a ação da enzima α -amilase ocorrida no tempo zero (Figura 3.4). Pode-se verificar que há uma baixa formação de glicose nesta etapa, vindo a confirmar a maior formação de dextrinas limite e outros oligossacarídeos não determinados neste trabalho (NOVO NORDISK, 1996). A etapa de sacarificação se inicia com cerca de 9,5 g/l de glicose formada durante a ação da α -amilase.

Utilizando-se 1ml de enzima/l de solução de amido liqüefeito (300g/l), durante 260 minutos, pH 4,5 e temperatura de 55-57°C; obteve-se uma concentração de 205,79 g/l de glicose. Este valor supera em 37,8 % o valor obtido com 0,5 ml de enzima/ l de solução de amido liqüefeito (300g/l) – 128 g/l de glicose, nas mesmas condições.

Durante outras hidrólises realizadas sem um acompanhamento mais rigoroso tivemos produções de 210,4; 212,8; 231,6; 228,1; 221,1; 203,5 e 223,3 g/l de glicose com 1 ml de enzima/l de solução.

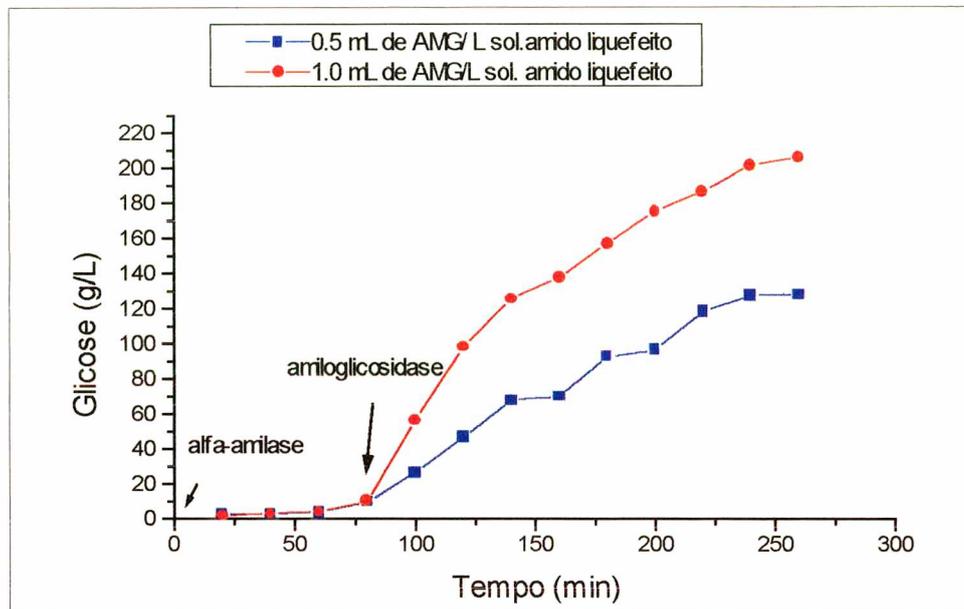


Figura 3.4 – Formação de glicose (g/l) contra o tempo (min) para concentrações de 0,5 e 1,0 ml enzima amiloglicosidase/l de solução de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Se considerarmos o cálculo da concentração total de glicose formada durante a hidrólise do amido proposto por CHIANG e JOHNSON (1977), o qual usa um fator de conversão de amido (trigo suave) em glicose de 1,1; nessa reação obtivemos um rendimento médio (218,7 g/l de glicose) de 66,3%, no tempo proposto. EJIOFOR et al. (1996), utilizando o mesmo período de hidrólise para amido de mandioca liqüefeito com concentração inicial de 200 g/l, conseguiu um rendimento de aproximadamente 69% de glicose e o restante dos produtos foram essencialmente maltose e isomaltose, e as mesmas condições utilizadas neste trabalho.

Em termos de atividade específica, foram obtidos valores de 93,5 U/mg e 83,3 U/mg para enzima amiloglicosidase AMG 200L, nos ensaios com 1,0 e 0,5 ml de enzima/l de solução-mãe, respectivamente. O experimento com 1,0 ml de enzima teve sua atividade 10,9 % maior que o experimento realizado com 0,5 ml de AMG. Segundo ZANIN (1989), a concentração de 1 ml de enzima/l de solução tem

garantida a ocupação de todos os sítios ativos da enzima, o que faz com que haja um maior aproveitamento da sua capacidade catalítica.

Apesar de terem sido testadas somente duas concentrações de enzima amiloglicosidase AMG 200L, ficou determinado que as hidrólises posteriores seriam realizadas com 1ml de enzima/l de solução de amido liquefeito (300g/l), nas mesmas condições do experimento, tendo como tempo de reação 240 minutos. Após este tempo, a temperaturas superiores a 50°C, há uma redução da atividade da amiloglicosidase.

2 – CULTURAS DE CÉLULAS EM “SHAKER”

Foram realizados experimentos em frascos Erlenmeyer utilizando-se o meio proposto por WIN et al. (1996), variando-se as concentrações de extrato de levedura (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g/l) em substituição à solução vitamínica referenciada, para o cultivo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa CCT 1530. Para a execução dos ensaios foi usada uma velocidade de agitação de 100 min⁻¹ e temperatura de 30°C.

O objetivo destes ensaios foi de estudar a viabilidade de substituição da solução de vitaminas por extrato de levedura para facilitar a manipulação e garantir uma esterilização eficiente do meio de cultura. O fato de as vitaminas terem sua atividade extremamente fragilizada quando em solução, as torna ainda menos atraente do uso.

Para a escolha da melhor concentração de extrato de levedura levou-se em consideração a concentração final de célula e o fator de conversão de glicose em célula ($Y_{X/G}$) dos valores médios dos experimentos realizados. Os resultados experimentais podem ser verificados no Anexo II.

A Figura 3.5 apresenta os valores das concentrações finais de células (g/l) obtidas nos ensaios realizados com solução de vitamina e concentrações de extrato de levedura de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g/l.

Como demonstra a Figura 3.5, o melhor resultado obtido foi de 1,58 g/l de células para a concentração de extrato de levedura de 3,0 g/l, nas condições do experimento. Este valor superou em 29,1% o resultado do ensaio utilizando a solução de vitaminas proposta por WIN et al. (1996).



Figura 3.5 – Concentração final de células (g/l) para as diferentes concentrações de extrato de levedura (Y.E.) e solução vitamínica, obtida com 12 horas de cultivo em “shaker”.

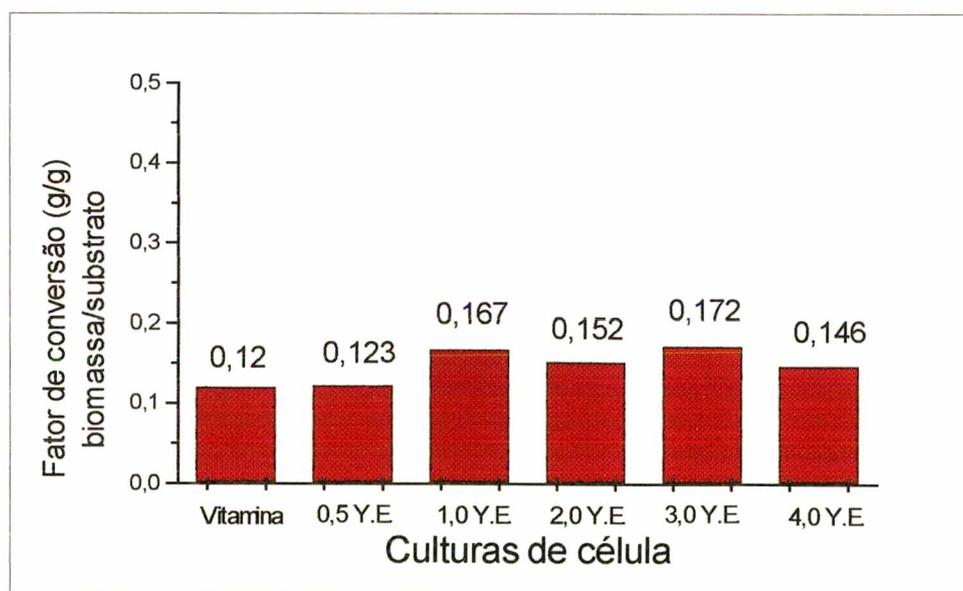


Figura 3.6 – Fator de conversão de glicose em células (g/g) para as diferentes concentrações de extrato de levedura (Y.E.) e solução vitamínica, obtida com 12 horas de cultivo em “shaker”.

Na Figura 3.6 estão apresentados os fatores de conversão (g células /g de glicose), $Y_{X/G}$, dos ensaios realizados em shaker. Pode-se verificar um maior

rendimento na cultura de células que tiveram o meio adicionado de 3,0 g/l de extrato de levedura, apresentando um fator de conversão de substrato em célula de 0,172 g/g. O valor mostrado pela cultura com solução de vitamina foi de 0,12 g/g, 30% menor.

O fator de conversão global obtido por WIN et al. (1996) foi de 0,18 g/g utilizando um biorreator aerado e processo batelada. O valor de 0,17 g/g conseguido no experimento com 3,0 g/l de extrato de levedura, foi considerado muito bom, levando-se em consideração que o ensaio foi realizado em "shaker" sem o controle de pH. Contudo, apesar da concentração de 3,0 g/l de extrato de levedura ter sido o maior obtido, as demais concentrações também se apresentaram muito boas.

Diante dos resultados obtidos com estes ensaios ficou determinado que os demais ensaios fermentativos deveriam ser realizados com o meio de WIN et al. (1996), tendo como substituto para a solução de vitaminas o extrato de leveduras na concentração de 3,0 g/l, além do que esta concentração é a encontrada na formulação do meio YMA, meio recomendado pela Fundação Tropical de Pesquisa André Tosello, banco de cepas.

3. CULTURA DE CÉLULAS EM BIORREATOR

Estão apresentados e discutidos, neste item, os experimentos realizados em biorreatores fazendo-se uso dos processos em batelada simples e batelada alimentada, visando a determinação das cinéticas de crescimento e melhoria dos parâmetros de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, cepas CCT 1530 e CCT 1531.

3.1 – CULTURA EM BATELADA SIMPLES

Os resultados dos experimentos realizados em processo batelada simples, estão demonstrados neste item. São discutidos os ensaios com a cepa CCT 1530 e cepa CCT 1531, onde foram testadas a influência da concentração inicial de

substrato, influência da concentração da fonte de nitrogênio (cepa CCT 1530) e comportamento das cepas crescendo em meio complexo YM.

A influência da concentração inicial de substrato foi avaliada visando uma maior produção de células, uma vez que é sabido que a *Saccharomyces cerevisiae*, quando em presença de excesso de glicose desvia seu metabolismo para um metabolismo fermentativo, apresentando uma oxidação incompleta do substrato levando a um processo pouco energético em termos de produção de ATP.

Para verificar a possibilidade de haver insuficiente quantidade de nitrogênio no meio reacional, foi realizado um ensaio com a cepa CCT 1530 contendo o dobro da concentração de sulfato de amônia (20 g/l) e uma concentração de 15 g/l de glicose inicial.

O meio YM, sugerido por OLIVEIRA (1995) e o meio de sais sugerido por WIN et al. (1996) e modificado na fase de cultura em "shaker", foram testados para testar a influência do meio no crescimento da levedura.

Nas cultura em batelada simples foram determinados os parâmetros cinéticos do crescimento celular: fator de conversão de glicose em células ($Y_{X/G}$), fator de conversão de etanol em célula ($Y_{X/ETOH}$), velocidade máxima de crescimento sobre glicose ($\mu_{X/G}$), velocidade máxima de crescimento sobre etanol ($\mu_{X/ETOH}$) e produtividade em célula (P_X)

A discussão dos resultados está separada, primeiramente, de acordo com a cepa e, após isto, fica estabelecida a comparação entre as cepas utilizadas.

3.1.1 – ENSAIOS COM A CEPA CCT 1530

3.1.1.1 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO – CEPA CCT 1530

Foram realizados ensaios com concentrações iniciais de substrato de 5, 10 e 15 g/l. A glicose proveniente da hidrólise do amido de mandioca foi utilizada como substrato carbonado das culturas.

O processo foi realizado sem controle de pH. Os demais parâmetros de processo foram temperatura de 30°C, frequência de agitação de 400 rpm e a aeração de 3,6 l/min. A agitação mantida em 400 rpm, a mesma utilizada por OLIVEIRA (1995), é uma parâmetro importante por participar da partição das bolhas

de ar, e conseqüentemente, melhorar a aeração do meio. O pH não foi controlado por haver falhas no equipamento, contudo, este foi monitorado.

As Figuras 3.7, 3.8 e 3.9 mostram a cinética de crescimento da cultura de células de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 para os ensaios com concentrações iniciais de glicose (hidrolisado de amido de mandioca) de 5, 10 e 15 g/l, respectivamente. O tempo de cultura foi de 23 – 26 horas com o monitoramento do pH, concentração celular, concentração de etanol e concentração de glicose.

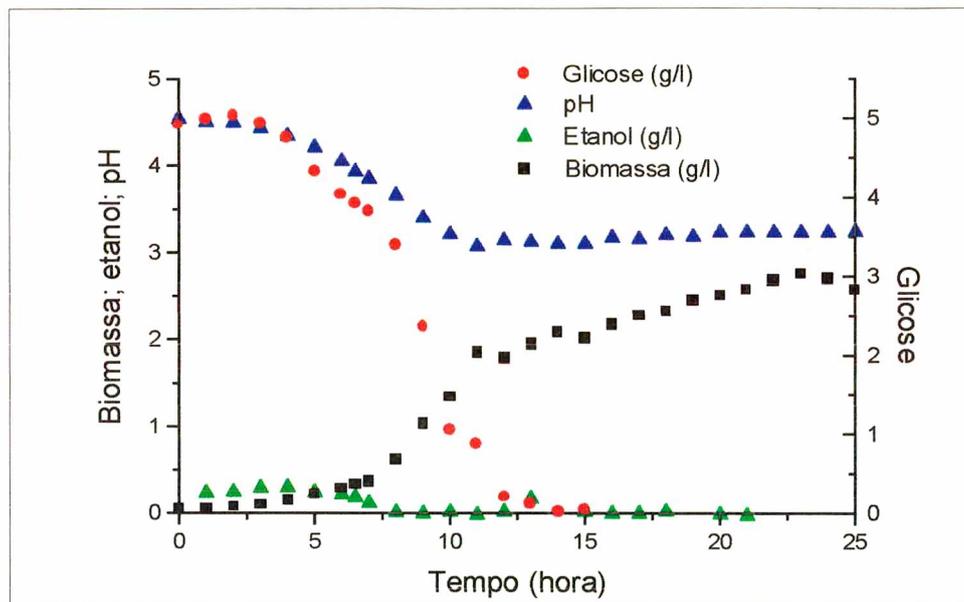


Figura 3.7 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de células, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 5 g/l de glicose inicial.

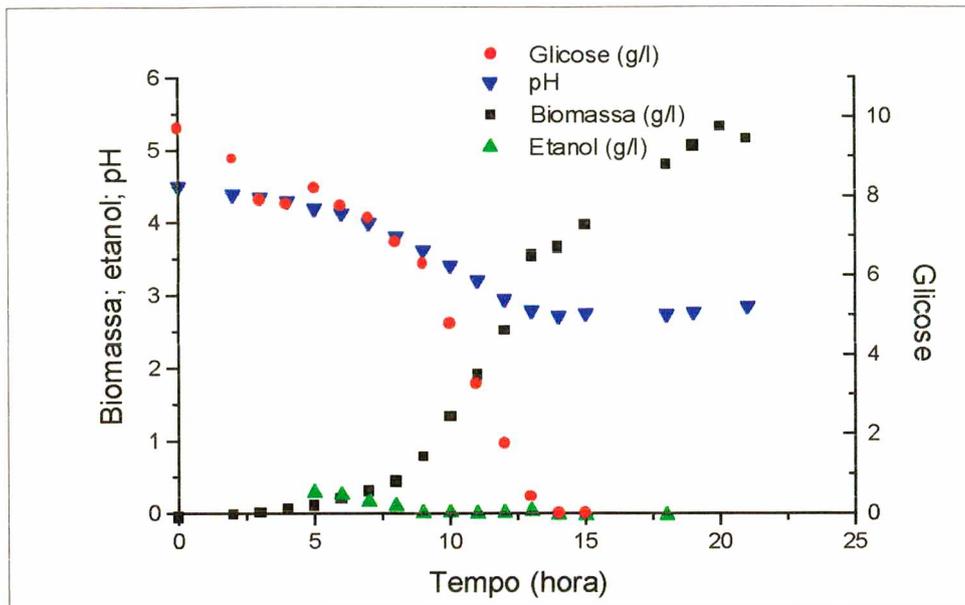


Figura 3.8 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de células, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 10 g/l de glicose inicial.

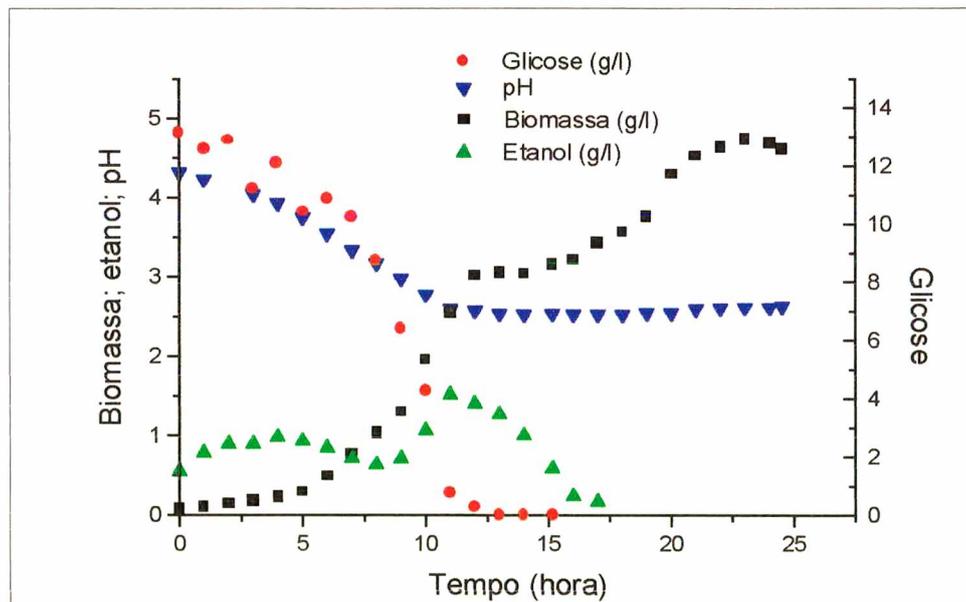


Figura 3.9 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de células, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 15 g/l de glicose inicial.

De acordo com as cinéticas de crescimento apresentadas nas Figuras 3.7, 3.8 e 3.9, existem três fases bem definidas na curva do crescimento celular. A primeira fase, que vai do início do processo e termina onde a curva de substrato tende a zero, é a fase em que se tem o consumo de glicose como substrato. A segunda fase se caracteriza por uma parada no crescimento celular, que pode variar de 1 à 4 horas e se inicia quando o substrato principal, a glicose, é exaurida do meio. Neste período a levedura se adapta ao novo substrato sintetizando as enzimas necessárias para a assimilação de outro tipo de molécula, que não glicose, que pode estar presente no meio reacional. A terceira fase ocorre com a utilização pela levedura de outro substrato carbonado, que pode ser etanol ou outro açúcar proveniente da hidrólise incompleta do amido, esta se mostra menos acentuada que a primeira fase, em função da baixa concentração de substrato presente, ou devido a uma menor afinidade da levedura pela molécula.

Uma cinética típica seria a terceira fase de crescimento se dar em função do consumo de etanol, contudo pode-se observar na Figuras 3.7, 3.8 e 3.9, que apesar de não haver concentrações aparentes de etanol, esta fase se apresenta ascendente. Uma justificativa para este comportamento pode ser dada com a possível existência de outras fontes de carbono assimiláveis pela levedura.

MARC (1982) e GRIFFIN (1970) demonstram que, após o consumo do substrato principal, glicose, a *Saccharomyces cerevisiae*, quando em presença de outros açúcares redutores de baixo peso molecular, passa a consumir a maltose, maltotriose e frutose como fonte de carbono. Como é sabido, não se tem uma hidrólise completa do amido, assim, é muito provável que se tenha presente no meio dextrinas limite e, até, maltose e maltotriose.

O consumo dos açúcares redutores diferentes de glicose (AR) ocorre de forma mais lenta como pode ser verificada através da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X/AR}$) demonstrado na Tabela 3.2.

O monitoramento dos diversos açúcares redutores contidos na solução de amido liquefeito não foi realizado em virtude da limitação de equipamento para a análise dos mesmos.

Na Figura 3.9 pode se verificar uma maior produção de etanol, significando que à concentração inicial de 15 g/l de glicose há um favorecimento do metabolismo fermentativo por ação do efeito crabtree, com conseqüente redução no rendimento em célula no processo.

A Tabela 3.2 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos obtidos com a culturas da cepa CCT 1530, com concentrações iniciais de glicose de 5, 10 e 15 g/l de glicose de mandioca. A determinação destes valores pode ser avaliada no Anexo III.

Tabela 3.2 – Parâmetros cinéticos determinados nos ensaios em batelada simples com a cepa CCT 1530, para o estudo da influência da concentração inicial de substrato.

Conc. inicial de glicose (g/l)	$\mu_{X/G}$ (h^{-1})	$\mu_{X/AR}^{**}$ (h^{-1})	$Y_{X/G}$ (g/g)	$Y_{X/ETOH}$ (g/g)	P_x (g/l.h)
5	0,34	0,031	0,40	---	0,118
10	0,48	0,054	0,44	---	0,266
15	0,32	0,043	0,23	0,18	0,202

** AR são os açúcares redutores fermentecíveis que não seja glicose

Na Tabela 3.2 vemos que os maiores valores foram os obtidos com as culturas realizadas com 10 g/l de glicose inicial. Acreditamos que 5g/l de glicose foi insuficiente para o bom rendimento da cultura, enquanto que 15 g/l de glicose inicial se mostrou superior à concentração crítica, onde o metabolismo é desviado para a rota anaeróbica, com produção de etanol.

Os fatores de conversão de outros açúcares redutores em célula para as concentrações de 5 e 10 g/l não puderam ser calculados, como já citado, devido a concentração de açúcares redutores totais não ter sido determinada.

O fator de conversão de etanol em célula da cultura de 15 g/l de glicose pode estar refletindo um valor mascarado de um fator de conversão de outros açúcares redutores (AR) presentes no meio, por poder estar havendo uma concomitante assimilação pela levedura de etanol e AR.

Os experimentos foram realizados em duplicata, tendo apresentado boa reprodutibilidade dos resultados.

3.1.1.2 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE NITROGÊNIO – CEPA CCT 1530

O ensaio foi realizado com o meio de WIN et al. (1996) modificado, com uma concentração de glicose inicial de 15 g/l e um suprimento de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio de 20 g/l, o dobro da concentração utilizada nos experimentos anteriores (Figura 3.10).

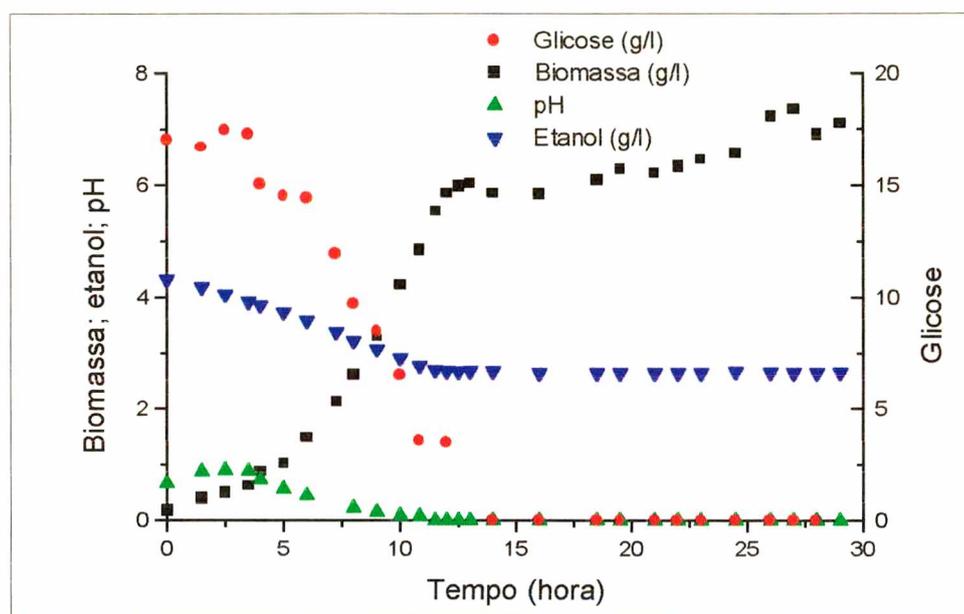


Figura 3.10 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de células, etanol e glicose contra o tempo (h), para processo em batelada simples com 15 g/l de substrato inicial e 20 g/l de fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

A Tabela 3.3 apresenta os parâmetros cinéticos determinados na cultura de célula CCT 1530 com 15 g/l de glicose e 20 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Em comparação com ensaios com 15 g/l de glicose e 10 g/l de fonte de nitrogênio, a cultura com o dobro de nitrogênio apresenta um fator de conversão da ordem de 40% maior e velocidade específica máxima de crescimento sobre glicose 13% menor.

Tabela 3.3 – Parâmetros cinéticos determinados nos ensaios em batelada simples com a cepa 1530, para o estudo da influência da concentração de nitrogênio.

Conc. inicial de glicose (g/l)	$\mu_{X/G}$ (h^{-1})	$\mu_{X/AR^{**}}$ (h^{-1})	$Y_{X/G}$ (g/g)	$Y_{X/ETOH}$ (g/g)	P_X (g/l.h)
15	0,29	0,013	0,34	---	0,128

** AR são os açúcares redutores fermentescíveis que não seja glicose

GUILLOU (1996) apresenta dados de fatores de conversão calculados por SUZUKI et al. (1985) a partir da composição de levedura, sendo que o fator de rendimento de célula sobre nitrogênio é de 8,55 g/g. Como o nitrogênio perfaz 21% da massa de sulfato de amônia teríamos uma produção de célula total de 17,9 g e 35,9 g de células nas culturas com 10 g/l e 20 g/l de fonte de nitrogênio, respectivamente. Portanto, como nos ensaios realizados, a concentração de célula não ultrapassou 7 g/l, não houve limitação de nitrogênio nos meios utilizados.

Segundo AMORIM (1977) a fermentação alcoólica ocorre de forma mais rentável em presença de concentrações baixas de nitrogênio, entre 500 e 600 ppm. ZAGO (1982) citado por RIBEIRO, et al.(1987), afirma que o nitrogênio foi o elemento cuja deficiência mais evidenciou o decréscimo na produção de matéria seca das leveduras de panificação Fleischmann, IZ 1904 e M 300A. Contudo o que foi observado neste ensaio foi um aumento do fator de conversão de 48% em relação ao ensaio com a mesma concentração de glicose inicial (15 g/l).

Apesar de se apresentar com resultados superiores aos obtidos nas culturas sem suplementação de nitrogênio, o ensaio suplementado não superou os valores apresentados pelas culturas realizadas com concentração de glicose inicial de 10 g/l. Isto se deve à influência da concentração de glicose sobre o metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.1.3 – Cultura da cepa CCT 1530 com controle de pH

Valores de pH muito baixos diminuem o rendimento de *Saccharomyces cerevisiae* (VERDUYN, 1991). Para verificar a influência do pH sobre a cinética de crescimento da cepa CCT 1530, foi escolhida a cultura com a concentração de 10 g/l

de glicose inicial, a qual apresentou melhores comportamentos cinéticos, para a realização do ensaio.

A Figura 3.11. demonstra a cinética de crescimento de *S. cerevisiae* CCT-1530 em meio de WIN, et al. (1996) modificado com glicose inicial de 10 g/l e controle de pH.

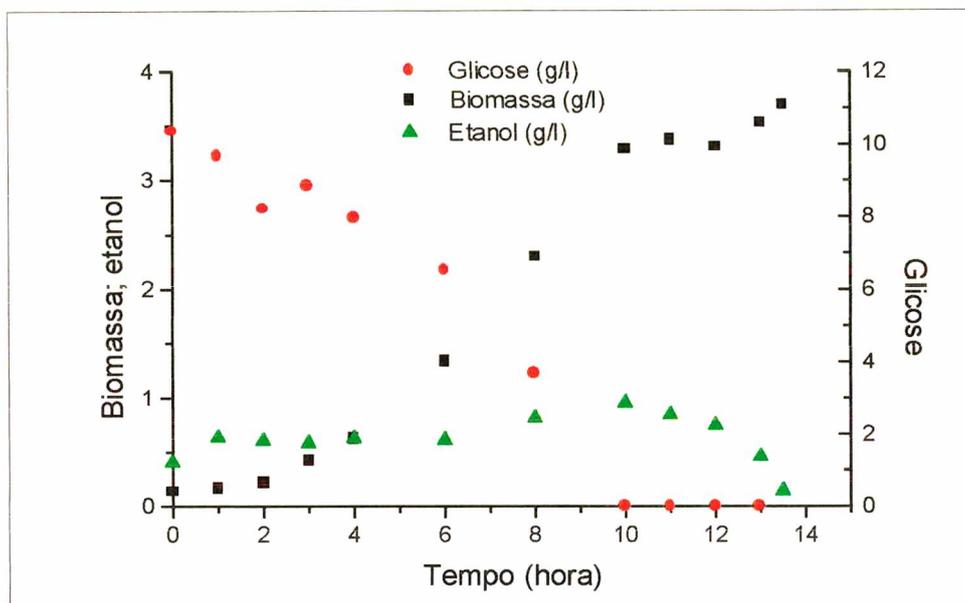


Figura 3.11 Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada em meio de WIN et al. (1996) modificado simples com 10 g/l de glicose inicial com controle de pH em 4,5.

De acordo com os valores dos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 3.4, podemos verificar que o fator de conversão de glicose em célula, $Y_{X/G}$, é menor que o valor obtido com a cultura realizada com a mesma concentração de glicose inicial sem correção de pH. Este fato se reflete ao contrário da hipótese inicial proposta, talvez pelo fato de se tratar de uma cepa ácido-tolerante, como declara o banco de cepa de origem (Fundação de Pesquisa e Tecnologia André Tosello).

Pode-se observar, também que houve uma maior produção de etanol, levando a um fator de conversão de etanol em célula, $Y_{X/ETOH}$, elevado (0,48 g/g), e que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X/G}$) se apresentou 29% inferior à mesma cultura sem controle de pH (ver Tabela 3.2)

Tabela 3.4 – Parâmetros cinéticos determinados nos ensaios em batelada simples com a cepa CCT 1530 com controle de pH.

Conc. inicial de glicose (g/l)	$\mu_{X/G}$ (h^{-1})	$\mu_{X/AR^{**}}$ (h^{-1})	$Y_{X/G}$ (g/g)	$Y_{X/ETOH}$ (g/g)	P_X (g/l.h)
10	0,34	0,08	0,33	0,48	0,264

** AR são os açúcares redutores fermentecíveis que não seja glicose

3.1.1.4 – ENSAIO COM MEIO COMPLEXO YM – CEPA CCT 1530

Com intuito de verificar a influência do meio de cultura na cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530, e ainda, estabelecer um comparativo com estudos realizados por OLIVEIRA (1995), foi realizado um ensaio com meio complexo YM. A concentração inicial de glicose de mandioca foi de 10g/l, por ser esta a concentração que resultou em melhores valores dos parâmetros cinéticos obtidos com as culturas utilizando meio de WIN et al. (1996) modificado.

A Figura 3.12 demonstra a cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 em meio YM com acompanhamento da variação do pH, das concentrações de glicose, etanol e célula. O que pode ser observado é que houve uma maior produção de etanol no início da cultura, onde se tinha uma concentração inicial de glicose maior. A presença de uma alta concentração de substrato no início do processo faz com que as células utilizem o caminho fermentativo de crescimento, resultando na produção de etanol e decréscimo do rendimento em célula.

No período de tempo em que o etanol esteve presente, não houve crescimento expressivo da população de célula, o que demonstra uma inibição do crescimento celular frente a este metabólito se traduzindo em uma repressão catabólica. Após o etanol se apresentar numa concentração inferior à concentração crítica (0,5 g/l) a levedura inicia sua fase exponencial de crescimento, atingindo uma velocidade específica de crescimento sobre glicose ($\mu_{X/G}$) de 0,368 h^{-1} .

A glicose no meio de cultivo, este é o substrato preferencialmente consumido pela *S. cerevisiae*, porém se observa que o etanol presente no início do cultivo desaparece, o que sugere um arraste (“stripping”) pelo ar deste composto volátil.

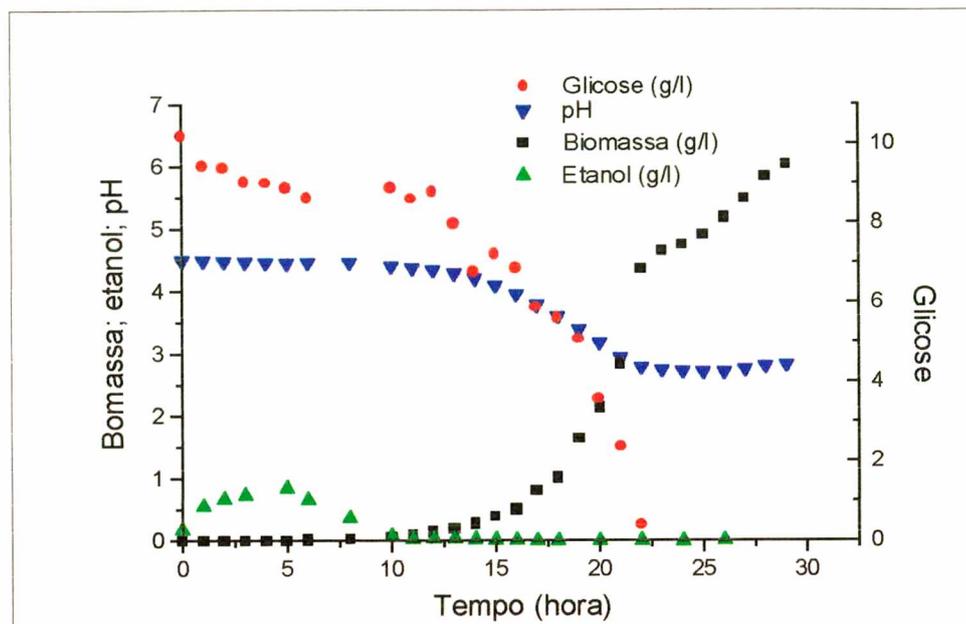


Figura 3.12 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1530, com valores de pH e concentrações (g/l) de célula, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com meio YM contendo 10 g/l de substrato inicial.

Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos estão demonstrados na Tabela 3.5. O fator de conversão sobre glicose de 0,519 g/g, se apresenta muito bom, ficando próximo do resultado obtido com meio de WIN et al. (1996) modificado (0,435 g/g) com a mesma concentração inicial de substrato. A velocidade específica de crescimento sobre glicose neste experimento é da ordem de 15% inferior.

Tabela 3.5 – Parâmetros cinéticos determinados nos ensaios em batelada simples com a cepa CCT 1530 sobre meio YM.

Conc. inicial de glicose (g/l)	$\mu_{X/G}$ (h^{-1})	$\mu_{X/AR^{**}}$ (h^{-1})	$Y_{X/G}$ (g/g)	$Y_{X/ETOH}$ (g/g)	P_X (g/l.h)
10	0,37	0,047	0,52	---	0,214

** AR são os açúcares redutores fermentáveis que não seja glicose

OLIVEIRA (1995) utilizando glicose PA, realizou cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531, obteve uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X/G}$) de $0,28 h^{-1}$ e um fator de conversão sobre glicose de 0,14 g/g. Como demonstra a Tabela 3.5, a cultura da cepa CCT 1530 superou em 24% a velocidade

específica máxima de crescimento e 73% o fator de conversão ($Y_{X/G}$) obtido por OLIVEIRA (1995).

O fator de conversão de glicose em célula, $Y_{X/G}$, de 0,52 g/g, supera os valores obtidos por diversos autores (WIN et al., 1996; EJIOFOR et al., 1996) que utilizaram hidrolisado de mandioca como substrato e processo batelada alimentada, onde se tem a maximização do rendimento. Os autores que realizaram culturas em batelada simples com o mesmo substrato (WIN et al., 1996; NINOW et al., 1994) apresentaram valores de $Y_{X/G}$ da ordem de 0,2 g/g.

3.1.2 – ENSAIOS COM A CEPA CCT 1531

3.1.2.1 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO

Neste tópico estão discutidos os ensaios realizados com a cepa CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado com concentrações iniciais de glicose de mandioca de 5, 10 e 15 g/l. Um ensaio com meio YM e 10g/l de glicose de mandioca, também foi executado.

As Figuras 3.13, 3.14 e 3.15 apresentam as cinéticas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531 para as concentrações iniciais de 5, 10 e 15 g/l de glicose de amido de mandioca hidrolisado, respectivamente. Pode-se verificar um rápido consumo de glicose, ficando esta ausente o meio a partir da 5^a hora de ensaio, com uma produção de concentrações razoáveis de etanol. Isto indica que houve um direcionamento do metabolismo da levedura à fermentação, com consequente diminuição do rendimento da cultura em células.

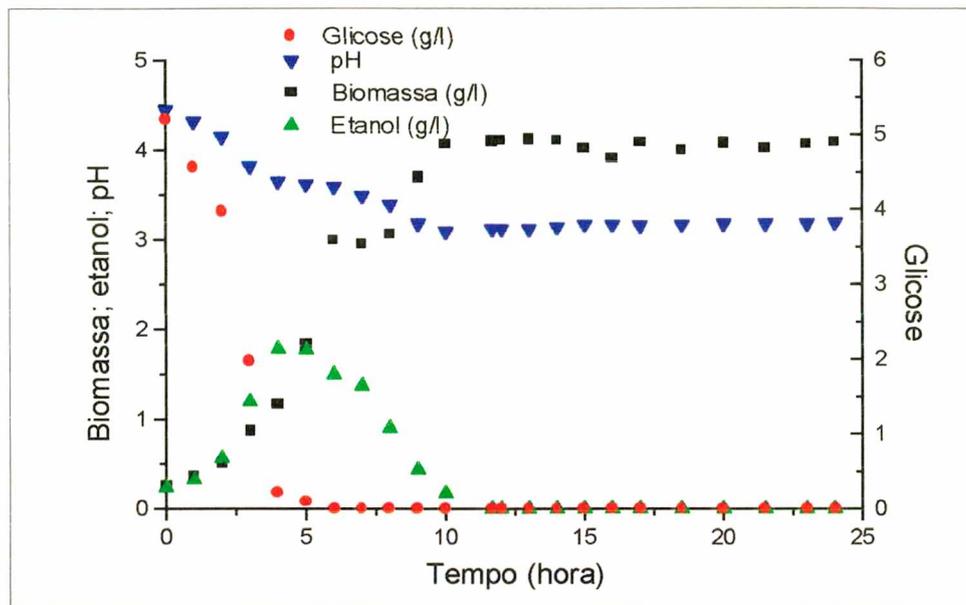


Figura 3.13 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de células, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 5 g/l de glicose inicial.

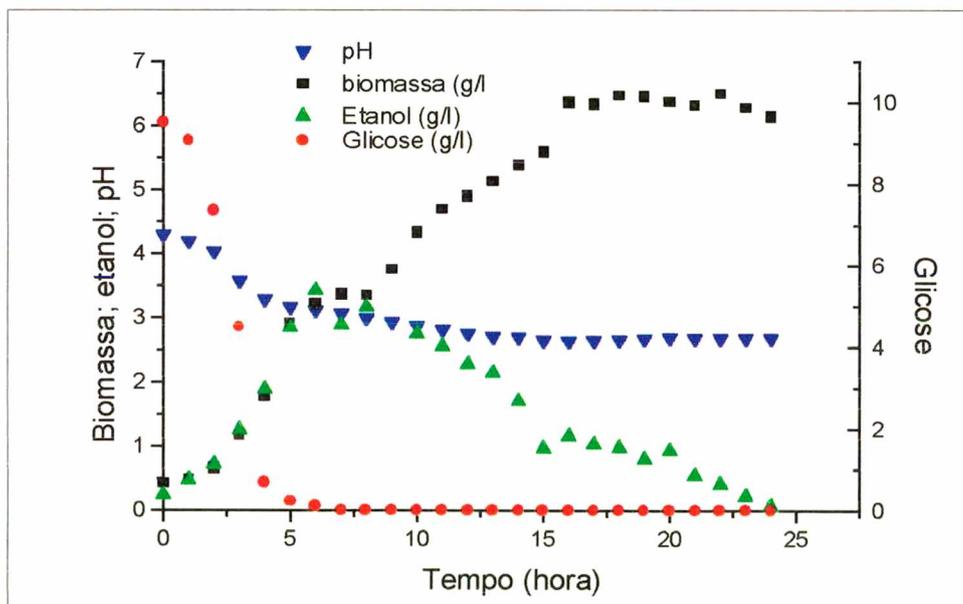


Figura 3.14 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de células, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 10 g/l de glicose inicial.

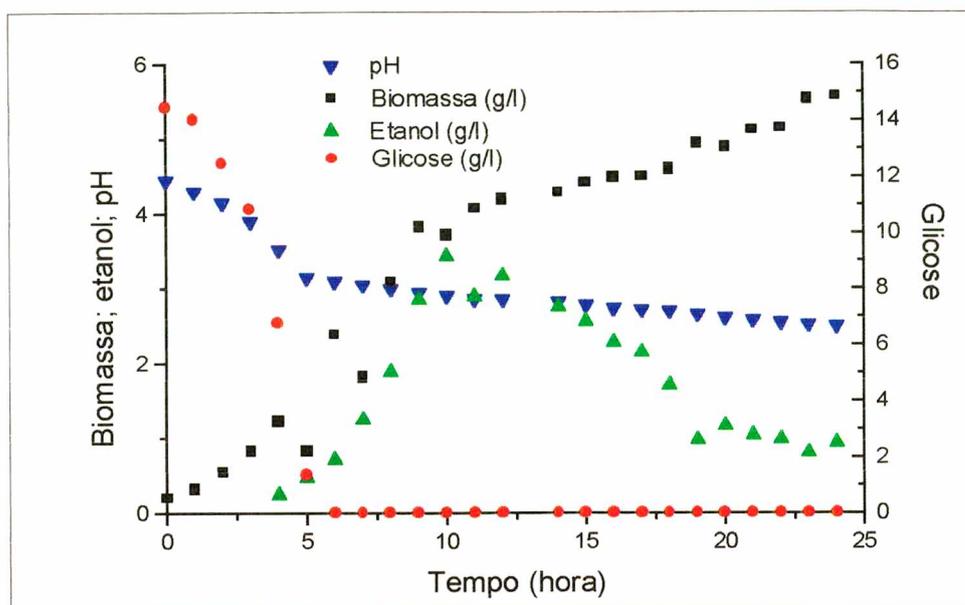


Figura 3.15 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, com valores de pH e concentrações (g/l) de células, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 15 g/l de glicose inicial.

As curvas de crescimento de célula apresentam duas fases ascendentes nítidas, sendo que a primeira se dá em função do consumo de glicose e a segunda está relacionada a uma utilização de etanol pela levedura, como fonte de carbono.

A presença de outros açúcares fermentáveis no meio foi observada nos ensaios realizados com a cepa CCT 1530. Assim pode estar havendo um consumo de outros açúcares redutores juntamente com o etanol, também na cultura CCT 1531.

Contudo, devido a incerteza de estar havendo utilização de outros açúcares redutores o cálculo de fator de conversão e velocidade máxima específica de crescimento foram realizadas sobre o etanol.

No Anexo III estão demonstradas as determinações das velocidades específicas máximas de crescimento sobre glicose ($\mu_{X/G}$), etanol ($\mu_{X/ETOH}$), bem como os fatores de conversão de glicose em célula ($Y_{X/G}$) e etanol em célula ($Y_{X/ETOH}$). Os valores dos parâmetros cinéticos das culturas de células CCT 1531, para as três concentrações de substratos inicial, estão apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Parâmetros cinéticos determinados nas culturas em batelada simples com a cepa CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, para o estudo da influência da concentração inicial substrato.

Conc. inicial de glicose (g/l)	$\mu_{X/G}$ (h^{-1})	$\mu_{X/ETOH}$ (h^{-1})	$Y_{X/G}$ (g/g)	$Y_{X/ETOH}$ (g/g)	P_x (g/l.h)
5	0,36	0,14	0,18	1,81	0,160
10	0,41	0,08	0,16	0,97	0,276
15	0,41	0,11	0,12	nd ¹	0,224

¹ não determinado

Os fatores de conversão de etanol em célula ($Y_{X/G}$) obtidos são superiores aos encontrados na referência, 0,65 g/g – OLIVEIRA (1995), 0,61 g/g – VERDUYN (1991), 0,68 g/g – OLSSON et al. (1997). O que se sugere é que pode estar havendo uma assimilação concomitante de etanol e outros açúcares redutores.

As velocidades específicas máximas de crescimento sobre glicose ($\mu_{X/G}$) das culturas com 10 e 15 g/l de glicose são iguais. Os valores obtidos neste trabalho superam em 32% a melhor velocidade máxima obtida no trabalho de OLIVEIRA (1995) realizado com a mesma cepa, (0,28 h^{-1}); ORLOWSKI e BARFORD (1991) conseguiram um $\mu_{(X/G)}$ de 0,45 h^{-1} em cultura sobre 10 g/l de glicose.

3.1.2.2 – ENSAIO COM MEIO COMPLEXO YM – CEPA CCT 1531

Neste experimento foi utilizada a mesma metodologia e condições de operação efetuada por OLIVEIRA (1995), para verificar as condições atuais da cepa CCT 1531. Para tanto foi utilizado meio complexo YM e glicose PA como fonte de carbono.

A cultura teve o pH controlado e o monitoramento da concentração de célula, concentração de etanol e da concentração de glicose como demonstra a Figura 3.16. Pode-se verificar, assim como ocorreu com as culturas em meio de WIN et al. (1996) modificado da cepa CCT 1531, o processo em meio YM apresenta um rápido consumo de glicose com formação de etanol em concentrações que chegam a 3,9 g/l.

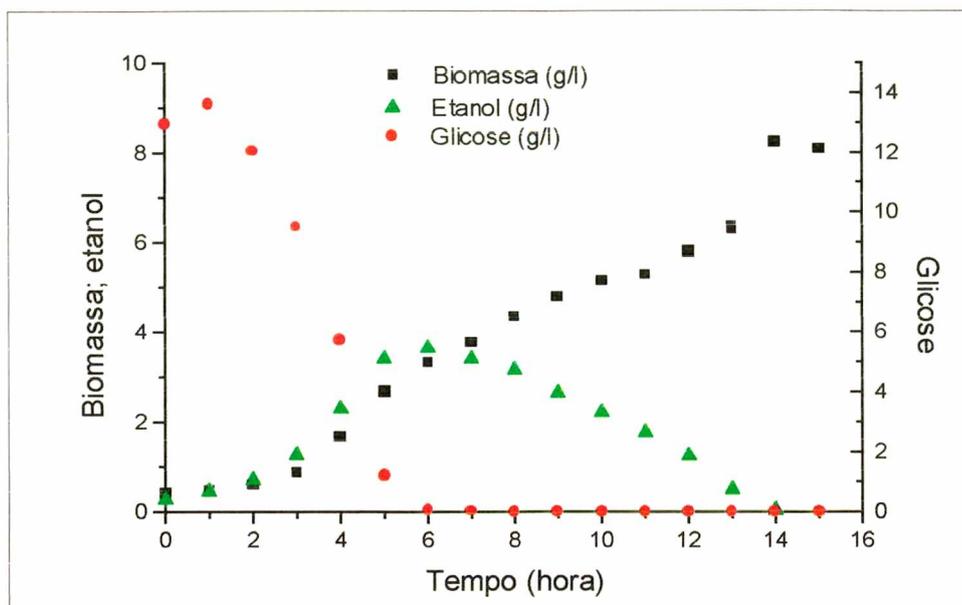


Figura 3.16 – Cinética da cultura de células de *S. cerevisiae* CCT 1531 em meio YM, com valores de concentrações (g/l) de células, etanol e glicose contra tempo (h), para processo em batelada simples com 10 g/l de glicose inicial e pH controlado.

Em relação aos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 3.7, podemos verificar uma velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{X/G}$, levemente maior às obtidas com a mesma cepa CCT 1531, 0,36; 0,41 e 0,41 h^{-1} para as culturas em meio de WIN et al. (1996) modificado com 5, 10 e 15 g/l de glicose, respectivamente. A produtividade P_X dobrou, talvez pelo fato do pH ser mantido em 4,5, ter favorecido o crescimento da levedura.

Tabela 3.7 – Parâmetros cinéticos determinados no ensaio em batelada simples com a cepa CCT 1531 em meio YM e pH controlado.

Conc. inicial de glicose (g/l)	$\mu_{X/G}$ (h^{-1})	$\mu_{X/ETOH}$ (h^{-1})	$Y_{X/G}$ (g/g)	$Y_{X/ETOH}$ (g/g)	P_X (g/l.h)
10	0,43	0,13	0,20	0,80	0,55

Os parâmetros cinéticos demonstrados por OLIVEIRA (1995) nas mesmas condições de ensaio foram: $\mu_{X/G} = 0,28 \text{ h}^{-1}$ e $Y_{X/G} = 0,164 \text{ g/g}$; comparando com os

valores mostrados na Tabela 3.6 verifica-se um $\mu_{X/G}$ da ordem de 35% maior. A justificativa para este fato é que pode ter havido algum tipo de variação no metabolismo da cepa usado por OLIVEIRA (1995), alterando a velocidade de consumo de glicose, já que para o nosso trabalho, a cepa CCT 1531 foi adquirida junto ao banco de cepas na forma reativada, em datas recentes, não tendo sofrido muitos repiques.

3.1.3 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CULTURAS DAS CEPAS CCT 1530 E CCT 1531

A principal característica a ser ressaltada é a produção de etanol, a qual se deu em menores quantidades nas culturas da cepa CCT 1530, demonstrando que a cepa CCT 1531 apresentou um maior desvio do metabolismo respiratório, conduzindo a menores fatores de conversão de glicose em célula. A Figura 3.17 apresenta uma comparação dos valores de $Y_{X/G}$ para as culturas de CCT 1530 e CCT 1531 em meio de WIN et al. (1996) modificado, nas concentrações iniciais de glicose de 5, 10 e 15 g/l.

O rápido consumo de glicose apresentado pela cepa CCT 1531 confirma a preferência desta cepa pelo consumo da glicose na via anaeróbica (CANO E CALOMÉ, 1986).

GUILLOU (1996), apresenta um fator de conversão teórico de glicose em célula, $Y_{X/G}^{teo}$, de 0,73 g/g. Como na prática os maiores fatores de conversão apresentados são da ordem de 0,52 g/g (VERDUYN, 1991), tem-se, aí, um excedente de glicose integrada à demanda pelo anabolismo da célula, tendo-se um valor máximo, $Y_{X/G}^{est}$ estimado em 0,652 g/g, calculado a partir das equações estequiométricas de culturas aeróbicas. Com base no valor estimado e tomando como definição que o rendimento é o valor calculado sobre um fator de conversão máximo, temos os valores de rendimento das culturas realizadas na Figura 3.18.

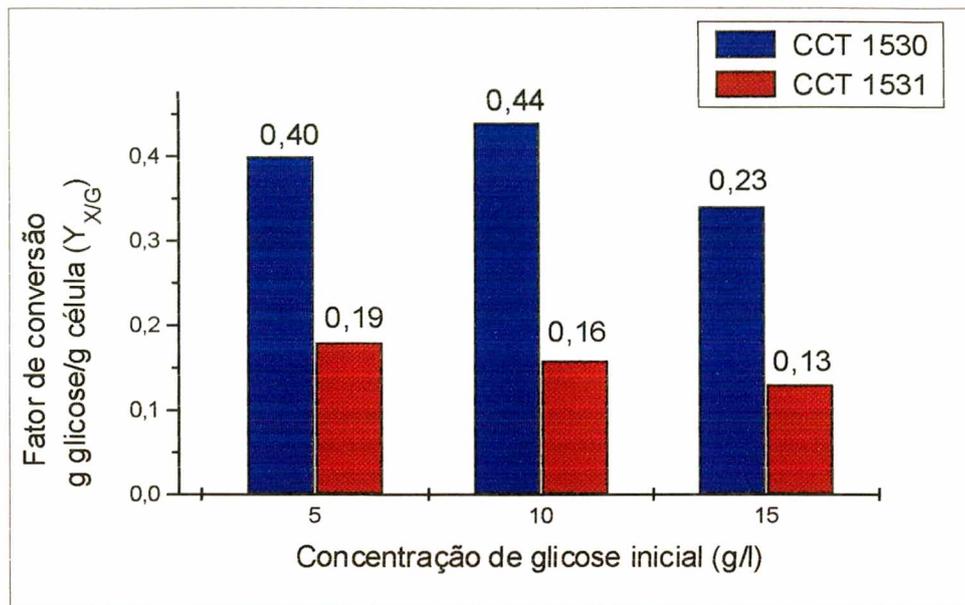


Figura 3.17 – Fatores de conversão de glicose em célula (g/g) para as culturas de células de *S. cerevisiae* CCT 1530 e CCT 1531.

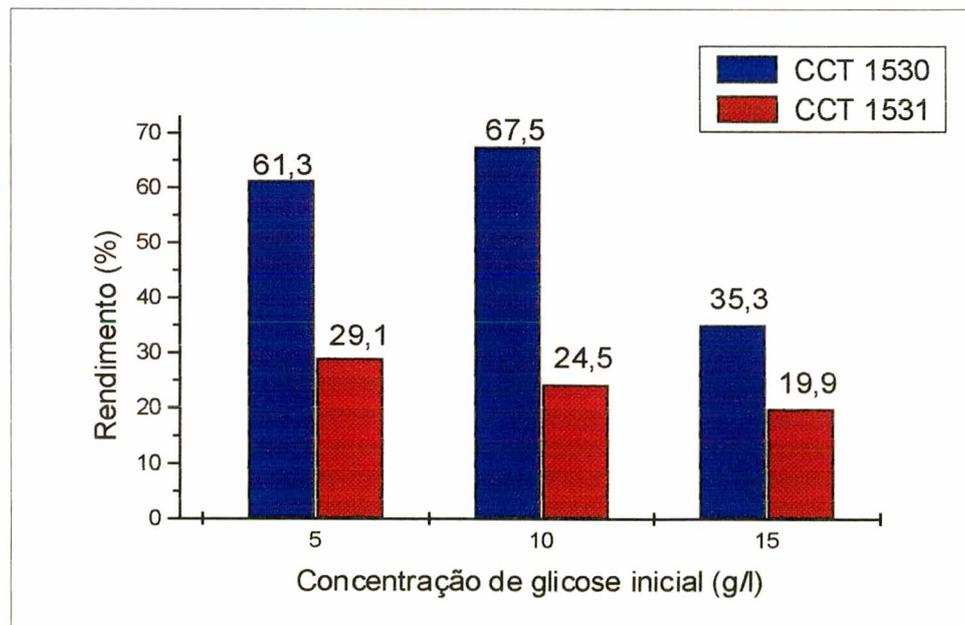


Figura 3.18 – Rendimento (%) das culturas com as cepas CCT 1530 e CCT 1531 sobre o valor estimado de fator de conversão de glicose em célula $Y_{X/G}^{est}$ de 0,652 g/g.

Como pode-se constatar na Figura 3.17 e Figura 3.18, a cepa CCT 1530 de forma geral apresentou melhores rendimentos que a CCT 1531, se destacando a cultura realizada com a cepa CCT 1530 com concentração inicial de glicose de 10 g/l, com um fator de conversão de 0,44 g/g, perfazendo 67,5% do rendimento estimado por GUILLOU (1996)

Através dos dados demonstrados podemos afirmar que a cepa CCT 1530 apresentou um melhor desempenho, e para a produção de células se mostra em como uma cepa preferencial, já que o fator de conversão é um parâmetro de relevância para a seleção de cepa para este fim.

Com relação à produtividade, as culturas das duas cepas realizadas sob as mesmas condições apresentam valores bem próximos, com a cepa CCT 1531 ligeiramente maior, sendo que em ambas culturas com 10 g/l de glicose inicial se mostraram mais produtivas. O resumo dos valores obtidos para esta parâmetro pode ser verificado na Figura 3.19.

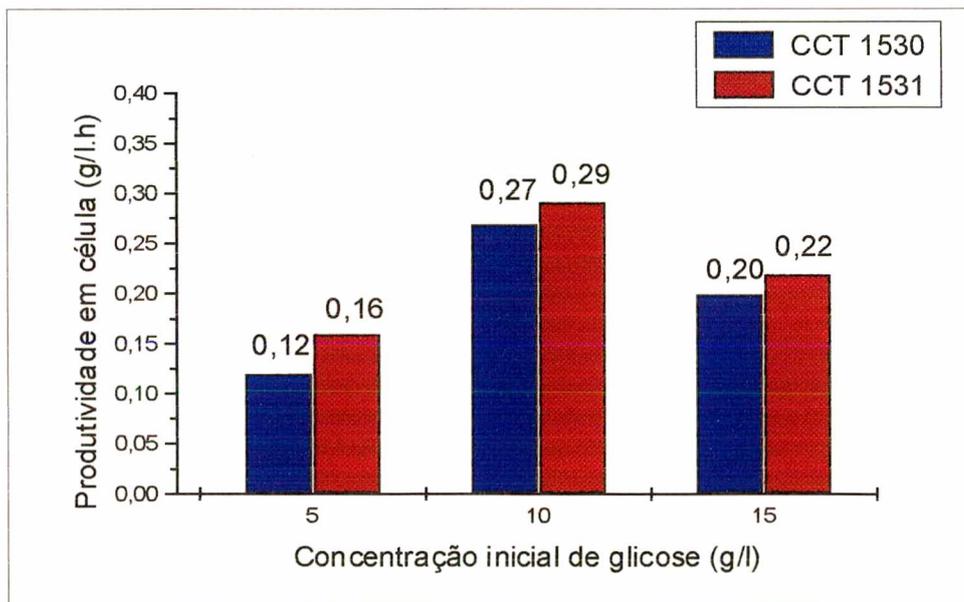


Figura 3.19 - Produtividade das culturas com as cepas CCT 1530 e CCT 1531 (g/l.h).

WIN et al. (1996) obteve, realizando cultivo de células em batelada com xarope de glicose de mandioca como fonte de carbono, uma produtividade de 0,31 g/l.h e um fator de conversão de 0,23 g/g de célula de glicose, com culturas em

batelada simples em meio semelhante ao usado neste trabalho. Observando as Figuras 3.17 e 3.19 podemos confirmar com os valores apresentados pela cepa CCT 1530, que a substituição da solução de vitaminas por extrato de levedura não causou nenhum prejuízo.

Uma característica interessante observada durante os ensaios foi a dificuldade em filtrar o meio de cultura contendo a cepa CCT 1530 em relação à cepa CCT 1531. As cepas CCT 1530 e CCT 1531, filtradas no momento da determinação do peso seco, quando da confecção da curva de calibração de células, levavam, em média de 24-30 horas e 30-40 minuto, respectivamente.

3.2 – CULTURAS EM BATELADA ALIMENTADA

Foram efetuadas duas culturas em biorretor com processo em batelada alimentada, sendo uma com a cepa CCT 1531 em meio YM e outra com a cepa CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado.

A alimentação se deu através do monitoramento da concentração de etanol durante o ensaio. Para evitar inibição do crescimento celular por parte do etanol, estabeleceu-se um "set point" para a concentração deste metabólito de 0,5 g/l. Ao atingir este valor a adição de glicose era parada até chegar a uma concentração em torno de 0,1 g/l de etanol.

No Anexo IV estão demonstrados os resultados experimentais obtidos durante o processo.

3.2.1 – "FED-BATCH" – CEPA CCT 1531

O processo "fed-batch" realizado com a cepa CCT 1531 foi conduzido de forma semelhante ao utilizado por OLIVEIRA (1995), diferenciando no sistema de análise, onde OLIVEIRA o fez via "on line", fazendo uso de um sensor de compostos voláteis desenvolvido no laboratório de Engenharia Bioquímica - UFSC, o que permitia analisar uma maior quantidade de amostras durante o ensaio. Para a análise de etanol nos ensaios realizados neste trabalho, as amostras eram retiradas, centrifugadas e posteriormente injetadas manualmente no cromatógrafo.

A cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531 em meio YM está demonstrada na Figura 3.20.

Observando as curvas de etanol e glicose, pode-se dizer que o controle do processo foi bom apesar do tempo de amostragem ter sido relativamente elevado, 30 minutos, o que prejudicou na determinação do tempo de injeção da solução de alimentação. Para se evitar concentrações de glicose elevadas (superiores à crítica), procurava-se deixar a vazão da bomba no valor mínimo, em torno de 2 ml/min, e à medida que a população de células aumentava, variava-se o tempo de alimentação.

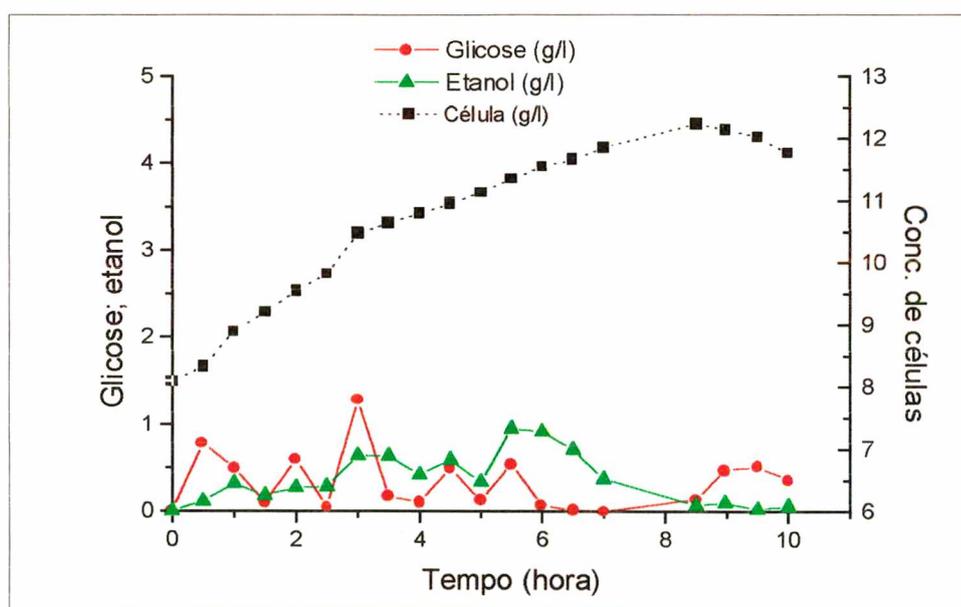


Figura 3.20 – Cinética de crescimento em batelada alimentada de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531 em meio YM.

Na Figura 3.21 pode-se verificar a variação do volume do reator (l) com o tempo (h), onde se nota uma tendência à variação exponencial.

Um fato que devemos ressaltar é a não disponibilidade de uma sonda para a dosagem de oxigênio dissolvido no meio de cultura e monitoramento das condições de cultivo. Este parâmetro é muito importante em culturas de leveduras facultativas, uma vez que a capacidade respiratória do microrganismo também é dependente da concentração de oxigênio no meio.

Os parâmetros cinéticos calculados no processo foram: velocidade específica máxima de crescimento (μ) e fator de conversão de glicose em célula, demonstrados nas Figuras 3.22 e 3.23, respectivamente.

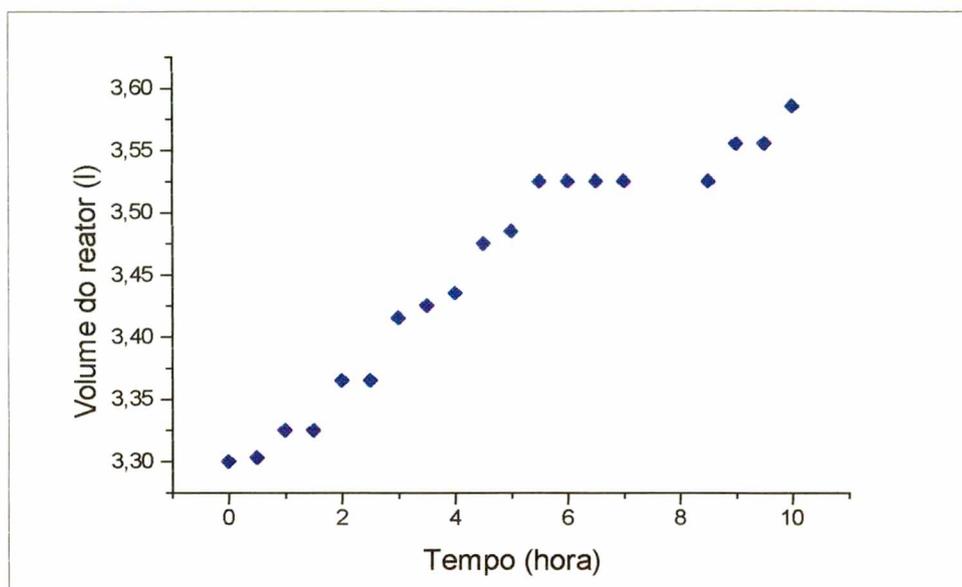


Figura 3.21 – Variação do volume do reator (l) versus tempo (h) de processo batelada alimentada da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531 com meio YM.

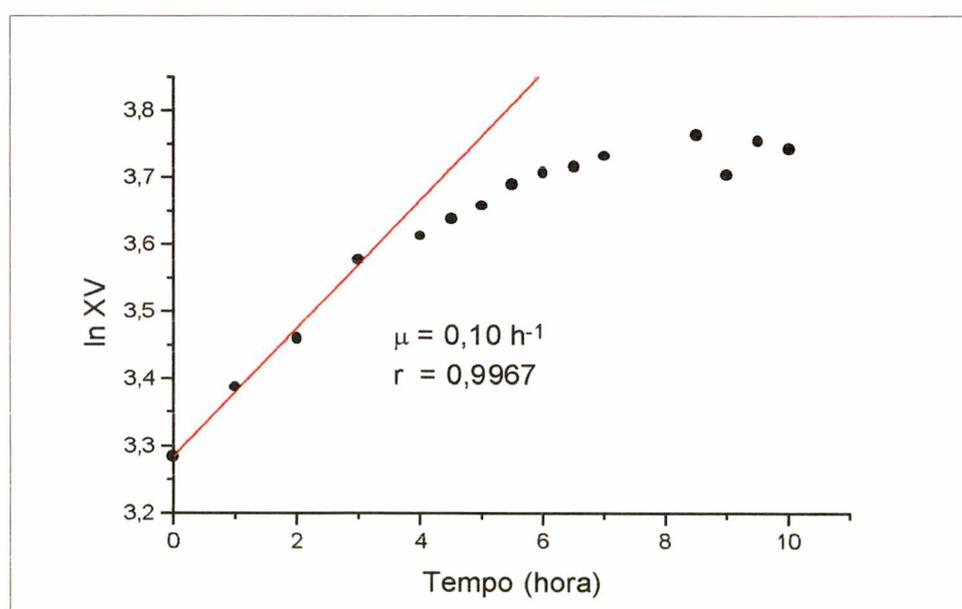


Figura 3.22 – Determinação da velocidade específica máxima de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531 em batelada alimentada com meio YM.

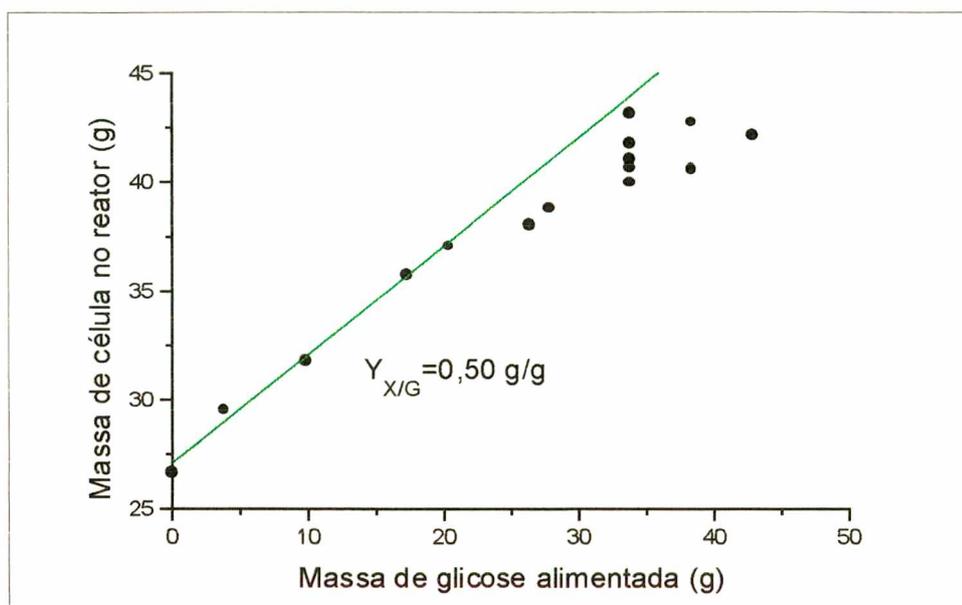


Figura 3.23 – Determinação do fator de conversão de glicose em célula (g/g) para cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531 em processo batelada alimentada com meio YM.

OLIVEIRA (1995) obteve um fator de conversão de 0,51 g de célula/g de glicose, se aproximando bastante do valor obtido neste trabalho (0,50 g/g). A velocidade específica máxima de crescimento ficou prejudicada ($0,10 \text{ h}^{-1}$) principalmente devido ao fato de não se ter um conhecimento mais preciso da real necessidade de glicose pelos microrganismos, uma vez que o intervalo de amostragem foi muito grande, além do fato de não se conhecer a concentração de oxigênio no meio. As velocidades específicas máximas de crescimento apresentadas por outros autores são: $0,18/0,23 \text{ h}^{-1}$ (EJIOFOR et al., 1996); $0,21 \text{ h}^{-1}$ (OLIVEIRA, 1995); $0,17 \text{ h}^{-1}$ (NAMBA et al., 1981); $0,15/0,19 \text{ h}^{-1}$ (WILLIAMS et al., 1979).

3.2.2 – “FED BATCH” – CEPA CCT 1530

A cinética de crescimento do processo batelada alimentada utilizando a cepa CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado e glicose de hidrolisado de mandioca, está apresentada na Figura 3.24 e a variação do volume do reator, na Figura 3.25.

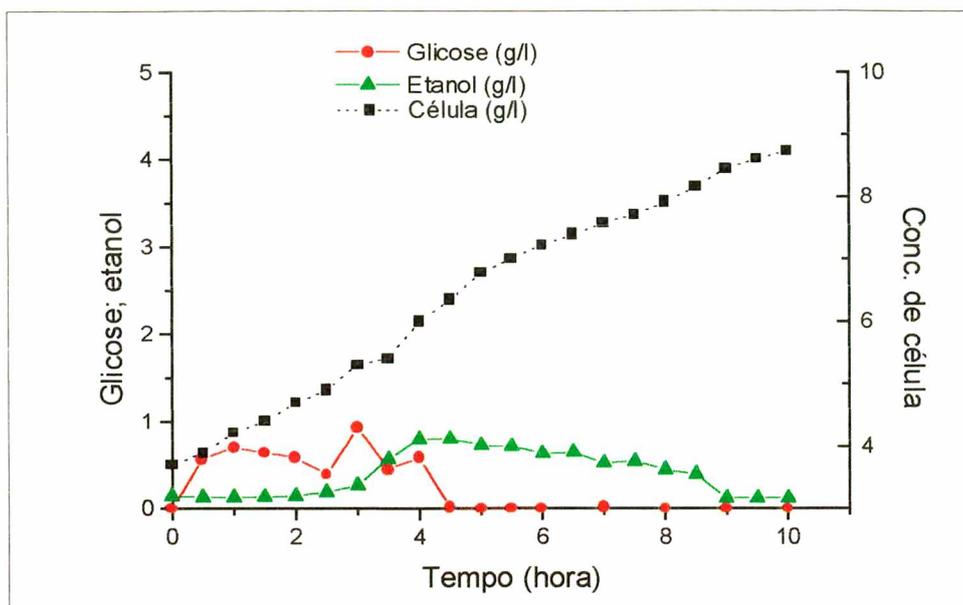


Figura 3.24 – Cinética de crescimento em batelada alimentada da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado.

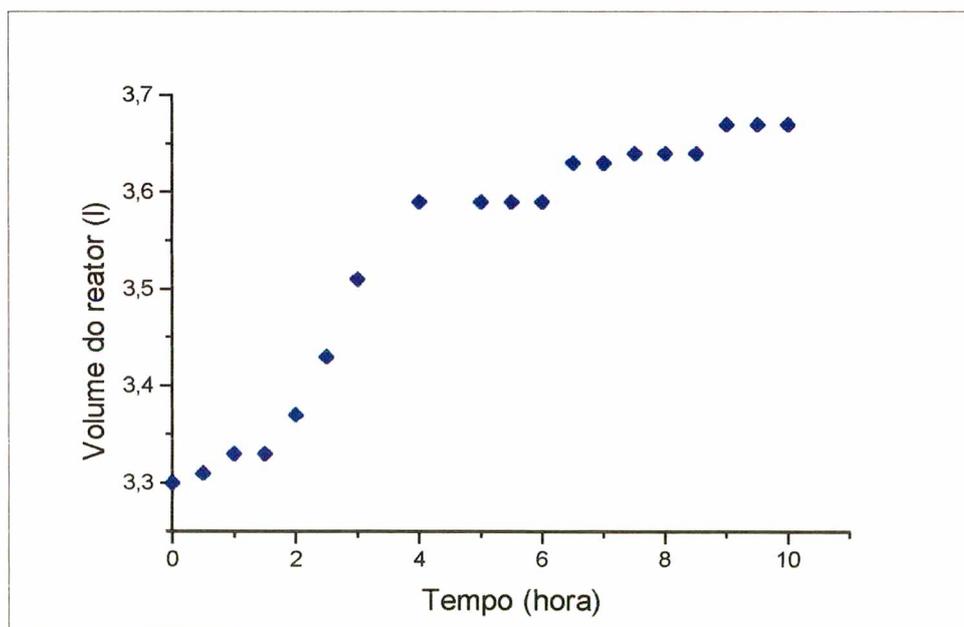


Figura 3.25 - Variação do volume do reator (l) versus tempo (h) de processo batelada alimentada da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado.

Observando a Figuras 3.24 pode-se verificar que houve um excesso de glicose em 4 horas de processo, atingindo uma concentração de 1,2 g/l. Para retornar a valores considerados bons, em torno de 0,5 g/l, foi necessário interromper a alimentação (Figura 3.25). O motivo a que se deve este desvio está relacionado ao problema do tempo de amostragem como já citado na cultura em batelada alimentada da cepa CCT 1531.

Os parâmetros cinéticos determinados nesta cultura estão demonstrados nas Figuras 3.26 e 3.27.

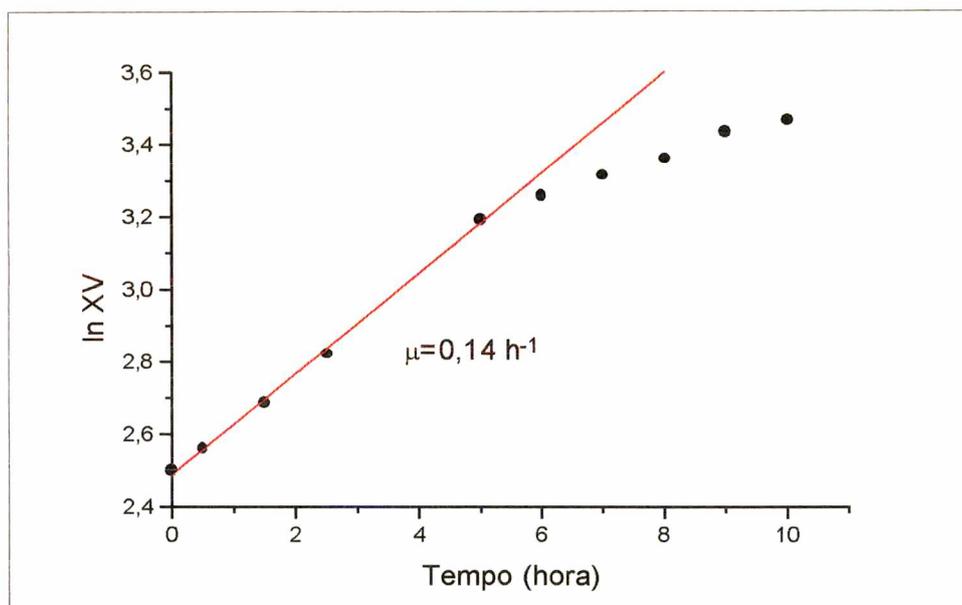


Figura 3.26 – Determinação de velocidade específica máxima de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 em processo batelada alimentada com meio de WIN et al. (1996) modificado.

A velocidade específica máxima de crescimento se apresenta coerente com os encontrados na literatura (OLIVEIRA, 1996; WILLIAMS, 1976)

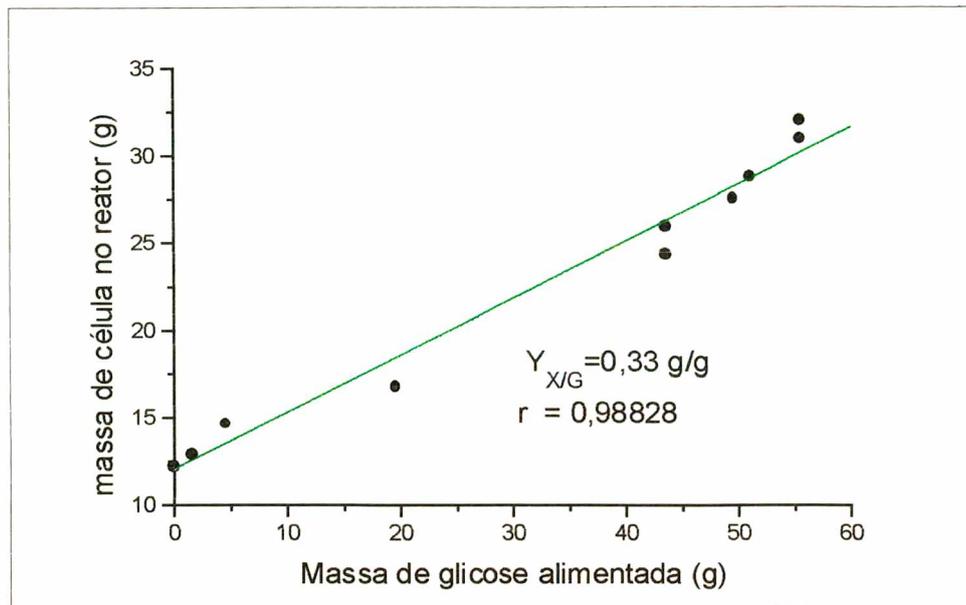


Figura 3.27 – Determinação do fator de conversão de glicose em célula (g/g) para cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 em processo batelada alimentada com meio de WIN et al. (1996) modificado.

O fator de conversão de glicose em célula obtido neste processo de 0,33 g/g, foi inferior ao valor obtido na cultura CCT 1531. Valores semelhantes são apresentados por WILLIAMS et al. (1976) (0,33 g/g) e por OLIVEIRA (1995) sem controle de etanol (0,38 g/g). Contudo, WIN et al. (1996), pesquisadores que fizeram uso do mesmo meio de cultivo utilizado neste trabalho obtiveram resultados superiores ao apresentado pela cepa CCT 1530, demonstrando que outros parâmetros como agitação, aeração e a própria alimentação devam ser otimizados.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

1 – CONCLUSÕES

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo do uso de hidrolisado de amido de mandioca para a produção de biomassa microbiana, usando para tal duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, CCT 1530 e CCT 1531.

Para tanto foram realizados ensaios de hidrólise, utilizando as enzimas α -amilase e amiloglicosidase, para a obtenção de uma solução de glicose, a qual foi incorporada ao meio de cultivo como fonte de carbono.

Com a finalidade de substituição da solução de vitamina contida no meio de sais proposto por WIN et al. (1996) por extrato de levedura, foram realizados experimentos de cultivo em “shaker”.

Um estudo comparativo entre os parâmetros cinéticos levantados nas culturas em biorreator em processo batelada simples das duas cepas, foi realizado sob várias condições de cultivo. Foi variada a concentração de substrato inicial para a verificação deste parâmetro na cinética de crescimento das leveduras. Foram testadas também a influência do meio de cultivo, do pH e da concentração de nitrogênio no meio.

Visando-se a maximização da produção de células pelo controle da concentração de glicose no meio, foram realizados cultivos em batelada alimentada, utilizando-se o etanol, metabólito deste tipo de fermentação, como variável de controle.

Estes estudos permitiram concluir:

a) Ensaios enzimáticos:

- A amiloglicosidase usada na concentração de 1 μ l de enzima/ml de solução de amido liquefeito, não apresentou inibição pelo substrato como retrata a literatura e a cinética apresentou uma curva de comportamento hiperbólica se

aproximando de uma cinética michaeliana até a concentração de 150 g/l de substrato. O valor da atividade específica obtida com uma concentração inicial de amido liquefeito de 300 g/l, indica uma inibição pelo substrato nas condições do ensaio.

- Concentrações de amiloglicosidase de 1 ml de enzima/l de solução de amido liquefeito (300 g/l) se apresentou mais produtiva em termos de formação de glicose, tendo como rendimento médio 66,3%, no tempo do experimento.

b) Ensaio em "shaker":

- O extrato de levedura substituí com vantagens a solução vitamínica, para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, se destacando a concentração de 3,0 g/l; e ainda, proporciona maior agilidade no preparo do meio com maiores garantias de esterilização.

c) Ensaio em biorreatores, batelada simples:

- Nas culturas em batelada simples, foi observado que um excesso de açúcar leva à um crescimento fermentativo, resultando numa produção de etanol ao invés de favorecer a produção de célula, o qual leva a um menor rendimento.
- A concentração inicial de glicose que apresentou melhores resultados para ambas as cepas foi a de 10 g/l.
- A cepa CCT 1531 demonstrou uma maior tendência ao metabolismo fermentativo, com o rápido consumo de glicose e maior produção de etanol.
- A relevância do fator de conversão de substrato em célula para o processo de produção de biomassa celular, faz da cepa CCT 1530 a mais indicada para este tipo de finalidade.
- A concentração de sulfato de amônia de 10 g/l usada como fonte de carbono, foi suficiente para o cultivo de célula nas condições do ensaio.

- Os resultados obtidos neste trabalho tanto para a cepa CCT 1530, como para a cepa CCT 1531 foram superiores aos apresentados por OLIVEIRA (1995), trabalho tomado como referência.

d) Ensaio em biorreatores, batelada alimentada:

- A cepa CCT 1531 apresentou um fator de conversão de glicose em célula de 0,5 g/l na cultura em batelada alimentada, de acordo com o esperado.
- A velocidade específica máxima de crescimento obtida na cultura em batelada alimentada da cepa CCT 1531 em meio YM, foi inferior aos encontrados na bibliografia, significando que para se conseguir concentrações de células ideais levaria maior tempo de processo.
- Os parâmetros cinéticos obtidos nas culturas em batelada alimentada da cepa CCT 1530 foram inferiores aos esperados, apesar da concordância com alguns autores. Provavelmente, a otimização do processo seria conseguida com um maior número de amostragem e acompanhamento de outras variáveis como aeração, agitação e frequência de alimentação.
- O etanol pode ser utilizado com sucesso como variável de controle em culturas em batelada alimentada de *Saccharomyces cerevisiae*, contudo se faz necessário o monitoramento de outras variáveis, como a concentração de oxigênio dissolvido.

Como conclusão global, tem-se que:

- O uso potencial do amido de mandioca hidrolisado como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos interessantes biotecnologicamente, foi comprovado neste trabalho. Assim pode-se dizer que o resíduo de mandioca proveniente de fecularias podem vir a ser um excelente substrato para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.

2 – SUGESTÕES

- Realização de outros ensaios com concentrações diferentes de enzima de forma a obter a concentração ideal para tornar o processo mais produtivo e atraente economicamente.
- Adoção de técnicas analíticas que permitam conhecer a cinética do consumo dos diversos açúcares presentes na solução de amido de mandioca hidrolisado.
- Observação de outros parâmetros como aeração e agitação na realização de processos em batelada alimentada.
- Monitoramento da concentração de etanol “on line” durante o cultivo em batelada alimentada para um controle mais preciso e consequente otimização e maximização da produção de célula.
- Realização de ensaios em co-cultura com outras leveduras amilolíticas, ou mesmo *Saccharomyces cerevisiae* engenheirada, de forma a excluir a etapa de hidrólise enzimática, com o objetivo de tornar o processo mais econômico.
- Estudo da cinética e modelagem do processo enzimático.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S.; NAGAI, S. e NISHIZAWA, Y. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: a perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.18, p. 1001-1016, 1976.
- AMORIM, H. V. Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica. **Apostila**: USP (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 90 p., 1977.
- ANDRADE, M.O. e LIMA, U.A. Tecnologia dos alimentos glucídios. In: **Tecnologia dos Produtos Agropecuários – Alimentos**, ed. Biblioteca Rural, Livraria Nobel, São Paulo, cap. 13, p. 235-267, 1989.
- ATTHASAMPUNNA, P.; SOMCHAI, P.; EUR-AREE, A. e ARTJARIYASRIPONG, S. Production of fuel ethanol from cassava. **MIRCEN Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 135-142, 1987.
- BALAGOPALAN, C.; MAINI, S.B. e HRISHI, N. Microbial treatment of starch factory effluents and the production of single cell protein. **Journal Root Crops**, v. 3, n. 2, p. 47-50, 1977.
- BU'LOCK, J. e KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**, London: Academic Press, 561p., 1987.
- CANNIATTI-BRAZACA, S.G. et al. Produção de proteína microbiana a partir da mandioca e/ou resíduos de seu processamento. **Resíduos da Industrialização de Mandioca no Brasil**, Ed. Pauliceia, São Paulo, cap. 7, p. 119-132, 1994.
- CANO, R.J. e COLOMÉ, J.S. **Microbiology**. St Paul: West Publishing Co., p. 184, 1986.
- CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da indústria de mandioca. **Resíduos**

- da Industrialização de Mandioca no Brasil**, Ed. Pauliceia, São Paulo, cap. 1, p. 11-50, 1994.
- CEREDA, M. P. Valorização de Resíduos como forma de reduzir custos de produção. In: I Congresso Latino Americano de Raízes Tropicais, IX Congresso Brasileiro de Mandioca, **ANAIS**, São Pedro (SP), p. 25-58, 1996.
- CHIANG, B. Y e JONHSON, J. A. Measurement of total and gelatinized starch by glucoamylase and o-toluidine reagent. **Cereal Chemistry**, v. 54, n.3, p. 429-435, 1977.
- CHIQUELLE, J. *Saccharomyces cerevisiae* used alone or in combination as a feed supplement for beef and dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, p. 405 – 415, 1995.
- EJIOFOR, A.O.; CRISTI, Y. e MOO-YOUNG, M. Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking-quality yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 519-525, 1996.
- EJIOFOR, A.O.; CRISTI, Y. e MOO-YOUNG, M. Fed-batch production of baker's yeast using millet (*Pennisetum typhoides*) flour hydrolyzate as the carbon source. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 102-109, 1996.
- EJIOFOR, A.O.; SOLOMON, B.O.; POSTEN, C.D. e DECKWER, W.D. Analysis of the respiro-fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose in fed-batch fermentation strategy for accurate parameter estimation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 41, p. 664-669, 1994.
- FERNANDES JR., A. e TAKAHASHI, M. Tratamento da mandioca por processos biotecnológicos – aeróbios e anaeróbios. **Resíduos da Industrialização de Mandioca no Brasil**, Ed. Pauliceia, São Paulo, cap. 8, p. 133-150, 1994.
- FRENCH, D. Amylases: enzymatic mechanisms. In: **Trends in the Biology of Fermentation**, Londres: Plenum Press, p. 168, 1980.
- GHOUL, M. Cinétique et conduite de fermentations de levures, INPL, 175p., **Tese de doutorado**, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 1983.
- GRIFFIN, S.R. Fast and slow fermentation of Brewer's wort by strains of

- Saccharoyices cerevisiae*. **Journal Institute Brewing**, vol 76, p. 41-45, 1970.
- GUILLOU, V. Etude du comportement dynamique de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue dan la région oxidative des taux de croissance. INSA, 147p., **Tese de Doutorado em Biologia e Genética Molecular e Celular – Biotecnologia**, Intitut National des Sciences Appliquees de Toulouse, Toulouse, 1996.
- HAWCROFT, D. **Diagnostic enzymology – analytical chemistry by open learning**. Chinchester; John Wiley e Sons, cap. 2, 1987.
- HESS, M.L. Tratamento de despejos de fecularias de mandioca por oxidação biológica. **Revista do Departamento de Águas e Esgotos**, São Paulo, v. 23, n. 46, p. 29-35, 1962.
- HOWLING, D. Mechanisms of starch enzimolysis. **International Biodeterioration**, v. 25, p. 15-19, 1989.
- JAMUNA, R. e RAMAKRISHNA, S.V. SCP production and removal of organic load from cassava starch industry waste by yeasts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n. 2, p. 126-131, 1989.
- LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy of metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, vol. 2, p. 221-228, 1986.
- LALUCE, C.; BERTOLINI, M.C.; ERNANDES, J.R.; MARTINI, A.V. e MARTINI, A. New amyolytic yeart strains for starch and destrin fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2447-2451, 1988.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. e COX, M.M. **Princípios de Bioquímica** 2ª ed., Sarvier ed., São Paulo, pg. 147-176, 839 p., 1985.
- LEMO, P.R. e MENEZES, T.J.B. Bioconversão das águas residuais do processamento de mandioca para a produção de biomassa. **Coletânea do Ital**, Campinas, São Paulo, v. 10, p. 1-14, 1979.
- LIMA, G.J.M.M.; LAVORENTI, A.; PACKER, I.U.; BERTO, D.A.; MIYADA, U.S. e MENTEN, J.F.M. Uso da levedura seca de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de matrizes suínas em gestação e em lactação. I – Efeitos

- sobre o número de leitões. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 299 – 307, 1987.
- LIU, S.Y. e LIANG, C.L. Studies on the efficiency of alcohol production in sweet potato, cassava and potato. **Journal of Agriculture Research of China**, v. 32, n. 2, p. 11-120, 1983.
- MACCARI Jr., A. Uso da Levedura amilolítica *Schwanniomyces castelli* para hidrólise do amido de batata e produção de etanol. UFPR, 89 p., **Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.
- MANILAL, V.B.; NARAYANAN, C.S. e BALAGOPALAN, C. Cassava starch effluent treatment with concomitant SCP production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 185-190, 1991.
- MARC, I. Modelisation de la fermentation de la biere dans un reacteur cylindro-conique: cinetique d'assimilation de sucres et d'acides-amines, de croissance et de floculation de levures, de production de CO₂ et de metabolites. INPL, **Tese de Doutorado**, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 1982.
- MENEZES, T.J.B.; FIGUEIREDO, I.B. e STRASSER, J. Proteínas monocelular de leveduras amilolíticas. **Coletânea do ITAL**, Campinas, São Paulo, v. 4, p. 109-116, 1971/72.
- MENEZES, T.J.B. Mandioca, resíduos e subprodutos para produção de biomassa. **Resíduos da Industrialização de Mandioca no Brasil**, Ed. Pauliceia, São Paulo, cap. 5, p. 101-108, 1994.
- MIYADA, V.C. ; LAVORENTI, A. Uso da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de suínos em crescimento e acabamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 8, n. 3, p. 497 – 513, 1979.
- NAMBA, A.; HIROTA, A.I.; NAGAI, S. Micro computer-coupled baker's yeast production. **Journal Fermentation Technology**, v. 59, p. 383-389, 1981.
- NETO, O.C. e SIQUEIRA, E.R. Valor nutritivo da levedura seca (*Saccharomyces*

- cerevisiae*), resíduo da produção de álcool, para novilhos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 3–6, 1989.
- NINOW, J.L.; EMMENDOERFER, C.M. e OLIVEIRA, D. Utilização de resíduos amiláceos para a produção de proteínas unicelulares – dosagem em linha de metabólitos voláteis. In: Congresso de Engenharia Química, **Anais**, São Paulo, p. 1342-1346, 1994.
- NINOW, J.L. Desenvolvimento de um sensor “on line” de compostos voláteis para o monitoramento e controle de processos fermentativos. CTC: UFSC, 120p., **monografia**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994
- NOPARATNARAPORN, N.; TRAKULNALEUMSAI, S.; SILVEIRA, R. G.; NISHIZAWA, Y. e NAGAI, S. SCP production by mixed culture of *Rhodocyclus gelatinosus* and *Rhodobacter sphaeroides* from cassava. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, p. 11-16, 1987.
- NOVO NORDISK BIOINDUSTRIAL DO BRASIL. Enzyme Process Division, ficha técnica: Termamyl, Araucária – PR, 1996. (a)
- NOVO NORDISK BIOINDUSTRIAL DO BRASIL. Enzyme Process Division, ficha técnica: AMG, Araucária – PR, 1996. (b)
- O’HAIR, S.K. Tropical root and tuber crops <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/v1-424.html#cassava>, p. 1-2, 7p., 10/04/1998.
- OLIVEIRA, D. Uso de um sensor de compostos voláteis para o controle de uma fermentação batelada alimentada de *Saccharomyces cerevisiae*. UFSC, 125 p.. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.
- OLSSON, L; LARSEN, M. E; RONNOW, B; MIKKELSEN, J.D and NIELSEN, J. Silencing MIG1 in *saccharomyces cerevisiae*: Effects of antisense MIG1 expression and MIG1 gene disruption. **Applied and environmental microbiology**, vol. 63, nº 6, p. 2366-2371, 1997.
- ORLOWSKI, J.H. e BARFORD, J.P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces*

- cerevisiae* in batch and continuous culture. **Journal of Genetical and Applied Microbiology**, v. 37, p. 215-218, 1991.
- PATERSON, M. e MELO, F.A.D. Processos de produção de proteínas a partir da propagação de leveduras. **Trabalho Técnico**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, n. 3, p. 7-46, 1993.
- PONS, M.N.; DUCOURET, P.; ENGASSER, J.M. Mass transfer characteristics of hydrophobic tubing membrane sensor. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 407, 1986.
- REED, G. **Enzymes in food processing**. London, Ed. Academic Press, 2nd ed., 1975.
- SALES, A.M. e MENEZES, T.J.B. Produção de biomassa protéica de mandioca. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 7, p. 139-144, 1976.
- Síntese Anual da Agricultura da Santa Catarina**. Instituto CEPA/SC, p.104-107, 1995.
- SONNLEITNER, B. e KÄPPELI, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* Is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. **Biotechnology of Bioengineering**, v. 28, p. 927-937, 1986.
- STANBURY, P.F. e WHITAKER, A. **Principles of fermentation technology**, Oxford: Pergamon press, 255p., 1984.
- STAMBUK, B.J.C.U. Caracterização do transportador de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*. USP, **Tese de Doutorado em Química**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- VERDUYN, C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 60, p. 325-353, 1991.
- TELES, F.F. Técnicas de liberação de HCN e toxidez cianogênica das mandiocas. **Informe Agropecuário**, v. 13, n. 145, p. 18-22, Belo Horizonte, 1987.
- WILLIAMS, D.; YOUSEFPOUR, T.; WELLINGTON, E.M.H. On-line adaptative control of a fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology**

- of Bioengineering**, v. 28, p.631-645, 1986.
- WIN, S.S.; IMPOOLSUP, A. e NOOMHORM, A. Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugarcone molases and glucose syrup from cassava starch. **Journal of industrial Microbiology**, v. 16, p. 117-123, 1996.
- WU, W.T.; CHEN, K.C; CHIOU, H.W. On-line optimal control for fed-batch culture of baker's yeast production. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 27, p. 756-760, 1984.
- ZANIN, G.M. Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada. UNICAMP, 455 p., **Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos**, Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

ANEXOS

**RESULTADOS
EXPERIMENTAIS**

ANEXO I

RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Estão apresentados a seguir os resultados dos ensaios de influência da concentração de substrato, amido liquefeito, sobre a atividade enzimática da amiloglicosidase.

O anexo está organizado da seguinte forma: primeiramente se encontra uma tabela com os resultados experimentais e seguindo os gráficos correspondentes às tabelas.

Estão apresentados os gráficos de concentração de glicose (g/l) versus tempo (min) e micromoles de glicose versus tempo (min) para ambos os experimentos, e os gráficos das médias dos resultados dos dois experimentos, sendo que com esses últimos valores foram calculadas as velocidade iniciais de reação através da tangente da curva no ponto zero (atividade).

Os experimentos com as diferentes concentrações iniciais estão apresentados nas Tabelas e Figuras de AI 1 a AI 9, enquanto os ensaios com concentrações de enzima diferentes estão demonstrados na Tabela AI 10 e Figura AI 10.

Tabela AI 1 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 1,5 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	0,1562400	0,00000	0,00000	0,1562400	0,00000	0,00000
0,4	50,05	0,6619718	0,50573	140,62155	0,6760563	0,51982	144,53782
2	49,25	1,3732394	1,21700	332,98457	1,5845070	1,42827	390,78973
4	48,45	1,6056338	1,44939	390,12850	1,6971831	1,54094	414,77052
6	47,65	1,7253521	1,56911	415,37885	1,8802817	1,72404	456,39215
8	46,85	1,8098592	1,65362	430,40032	1,8380282	1,68179	437,73209
10	46,05	1,7605634	1,60432	410,43940	1,9014085	1,74517	446,47226
12	45,25	1,8169014	1,66066	417,47183	2,0070423	1,85080	465,27112
14	44,45	1,8661972	1,70996	422,26443	1,9577465	1,80151	444,87202
16	43,65	1,9436620	1,78742	433,44983	1,9788732	1,82263	441,98856
18	42,85	1,8591549	1,70291	405,38836	1,9929577	1,83672	437,24086
20	42,05	1,8450704	1,68883	394,52955	1,9788732	1,82263	425,78738
22	41,25	1,8591549	1,70291	390,25134	1,9507042	1,79446	411,23138
24	40,45	1,9154930	1,75925	395,34323	1,9366197	1,78038	400,09089
26	39,65	1,9014085	1,74517	384,42183	1,9366197	1,78038	392,17809

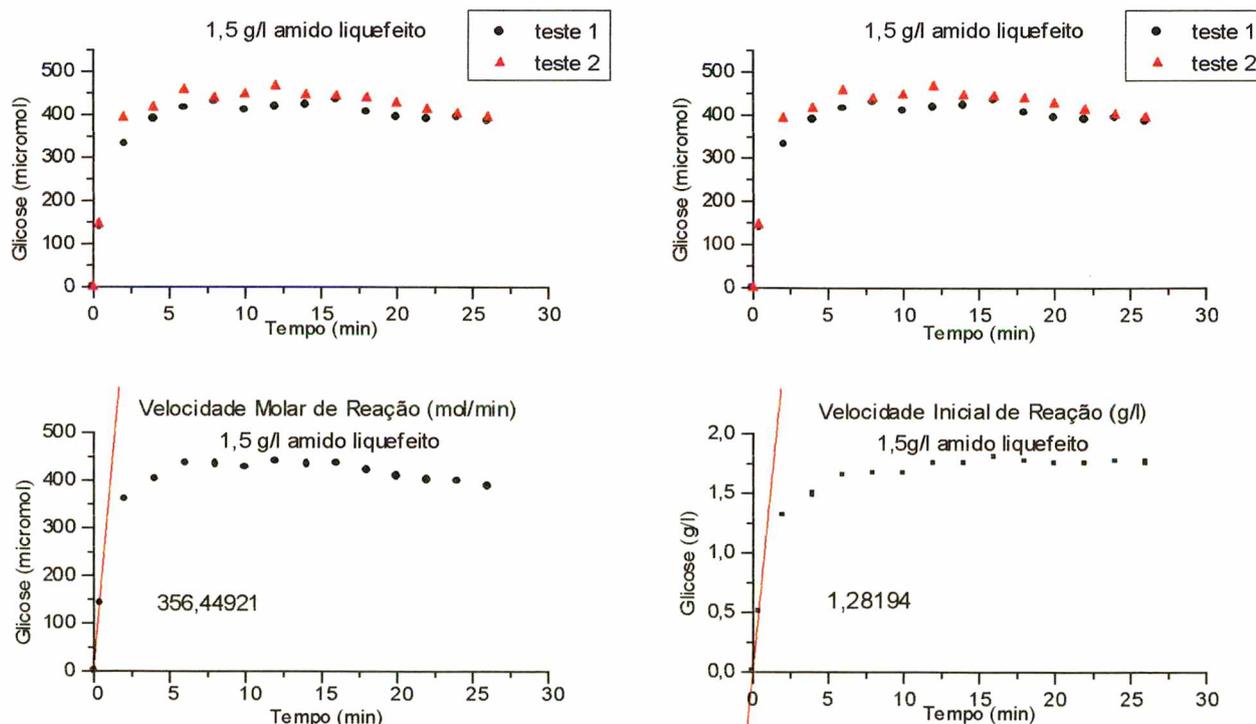


Figura AI 1 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 1,5 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 2 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 3,0 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	0,2025000	0,00000	0,00000	0,2025000	0,00000	0,00000
0,6	50,05	1,2534060	1,05091	292,21025	1,1512262	0,94873	332,00000
2	49,25	2,2207084	2,01821	552,20426	2,1185286	1,91603	682,67277
4	48,45	2,6498638	2,44736	658,74875	2,6975477	2,49505	732,09116
6	47,65	2,9155313	2,71303	718,19968	2,9223433	2,71984	720,00297
8	46,85	3,0449591	2,84246	739,82895	3,1335150	2,93101	762,87807
10	46,05	3,3174387	3,11494	796,90515	3,2629428	3,06044	782,96328
12	45,25	3,5899183	3,38742	851,55931	3,0653951	2,86290	719,70002
14	44,45	3,0313351	2,82884	698,56512	3,2016349	2,99913	740,61970
16	43,65	3,0994550	2,89696	702,51160	3,2697548	3,06725	743,80928
18	42,85	3,2288828	3,02638	720,44725	3,3446866	3,14219	748,01499
20	42,05	3,2722144	3,06971	717,11939	3,3495146	3,14701	735,17757
22	41,25	3,1805360	2,97804	682,46658	3,3564494	3,15395	722,78007
24	40,45	3,2440056	3,04151	683,49391	3,4257975	3,22330	724,34658
26	39,65	3,3145275	3,11203	685,51050	3,3703190	3,16782	697,80013

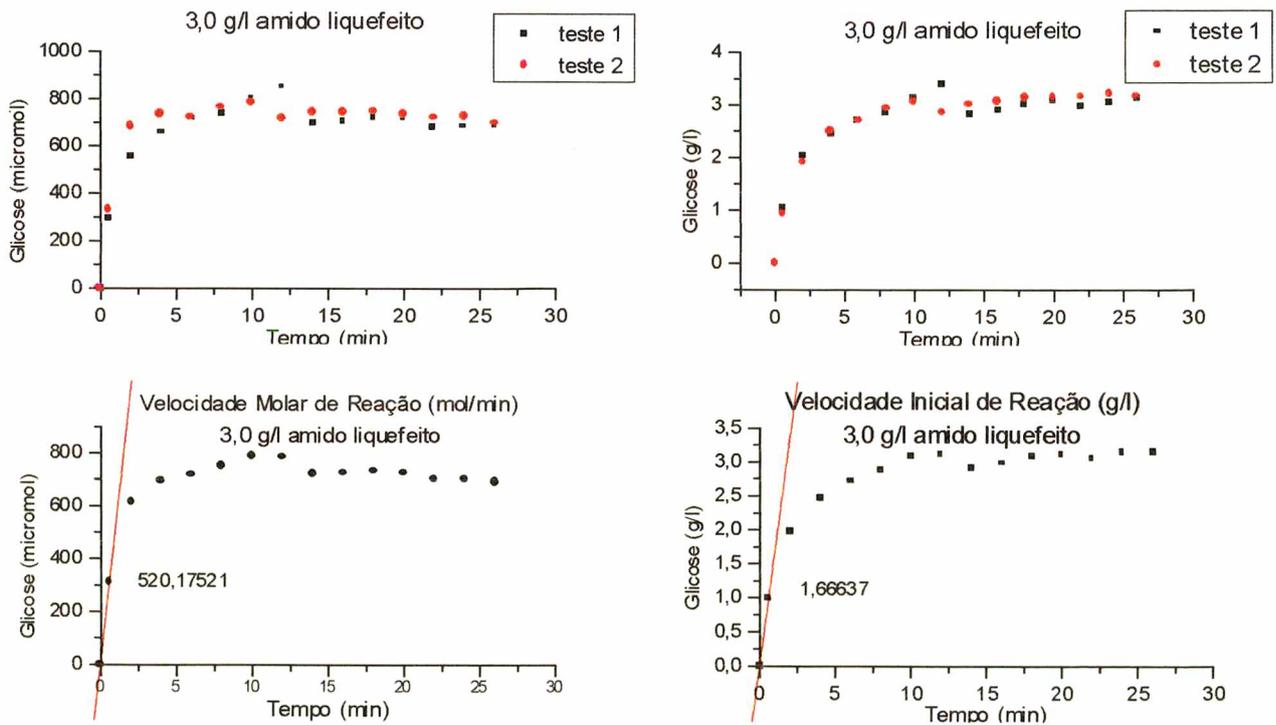


Figura AI 2 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 3,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 3 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 6,0 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	0,2955900	0,00000	0,00000	0,2955900	0,00000	0,00000
0,9	50,05	1,9642366	1,66865	463,97645	2,1086657	1,81308	504,13578
2	49,25	2,7730399	2,47745	686,11598	2,9174691	2,62188	726,11484
4,34	48,45	3,8418157	3,54623	978,16725	-----	-----	-----
4,583	48,50	-----	-----	-----	4,1595598	3,86397	1065,81168
6	47,65	-----	-----	-----	4,1306740	3,83508	1053,58280
6,57	47,65	4,4195323	4,12394	1132,93860	-----	-----	-----
8	46,85	4,8528198	4,55723	1246,90871	-----	-----	-----
8,5	46,50	-----	-----	-----	5,1416781	4,84609	1325,94356
10	46,05	5,1127923	4,81720	1312,68763	5,0261348	4,73054	1289,07346
12	45,25	5,6893617	5,39377	1463,80971	5,6595745	5,36398	1455,72578
14	44,45	5,8085106	5,51292	1490,01994	5,7489362	5,45335	1473,91828
16	43,65	5,9872340	5,69164	1532,00085	5,6595745	5,36398	1443,80582
18	42,85	5,9574468	5,66186	1517,69217	5,8978723	5,60228	1501,72291
20	42,05	6,0468085	5,75122	1535,25583	5,7787234	5,48313	1463,69200

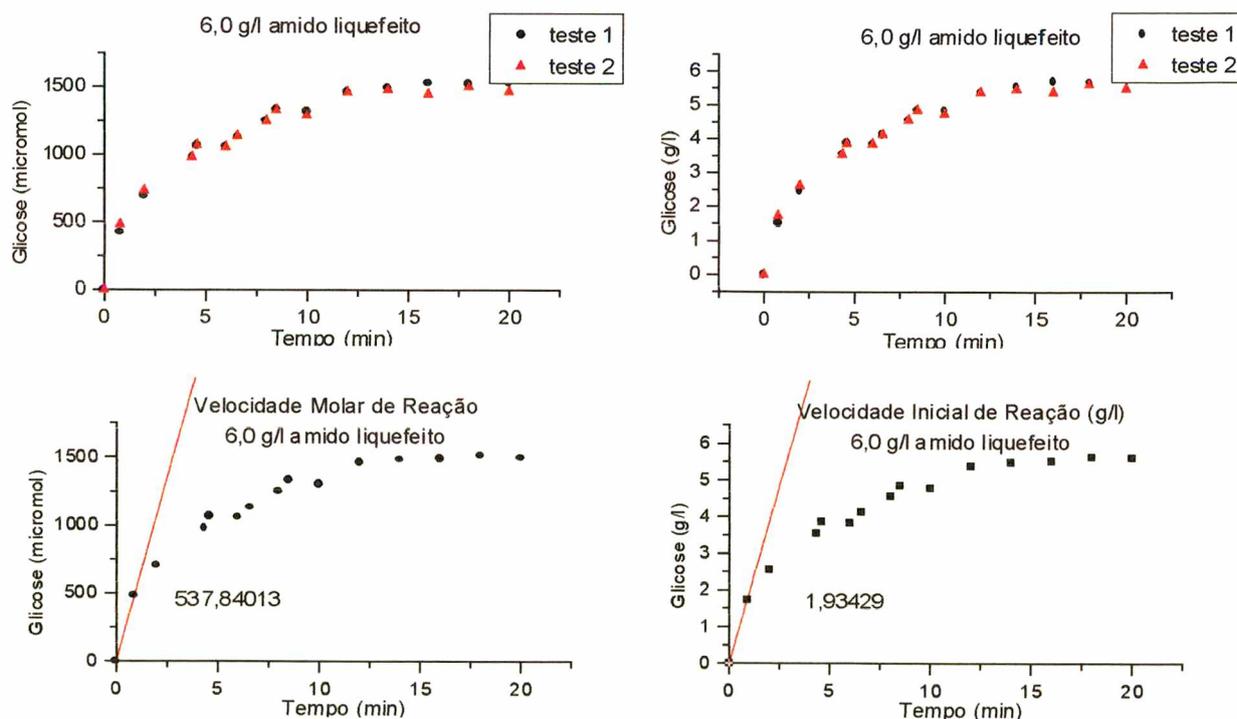


Figura AI 3 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 6,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 4 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 15,0 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	0,0574260	0,00000	0,00000	0,5742900	0,00000	0,00000
0,5	50,05	1,9283747	1,35408	376,51076	2,1487603	1,57447	437,79022
2,1	49,55	4,9449036	4,37061	1203,13279	4,7245179	4,15023	1142,46552
4	49,05	7,7410468	7,16676	1952,94124	6,5289256	5,95464	1622,63821
6	48,55	8,8980716	8,32378	2245,10888	7,6859504	7,11166	1918,17285
8	48,05	9,8760331	9,30174	2483,04863	8,9944904	8,42020	2247,72571
10	47,55	10,6473829	10,07309	2660,97538	9,8071625	9,23287	2439,01716
12	47,05	11,3483146	10,77402	2816,21032	11,5449438	10,97065	2867,60701
14	46,55	12,7808989	12,20661	3156,76468	11,8679775	11,29369	2920,67308
16	46,05	12,8370787	12,26279	3137,23010	13,0337079	12,45942	3187,53440
18	45,55	14,5505618	13,97627	3536,77322	13,4269663	12,85268	3252,44114
20	45,05	14,0308989	13,45661	3367,89017	13,0617978	12,48751	3125,34569
22	44,55	14,4241573	13,84987	3427,84216	13,8342697	13,25998	3281,84497
24	44,05	14,1011236	13,52683	3310,31678	14,2696629	13,69537	3351,56210
26	43,55	14,3398876	13,76560	3330,50987	14,2275281	13,65324	3303,32510
28	43,05	14,3258427	13,75155	3288,91302	13,5393258	12,96504	3100,80441
30	42,55	14,6769663	14,10268	3333,71598	15,4775281	14,90324	3522,95989

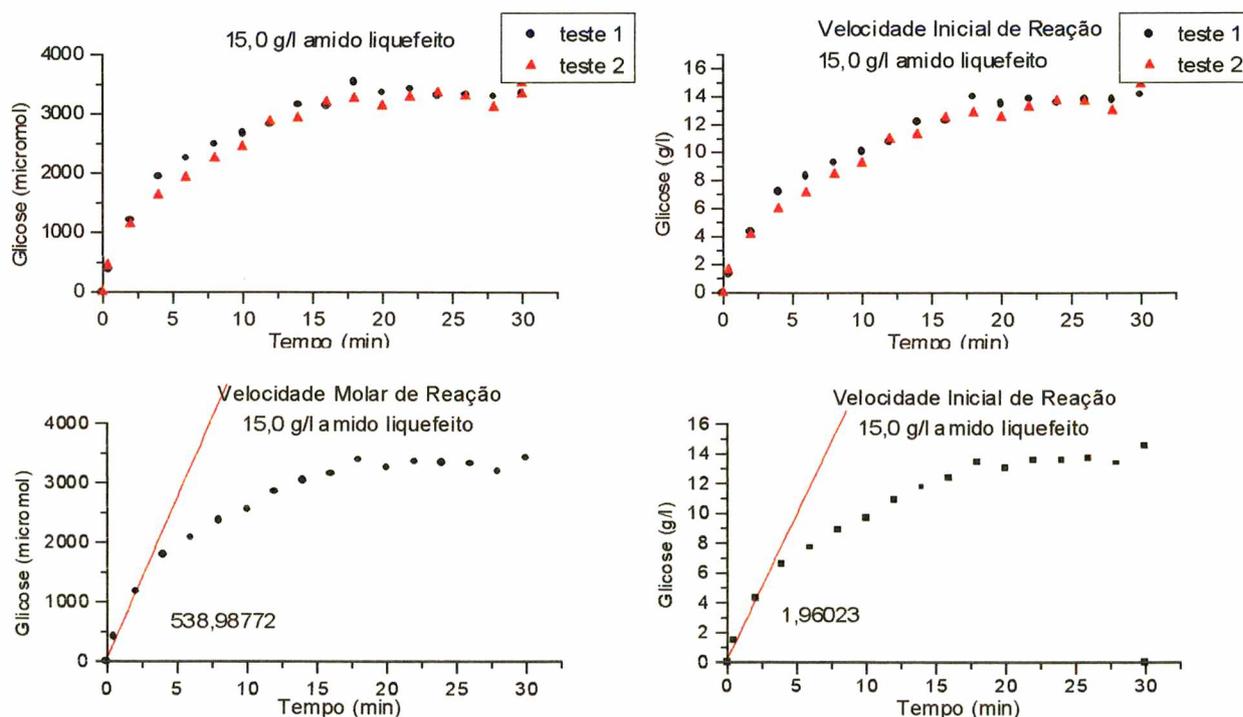


Figura AI 4 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amilglicosidase sobre a concentração de 15,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 5 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 30,0 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	1,0387900	0,00000	0,00000	1,0387900	0,00000	0,00000
0,6	50,05	3,3837689	2,34498	652,03441	3,0398900	2,00110	556,41696
5	49,55	11,1416781	10,10289	2781,10059	10,2475928	9,20880	2,534,97878
10	49,05	16,2998624	15,26107	4158,64224	13,0398900	12,00110	3270,29974
15	48,55	19,8074278	18,76864	5062,31869	15,7083906	14,66960	3956,71729
20	48,05	22,1870702	21,14828	5645,41590	19,1059147	18,06712	4822,91857
25	47,55	25,6140351	24,57525	6491,96058	22,2807018	21,24191	5611,40502
30	47,05	27,9824561	26,94367	7042,77496	24,5614035	23,52261	6148,54981
35	46,55	28,7280702	27,68928	7160,75551	26,4035088	25,36472	6559,59810
40	46,05	28,3333333	27,29454	6982,85400	27,1491228	26,11033	6679,89348
45	45,55	29,6929825	28,65419	7251,10259	28,2017544	27,16296	6873,73904
50	45,05	29,7368421	28,69805	7182,48471	28,6403509	27,60156	6908,05732
55	44,55	30,3508772	29,31209	7254,74158	28,4210526	27,38226	6777,11000
60	44,05	30,3070175	29,26823	7162,58569	28,4649123	27,42612	6711,78159

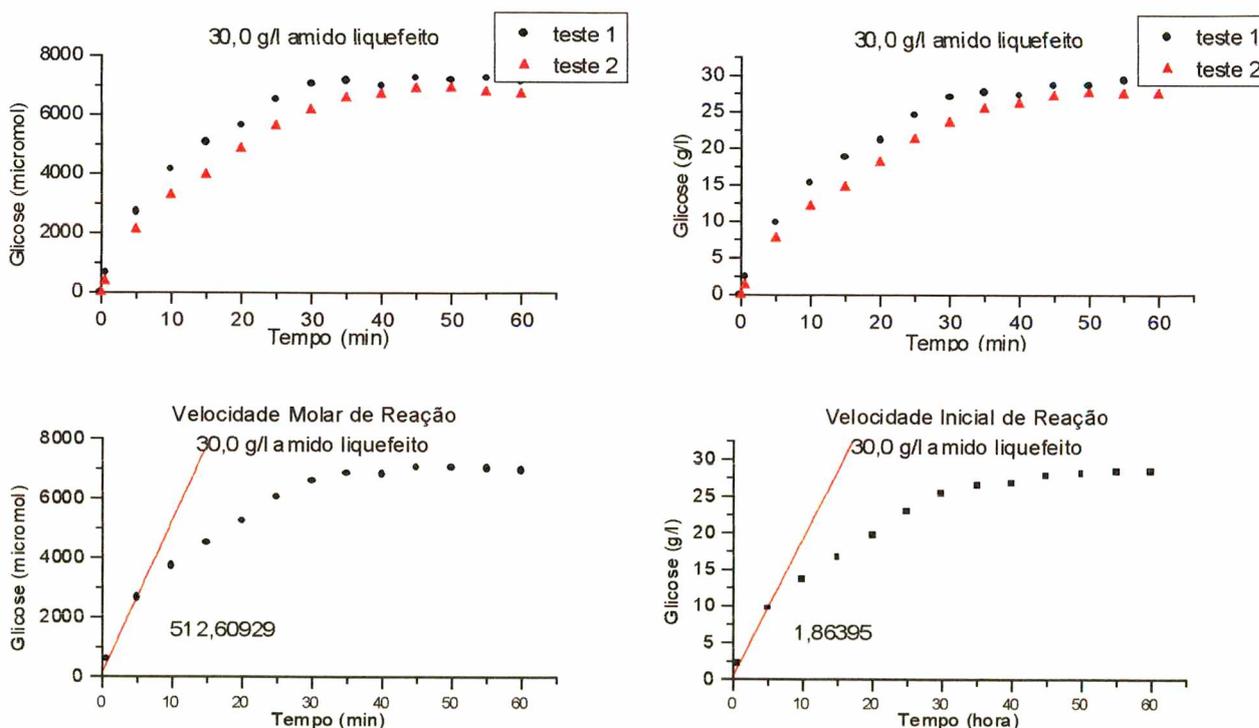


Figura AI 5 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amilglicosidase sobre a concentração de 30,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 6 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 60,0 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	1,9677900	0,00000	0,00000	1,9677900	0,00000	0,00000
0,3	50,05	2,9519868	0,98420	273,66139	3,2850941	1,31730	366,28371
5	49,55	12,1841808	10,21639	2812,34536	12,4602026	10,49241	2888,32803
10	49,05	19,1734437	17,20565	4688,54063	21,4905933	19,52280	5319,96391
15	48,55	23,7534626	21,78567	5876,08003	25,0000000	23,03221	6212,29886
20	48,05	21,8836565	19,91587	7108,33333	30,3324100	28,36462	7571,77772
25	47,55	31,5789474	29,61116	7822,28074	32,3407202	30,37293	8023,51573
30	47,05	35,7340720	33,76628	8826,13094	35,6648199	33,69703	8808,02922
35	46,55	36,4958449	34,52805	8929,33864	36,1495845	34,18179	8839,79185
40	46,05	38,9889197	37,02113	9471,23901	37,3268698	35,35908	9046,03125
45	45,55	42,7977839	40,82999	10332,25680	46,1911357	44,22335	11190,96332
50	45,05	44,5983380	42,63055	10669,47881	45,7756233	43,80783	10964,12716
55	44,55	47,2991690	45,33138	11219,51630	-----	-----	-----
60	44,05	48,6842105	46,71642	11432,54625	46,4681440	44,50035	10890,22553

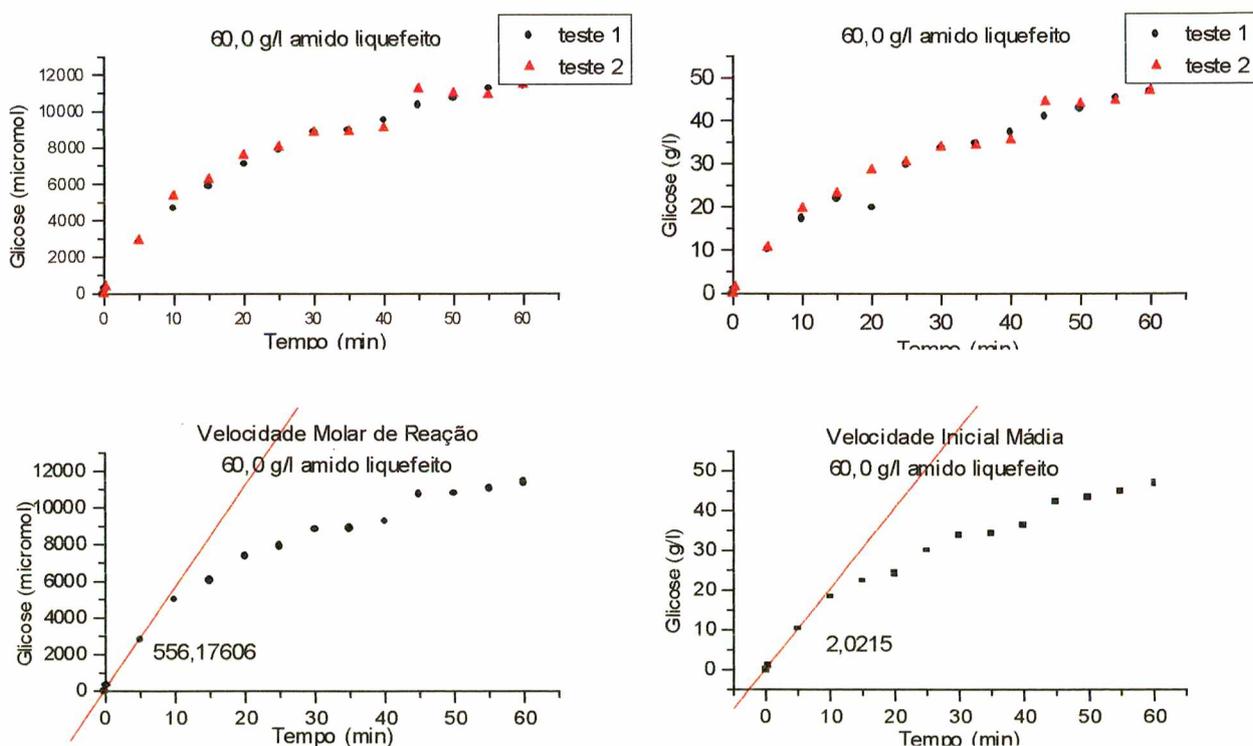


Figura AI 6 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 60,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 7 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 90,0 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	2,8968000	0,00000	0,00000	2,8968000	0,00000	0,00000
1	50,05	7,5593873	4,66259	1296,45830	8,0281690	5,13137	1426,80566
5	49,95	16,7117727	13,81497	3833,65491	16,8470907	13,95029	3871,20566
10	49,85	27,2658707	24,36907	6748,87874	26,3193505	23,42255	6486,74523
15	49,75	37,1394418	34,24264	9464,28571	35,7916103	32,89481	9091,76006
20	49,65	44,5872801	41,69048	11499,62410	44,1138911	41,21709	11369,04762
25	49,55	50,8130081	47,91621	13190,26729	45,3252033	42,42840	11679,59656
30	49,45	57,9945799	55,09778	15136,58455	53,6619718	50,76517	13946,32082
35	49,35	58,2655827	55,36878	15180,27458	53,2394366	50,34264	13802,27287
40	49,25	63,8888889	60,99209	16688,11321	61,4084507	58,51165	16009,43776
45	49,15	68,4281843	65,53138	17893,70854	62,6760563	59,77926	16323,05805
50	49,05	72,9674797	70,07068	19094,26021	64,4366197	61,53982	16769,60087
55	48,95	72,9281768	70,03138	19044,64386	69,1988950	66,30210	18030,48640
60	48,85	79,4198895	76,52309	20767,51623	69,1988950	66,30210	17993,65190
65	48,75	79,9033149	77,0065149	20855,9311	68,4392265	65,5424265	17751,0738

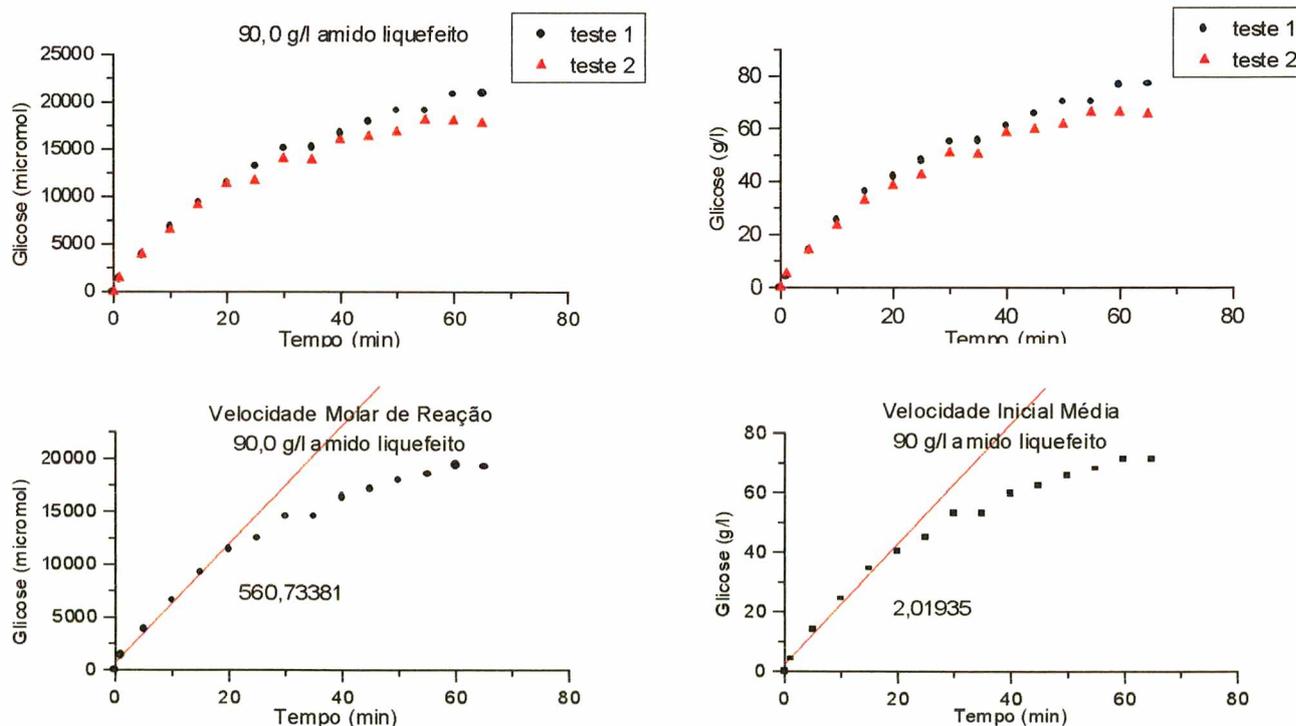


Figura AI 7 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amilglicosidase sobre a concentração de 90,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 8 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 150,0 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	4,7550000	0,00000	0,00000	4,7550000	0,00000	0,00000
0,6	50,05	7,3266076	2,57161	715,04978	7,4170574	2,66206	740,19985
5	49,95	16,2162162	11,46122	3155,01813	17,7177177	12,96272	3568,34813
10	49,85	24,7747748	20,01977	5455,38863	29,7297297	24,97473	6805,61385
15	49,75	42,4863388	37,73134	10176,98055	34,6994536	29,94445	8076,68456
20	49,65	48,9071038	44,15210	11786,15883	41,6666667	36,91167	9853,36435
25	49,55	53,4153005	48,66030	12854,42939	49,5901639	44,83516	11843,95581
30	49,45	54,9180328	50,16303	13112,05940	56,0109290	51,25593	13397,73032
35	49,35	64,8907104	60,13571	15551,76288	56,8306011	52,07560	13467,32906
40	49,25	68,9890710	64,23407	16433,21651	61,6120219	56,85702	14545,92143
45	49,15	70,4918033	65,73680	16635,06327	66,8032787	62,04828	15701,66163
50	49,05	67,7595628	63,00456	15768,64198	72,1311475	67,37615	16862,75248
55	48,95	71,3114754	66,55648	16472,72766	71,1748634	53,45715	13230,64355

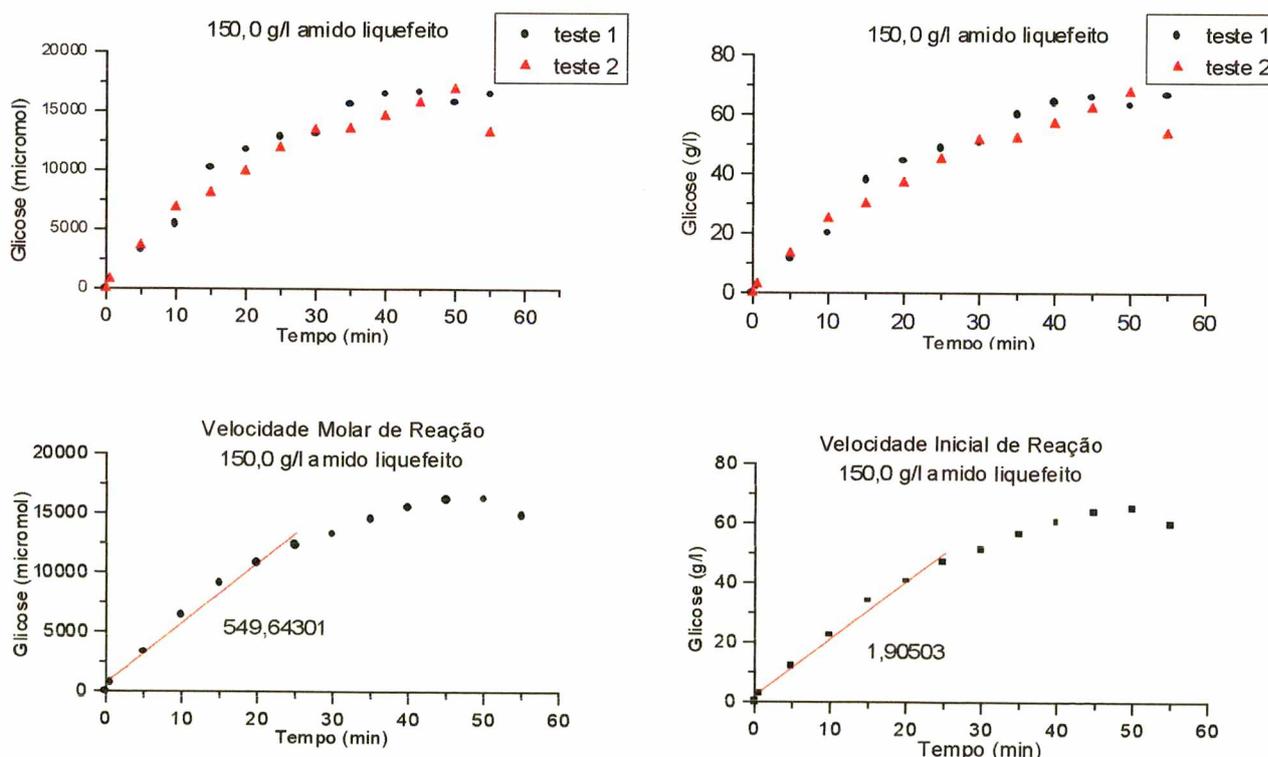


Figura AI 8 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amilglicosidase sobre a concentração de 150,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 9 – Resultados dos experimentos 1 e 2, para a concentração inicial de substrato de 300,0 g/l de amido liqüefeito.

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1			Reação 2		
		Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose presente (mg/ml)	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	50,05	9,3900000	0,00000	0,00000	9,3900000	0,00000	0,00000
0,2	50,05	14,4381223	5,04812	1403,65846	15,2056738	5,81567	1617,08040
5	49,95	22,1906117	12,80061	3523,72393	23,6170213	14,22702	3916,38280
10	49,85	35,2062589	25,81626	7034,93055	32,7659574	23,37596	6369,94840
15	49,75	48,8620199	39,47202	10646,48093	47,0212766	37,63128	10149,99155
20	49,65	59,7439545	50,35395	13441,70840	54,6808511	45,29085	12090,14108
25	49,55	70,6258890	61,23589	16176,48069	61,7021277	52,31213	13819,12039
30	49,45	87,6955903	78,30559	20468,21125	68,0851064	58,69511	15342,24864
35	49,35	94,7368421	85,34684	22071,64167	81,0638298	71,67383	18535,64876
40	49,25	107,9658606	98,57586	25218,99100	86,3829787	76,99298	19697,37039
45	49,15	109,8862020	100,49620	25431,12223	92,7659574	83,37596	21098,74923
50	49,05	114,5803698	105,19037	26326,81201	101,0638298	91,67383	22943,92240
55	48,95	120,9815078	111,59151	27618,89819	106,5957447	97,20574	24058,42181
60	48,85	130,7965861	121,40659	29710,88953	108,510638	99,1206383	24257,0229

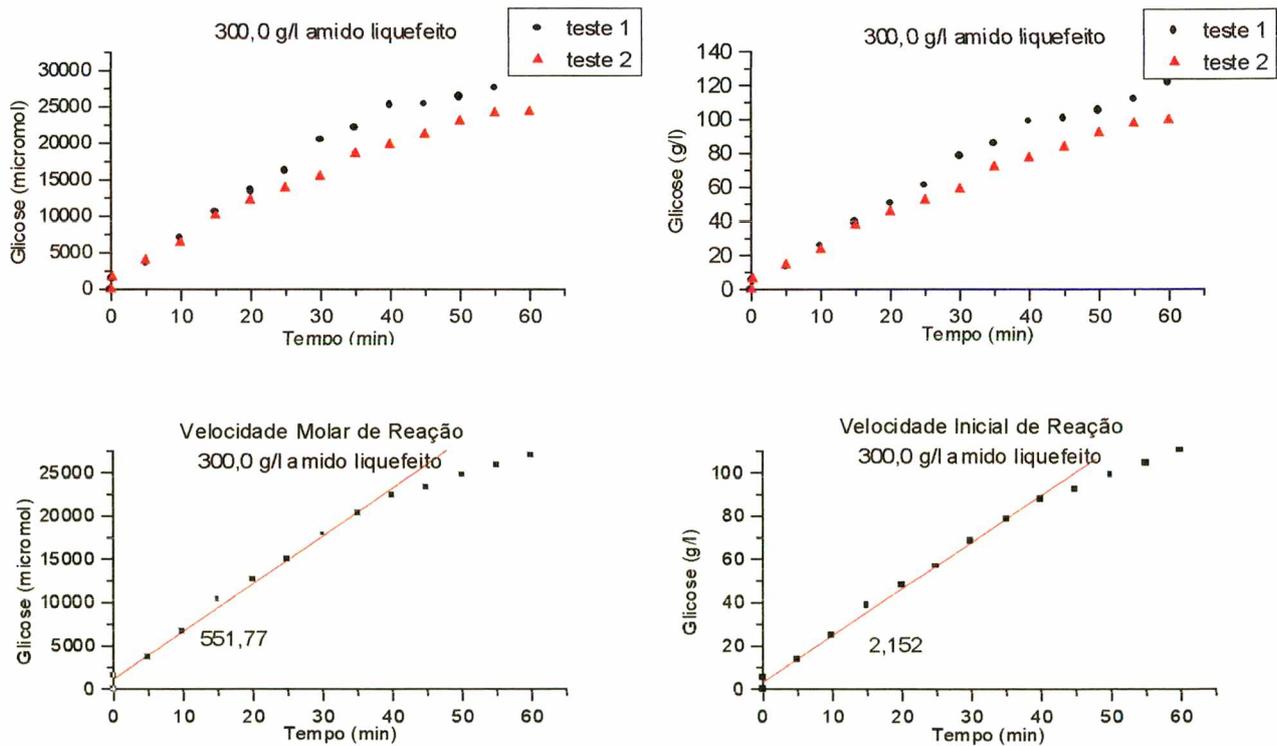


Figura AI 9 – Gráficos de velocidade inicial média de reação e velocidade molar média da enzima amiloglicosidase sobre a concentração de 300,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

Tabela AI 10 – Formação de glicose em g/l e μmol durante as hidrólises realizadas às concentrações de 1 ml AMG/ l de amido liqüefeito (experimento 1) e 0,5 ml AMG/ l de amido liqüefeito (experimento 2).

Tempo de reação (min)	Vol. de reação (ml)	Reação 1		Reação 2	
		Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado	Glicose formada (mg/ml)	micromoles de glicose formado
0	1000,00	0,0000	0,00	0,0000	0,00
20	999,50	---	---	3,2857	18244,82
40	999,00	3,1402	17428,33	2,7143	15064,31
60	998,50	4,7256	26214,01	3,7419	20762,48
80	998,00	9,7561	54092,15	9,7143	53860,34
100	997,50	48,7805	270325,22	26,5714	147250,01
120	997,00	97,2561	538690,73	46,5713	257953,98
140	996,50	122,5610	678511,31	68,0321	376633,26
160	996,00	125,3049	693353,73	70,0017	387342,74
180	995,50	145,7317	805977,26	92,5714	511971,44
200	995,00	166,7683	921858,10	96,5804	533825,40
220	994,50	176,2195	973612,74	118,5740	655106,99
240	994,00	192,0732	1060670,89	127,4286	703689,05
260	993,50	205,4878	1134178,50	128,1290	707200,90

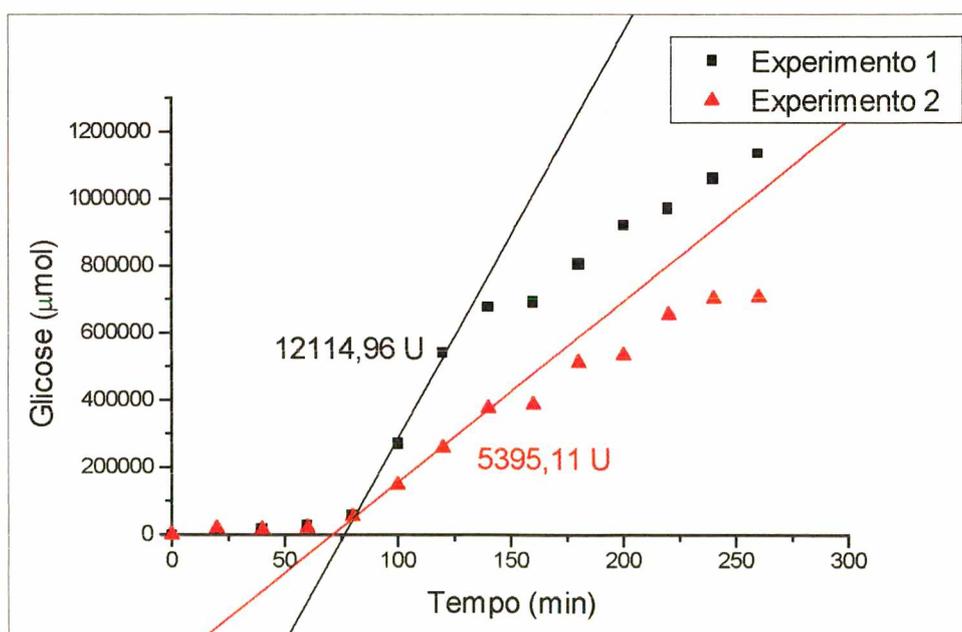


Figura AI 10 – Determinação da atividade (U) da amiloglicosidase nos experimentos 1 e 2, sobre uma concentração de 300,0 g/l de amido liqüefeito - pH 4,5 e temperatura de 55-57°C.

ANEXO II

RESULTADOS EXPERIMENTAIS:

CULTURAS EM “SHAKER”

O Anexo II apresenta os resultados experimentais dos ensaios realizados em “shaker”.

Os dados dos experimentos com a solução vitamínica e com extrato de levedura em concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 (g/l) estão demonstrados nas figuras A II 1, A II 2, A II 3, A II 4, A II 5 e A II 6, respectivamente.

De acordo com a metodologia de amostragem, os gráficos apresentam a concentração de célula (g/l) contra o tempo (hora) e concentração de glicose (g/l) contra o tempo (hora) com os valores médios das amostras, os valores obtidos no frasco 1 e os valores das primeiras amostras de cada frasco.

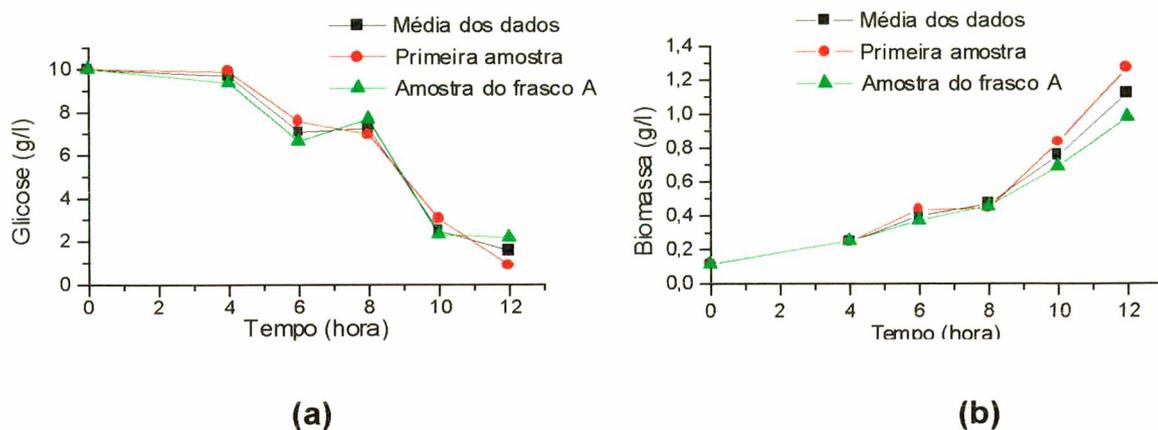


Figura All 1 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) com solução vitamínica – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.

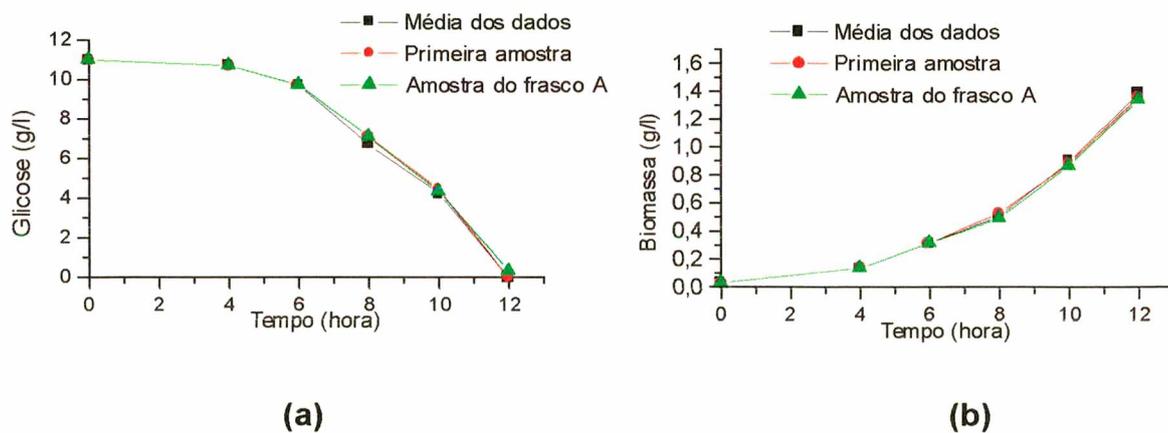


Figura All 2 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 0,5 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.

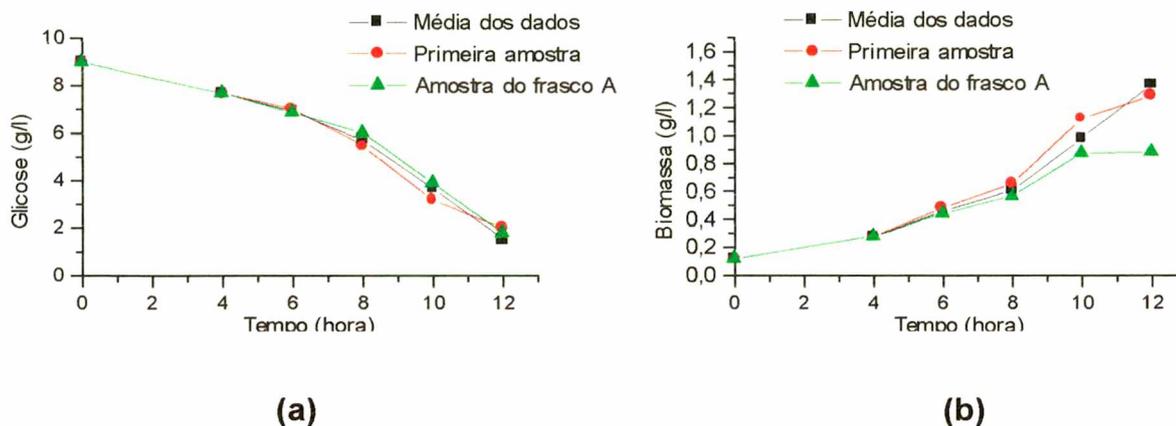


Figura All 3 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 1,0 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.

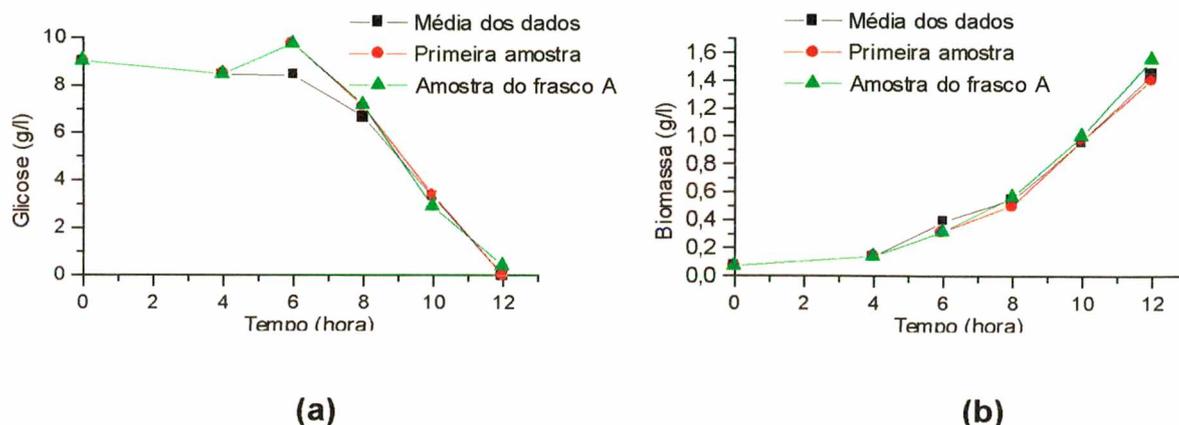


Figura All 4 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 2,0 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.

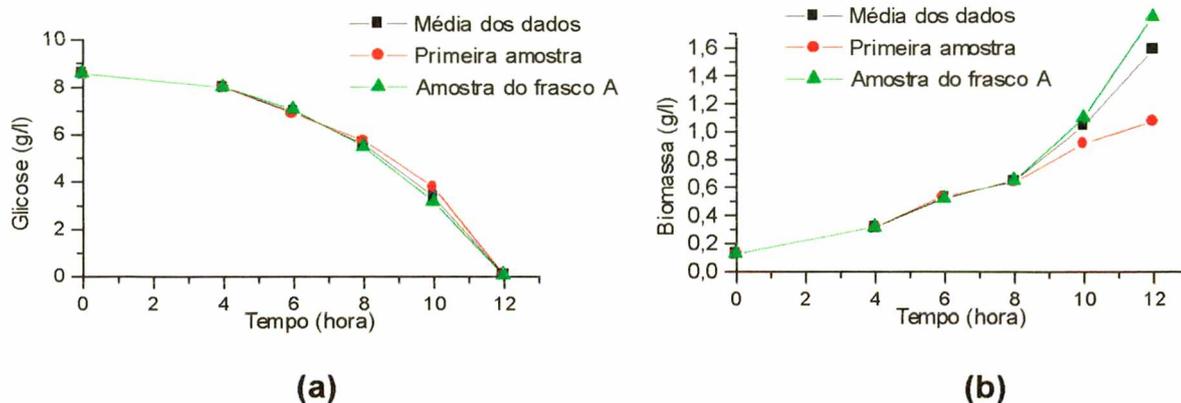


Figura AII 5 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 3,0 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.

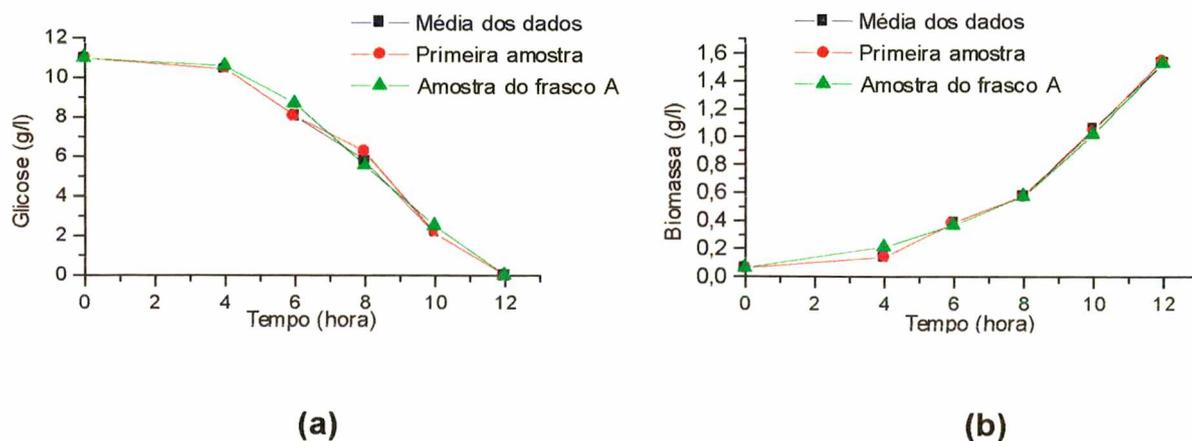


Figura AII 6 – Resultados obtidos com culturas em “shaker” de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 com meio de WIN et al. (1996) modificado, usando 4,0 g/l de extrato de levedura – gráfico (a) e (b) demonstram a concentração de glicose versus tempo e concentração de biomassa versus tempo, respectivamente.

ANEXO III

RESULTADOS EXPERIMENTAIS:

CULTURAS EM BATELADA SIMPLES

O Anexo III apresenta tabelas contendo os valores experimentais obtidos durante as culturas em batelada simples realizadas com as cepas CCT 1530 e CCT 1531. A discussão dos resultados está no item 3 – culturas de células em biorreator, do Capítulo de Resultados e Discussões.

A determinação dos parâmetros cinéticos de cada cultura realizada em batelada simples estão demonstrados nas Figuras deste anexo. Foram determinados as velocidades específicas máximas de crescimento sobre glicose ($\mu_{X/G}$), etanol ($\mu_{X/ETOH}$) e açúcares redutores ($\mu_{X/AR}$), quando possível, e os fatores de conversão de glicose em célula ($Y_{X/G}$) e de etanol em célula ($Y_{X/ETOH}$).

Tabela AIII 1 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 5 g/l de glicose inicial.

Tempo (h)	pH	Conc. de biomassa (g/l)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	4,54	0,050	4,92	0,230
1	4,50	0,062	4,99	0,243
2	4,49	0,080	5,03	0,281
3	4,43	0,100	4,93	0,298
4	4,34	0,145	4,76	0,238
5	4,21	0,215	4,33	0,212
6	4,05	0,288	4,04	0,182
6,5	3,93	0,336	3,93	0,118
7	3,85	0,370	3,82	0,011
8	3,66	0,618	3,39	-0,005
9	3,40	1,020	2,37	0,0014
10	3,21	1,332	1,05	-0,018
11	3,07	1,849	0,88	0,019
12	3,14	1,788	0,21	0,169
13	3,12	1,942	0,12	
14	3,10	2,085	0,02	0,015
15	3,10	2,013	0,04	-0,002
16	3,17	2,077		-0,002
17	3,15	2,279		0,020
18	3,20	2,320		
19	3,18	2,448		-0,012
20	3,23	2,510		-0,027
21	3,23	2,576		
22	3,23	2,679		
23	3,23	2,755		
24	3,23	2,699		
25	3,24	2,576		

Tabela AIII 2 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 10 g/l de glicose inicial.

Tempo (h)	pH	Conc. de biomassa (g/l)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	4,50	-0,051	9,71	
1	4,41	-0,030	7,67	
2	4,39	-0,017	8,93	
3	4,35	0,013	7,90	
4	4,30	0,055	7,81	
5	4,20	0,018	8,21	0,285
6	4,13	0,196	7,73	0,254
7	4,00	0,299	7,47	0,157
8	3,81	0,434	6,86	0,101
9	3,62	0,786	6,28	0,003
10	3,41	1,328	4,79	0,007
11	3,21	1,896	3,26	-0,00
12	2,95	2,517	1,77	0,000
13	2,79	3,544	0,43	0,031
14	2,71	3,654	0,00	0,028
15	2,75	3,963	0,00	0,032
16	2,73	4,190		0,033
17	2,74	4,432		0,030
18	2,74	4,785		0,031
19	2,77	5,049		
20		5,313		
21	2,85	5,152		

Tabela AIII 3 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 15 g/l de glicose inicial.

Tempo (h)	pH	Conc. de biomassa (g/l)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. de etanol (g/l)
0	4,32	0,082	13,153	0.546
1	4,23	0,114	12,585	0.788
2		0,140	12,898	0.899
3	4,04	0,185	11,222	0.898
4	3,93	0,238	12,102	0.983
5	3,75	0,300	10,519	0.934
6	3,55	0,489	10,845	0.852
7	3,34	0,774	10,249	0.721
8	3,17	1,040	8,736	0.639
9	2,98	1,305	6,392	0.711
10	2,78	1,962	4,290	1.066
11	2,60	2,550	0,767	1.520
12	2,58	3,011	0,254	1.407
13	2,54	3,053	0,089	1.273
14	2,53	3,045	0	1.005
15,15	2,54	3,155		0.588
16	2,53	3,223		0.243
17	2,53	3,434		0.173
18	2,53	3,570		0
19	2,55	3,756		
20	2,55	4,306		
21	2,60	4,534		
22	2,61	4,636		
23	2,62	4,737		
24	2,62	4,695		
24,5	2,63	4,619		

Tabela AIII 4 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 15 g/l de glicose inicial e 20 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tempo (h)	pH	Conc. de biomassa (g/l)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. etanol (g/l)
0	4.32	0.120	16.978	0.661
1.5	4.18	0.218	16.703	0.874
2.5	4.05	0.270	17.473	0.896
3.5	3.92	0.328	17.308	0.875
4	3.86	0.448	15.082	0.729
5	3.73	0.518	14.533	0.565
6	3.58	0.740	14.451	0.442
7.25	3.38	1.053	11.951	
8	3.22	1.281	9.698	0.225
9	3.07	1.616	8.489	0.148
10	2.91	2.060	6.538	0.084
10.83	2.77	2.364	3.571	0.074
11.5	2.69	2.694		
12	2.67	2.847	3.484	
12.5	2.66	2.910		
13	2.67	2.935		
14	2.67	2.851	0.011	
16	2.64	2.842	0.008	
18.5	2.64	2.965	0.008	
19.5	2.64	3.058		
21	2.64	3.024		
22	2.64	3.079		
23	2.64	3.143		
24.5	2.66	3.193		
26	2.65	3.508		
27	2.64	3.574		
28	2.64	3.354		
29	2.65	3.453		

Tabela AIII 5 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em 10 g/l de glicose inicial e pH controlado.

Tempo (h)	Concentração de célula (g/l)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de etanol (g/L)
0	0,41332	12,9331	0,28091
1	0,4486	13,6417	0,45115
2	0,60659	12,0472	0,70809
3	0,87349	9,51772	1,26406
4	1,6834	5,73622	2,2958
5	2,67277	1,18726	3,40189
6	3,30934	0,04826	3,64364
7	3,76184	0,02703	3,40427
8	4,33706	0	3,15756
9	4,78956	0	2,64588
10	5,15003	0	2,21072
11	5,27275	0	1,75637
12	5,79428	0	1,23992
13	6,32347	0	0,48861
14	8,23319	0	0,03227
15	8,0798	0	0

Tabela AIII 6 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1530 em meio YM e 10 g/l de glicose inicial.

Tempo (h)	pH	Conc. de biomassa (g/l)	Conc. de glicose (g/l)	Conc. etanol (g/l)
0	4.47	0.134	7.782	0.165
1	4.4	0.259	7.357	0.542
2	4.39	0.349	8.977	0.661
2.75	4.35	0.422	8.313	0.723
4	4.25	0.566		
5	4.1	0.889	7.198	0.836
6	3.99	1.478	7.019	0.649
7	3.92	1.945	6.155	0.360
8	3.93	2.522	4.993	0.067
9	3.91	2.975	3.862	0.028
10	3.91	4.195	2.199	0.030
11	3.87	4.650	1.104	0.032
12	3.92	5.133	0.035	0.014
13	4	5.054	0.003	0.006
14	4.07	5.002		0.002
15	4.13	4.911		-0.009
16	4.15	4.872		-0.011
17	4.3	4.876		
18	4.33	4.848		-0.012
19	4.32	4.864		
20	4.36	4.761		-0.007
21	4.36	4.749		
22	4.38	4.852		-0.014
23	4.41	4.824		
24	4.42	4.800		9.73E-0.5

Tabela AIII 7 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1531 em 5 g/l de glicose inicial.

Tempo (h)	pH	Concentração de biomassa (g/l)	Concentração de glicose (g/l)	Concentração de etanol (g/l)
0	4.45	0.249	5.211	0.237
1	4.32	0.370	4.560	0.329
2	4.15	0.516	3.991	0.563
3	3.82	0.872	1.982	1.197
4	3.65	1.166	0.222	1.783
5	3.62	1.831	0.095	1.775
6	3.59	2.993	0	1.498
7	3.49	2.954	0	1.372
8	3.39	3.060	0	0.900
9	3.18	3.701	0	0.434
10	3.09	4.058	0	0.170
11.66	3.12	4.098	0	0
12	3.12	4.102	0	0
13	3.12	4.117	0	0
14	3.14	4.113	0	0
15	3.17	4.015	0	0
16	3.17	3.905	0	00
17	3.16	4.082	0	0
18.5	3.17	3.999	0	0
20	3.18	4.070	0	0
21.5	3.18	4.023	0	0
23	3.18	4.062	0	0
24	3.19	4.086	0	0

Tabela AIII 8 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1531 em 10 g/l de glicose inicial.

Tempo (h)	pH	Concentração de biomassa (g/l)	Concentração de glicose (g/l)	Concentração de etanol (g/l)
0	4.3	0.427	9.496	0.242
1	4.2	0.462	9.078	0.474
2	4	0.663	7.357	0.716
3	3.6	1.173	4.487	1.250
4	3.3	1.761	0.697	1.883
5	3.2	2.910	0.219	2.850
6	3.1	3.218	0.089	3.431
7	3.1	3.372	0	2.892
8	3	3.356	0	3.172
9	2.9	3.760	0	2.222
10	2.9	4.333	0	2.755
11	2.8	4.692	0	2.560
12	2.8	4.902	0	2.276
13	2.7	5.123	0	2.146
14	2.7	5.376	0	1.705
15	2.7	5.573	0	0.973
16	2.6	6.360	0	1.162
17	2.7	6.320	0	1.038
18	2.7	6.478	0	0.985
19	2.7	6.447	0	0.805
20	2.7	6.384	0	0.936
21	2.7	6.305	0	0.547
22	2.7	6.494	0	0.412
23	2.7	6.289	0	0.222
24	2.7	6.146	0	0.062

Tabela AIII 9 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1531 em 15 g/l de glicose inicial.

Tempo (h)	pH	Concentração de biomassa (g/l)	Concentração de glicose (g/l)	Concentração etanol (g/l)
0	4.5	0.203	14.443	0.242
1	4.3	0.321	14.061	0.474
2	4.2	0.554	12.46	0.716
3	3.9	0.832	10.828	1.250
4	3.5	1.230	6.791	1.883
5	3.2	0.832	1.330	2.850
6	3.1	2.397	0.005	3.431
7	3.13	1.820	0	2.892
8	3	3.081	0	3.172
9	3	3.823	0	2.221
10	2.9	3.712	0	2.755
11	2.9	4.068	0	2.560
12	2.9	4.194	0	2.276
13	2.8	4.257	0	2.146
14	2.8	4.297	0	1.705
15	2.8	4.423	0	0.973
16	2.7	4.487	0	1.162
17	2.7	4.510	0	1.038
18	2.7	4.597	0	0.985
19	2.7	4.945	0	0.805
20	2.6	4.890	0	0.936
21	2.6	5.111	0	0.547
22	2.6	5.143	0	0.412
23	2.5	5.530	0	0.222
24	2.5	5.570	0	0.062

Tabela AIII 10 – Dados experimentais para a cultura em batelada simples da cepa CCT 1531 em meio YM com 10 g/l de glicose PA inicial e pH controlado.

Tempo (h)	pH	Concentração de biomassa (g/l)	Concentração de glicose (g/l)	Concentração etanol (g/l)
0	4.5	0.413	12.933	0.281
1	4.5	0.449	13.642	0.451
2	4.5	0.607	12.047	0.708
3	4.5	0.874	9.518	1.264
4	4.5	1.683	5.736	2.296
5	4.5	2.673	1.187	3.402
6	4.5	3.309	0.048	3.644
7	4.5	3.762	0.027	3.404
8	4.5	4.337	0	3.158
9	4.5	4.790	0	2.646
10	4.5	5.15	0	2.2101
11	4.5	5.273	0	1.756
12	4.5	5.794	0	1.240
13	4.5	6.324	0	0.489
14	4.5	8.233	0	0.032
15	4.5	8.080	0	0

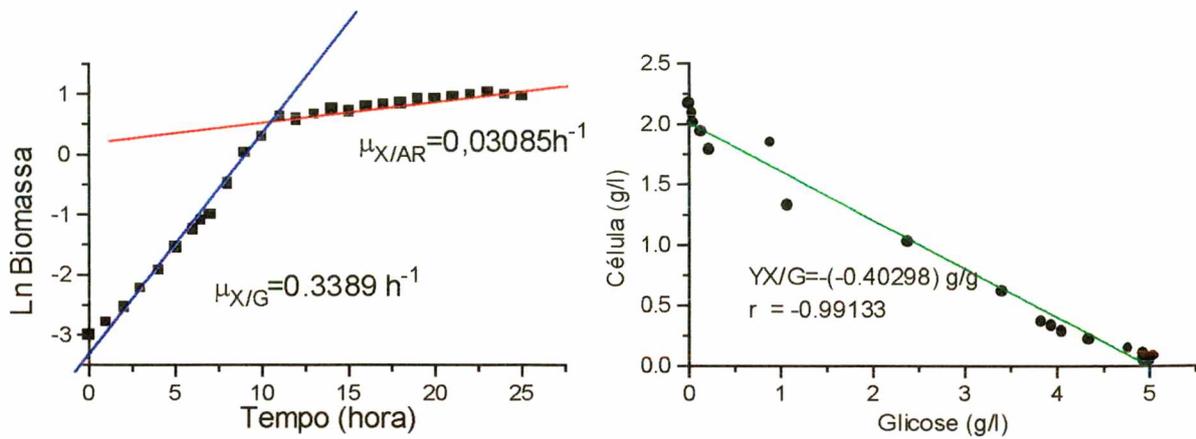


Figura AIII 1 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1530, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 5 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

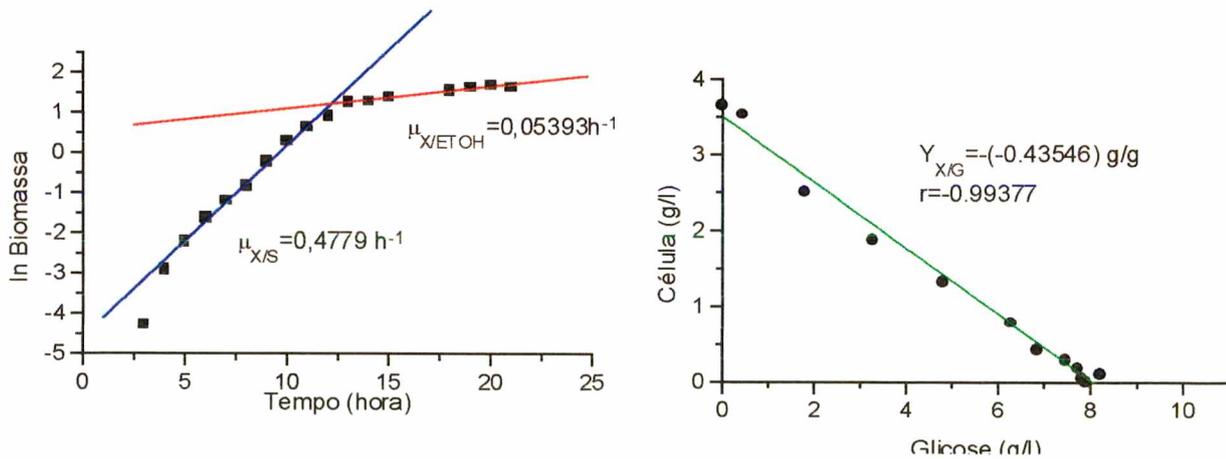


Figura AIII 2 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1530, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

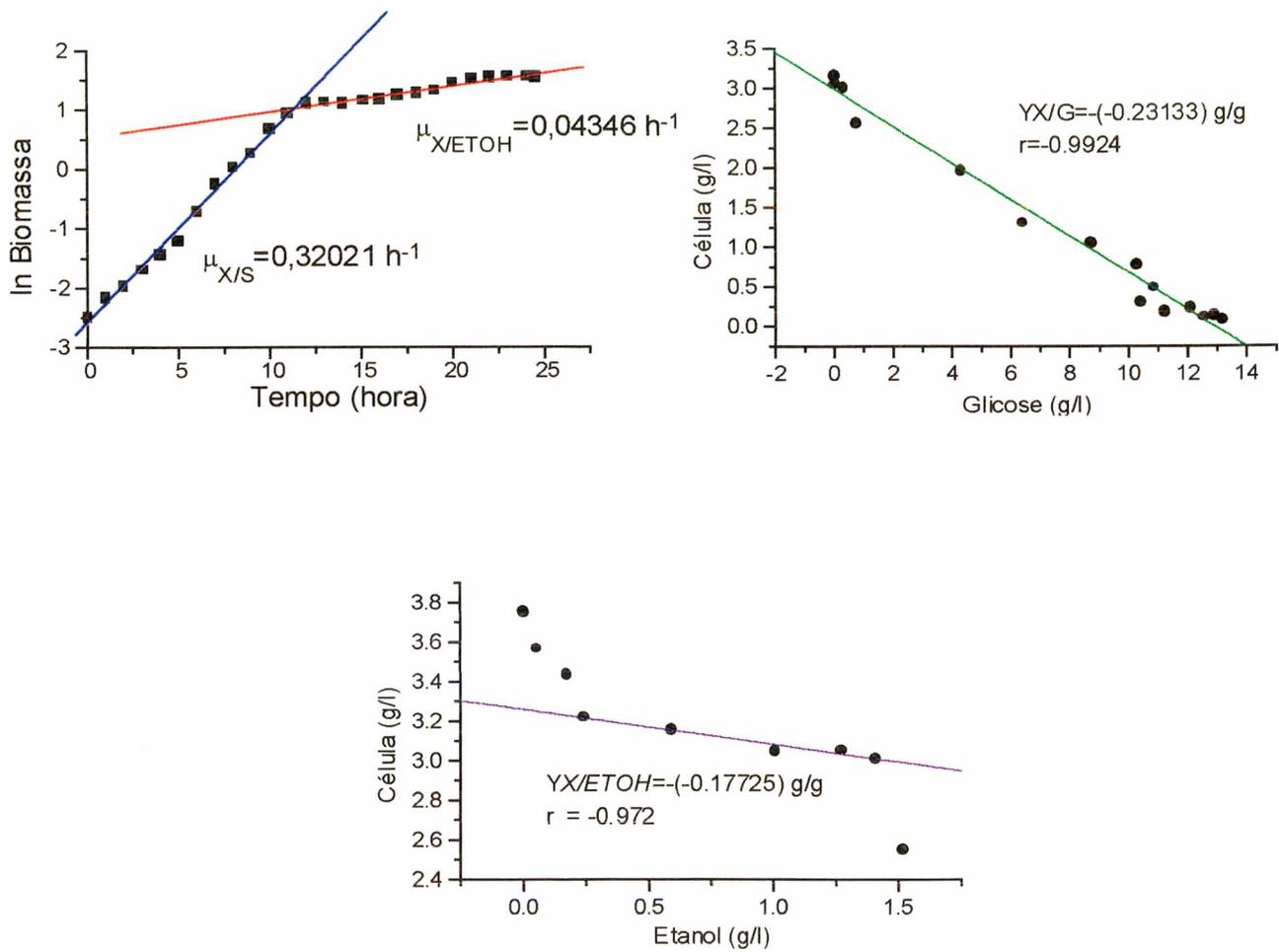


Figura AIII 3 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1530, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 15 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

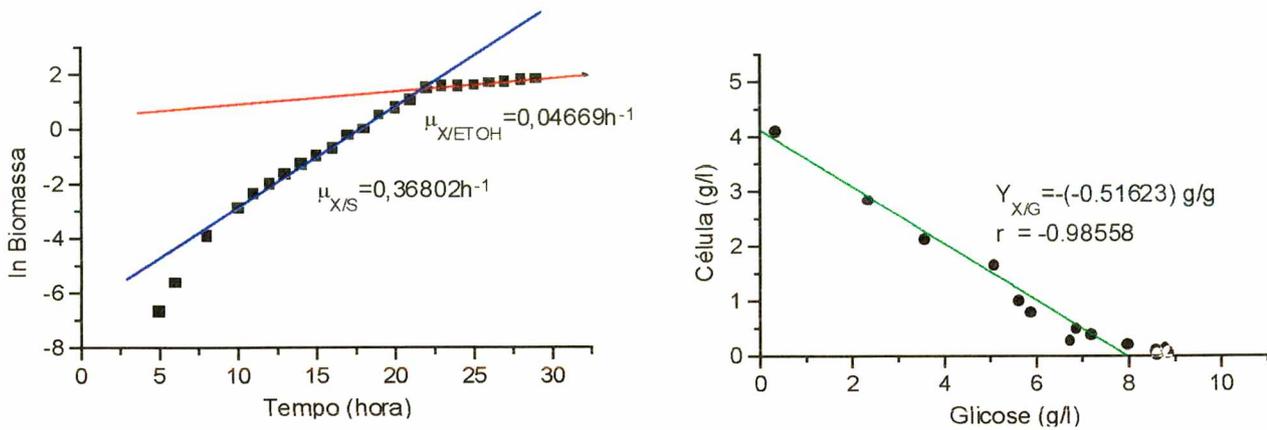


Figura AIII 4 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1530, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 15 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca suplementado com 20 g/l de sulfato de amônia.

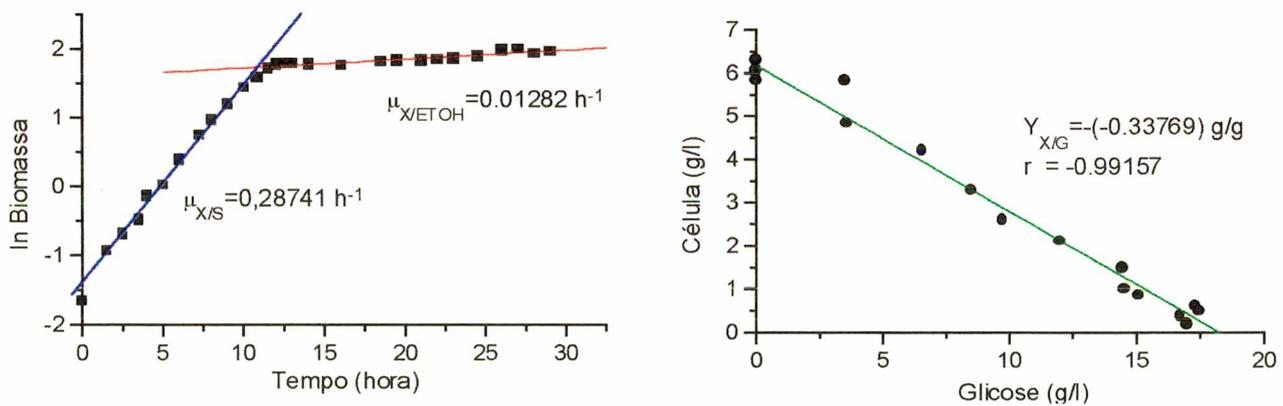


Figura AIII 5 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1530, em meio YM com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

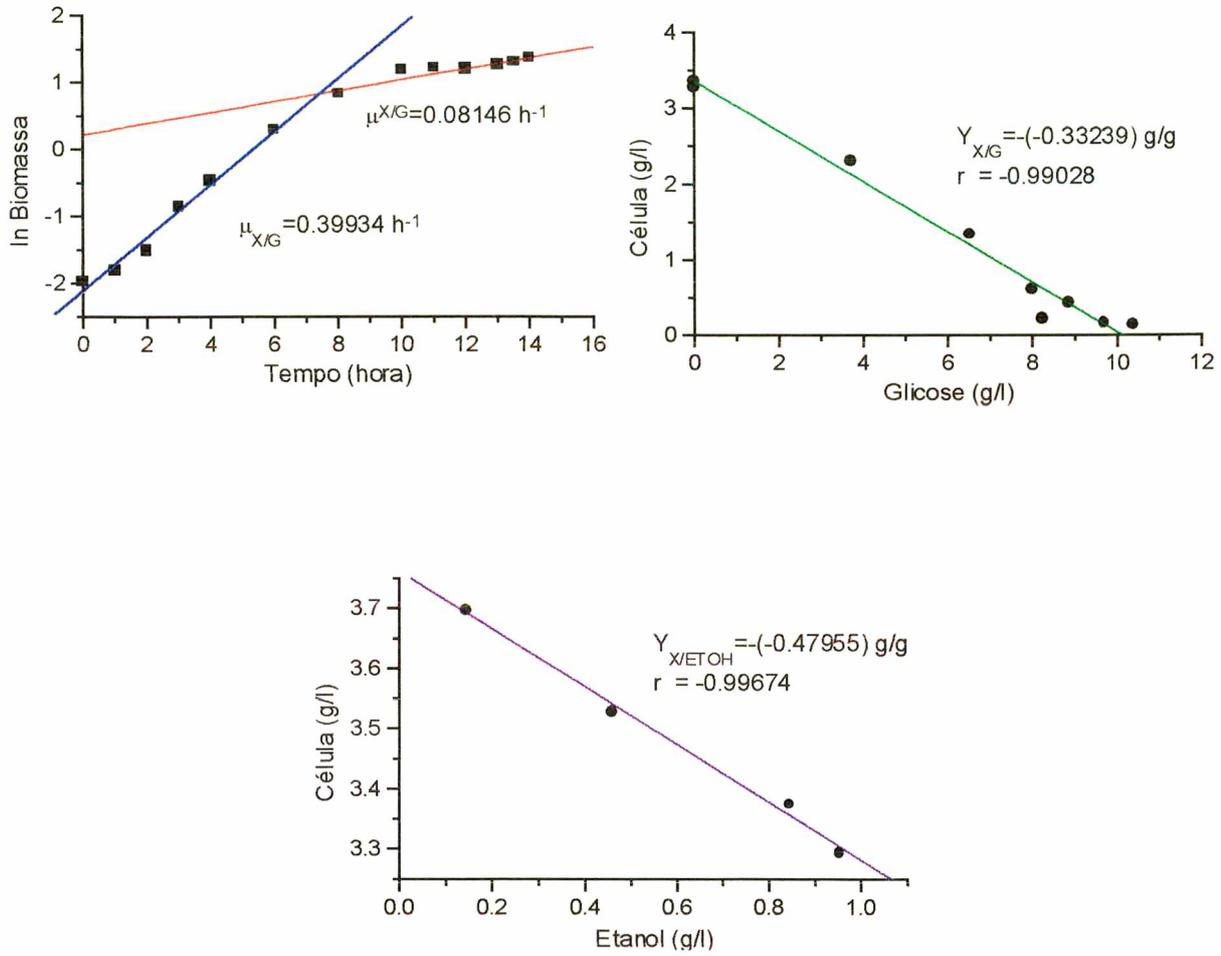


Figura AIII 6 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1531, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 5 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

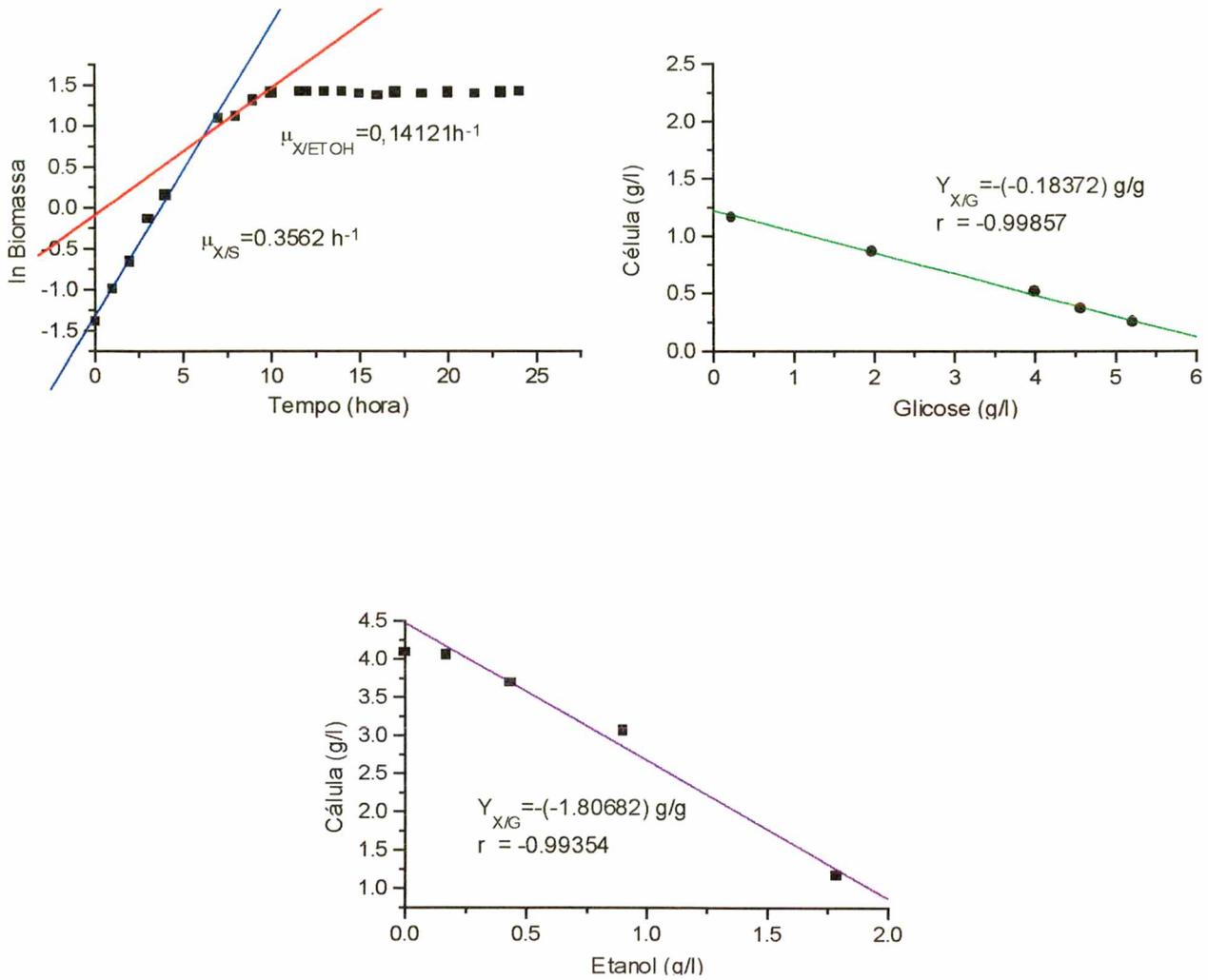


Figura All 7 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1531, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

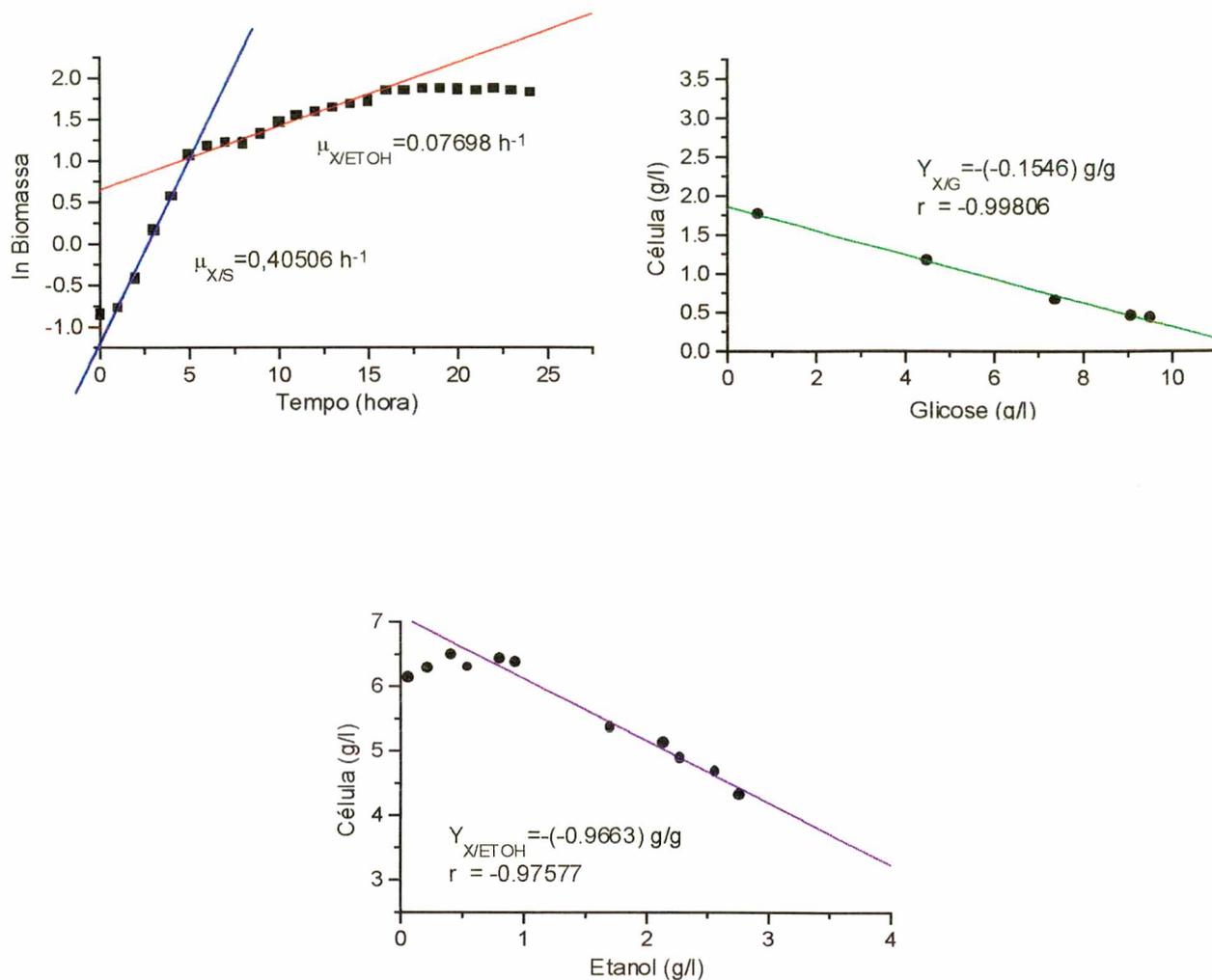


Figura Alll 8 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1531, em meio de WIN et al. (1996) modificado com 15 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

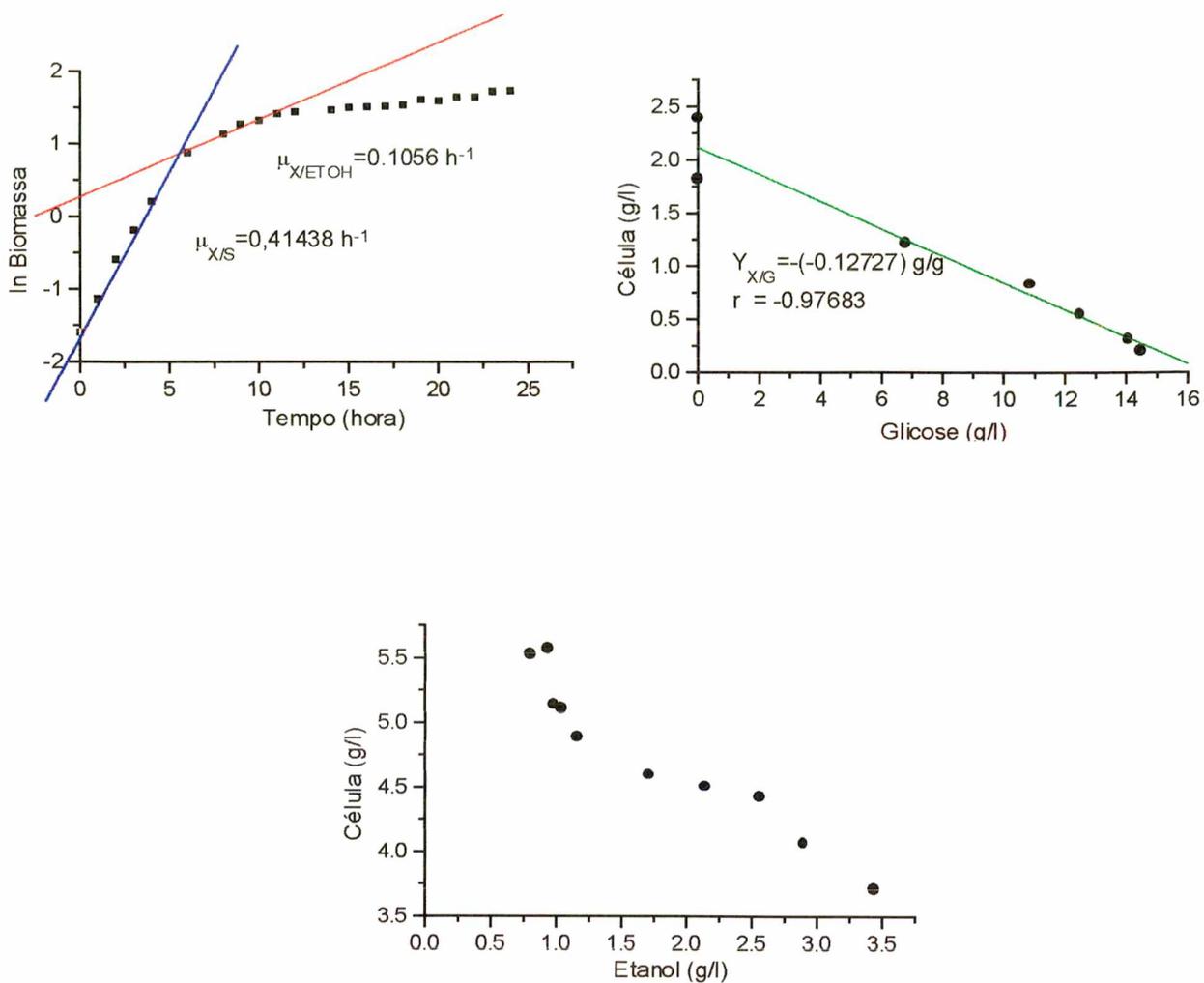


Figura All 9 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1531, em meio YM com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

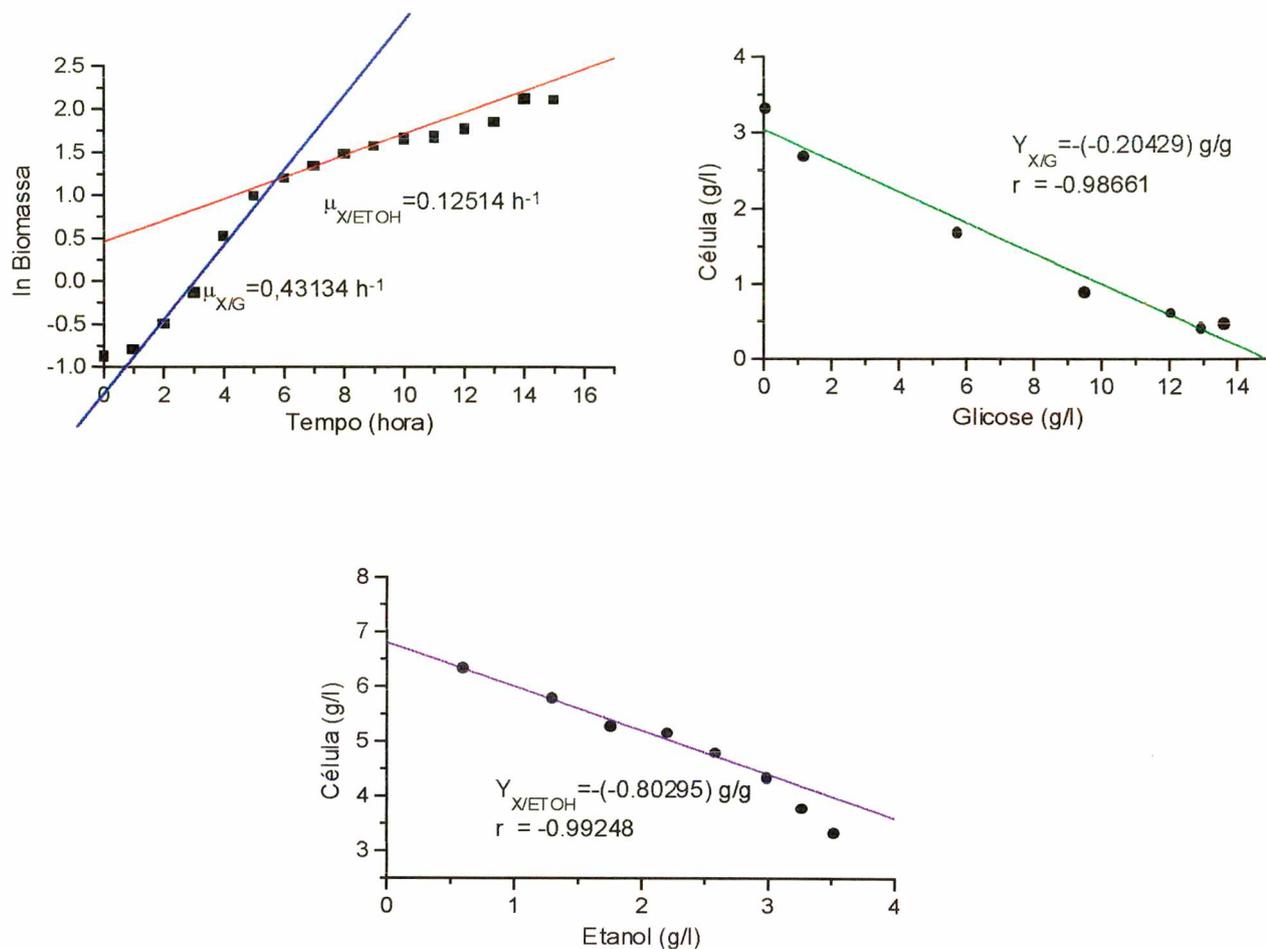


Figura AIII 10 – Parâmetros cinéticos da cultura em batelada simples de *Saccharomyces cerevisiae* CCT1531, em meio de YM com 10 g/l de glicose de hidrolisado de amido de mandioca.

ANEXO IV

RESULTADOS EXPERIMENTAIS:

CULTURAS EM BATELADA ALIMENTADA

O Anexo IV apresenta os dados experimentais obtidos nos ensaios em batelada alimentada.

Tabela AIV 1 - Dados do processo de batelada e batelada alimentada para cultura e células de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531 em meio YM.

Tempo (h)	Concentração de célula (g/l)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de etanol (g/L)	Volume de meio (l)
0	8,0798	0	0	3,303
0,5	-----	0,78077	0,1084	3,325
1,0	8,89277	0,49804	0,319	3,325
1,5	-----	0,10618	0,17956	3,365
2,0	9,46032	0,59846	0,27267	3,365
2,5	-----	0,04633	0,28091	3,415
3,0	10,4727	1,28185	0,63694	3,425
3,5	-----	0,16598	0,63242	3,435
4,0	10,7948	0,10236	0,41685	3,475
4,5	10,9482	0,49213	0,59134	3,485
5,0	11,1323	0,12402	0,33765	3,525
5,5	11,347	0,54528	0,95021	3,525
6,0	11,5464	0,07087	0,91731	3,525
6,5	11,6538		0,70541	3,525
7,0	11,8532	0	0,37083	3,525
7,5	12,2367		0,06815	3,555
8,0	11,4237	0,47699	0,09357	3,555
9,5	12,0219		0,02185	3,585
10,0	11,7689	0,36402	0,05478	3,585

Tabela AIV 2 - Dados do processo de batelada e batelada alimentada para cultura e células de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1530 em meio de WIN et al. (1996) modificado.

Tempo (h)	Concentração de célula (g/l)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de etanol (g/L)	Volume de meio (l)
0	3,52963	0	0,45858	3,3
0,5	3,69845	0,264	0,14419	3,31
1,0	3,90397	0,5678	0,12871	3,33
1,5	-----	0,7	0,12825	3,33
2,0	4,40308	0,6406	0,13277	3,37
2,5	-----	0,5884	0,14447	3,43
3,0	4,90219	0,3871	0,18666	3,51
3,5	-----	0,9291	0,26596	3,59
4,0	5,40864	0,4528	0,56237	3,59
4,5	-----	0,5793	0,79575	3,59
5,0	6,34448	0,0128	0,79783	3,59
6,0	6,7812	0	0,72578	3,59
6,5	-----	0	0,70887	3,59
7,0	7,23627	0	0,63183	3,63
7,5	-----	-----	0,64394	3,63
8,0	7,58859	0,0076	0,52115	3,64
8,5	-----	-----	0,53756	3,64
9,0	7,91154	0	0,44273	3,64
9,5	-----	-----	0,39060	3,67
10,0	8,45469	0	0,11794	3,67
10,5	-----	0,0894	1,29840	3,67
11,0	8,73361	0	-----	3,67