

FLOCULAÇÃO DA LEVEDURA *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E CINÉTICA

JOSÉ ANTÓNIO COUTO TEIXEIRA



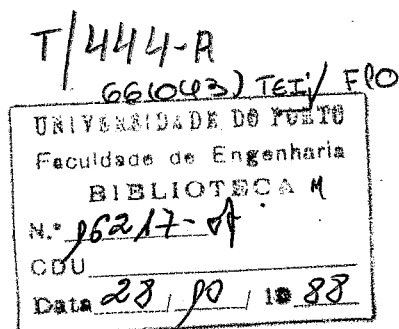
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
FACULDADE DE ENGENHARIA DO PORTO

1988

FLOCULAÇÃO DA LEVEDURA *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E CINÉTICA

JOSÉ ANTÓNIO COUTO TEIXEIRA



0630
T266
8X.2

TESE DE DOUTORAMENTO APRESENTADA

À

FACULDADE DE ENGENHARIA DO PORTO

1988

Publicação Subsidiada pelo
Instituto Nacional de Investigação Científica

SUMARIO

Apresenta-se, neste trabalho, um estudo das características fisiológicas e cinéticas de uma estirpe floculante de K. marxianus. A estirpe floculante foi obtida, usando uma metodologia de fermentação em contínuo, a partir de uma variedade não floculante.

A caracterização da fisiologia de floculação de K. marxianus foi feita comparando a composição bioquímica das paredes celulares das variedades não floculante e floculante e analisando a influência de tratamento químico e enzimático na capacidade de floculação. Determinamos também a acção do pH e de diferentes catiões (di, tri e tetraivalentes) no estabelecimento de agregados da levedura em consideração. A morfologia associada ao fenómeno de floculação foi outro dos aspectos analisados tendo para tal sido utilizada a microscopia electrónica de varrimento.

O fermentador contínuo utilizado foi projectado de modo a englobar uma zona de fermentação e uma zona de separação.

Neste sistema, analisamos a influência das variáveis de operação — taxa de diluição, taxa de recirculação e concentração da fonte de carbono na alimentação — no comportamento cinético e de acumulação de biomassa da levedura K. marxianus.

Simultaneamente desenvolveu-se um modelo que permite a caracterização hidrodinâmica e cinética do bioreactor de floculação.

Uma vez que os processos que funcionam com células floculantes apresentam limitações difusionais que afectam o sistema de transporte

de nutrientes e metabolitos, construimos um reactor que permite determinar o factor de eficácia em flocos de levedura e simultaneamente, analisar a influência de aditivos na floculação.

A minha Mulher

A minha Filha

A meus Pais

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho desejo expressar o meu apreço às várias pessoas e entidades que de algum modo contribuíram para a sua realização.

Desejo igualmente exprimir o meu agradecimento ao Prof. Manuel Mota, supervisor desta tese de doutoramento, pelos seus inestimáveis conselhos e pelo apoio que sempre me prestou ao longo deste trabalho.

Agradeço também à Maria Noémia que dactilografou o texto, todo o interesse e dedicação manifestados.

O meu obrigado à JNICT e à CEE-DGXII pelos apoios financeiros concedidos que permitiram a aquisição de equipamento sem o qual não teria sido possível realizar este trabalho.

Finalmente, uma palavra de gratidão para os meus familiares, amigos e colegas de laboratório pelo estímulo e apoio constantes durante estes anos.

Um agradecimento muito especial à minha mulher.

INDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Metodologia	5
2. ANALISE BIBLIOGRAFICA	7
2.1 Bioquímica de fermentação alcoólica	7
2.2 Influência do oxigénio na actividade das leveduras	11
2.3 Influência do substrato na actividade das leveduras	11
2.4 Influência do etanol na actividade das leveduras	12
2.5 Influência de outros produtos de fermentação na actividade das leveduras	14
2.6 Novas tecnologias de fermentação	15
2.7 Floculação de leveduras	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Estirpe	38
3.2 Processos de fermentação	38
3.3 Caracterização bioquímica das paredes	46
3.4 Microscopia electrónica das células	49
3.5 Equipamento	50
3.6 Balanços mássicos: cálculo dos parâmetros cinéticos	55
4. INDUÇÃO DE FLOCULAÇÃO: ANALISE CINÉTICA COMPARATIVA DAS ESTIRPES NÃO FLOCULANTE E FLOCULANTE	62
4.1 Caracterização da estirpe não floculante	62
4.2 Isolamento da estirpe floculante de <u>K. marxianus</u>	80

	Pág.
4.3 Caracterização da estirpe floculante	83
4.4 Comparação dos parâmetros cinéticos das variedades floculante e não floculante	90
5. FISILOGIA DE FLOCULAÇÃO	93
5.1 Caracterização bioquímica das paredes	94
5.2 Eliminação da capacidade de floculação	98
5.3 Tratamento químico e enzimático das células de <u>K. marxianus</u> floculante	99
5.4 Retenção de cálcio na floculação	103
5.5 Influência do pH do meio e do cálcio na floculação	104
5.6 Acção de diferentes catiões na floculação	107
5.7 Morfologia	111
6. FERMENTAÇÃO EM CONTINUO	115
6.1 Teste de homogeneidade do reaktor	115
6.2 Caracterização do arejamento do meio - determinação do K_{La}	117
6.3 Caracterização global do fermentador	119
6.4 Caracterização das limitações difusionais em flocos de leveduras - determinação do factor de eficácia	159
7. MODELIZAÇÃO	167
7.1 Descrição da instalação	167
7.2 Método utilizado	169
7.3 Resultados experimentais	170

	Pág.
7.4 Descrição do modelo	170
7.5 Modelização hidrodinâmica	181
7.6 Modelização cinética	190
7.7 Modelo global	190
8. CONCLUSÕES	195
9. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	199
APENDICES	201
A.1 Indução de floculação em fermentação contínua de <u>Sacharomyces bayanus</u>	201
A.2 Indução fisiológica da flòculação em diferentes estirpes de leveduras	205
A.3 Sistema automático de medição de caudais gasosos	220
A.4 Determinação da fracção volúmica de sólidos no fermentador	225
A.5 Cromatografia do etanol	227
A.6 Tabelas de valores experimentais	228
NOMENCLATURA	272
BIBLIOGRAFIA	274

CAPITULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 - Condições Gerais

A floculação microbiológica é um fenómeno que foi amplamente investigado, sobretudo sob o ponto de vista da engenharia bioquímica, quando se pensava que os bioreactores da floculação seriam uma resposta à fermentação em contínuo da cerveja (Atkinson B. e Daoud T.S. (1976), Greenshields R.N. e Smith E.L. (1971)).

Problemas de índole organoléptica acabaram por fazer esmorecer a investigação neste domínio. No entanto, e pelas razões a seguir referidas, o interesse por este assunto voltou a renascer. Os investigadores actualmente envolvidos dão-se conta que o problema é bastante complexo e que a compreensão e domínio do fenómeno necessita de uma abordagem integrada que inclua o estudo da fisiologia das leveduras floculantes, da regulação e da genética da floculação.

O termo floculação é sinónimo de muitos outros termos, utilizados frequentemente, segundo os investigadores, tais como adesão, aderência, aglomeração, aglutinação.

As estruturas resultantes da floculação podem ser denominadas flocos, agregados, aglomerados, partículas. Calleja G.B. e Johnson B.F. (1977) propõem que se considere que 10 células é o número mínimo exigível para os agregados, aceitando-se a partir deste número a designação de sistemas floculantes.

A floculação é um fenómeno bastante difundido na Natureza. De

facto, não é raro verificar-se o aparecimento de uma fracção floculante no seio de uma cultura microbiana. Calcula-se (Lewis C.W. et al. (1976)) que a frequência de mutação espontânea de uma população não floculante em floculante é da ordem de 5.5×10^{-4} a 1.7×10^{-2} , o que corresponde a um valor 100 a 10 000 vezes superior ao da frequência de mutação espontânea de outros genes. Estes cálculos podem não estar correctos na medida em que a floculação depende fortemente das condições e meio de crescimento.

Com efeito, é razoável admitir-se que células potencialmente floculantes não se exprimam em condições de fácil acesso aos nutrientes porquanto a própria existência de flocos provoca limitações difusionais, diminuindo as áreas de transferência e afectando por isso todo o sistema de transporte quer de nutrientes quer de metabolitos.

Em suma, células constitutivamente floculantes possuem provavelmente desvantagens selectivas e, pelo contrário, as células indutivamente floculantes possuirão uma vantagem selectiva adicional.

O Homem, na sua actividade produtiva, pode tirar proveito da capacidade de floculação das estirpes e é possível considerar um conjunto de situações em que a floculação pode ser utilizada com vantagens.

1 - A utilização de culturas de alta densidade celular

Tem-se assistido nos últimos anos a um desenvolvimento da investigação em culturas de alta densidade celular, sendo referidas na literatura densidades de 120-180 g/l de peso seco de células (Mehaya *et al.*, e Cherian M. (1984), Mitany Y. *et al.* (1984) e Mota M. *et al.* (1987)).

Deste modo, as produtividades dos bioreactores podem ser multiplicadas 20 a 50 vezes em relação às produtividades de bioreactores normais, o que tem por consequência:

- a) drásticas diminuições de volume de operação
- b) economias muito grandes em equipamento de processo
- c) menores quantidades de líquido a manipular
- d) maior facilidade de separação dos produtos

Os bioreactores de floculação são uma das tecnologias de alta densidade celular a par de outras tais como as tecnologias de membrana (ultrafiltração, microfiltração) e a reciclagem por centrifugação. Embora os bioreactores de floculação sejam aqueles que apresentam menores densidades celulares são, no entanto, os que apresentam menores custos, tanto fixos como de operação (Comberbach D.M. *et al.* (1984), Netto C. B. *et al.* (1985)).

2 - A recuperação assistida de produtos

Uma das etapas fundamentais de qualquer processo biotecnológico é a separação e a purificação dos produtos. Esta fase inicia-se pela

separação das células, geralmente por filtração ou centrifugação, operações com custos relativamente elevados. Qualquer processo que diminua a quantidade de células a filtrar ou a centrifugar diminui automaticamente os custos de produção. A indução de floculação após a fase de fermentação constituiria uma forma económica de recuperação ensaiada, aliás com sucesso, na recuperação de microalgas, por exemplo (Kunikane S. et al. (1986), com o auxílio de aditivos. O ideal seria a indução da floculação por mudança brusca de parâmetros físicos (temperatura, por exemplo) ou químicos (pH, força iónica). Esta forma de recuperação é a mais aconselhável no caso em que, querendo recuperar células activas, a filtração ou a centrifugação sejam agressivas.

3 - A fermentação em contínuo de culturas geneticamente modificadas

As culturas de células geneticamente modificadas são difíceis de fazer crescer em contínuo, pois em geral as taxas específicas de crescimento das populações mutantes são inferiores às taxas específicas de crescimento das estirpes selvagens. Dado que há sempre tendência para reversões espontâneas, corre-se o risco, numa fermentação em quimiostato, de perder totalmente a estirpe mutante. Uma alternativa seria a utilização de severas pressões de selecção recorrendo a antibióticos ou inibidores, constituindo um risco para o meio ambiente. A outra alternativa seria a utilização de estirpes mutantes que, ao invés da estirpe selvagem, fossem simultaneamente floculantes.

As vantagens seriam várias:

- a pressão positiva de selecção não é agressora do meio ambiente.
- a estirpe mutante manter-se-ia confinada ao bioreactor.
- obter-se-ia uma cultura mutante de alta densidade celular em contínuo, com um enorme aumento de produtividade.

1.2 - Metodologia

No capítulo seguinte fazemos uma análise dos aspectos teóricos mais importantes sobre bioreactores de alta densidade celular e fisiologia da floculação em leveduras. No capítulo 3 referimos a estirpe utilizada, as condições experimentais em que se realizou o trabalho e o equipamento e técnicas analíticas utilizadas. No capítulo 4, descrevemos o processo de indução de floculação em Kluyveromyces marxianus e comparamos as características cinéticas da estirpe mãe não floculante com as da variedade floculante. No capítulo seguinte estudamos alguns aspectos da fisiologia da floculação em K. marxianus. Para tal, recorremos à análise da composição bioquímica das paredes das duas variedades e ao estudo da acção de diferentes tratamentos e do pH e vários catiões na formação de agregados. No capítulo 6 caracterizamos o processo de floculação em contínuo, analisando a acção das diferentes variáveis de operação no comportamento do bioreactor de floculação. Desenvolvemos também nesta secção um método que permite a determinação do factor de eficácia em flocos de leveduras. No capítulo 7 desenvolvemos um

modelo matemático que permite descrever hidrodinâmica e cineticamente o fermentador de floculação.

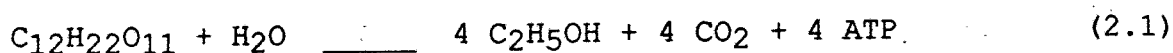
Finalmente, no último capítulo são apresentadas as conclusões e algumas sugestões para trabalho futuro decorrentes do estudo realizado.

CAPITULO 2: ANALISE BIBLIOGRAFICA

2.1 - Bioquímica da fermentação alcoólica

A lactose pode ser degradada pelas leveduras segundo múltiplas vias metabólicas conforme se representa na Fig. 2.1. Inicialmente é hidrolisada em glucose e galactose que são convertidos em glucose 6-fosfato por diferentes mecanismos.

Independentemente das condições de cultura (aerobiose ou anaerobiose) as leveduras numa primeira etapa - glicólise - transformam a glucose-6-fosfato em piruvato. Nos sistemas anaeróbicos ou fracamente arejados o piruvato é catalizado segundo a via de Embden-Meyerhof conduzindo à formação de etanol e dióxido de carbono. Na Fig.2.2 representa-se, em mais detalhe, a via metabólica de transformação de lactose em etanol. Globalmente, a conversão de lactose em etanol é representada pela seguinte equação:



P.M. 342 18

184 176

A partir desta equação deduz-se que 1kg de lactose devia produzir .538 kg de etanol. Contudo, a síntese celular e a síntese de produtos secundários reduzem o rendimento estequiométrico a 90-95% deste valor.

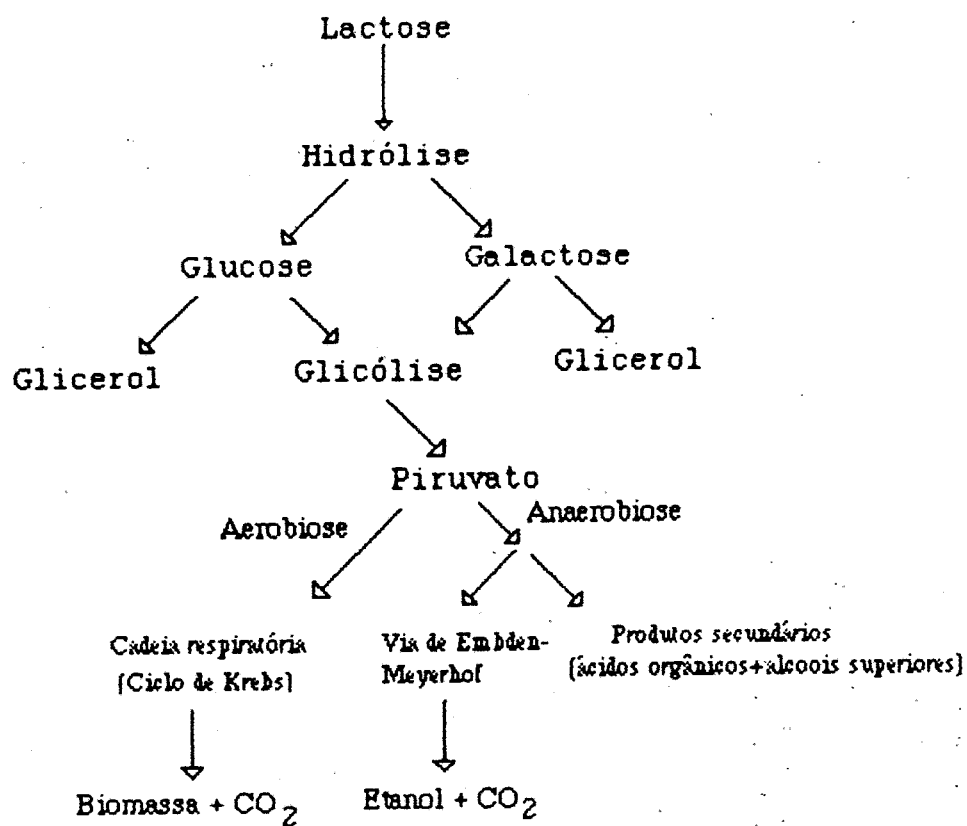


Fig. 2.1 - Vias metabólicas de degradação da lactose pelas leveduras

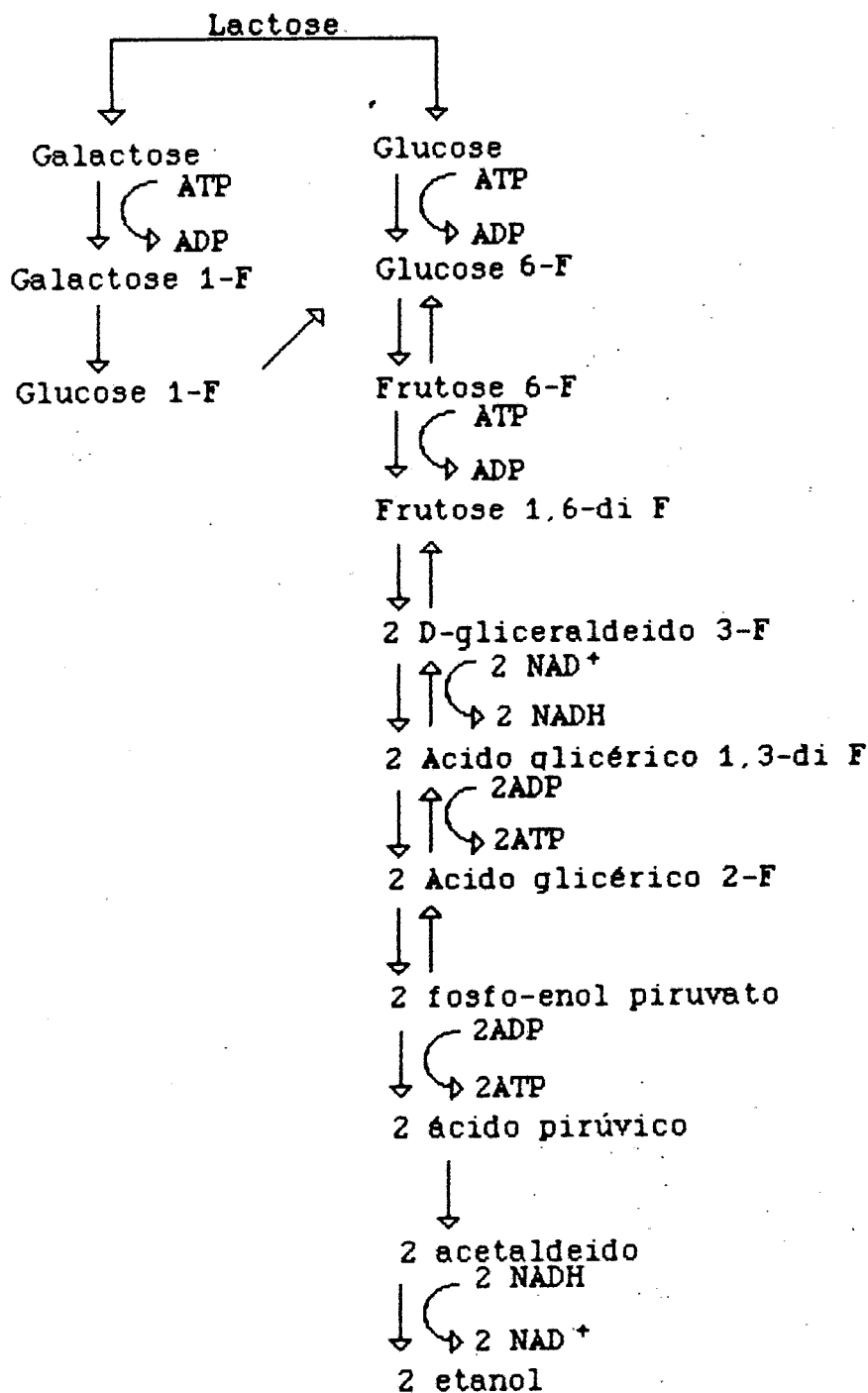


Fig. 2.2 - Via metabólica de transformação de lactose em etanol

por substrato (Holzer, 1968). Para concentrações de substrato superiores a 1-5g/l, há uma inibição das enzimas respiratórias e o metabolismo torna-se fermentativo, independentemente da concentração em oxigénio — efeito Crabtree.

A acção conjunta do oxigénio e da glucose é representada na Tab. 2.1

Tab.2.1 - Acção conjugada do oxigénio e da glucose no metabolismo de S. cerevisiae.

Glucose g/l		1-5	150 →
+O ₂	Metabolismo respiratório (efeito Pasteur)	Metabolismo fermentativo	Inibição pelo substrato das vias oxidativas
-O ₂	Metabolismo fermentativo	Metabolismo fermentativo	e fermentativas

Por outro lado, a acção inibidora da concentração inicial de substrato é mais acentuada no crescimento celular do que na produção de etanol quando se trata de velocidades de reacção e o seu efeito parece ter um carácter irreversível (Strehaiano et al. (1984)).

Neste aspecto, deve ser referida a utilização de reactores contínuos que permitem minimizar o efeito inibidor do substrato. Tal

Em condições de anaerobiose, a síntese celular é reduzida relativamente à que se observa em aerobiose, na qual o piruvato segue a via da cadeia respiratória (ciclo de Krebs) conduzindo à formação de biomassa e dióxido de carbono. Cysewski e Wilke (1976) referem um rendimento de produção de biomassa de 40 a 47% em aerobiose e 5 a 12% em anaerobiose. Deve, de qualquer modo, referir-se que a noção de aerobiose está intimamente ligada às concentrações de açúcar no meio de cultura.

2.2 - Influência do oxigénio na actividade das leveduras

O oxigénio desempenha um papel fundamental como factor de crescimento. É indispensável como o demonstraram David e Kirsop (1973) para a síntese dos ácidos gordos poliinsaturados e dos lípidos membranares das leveduras. Segundo Cowland e Maule (1966) basta, em quimiostato, uma pressão de oxigénio de .05 mm de Hg para que as leveduras estejam em boas condições fisiológicas. Uma oxigenação muito acentuada na presença de pequenas quantidades de substrato impede a fermentação e toda a glucose é convertida em células (efeito Pasteur positivo), água e dióxido de carbono. Pelo contrário, a ausência total de oxigénio diminui a capacidade de fermentação das leveduras (efeito Pasteur negativo).

2.3 - Influência do substrato na actividade das leveduras

Concentrações de glucose superiores a 150g/l inibem as enzimas da cadeia respiratória e as do metabolismo fermentativo — inibição

é possível devido a uma conversão quase imediata pelo que as leveduras encontram-se em contacto com concentrações de açúcar próximas do zero.

2.4 - Influência do etanol na actividade das leveduras

Classicamente, admite-se que o etanol constitui um factor primordial na inibição da fermentação alcoólica. Exceptuando em vinificação na indústria raramente se atingem concentrações de etanol superiores a 80g/l. Verifica-se que concentrações de etanol da ordem dos 40g/l podem provocar uma diminuição acentuada da viabilidade e velocidade de crescimento celular das leveduras (Thomas et al. (1978), Holzberg et al. (1967), Novak et al. (1981)) e também uma redução da taxa de produção de etanol (Strehaiano et al. (1978), Goma et al. (1980)).

Existem vários modelos que pretendem explicar a inibição por etanol

$$\mu = \mu_{\max} (1 - a P) \quad \text{Hinshelwood (1946)}$$

$$\mu = \mu_{\max} \exp (- K_p P) \quad \text{Aiba (1968)}$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{K_p}{K_p + P} \quad \text{Ierusalimski (1969)}$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\text{crit}}} \right)^n \quad \text{Levenspiel (1980)}$$

A compreensão deste fenómeno tornou-se mais complexa quando alguns autores (Nagodawithana e Steinkraus (1976), Novak et al, (1981)) demonstraram que o álcool endógeno é bastante mais inibidor que o álcool exógeno.

Resultados mais recentes põem em causa a noção de toxicidade do etanol. Mota (1985) verificou que o efeito inibidor do etanol se encontra associado ao da glucose e que a utilização de sistemas "fed-batch", ao dissociarem estes dois efeitos, permite ultrapassar os clássicos 100g/l de etanol de paragem de fermentação.

Outros autores (Ryu et al.(1984), Hoppe et al.(1984)) indicam que há um aumento à tolerância ao etanol quando as fermentações são micro arejadas. O fornecimento de pequenas quantidades de oxigénio, segundo Rogers e Stewart (1973) favorece a síntese de ácidos gordos insaturados que permitem que o etanol atravesse mais facilmente a membrana plásmica (White (1978)).

Por sua vez, Sá-Correia I. et al. (1987) verificaram que a produtividade das fermentações alcoólicas melhora pela adição ao meio de suplementos nutritivos complexos ou utilizando um meio natural rico (sumo de topinambo), quando comparada com fermentações realizadas num meio simples.

Em conclusão, podemos afirmar que a tolerância ao etanol é dependente da concentração em açúcar, das condições de arejamento, da composição do meio e da estirpe e considera-se, cada vez menos, que o

álcool é o principal responsável das inibições verificadas.

2.5 - Influência de outros produtos de fermentação na actividade das leveduras

Sá-Correia I. et al. (1987) verificaram que a presença de ácidos octanóico e decanóico, mesmo em baixas concentrações (2-15 p.p.m), reduzem a actividade de S. bayanus e sugerem que a sua acção é ao nível das membranas das leveduras.

Vários autores ao estudarem o efeito da taxa de inoculação sobre os parametros da fermentação alcoólica chegaram à mesma conclusão: quando a taxa de inoculação aumenta, a biomassa produzida durante a fermentação diminui (Borzani et al. - (1983), Strehaiano et al. (1983)). Mota (1985) demonstrou que os microorganismos têm tendência a auto-regular a sua população pela excreção de cometabolitos inibidores. Verifica-se também que em sistemas que funcionam com elevadas concentrações celulares, a um aumento da densidade em biomassa não corresponde um aumento proporcional da velocidade de crescimento e de produção de etanol. Na realidade estes parâmetros são fracos pelo que, para se obter fermentações de elevada produtividade, é necessária a utilização de elevadas densidades celulares.

Este conjunto de conceitos sobre fermentação alcoólica conduziu ao desenvolvimento de novas tecnologias de fermentação.

2.6 - Novas tecnologias de fermentação

Os novos processos de fermentação alcoólica têm por objectivo fundamental reduzir a limitação resultante da acção dos diferentes inibidores. A minimização da acção inibidora do substrato, ao permitir trabalhar com maiores concentrações de açúcar, conduz à redução do volume dos fermentadores e à obtenção de graus alcoólicos mais elevados — menores custos de destilação e menor risco de contaminação. Outro factor que permite aumentar a produtividade é a obtenção de concentrações elevadas de biomassa activa no fermentador.

As características fundamentais destes processos são:

- os sistemas operam em contínuo, o que permite minimizar a inibição por substrato e aumentar a produtividade volumétrica.
- os sistemas são microarejados para manter a viabilidade celular e favorecer a reprodução das leveduras.

Seguidamente, é feita uma breve descrição dos novos processos de fermentação alcoólica.

2.6.1 Fermentação extractiva

Nesta técnica, o etanol produzido durante a fermentação é extraído por vácuo, por destilação "flash" ou por extracção com solventes. Os trabalhos mais significativos nesta área são os de Cysewski e Wilke (1976) que patentearam o processo Vacuferm —

fermentação extractiva sob vácuo, e de Minier e Goma (1982) — fermentação extractiva com solvente.

O único processo, baseado na extracção de etanol, que existe à escala industrial é o processo BHOSTIL - ALFA LAVAL (Fig.2.3) que permite a obtenção de produtividades de 8-10g/l.h.

2.6.2 Processos que utilizam densidades celulares elevadas

2.6.2.1. Reciclagem de células

A utilização de células recicladas permite aumentar a concentração em biomassa no fermentador. O esquema proposto por Cysewski e Wilke (1977) (Fig.2.4), permite a obtenção de concentrações celulares de 80g/l e produtividades em etanol de 30 a 40g/l.h. À escala industrial podemos referir o processo desenvolvido pelas sociedades Rhône-Poulenc, Vogelbusche e Speichim (Fig.2.5) que permite a obtenção de produtividades de 3-8g/l-h de etanol. Neste processo, a fermentação é realizada em 5 a 7 fermentadores em série, sendo os primeiros arejados. A alimentação do substrato e a recirculação das leveduras é feita de maneira repartida.

2.6.2.2. Utilização de células imobilizadas

As células podem ser imobilizadas por diferentes métodos: adsorção, ligação covalente ou inclusão em geis. Os suportes utilizados vão desde cerâmica a aparas de madeira, passando por

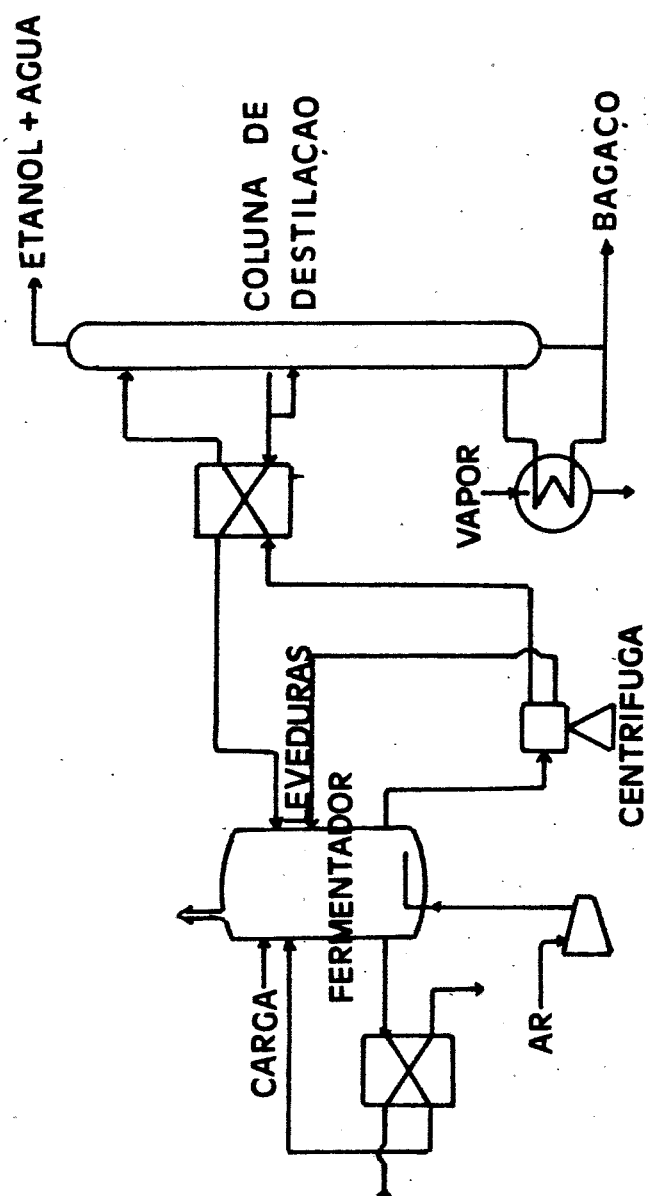


Fig. 2.3 - Processo Biostil-Alfa Laval

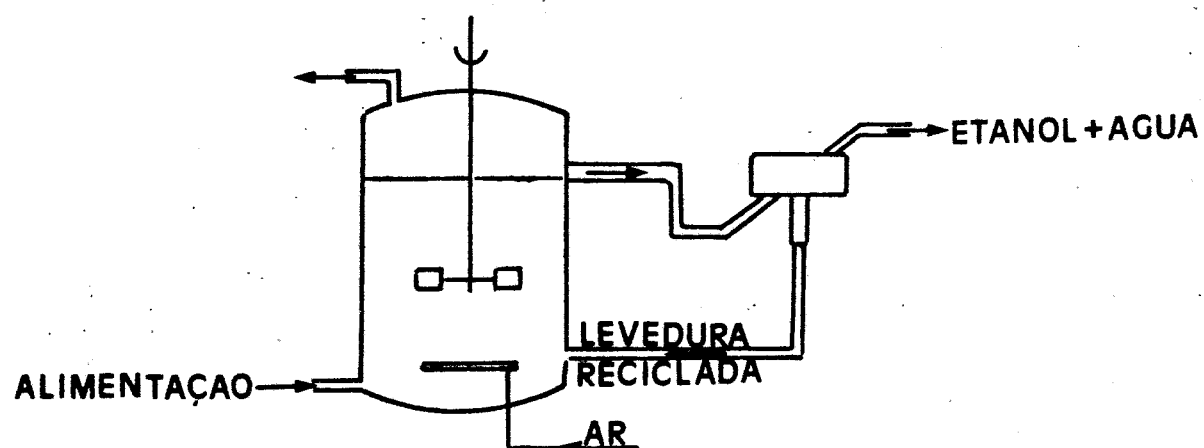


Fig. 2.4 - Sistema de reciclagem de células

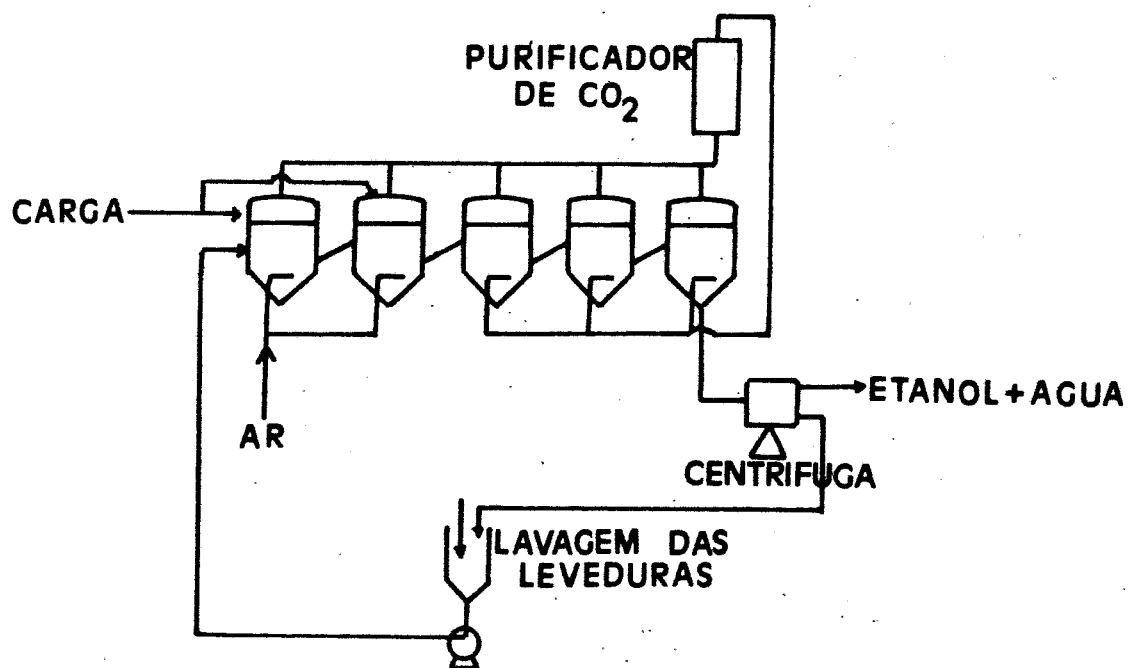


Fig. 2.5 - Processo Rhône-Poulenc, Vogelbush e Speichim

resinas permutadoras de iões. Ao nível industrial existem em funcionamento os processos desenvolvidos pelas sociedades Kyowa (Fig.2.6) - imobilização em alginato de cálcio, e J.G.C. (Fig.2.7) - imobilização em bandas polimerizadas. Nestes sistemas, não é necessária agitação mecânica nem reciclagem de células.

2.6.2.3. Processos com membranas

Estes processos caracterizam-se pela utilização de uma membrana impermeável às células e permeável ao substrato e ao produto.

Podem ser utilizados dois sistemas:

- "hollow fibers"
- membranas de ultrafiltração e microfiltração

Mehaia e Cheryan (1983) utilizando o primeiro sistema conseguiram obter uma produtividade volumétrica de 60g/l.h de etanol e concentrações celulares de 80g/l.

Os mesmos autores (1984) utilizando o segundo sistema obtiveram produtividades volumétricas de 80-100g/l.h de etanol e densidades celulares de 80-120g/l.

Mota (1985), usando um fermentador contínuo acoplado a um sistema de microfiltração obteve uma produtividade de 80g/l.h com uma densidade celular de 180g/l.

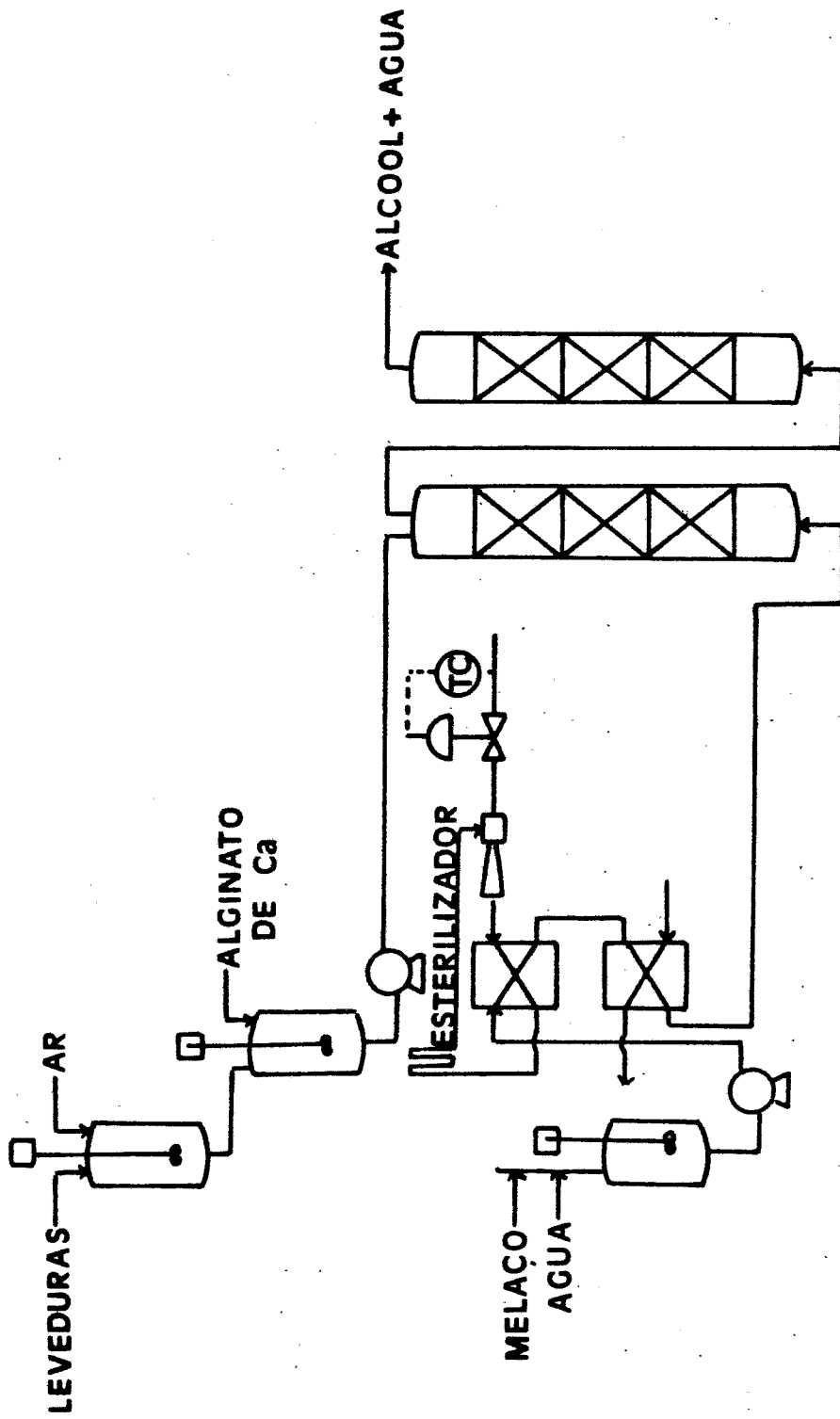


Fig. 2.6 - Processo Kiowa

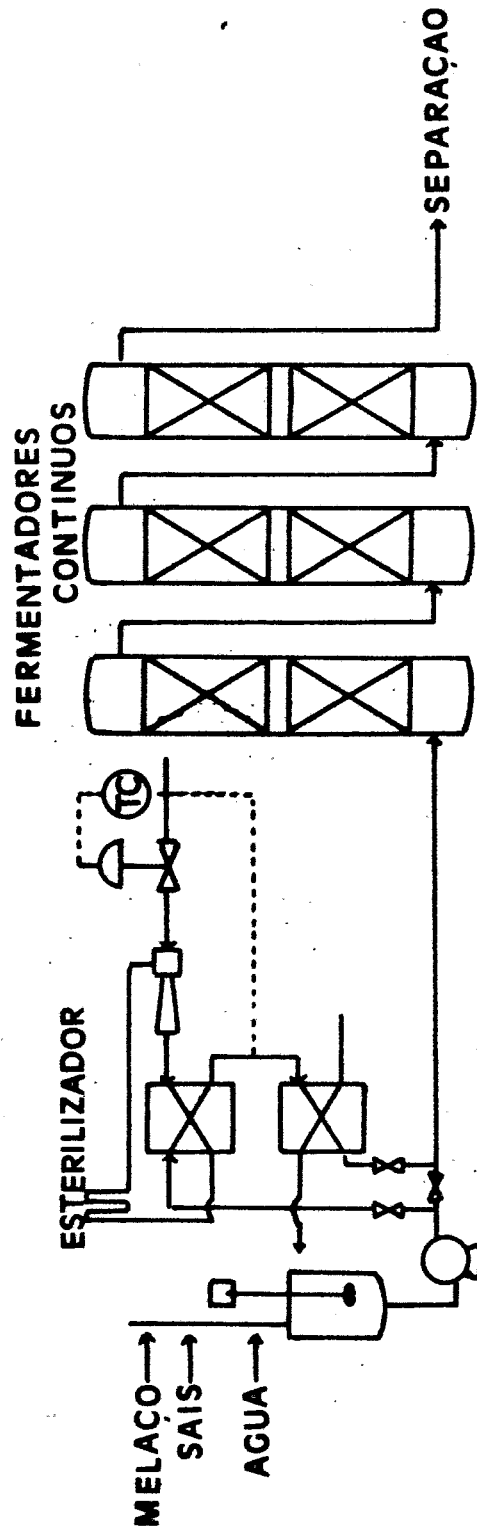


Fig. 2.7 - Processo J.G.C.

2.6.2.4. Flocculação

Nos processos com leveduras flocculantes as células são retidas no sistema de fermentação usando um conjunto fermentador-decantador.

Os principais argumentos a favor deste processo são:

- a sua simplicidade
- a não utilização de dispositivos mecânicos complexos (Ex. centrífuga)
- o seu baixo custo
- a possibilidade de obtenção de elevadas concentrações de biomassa que asseguram produtividades elevadas.

À escala industrial encontram-se em funcionamento os reactores tipo "torre" para produção de cerveja da sociedade A.P.V. e para produção de etanol combustível da sociedade Hoechst-Udhe (Fig.2.8).

A nível laboratorial foi possível obter concentrações celulares bastante elevadas (70-100 g/l) e produtividades volumétricas entre 20-30 g/l.h.

Na Tab. 2.2, adaptada de Solá et al. (1987) são referidos e caracterizados, nos seus parâmetros fundamentais, os sistemas que produzem etanol utilizando leveduras flocculantes.

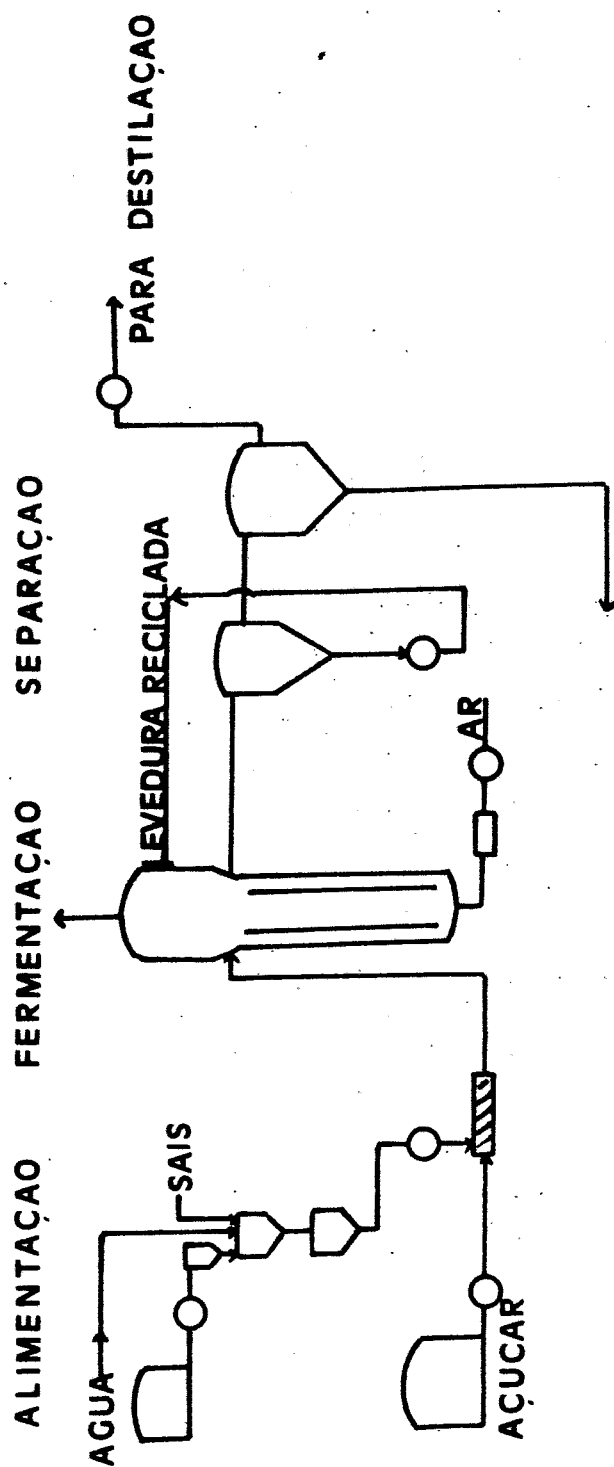


Fig. 2.8 - Processo Hoechst-Udhe

Tab. 2.2 - Produção de etanol por leveduras flocculantes

Microorganismo	Tipo de bioreactor	Conc. de substrato ($g\ l^{-1}$)	Utilização de açúcar (%)	Conc. de etanol ($g\ l^{-1}$)	Tempo de residência (h)	Produtividade ($g\ l^{-1}h^{-1}$)	Tempo de operação estável (dias)	Ref. ^a
Levedura de vinificação estirpe Montrachet	Tubo inclinado	Sumo de uva açúcares 180	90	77.8	3.1	25.1	10	Wick.E., Popper K. (1977)
<i>S.cerevisiae</i> NCYC 1257	Torre de fermentação	Sacarose, 125	90	58	3.8	16.1	—	Prince I.G., Barford J.P. (1982)
<i>Schiz. pombe</i>	Coluna vertical	Glucose, 150	93	69	1.67	41	60	Tsao H.Y., et al (1983)
<i>S.cerevisiae</i>	R.PA + sedimentador de reciclagem de células	Sacarose, 117	98.6	57.2	3.76	15	—	Ramirez A., Boudarel M.J. (1983)
<i>S.cerevisiae</i> MAN ⁺ - I	Torres de fermentação	Glucose, 130	—	59.7	5.1	11.7	—	Jones S.T. et al (1984)
<i>S.uvarum</i>	Torre de fermentação	Glucose, 170	95	72	4.76	15.12	48	Comberbach D.M, Bu'lock J. (1980)
<i>S.uvarum</i> SV4	Torre de fermentação	Glucose, 230	100	110	14.3	7.7	—	Gong C.S., Chen L.F. (1984)
<i>S.cerevisiae</i> NRRL -Y- 625	Torre de fermentação	Glucose, 130	98.2	60	3.26	18.4	41	Netto C.B. et al (1985)
<i>S.cerevisiae</i> AM12 e MCY 1251	3 reactores de fluxo para lelo em série	Glucose, 150	71	49.9	2	25	—	Juneja L.R. et al (1986)

2.7 - Floculação de leveduras

As propriedades das células são o resultado da interacção constante entre o meio ambiente, a nutrição e o controle genético. No caso específico das leveduras são os efeitos sobre a composição das paredes celulares que permitem a formação de agregados — FLOCULACÃO. Por sua vez, os flocos formados modificarão o metabolismo celular e as condições ambientais.

Esquemáticamente, podemos representar do seguinte modo (Fig.2.9) o conjunto de interacções que actuam na formação dos flocos celulares.

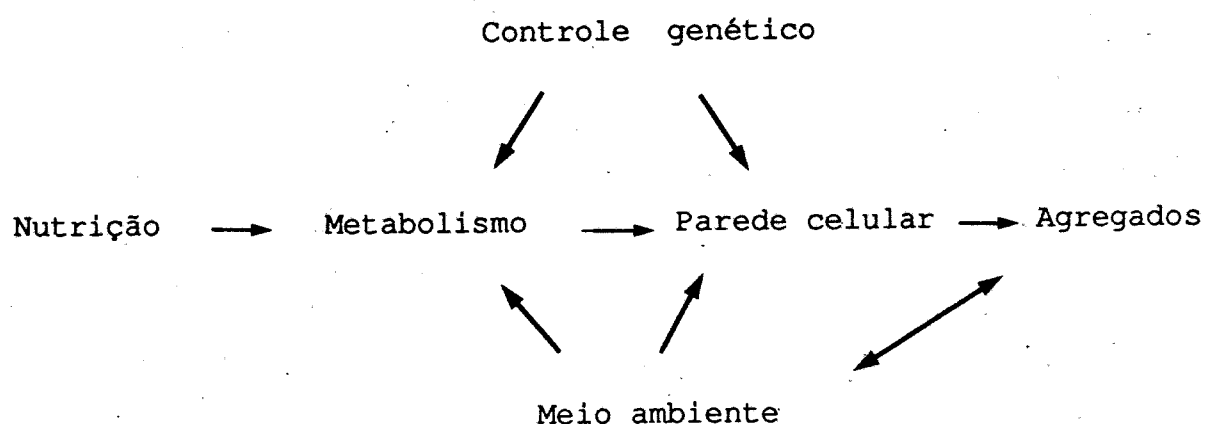


Fig.2.9 — Factores que actuam na formação de flocos celulares

2.7.1 Mecanismos de floculação e parede celular

O estudo dos mecanismos de floculação de leveduras tem-se centrado em S. cerevisiae, devido à sua utilização na indústria cervejeira. Embora haja inúmeros trabalhos publicados sobre a formação de agregados em leveduras, não foi ainda encontrada uma explicação completa e satisfatória para o fenómeno. Os resultados obtidos baseiam-se em estudos comparativos entre células floculantes e não floculantes de diferentes estirpes e cada autor, a partir das diferenças observadas, tenta definir o factor ou conjunto de factores que induzem a formação de flocos.

Mill (1964) foi um dos primeiros a apresentar uma teoria para a formação de flocos de leveduras, sugerindo o estabelecimento de ligações iónicas entre iões Ca^{2+} e sítios receptores nas paredes celulares das leveduras.

É precisamente no que diz respeito aos grupos aniónicos receptores dos iões que não há acordo entre os vários autores. Alguns consideram que são os grupos carboxílicos das proteínas ácidas da parede celular, enquanto outros afirmam que são os fosfomananos os responsáveis pela ligação estabelecida.

Lyons e Hough (1970, 1971) demonstraram que a presença de grupos fosfatos na superfície das células floculantes assegurava o estabelecimento da ligação de um ião cálcio com duas unidades de fosfato. Consideram que nas estirpes não floculantes não há grupos

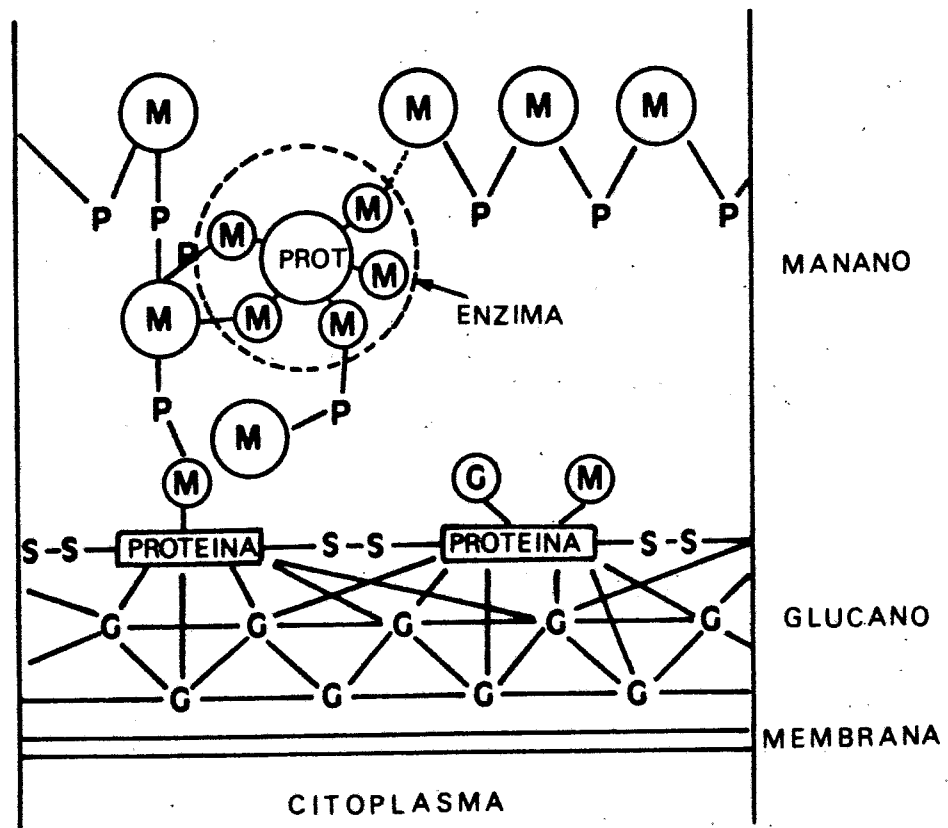
fosfatos à superfície em quantidade suficiente para induzir floculação. A partir dos resultados obtidos estabeleceram um esquema representativo da estrutura de parede celular em leveduras floculantes (Fig.2.10).

Maschelein et al (1963) verificaram que o máximo da floculação na estirpe que estudaram corresponde a um valor mínimo da razão manano/proteína nas paredes celulares e a um aumento significativo de aminoácidos.

Williams e Wiseman (1973) ao tratarem enzimaticamente células de S. cerevisiae para formação de protoplastos constataram, associada à libertação de invertase e fosfatase ácida, uma acentuada diminuição do poder floculante da levedura.

Estes resultados sugerem também um envolvimento dos grupos fosfato na floculação. Também Mill (1966) comparando a composição dos polissacáridos das estirpes floculantes e não floculantes de S. cerevisiae verificou que o grau de fosforilação dos mananos era mais elevado nas floculantes.

Por outro lado, Amri et al. (1981) concluíram que são os grupos carbóxilo os responsáveis pela ligação dos iões às paredes celulares, após a realização de ensaios de substituição destes grupos com metilglicina que conduziram a uma inibição de floculação. Este autor também verificou que nas estirpes floculantes, o teor em mananos era mais elevado assim como havia uma diminuição do conteúdo em proteínas, embora existindo uma predominância de ácidos glutâmico e aspártico, treonina e serina. Nishihara et al. (1977), por sua vez,



M - MANANO; P - FOSFATO;
G - GLUCOSE

Fig. 2.10 - Estrutura da parede celular das leveduras

afirmam que, quer os grupos carbóximo quer os fosfatos são necessários para a floculação pois, após terem provocado a esterificação de ambos os radicais, houve uma redução acentuada de floculação para a estirpe estudada. No mesmo artigo, através de um conjunto de ensaios conducentes à alteração química das proteínas das paredes celulares, é sugerida a importância dos grupos funcionais dos aminoácidos e proteínas das paredes celulares na capacidade de floculação das células de levedura. Esta conclusão é confirmada nas experiências em que é realizada um tratamento enzimático (com papaína, tripsina, quimiotripsina e pepsina) das paredes celulares que conduz a uma eliminação irreversível da floculação.

Entre os autores que reafirmaram a importância das paredes celulares no fenómeno da floculação devem ser salientadas as conclusões de Stewart (1975) e Miki et al. (1981). Stewart põe em relevo a importância do modo estereoespecífico com que o cálcio (Ca^{2+}) é ligado à parede celular e demonstra, por microscopia electrónica, a existência de "pêlos" na camada superficial das paredes celulares de leveduras floculantes. Usando também a microscopia electrónica, Miki, além de demonstrar que a estirpe por ele estudada não apresentava "pêlos" na camada exterior das paredes celulares, concluiu da interacção mútua dos mananos adjacentes às paredes celulares em leveduras floculantes. Sugeriu que os mananos, que não são específicos de uma dada estirpe, actuam como ligandos para receptores que se encontram só nas superfícies das estirpes floculantes. Este factor de reconhecimento que se liga com mananos de outras células é dominado por expressão genética e é, muito

provavelmente, de natureza proteica.

Ensaio realizado com Kluyveromyces bulgaricus por Mahmoud et al. (1987) indicam que os fosfopeptidomananos da parede da estirpe floculante apresentam cadeias mais compridas e com maior conteúdo em resíduos fosforilados de manose.

Estes resultados, segundo os mesmos autores, sugerem que a floculação é dependente de modificações estruturais coordenadas da superfície externa das leveduras e da elaboração de um factor proteico tipo lectina. Estas alterações são altamente dependentes do conteúdo em cálcio do meio.

2.7.2 Floculação e nutrição celular

Começando por referir a influência da fonte de carbono na floculação, também aqui as opiniões são contraditórias.

Mill (1964) concluiu que as características floculantes das leveduras desenvolvem-se facilmente na presença de glucose ao passo que Eddy et al. (1958) afirmam que os açúcares fermentescíveis, nomeadamente glucose, manose e maltose inibem a floculação. Também Miki et al. (1982) e Taylor e Orton (1978) afirmam que a manose apresenta um efeito negativo na floculação de leveduras assim como Amri et al. (1979) confirmam o efeito negativo da glucose. Por seu lado, Netto (1985) afirma que a glucose não afecta as características de floculação das leveduras. Nishihara et al. (1976) dizem que os

açúcares (glucose, frutose, manose, sacarose e maltose) não afectam as características floculantes das células sendo, inclusivé, necessários para induzir floculação em meios deficientes em Mg^{2+} e a baixo pH na fase inicial de crescimento. Hussain et al. (1986) indicam que os açúcares revertem a floculação por um mecanismo específico, isto é, a capacidade de desfloculação dos açúcares varia segundo a estirpe.

Patel e Ingledew (1975) demonstram que existem diferenças fisiológicas no metabolismo dos carboidratos relacionadas com a floculação, sugerindo que há uma relação directa entre floculação de leveduras e glicogénio (solúvel em ácido) intracelular.

Analisando seguidamente a influência de outros nutrientes, Patel e Ingledew (1975) e Baker e Kirsop (1972) afirmam que a adição de compostos azotados (lisina e actidina) diminuem, podendo mesmo anular, a floculação. Amri et al. (1979) verificaram que, no caso das estirpes por eles estudadas (uma bastante e outra moderadamente floculante) a adição de aminoácidos ao meio de cultura não provoca alteração nas suas características.

O mesmo autor, após ter analisado a acção de açúcares, aminoácidos e vitaminas nas estirpes com as características citadas, conclui que a floculação não depende só do conteúdo do meio em glucose, sendo antes o resultado de interacções entre as vários elementos envolvidos no metabolismo celular.

Outro aspecto a considerar é a influência do arejamento na floculação. Calleja (1973) refere que é necessário o desenvolvimento da função mitocondrial e a síntese de proteínas do citoplasma para que haja floculação.

Também Miki et al. (1982) fazem notar que as características floculantes da estirpe que analisaram variam proporcionalmente com a intensidade do arejamento, concluindo que a expressão fenotípica do gene de floculação pode ser manipulada por arejamento. Deverell e Clark (1985), por sua vez, indicam que um arejamento reduzido (.001v.v.m.), isto é, uma baixa taxa específica de consumo de oxigénio, favorece a floculação da levedura Pachysolen tannophilus.

2.7.3 Floculação e idade fisiológica

Mill (1964) verificou para as suas estirpes que a capacidade de floculação diminui durante a fase exponencial de crescimento e volta a aumentar na fase estacionária. Para Nishihara et al. (1976) as células começam a flocular no meio da fase exponencial e floculam fortemente no fim desta e na fase estacionária. No caso das estirpes utilizadas por Amri et al. (1979) a floculação é mais intensa no fim da fase exponencial para diminuir na fase estacionária. Por sua vez, Miki et al (1980) constataram a existência de uma densidade celular crítica para floculação, dependente de cada estirpe. No caso das estirpes analisadas por Hussain et al. (1986) - S. uvarum e K. bulgaricus, a floculação ocorre, respectivamente no princípio e no fim da fase exponencial de crescimento.

2.7.4 Floculação e propriedades iónicas do meio

As propriedades iónicas do meio - pH, concentração iónica e concentração de solventes orgânicos - desempenham um papel fundamental nos mecanismos de floculação.

Uma vez que os resultados descritos por cada autor se referem a estirpes diferentes, é natural que não haja um critério uniforme relativamente à sensibilidade da floculação ao pH. De qualquer modo podemos generalizar e dizer que o pH óptimo de floculação está compreendido entre 4.5 e 5.5 e que a pH inferior a 2 há uma inibição completa de floculação (Eddy et al. (1958), Nishihara et al. (1976)). Convém, no entanto, referir que a acção dos iões H^+ não é independente da concentração de outros catiões como foi demonstrado por Netto C.B. (1984).

Os catiões divalentes actuam sobre a floculação permitindo o estabelecimento de pontes iónicas entre as paredes das leveduras, estabilizadas por pontes de hidrogénio.

Mill (1964) foi o primeiro a sugerir a função do cálcio neste fenómeno, ao verificar que concentrações baixas ($200\mu M/l$) deste cationo eram necessárias para induzir floculação nas estirpes que estudou. Também constatou que outros catiões, nomeadamente Fe^{3+} , Ag^+ , Si^{2+} , Sn^{4+} e Mn^{3+} não eram tão eficazes, pelo que concluiu da especificidade do cálcio para a floculação. Outros autores também afirmam que o cálcio é específico, embora discordem de Mill no que se

refere à quantidade necessária — Taylor e Orton (1975) mediram concentrações da ordem de 10^{-8} M. Amri et al. (1981) verificaram que as células de leveduras floculantes ligam duas ou três vezes mais cálcio que as não floculantes.

De qualquer modo, Nishihara et al. (1976) afirmam que o Mg^{2+} é necessário para induzir floculação nas suas estirpes. Stewart et al. (1976) e Miki et al. (1982) indicam que o Mg^{2+} e o Mn^{2+} substituem, embora com uma menor eficiência, o cálcio na indução da floculação. Referindo-se ao Sr^{2+} e ao Ba^{2+} (iões divalentes de maiores dimensões), Nishihara et al. (1982) indicam que na sua presença não há floculação.

Outro aspecto a considerar é a presença de catiões monovalentes e a sua influência na floculação, principalmente Na^{+} e K^{+} .

Stewart et al. (1976) e Miki et al. (1982) concluíram que, em baixas concentrações, estes iões podem, embora com fraca intensidade induzir a floculação, sendo altamente inibidores para concentrações elevadas. Provavelmente, actuam neutralizando as forças das cargas negativas das paredes embora permitindo, para concentrações baixas, o estabelecimento de pontes de hidrogénio. A sua acção inibidora também pode ser entendida como o resultado da competição com os iões cálcio para os sítios aniónicos das paredes (Mill (1964), Amri et al. (1976)).

A presença de solventes, ao reduzir a constante dieléctrica das

soluções aquosas, diminui o grau de ionização das pontes salinas, aumenta a sua força e activa as ligações de hidrogénio. Mill (1964) verificou que era possível induzir floculação em leveduras não floculantes na presença de Ca^{2+} , se às suspensões fossem adicionadas solventes orgânicos (metanol, etanol, propanol e acetona) em concentrações tais que permitissem obter uma constante dieléctrica aproximadamente igual a 68.

2.7.5 Floculação e temperatura

Para valores de temperatura compreendidos entre 23°C e 50°C, as características de floculação das leveduras não são significativamente alteradas, tendo Williams e Wiseman (1973) determinado um óptimo a 32°C. Entre os 50°C e os 60°C há uma redução acentuada da floculação, sendo os flocos totalmente destruídos a 60°C. Mill (1964) verificou que este fenómeno é reversível. Hussain et al. (1986) verificaram que temperaturas entre 80 e 100°C podem eliminar irreversivelmente a floculação.

2.7.6 Floculação e propriedades hidrodinâmicas

A floculação, como seria de esperar, é afectada pelas propriedades hidrodinâmicas dos meios onde estão suspensas as leveduras. Factores tais como a intensidade da agitação mecânica, o arejamento, a taxa de diluição e a viscosidade do meio, são condicionantes na formação de flocos, alterando o seu tamanho, forma e porosidade.

2.7.7 Floculação é genética

Do ponto de vista genético, os conhecimentos encontram-se ainda numa fase incipiente. Inicialmente foram apontados vários genes ligados à floculação que se designaram FLO1, FLO2, flo3 (recessivo) e FLO4. Trabalhos posteriores demonstraram que FLO1, FLO2 e FLO4 são alélicos (Russel et al. (1980)) sendo-lhes atribuído um único "locus" designado por FLO1.

Alguns trabalhos referem a transformação, por manipulação genética, de estirpes não floculantes em floculantes (Barney et al. (1980); Miki et al (1981); Figueroa et al. (1984)). De Jonge P, et al. (1987) já mapearam o gene FLO1, embora não o tenham isolado e muito menos sequenciado.

CAPITULO 3:MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Estirpe

Neste trabalho foi utilizada uma estirpe da levedura Kluyveromyces marxianus (IGC 2671).

3.2 - Processos de fermentação

3.2.1. Meio de cultura

Utilizamos um meio semi-sintético pobre com a seguinte composição:

KH_2PO_4	-----	5 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-----	2 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	0.4g/l
Extracto de levedura	-----	1 g/l

A fonte de carbono é a lactose em concentrações compreendidas entre 20g/l e 200g/l. O meio é preparado em água corrente com um conteúdo em cálcio aproximadamente igual a 20 p.p.m.

O pH do meio é ajustado a 4.1 pela adição de H_3PO_4 .

3.2.2. Pré-culturas

3.2.2.1. Ensaaios "batch"

Os inóculos para os ensaios "batch" foram realizados em Erlenmeyers tapados com algodão cardado, durante 24 horas, no meio semi-sintético acima definido e com uma concentração em fonte de carbono de 20g/l. O inóculo representa 10% do volume total da fermentação seguinte.

3.2.2.2. Ensaaios em contínuo

Os ensaios em contínuo são precedidos de uma fermentação "batch" para assegurar uma concentração elevada de biomassa no arranque do processo.

Os meios da cultura foram sempre esterilizados em autoclave, com vapor saturado a 2 atm.

3.2.3. Métodos analíticos

3.2.3.1. Substrato

A lactose é doseada, espectralfotometricamente, a 540nm, pelo método DNS (Bernfeld P.(1975)).

3.2.3.2. Etanol

O etanol é doseado por cromatografia em fase gasosa de ionização de chama. O enchimento utilizado é PORAPACK Q 80-100 Mesh. As condições de análise são:

Temperatura do forno	_____	150°C
Temperatura do injector	_____	250°C
Temperatura do detector	_____	250°C

A quantificação do etanol é realizada com um padrão interno de isopropanol (2%), e referenciada a uma recta padrão.

3.2.3.3. Biomassa total

3.2.3.3.1. Peso seco

Nesta técnica, a mais fiável segundo a maioria dos autores, a determinação da biomassa é feita por diferença de peso seco, após filtração de um volume conhecido numa membrana de porosidade calibrada ($.45\mu\text{m}$). Os filtros, antes e após a filtração, são secos numa estufa a 105°C, durante pelo menos 3 horas.

3.2.3.3.2. Turbidimetria

Neste método, a biomassa total, após desfloculação (Cap.5) é determinada, medindo a densidade óptica do meio, ou do meio diluído,

a 620nm.

Previamente, é feita uma calibração relacionando a absorvância a 620 nm, com a concentração de biomassa, determinada pela técnica do peso seco.

Para a levedura Kluyveromyces marxianus é da seguinte forma, a expressão que relaciona a concentração de biomassa (C) com a densidade óptica (DO):

$$C(\text{g/l}) = - .001 + 0.3196 \times \text{D.O.} \quad \text{cc.} = 0.999 \quad (3.1)$$

De qualquer modo, para os ensaios de fermentação em contínuo, em que se verificava uma maior densidade celular, utilizamos sistematicamente a técnica do peso seco.

3.2.3.4. Viabilidade celular

Quando necessário, a viabilidade celular foi determinada pela coloração com azul de metileno (Pierce (1970)).

Contudo, para as células floculadas, não foi possível medir a biomassa activa, pois, a pH2 (pH de desfloculação), não se consegue distinguir entre as células mortas (coradas de azul) e as viáveis (brancas).

3.2.4. Determinação da capacidade de floculação - teste de sedimentação

A capacidade de floculação das leveduras foi medida utilizando o método de Helm (Stewart G.G. (1975)) modificado, conforme se indica a seguir.

Neste procedimento, as células são recolhidas e separadas da fase líquida (por centrifugação ou filtração). Seguidamente são sucessivamente lavadas com uma solução de 15 g/l de NaCl a pH(2) - 3 lavagens, com uma solução saturada de EDTA - 3 lavagens, e com água ultra pura - 3 lavagens.

Após este tratamento, são ressuspensas numa solução de CaCl_2 (40mg/l Ca^{2+}) a pH4. Esta suspensão é colocada numa proveta de 25 ml e, com o auxílio de uma pipeta automática, são recolhidas, a tempos determinados, amostras de uma posição fixa (15 cm^3 na proveta) e analisada a sua concentração em biomassa.

Com as concentrações obtidas, após normalização referida à concentração inicial da suspensão, é traçado o perfil de sedimentação da estirpe floculante (Fig.3.1).

Todo o material utilizado neste teste é previamente tratado por ultra-sons num banho com detergente e lavado com uma solução de ácido nítrico a 10%. Finalmente é lavado com água ultrapura.

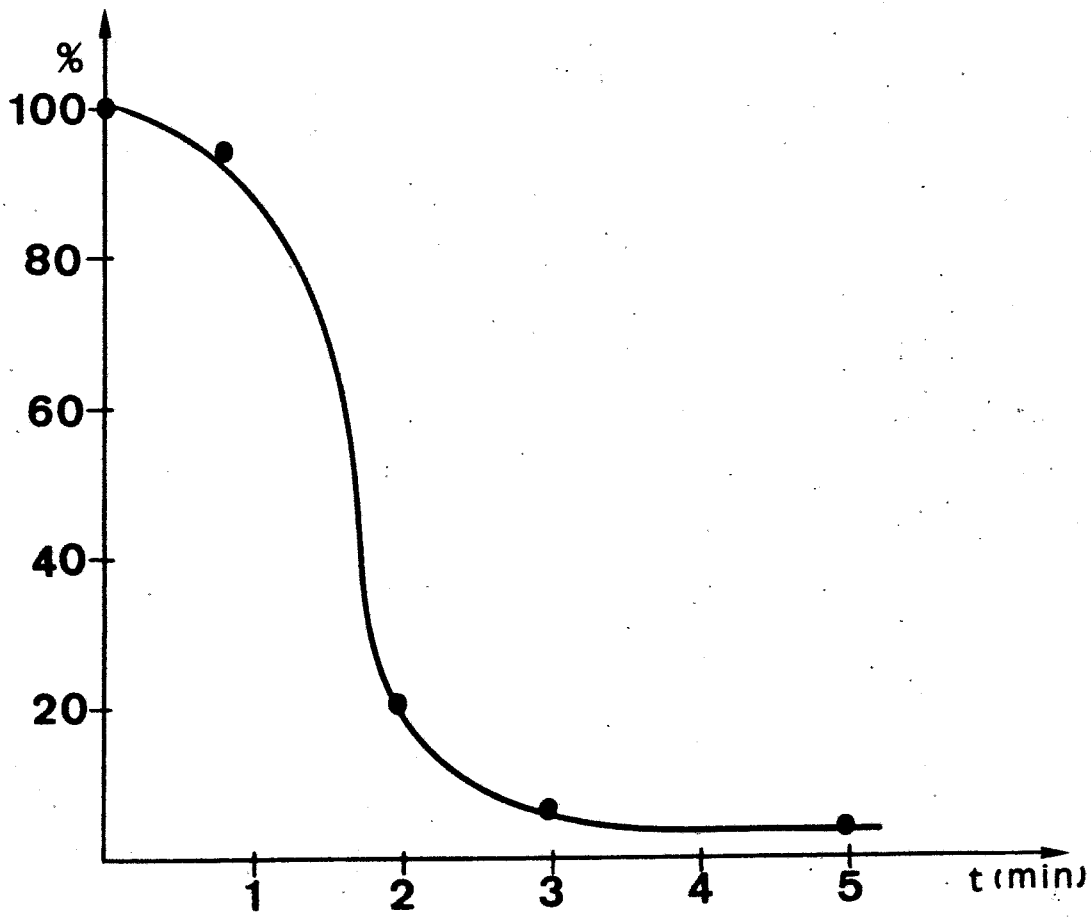


Fig. 3.1 - Perfil de sedimentação de Kluyveromyces marxianus flocculante

A concentração de células na proveta de sedimentação deve ser da ordem dos 4 g/l (em peso seco).

3.2.5. Determinação da porosidade dos flocos

Para determinar a porosidade de flocos, usamos a técnica termogravimétrica desenvolvida por Uribe Larrea et al. (1985).

Este método baseia-se nas diferenças de velocidade de evaporação de água extracelular e extraflocular, intraflocular e intracelular.

Para tal, segue-se a perda de peso resultante da sua evaporação a 80°C. Esta medida é feita, utilizando uma termobalança "Mettler", com precisão até à centésima de miligrama. A determinação do peso seco é efectuada aumentando a temperatura para 125°C.

Na Fig.3.2 encontra-se representada uma curva termogravimétrica típica

As diferentes zonas da figura correspondem a:

- $\overline{AB}$ - arranque da termobalança (evaporação da água extracelular e extraflocos)
- $\overline{BC}$ - evaporação de água intraflocos
- $\overline{CD}$ - evaporação de água intracelular
- D - representa o peso seco

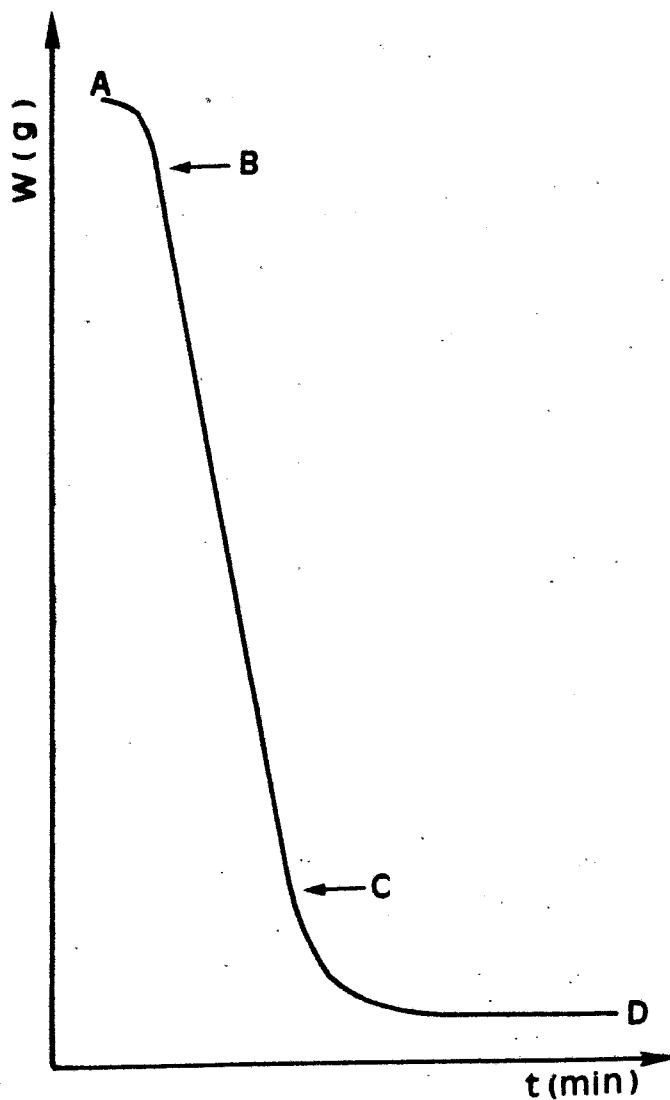


Fig. 3.2 - Ensaio de termogravimetria para a determinação de porosidade dos flocos

A porosidade é calculada pela seguinte equação:

$$\text{Porosidade \%} = 100 \times \frac{B - C}{B} \quad (3.2)$$

3.2.6 - Determinação da densidade dos flocos

A densidade de flocos foi determinada por picnometria a 25°C, após tratamento idêntico ao usado na preparação das amostras para a termogravimetria (Atkinson B. (1974)).

3.2.7 - Determinação de xilose

A xilose foi analisada, quantitativamente, por espectrofotometria, conforme descrito por Costa M. (1984).

3.2.8 - Determinação do cálcio

Para determinar o cálcio em solução, usamos o método do antipyrilazo, conforme descrito por Budesinsky B.W. (1974).

3.3 - Caracterização bioquímica das paredes

A técnica usada na preparação e ruptura das paredes de *K marxianus* baseia-se na descrita por Vega e Dominguez (1986) e inclui as fases a seguir descritas.

As leveduras, recolhidas por centrifugação a 5000 r.p.m e lavadas com água destilada, são rompidas mecânicamente, utilizando um motor

de elevada velocidade (5000 r.p.m.) na presença de bolas de vidro (.45-.50mm). A ruptura das paredes é considerada completa quando se verifica, por microscopia óptica, que cerca de 95% das células foram rebentadas.

O homogenato é separado das bolas de vidro, por filtração através de uma placa de vidro poroso.

As paredes celulares são centrifugadas a 3000 r.p.m. e posteriormente lavadas com água destilada (5 vezes), NaCl a concentrações decrescentes - 5%, 2%, 1% (2 vezes cada) e novamente água destilada (10 vezes).

As preparações são liofilizadas e armazenadas a 0°C.

Todo o procedimento experimental é realizado a 0°C e as soluções de lavagem, além de frias, contêm PMSF, para evitar a acção de proteases. A cada 100 ml de solução de lavagem são adicionados 200 µl de uma solução preparada dissolvendo 4.3 mg de PMSF em 100 ml de etanol.

3.3.1. Hidratos de carbono

As paredes são solubilizadas em H_2SO_4 , 10M, a 30°C, durante uma hora. Seguidamente, a suspensão é diluída a 1M e mantida em tubos fechados, durante 6 horas, numa estufa a 100°C. A concentração de paredes é aproximadamente 2g/l na solução 1M de H_2SO_4 .

Após a hidrólise, é feita uma neutralização do produto final com KOH - 1M.

Nas soluções neutralizadas, os açúcares totais são determinados utilizando o método do fenol-sulfúrico (Dubois M. et al (1956)).

Para a análise dos açúcares redutores foi usado o método descrito por Somogy M. et al. (1956).

A glucose foi determinada pelo método enzimático da glucose-oxidase (Colowick J., Kaplan N.(1966)).

Para os três métodos anteriormente descritos usou-se a glucose como padrão.

Os açúcares aminos foram avaliados recorrendo à técnica descrita por Morgan - Elson (Hanson R.S., Philips J.A. (1984)), utilizando como padrão a glucosamina.

Em todos os casos, os padrões foram submetidos ao mesmo tratamento das paredes de levedura, após liofilização.

3.3.2. Proteína

3.3.2.1. Proteína total

A proteína total existente nas paredes celulares foi doseada pelo

método de Lowry (Stenesh J. (1984)), usando como padrão a albumina do soro bovino. Nesta técnica, quer as proteínas das paredes quer os padrões são solubilizados em NaOH-1M durante 10 minutos a 90°C.

3.3.2.2. Análise qualitativa

As proteínas das paredes celulares das leveduras floculantes e não floculantes eram extraídas das fracções celulares, fervendo num banho de um tampão contendo dodecil sulfato de sódio e ditiotretitol (Stanley P.R., Pitt T.Y. (1983)) e eram separadas em geis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (10%). (Laemmli U.K. (1970)). Cada amostra continha 20 µg de proteína.

Foram usadas como padrão proteínas de peso molecular conhecido.

3.3.3. Fósforo

O fósforo total é determinado pelo método descrito por Bartlett G.R. (1958).

3.4 - Microscopia electrónica das células

As células, para microscopia electrónica de varrimento, foram, após lavagem, fixadas em glutaraldeído (3% v/v), durante uma noite conforme descrito por Arnold W.N. (1984).

Seguidamente foram lavadas com soluções aquosas de concentração

crescente em etanol (30%, 60%, 100% v/v) e colocadas à temperatura ambiente em pequenas placas de vidro, para secagem completa.

Foi utilizado o microscópio de varrimento pertencente ao Centro de Metalurgia e Ciência dos Materiais da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (CEMMUP).

3.5 - Equipamento

3.5.1. Ensaios em descontinuo ("batch")

Os ensaios "batch" foram realizados em matrizes tapados com algodão cardado e com agitação por barra magnética.

A temperatura foi mantida a 30°C e o pH a 4.1 (por adição de amónia), recorrendo a sistemas automáticos de controle.

Também utilizamos um sistema operando em descontinuo como o representado na Fig.3.3 para a selecção de uma estirpe floculante de Kluyveromyces marxianus.

3.5.2. Ensaios em contínuo

Os ensaios em contínuo foram realizados no fermentador representado na Fig.3.4.

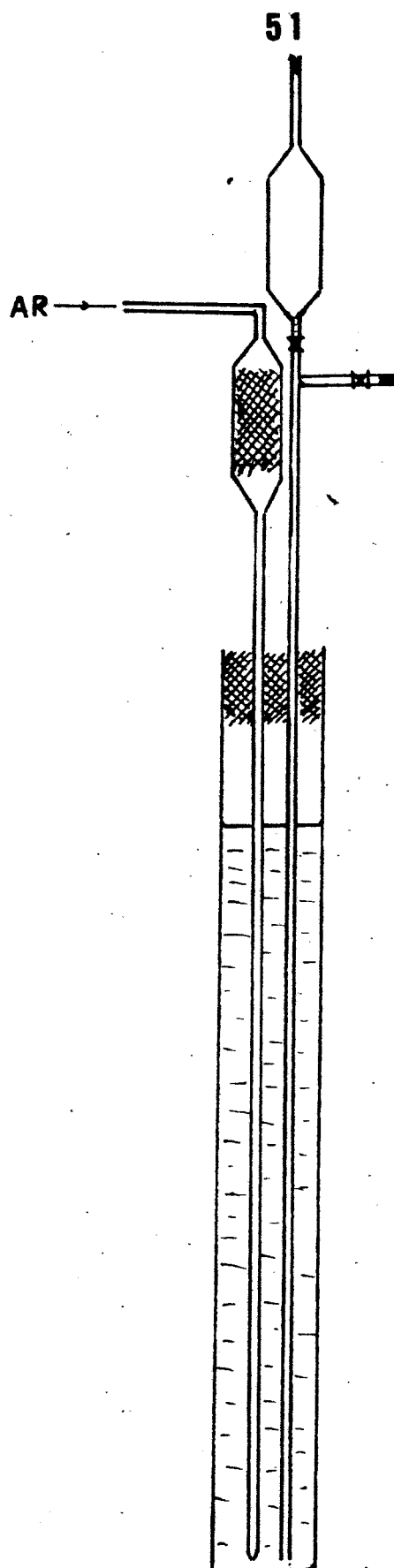


Fig. 3.3 - Sistema descontínuo utilizado para a indução de
floculação

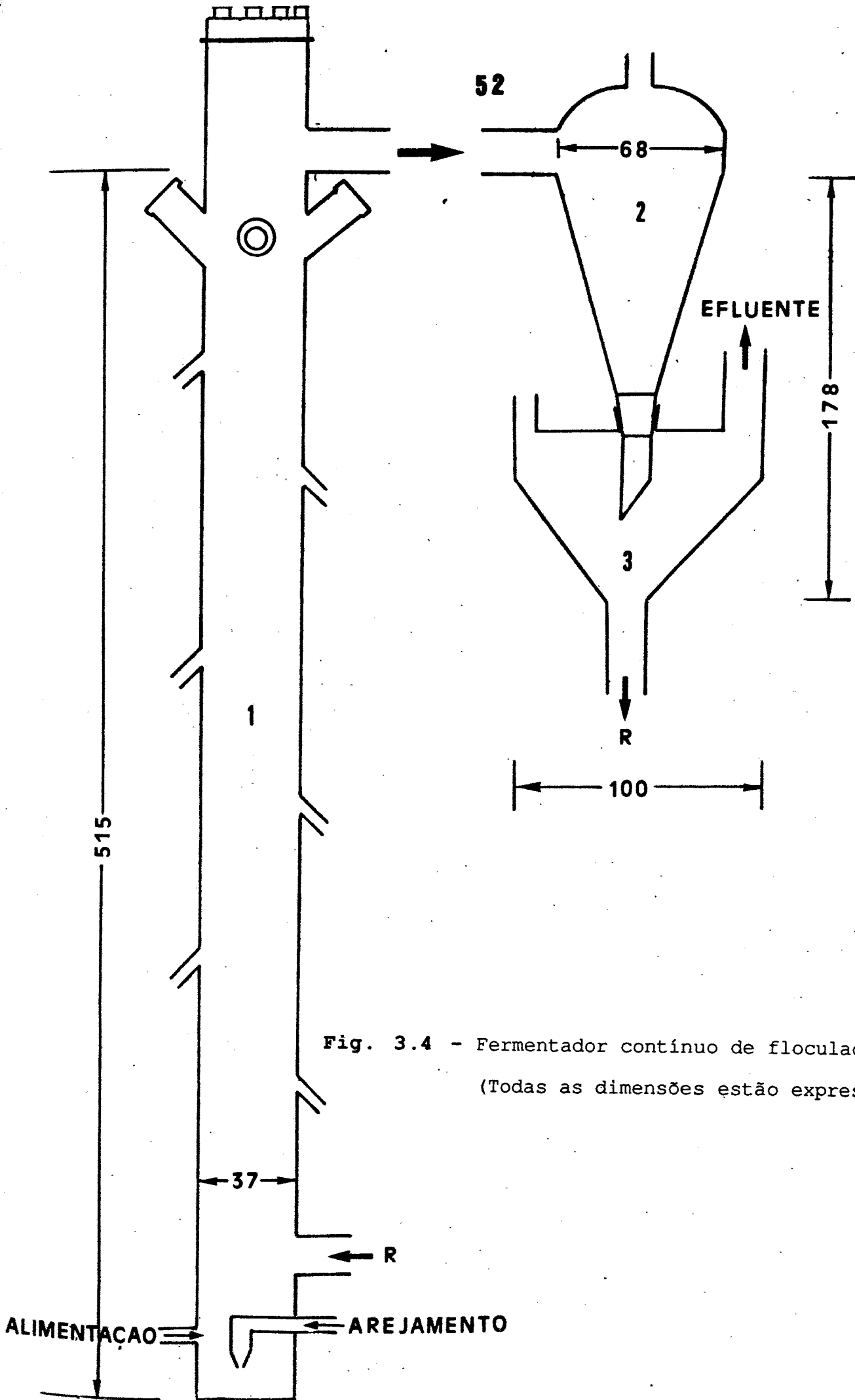


Fig. 3.4 - Fermentador contínuo de floculação

(Todas as dimensões estão expressas em mm)

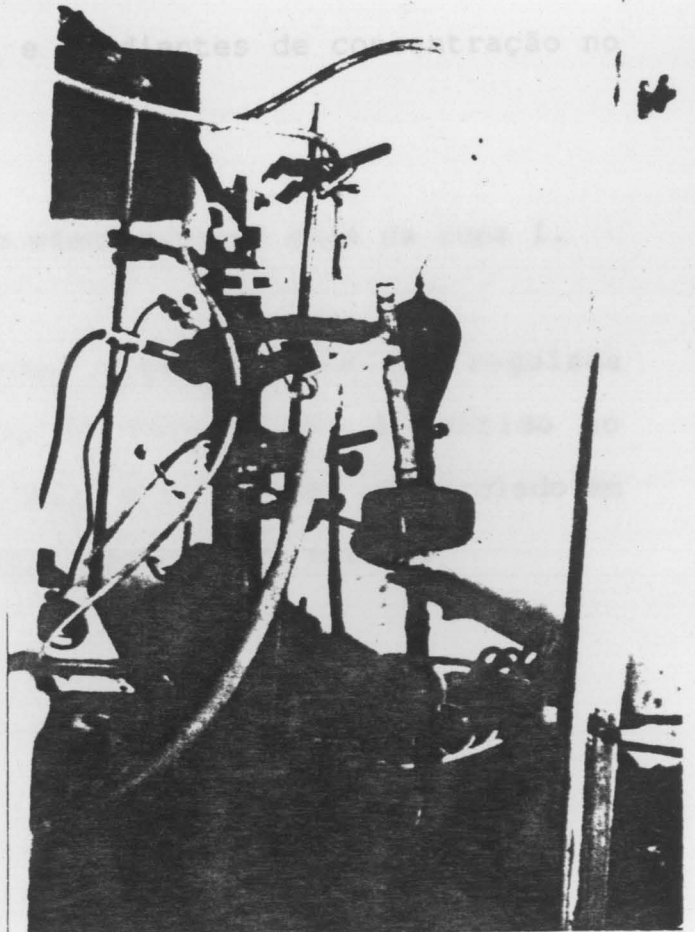
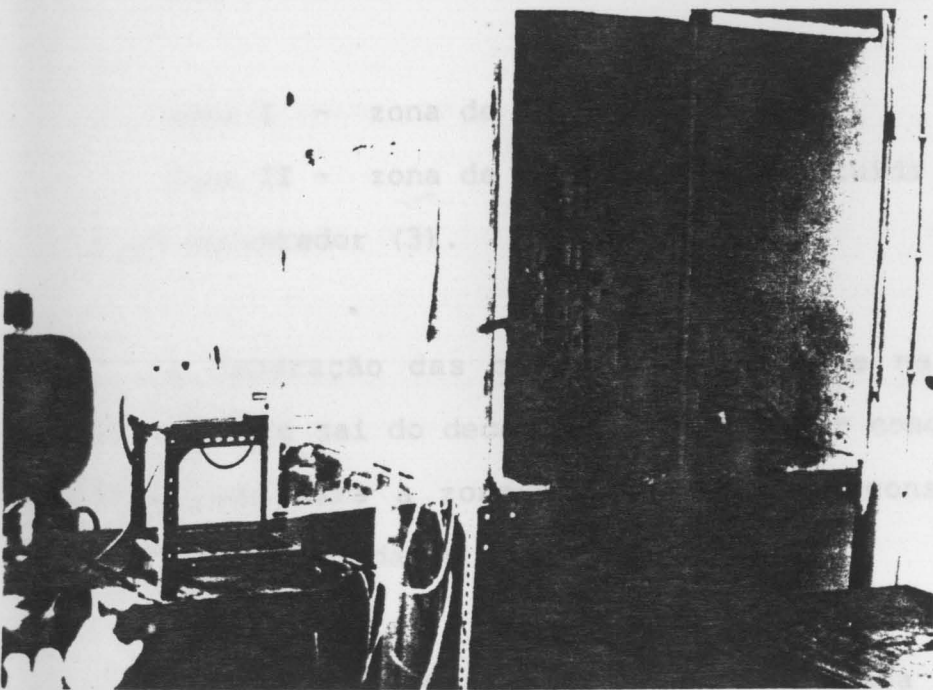


Fig. 3.4 - Continuação

Este sistema é constituído por duas secções:

Zona I - zona de fermentação (1)

Zona II - zona de separação, constituída por um hidrociclone (2) e um decantador (3).

A separação das células é efectuada na zona II e a corrente líquida que sai do decantador, com maior concentração em biomassa, é reciclada para a zona de fermentação, constituindo o restante a corrente de saída do sistema.

A reciclagem é efectuada com uma bomba peristáltica de caudal elevado, para assegurar a homogeneidade do reactor de modo a impedir a formação de depósitos de células e gradientes de concentração no interior da zona de fermentação.

A alimentação e o arejamento são efectuados na base da zona I.

Como nos ensaios em descontínuo, a temperatura foi regulada automaticamente a 30°C (o sistema de fermentação é mantido no interior de uma cabine termostatzada) e o pH foi controlado em $4.0 \pm .1$ por adição, controlada automaticamente, de amónia.

3.6 - Balanços mássicos: cálculo dos parâmetros cinéticos

3.6.1. Ensaio em descontínuo ("batch")

O cálculo dos parâmetros cinéticos é efectuado a partir das curvas de concentração, expressa em g/l, das diferentes variáveis de fermentação — biomassa (X), açúcar (S) e álcool (P) em função do tempo (t) — expresso em horas, segundo as equações a seguir definidas:

$$\mu(h^{-1}) - \text{taxa específica de crescimento} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.3)$$

$$v(g/g.h) - \text{taxa específica de produção de etanol} = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (3.4)$$

$$R_x(g/g) - \text{factor de conversão de açúcar em biomassa} = \frac{X - X_0}{S_{\text{consumido}}} \quad (3.5)$$

$$R_p(g/g) - \text{factor de conversão de açúcar em etanol} = \frac{P - P_0}{S_{\text{consumido}}} \quad (3.6)$$

Tendo em consideração que a estequiometria da reacção é:



O rendimento teórico de conversão de lactose em etanol é igual a 0.538. Portanto o rendimento de conversão virá dado por

$$\eta = \frac{R_p}{0.538} \times 100 \quad (3.7)$$

X_0 e P_0 representam as concentrações iniciais de biomassa e etanol, respectivamente.

3.6.2. Sistema contínuo

O sistema de fermentação, como anteriormente descrito, pode ser dividido em duas zonas (Fig.3.5):

- Zona I - zona de fermentação
- Zona II - zona de Separação

O balanço material ao sistema é feito considerando que:

- a reacção só ocorre na zona I
- a zona II é, unicamente, zona de separação
- a zona I é perfeitamente agitada

Estas hipóteses serão confirmadas pelos resultados apresentados nos Caps. 6 e 7. Nas equações de balanço a seguir descritas, Q representa o caudal volúmico das diferentes correntes e S , P e X representam respectivamente, as concentrações de substrato, produto e biomassa nas diferentes correntes. V_1 é o volume útil da zona I.

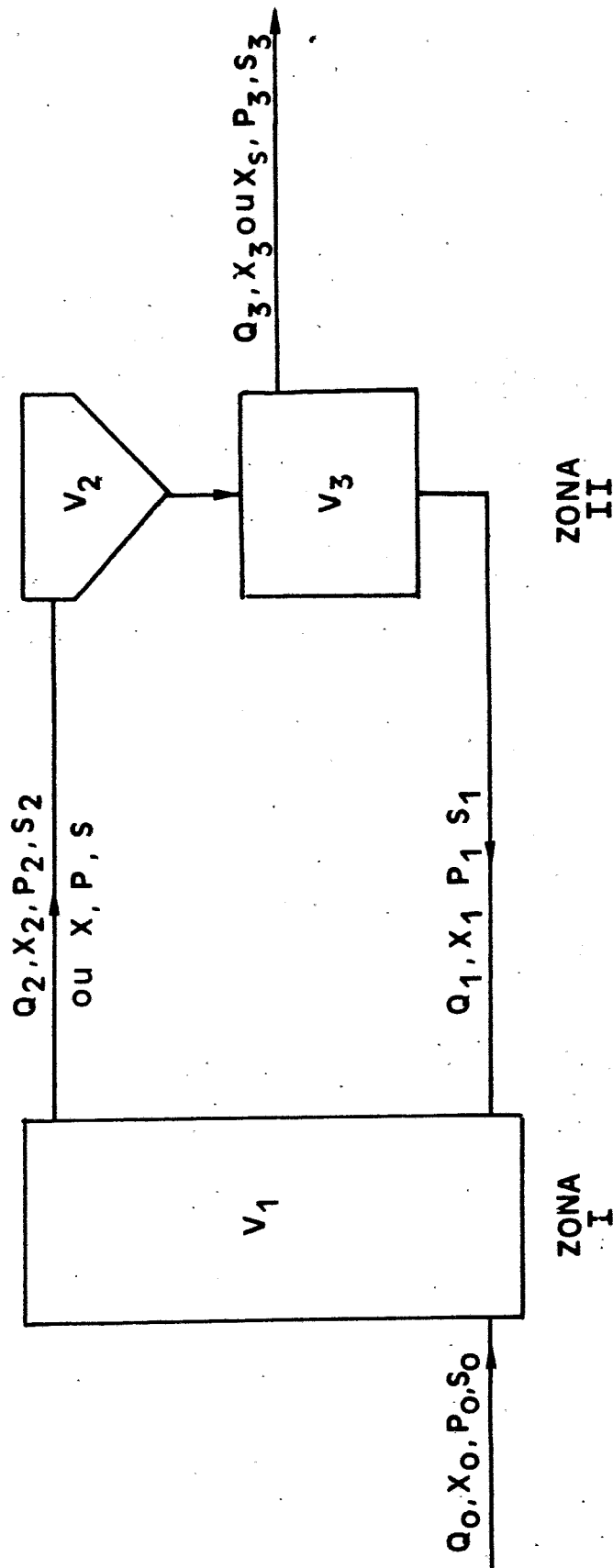


Fig. 3.5 - Representação esquemática do fermentador de floculação

3.6.2.1. Balanço mássico ao substrato

Zona I

$$Q_0 S_0 + Q_1 S_1 = Q_2 S_2 + r_s V_1 + V_1 \frac{dS_2}{dt} \quad (3.8)$$

Zona II

$$Q_2 S_2 = Q_3 S_3 + Q_1 S_1 \quad (3.9)$$

Substituindo 3.9 em 3.8, com

$$S_1 = S_2 = S_3 \quad (3.10)$$

$$Q_0 = Q_3 \quad (3.11)$$

$$D_F = \frac{Q_0}{V_1} \quad (3.12)$$

obtém-se a velocidade de consumo de substrato - r_s (g/l.h)

$$- r_s = \frac{dS_3}{dt} - D_F (S_0 - S_3) \quad (3.13)$$

e a taxa específica de consumo de substrato - q_s (g/gh.)

$$- q_s = \frac{1}{X_2} \frac{dS_3}{dt} - \frac{D_F}{X_2} (S_0 - S_3) \quad (3.14)$$

3.6.2.2. Balanço mássico do produto

ZONA I

$$Q_0 P_0 + Q_1 P_1 + r_p V_1 = Q_2 P_2 + V_1 \frac{dP_2}{dt} \quad (3.15)$$

ZONA II

$$Q_2 P_2 = Q_3 P_3 + Q_1 P_1 \quad (3.16)$$

Substituindo 3.16 em 3.15 com

$$P_0 = 0 \quad (3.17)$$

$$P_1 = P_2 = P_3 \quad (3.18)$$

obtém-se que a velocidade de produção de etanol (r_p (g/l.h)) é expressa por

$$r_p = \frac{dP_3}{dt} + D_F P_3 \quad (3.19)$$

e a taxa específica de produção v (g/g.h) por

$$v = \frac{1}{X_2} \frac{dP_3}{dt} + \frac{D_F}{X_2} P_3 \quad (3.20)$$

3.6.2.3. Balanço mássico à biomassa

ZONA I

$$Q_0 X_0 + Q_1 X_1 + r_x V_1 = Q_2 X_2 + V \frac{dX_2}{dt} \quad (3.21)$$

ZONA II

$$Q_2 X_2 = Q_3 X_3 + Q_1 X_1 \quad (3.22)$$

Substituindo 3.22 em 3.21 com

$$X_0 = 0$$

a velocidade de crescimento de biomassa r_x (g/l.h)) virá dada por

$$r_x = \frac{dX_2}{dt} + D_F X_3 \quad (3.23)$$

A taxa específica de produção $-\mu$ (h^{-1}) é representada por.

$$\mu = \frac{1}{X_2} \frac{dX_2}{dt} + D_F \frac{X_3}{X_2} = \mu_{ac} + D_f \frac{X_3}{X_2} \quad (3.24)$$

Nesta expressão, o termo $\frac{1}{X_2} \frac{dX_2}{dt}$ representa a taxa específica de acumulação de biomassa no fermentador, isto é, a massa de flocos de levedura formada a partir da biomassa total por unidade de tempo.

O termo $D_F \frac{X_3}{X_2}$ representa a quantidade de células "lavadas" por unidade de tempo do sistema de fermentação.

3.6.2.4. Rendimento e produtividade em etanol

O rendimento de conversão de substrato em etanol - η (%) é calculado do seguinte modo

$$\eta = \frac{P_{medido}}{S_0 \times 0.538} \quad (3.25)$$

O rendimento de conversão de substrato em biomassa é

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (3.26)$$

Em contínuo a produtividade em etanol, referida ao volume da zona de alimentação - P_F (g/l.h) é calculada por

$$P_F = D_F \quad P \quad (3.27)$$

A produtividade referida ao volume total - P_t é determinada pela equação

$$P_t = P_F \frac{V_1}{V_1 + V_2 + V_3} \quad (3.28)$$

CAPÍTULO 4: INDUÇÃO DE FLOCULAÇÃO:
ANÁLISE CINÉTICA COMPARATIVA DAS
ESTIRPES NÃO FLOCULANTE E
FLOCULANTE

4.1. Caracterização da estirpe não floculante

A estirpe Kluyveromyces marxianus não floculante foi caracterizada mediante a realização de ensaios "batch" em matrizes mantendo a temperatura e o pH constantes e iguais, respectivamente, a 30°C e 4.1 (por adição automática de amónia). A agitação por barra magnética, foi mantida inalterada no decorrer das várias fermentações.

Para se obter uma definição correcta da influência da fonte de carbono nas características cinéticas da estirpe, utilizaram-se concentrações de lactose que variam entre os 20g/l e os 200g/l, mantendo constante, em todos os ensaios, a concentração de inóculo. Nas Figs. 4.1 a 4.7 estão representados, em função do tempo, as variações da concentração de biomassa, lactose e etanol para as diferentes concentrações iniciais de substrato.

Com este conjunto de ensaios, foi possível caracterizar a estirpe não floculante de K. marxianus, em termos de parâmetros cinéticos e rendimento de produção da lactose em etanol (Tab.4.1)

4.1. Caracterização da estirpe não floculante

A estirpe Kluyveromyces marxianus não floculante foi caracterizada mediante a realização de ensaios "batch" em matrizes mantendo a temperatura e o pH constantes e iguais, respectivamente, a 30°C e 4.1 (por adição automática de amónia). A agitação por barra magnética, foi mantida inalterada no decorrer das várias fermentações.

Para se obter uma definição correcta da influência da fonte de carbono nas características cinéticas da estirpe, utilizaram-se concentrações de lactose que variam entre os 20g/l e os 200g/l, mantendo constante, em todos os ensaios, a concentração de inóculo. Nas Figs. 4.1 a 4.7 estão representados, em função do tempo, as variações da concentração de biomassa, lactose e etanol para as diferentes concentrações iniciais de substrato.

Com este conjunto de ensaios, foi possível caracterizar a estirpe não floculante de K. marxianus, em termos de parâmetros cinéticos e rendimento de produção da lactose em etanol (Tab.4.1)

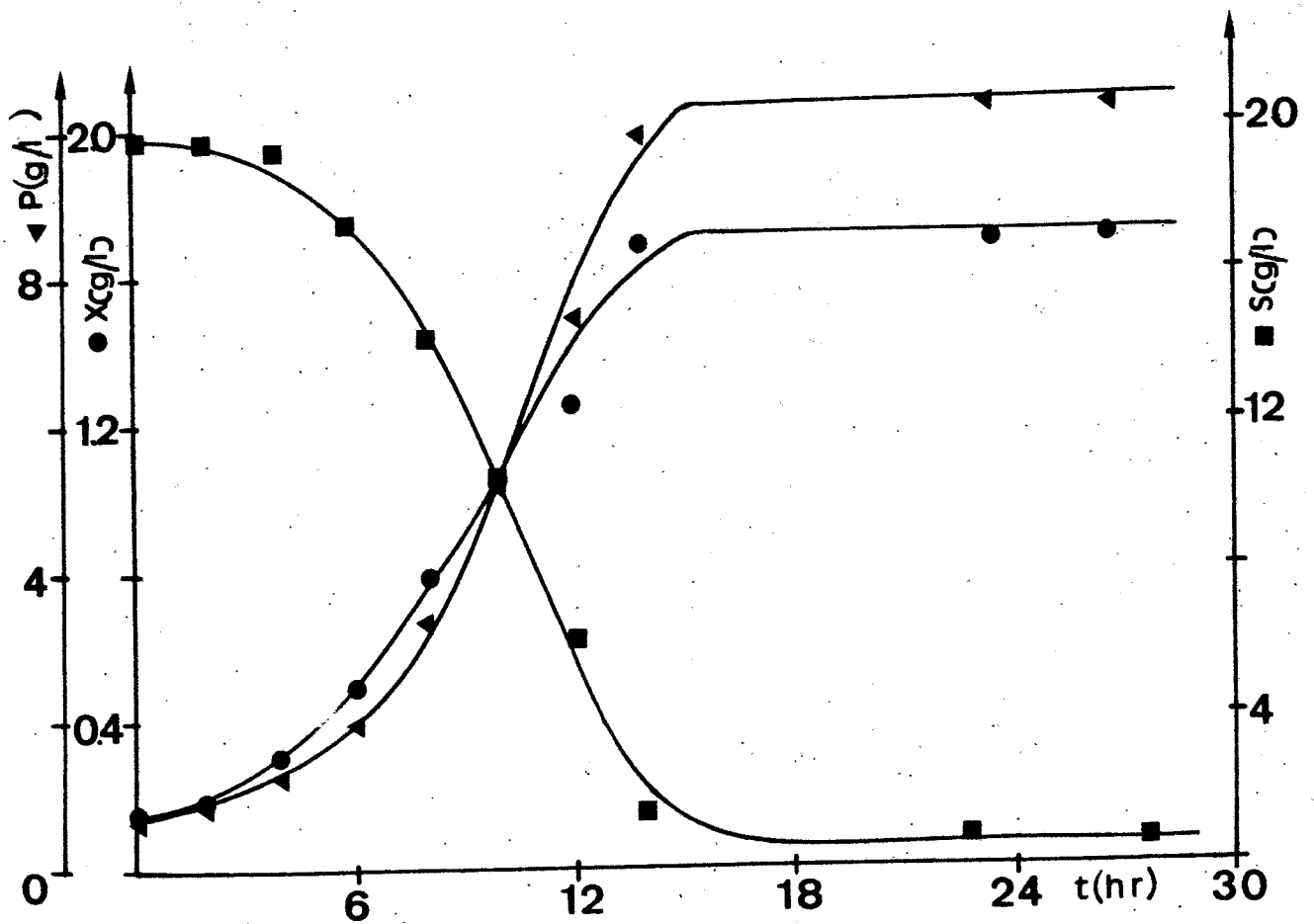


Fig. 4.1 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P), para a levedura *K. marxianus* não floculante, com uma concentração inicial de substrato de 19.6 g/l

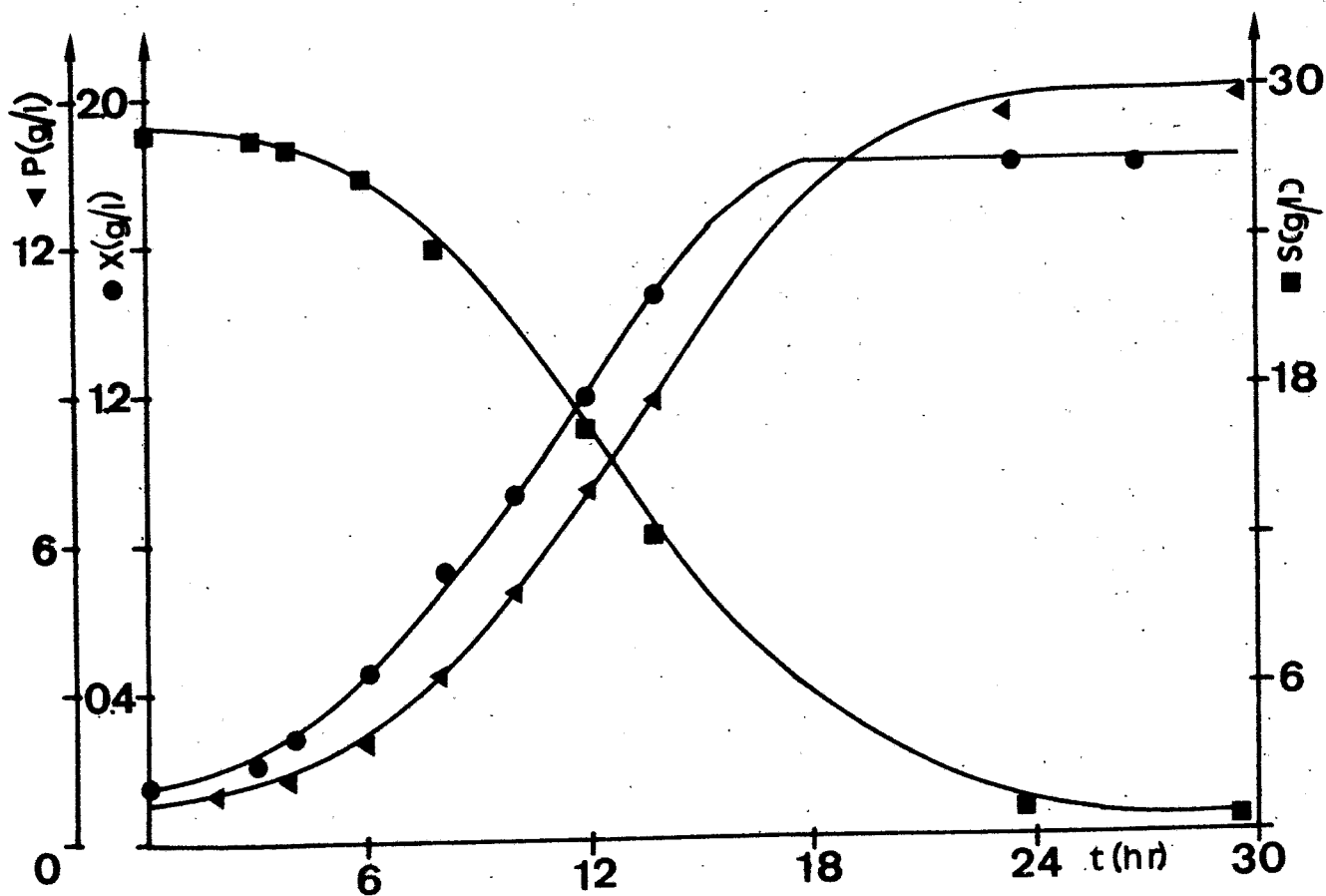


Fig. 4.2 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P), para a levedura *K. marxianus* não floculante, com uma concentração inicial de substrato de 28.5 g/l

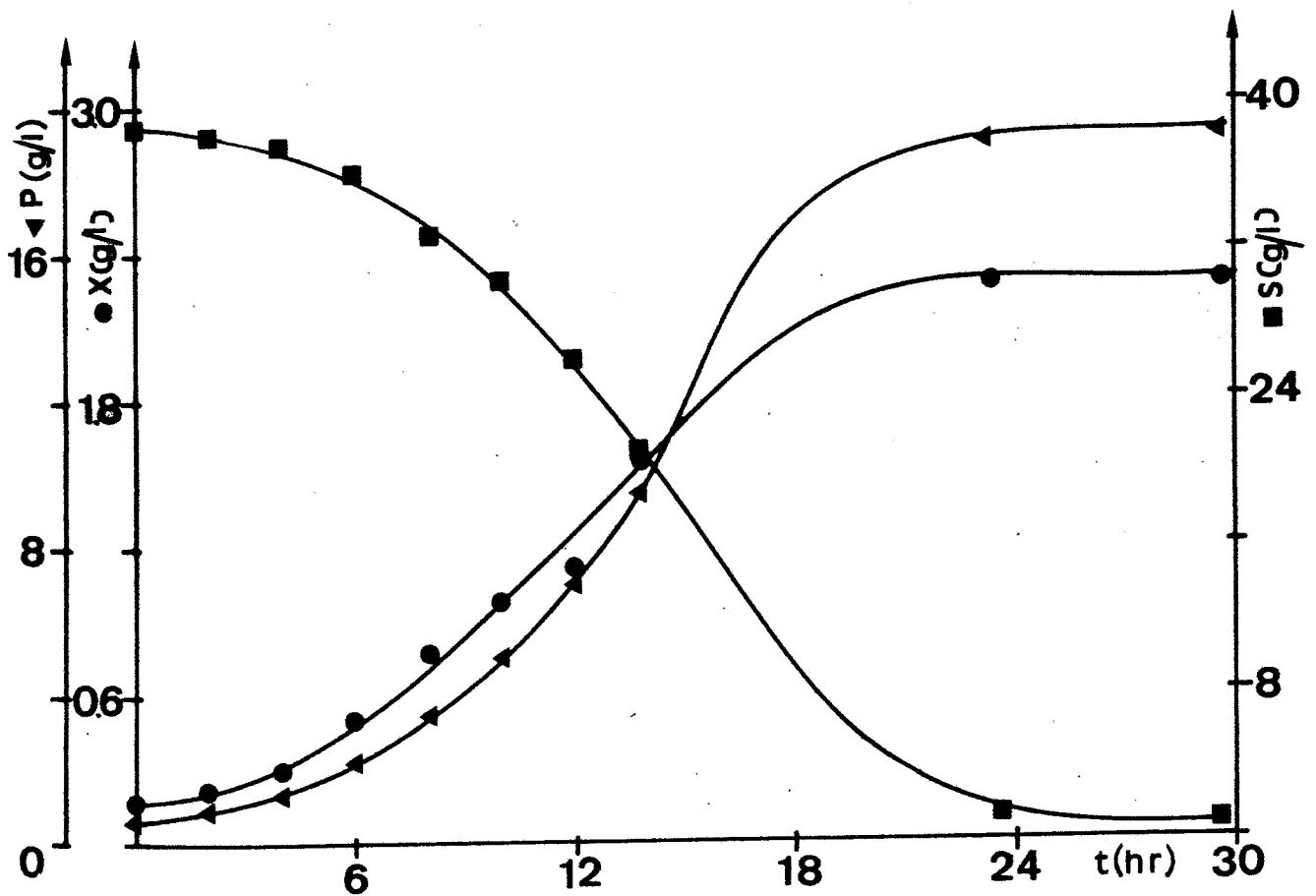


Fig. 4.3 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P), para a levedura *K. marxianus* não floculante, com uma concentração inicial de substrato de 38.8 g/l

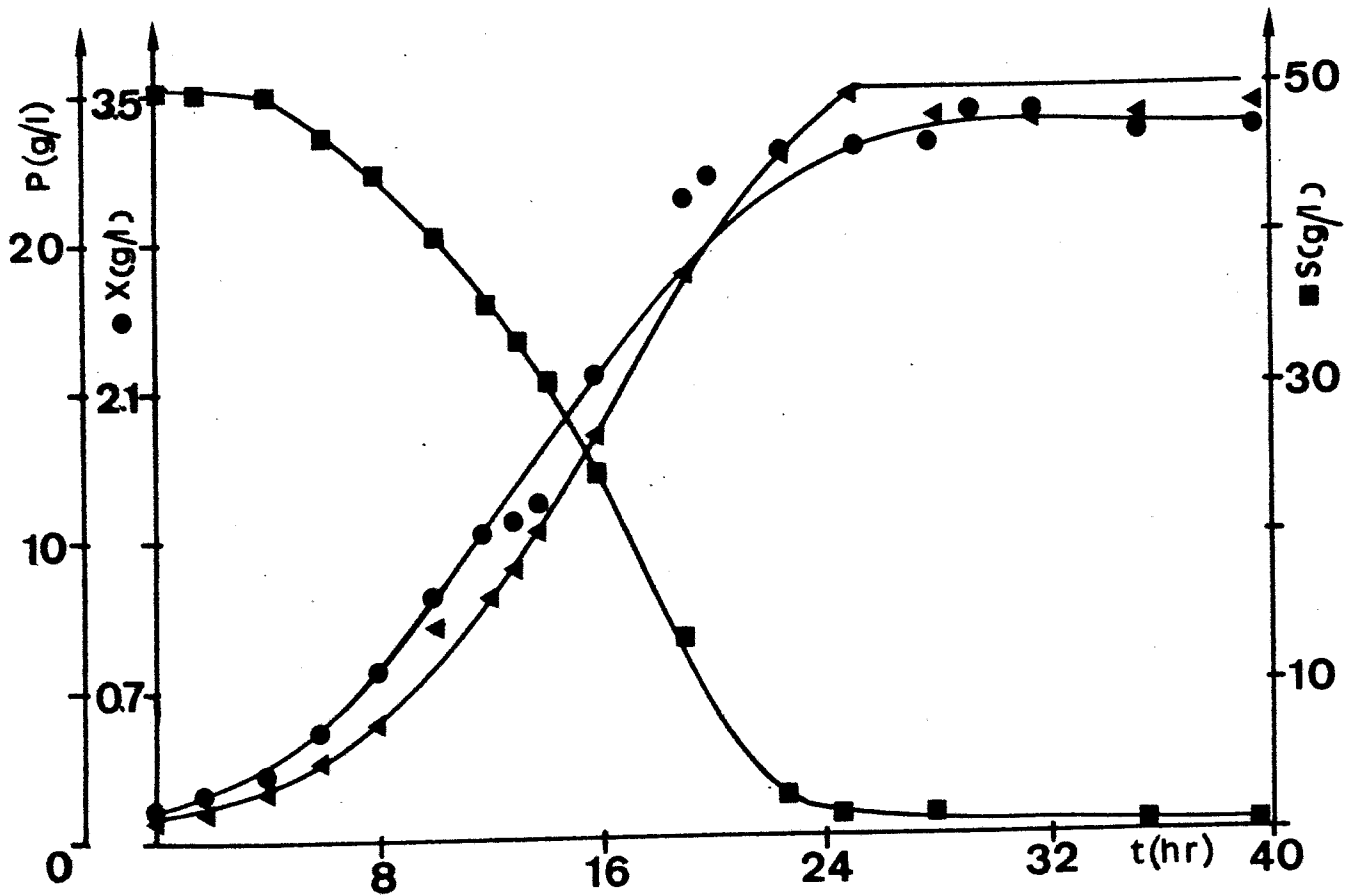


Fig. 4.4 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P), para a levedura *K. marxianus* não floculante, com uma concentração inicial de substrato de 50.1 g/l

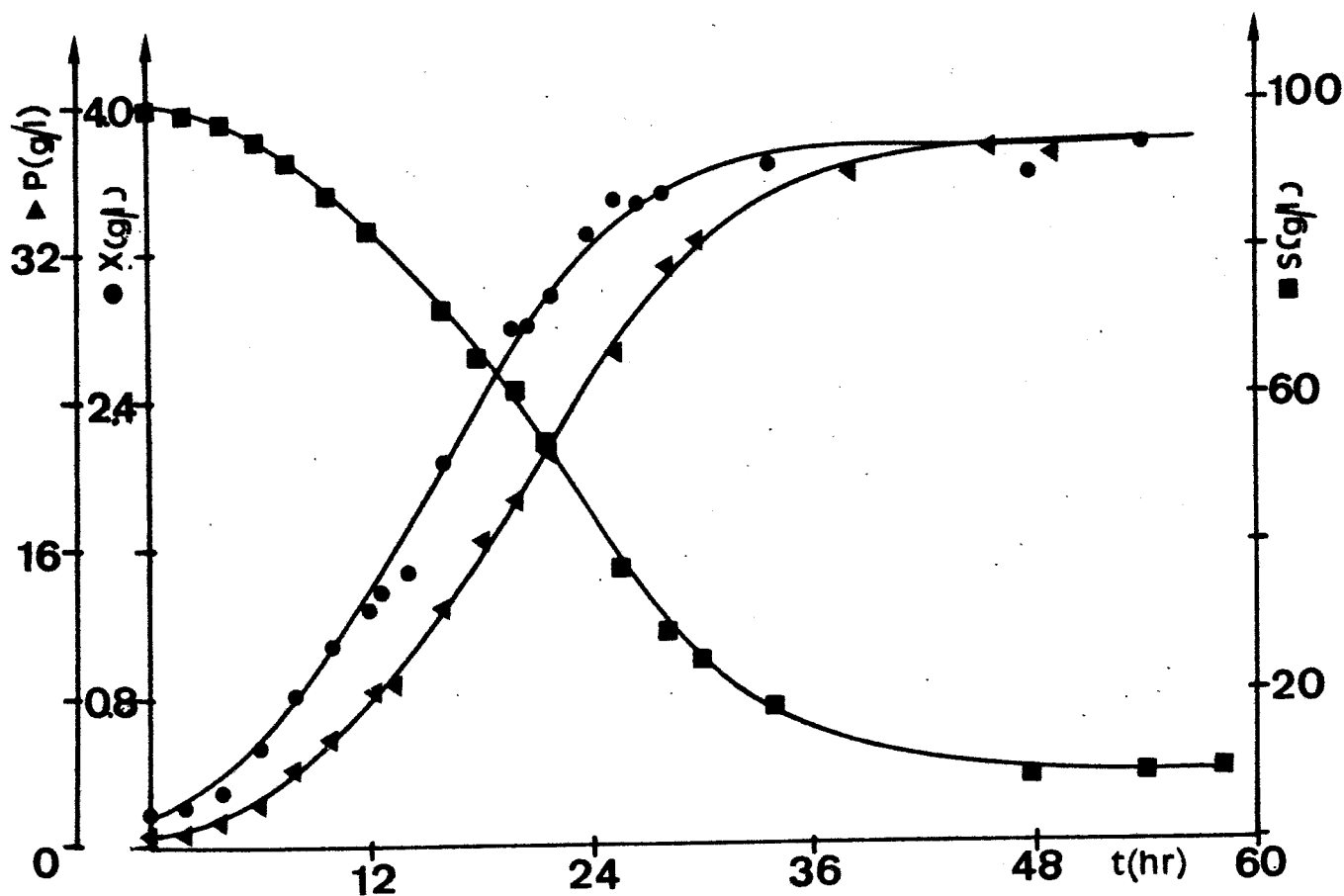


Fig. 4.5 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P), para a levedura *K. marxianus* não floculante, com uma concentração inicial de substrato de 97.7 g/l

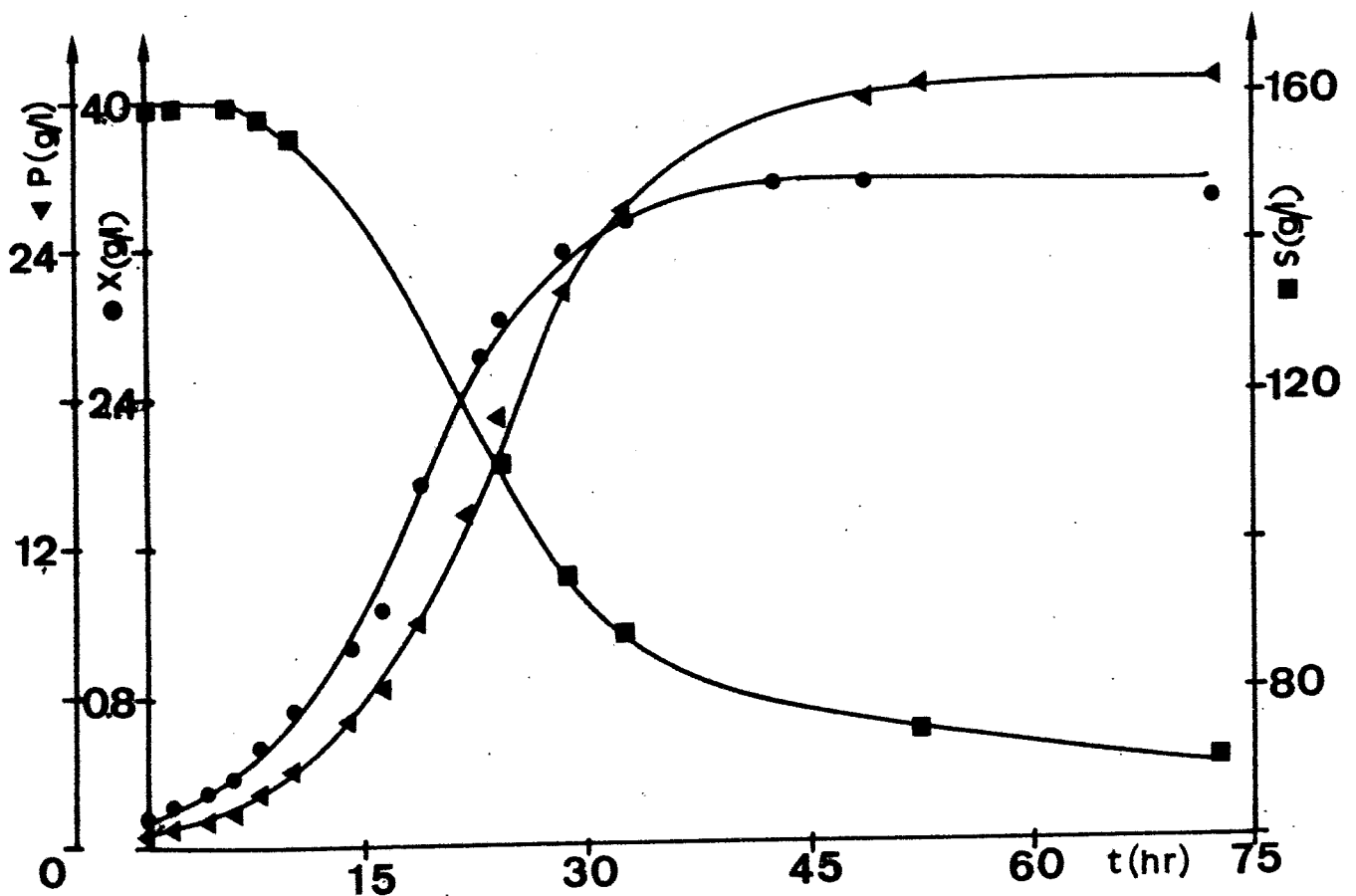


Fig. 4.6 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P), para a levedura *K. marxianus* não floculante, com uma concentração inicial de substrato de 157.0 g/l

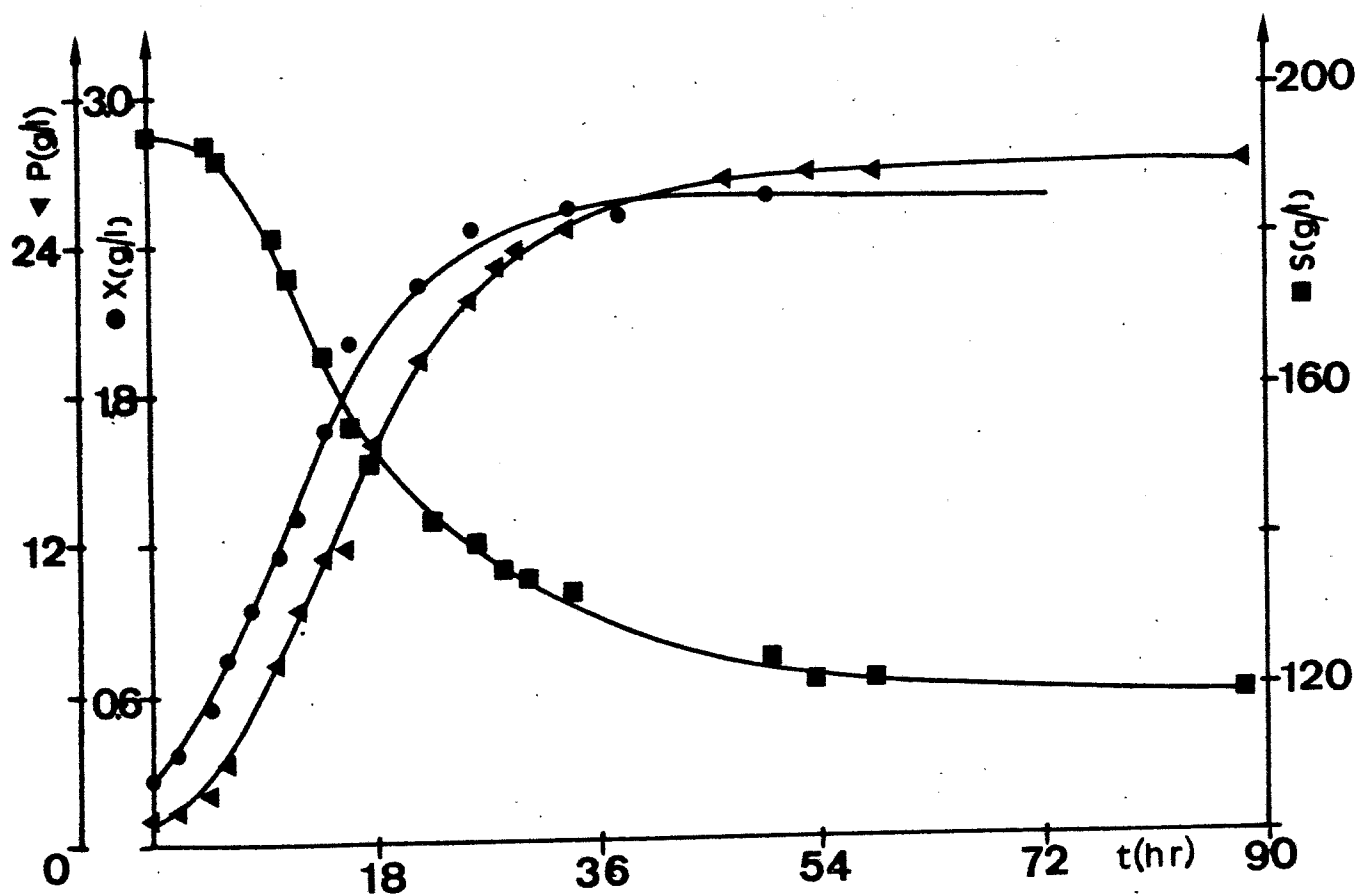


Fig. 4.7 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P); para a levedura *K. marxianus* não floculante, com uma concentração inicial de substrato de 194.6 g/l

TAB. 4.1 - Parâmetros que caracterizam a levedura *K. marxianus*

S_0 (g/l)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	$D_{\max}$ (h ⁻¹)	X_f (g/l)	S_f (g/l)	P_f (g/l)	η_p
19.6	.284	1.159	1.655	.85	10.22	92.9
28.5	.288	1.188	1.778	.81	14.49	90.9
38.8	.270	1.155	2.267	.83	19.10	90.3
50.1	.280	1.284	3.349	.80	25.16	91.3
97.7	.272	1.345	3.780	8.48	37.35	76.7
157.0	.247	1.225	3.551	71.7	30.71	65.4
194.6	.211	1.276	2.570	119.1	26.67	63.4

As concentrações X_f , S_f e D_f referem-se aos valores obtidos após paragem de fermentação.

Nas Figs. 4.8 e 4.9 estão representadas, respectivamente, a variação da taxa específica máxima de crescimento e da taxa específica máxima de produção de etanol com a concentração inicial de lactose.

A análise destes resultados permite concluir que, para concentrações de lactose inferiores a 100g/l, não existe inibição por substrato, quer para o crescimento de biomassa quer para a produção de etanol. Verifica-se também que, para concentrações iniciais de lactose iguais ou superiores a 100g/l, há uma paragem do consumo

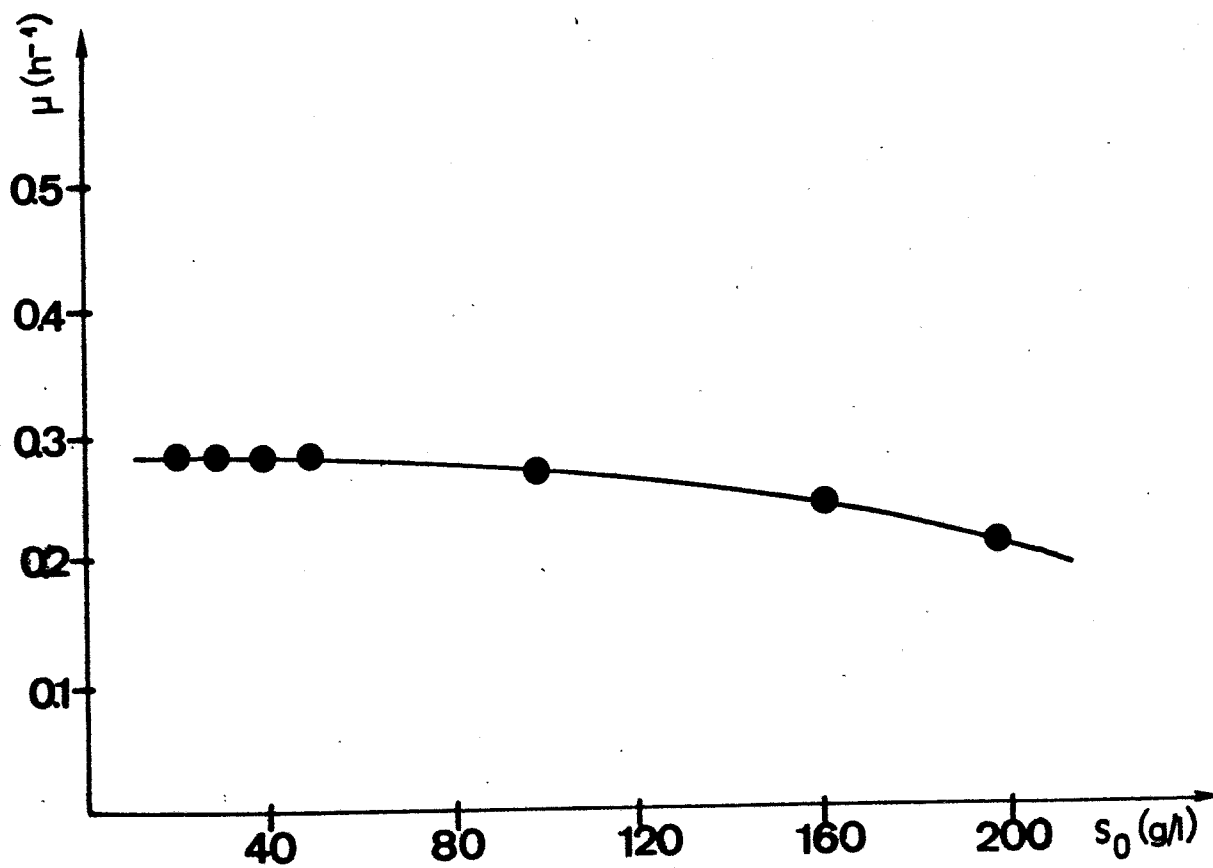


Fig. 4.8 - Variação da taxa específica máxima de crescimento com a concentração inicial de lactose

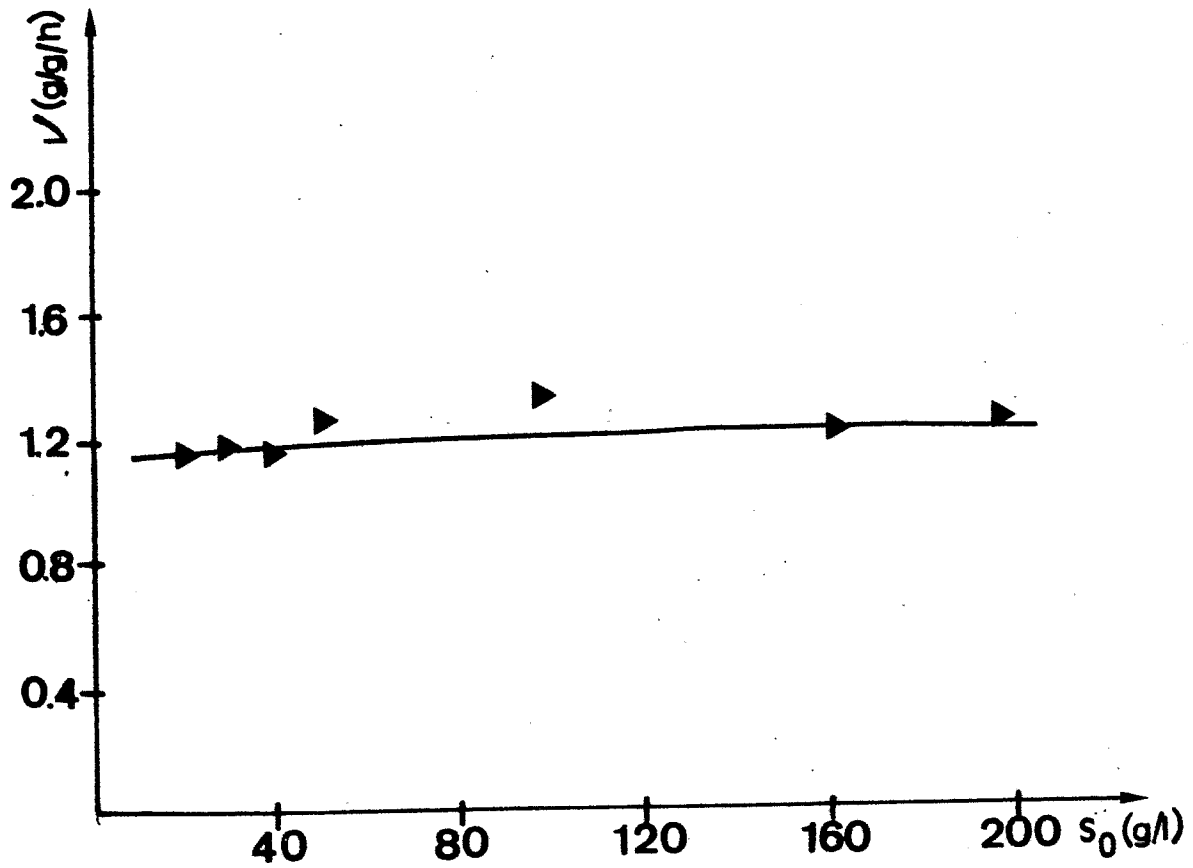


Fig. 4.9 - Variação da taxa específica máxima de produção de etanol com a concentração inicial de lactose

antes de se esgotar a fonte de carbono, o que indica uma acentuada acção inibidora do etanol, acção essa que não pode ser dissociada da inibição pelo substrato (ensaios com $S_0 = 157\text{g/l}$ e $S_0 = 195\text{g/l}$).

A caracterização do efeito inibidor do etanol foi feita considerando que no decorrer da fase exponencial e para concentrações iniciais da lactose até 100g/l , a única variável que afecta as taxas específicas de produção da biomassa e de etanol é a concentração em etanol na solução.

Para tal, foram testados os modelos de Aiba et al. (1968), Ierusalimski (1969) e Levenspiel (1980), recorrendo, numa primeira fase, a um método de optimização não linear do tipo Gauss-Newton, usando como função objectivo o somatório dos quadrados dos resíduos entre os valores experimentais de concentração de biomassa e de etanol e os valores calculados. Em todos os modelos tratados, considerou-se que a concentração de etanol é linearmente dependente da concentração em lactose segundo

$$P - P_0 = R_p (S_0 - S) \quad (4.1)$$

em que

- S_0 - concentração inicial de lactose (g/l)
- S - " de lactose no instante t (g/l)
- P_0 - " inicial de etanol (g/l)
- P - " de etanol no instante t (g/l)
- R_p - factor de conversão de lactose em etanol

Esta relação encontra-se representada na Fig. 4.10 para $S_0 = 50.1\text{g/l}$

Dos três modelos testados, o que melhor representa o efeito do etanol nos parâmetros de crescimento é o sugerido por Aiba et al., com

$$\mu_{\max} = .2727 \pm 6.96\%$$

$$K_p = .0856 \pm 12.9 \%$$

$$v_{\max} = 1.079 \pm 3.82\%$$

$$K'_p = .0321 \pm 12.1 \%$$

Com este conjunto de parâmetros foi possível determinar que a constante de limitação por substrato, quer para a produção de biomassa quer para a produção de etanol é $K_s = K'_s = 1\text{g/l}$.

Seguidamente, foi definido o modelo global recorrendo a um programa de optimização desenvolvido por Salcedo et al. (1988). Este programa baseia-se no método de Luus R. e Jakola T.H.I (1973) e utiliza como critério de optimização o somatório dos quadrados dos resíduos entre os declives experimentais.

$$\frac{d(\text{concentração em biomassa})}{d(\text{tempo})} \quad e \quad \frac{d(\text{concentração em etanol})}{d(\text{tempo})}$$

admitindo a relação anteriormente definida (eq.3.1) entre as concentrações de lactose e de etanol e fixando a constante de limitação por substrato no valor anteriormente determinado, isto é,

$$K_s = K'_s = 1\text{g/l}. \quad (4.2)$$

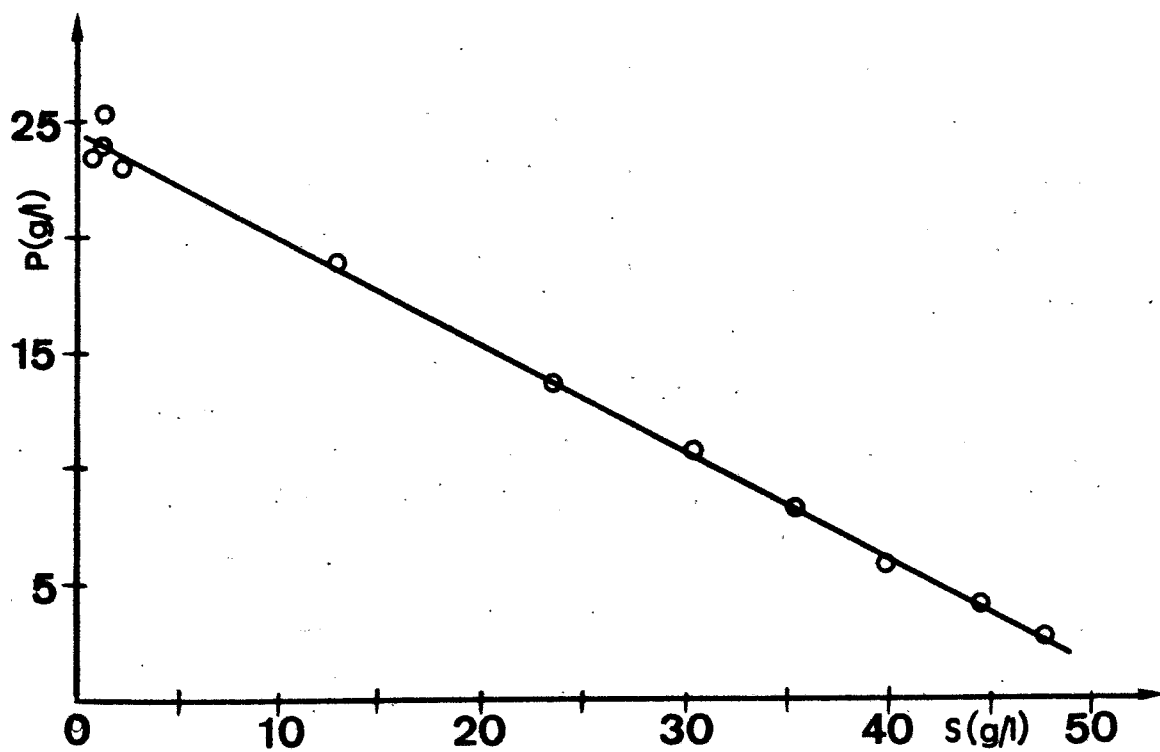


Fig. 4.10 - Relação existente entre a concentração de produto e a de substrato durante a fermentação em descontínuo para $S_0 = 50.1$ g/l

O modelo global obtido é caracterizado pelas equações

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = .298 \frac{S}{1+S} \exp (- .098 P) \quad (4.3)$$

$$v = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = 1.259 \frac{S}{1+S} \exp (- .049 P) \quad (4.4)$$

Nas Figs. 4.11, 4.12 e 4.13 estão representados as cinéticas da produção de biomassa e etanol e consumo de lactose, obtidos por integração das equações 4.3 e 4.4 (usando o método de Butcher (1971)) complementadas com a eq. 4.1 e os respectivos valores experimentais para uma concentração inicial de lactose igual a 50.1g/l.

A análise comparativa dos valores experimentais e dos valores calculados indica que o modelo global caracteriza satisfatoriamente a cinética da levedura K. marxianus. O desvio percentual médio para a produção de biomassa é 6.48 e para a produção de etanol 3.45.

Para o consumo de lactose o desvio percentual médio - 26.1-, é inflacionado pelos valores obtidos para concentrações próximas de zero, uma vez que o modelo admite consumo total e, na prática, se verifica a existência de quantidades residuais da fonte de carbono.

R

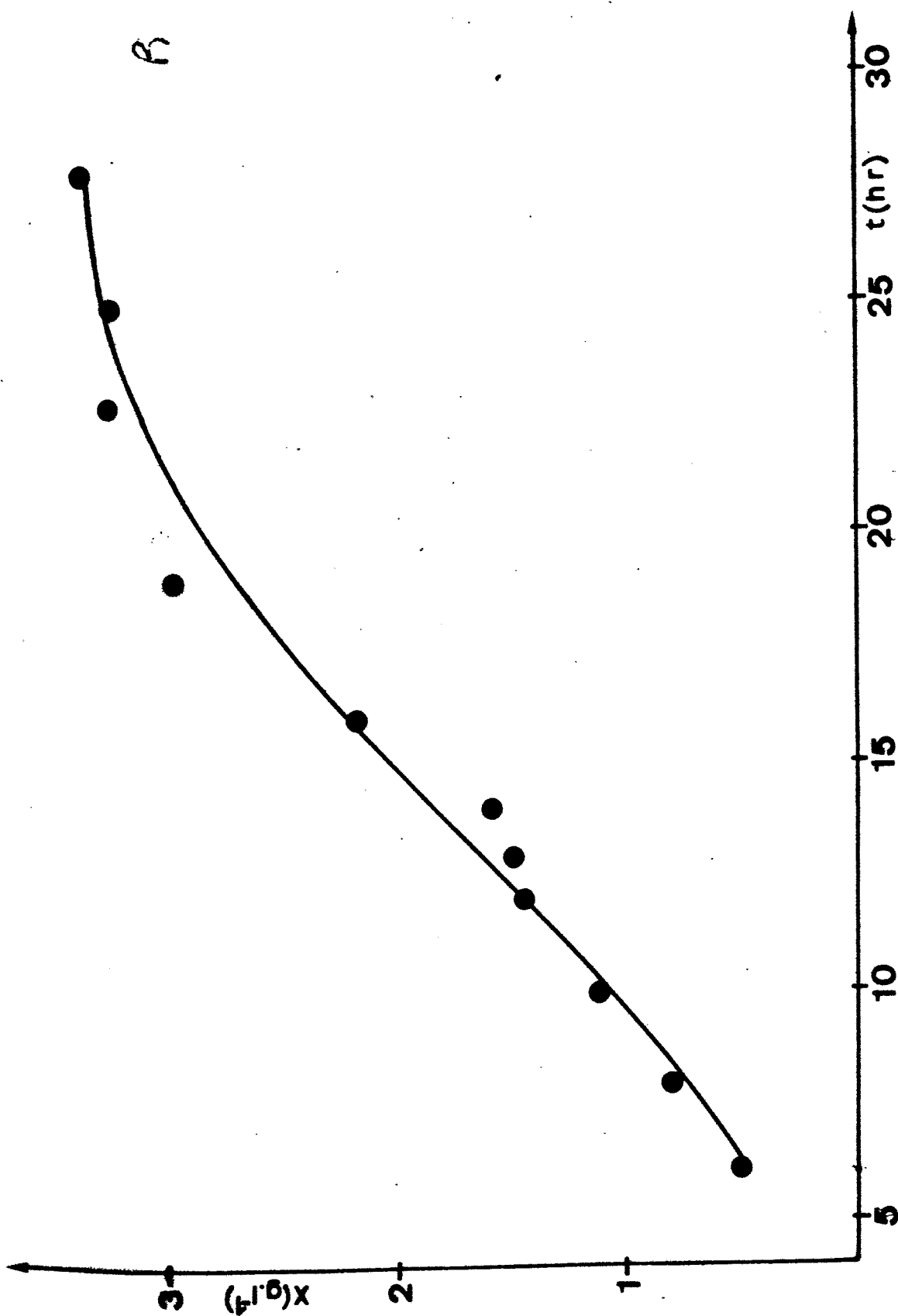


Fig. 4.11 - Cinética de produção de biomassa utilizando o modelo proposto para $S_0 = 50.1$ g/l

● Pontos experimentais

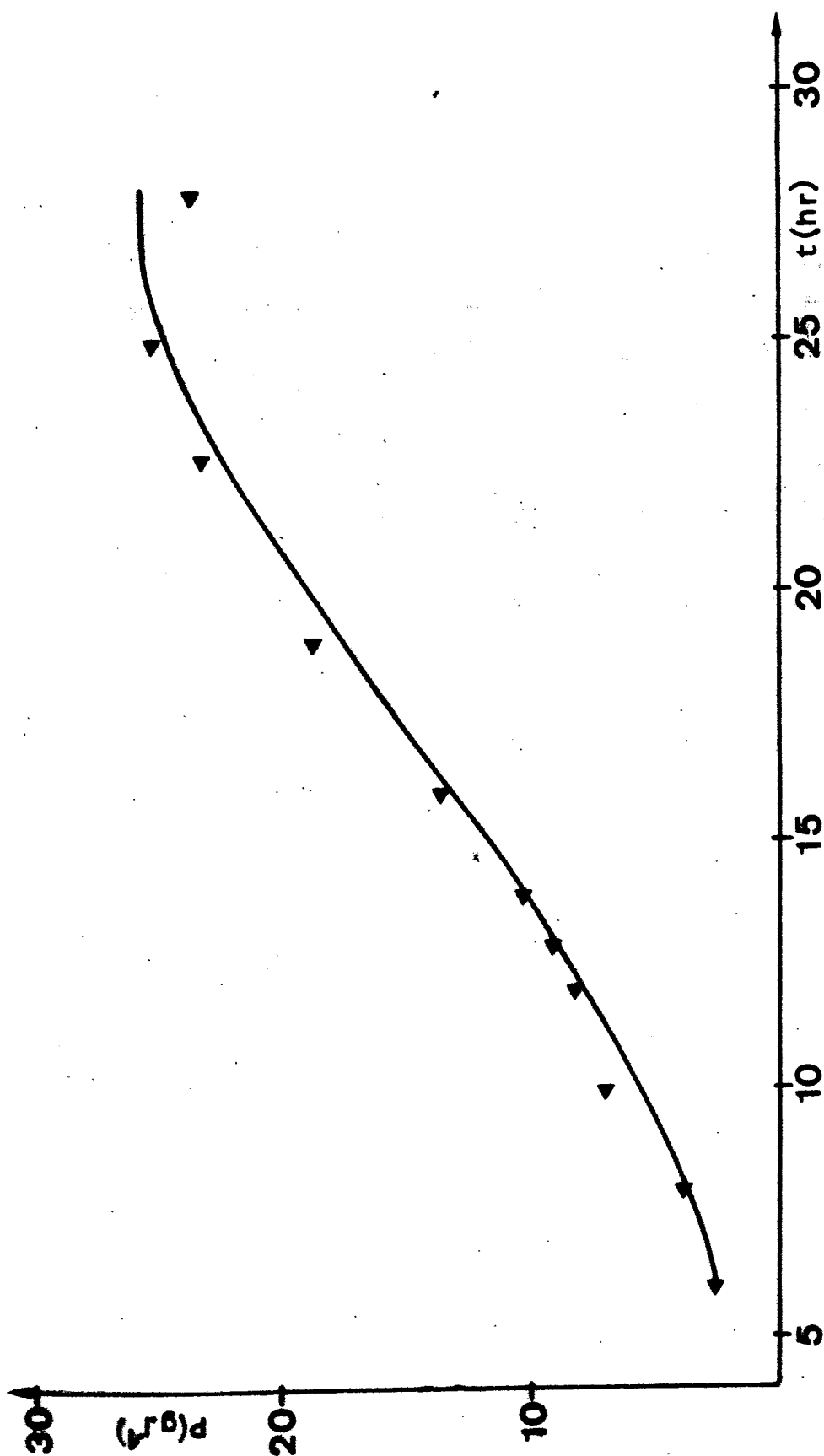


Fig. 4.12 - Cinética de produção de etanol utilizando o modelo proposto para $S_0 = 50.1$ g/l

▼ Pontos experimentais

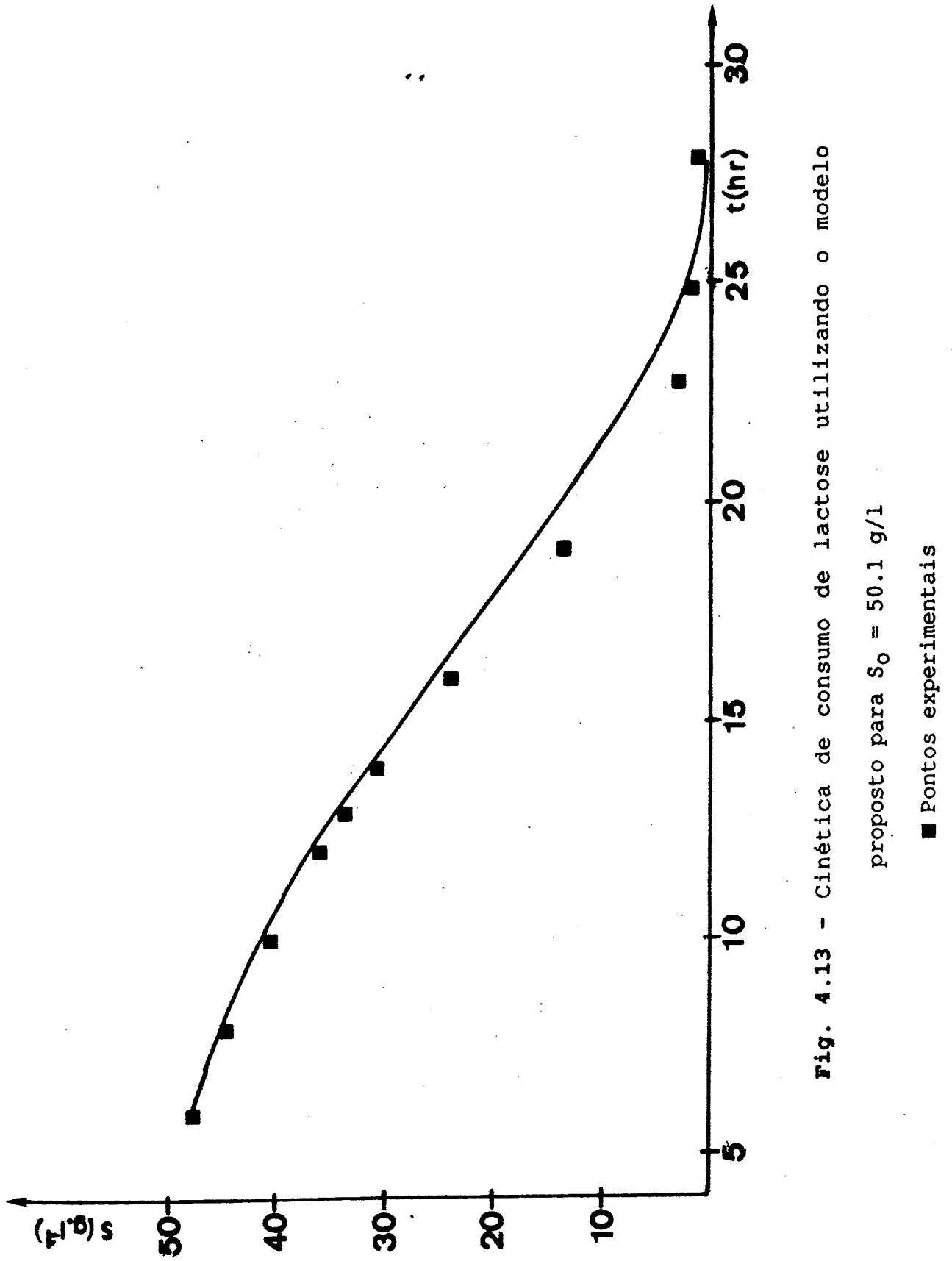


Fig. 4.13 - Cinética de consumo de lactose utilizando o modelo proposto para $S_0 = 50.1$ g/l

■ Pontos experimentais

4.2. Isolamento da estirpe floculante de Kluyveromyces marxianus

A selecção de uma estirpe floculante de K. marxianus foi tentada por dois métodos distintos:

- culturas "batch" consecutivas
- fermentação em contínuo

4.2.1. Processo descontínuo

As fermentações em descontínuo foram realizadas na montagem descrita no cap. anterior (Fig.3.3). Este sistema foi construído de modo a que as transferências de inóculo para as fermentações posteriores fossem feitas em condições de esterilidade. O tubo de transferência mergulha até ao fundo do fermentador para permitir uma maior probabilidade de recolha de células floculantes.

A concentração de lactose utilizada foi 60g/l e o sistema funcionou a 30°C com um arejamento de aproximadamente .1 v.v.m.

Os resultados obtidos por este sistema não foram satisfatórios pois, apesar de se terem realizado para cima de 50 culturas consecutivas, não foi possível obter a indução de floculação na estirpe de K. marxianus.

4.2.2. Processo contínuo

A selecção em contínuo da estirpe floculante foi realizada no sistema de fermentação já anteriormente descrito (Fig.3.4), com uma concentração inicial de lactose de 60g/l, sendo a temperatura 30°C e mantendo-se o pH igual a 4.1 pela adição de amónia.

O caudal de reciclagem era aproximadamente 5 l/h e o arejamento 0.05 v.v.m.. Nesta fase, e só durante a indução da floculação, o meio de cultura foi suplementado com 1g/l de CaCl_2 .

O arranque do processo de selecção foi antecedido pela realização de uma fermentação "batch" que constitui o inóculo para o sistema contínuo.

O ensaio de isolamento propriamente dito principiou com uma taxa de diluição, referida ao volume total do sistema, de 0.075 h^{-1} , tendo começado a notar-se ao fim de nove dias, o aparecimento de flocos, visíveis a olho nú com um aumento acentuado da concentração em biomassa no interior do fermentador e uma correspondente diminuição da quantidade de células no efluente (Fig.4.14).

O parâmetro que melhor caracteriza a capacidade floculante do sistema e da estirpe isolada é o factor de concentração (F_c) definido como

$$F_c = \frac{\text{Conc. de células no interior do fermentador}}{\text{Conc. de células no efluente}}$$

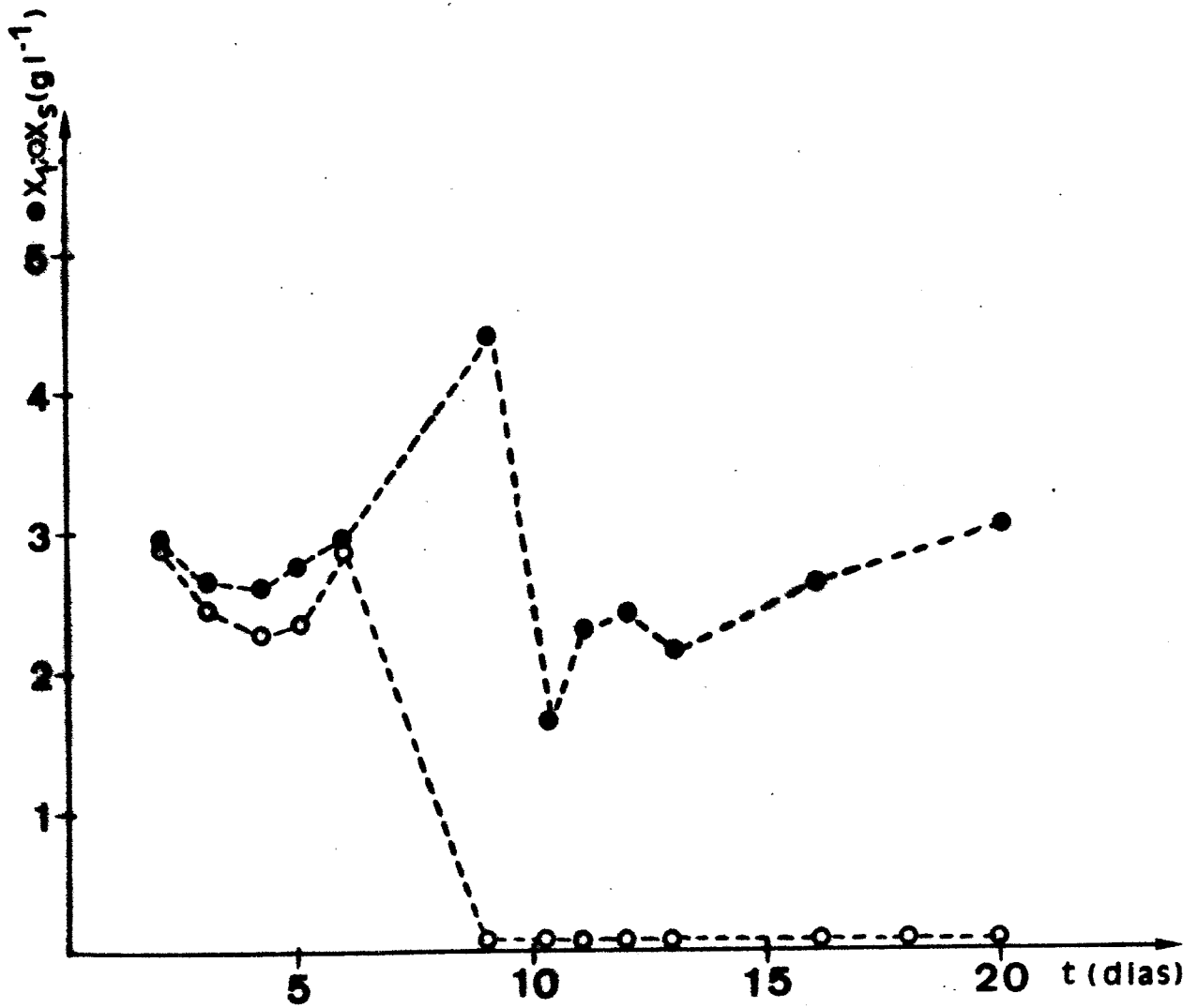


Fig. 4.14 - Indução de floculação em contínuo

- Biomassa no interior do fermentador
- Biomassa no efluente

Para esta taxa de diluição F_c manteve-se sempre superior a 50.

A taxa de diluição foi, então aumentada sucessivamente tendo sido possível obter, no fermentador, concentrações de biomassa iguais a 45g/l para uma taxa de diluição de 0.4 h^{-1} (referida ao volume total do sistema).

A análise de influência de taxa de diluição e da concentração de lactose no funcionamento do sistema de fermentação constituirá um dos temas a ser tratados no Cap.6.

De qualquer modo, deve ser referido que este conjunto de resultados é concordante com os descritos por Prince e Barford (1982).

A avaliação da capacidade de floculação da estirpe isolada foi confirmada pela realização simultânea do teste de sedimentação de Helm para a estirpe mãe (não floculante) e para a estirpe floculante.

Estes ensaios demonstram que a levedura original se mantém em suspensão ao passo que para a levedura isolada, ao fim de três minutos, quase toda a biomassa está sedimentada (Fig.4.15).

4.3. Caracterização da estirpe floculante

A caracterização cinética da estirpe floculante isolada foi realizada em fermentações "batch" nas condições descritas para a

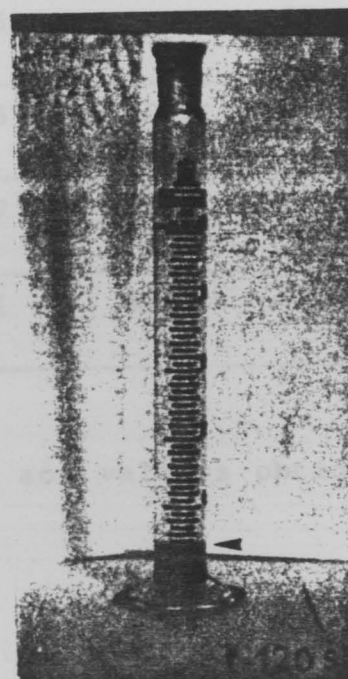
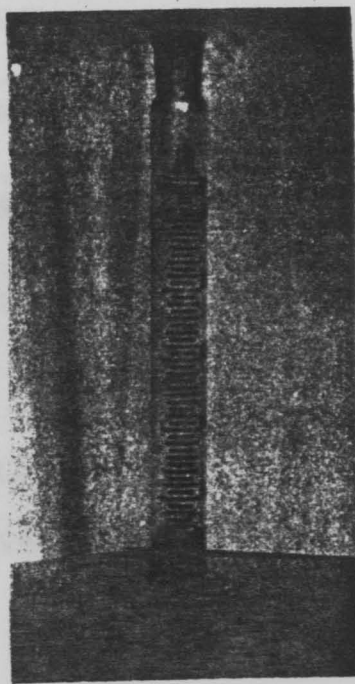
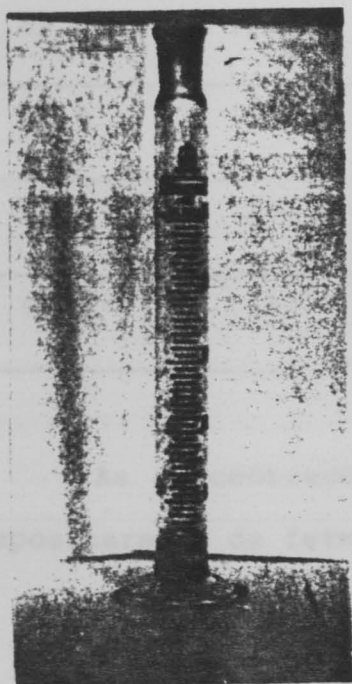
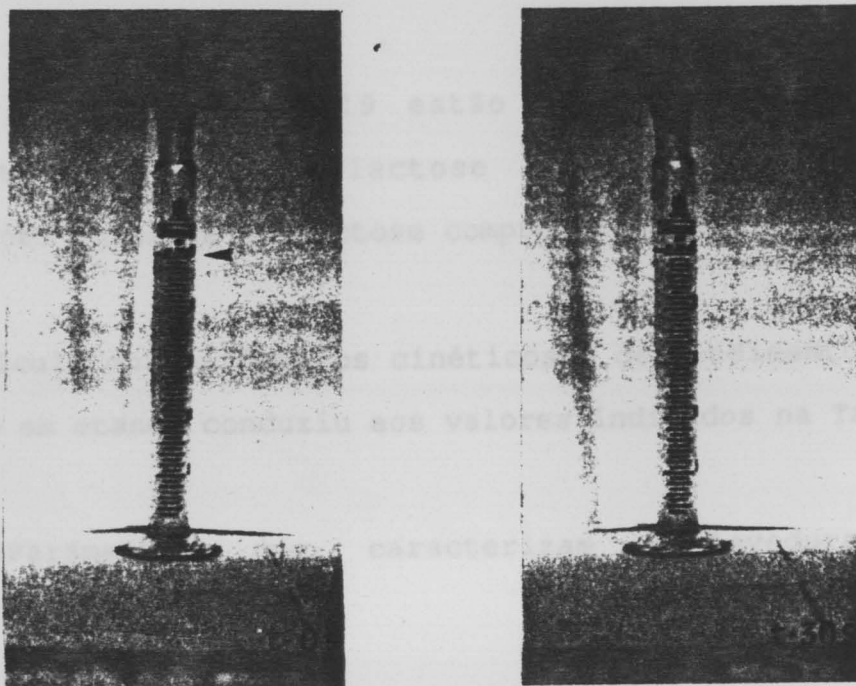


Fig. 4.15 - Sequência fotográfica do teste de sedimentação da estirpe floculante isolada

levedura K. marxianus não floculante.

Nas Figs. 4.16 a 4.19 estão representadas as curvas de crescimento, consumo de lactose e produção de etanol para concentrações iniciais de lactose compreendidas entre 30 e 100g/l.

O cálculo dos parâmetros cinéticos e de rendimento de produção de lactose em etanol conduziu aos valores indicados na Tab.4.3.

TAB 4.3 - Parâmetros que caracterizam a levedura K.marxianus floculante

So	$\mu_{\max}$	$v_{\max}$	X_f	S_f	P_f	η
30.8	.207	.961	1.85	.15	11.6	65.3
39.8	.177	.838	2.48	.25	16.1	72.4
51.3	.187	.916	3.50	.27	20.3	71.6
97.7	.183	.942	4.51	.11	35.0	66.7

As concentrações X_f , S_f e P_f referem-se aos valores obtidos após paragem de fermentação

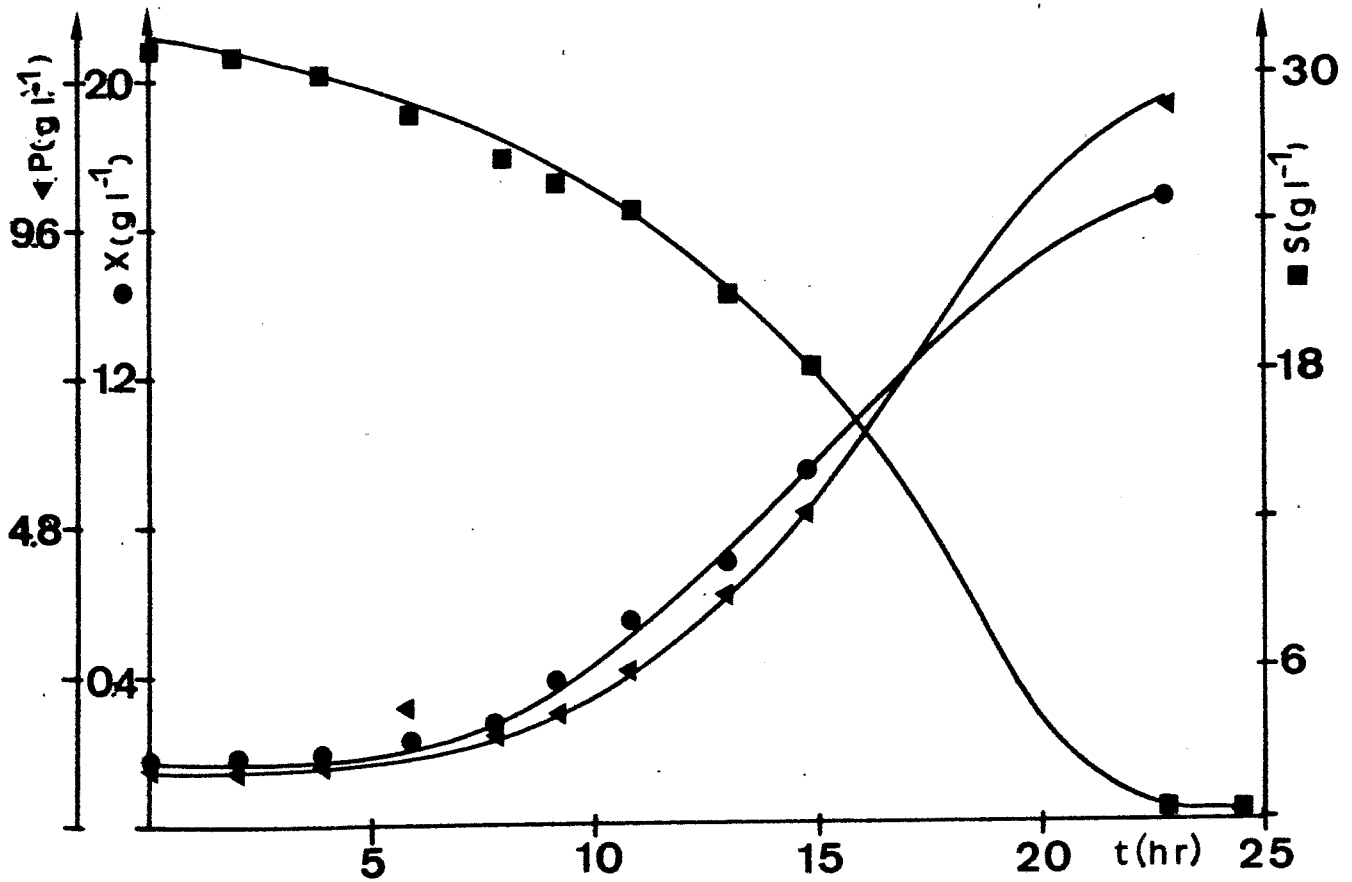


Fig. 4.16 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P) para a levedura *K. marxianus* flocculante, com uma concentração inicial de substrato de 30.8 g/l

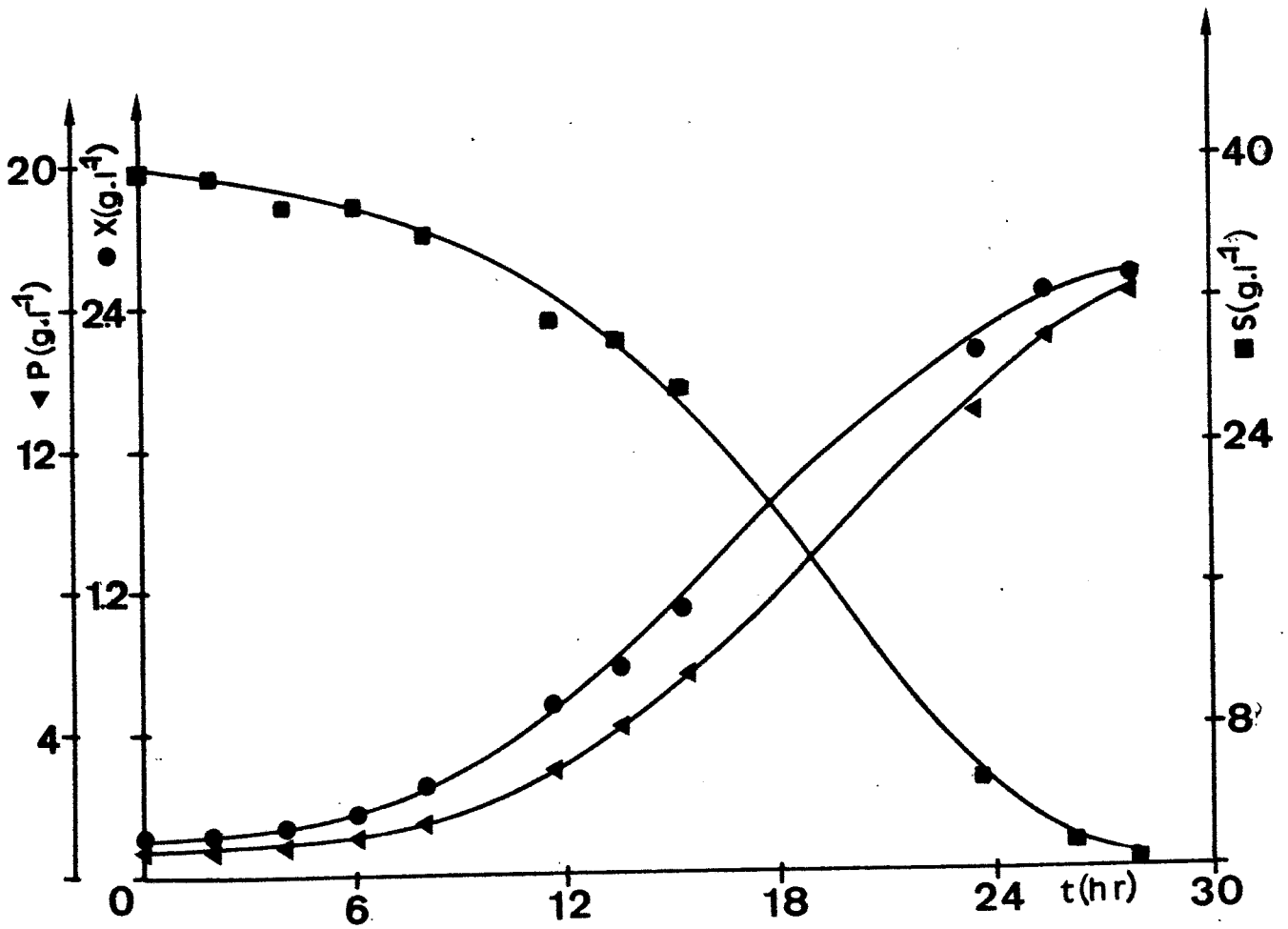


Fig. 4.17 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P) para a levedura *K. marxianus* flocculante, com uma concentração inicial de substrato de 39.8 g/l

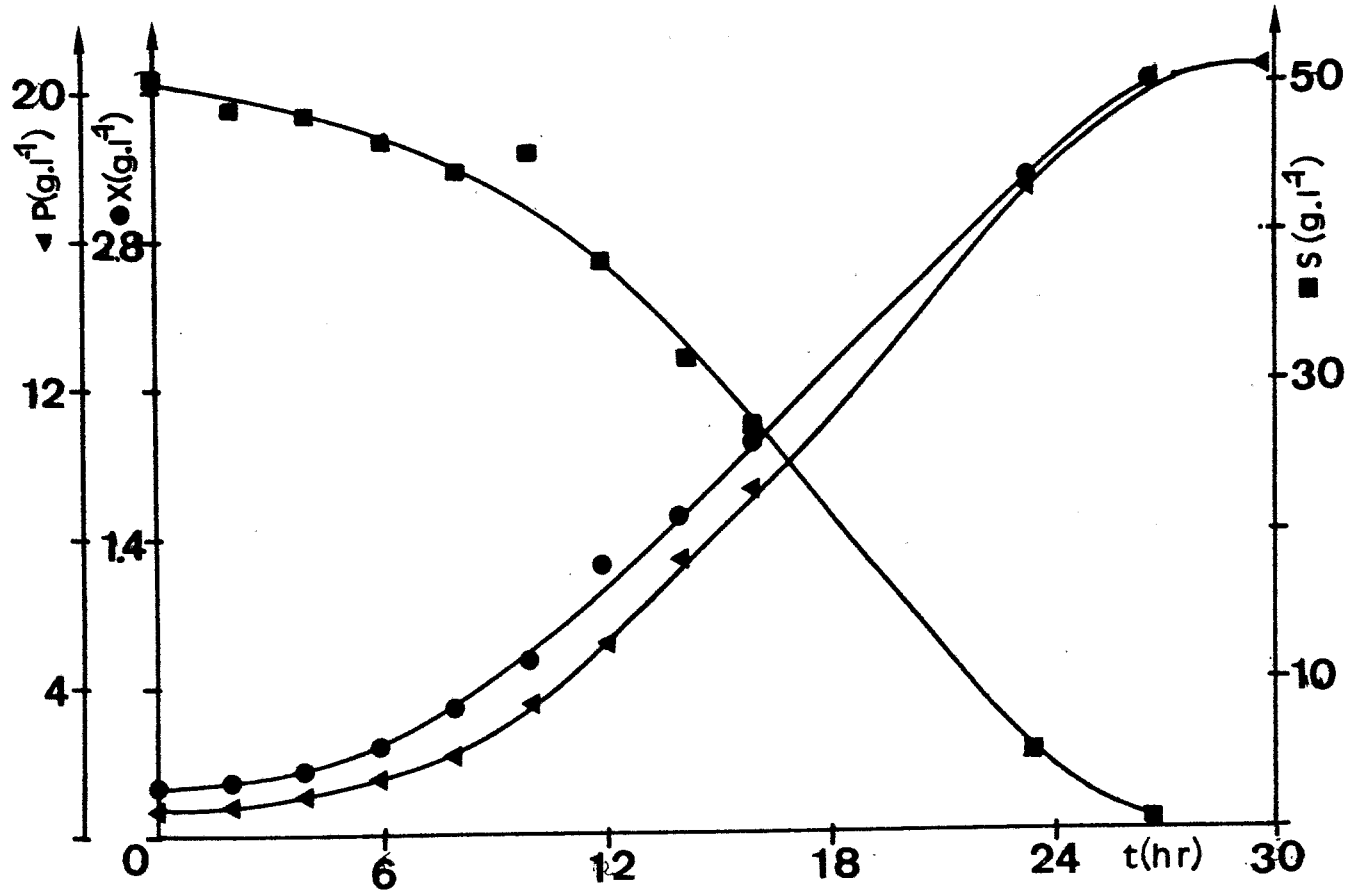


Fig. 4.18 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P) para a levedura *K. marxianus* floculante, com uma concentração inicial de substrato de 51.3 g/l

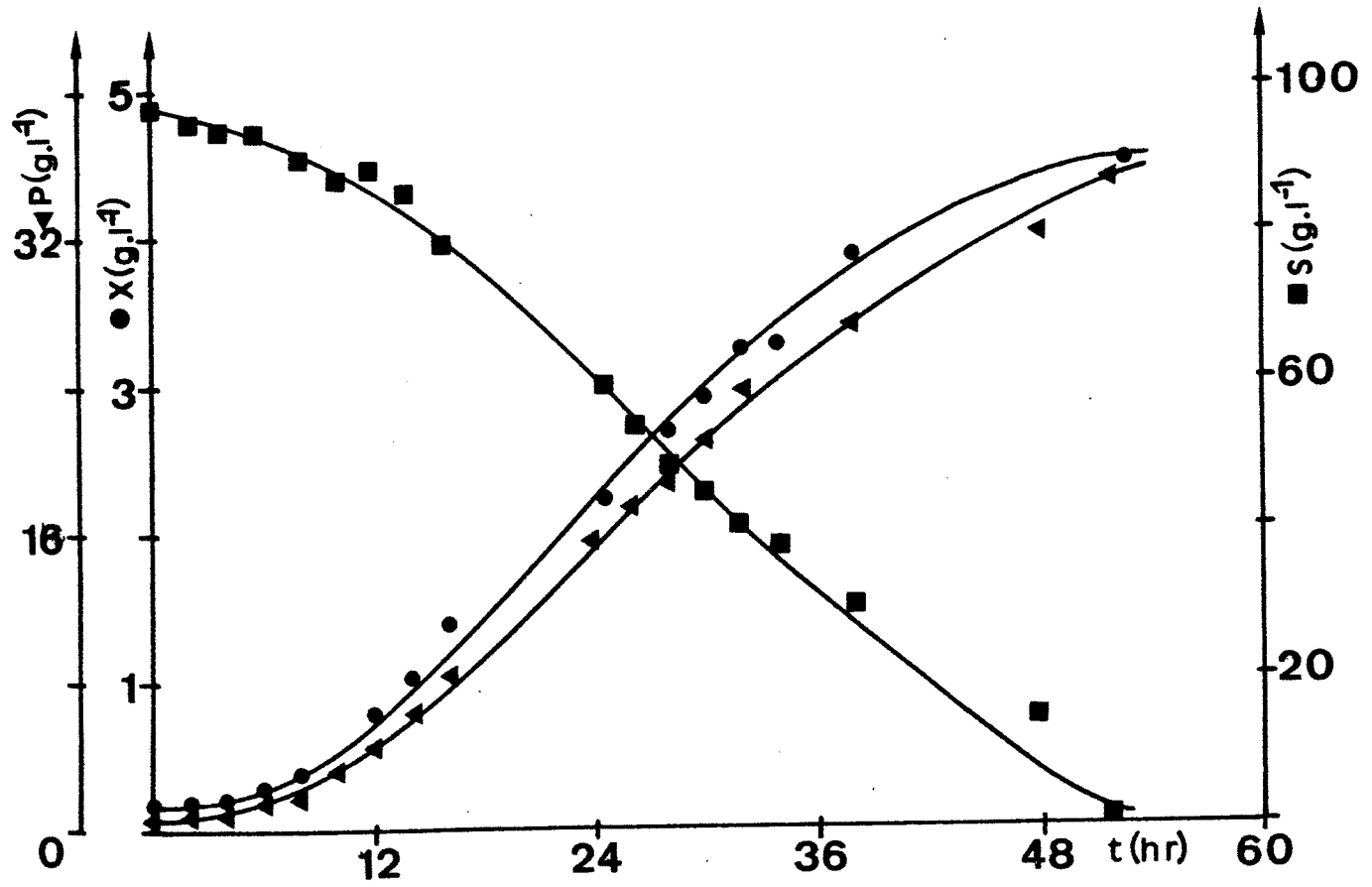


Fig. 4.19 - Curvas cinéticas de crescimento (X), consumo de lactose (S) e produção de etanol (P) para a levedura *K. marxianus* flocculante, com uma concentração inicial de substrato de 97.7 g/l

4.4. Comparação dos parâmetros cinéticos das variedades floculante e não floculante

A comparação dos parâmetros cinéticos das estirpes não floculante e floculante (Fig.4.20 e Fig.4.21) evidencia que a floculação introduz limitações principalmente ao nível da cinética de crescimento, sendo o efeito menos acentuado quando nos referimos à produção de etanol. Estes resultados sugerem a existência no interior dos flocos de limitações difusionais o que será comprovado no Cap.6.

Também deve ser referida uma diminuição significativa do rendimento de produção de lactose em etanol, no caso da estirpe floculante, compensada por um aumento relativo da concentração em biomassa.

Adoptando o mesmo tipo de aproximação descrito em 4.1, foram calculados os parâmetros do modelo de Aiba (modelo que também melhor caracteriza o efeito inibidor do etanol) para a estirpe floculante tendo-se obtido:

$$\mu_{\max} = 0.2063 \pm 3.93\%$$

$$K_p = 0.0766 \pm 9.53\%$$

$$v_{\max} = 1.155 \pm 4.20\%$$

$$K'_p = 0.0693 \pm 7.00\%$$

Estes parâmetros demonstram que, a acção inibidora do produto é mais acentuada para a produção de etanol nas leveduras floculantes, sendo o seu efeito idêntico, em ambas as estirpes, para a produção de biomassa.

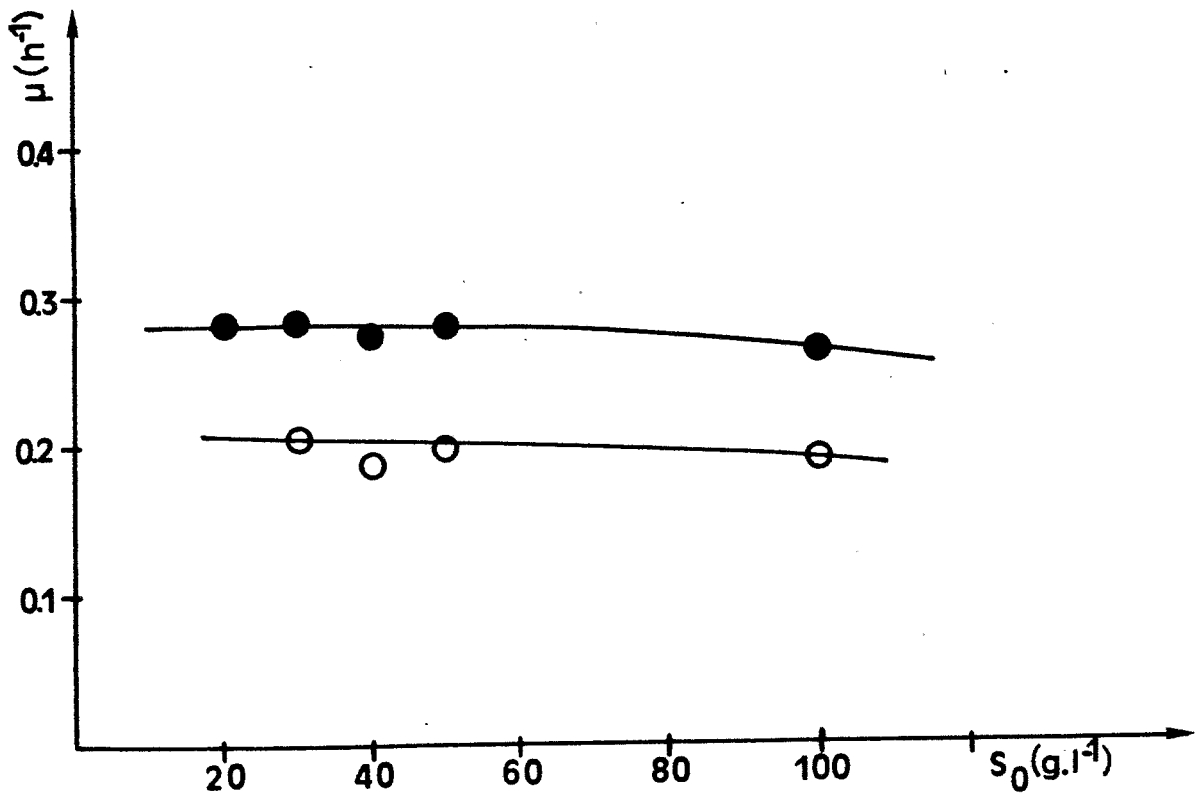


Fig. 4.20 - Variação da taxa específica máxima de crescimento com a concentração inicial de lactose para as estirpes (○) floculante e (●) não floculante

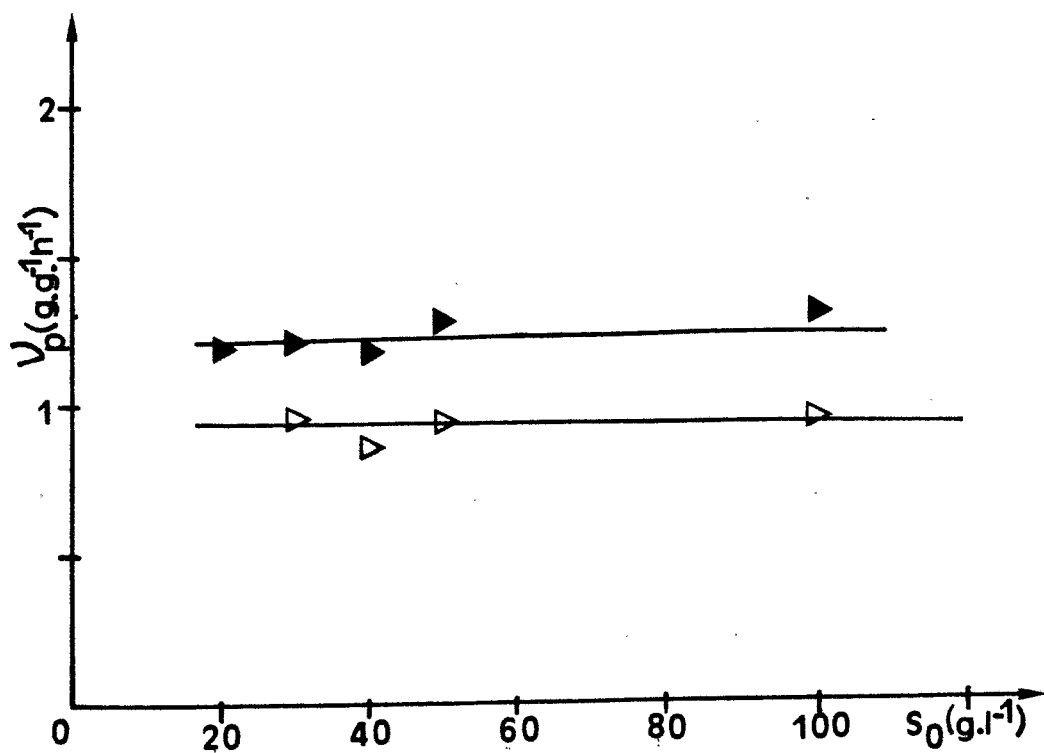


Fig. 4.21 - Variação da taxa específica máxima de produção de etanol com a concentração inicial de lactose para as estirpes (O) floculante e (●) não floculante

CAPITULO 5: FISILOGIA DE FLOCULAÇÃO

A fisiologia da floculação é um tema que, nos seus diferentes aspectos, está longe de ser convenientemente conhecido. A falta de concordância na informação existente deve-se, essencialmente, ao facto de os trabalhos publicados se referirem a diferentes estirpes desenvolvendo-se em condições diferentes, conforme referido no Cap.2.

Neste trabalho, partimos de uma estirpe mãe não-floculante e, a partir de uma metodologia de fermentação em contínuo, isolamos dessa estirpe uma linhagem floculante.

Um aspecto importante da fisiologia de floculação e sobre o qual todos os autores estão de acordo é a existência duma proteína nas paredes das leveduras que está intimamente associada ao fenómeno da floculação. É no que diz respeito ao grupo funcional da proteína que permite a Pontagem através de, por exemplo, catiões divalentes com idêntico grupo de outra proteína que os diferentes autores estão em desacordo - alguns referem que são os grupos carboxilo ao passo que outros indicam que são os grupos fosfato. Neste capítulo, demonstraremos, por análise bioquímica das paredes e recorrendo a diferentes tratamentos, a existência na parede de Kluyveromyces marxianus de uma proteína responsável pela floculação.

Analisaremos também o efeito do pH e de diferentes catiões (di, tri e tetraivalentes) na floculação de K. marxianus, dando particular relevo ao efeito do Ca^{2+} . Tal análise é sugerida pelo facto de, também neste aspecto, as opiniões não serem totalmente concordantes embora, com poucas excepções, todos os autores refiram a importância

do cálcio na floculação.

5.1. Caracterização bioquímica das paredes

A análise bioquímica das paredes da levedura Kluyveromyces marxianus não floculante e da correspondente variedade floculante foi realizada seguindo a técnica referida em "Materiais e métodos".

A estirpe não floculante foi recolhida no início da fase estacionária de uma fermentação realizada em descontínuo e a estirpe floculante foi recolhida do interior do fermentador contínuo.

Analizamos a composição da parede em açúcares (totais e redutores), glucose, proteína, fósforo total e hexosaminas, estando os resultados obtidos representados na Tab. 5.1.

Tab. 5.1 - Composição bioquímica das paredes das estirpes não floculante (Floc⁻) e floculante (Floc⁺) de Kluyveromyces marxianus.

Constituinte	Floc ⁻ %	Floc ⁺ %
Açúcares totais	53.9	60.0
Açúcares redutores	44.3	47.1
Glucose	34.7	36.1
Proteína	27.6	35.4
Fósforo	0.18	0.22
Hexosaminas	0.4	0.4

Os valores estão expressos em percentagem de matéria seca

A principal conclusão extraída da tabela é a existência de uma diferença significativa no conteúdo proteico das duas estirpes - a variedade floculante apresenta cerca de 30% mais proteína que a não floculante. No que se refere às concentrações em açúcares as diferenças são pouco significativas. Os resultados obtidos para o teor em fósforo sugerem também um aumento = 23%, no caso da estirpe floculante, o que indica que as razões fósforo/proteína, em ambas as estirpes são semelhantes. Este facto, permitiria concluir que é uma fosfoproteína que está envolvida no processo de floculação. Contudo, e atendendo ao erro experimental associada à determinação do fósforo (± 0.02), tal conclusão carece de solidez.

A diferença encontrada no conteúdo proteico das duas estirpes levou à realização de uma electroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (10.0%), a fim de se verificar se existia alguma diferença detectável na natureza das proteínas presentes na parede celular de cada estirpe.

A revelação da electroforese conduziu à identificação de uma proteína de peso molecular aparente 37000 daltons, presente na estirpe floculante e que não se encontra, pelo menos em quantidades significativas, na parede da estirpe não floculante (Fig. 5.1).

Conclui-se assim que existe uma proteína presente na parede da estirpe floculante que não existe na variedade não floculante.

Após a indução da floculação em contínuo, a estirpe floculante

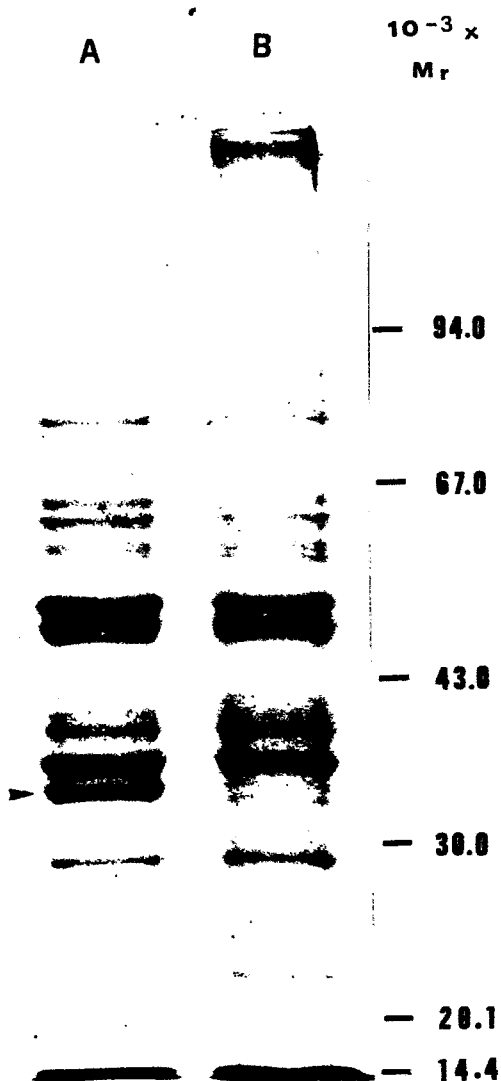


Fig. 5.1 - Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS (10%) das proteínas das paredes celulares das leveduras floculante (A) e não floculante (B).

A seta indica uma proteína com peso molecular aparente de 37 000 daltons

foi transferida para tubos inclinados (20 g/l de agar) com 60 g/l de extrato de malte. A levedura a ssim mantida, foi utilizada passados três dias como inóculo para uma fermentação em descontínuo, em meio semi-sint tico com 60 g/l de lactose.

No decorrer da fermentação, verificamos que a levedura se manteve pulverulenta no início e durante um longo período da fase exponencial, começando a flocular no fim da fase exponencial e mantendo essa capacidade durante a fase estacionária. Analisamos então a composição bioquímica das paredes da levedura nos dois estados, tendo obtido os valores representados na Tab. 5.2.

Tab. 5.2 - Composição bioquímica das paredes de K. marxianus na fase não floculante (Floc⁻) e na fase floculante (Floc⁺) .

Constituinte	Floc ⁻ (%)	Floc ⁺ (%)
Açúcares totais	80.5	66.6
Açúcares redutores	58.8	45.0
Glucose	47.2	37.4
Proteína	24.7	31.3
Fósforo	0.20	0.23

Os valores estão expressos em percentagem de matéria seca

A conclusão mais evidente a extrair destes resultados, comparando-os com os da Tab. 5.1, é a confirmação do aumento significativo do conteúdo proteico da levedura quando na fase

floculante (+30%). Também se confirma um aumento, embora não tão significativo, do teor em fósforo. Outro aspecto interessante é a semelhança da composição bioquímica das paredes de ambas as culturas floculantes.

5.2 - Eliminação da capacidade de floculação

Alguns dias mais tarde, ao realizar mais algumas fermentações em descontínuo com a estirpe floculante mantida em tubo inclinado, verificamos a eliminação total da sua capacidade de floculação. A aplicação do teste de sedimentação de Helm modificado à biomassa obtida confirmou a eliminação de capacidade de floculação.

Fermentações posteriores, em que adicionamos ao meio de cultura 10 g/l de etanol (o etanol ao diminuir a constante dieléctrica do meio favorece a floculação), conduziram ao mesmo resultado — eliminação após manutenção prolongada (superior a 5 dias) em tubo inclinado com 60 g/l de extrato de malte, da capacidade de floculação de K. marxianus anteriormente floculante.

Estes resultados parecem indicar que a manutenção da capacidade floculante de levedura K. marxianus está relacionada com a manutenção de uma pressão selectiva existente na fermentação em contínuo.

5.3 - Tratamento químico e enzimático das células de K. marxianus floculante

Os resultados anteriormente referidos indicam apenas que existe nas paredes das leveduras floculantes uma proteína que não existe na estirpe não floculante. Não nos permite concluir se é uma proteína localizada na parede celular que está envolvida no fenómeno de floculação.

Para confirmar a existência de uma proteína de floculação, foi determinada a capacidade de sedimentação das leveduras após tratamento enzimático com pepsina e tratamento químico -- esterificação.

5.3.1 - Tratamento químico

As células (aproximadamente 100 mg) eram recolhidas do fermentador e, após as lavagens descritas em 3.4, foram incubadas em 100 ml de uma solução 0.1 N de HCl em metanol a 30°C durante 24 horas.

No fim deste período foram lavadas três vezes com água desionizada ultra pura e medida a sua capacidade de floculação recorrendo ao teste de sedimentação anteriormente descrito.

Os resultados obtidos (Fig. 5.2) indicam que o tratamento com metanol-HCl elimina a capacidade de floculação de K. marxianus,

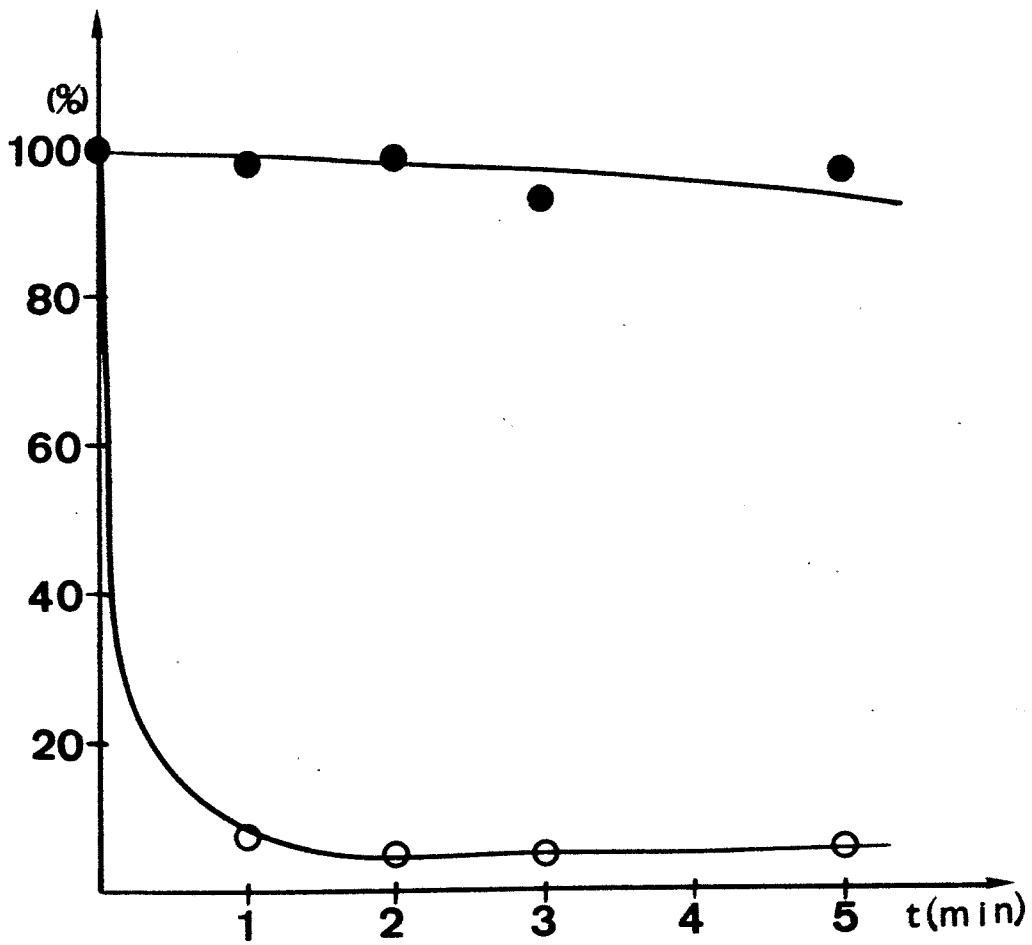


Fig. 5.2 - Teste de sedimentação de K. marxianus flocculante antes (○) e após (●) tratamento químico

sugerindo que os grupos carboxilo e/ou os grupos fosfato das superfícies celulares estão envolvidos na floculação.

5.3.2 - Tratamento enzimático

Neste caso, e após lavagem, as células recolhidas do fermentador (aproximadamente 100 mg) foram incubadas com 100 mg de pepsina a 37°C durante 1 hora em 50 ml de uma solução de HCl a pH2.

Seguidamente, foram lavadas em água desionizada ultra pura e medida a sua capacidade de floculação. Também neste caso, os resultados obtidos (Fig.5.3) indicam a eliminação completa da capacidade de floculação o que demonstra que certas proteínas na superfície das paredes celulares são essenciais para a floculação.

Em função destes resultados e da análise bioquímica das paredes é possível afirmar que a proteína detectada por electroforese em gel de poliacrilamida nas paredes da estirpe floculante é essencial para a floculação de Kluyveromyces marxianus.

De qualquer modo, não é possível afirmar, embora os resultados o sugiram, que é uma fosfoproteína que está envolvida neste fenómeno. Os meios disponíveis não permitiram obter proteína em quantidade suficiente para comprovar as características da proteína de floculação.



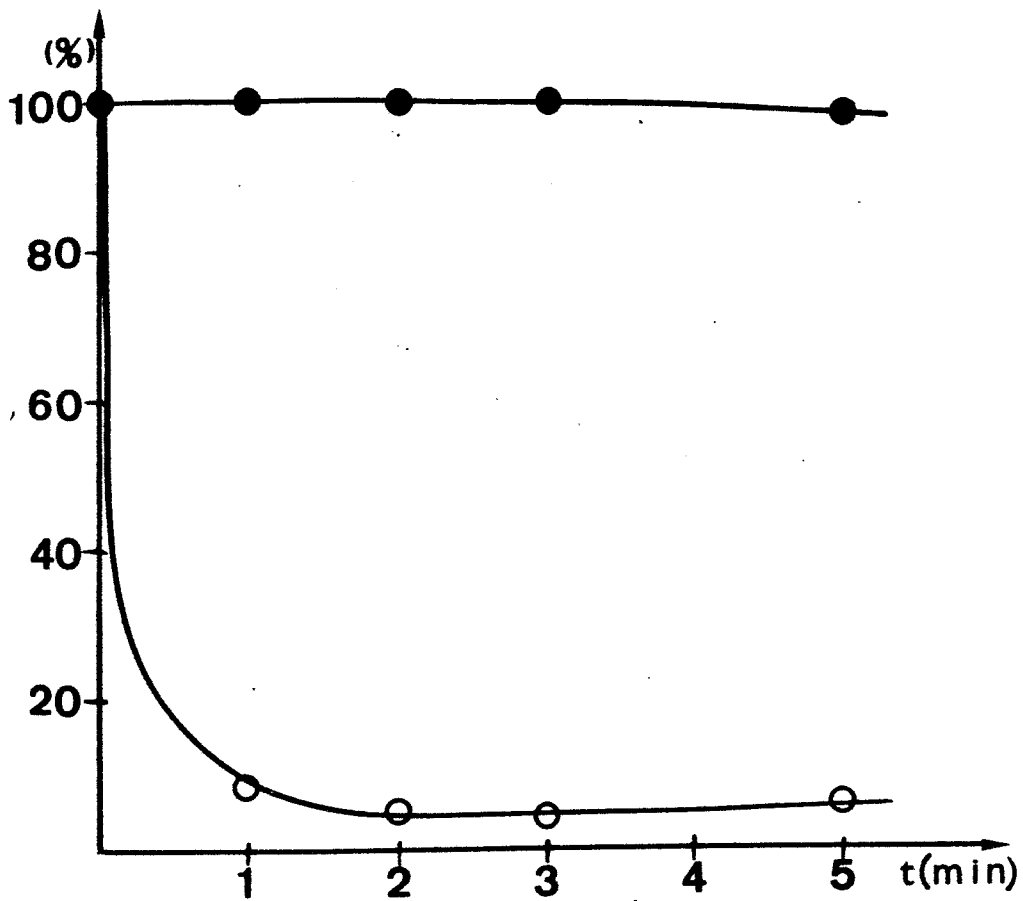


Fig. 5.3 - Teste de sedimentação de *K. marxianus* flocculante antes (○) e após (●) tratamento enzimático

5.4 - Retenção de cálcio na floculação

O cálcio é, segundo a maioria dos autores, responsável pelo estabelecimento de pontes iônicas entre os grupos funcionais das proteínas das paredes celulares de leveduras floculantes. Decidimos então após os tratamentos enzimático e químico acima descritos.

Esta determinação foi feita, colocando as leveduras (aproximadamente 100 mg), após as devidas lavagens, em contacto com 50 ml de uma solução de cálcio (10 mg/l) em água ultra-pura a pH4 (corrigido pela adição de HCl).

TAB. 5.3 - Quantidade de cálcio retido pelas estirpes não floculante e floculantes (antes e após tratamento)

Estirpe não floculante	1.1×10^{-3}
Estirpe floculante	3.4×10^{-4}
Estirpe floculante (após esterificação)	1.3×10^{-4}
Estirpe floculante (após tratamento enzimático)	8.1×10^{-5}

Estes valores estão expressos em gramas de cálcio por grama de biomassa (peso seco).

Da análise dos valores obtidos (representados na Tab. 5.3) verificamos que:

- as paredes da estirpe não floculante retêm cerca de 3 vezes mais cálcio que a variedade floculante.

- quer a esterificação quer a digestão enzimática reduzem significativamente a quantidade de cálcio retida nas paredes da levedura floculante.

A conclusão a extrair destes resultados é: o cálcio é necessário mas não suficiente para a floculação.

5.5 - Influência do pH do meio e do cálcio na floculação

A análise da acção conjunta do pH do meio e do cálcio na floculação permite-nos demonstrar que a concentração do ião Ca^{2+} condiciona a intensidade do efeito do pH.

Para tal, as células após lavagem eram colocadas em água contendo diferentes quantidades de Ca^{2+} :

A - água desionizada ultra-pura ($\text{Ca}^{2+} < 0.2 \text{ mg/l}$)

B - água corrente ($\text{Ca}^{2+} \approx 20 \text{ mg/l}$)

C - água corrente à qual se adicionou 1 g/l de CaCl_2 ($\text{Ca}^{2+} \approx 390 \text{ mg/l}$)

Em cada uma das soluções procedeu-se do seguinte modo:

- o pH é ajustado a 5 com NaOH 2N
- o meio é agitado durante dois minutos e seguidamente colocado em repouso durante outros dois minutos.
- recolhe-se uma amostra do sobrenadante para determinar a concentração em células livres.
- novos valores de pH vão sendo fixados de maneira decrescente até pH = 2 por adição de ácido ortofosfórico.
- o pH é levado, por incrementos de 1, de novo a 5 pela adição de NaOH 2N.
- o grau de floculação, representado pela percentagem de células livres é medido para cada valor do pH.

Os resultados obtidos estão representados na Fig. 5.4.

Verificamos imediatamente que para os pH mais elevados existe um menor conteúdo em células livres e que o efeito do pH na floculação é reversível.

Também confirmamos a existência de um equilíbrio iónico (tipo ácido fraco) determinado pelo pH do meio - em meios ácidos existe uma neutralização das cargas das paredes das leveduras, conforme descrito por Netto C.B. (1984), o que provoca um aumento da percentagem de

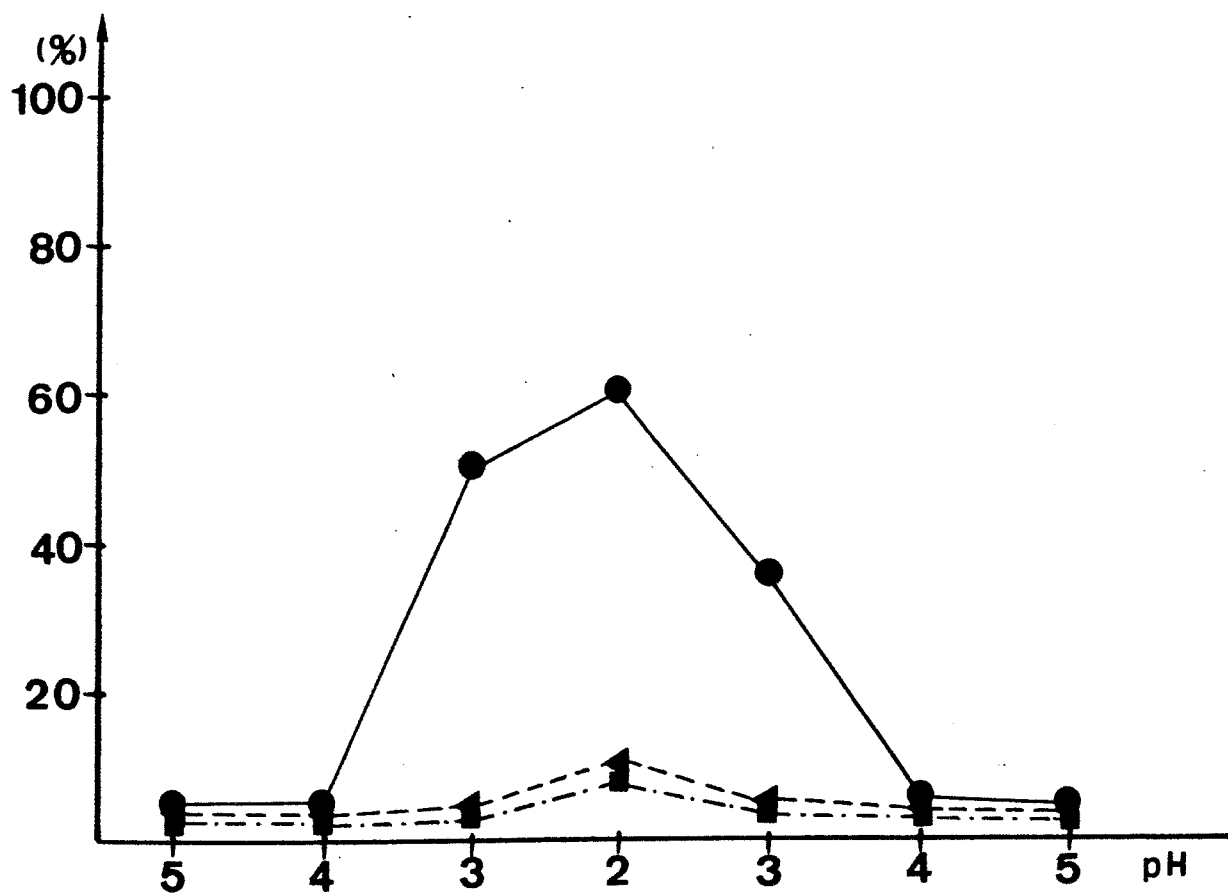


Fig. 5.4 - Efeito conjunto do pH e do cálcio na floculação de *K. marxianus*

● Ca²⁺ = 0.2 mg/l; ▲ Ca²⁺ = 20 mg/l; ■ Ca²⁺ = 390 mg/l

células livres.

Outra conclusão a extrair é que a concentração de cálcio no meio condiciona a intensidade do efeito do pH na floculação. Com efeito, para os ensaios realizados na presença de vestígios de Ca^{2+} as células desfloculam pela simples deslocação do equilíbrio iónico acima referido, ao passo que, na presença de maiores concentrações de Ca^{2+} , esta deslocação não é suficiente para assegurar a ruptura das pontes formadas pelos iões cálcio.

Para assegurar a desfloculação completa é necessário que as células, após centrifugação, sejam colocadas em contacto com água a pH2 com 15 g/l de NaCl.

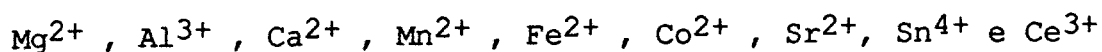
Como descrito por vários autores, os iões Na^+ competem com o Ca^{2+} para os sítios aniónicos da parede celular e provocam a eliminação de floculação.

5.6 - Acção de diferentes catiões na floculação

Os resultados existentes na literatura, conforme descrito na análise bibliográfica, referem essencialmente a acção de catiões mono e divalentes na capacidade de floculação das leveduras. Nesta secção, pretendemos, para a estirpe floculante de Kluyveromyces marxianus, alargar esta análise a um maior espectro de iões divalentes e estendê-la aos tri e tetravalentes e, se possível, correlacionar a capacidade de floculação com algumas das suas propriedades (massa

atômica ou propriedades iônicas).

Os iões testados, sob a forma de cloretos foram (por ordem crescente de massa atômica):



A quantificação da acção flocculante de cada um foi determinada, medindo, numa proveta de 25 ml, o perfil de sedimentação (de um modo análogo ao teste de Helm modificado) de idênticas quantidades de biomassa colocada em suspensão numa solução contendo, em água desionizada ultra-pura, 1 mM de cada um dos iões. O pH era ajustado a 4.0 pela adição de HCl.

Os resultados obtidos encontram-se representados nas Fig. 5.5 e 5.6.

Globalmente e usando como critério a percentagem de células existentes no sobrenadante ao fim de 5 minutos, podemos classificar a capacidade de floculação de diferentes iões do seguinte modo (Tab. 5.4)

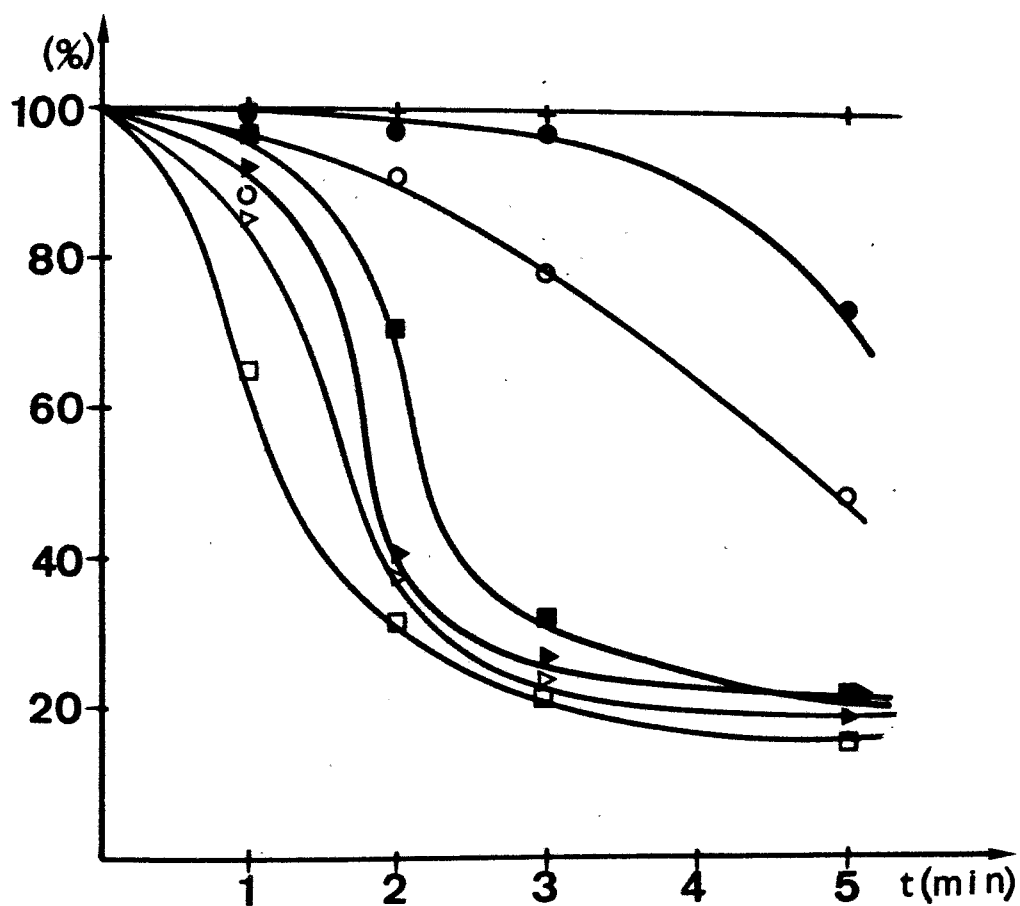


Fig. 5.5 - Teste de sedimentação de *K. marxianus* na presença de iguais quantidades de ● Mn²⁺, ○ Ca²⁺, ■ Mg²⁺, ► Co²⁺, ▷ Sr²⁺ e □ Fe²⁺

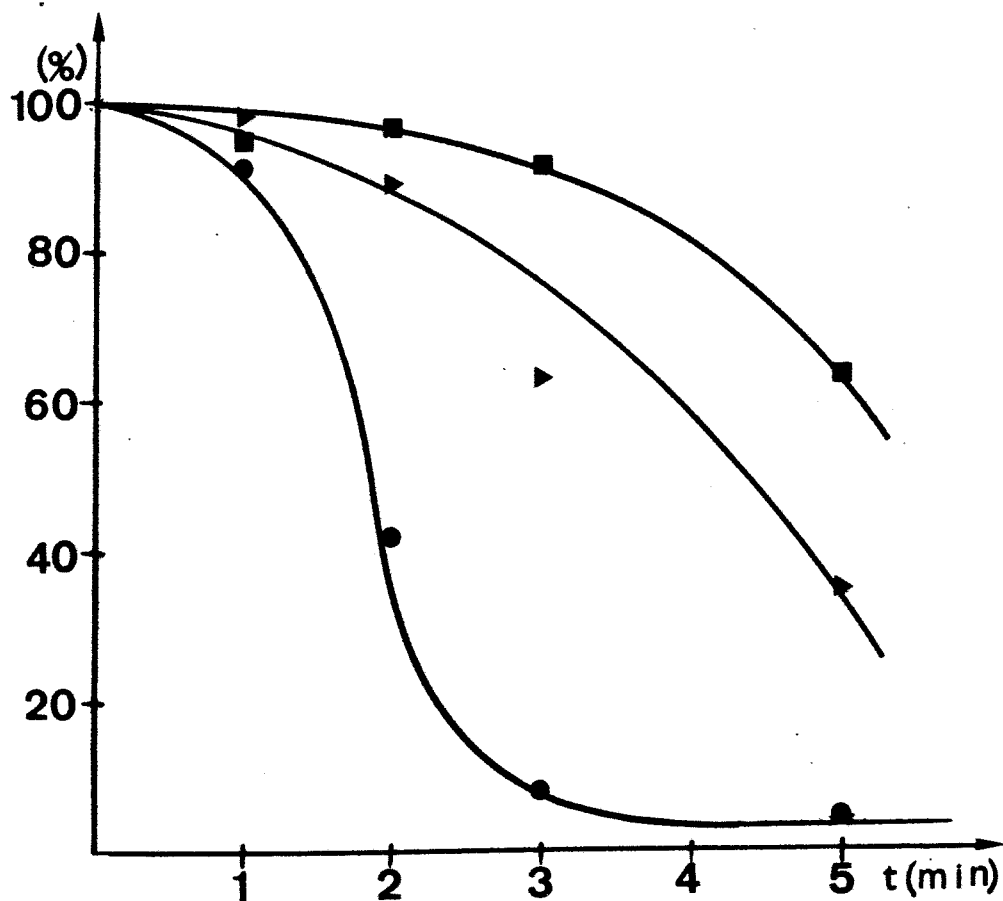


Fig. 5.6 - Teste de sedimentação de *K. marxianus* na presença de iguais quantidades de $\blacksquare \text{Ce}^{3+}$, $\blacktriangle \text{Al}^{3+}$, $\bullet \text{Sn}^{4+}$

TAB. 5.4 - Capacidade de floculação de K. marxianus na presença dos diferentes iões testados

Ião	%
Mn ²⁺	72
Ce ³⁺	63
Ca ²⁺	47
Al ³⁺	36
Mg ²⁺	22
Co ²⁺	21
Sr ²⁺	20
Fe ²⁺	19
Sn ⁴⁺	5

Desta tabela é evidente que o ião tetravalente apresenta o efeito mais significativo, o que está de acordo com o referido por Nishihara et al. (1984).

De qualquer modo, e em função dos resultados obtidos não é possível correlacionar o poder floculante dos iões com as propriedades respectivas.

5.7 Morfologia

Conforme referido por Guiraud J. e Galzy P. (1980) e Kreger van Rij N.J.W (1984) a possibilidade da formação de pseudomicélio é uma das características de K. marxianus.

A observação por microscopia óptica dos flocos de K. marxianus permite verificar a existência de cadeias de células alongadas que surgem do interior dos flocos e que constituem, às vezes, pontes de união entre flocos (Fig. 5.7). A analogia entre esta imagem e as apresentadas por Uruburu F. e Monreal J. (1967) indica a existência de pseudomicélio na nossa estirpe, nas condições de cultura em contínuo.

Por microscopia electrónica de varrimento também detectamos a existência de estruturas tubulares coexistindo com células normais (Fig.5.8), que possivelmente também são formações pseudomiceliares.

Estes elementos sugerem que o mecanismo de floculação de K. marxianus está associado a dois fenómenos:

- estabelecimento, por acção de catiões (di, tri ou tetravalentes) de pontes iónicas entre os grupos fosfato ou carboxilo de uma proteína existente nas paredes celulares de leveduras floculantes adjacentes.

- existência de uma malha tridimensional de pseudomicélio que serve para estabilizar as ligações iónicas formadas.

Outra observação importante a extrair da fotografia obtida por microscopia de varrimento é o elevado nº de cicatrizes existentes nas paredes das leveduras floculantes, o que sugere que a floculação é mais intensa em células velhas.

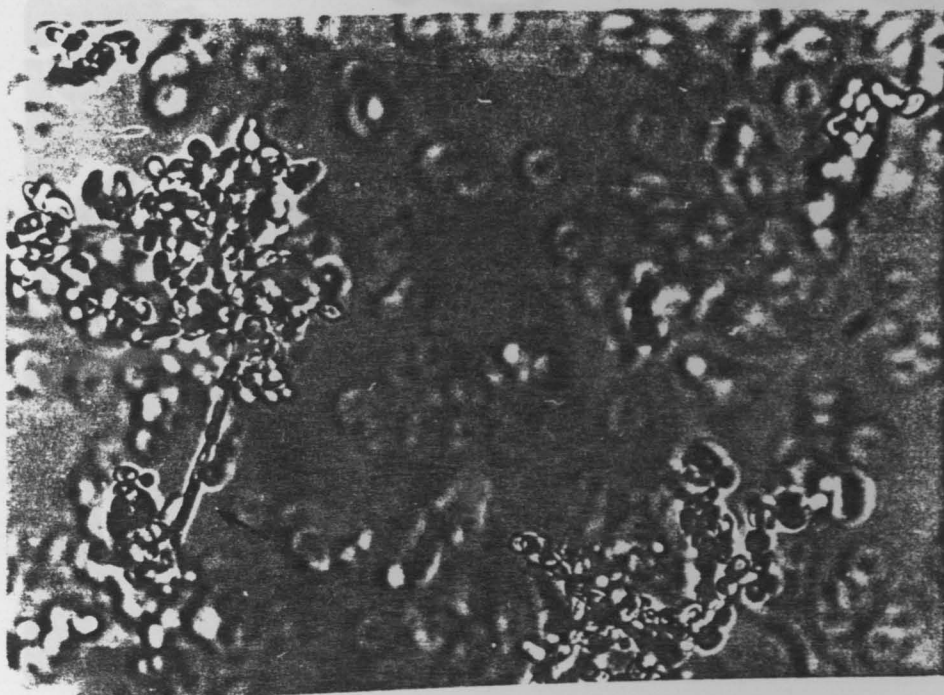
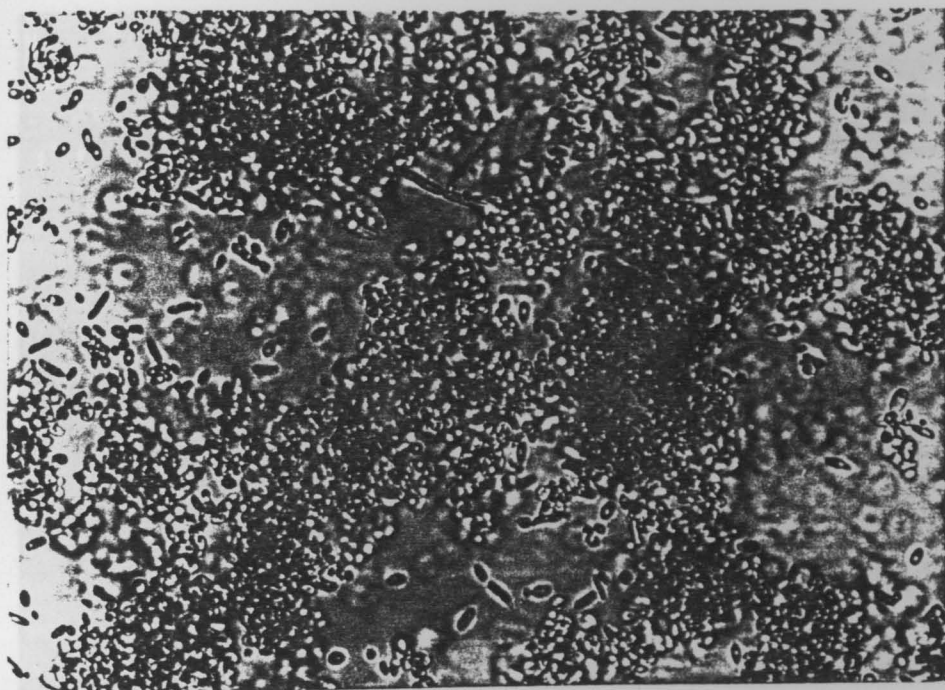


Fig. 5.7 - Microscopia óptica das células de K. marxianus flocculantes
(a seta indica pseudomicélio)

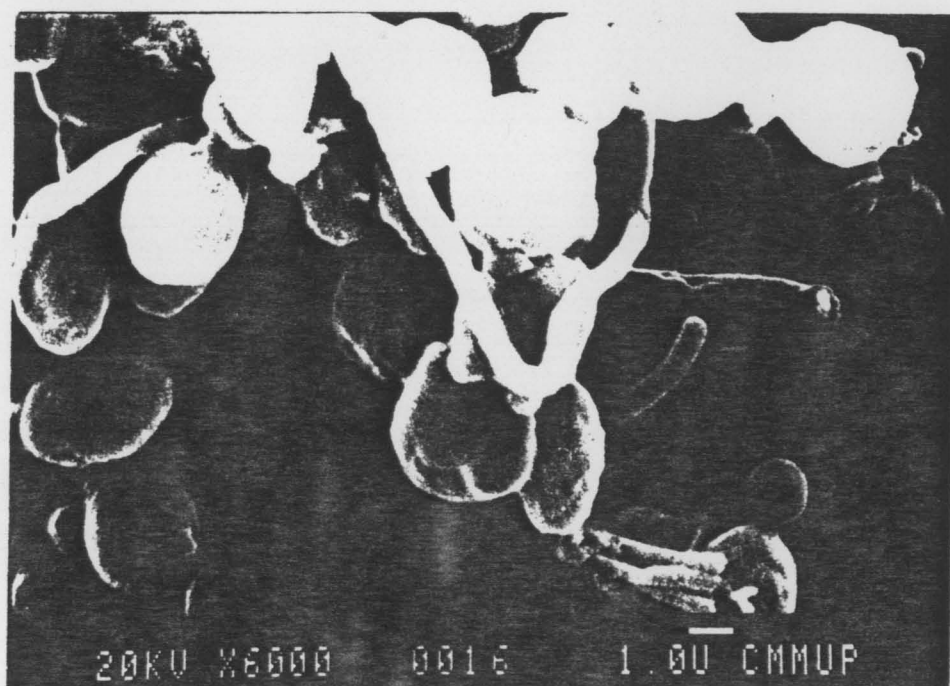
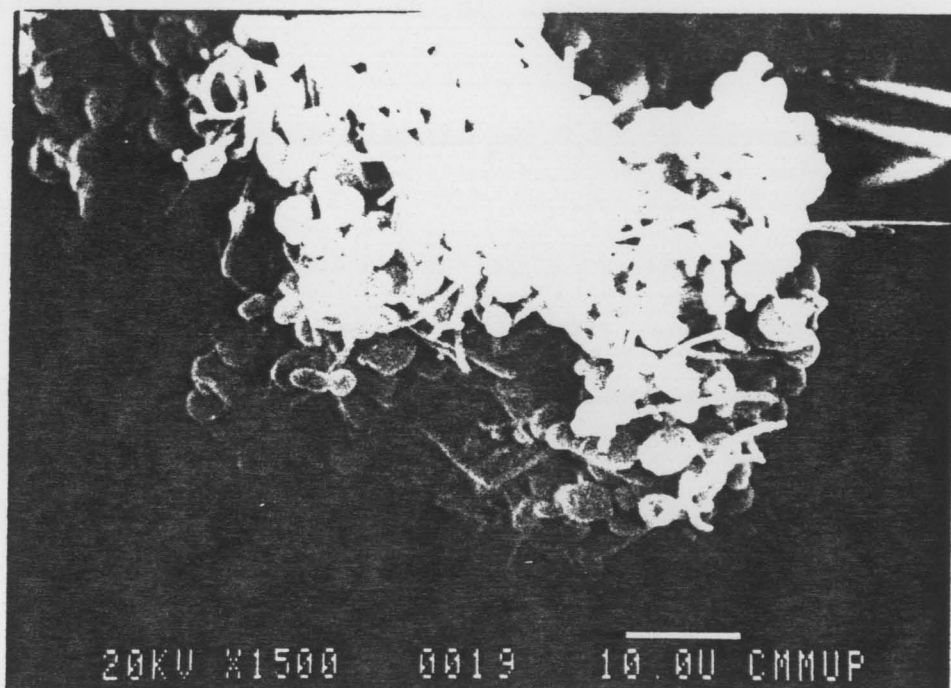


Fig. 5.8 - Microscopia electrónica de varrido de estirpe
floculante de K. marxianus

CAPITULO 6: FERMENTAÇÃO EM CONTINUO

6.1 Teste de homogeneidade do reactor

A caracterização da mistura na zona de fermentação (ZONA I) do sistema contínuo (Fig. 3.4) foi feita, analisando a resposta do reactor a um degrau negativo de azul de metileno. A técnica usada consiste em alimentar o reactor, para as condições de fermentação, com uma solução de lactose (60g/l) corada com azul metileno que, no instante $t=0$ era substituída por uma solução límpida. As amostras na corrente de saída eram recolhidas a intervalos de tempo definidos e analisadas espectrofotometricamente a 450 nm.

Considerando que a mistura no fermentador é perfeita, um balanço ao traçador indica que

$$\ln M/M_0 = -D \cdot t \quad (6.1)$$

em que:

M_0 - concentração inicial de traçador (mg/l)

M - concentração de traçador no instante t (mg/l)

D - taxa de diluição, definida como - razão entre o caudal volúmico de alimentação e o volume do reactor (h^{-1})

Ajustando os dados experimentais ao modelo definido obtém-se uma taxa de diluição $D = 0.453 \text{ h}^{-1}$ que se afasta 3% do valor medido $D = 0.439 \text{ h}^{-1}$. A função de ajuste e os valores experimentais estão representados na Fig. 6.1.

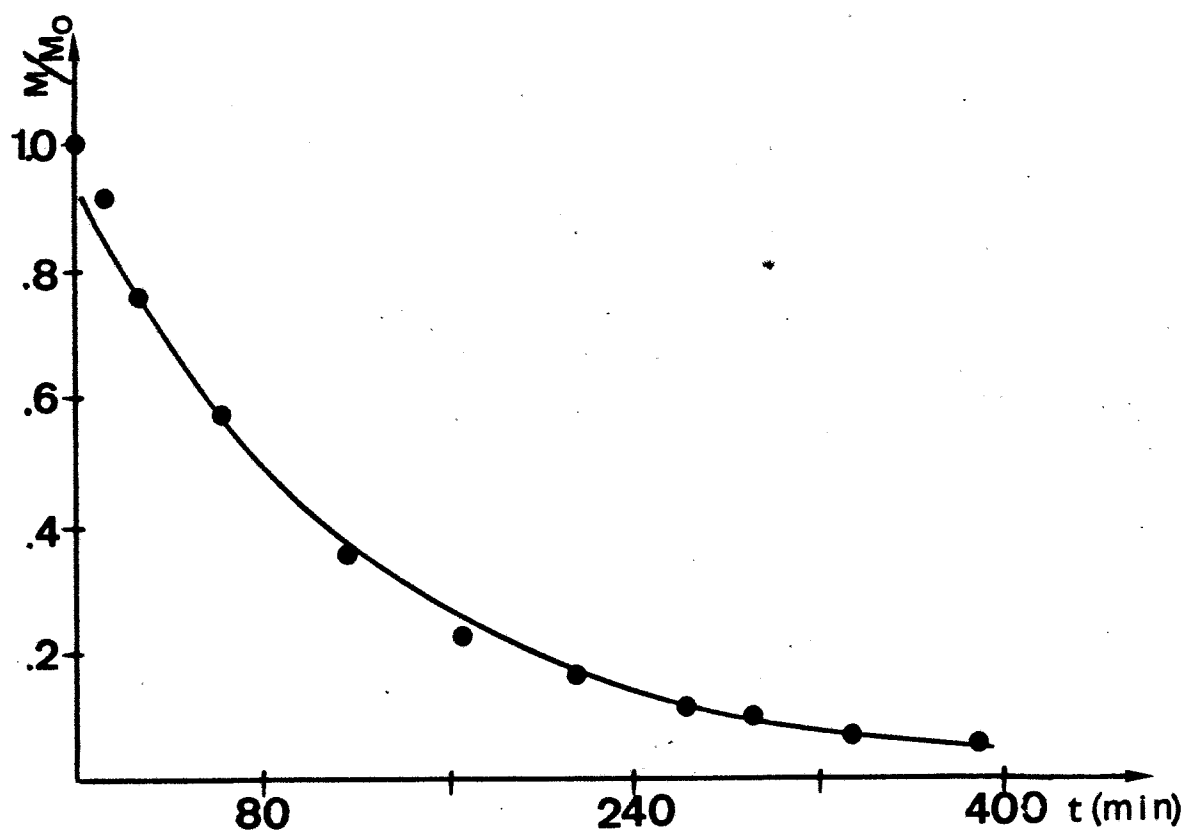


Fig. 6.1 - Teste de homogeneidade da zona de fermentação do reactor
(sem células)

● - valores experimentais

Podemos pois concluir que, nestas condições, a fase líquida é homogénea e, como tal, o reactor é perfeitamente agitado.

Usando o mesmo método foi feita uma análise idêntica para o sistema global sem bomba de recirculação (Fig. 6.2) e, como era previsível, existe um nítido afastamento do reactor perfeitamente agitado, pelo que, decidimos introduzir uma bomba de recirculação no sistema.

6.2 Caracterização do arejamento do meio - determinação do K_{1a}

Como anteriormente afirmado (Cap. 2), o fornecimento de pequenas quantidades de oxigénio tem uma acção positiva na actividade celular em culturas semi-anaeróbias.

Sendo assim, analisamos o coeficiente global de transferência de oxigénio (K_{1a}) para os caudais de arejamento utilizados.

O coeficiente de transferência foi determinado quimicamente, medindo a velocidade de oxidação do sulfito a sulfato, por acção do oxigénio dissolvido, na presença de um catalizador de cobre, conforme descrito por Costilow R.N. (1981).

A evolução com o tempo (t) da concentração de oxigénio transferido para a fase líquida (O_2) é expressa pela equação

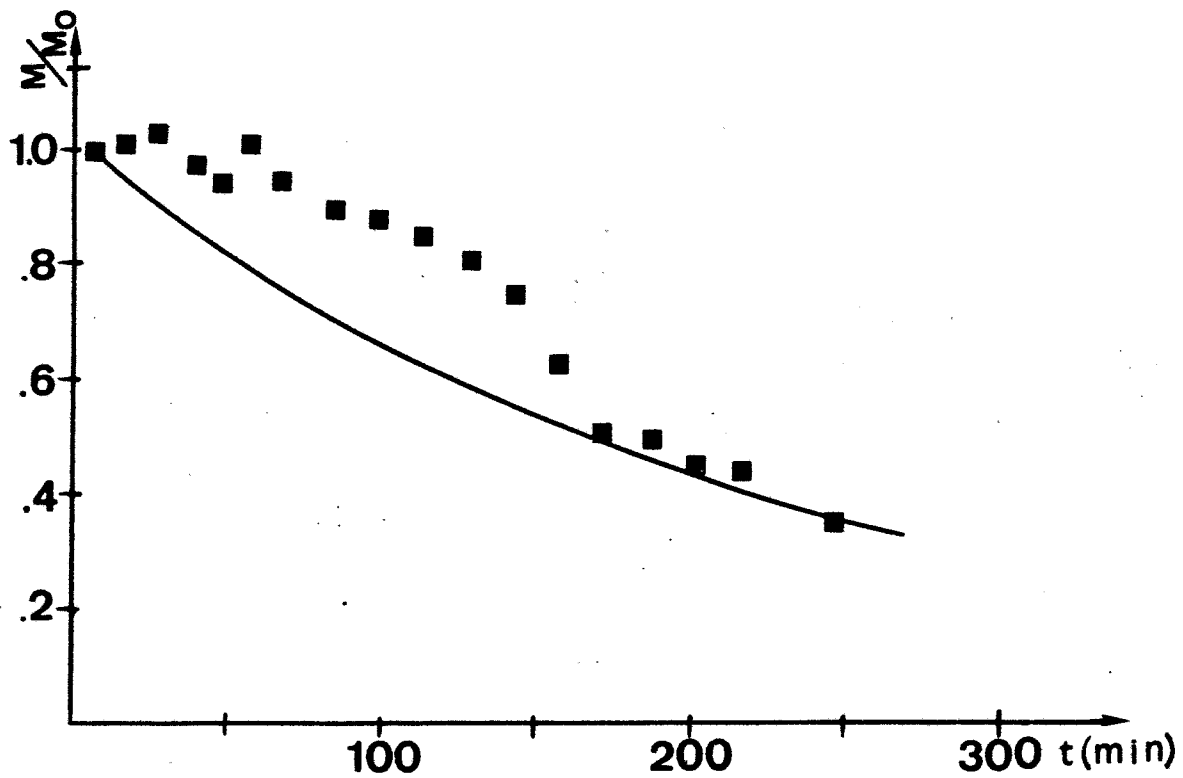


Fig. 6.2 - Teste de homogeneidade do reactor global
(sem células)

■ - valores experimentais

$$\frac{d O_2}{dt} = K_{1a} (O_2^* - O_2) \quad (6.2)$$

em que O_2^* é a concentração de saturação em oxigénio da fase líquida e O_2 é a concentração do oxigénio dissolvido na fase líquida.

Considerando que, em cada instante, a concentração de oxigénio dissolvido na fase líquida é nula (reação de oxidação é imediata), o K_{1a} obtém-se a partir do declive da função $O_2=f(t)$ (Fig. 6.3).

Nas nossas condições de trabalho, para um débito de arejamento de 0.1 v.v.m, o K_{1a} obtido foi 2.04 h^{-1} e para um débito de 0.3 v.v.m obtivemos 3.09 h^{-1} . Como, para os sistemas arejados, os valores de K_{1a} são da ordem das centenas podemos, pois, considerar o nosso reactor como microarejado.

6.3 Caracterização global dos fermentadores de floculação

Após a indução da floculação, decidimos analisar o sistema em função de um conjunto de parâmetros que nos permitiram um melhor conhecimento do comportamento global dos fermentadores de floculação.

Num primeiro conjunto de ensaios, analisamos a resposta do fermentador, em termos de concentração de biomassa e produção de etanol, a aumentos sucessivos da taxa de diluição para diferentes concentrações de substrato na alimentação.

Na fase seguinte, tentamos caracterizar o comportamento

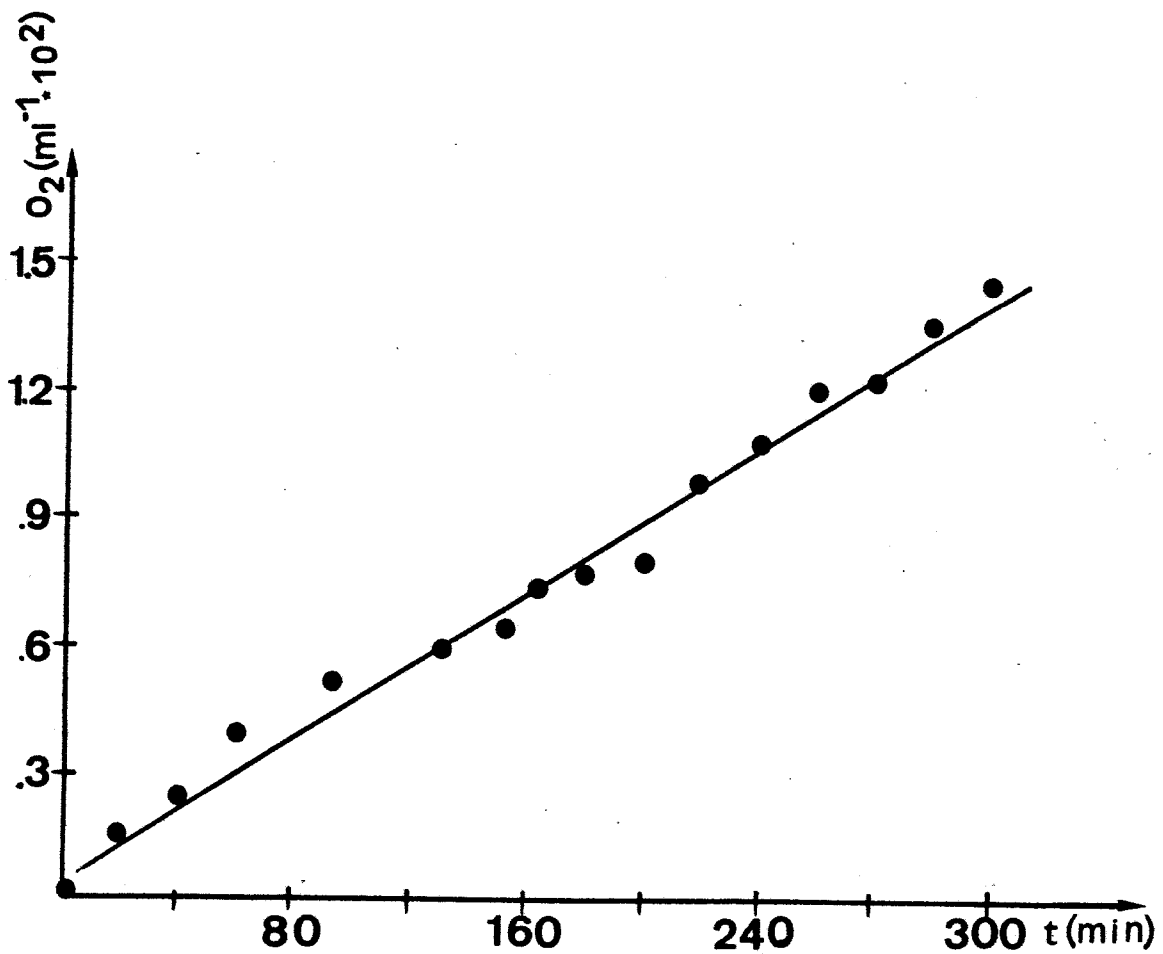


Fig. 6.3 - Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio (K_{La}) — evolução da concentração de oxigénio transferido com o tempo, para um débito de arejamento 0.3 v.v.m

cinético do sistema em estado transitório para uma concentração de substrato na alimentação de aproximadamente 60 g/l e para várias taxas de diluição.

Para cada conjunto de experiências anteriormente descritas, mantivemos constante a taxa de recirculação.

Assim sendo, os ensaios seguintes pretenderam definir a influência da taxa de recirculação nas cinéticas de produção e acumulação de biomassa e de produção de etanol relacionando-as com o tamanho dos flocos formados.

Também foi determinada a velocidade de retenção de cálcio para duas taxas de recirculação.

Na última parte deste capítulo é feita a descrição de um método que permite determinar as limitações difusionais em leveduras floculantes.

6.3.1. Resposta do sistema a aumentos sucessivos da taxa de diluição

Nas Figs. 6.4, 6.5 e 6.6 está representada a evolução das concentrações de biomassa e lactose no fermentador e no efluente e de etanol no fermentador para concentrações de substrato na alimentação iguais a, respectivamente, 57.7 g/l, 76 g/l e 93.8 g/l, mantendo a taxa de recirculação constante e igual a 11550 cm³/h. As taxas de

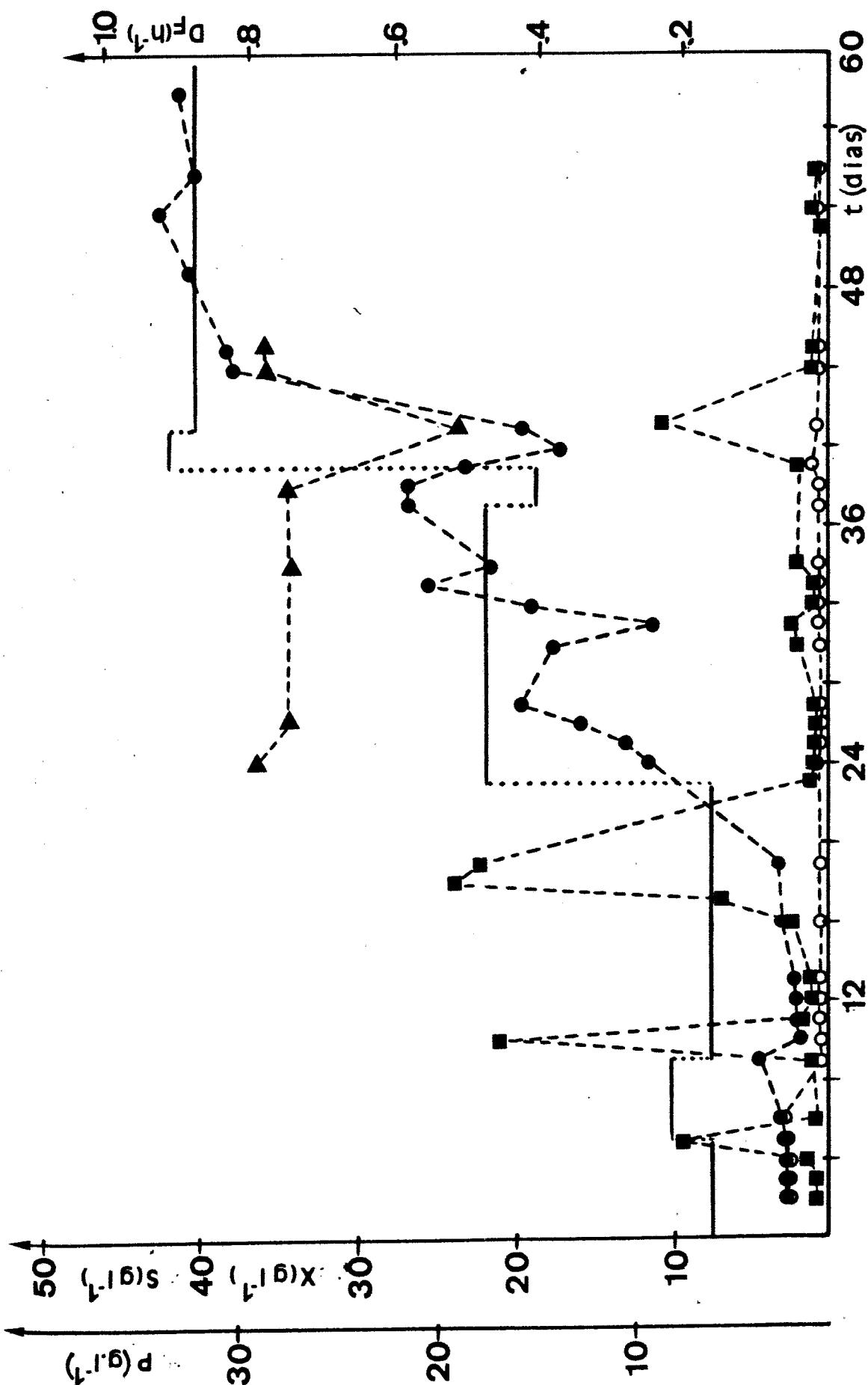


Fig. 6.4 - Evolução com o tempo das diferentes variáveis de fermentação para uma concentração de substrato na alimentação de 57.7 g/l

- concentração de biomassa no fermentador (Zona I) (g/l), ○ no efluente (g/l);
- concentração de lactose (g/l); ▲ concentração de etanol (g/l)

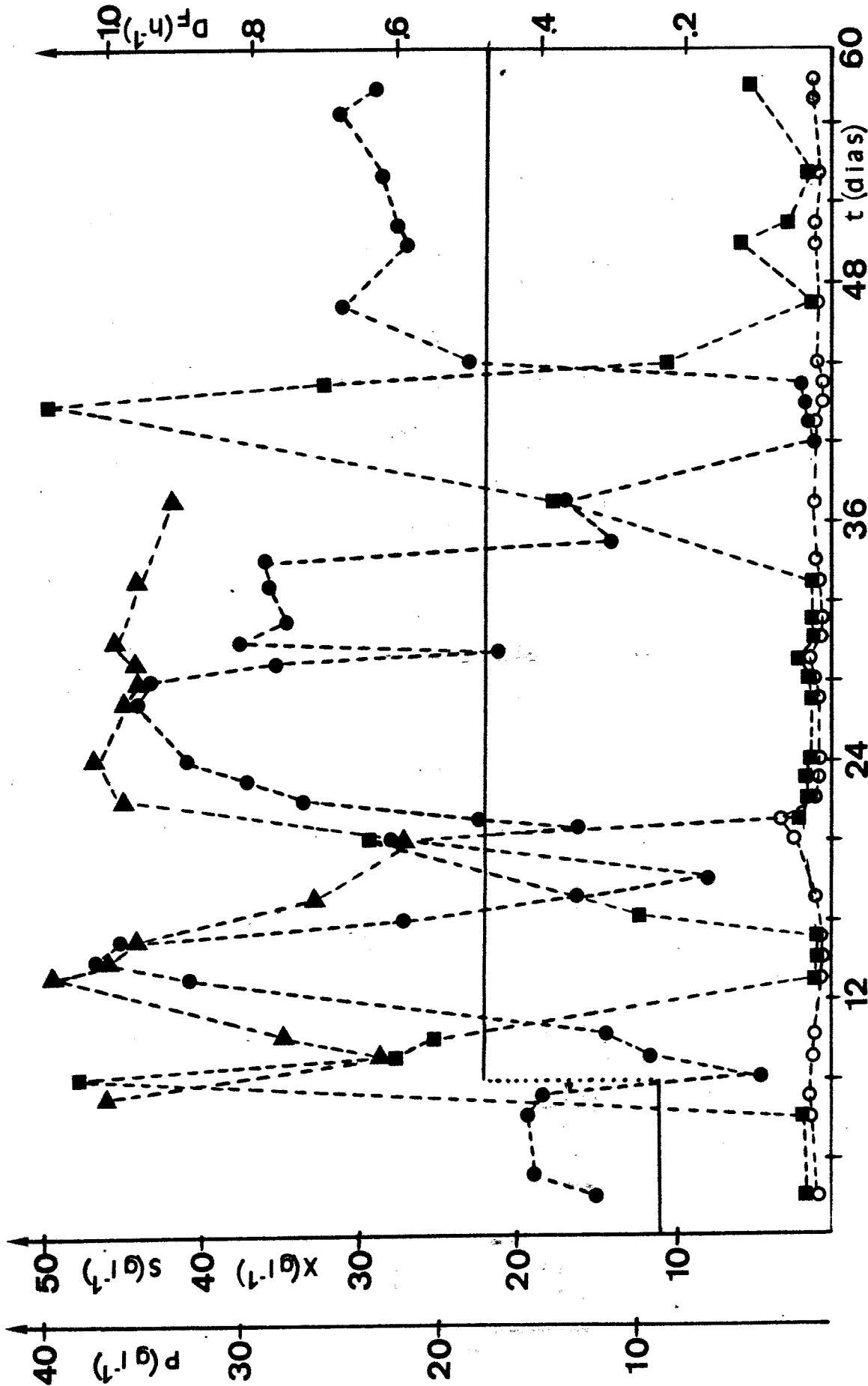


Fig. 6.5 - Evolução com o tempo das diferentes variáveis de fermentação

para uma concentração de substrato na alimentação de 76.0 g/l

$\bullet$ concentração de biomassa no fermentador (Zona I) (g/l), $\circ$ no efluente (g/l);

$\blacksquare$ concentração de lactose (g/l); $\blacktriangle$ concentração de etanol (g/l)

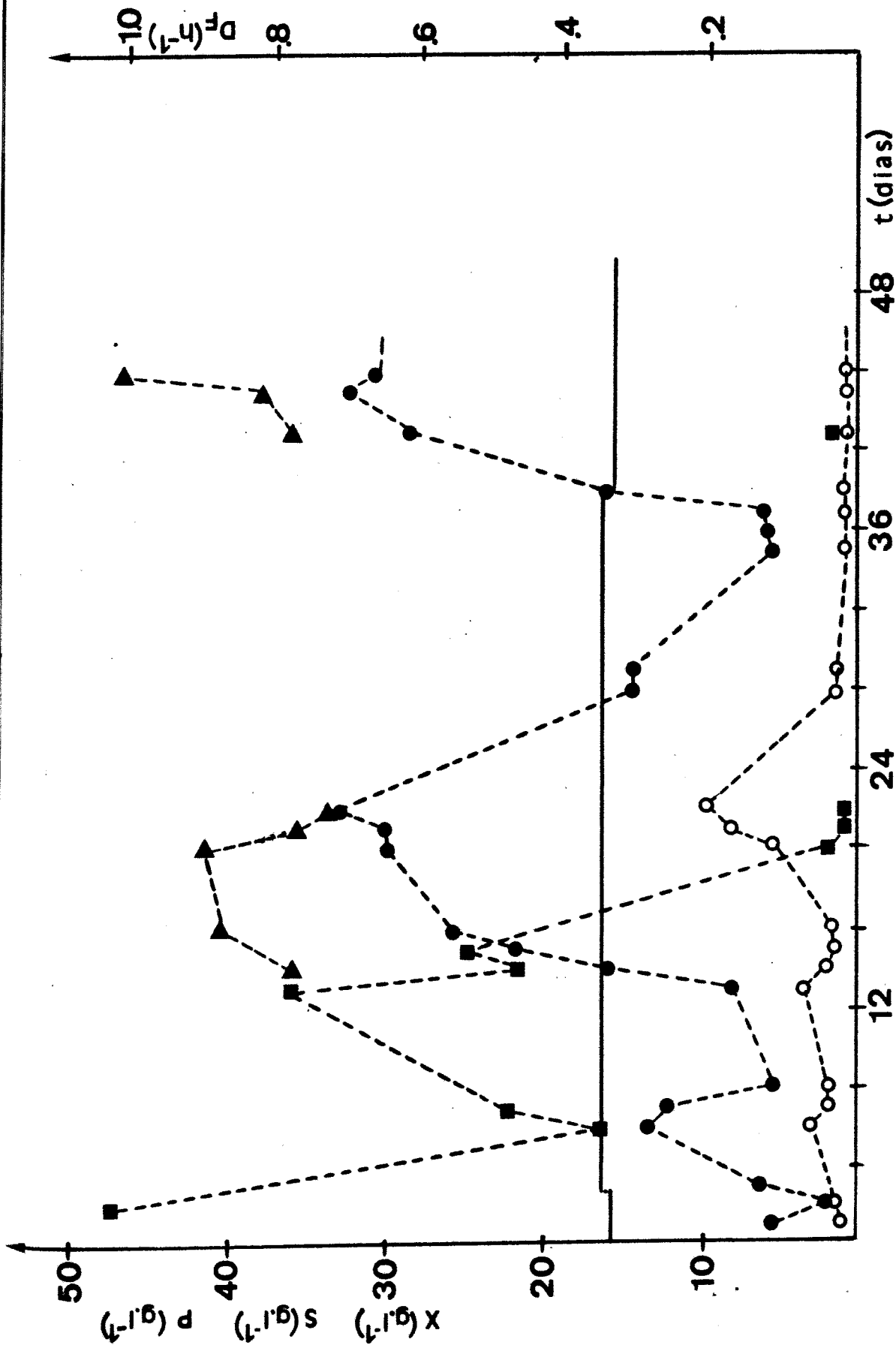


Fig. 6.6 - Evolução com o tempo das diferentes variáveis de fermentação

para uma concentração de substrato na alimentação de 93.8 g/l

● concentração de biomassa no fermentador (Zona I) (g/l), ○ no efluente (g/l);

■ concentração de lactose (g/l); ▲ concentração de etanol (g/l)

diluição referidas ao volume reaccional (D_f) variam entre 0.209 h^{-1} e 0.848 h^{-1} .

6.3.1.1. Análise preliminar

Deste conjunto de resultados podemos, em primeira análise, concluir que:

- a igualdade das concentrações de lactose no interior da zona I e no efluente comprova que a reacção ocorre só na coluna de fermentação. O sistema de separação funciona só como sistema de separação.

- o sistema é altamente instável para as concentrações de substrato mais elevados (93.8 g/l e 76 g/l) na gama de taxas de diluição testadas. De qualquer modo, também se verifica que essa instabilidade existe, embora menos frequentemente, para $S_0 = 57.2 \text{ g/l}$. Este facto deve estar relacionado com o desenho da zona de separação pois verificamos que para as maiores concentrações de substrato e taxas de diluição há, periodicamente, libertação de CO_2 do sedimentador que, ao ser expulso do sistema tem um efeito de sifão e arrasta grande parte do material contido no fermentador. O CO_2 libertado encontra-se retido no interior da biomassa que se acumula no sedimentador, quando se trabalha com concentrações elevadas. Este facto justifica a necessidade de serem feitas purgas periódicas.

- podemos também concluir da não existência de um estado

estacionário pois verificamos que existem sempre pequenas oscilações na concentração de biomassa no interior do fermentador a que correspondem oscilações no efluente.

- a concentração da biomassa no efluente para $S_0 = 57.2$ g/l e $S_0 = 76$ g/l manteve-se sempre inferior a 1.5 g/l e é mínima para os instantes correspondentes ao esgotamento inicial do substrato.

- o rendimento de conversão da lactose em etanol é sempre superior a 90%.

- verifica-se, para cada taxa de diluição, que há um consumo total de lactose antes de ser atingida a concentração máxima de biomassa no interior do fermentador, o que indica uma posterior diminuição dos parâmetros específicos de consumo.

- o reactor de floculação manteve-se em funcionamento por um período superior a 2 anos sem que tenha havido eliminação da capacidade floculante da levedura K. marxianus.

Um aspecto importante a referir é que, embora com pouca frequência, foram detectadas contaminações bacterianas que eram eliminadas, facilmente, por abaixamento do pH até 2.5 e por adição de antibióticos bactericidas.

6.3.1.2. Influência da taxa de diluição e da concentração em substrato na alimentação na concentração em biomassa no fermentador

No que se refere à produção de biomassa é possível estabelecer uma relação entre a concentração máxima de biomassa no interior do fermentador - X_m e a taxa de diluição - D_F , utilizando os elementos representados na Tab.6.1 e extraídos dos ensaios anteriormente descritos.

TAB. 6.1 - Variação de concentração máxima de biomassa no fermentador com a concentração de substrato na alimentação e com a taxa de diluição.

S_0 (g/l)	D_F (h^{-1})	X_m (g/l)
57.2	0.210	11.41
	0.460	25.34
	0.848	45.52
76.0	0.223	19.34
	0.458	46.80
93.8	0.339	32.44

As relações obtidas, representadas na Fig.6.7, foram

para $S_0 = 57.2$ g/l

$$X_m = 0.169 + 53.75 D_F \quad (6.3)$$

e para $S_0 = 76$ g/l

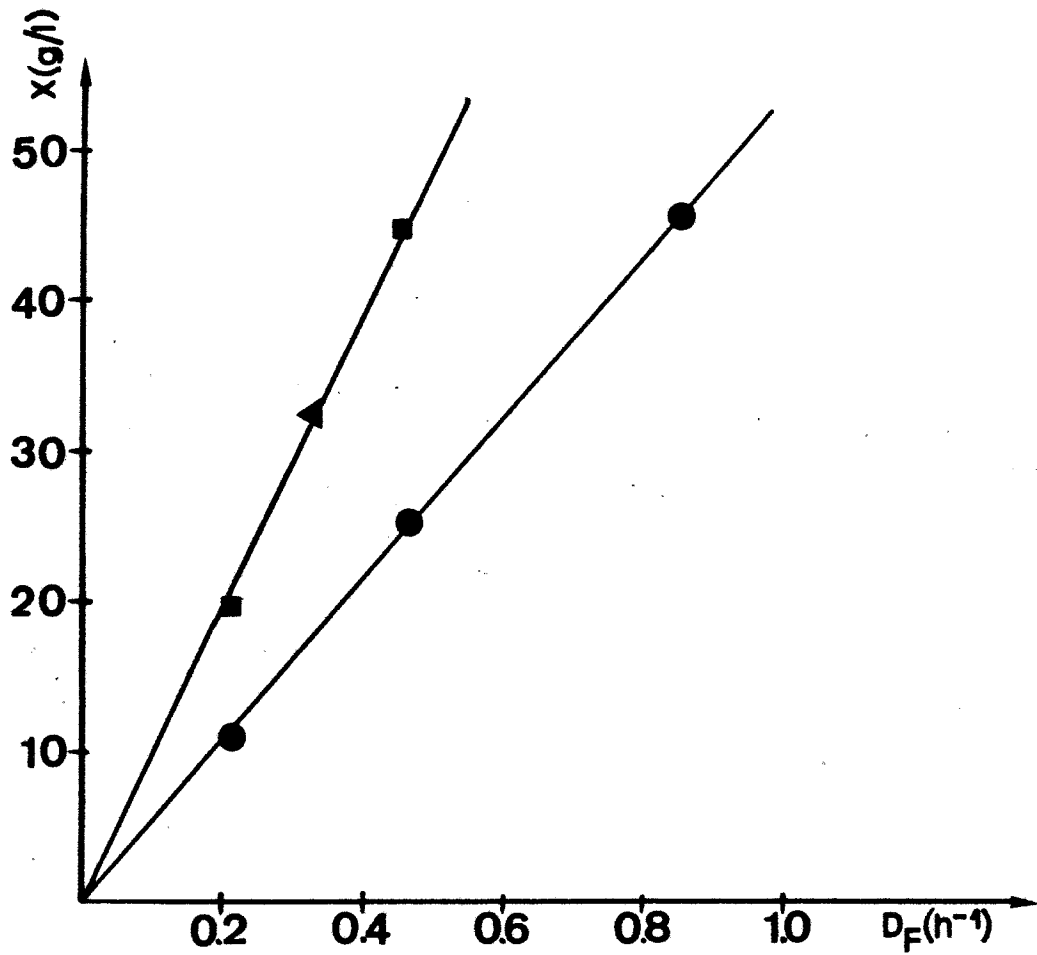


Fig. 6.7 - Variação de concentração máxima de biomassa no fermentador com a concentração de substrato na alimentação e com a taxa de diluição

● $S_0 = 57.7$ g/l; ■ $S_0 = 76.0$ g/l; ▲ $S_0 = 93.8$ g/l

$$X_m = - 1.179 + 102.31 D_F \quad (6.4)$$

Para $S_0 = 93.2$ g/l e atendendo à instabilidade do sistema não podemos confirmar que $X = 32.44$ g/l corresponde à concentração máxima de biomassa, pelo que não estabelecemos qualquer tipo de relação.

Combinando as eq.6.3 e 6.4 foi possível estabelecer a relação

$$X_m = (- 0.072S_0 + 4.270) + (2.58S_0 - 94.00) D_F \quad (6.5)$$

que define a concentração máxima de biomassa no fermentador para as taxas de diluição e concentrações de substrato consideradas.

Em relação aos valores de concentração máxima de biomassa no fermentador deve-se referir que o rendimento de conversão de lactose em biomassa $\Delta X / \Delta S$ é independente da taxa de diluição e cerca de 1.7 vezes mais elevado para a concentração de lactose igual a 76 g/l do que para $S_0 = 57.2$ g/l.

Se admitirmos que existe um gradiente de concentração de lactose no interior dos flocos individuais - processo controlado por difusão, é possível admitir a existência de uma concentração crítica de flocos no interior do fermentador, concentração essa que é mais elevada para a maior concentração de lactose na alimentação que permite uma maior penetração de substrato. A esta concentração crítica de biomassa corresponde a lise das células no interior dos flocos e a correspondente libertação para a corrente efluente.

6.3.1.3. Influência da taxa de diluição e da concentração de substrato na alimentação na produtividade em etanol

Como seria de esperar, lembrando que o rendimento de conversão da lactose em etanol se mantém aproximadamente constante, a produtividade em etanol - P_F , expressa em g/l.h (Tab.6.2) varia linearmente com a taxa de diluição, para as diferentes concentrações de substrato na alimentação conforme se representa na Fig.6.8.

Tab.6.2 - Variação da produtividade de etanol com a concentração de substrato na alimentação e com a taxa de diluição

S_0 (g/l)	D_F (h^{-1})	X_m (g/l)
57.2	0.210	6.04
	0.460	12.63
	0.848	24.42
76.0	0.223	7.73
	0.458	16.56
93.2	0.339	15.18

6.3.1.4. Influência da taxa de diluição e da concentração de substrato na alimentação na taxa específica de produção de etanol

Na Tab.6.3 representamos a taxa específica da produção de etanol - v (g/g.h) correspondente à concentração máxima de biomassa

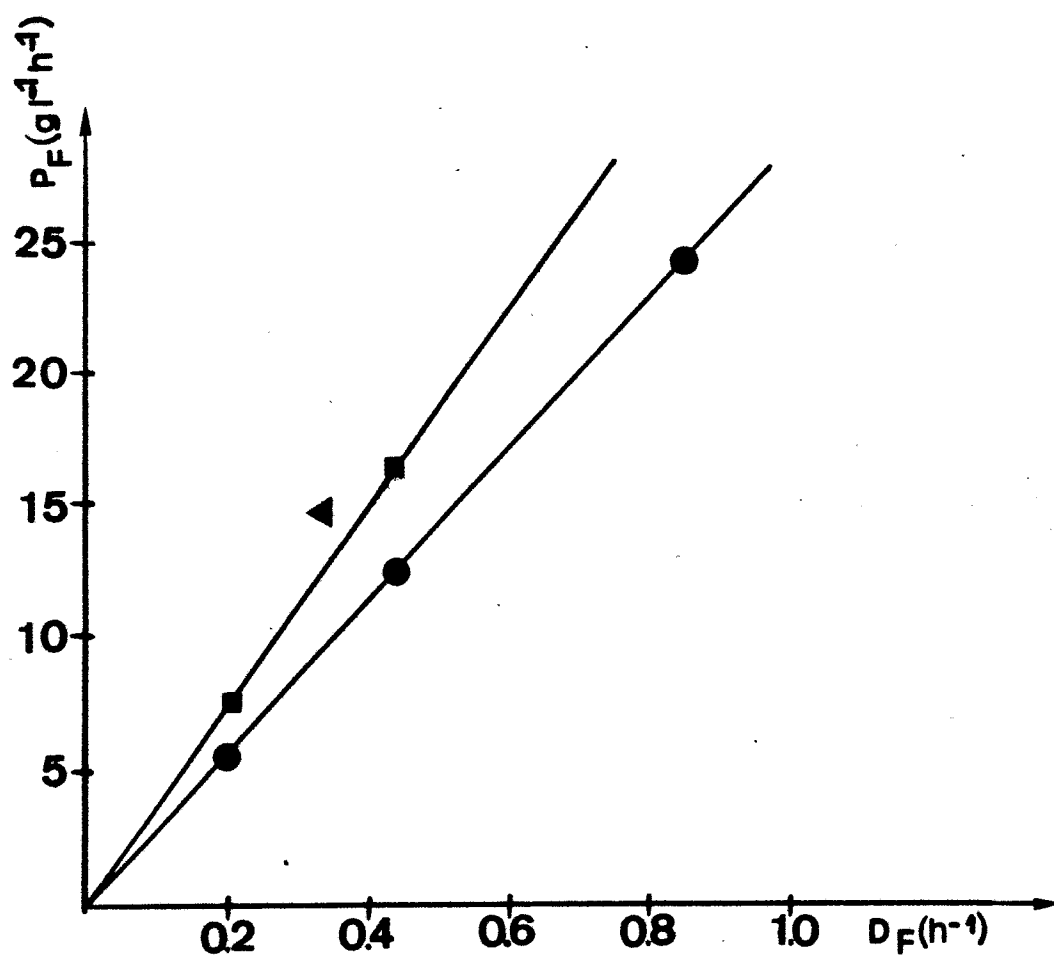


Fig. 6.8 - Variação de produtividade em etanol com a concentração de substrato na alimentação e com a taxa de diluição

● $S_0 = 57.7$ g/l; ■ $S_0 = 76.0$ g/l; ◄ $S_0 = 93.8$ g/l

TAB.6.3 - Variação da taxa específica de produção de etanol com a concentração de substrato na alimentação e com a taxa de diluição

S_0 (g/l)	D_f (h^{-1})	v (g/g.h)
57.2	0.210	0.529
	0.460	0.499
	0.848	0.527
76.0	0.223	0.424
	0.458	0.361

Considerando que, para as concentrações máximas de biomassa, a taxa de diluição para a mesma concentração de etanol não afecta a taxa específica de produção e que a inibição pelo produto segue o modelo de Aiba (1968) com a constante de inibição determinada nos ensaios em descontínuo para a estirpe não floculante, calculamos uma nova taxa específica máxima de produção, obtendo o seguinte modelo

$$v = 2.215 \exp (-.049 P) \quad (6.6)$$

Comparando estes parâmetros com os calculados usando a cinética determinada pelas experiências em descontínuo, concluímos que a lavagem produzida pela circulação do meio de cultura e pela recirculação existente no sistema, melhoram a produção específica de etanol. Este facto será confirmado posteriormente pela análise dos parâmetros obtidos em estado transitório.

6.3.1.5. Influência da taxa de diluição e da concentração de substrato na alimentação na concentração de biomassa acumulada

A análise da oscilação de biomassa no efluente, após se ter atingido uma concentração residual de lactose, permite ter uma medida de estabilidade do fermentador de floculação.

Nas Figs.6.9 e 6.10 está representada a biomassa na corrente de saída para as duas concentrações de lactose na alimentação. Como se verifica, para as condições correspondentes a uma maior actividade fermentativa - maior taxa de diluição e maior concentração de substrato na alimentação, é mais elevada a concentração de biomassa no efluente.

Os valores representados também sugerem que, para as maiores taxas de diluição, as oscilações são menos frequentes embora de maior amplitude, o que pode estar relacionado com o tempo necessário para se atingir a concentração máxima de biomassa no fermentador.

6.3.2. Caracterização do sistema de floculação em estado transitório

Neste conjunto de ensaios, fixamos a concentração de substrato na alimentação em 60 g/l, em todos os ensaios. Durante o tempo que decorreu até ao consumo completo do substrato, medimos a concentração de biomassa no fermentador e no efluente e a concentração de lactose. Não seguimos a evolução da concentração de etanol, pois como foi

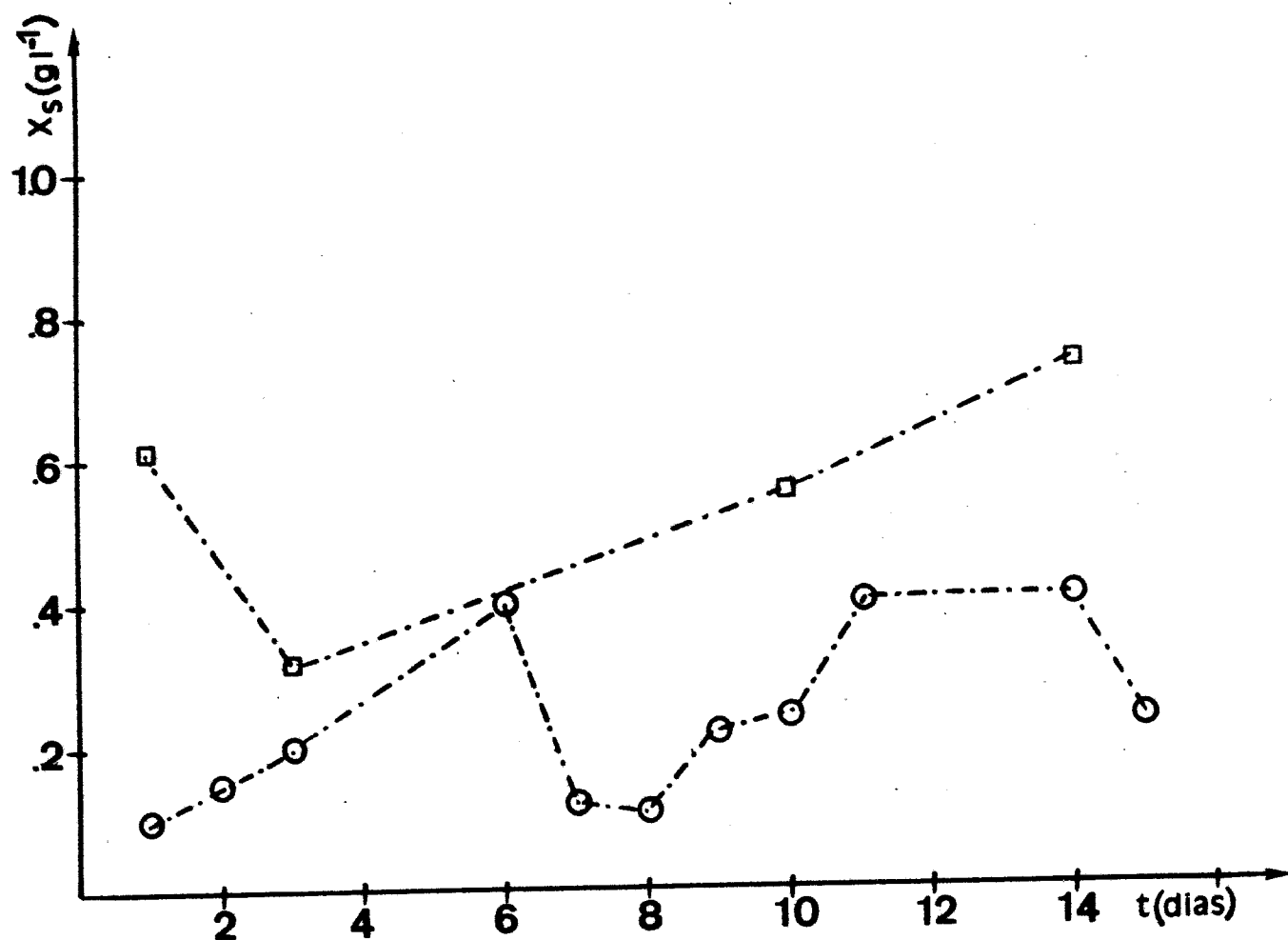


Fig. 6.9 - Evolução da concentração de biomassa no efluente para duas taxas de diluição e para uma concentração de substrato na alimentação de 57.6 g/l

○ $D_F = 0.460 \text{ h}^{-1}$

□ $D_F = 0.848 \text{ h}^{-1}$

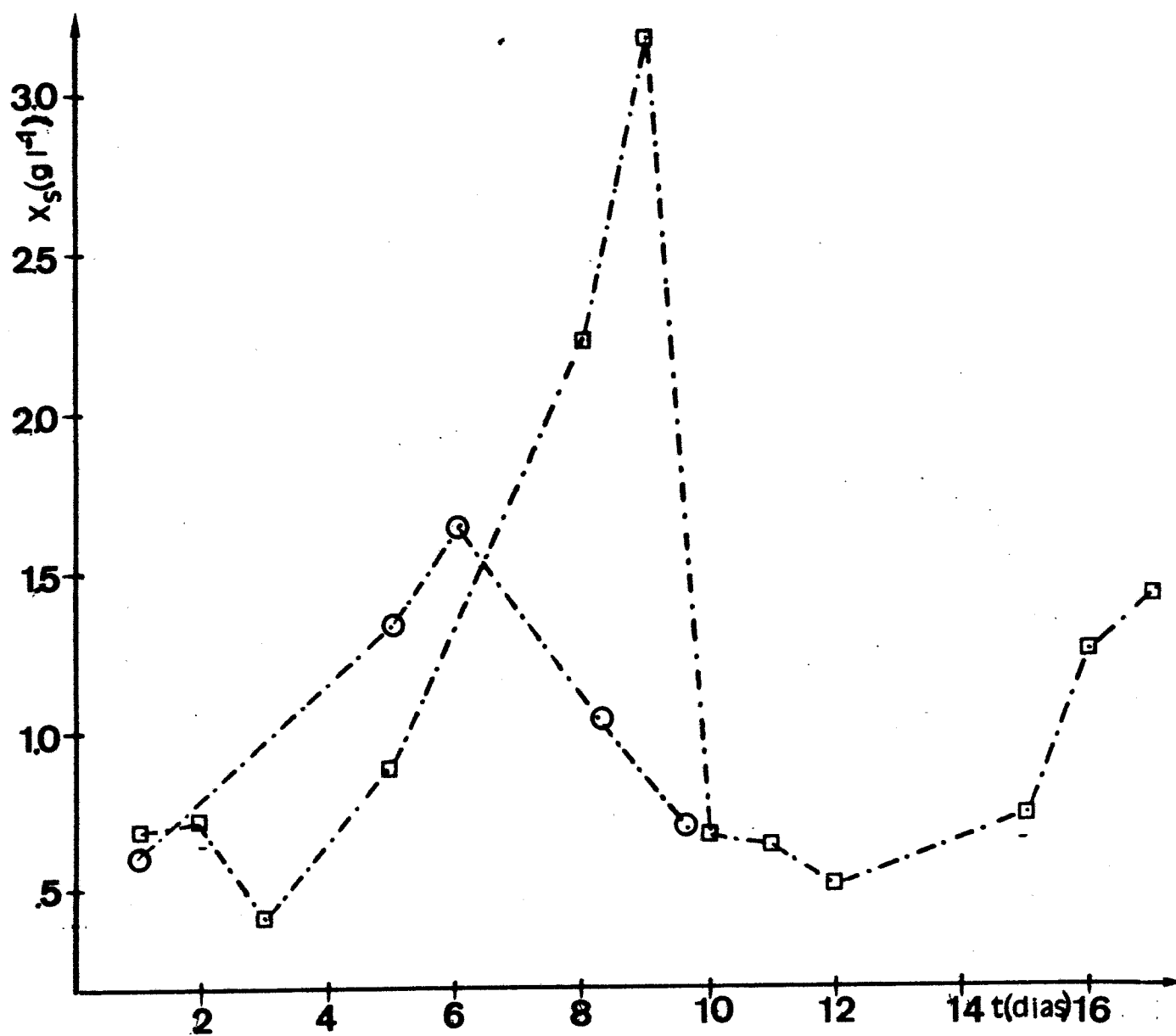


Fig. 6.10 - Evolução da concentração de biomassa no efluente para duas taxas de diluição e para uma concentração de substrato na alimentação de 76.0 g/l

○ $D_F = 0.212 \text{ h}^{-1}$

□ $D_F = 0.445 \text{ h}^{-1}$

anteriormente demonstrado, o rendimento de conversão de lactose em etanol manteve-se sempre constante e superior a 90%. A taxa de recirculação manteve-se constante e igual a $5800\text{cm}^3/\text{h}$ e utilizamos três taxas de diluição (D_F) diferentes: $.189\text{h}^{-1}$, $.424\text{h}^{-1}$ e $.635\text{h}^{-1}$.

Nas Figs. 6.11, 6.13 e 6.15 encontram-se representadas a variação de concentração de biomassa no fermentador (X_f) e no efluente (X_s) e da concentração de lactose (S_f) para as diferentes taxas de diluição e nas Figs. 6.12, 6.14 e 6.16 os respectivos parâmetros cinéticos - $\mu(\text{h}^{-1})$, $\mu_{ac}(\text{h}^{-1})$ e $-q_s(\text{g/g.h})$ calculados a partir das equações de balanço anteriormente descritas (Cap. 2).

6.3.2.1. Paragem da fermentação

A análise dos valores obtidos permite concluir que, para a taxa de diluição mais baixa há, antes de se atingir o consumo total do substrato, uma paragem do crescimento celular a que corresponde um aumento da concentração de biomassa no efluente e uma diminuição do consumo da lactose.

Este fenómeno repete-se, aliás de um modo idêntico ao descrito na secção anterior, numa fase de fermentação já após o consumo total de lactose.

Para as taxas de diluição mais elevadas, durante o arranque do sistema tais paragens não ocorrem embora, para $D_F = 0.635\text{h}^{-1}$, se tenha verificado uma eliminação substancial de células do sistema,

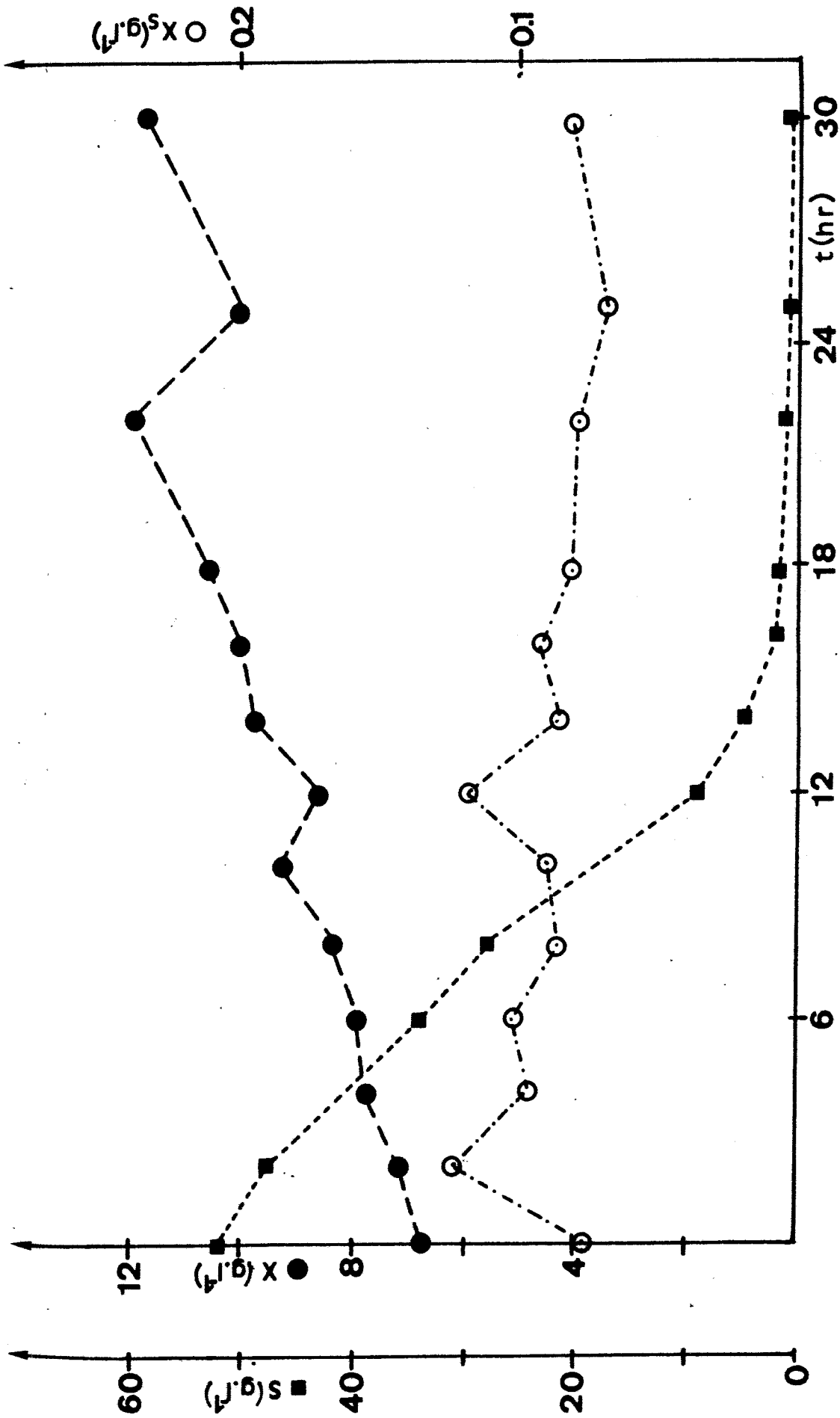


Fig.6.11 - Evolução das concentrações de biomassa no fermentador (X) e no efluente (X_S) e de lactose (S) durante o arranque do fermentador para uma taxa de diluição de 0.189 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 58.1 g/l

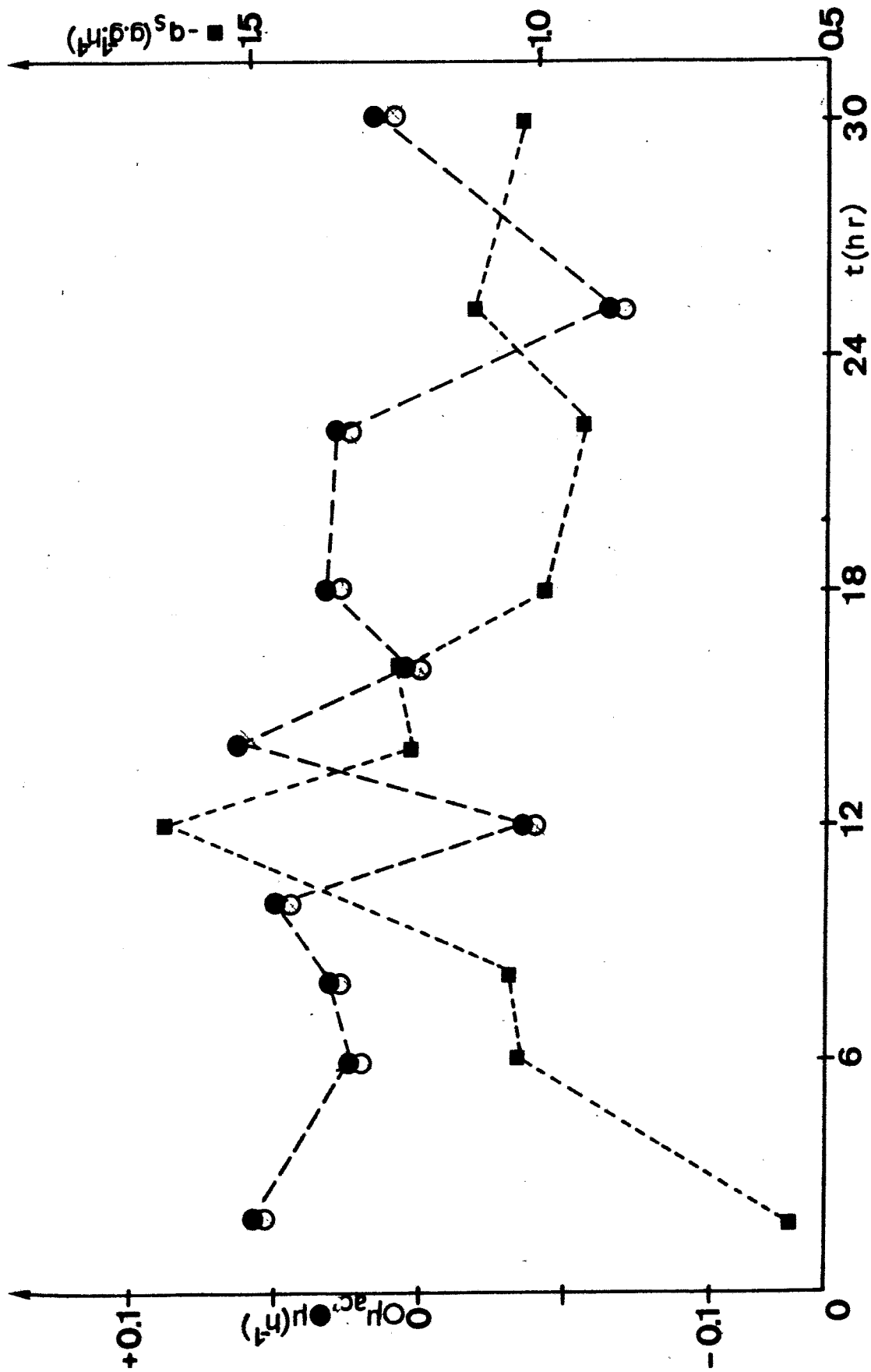


Fig. 6.12 -Evolução dos parâmetros cinéticos de produção (μ) e acumulação de biomassa (μ_{ac}) e consumo de lactose ($-q_s$) durante o arranque do fermentador para uma taxa de diluição de 0.189 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 58.1 g/l

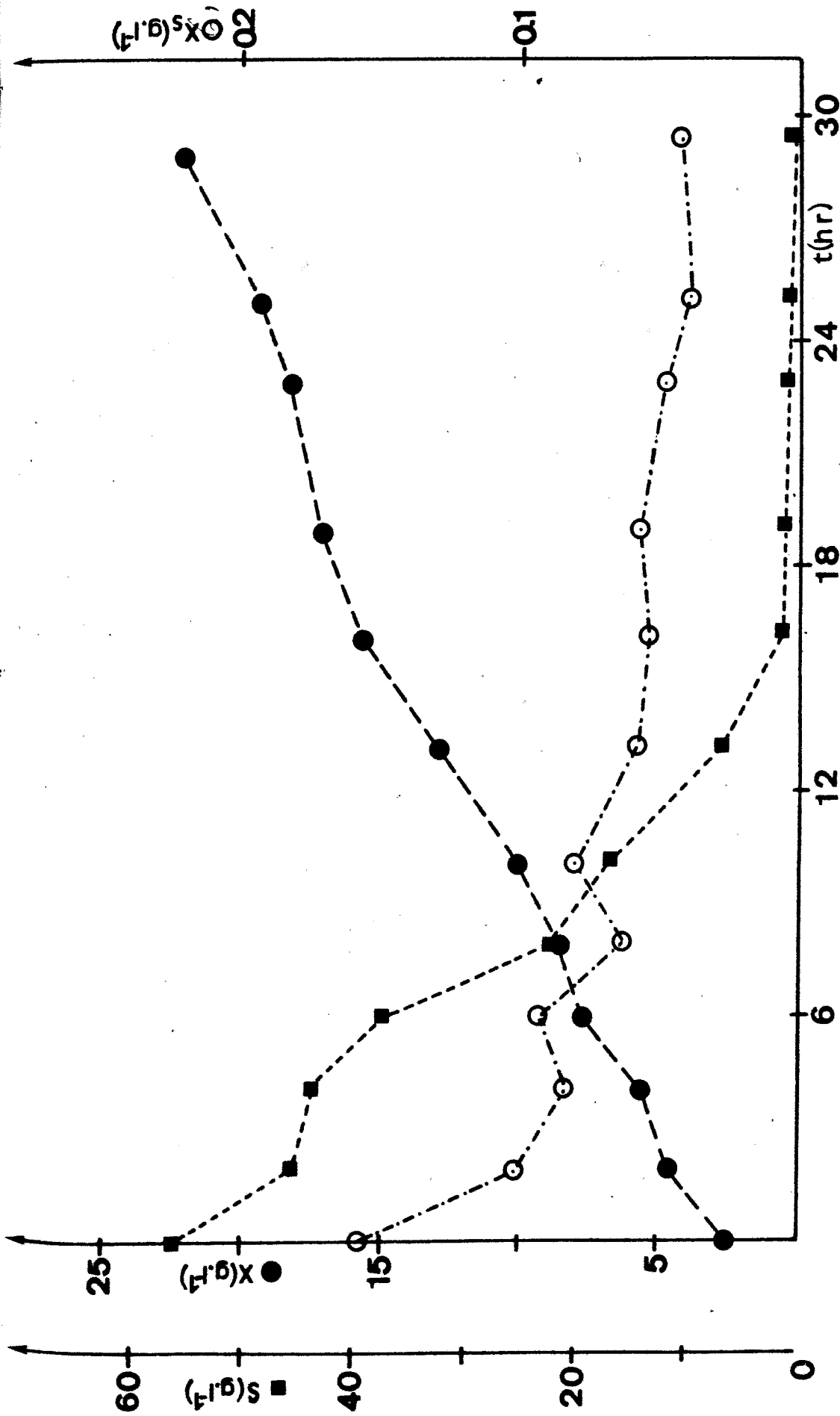


Fig.6.13 - Evolução das concentrações de biomassa no fermentador (X) e no efluente (X_s) e de lactose (S) durante o arranque do fermentador para uma taxa de diluição de 0.424 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 61.2 g/l

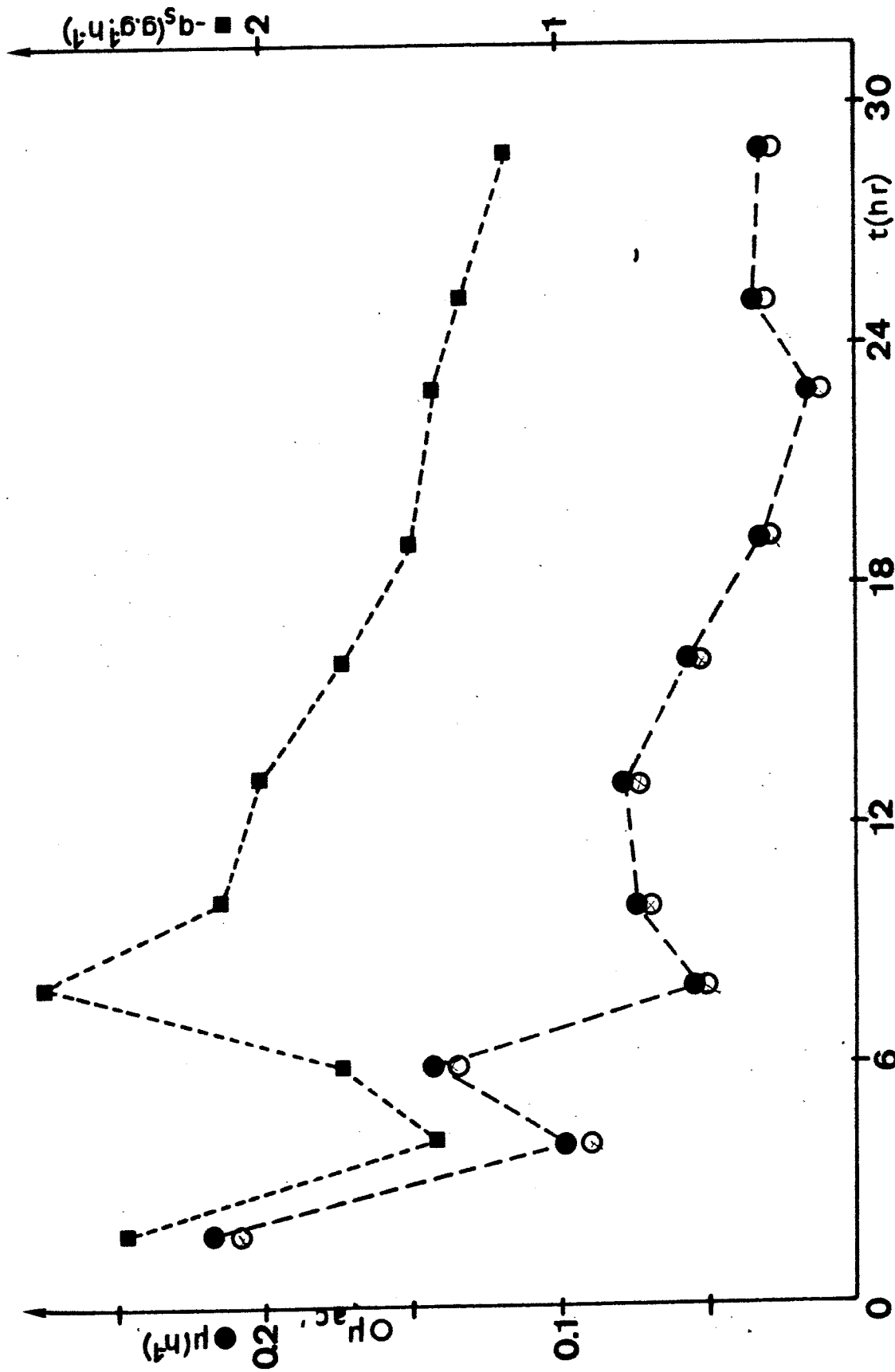


Fig. 6.14 - Evolução dos parâmetros cinéticos de produção (μ) e acumulação de biomassa (μ_{ac}) e consumo de lactose ($-q_s$) durante o arranque do fermentador para uma taxa de diluição de 0.424h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 61.2 g/l

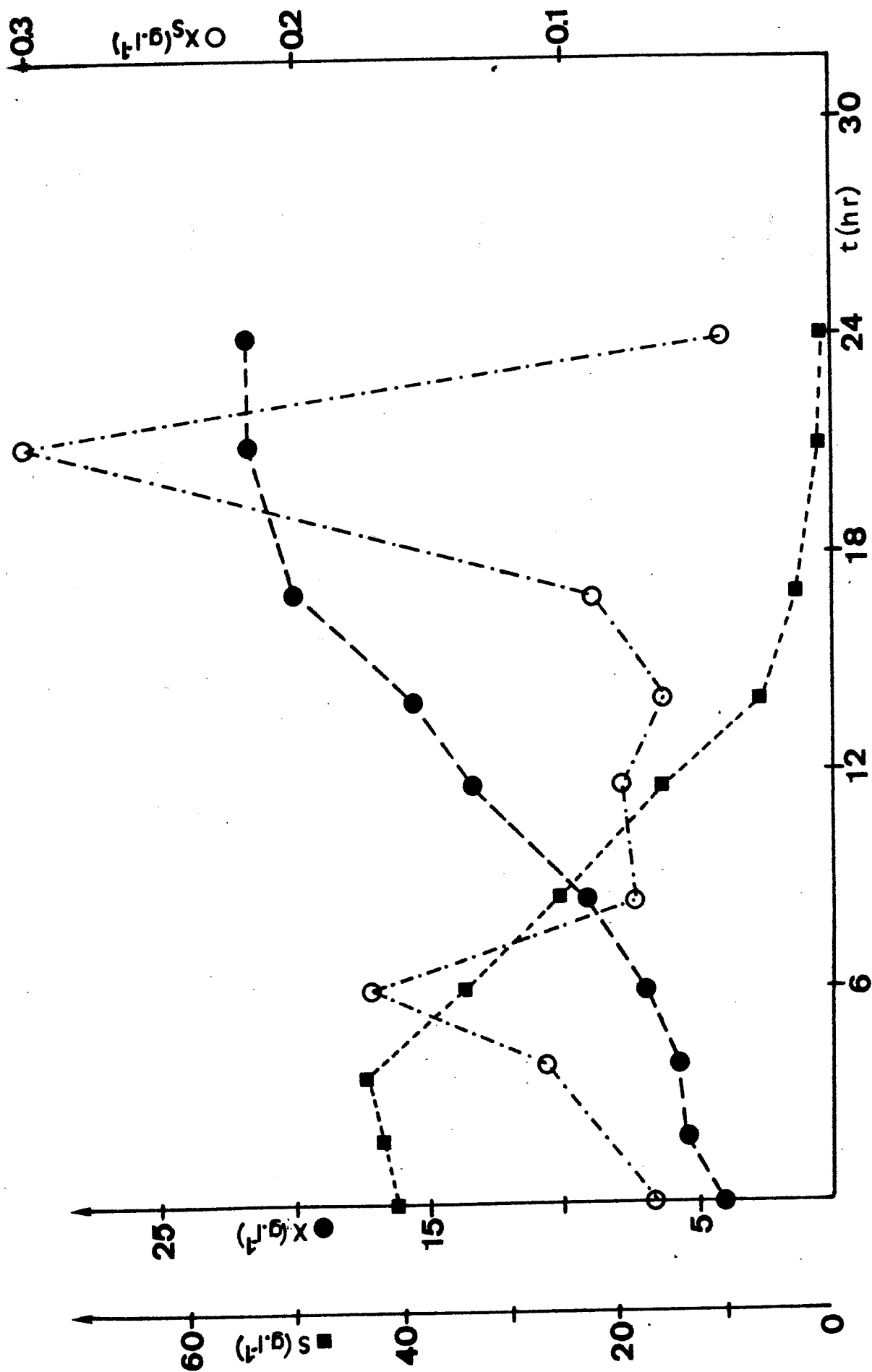


Fig. 6.15 - Evolução das concentrações de biomassa no fermentador

(X) e no efluente (X_S) e de lactose (S) durante o arranque do fermentador para uma taxa de diluição de 0.635 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação

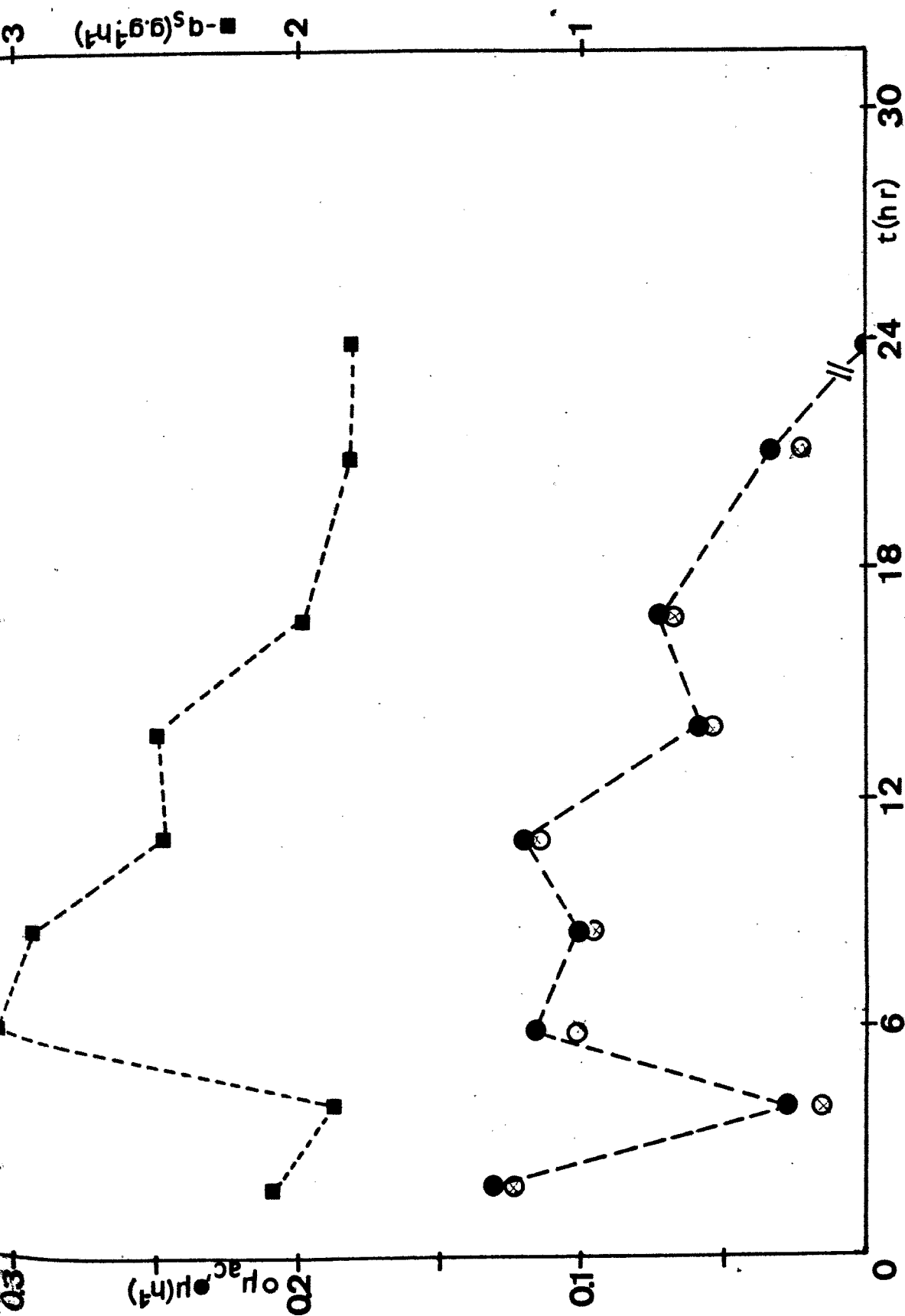


Fig. 6.16 - Evolução dos parâmetros cinéticos de produção (μ) e

acumulação de biomassa (μ_{ac}) e consumo de

lactose ($-q_s$) durante o arranque do fermentador para

uma taxa de diluição de 0.635 h^{-1} e uma concentração

de substrato na alimentação de 60.0 g/l

provavelmente devido ao aumento da actividade fermentativa.

6.3.2.2. Cinética de acumulação de biomassa

O aparecimento de células livres e como tal a lavagem de biomassa é resultante da interdependência existente entre a cinética de crescimento celular e a cinética de formação de flocos de leveduras. Verificamos que, para o caso da estirpe floculante utilizada e para as diferentes taxas de diluição, a taxa específica de acumulação de biomassa (μ_{ac}) representa sempre um valor superior a 90% da taxa específica de crescimento.

Na Tab.6.4 representamos os valores máximos das taxas específicas de produção da biomassa e consumo de lactose e a relação entre as velocidades específicas máximas de acumulação e de produção de biomassa.

Este conjunto de valores também se encontra representado na Figs. 6.17 e 6.18 e permite concluir que:

- o sistema tem um rendimento bastante elevado em termos de acumulação de biomassa e independente da taxa de diluição.

- as velocidades específicas máximas de acumulação e crescimento de biomassa aumentam com a taxa de diluição.

- a taxa específica de consumo de lactose apresenta, relativamente à taxa de diluição, um comportamento idêntico ao da taxa específica de crescimento.

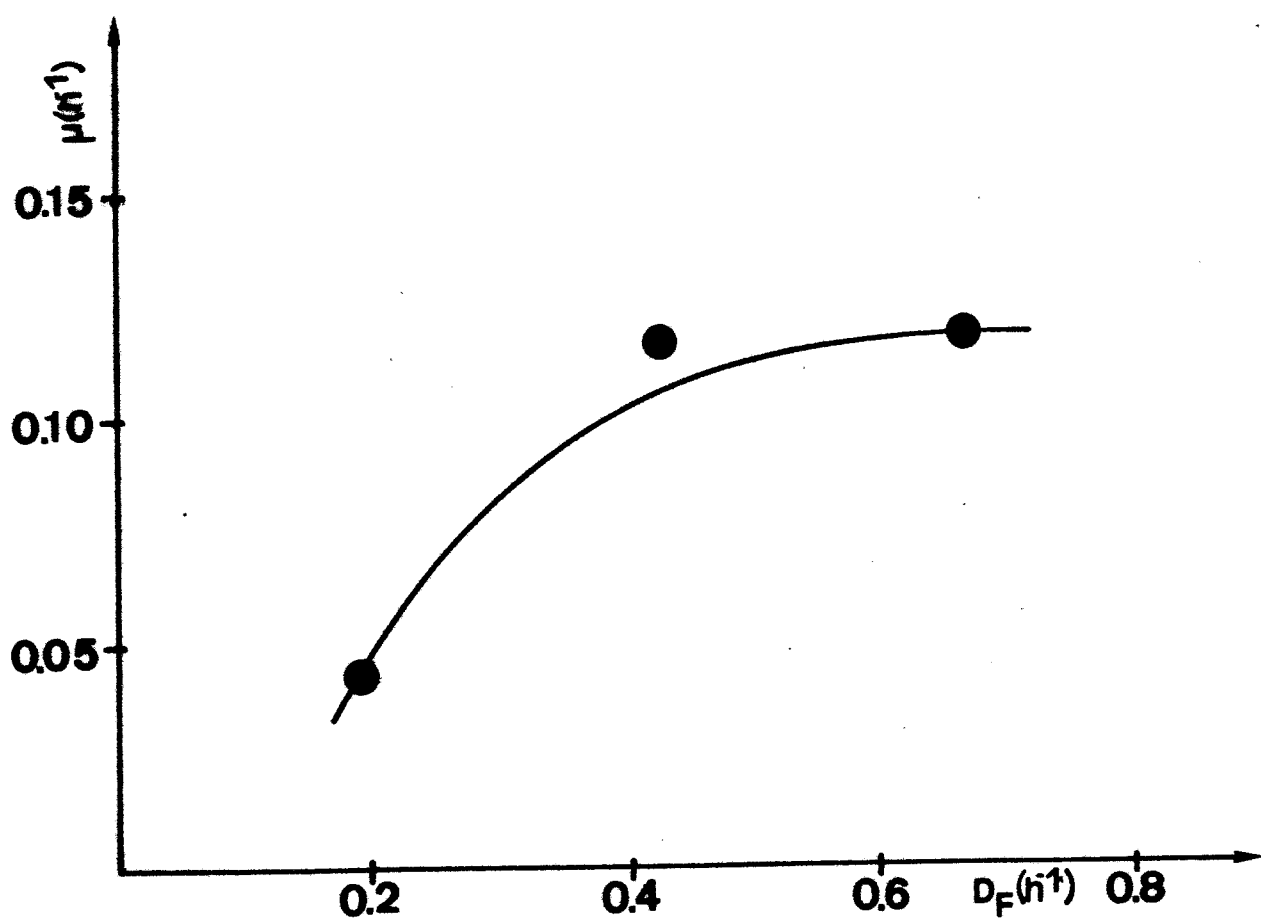


Fig. 6.17 - Variação de velocidade específica máxima de crescimento (μ) e acumulação de biomassa (μ_{ac}) com a taxa de diluição

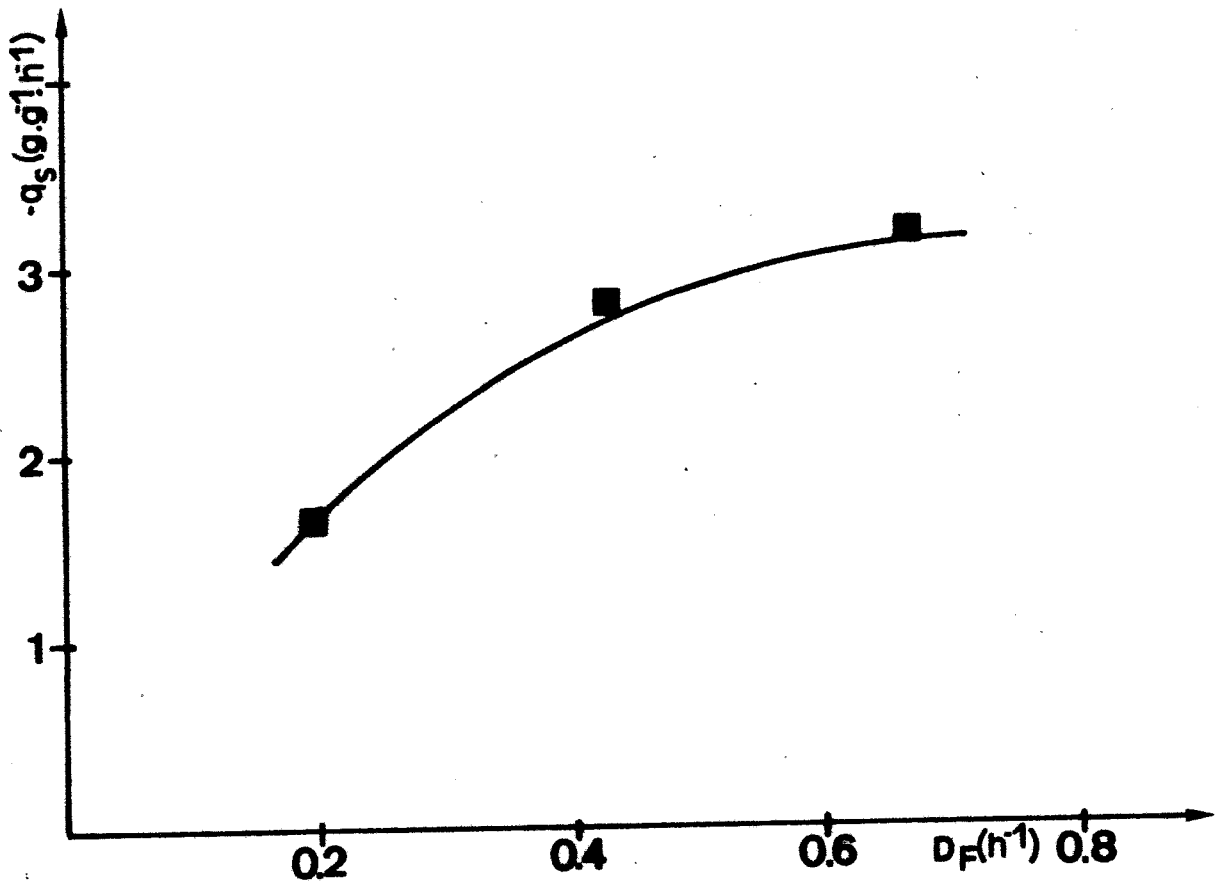


Fig. 6.18 - Variação da velocidade específica máxima de consumo de lactose com a taxa de diluição

Tab.6.4 - Influência da taxa de diluição nos parâmetros cinéticos e de acumulação de biomassa

$D_f (h^{-1})$	$\mu_{ac} (h^{-1})$	$\mu (h^{-1})$	$\mu_{ac}/\mu_{max} (\%)$	$-q_s (g/g.h)$
.189	.039	.042	92.9	1.64
.424	.085	.089	95.7	2.76
.635	.101	.109	92.7	3.08

6.3.2.3. Influência da taxa de diluição nos parâmetros cinéticos

Verificamos, ao longo de toda a análise do estado transitório que a actividade fermentativa é favorecida quando se utilizam taxas de diluição mais elevadas. A ocorrência de paragens na fermentação é eliminada e as velocidades específicas de crescimento de biomassa e consumo de lactose são melhoradas, embora não se verifique variação no tempo necessário para se atingir o consumo total da lactose.

Nas Figs. 6.19 e 6.20, demonstramos que, para cada taxa de diluição, a velocidade específica de consumo de substrato diminui com o aumento de concentração de biomassa e com a redução da concentração de lactose, sendo este efeito mais nítido para concentrações mais baixas de substrato. Verificamos que, para uma dada concentração de biomassa ou de lactose, o consumo específico de açúcar aumenta nitidamente com a taxa de diluição.

Resumindo, a renovação mais rápida do meio tem as seguintes

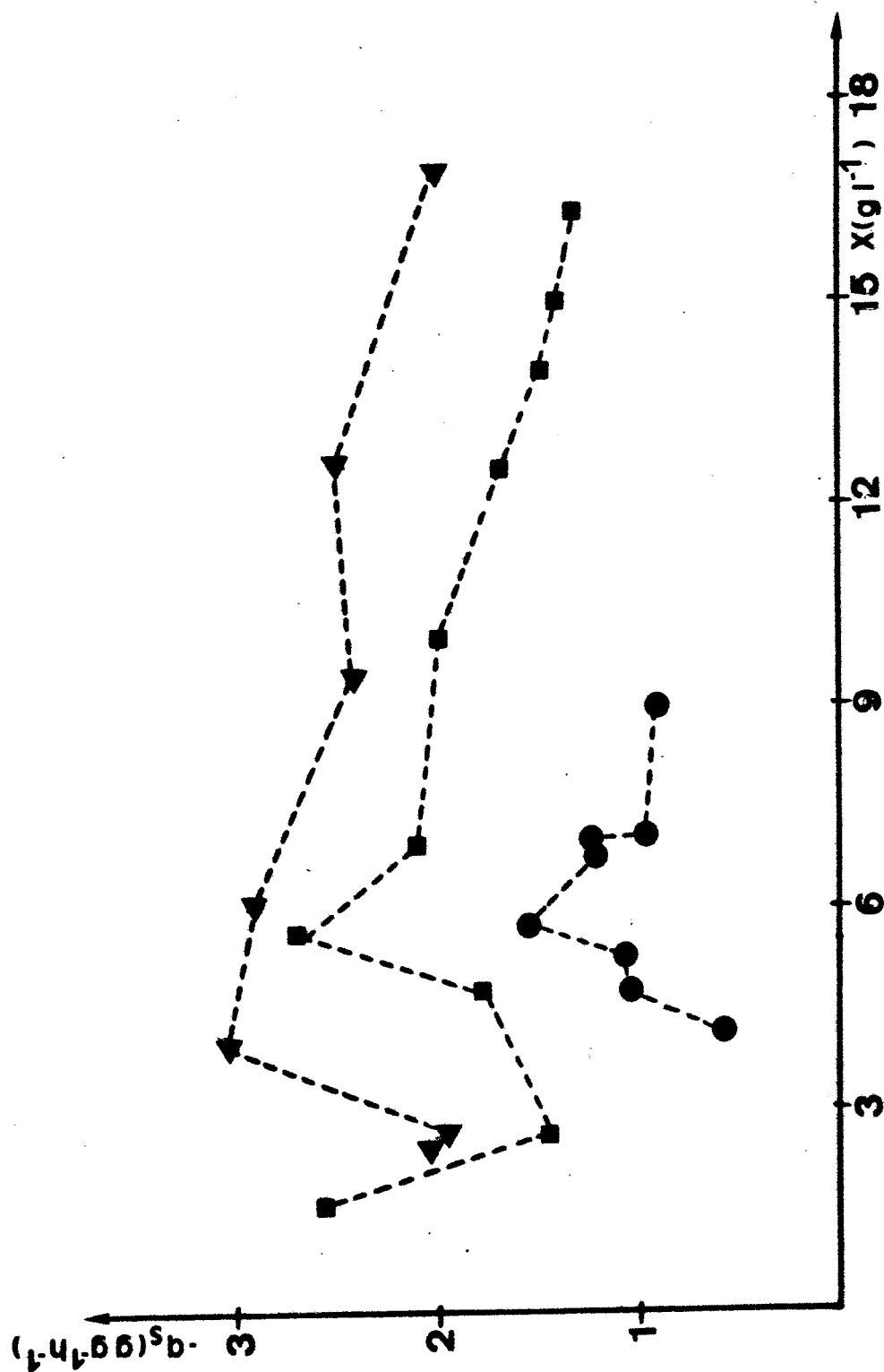


Fig. 6.19 - Comparação dos perfis de velocidade específica de consumo de lactose em função da concentração de biomassa durante o arranque do reactor

● $D_F = 0.189 \text{ h}^{-1}$; ■ $D_F = 0.424 \text{ h}^{-1}$; ▲ $D_F = 0.635 \text{ h}^{-1}$

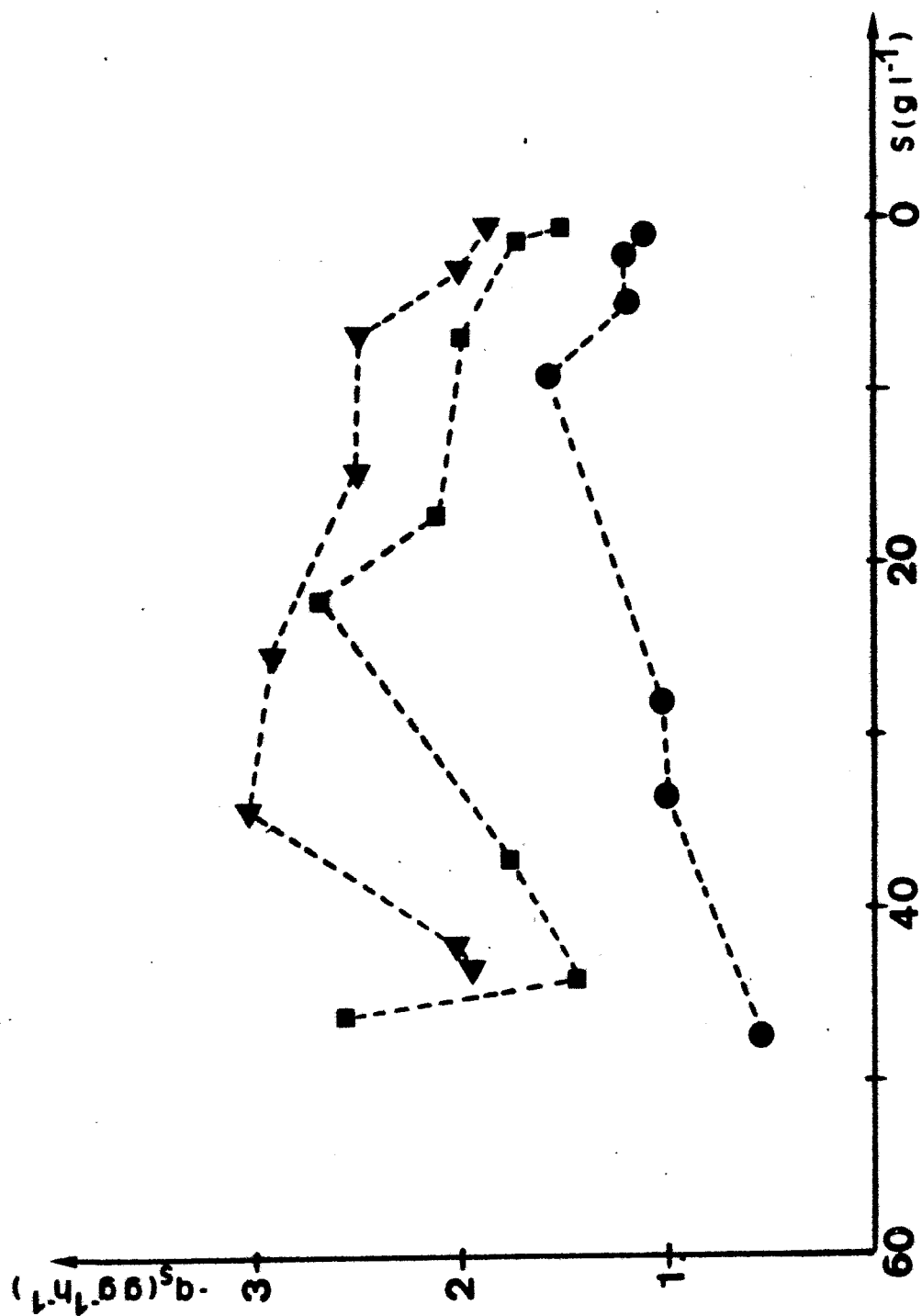


Fig. 6.20 - Comparação dos perfis de velocidade específica de consumo de lactose em função da concentração de lactose durante o arranque do reactor

● $D_F = 0.189 \text{ h}^{-1}$; ■ $D_F = 0.424 \text{ h}^{-1}$; ▲ $D_F = 0.635 \text{ h}^{-1}$

consequências.

- eliminação das paragens de fermentação
- aumento das velocidades máximas de crescimento e de consumo de lactose
- aumento das velocidades de crescimento e consumo de lactose para uma dada concentração de biomassa e substrato

Este conjunto de resultados demonstram que o aumento dos parâmetros é devido unicamente à renovação mais rápida do meio, que pode estar associada à lavagem de substâncias tóxicas libertadas no decorrer da fermentação, conforme anteriormente referido (Cap. 2).

6.3.3. Influência da taxa de recirculação no comportamento do fermentador

A taxa de recirculação (Q_1) actua sobre o fermentador segundo vários aspectos:

- para a mesma taxa de diluição reduz a concentração de biomassa no interior da zona de fermentação. Medimos para $S_0 = 76$ g/l e $D_f = 0.477h^{-1}$ a concentração máxima de biomassa tendo obtido para $Q_1 = 11550$ cm³/h um valor de $X = 46.8$ g/l e para $Q_1 = 34650$ cm³/h obtivemos $X = 32.2$ g/l. Para $S_0 = 60$ g/l e $D_f = 0.245h^{-1}$ obtivemos para $Q_1 = 5800$ cm³/h e $Q_1 = 17300$ cm³/h respectivamente $X = 22.2$ g/l e $X = 13$ g/l.

- para os ensaios em que aumentamos mais significativamente a

taxa de recirculação a concentração em biomassa no efluente manteve-se estável e em média mais elevada (Fig. 6.21).

- os parâmetros específicos de produção de biomassa e consumo de lactose são melhorados, por um aumento da taxa de recirculação (Figs.6.22 e 6.23).

- no que se refere aos parâmetros de crescimento e acumulação de biomassa, o aumento da taxa de recirculação tem um efeito positivo sobre a estabilidade do sistema, reduzindo as paragens no crescimento (Fig.6.22).

Esta redução da instabilidade do fermentador pode estar relacionada com a diminuição do tamanho dos flocos da levedura, provocado por um aumento da taxa de recirculação conforme se representa nas Figs.6.24 e 6.25.

Esta diminuição do tamanho de flocos pode ser positiva segundo dois aspectos:

- limita a acumulação de metabolitos inibidores no sistema de fermentação

- reduz as limitações difusionais do substrato permitindo um melhor contacto do substrato com todas as células constituintes dos flocos individuais e, como tal, diminui a lise que possa existir no seu interior por ausência de substrato.

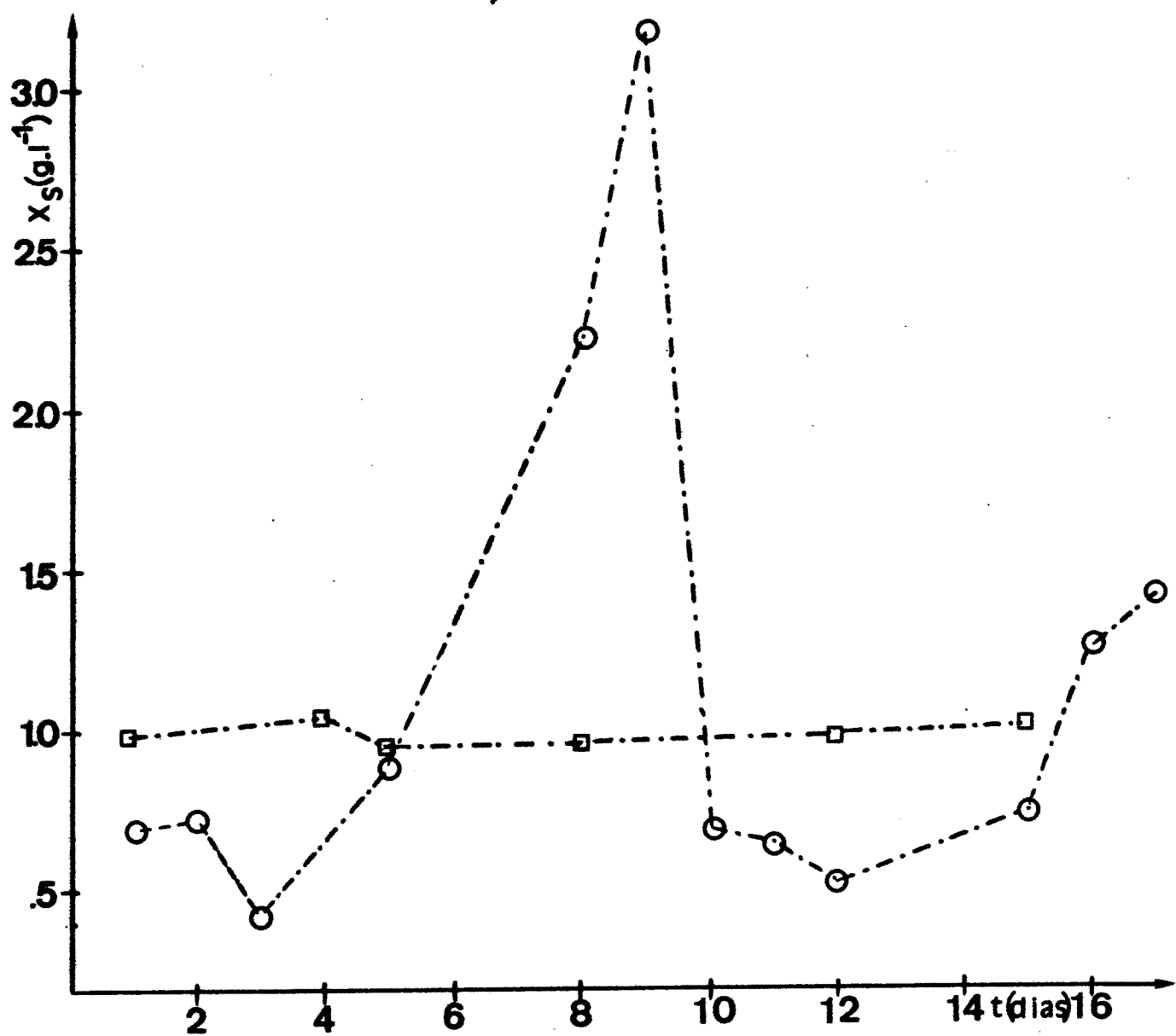


Fig. 6.21 - Evolução da concentração de biomassa no efluente para diferentes taxas de recirculação

○ $Q_1 = 11550$ cm³/h

□ $Q_1 = 34650$ cm³/h

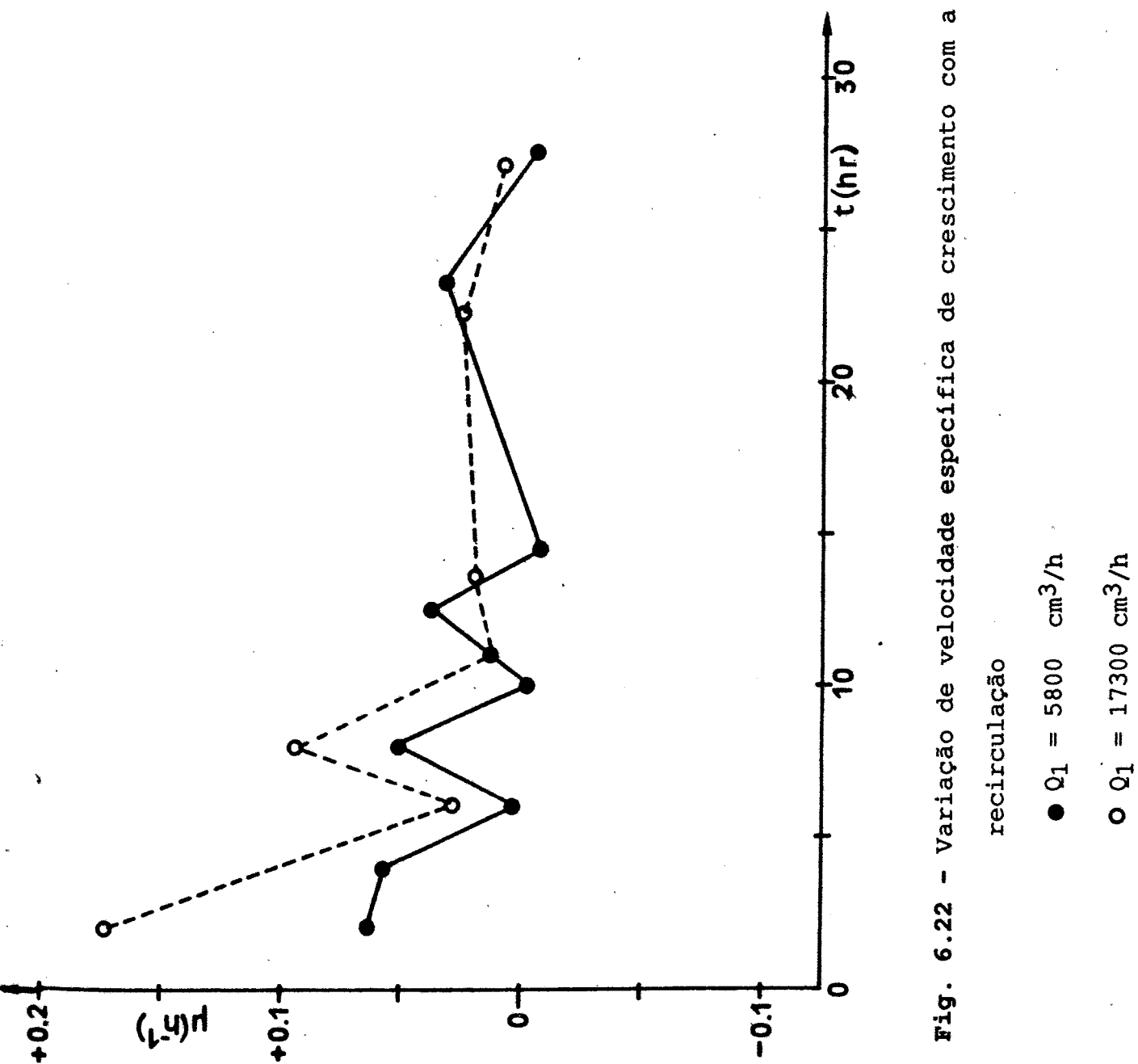


Fig. 6.22 - Variação de velocidade específica de crescimento com a recirculação

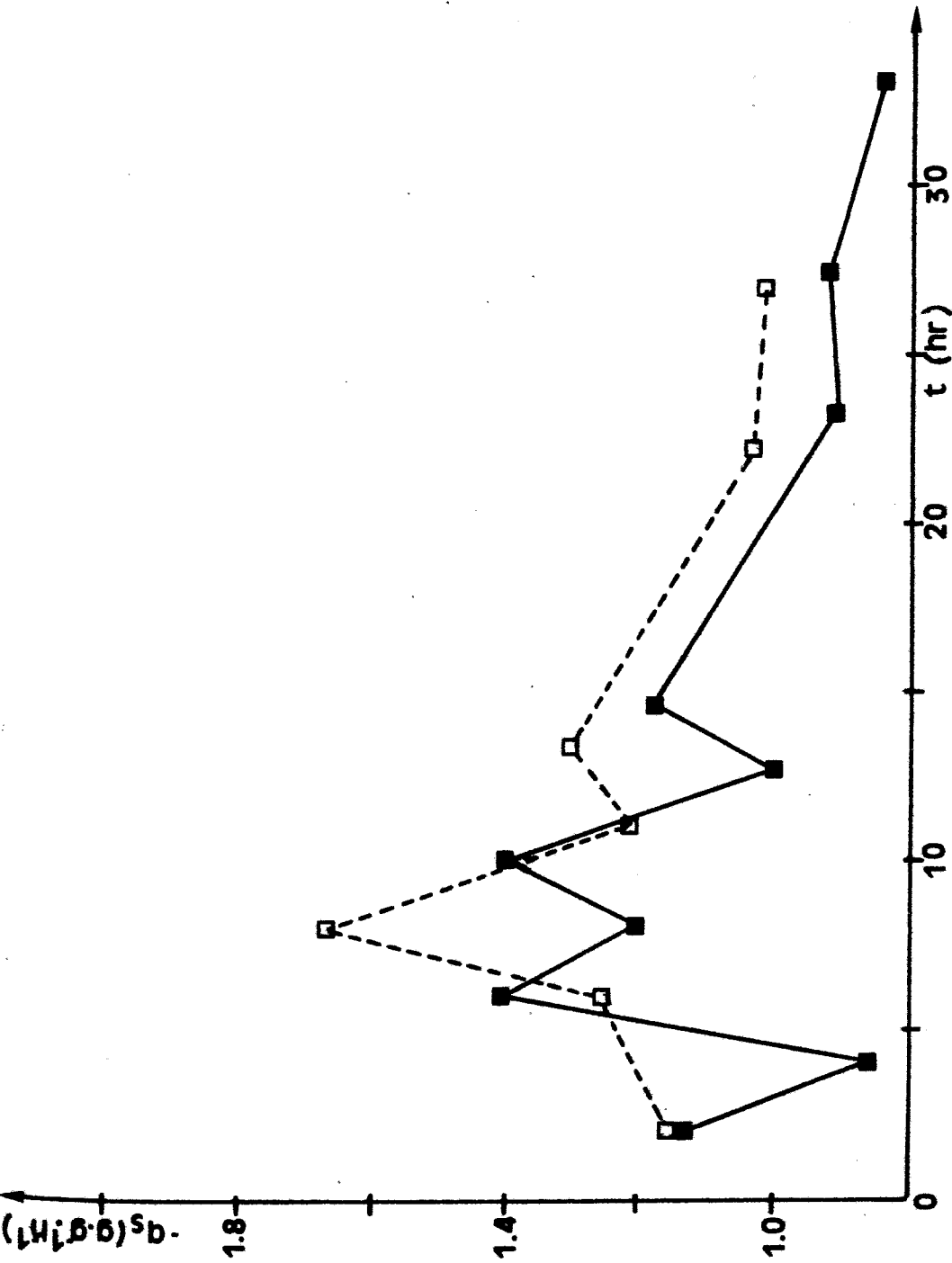


Fig. 6.23 - Variação de velocidade específica de consumo de lactose com a recirculação

■ Q₁ = 5800 cm³/h

□ Q₁ = 17300 cm³/h

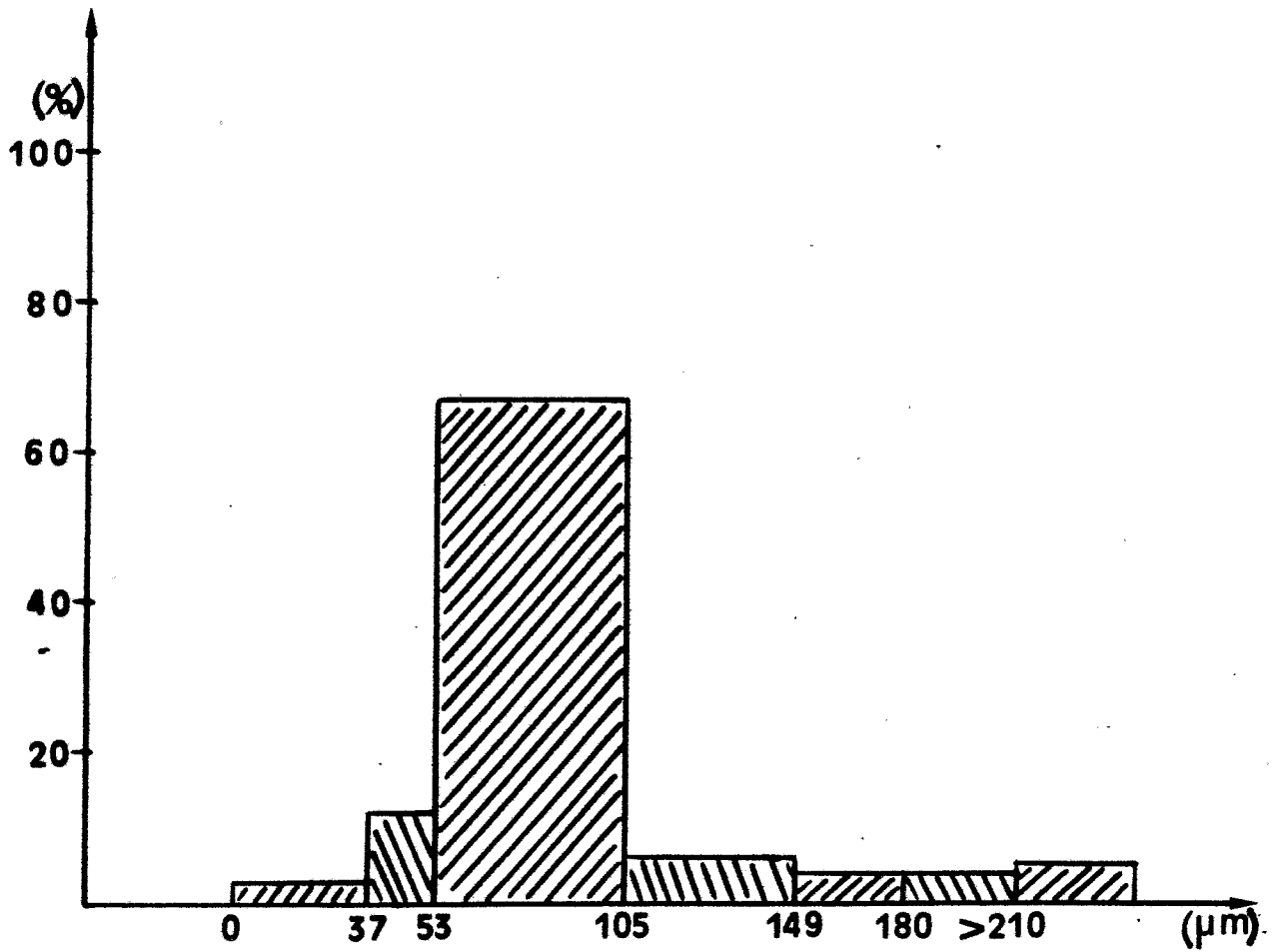


Fig. 6.24 - Distribuição do tamanho de flocos de *K. marxianus* para uma taxa de recirculação de 5800 cm³/h

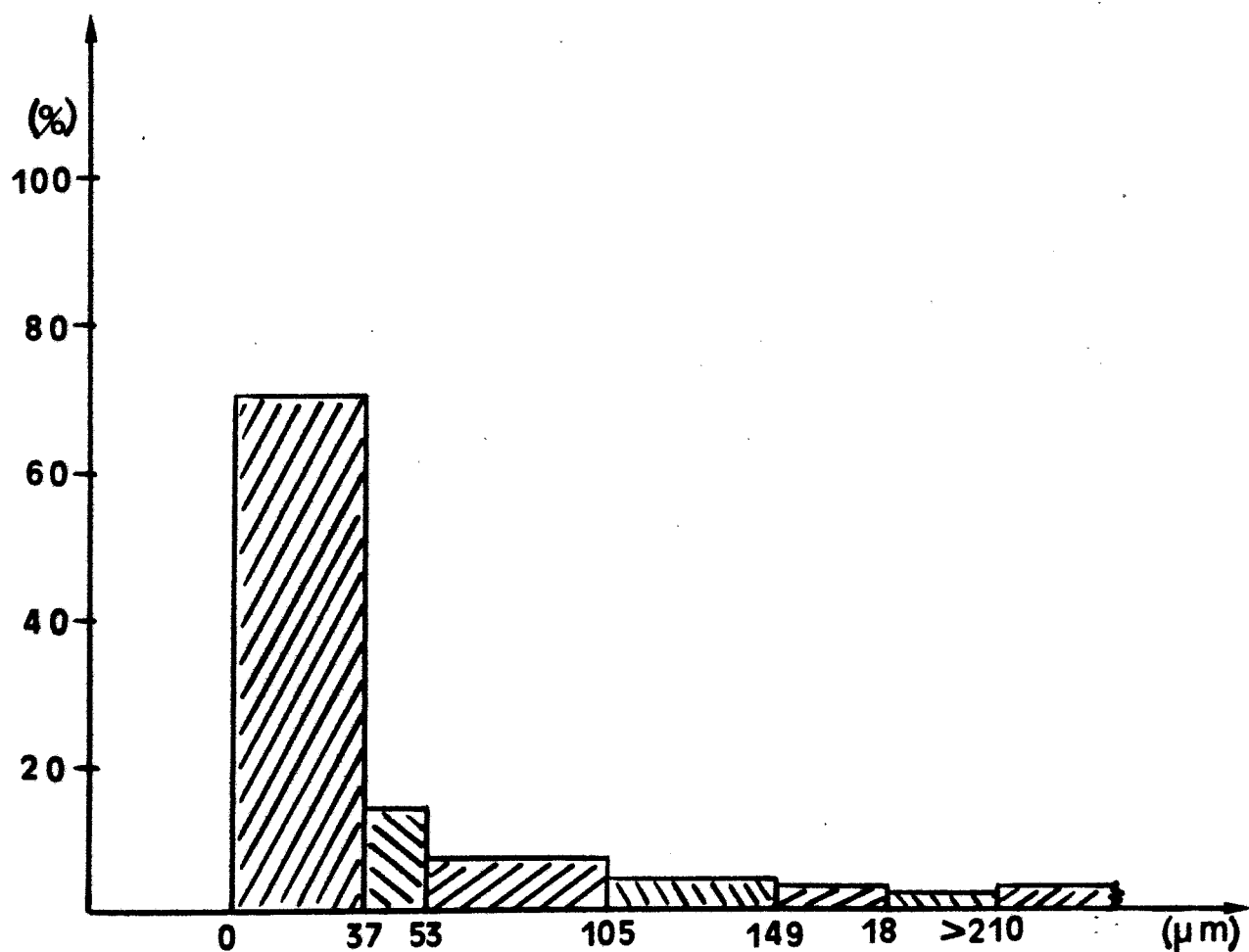


Fig. 6.25 - Distribuição do tamanho de flocos de *K. marxianus* para uma taxa de recirculação de 17300 cm³/h

6.3.4. Cinética de retenção do cálcio

O facto de, no decorrer do processo de indução de floculação, ter sido necessário adicionar ao meio de cultura 1 g/l de CaCl_2 , colocou-nos a seguinte pergunta:

- será que as células, mesmo depois de floculadas, continuam a reter cálcio para assegurar o estabelecimento de pontes iónicas entre grupos carregados negativamente de células adjacentes?

Para tal analisamos a quantidade de cálcio existente na fase líquida no interior do fermentador e no efluente para uma taxa de diluição igual a 0.245h^{-1} , e para duas taxas de recirculação, respectivamente, $5800\text{ cm}^3/\text{h}$ e $17300\text{ cm}^3/\text{h}$. Os resultados obtidos encontram-se representados nas Figs. 6.26 e 6.27 e demonstram que existe efectivamente retenção de cálcio, variável com a taxa de recirculação, para o sistema de leveduras floculantes por nós utilizado. Outra conclusão que se extrai deste conjunto de resultados é que no sistema de separação continua a haver retenção de cálcio pela biomassa aí existente. Após ter atingido o consumo total de lactose a quantidade de cálcio retida no fermentador é para a taxa de recirculação mais elevada igual a $0.242\text{ mg de Ca}^{2+}$ por g de biomassa, retendo a zona de separação mais $0.062\text{ mg de Ca}^{2+}$ por g de biomassa. Para a taxa de recirculação de $5800\text{ cm}^3/\text{h}$, os valores obtidos são respectivamente $.081$ e $.041$.

A maior quantidade de Ca^{2+} retida para a maior taxa de

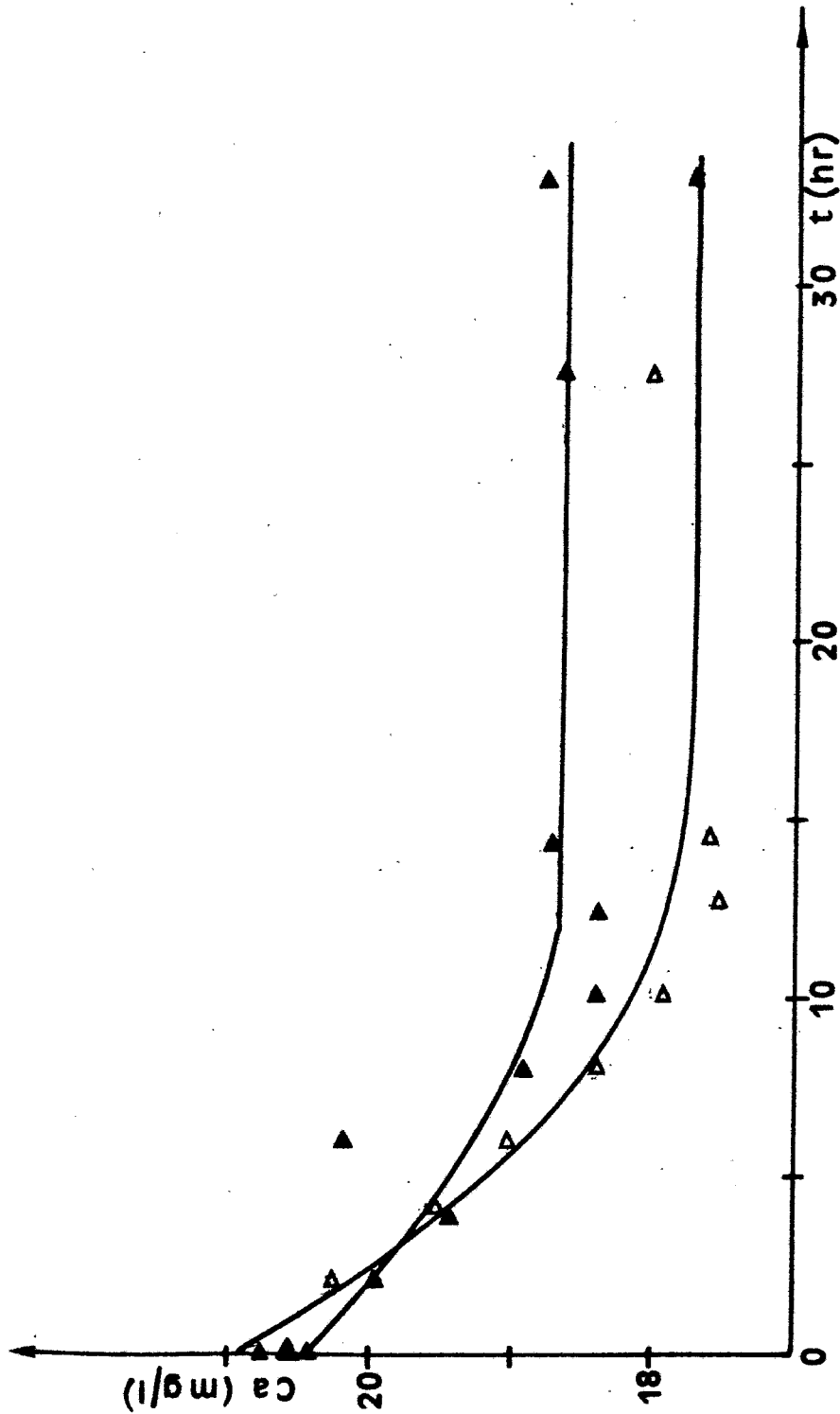


Fig. 6.26 - Cinética de retenção de cálcio para uma taxa de diluição de 0.245 h^{-1} e com um caudal de recirculação de $5800 \text{ cm}^3/\text{h}$

▲ concentração de cálcio no reactor (mg/l)

△ concentração de cálcio no efluente (mg/l)

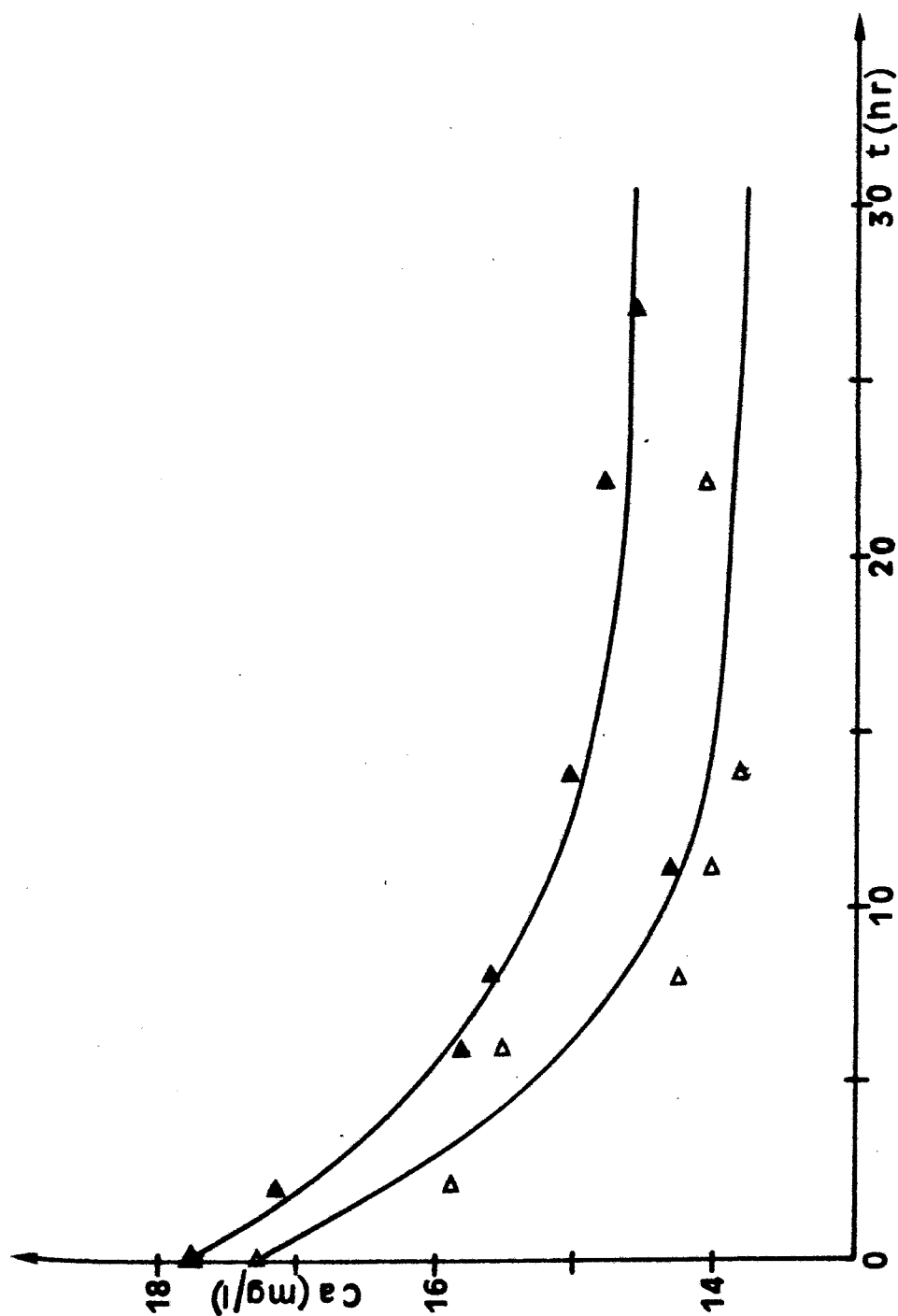


Fig. 6.27 - Cinética de retenção de cálcio para uma taxa de diluição de 0.245 h^{-1} e com um caudal de recirculação de $17300 \text{ cm}^3/\text{h}$

- ▲ concentração de cálcio no reator (mg/l)
- △ concentração de cálcio no efluente (mg/l)

recirculação pode querer indicar que os flocos formados são mais rígidos devido ao estabelecimento de um maior número de pontes iónicas entre as células.

É interessante, de qualquer modo, referir que a adição de Ca^{2+} ao meio pode melhorar os parâmetros cinéticos conforme descrito por Netto (1984) e, como tal, a justificação de melhoria destes parâmetros com o aumento da recirculação pode estar intimamente ligada à retenção de Ca^{2+} .

6.4 Caracterização das limitações difusionais em flocos de leveduras - determinação do factor de eficácia

Nesta secção, descrevemos um dispositivo experimental que permite a determinação do factor de eficácia para leveduras floculantes, nomeadamente, Kluyveromyces marxianus em duas condições: no primeiro caso a levedura foi colocada na presença de cálcio e no segundo foi adicionado ao meio de cultura um aditivo de floculação.

6.4.1. Introdução

Existem poucos trabalhos publicados que estejam relacionados com a determinação experimental do factor de eficácia em processos microbiológicos.

Alguns analisam este problema sob um ponto de vista meramente teórico (Andrews (1978), Dalili e Chau (1987), Logan e Hunt (1978)) e

os trabalhos experimentais existentes referem-se principalmente a células imobilizadas (Mavituna et al. (1987), Merchant et al. (1987), Sakaki et al. (1987)), sendo poucos os que tratam de células floculantes (Aiba e Kobayashi (1973), (Chen e Gong (1986))).

Um dos principais, senão o principal problema reside na determinação da velocidade de reacção na ausência de limitações difusionais.

Uma solução para ultrapassar esta dificuldade, embora sujeita a erros significativos é extrapolar para a origem, isto é, para o valor correspondente a flocos de diâmetro nulo (Bu'lock e Kristiansen (1987)).

No nosso caso, a velocidade de reacção na ausência de limitações difusionais foi determinada utilizando a estirpe não floculante de K. marxianus. Uma vez que a estirpe floculante foi seleccionada a partir da não floculante, como anteriormente descrito (Cap.4) o comportamento metabólico é o mesmo em ambos os casos.

6.4.2. Descrição experimental

O dispositivo experimental usado na determinação do factor de eficácia consiste num microreactor de "perspex" com 5 mm de espessura, constituído por duas câmaras (Fig.6.28). A câmara inferior tem um volume de 40.45 cm^3 e é agitada com uma barra magnética. Está separada da câmara superior, que tem um volume de 4.81 cm^3 , por um

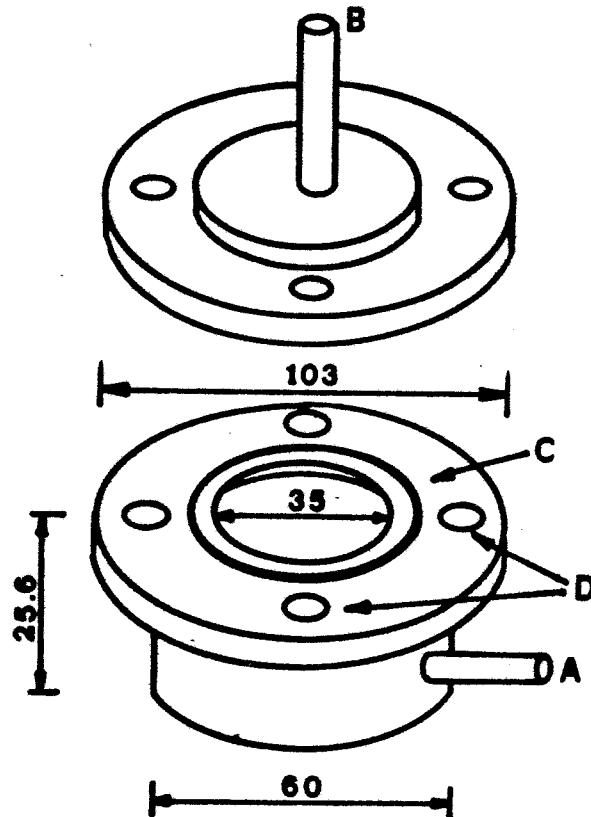


Fig. 6.28 - Vista, seccionada, do microreactor de "perspex".

A - entrada de alimentação

B - saída

C - O-ring

D - orifícios para aperto. O aperto é feito com parafusos de borboleta.

Todas as dimensões estão expressas em mm

filtro de membrana de 0.45 μm .

O meio semi-sintético anteriormente descrito, (Cap.3) com uma concentração de lactose igual a 10 g/l é alimentado, na base do microreactor, com uma bomba peristáltica. Os ensaios são realizados a 30°C e a taxa de diluição, em todas as experiências é mantida igual a 1.53 h⁻¹.

O aditivo de floculação utilizado, numa concentração no meio de cultura igual a .01% é uma resina catiónica de Bioprocessing Aids-BPA 1000. É um polímero catiónico (amina quaternária) de estireno-divinilbenzeno, com uma capacidade de permuta de 2.8 meq/g de resina e um diâmetro médio de 0.11 $\pm$ 0.2 μm .

Simultaneamente determinamos a porosidade dos flocos tratados com ou sem aditivo.

As células para a realização dos ensaios eram recolhidas do fermentador de floculação, lavadas várias vezes e colocadas na câmara inferior.

6.4.3. Resultados e discussão

Dez minutos após o arranque não havia as oscilações características do estado transiente, possivelmente devido ao pequeno volume da câmara superior e à alta taxa de diluição utilizada. Sendo assim, foi possível recolher amostras a intervalos regulares, 10

minutos após o arranque. O tempo total de cada experiência não deve ultrapassar os 45 minutos para evitar perturbações resultantes do crescimento celular (o tempo de duplicação das células é superior a 2 ou 3 horas) contaminação e libertação de gás (que se pode acumular debaixo da membrana e reduzir o volume de operação).

Foram feitos dois ensaios com as células não floculantes, usando diferentes concentrações de biomassa a diferentes velocidades de agitação (60 e 120 r.p.m.). Como indicado na Tab.6.5 o desvio relativo das velocidades específicas de consumo de substrato nos dois ensaios foi inferior a 1%.

A terceira experiência representada na mesma tabela foi realizada com as células floculantes num meio com cálcio (aproximadamente 20 p.p.m.). O quarto ensaio, foi realizado num meio idêntico ao anterior, ao qual foi adicionada a resina B.P.A. 1000. Na Tab.6.5 estão representadas as condições de cada experiência, conjuntamente com os valores obtidos para a taxa específica de consumo de substrato e o coeficiente de correlação.

O consumo específico de substrato é dado pelo declive da linha recta que relaciona o consumo da lactose por grama de peso seco de células com o tempo.

Como se representa na Fig.6.29 as linhas rectas que representam os consumos de lactose para a estirpe não floculante são paralelas. Além disso, as linhas rectas correspondentes à levedura floculante

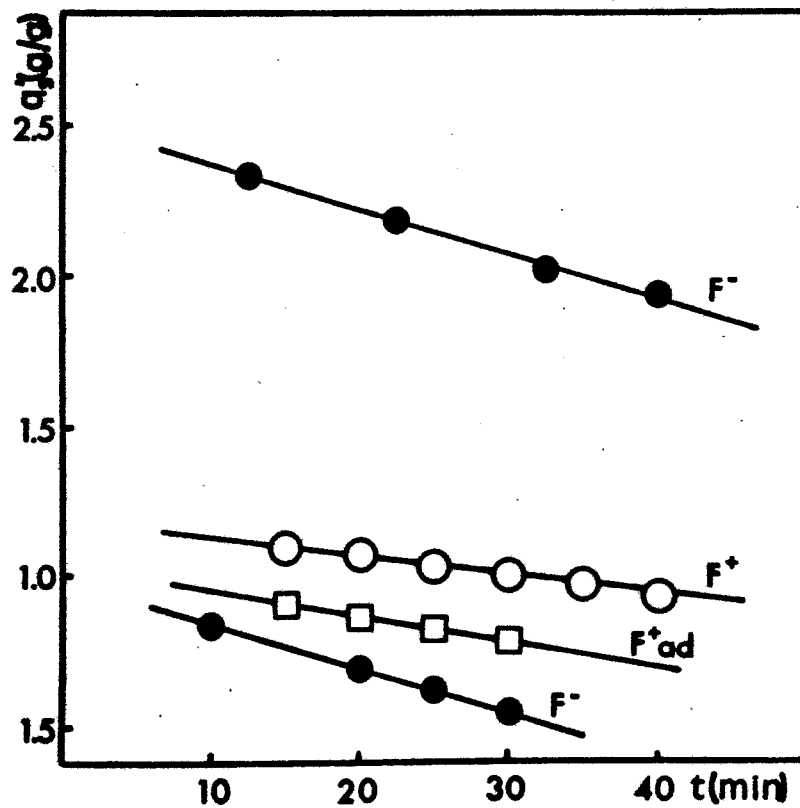


Fig. 6.29 - Variação da velocidade específica do consumo de substrato $q's$ (g de lactose/g de células (peso seco)) com o tempo

F^- - células não floculantes

F^+ - células floculantes

F^+_{ad} - células floculantes tratadas com aditivo

são concorrentes com as anteriores, o que demonstra a existência de limitações difusionais. Nestas condições operacionais não há limitações externas como é confirmado pelos resultados idênticos nos dois ensaios para a estirpe não floculante.

Adaptando a expressão proposta por Atkinson (1974) o factor de eficácia (θ) pode ser calculado usando a seguinte equação

$$\theta = \frac{\text{consumo específico de substrato da levedura floculante}}{\text{consumo médio específico de substrato da levedura não floculante}}$$

Na Tab.6.6 estão representados o factor de eficácia e a porosidade para as células floculantes não tratadas (F^+) e para as tratadas com aditivo (F^{+ad}).

Dos valores apresentados conclui-se que o factor de eficácia da estirpe tratada é cerca de 10% superior ao da não tratada e que o aditivo provoca um aumento de 10% na porosidade dos flocos.

Estes resultados sugerem que a adição da resina catiónica BPA 1000 tem um efeito positivo na redução das limitações difusionais em flocos de leveduras.

Deve também ser salientado que este sistema se provou preciso na determinação de factores de eficácia em leveduras floculantes.

TAB.6.5 - Condições de operação e resultados para os diferentes ensaios

Estirpe	Massa celular (g)	Vel. de agitação (r.p.m.)	Taxa específica de consumo de substrato (min^{-1})	Coefficiente de correlação
F ⁻	0.1883	120	1.483×10^{-2}	0.999
F ⁻	0.6015	60	1.469×10^{-2}	0.998
F ⁺	0.4049	60	0.682×10^{-2}	0.997
F ⁺ ad.	0.4584	60	0.749×10^{-2}	0.999

F⁻ estirpe não flocculante

F⁺ estirpe flocculante

F⁺ad. estirpe flocculante tratada com aditivo

TAB.6.6 - Porosidade e factor de eficácia para as células tratadas e não tratadas

Células	Porosidade %	Factor de eficácia %
F ⁺	50.5	46.2
F ⁺ ad.	54.7	50.7

CAPITULO 7: MODELIZAÇÃO

Neste capítulo é feita a caracterização hidrodinâmica e cinética do sistema de fermentação em contínuo anteriormente descrito (Cap. 3).

A análise da resposta do sistema a impulsos de um açúcar não metabolizado constitui a base experimental para a modelização hidrodinâmica.

Os parâmetros cinéticos foram calculados recorrendo aos ensaios em descontínuo como anteriormente descritos (Cap.3), e afinados utilizando as experiências realizadas em contínuo (Cap.6).

7.1 Descrição da instalação

O sistema de fermentação é constituído, como anteriormente descrito (Cap.3), por uma zona de fermentação (Zona I) e por uma zona de sedimentação (Zona II) (Fig. 7.1).

As dimensões do sistema são:

- Volume útil do fermentador — 566.5 cm^3
- Volume útil do hidrociclone — 127.0 cm^3
- Volume útil do sedimentador — 273.0 cm^3

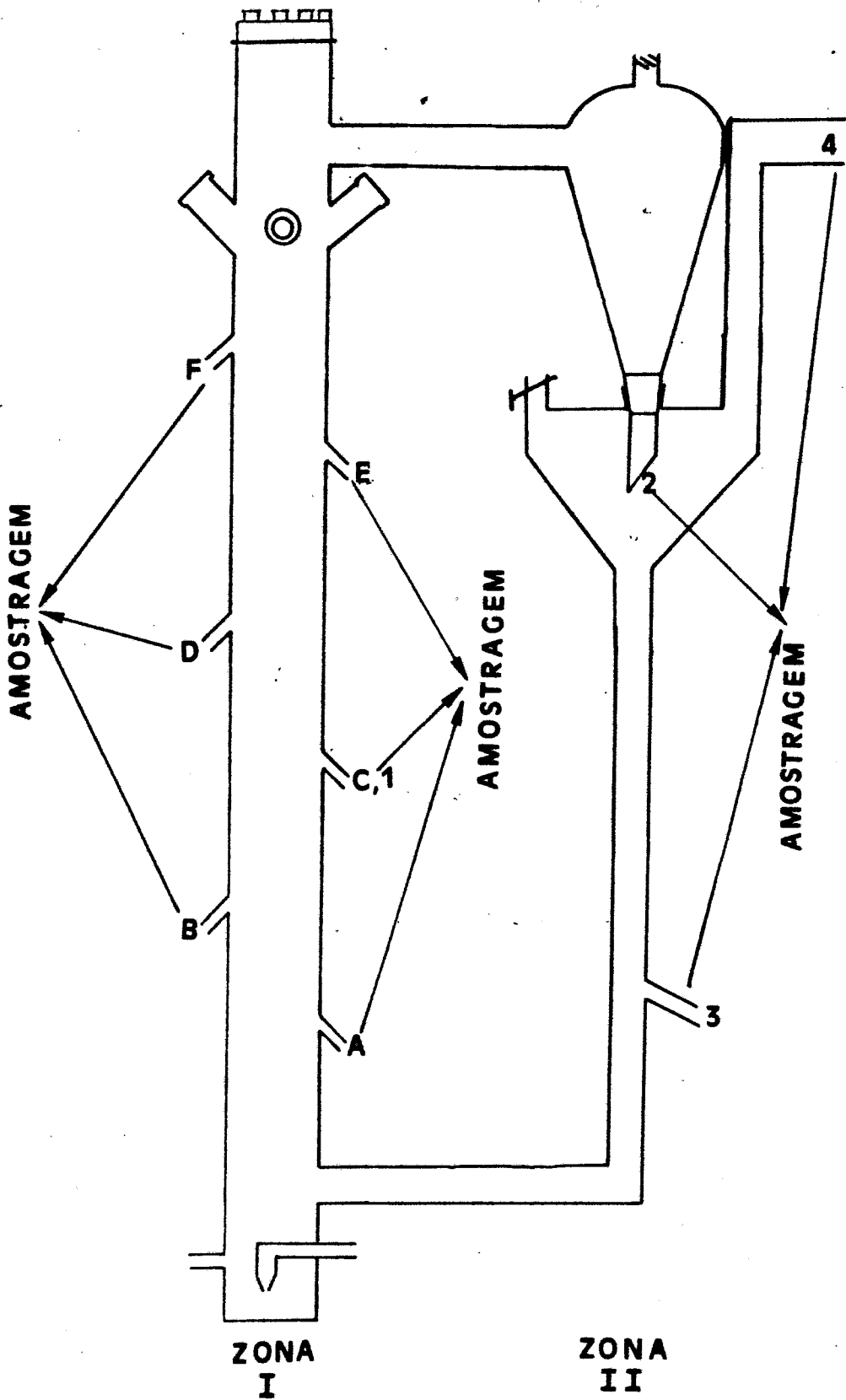


Fig. 7.1 - Sistema de fermentação em contínuo

Os ensaios para a caracterização hidrodinâmica foram realizados nas seguintes condições:

— Caudal de alimentação (Q_0)	— 490 cm ³ /h
— Caudal de recirculação (Q_1)	— 11550 cm ³ /h
— Caudal de arejamento	— 0.1 v.v.m.
— Concentração de biomassa	— 38 g/l
— Concentração inicial de lactose	— 57 g/l
— Concentração de etanol	— 28 g/l

7.2. Método utilizado

A caracterização hidrodinâmica do sistema foi feita introduzindo na corrente de alimentação um degrau positivo de um traçador.

O traçador utilizado foi a xilose pois obedecia às seguintes condições:

- a levedura K. marxianus não fermenta xilose (Guiraud J., Galzy P. (1980)). Além disso a taxa de assimilação de xilose determinada, em descontinuo, usando a xilose como única fonte de carbono (em substituição da lactose), é muito pequena (0.06 g/g.h).

- não apresenta um efeito inibidor ou tóxico na actividade da levedura.

- não provoca alterações na densidade da corrente de alimentação e é perfeitamente solúvel.

- é detectável por meios analíticos rigorosos e acessíveis -

espectrofotometria (Costa M. (1984)).

7.3. Resultados experimentais

Numa primeira fase, analisamos a resposta da zona I (zona de fermentação) ao degrau de xilose (concentração de traçador - 2.5 g/l). Foram feitas amostragens ao longo de todo o fermentador, estando os resultados obtidos representados nas Figs. 7.2, 7.3 e 7.4.

Após a caracterização da zona de fermentação foi analisada a resposta do sistema global a uma injeção de traçador (concentração - 4.75 g/l), tendo sido retiradas amostras nas zonas indicadas na Fig. 7.1.

A localização dos pontos de amostragem foi feita de modo a permitir a caracterização de cada uma das sub-unidades do sistema.

Os valores obtidos encontram-se representados na Fig. 7.5.

7.4. Descrição do modelo

A sobreposição dos valores experimentais de concentração de xilose, obtidos em amostragens simultâneas na zona de fermentação (Fig. 7.2, 7.3 e 7.4) indica que esta é perfeitamente agitada.

Em função disto e dos valores obtidos na resposta do sistema global, admitimos que o sistema seguia o seguinte modelo: o sistema

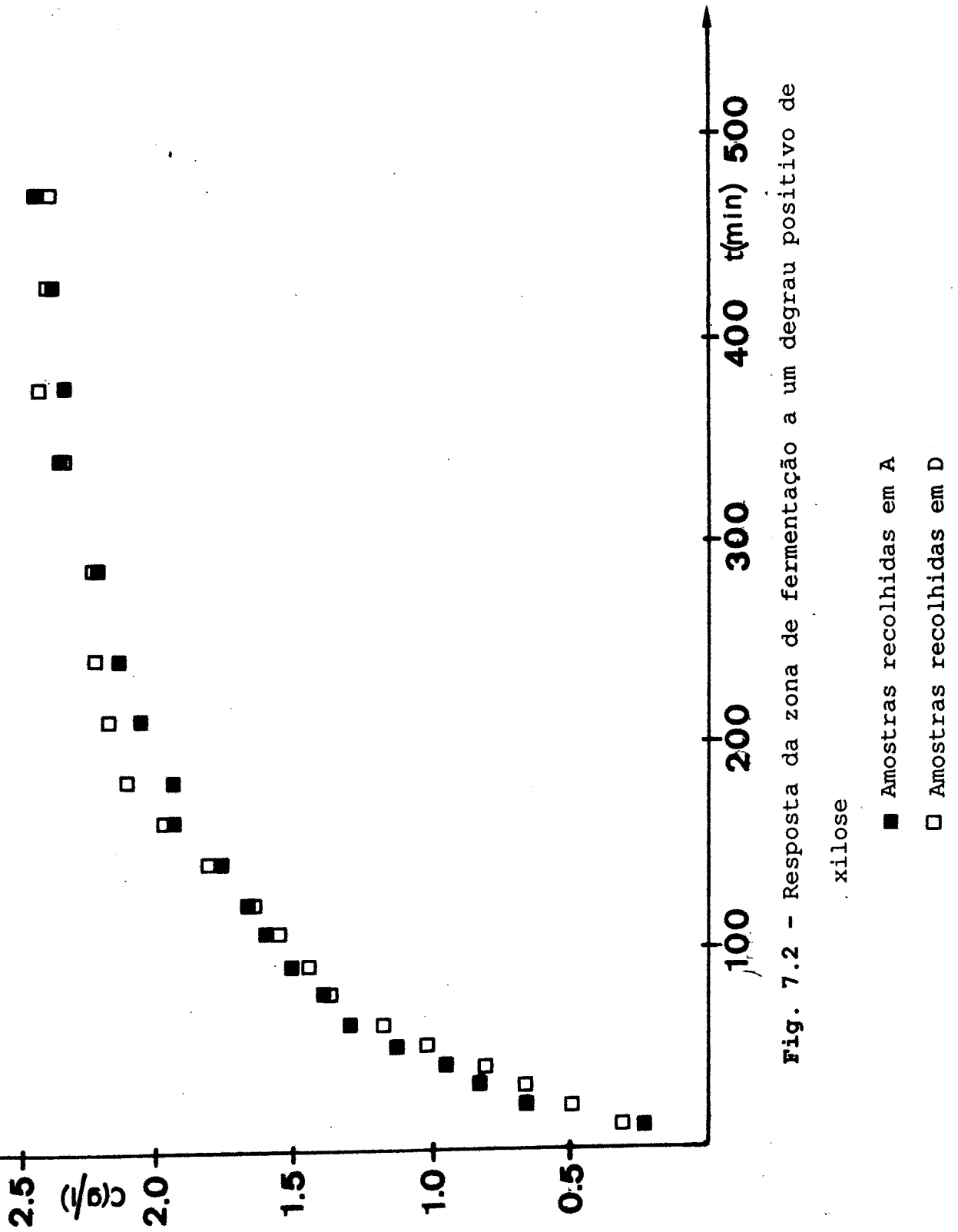


Fig. 7.2 - Resposta da zona de fermentação a um degrau positivo de xilose

■ Amostras recolhidas em A
□ Amostras recolhidas em D

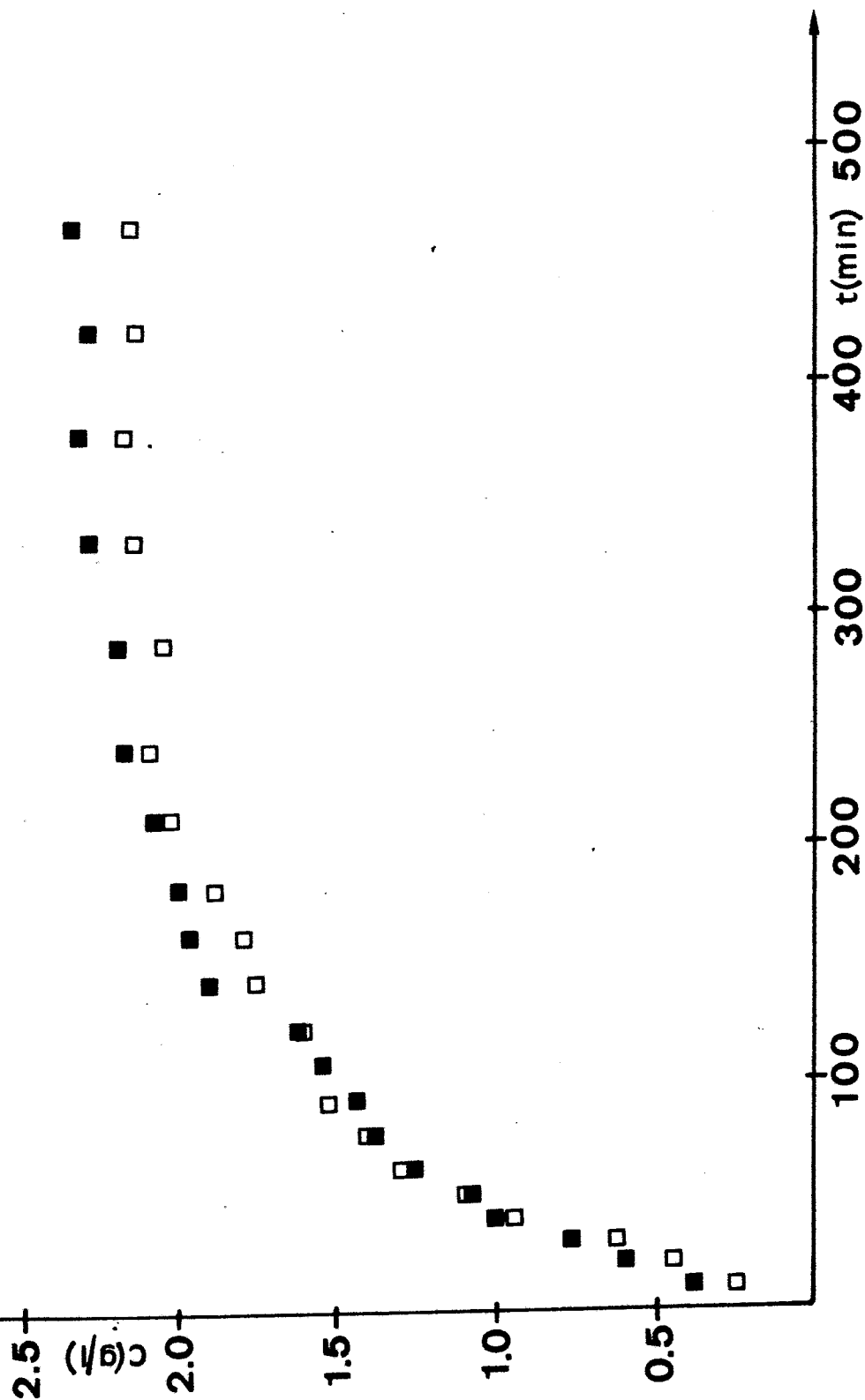


Fig. 7.3 - Resposta da zona de fermentação a um degrau positivo de xilose

■ Amostras recolhidas em B

□ Amostras recolhidas em E

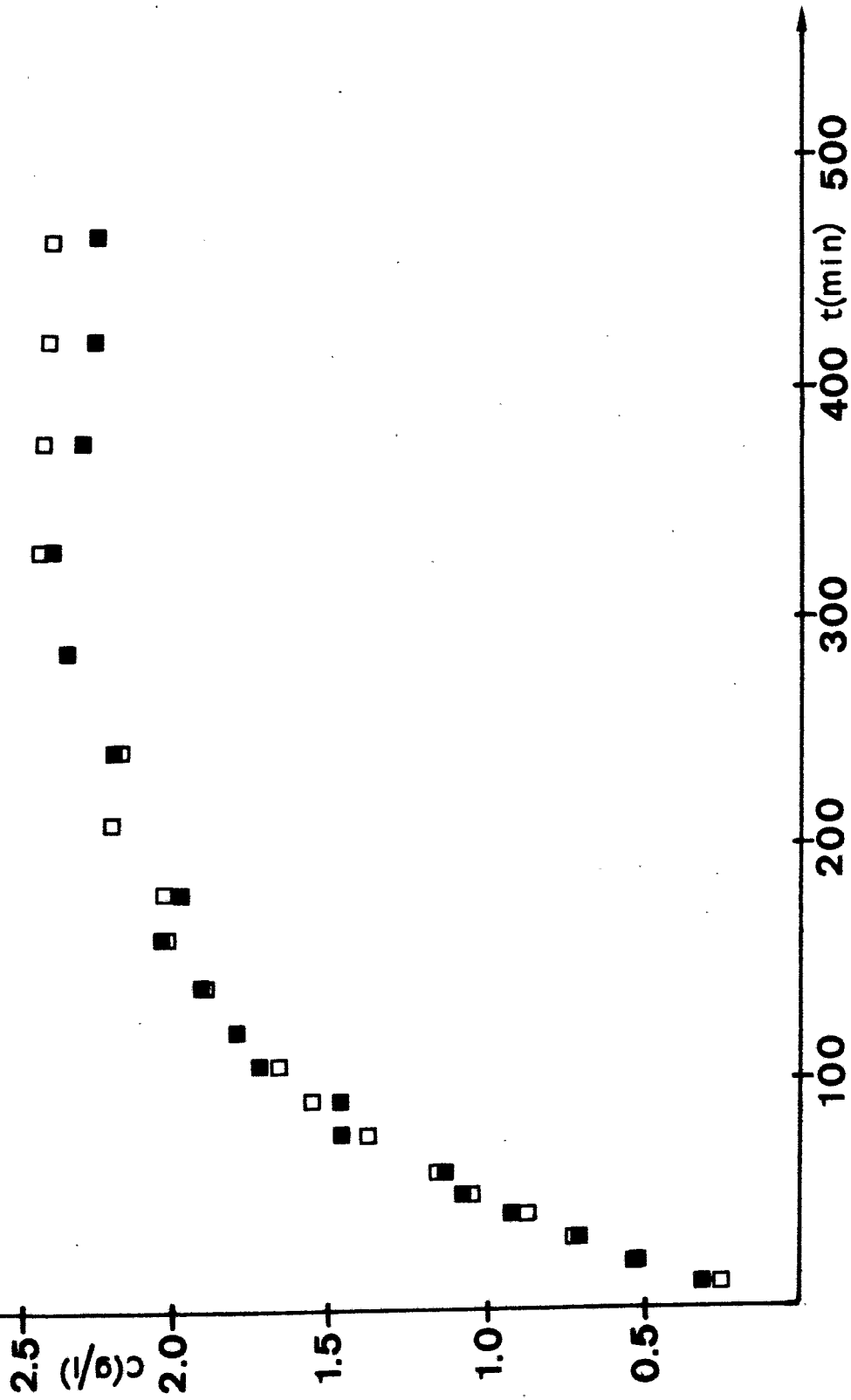


Fig. 7.4 - Resposta da zona de fermentação a um degraú positivo de xilose

■ Amostras recolhidas em C

□ Amostras recolhidas em F

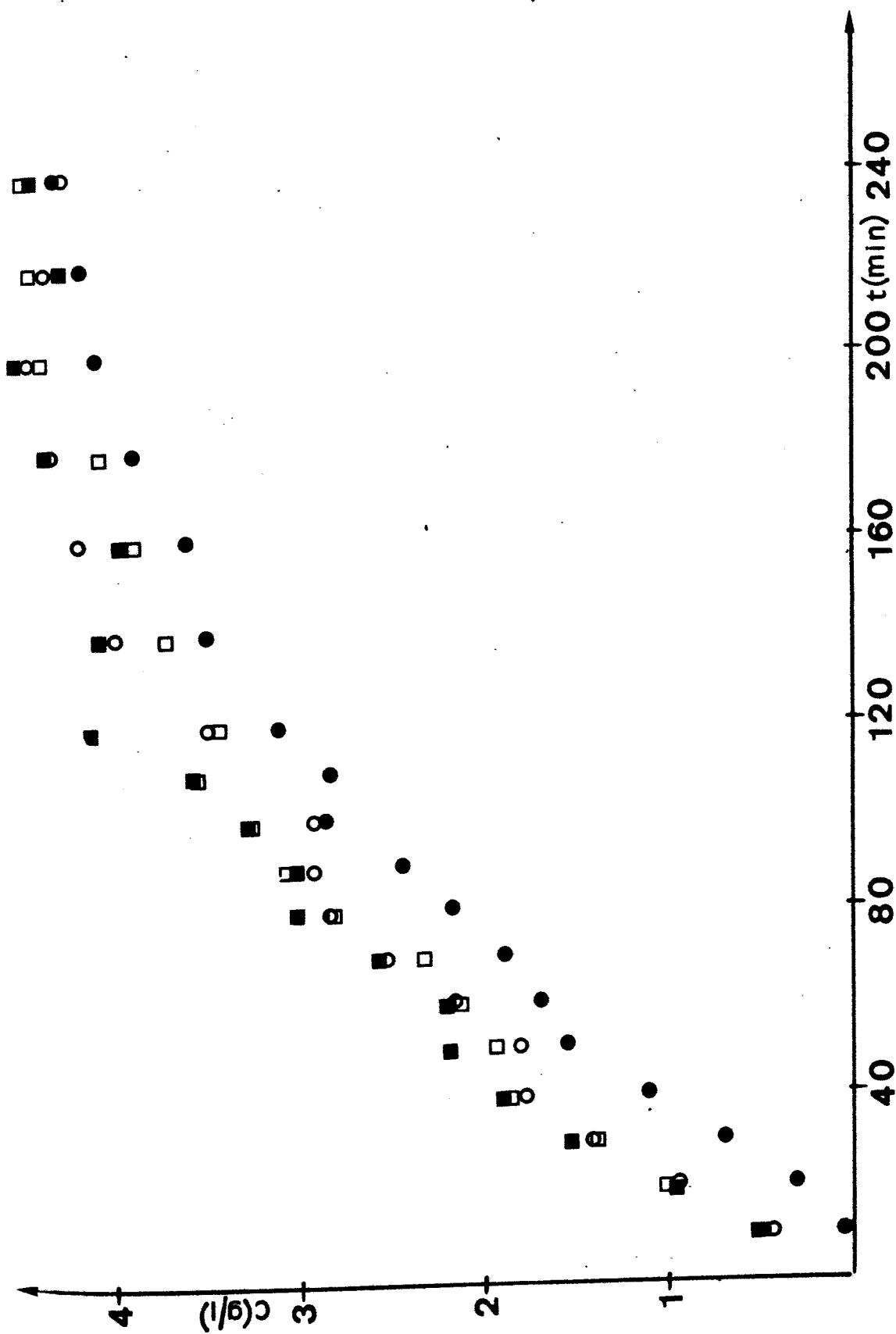


Fig. 7.5 - Resposta do sistema a um degraú positivo de xilose

□ Amostras recolhidas em 1

■ Amostras recolhidas em 2

○ Amostras recolhidas em 3

● Amostras recolhidas em 4

(Fig. 7.6) é representado por dois Reactores Perfeitamente Agitados e um Reactor Pistão em série com reciclagem através de um Reactor Perfeitamente Agitado.

Estabelecendo a relação entre o sistema global e o modelo proposto obtém-se o esquema representado na Fig. 7.7.

O fermentador corresponde ao 1º R.P.A., o hidrociclone ao 2º R.P.A. e o sedimentador divide-se em duas partes — a zona abaixo da saída do hidrociclone corresponde ao 3º R.P.A. e a zona acima ao reactor pistão e provoca um atraso na resposta.

O modelo a desenvolver considera que:

- a reacção ocorre, como confirmado no capítulo anterior, só na zona I.

- a concentração em biomassa na corrente de saída é desprezável, quando comparada com os valores obtidos no interior do fermentador (como descrito na capítulo anterior).

- a concentração de biomassa no interior do fermentador representa a massa de células por unidade de volume das fases sólida e líquida, isto é, consideramos que o peso seco é determinado numa base sem gás.

- a xilose encontra-se dissolvida em toda a fase líquida extracelular.

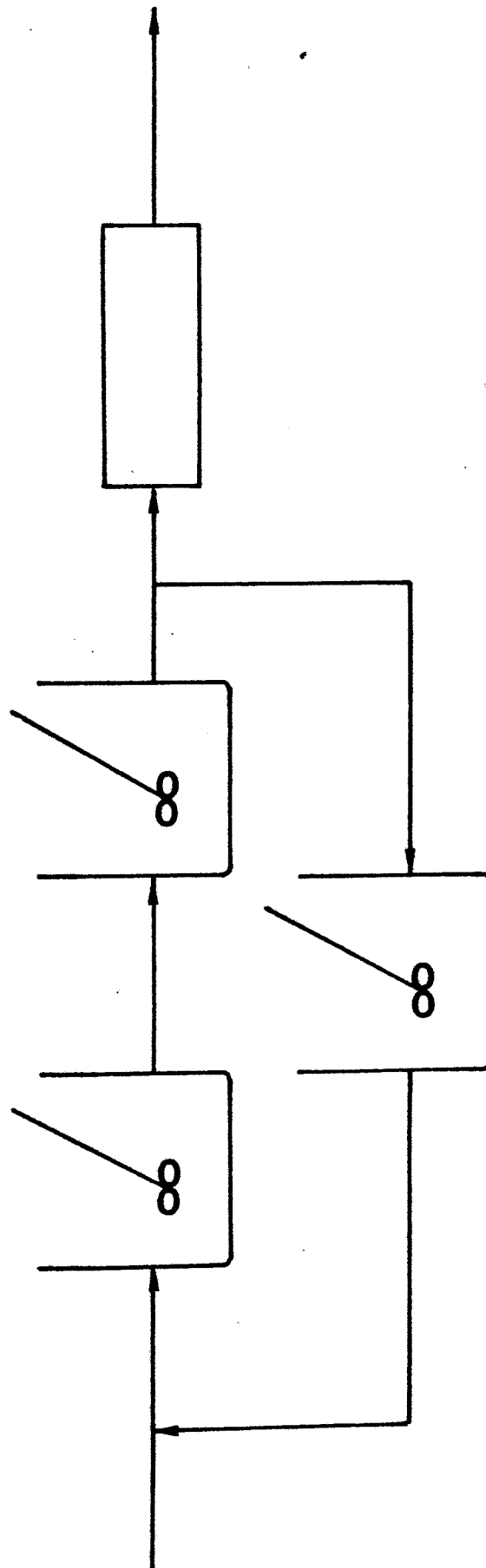


Fig. 7.6 - Modelo proposto para a caracterização hidrodinâmica do bioreactor de floculação

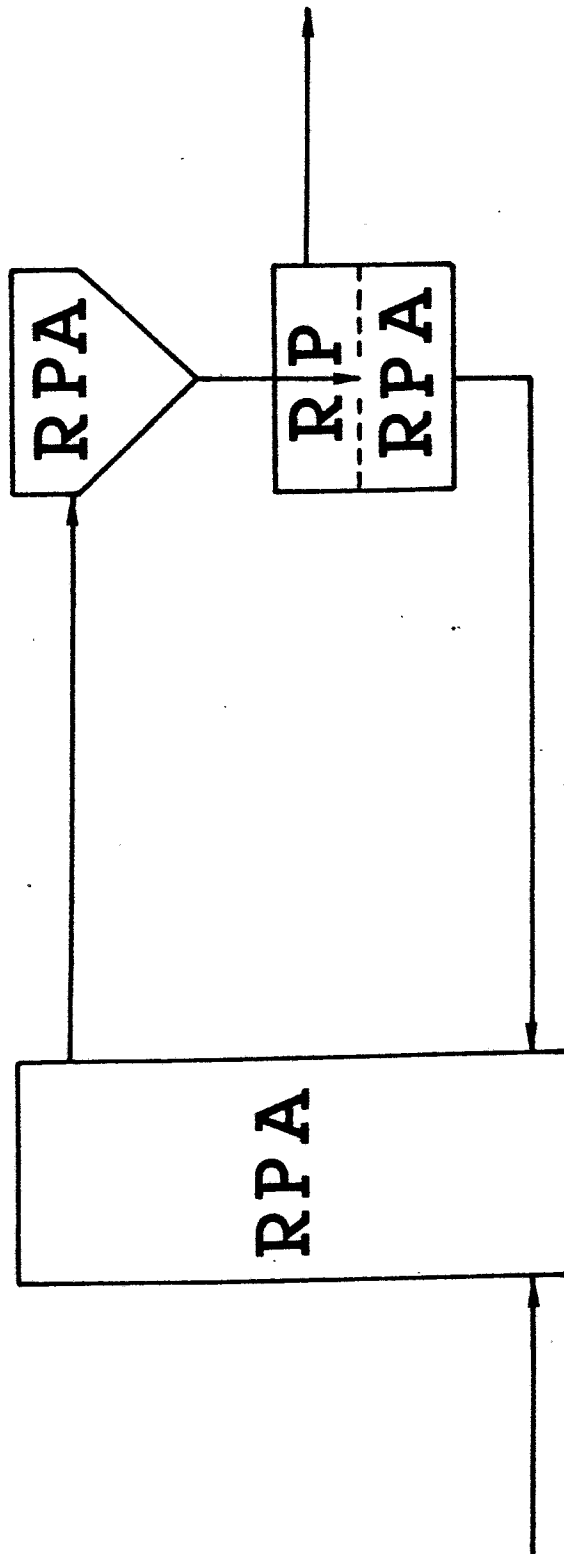


Fig. 7.7 - Analogia entre o modelo proposto e o reactor de
floculação

7.4.1. Equações de balanço do modelo

7.4.1.1. Balanço no traçador

7.4.1.1.1. Fermentador

$$Q_0 C_0 + Q_{L1} C_1 = (Q_0 + Q_{L1}) C_1 + L_1 \frac{dC_1}{dt} \quad (7.1)$$

7.4.1.1.2 Hidrociclone

$$(Q_0 + Q_{L1}) C_1 = (Q_0 + Q_{L1}) C_2 + L_2 \frac{dC_2}{dt} \quad (7.2)$$

7.4.1.1.3. Sedimentador

7.4.1.1.3.1. Zona perfeitamente agitada

$$Q_{L1} C_2 = Q_{L1} C_3 + L_3 \frac{dC_3}{dt} \quad (7.3)$$

7.4.1.1.3.2. Zona pistão

$$C_4 = C_2 \times H (t - \tau) \quad (7.4)$$

7.4.1.2. Balanço aos componentes do sistema

$$X_1 = \bar{X}_1 \times Y_1 / (1 - \bar{X}_1) \quad (7.5)$$

$$G_1 = 1 - X_1 - Y_1 \quad (7.6)$$

$$Y_2 = \bar{Y}_2 = Y_1 / (1 - G_1) \quad (7.7)$$

$$Y_3 = \bar{Y}_3 \quad (7.8)$$

$$Y_{3A} = 1 - \frac{(Q_0 + Q_1) (1 - Y_2)}{Q_1} \quad (7.9)$$

$$Y_{3A} = Y_{3.1} \quad (7.10)$$

$$L_1 = V_1 Y_1 \quad (7.11)$$

$$L_2 = V_2 Y_2 \quad (7.12)$$

$$L_{3A} = V_{3A} Y_{3A} \quad (7.13)$$

$$Q_{L1} = Q_1 Y_{3.1} \quad (7.14)$$

Neste conjunto de equações, as variáveis têm o seguinte significado:

Q_0 - caudal volúmico de alimentação

Q_1 - caudal volúmico de reciclagem

Q_{L1} - caudal volúmico de líquido no reciclagem

C_i - concentração de xilose (na fase líquida) nos diferentes pontos de amostragem i ($i = 1$ a 4).

V - volume de cada um dos reactores

L - volume da fase líquida de cada um dos reactores

X - fracção volúmica da fase sólida

Y - " " " " líquida

G - " " " " gasosa

$\bar{X}$ - fracção volúmica da fase sólida numa base sem gás

$\bar{Y}$ - " " " " líquida " " " "

- 1 - fermentador
- 2 - hidrociclone
- 3.A- R.P.A do sedimentador
- 3.1- reciclagem

7.4.1.3. Cálculo de fracção volúmica de sólidos no fermentador (X₁)

A análise termogravimétrica dos flocos permite o conhecimento da sua composição mássica:

- água em torno dos flocos (A) - 59.20%
 - 17.4% extraflocos
 - 41.8% intraflocos
- água intracelular (B) - 18.01%
- matéria seca (C) - 22.79%

A densidade (determinada por picnometria) numa amostra de flocos idêntica à usada na análise termogravimétrica é 1.117 (a 25°C).

É possível determinar que, para as condições experimentais anteriormente definidas, a fracção volúmica de sólidos no fermentador (X₁) numa base sem gás é .05058

7.5. Modelização hidrodinâmica

7.5.1. Critério de optimização

O critério de optimização consiste em minimizar o somatório dos quadrados dos resíduos entre os valores experimentais de concentração de xilose e os valores calculados pelo modelo proposto.

A optimização é efectuada arbitrando diferentes valores do atraso na resposta do reactor pistão (2), sendo o parâmetro a optimizar a fracção volúmica de líquido no fermentador Y_1 . Desta forma, também é possível determinar o "hold-up" $-G_1$.

7.5.2. Descrição do programa

Esquemáticamente, o programa de minimização pode ser representado do seguinte modo (Fig. 7.8).

O programa principal faz a leitura e escrita dos dados, chama ou a subrotina de optimização (SrA) e de análise estatística (SrI) ou a subrotina para simulação (SrB) e escreve os resultados finais.

Cada uma das subrotinas referidas têm como função:

- subrotina A - subrotina de minimização de funções por optimização dos seus parâmetros. Esta sub rotina resolve problemas da forma

$$\text{Minimizar } F(x) = \sum_{i=1}^M |f_i(x)|^2$$

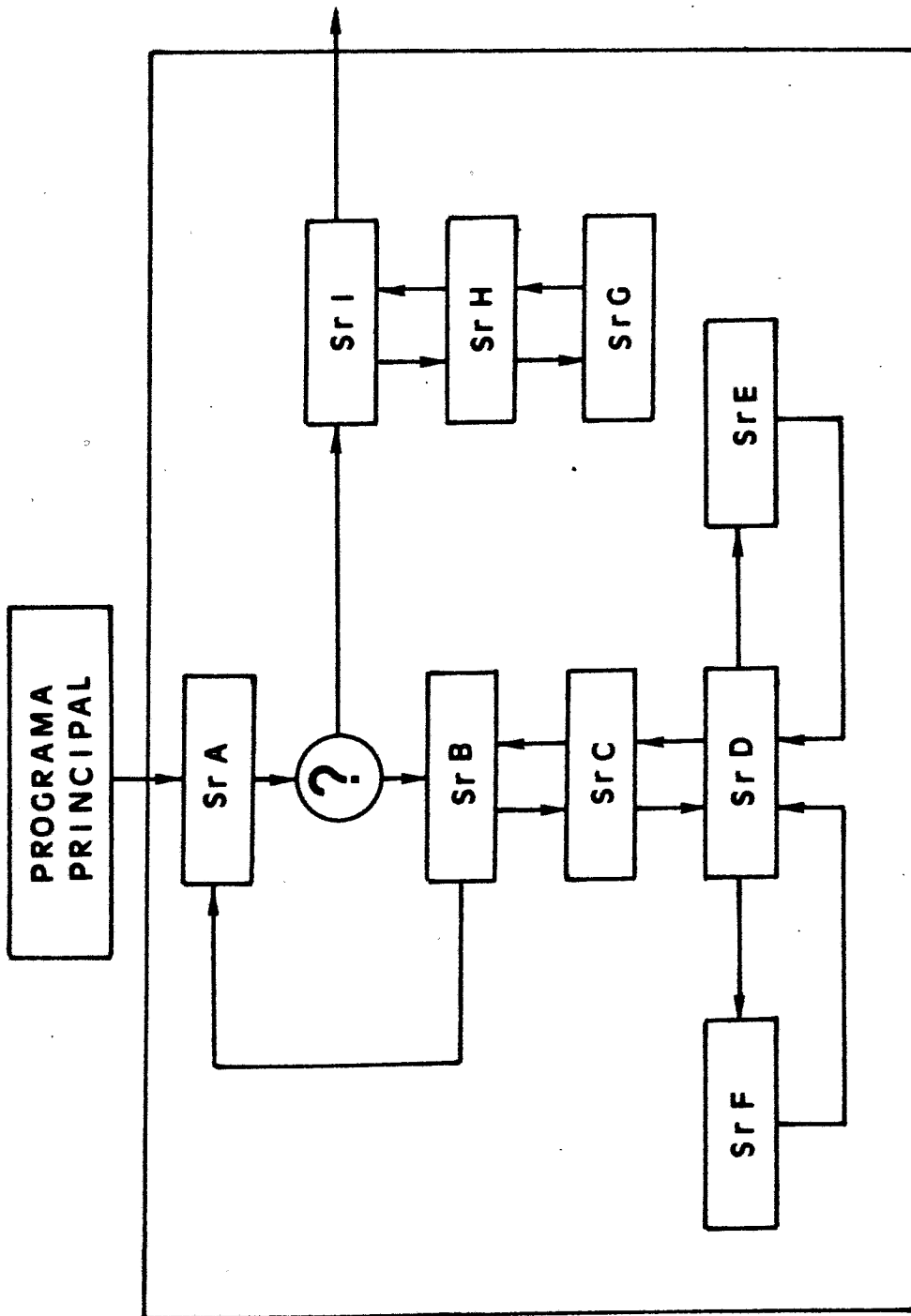


Fig. 7.8 - Esquema de programa utilizado na caracterização hidrodinâmica do fermentador de flocação

pelo método de Meyer e Roth (Meyer R.R., Roth P.M. (1972)) em que $x = (x_1, x_2, \dots, x_N)^T$ com $M > N$.

As funções $f_i(x)$ representam resíduos.

A partir de um conjunto de valores iniciais fornecidos pelo utilizador, a subrotina gera uma sequência de vectores x que convergem para um mínimo local $F(x)$.

A função a optimizar é definida numa subrotina a ser fornecida pelo utilizador.

- subrotina B - subrotina que faz o cálculo da função a minimizar em SrA. Calcula as concentrações teóricas, os resíduos (diferença entre concentrações teóricas e experimentais) e a soma dos quadrados dos resíduos (função objectivo).

- subrotina C - subrotina de integração numérica do sistema de três equações diferenciais de 1ª ordem, resultante do balanço de xilose, pelo método de Butcher (Lapidus L., Seinfeld J.H. (1971)). Chama SrD.

- subrotina D - subrotina que faz o cálculo dos lados direitos do sistema de equações

$$\left(\frac{dC_1}{dt}, \frac{dC_2}{dt}, \frac{dC_3}{dt} \right)$$

e chama a subrotina F, que calcula C4 e a subrotina E que permite

definir o perfil de concentrações de xilose à entrada do sistema.

- subrotina I - subrotina que calcula a variância e intervalo de confiança dos parâmetros otimizados, recorrendo às subrotinas H (inversão de matrizes) e G (resolução de sistemas de equações algébricas lineares).

7.5.3. Resultados

A optimização discreta efectuada para diferentes atrasos (1 a 20 minutos, por passos de 1 minuto) e usando como critérios a amplitude do intervalo de confiança da variável a otimizar - fracção volúmica de gás no fermentador - e respectiva variância e os desvios percentuais das concentrações experimentais de xilose relativamente às determinadas pelo modelo, permite concluir que este é melhor definido para um atraso $Z = 14$ minutos.

O valor obtido para a fracção volúmica de líquido no fermentador é de 72.81%, para uma fracção de sólidos igual a 3.88%, ocupando a fase gasosa (hold-up) 23.31% do volume total da zona de fermentação. O intervalo de confiança da variável optimizada é 4.3% e a variância 3.86×10^{-4} .

Os desvios percentuais médios para a concentração de xilose, exceptuando a análise feita aos 10 minutos na corrente de saída têm

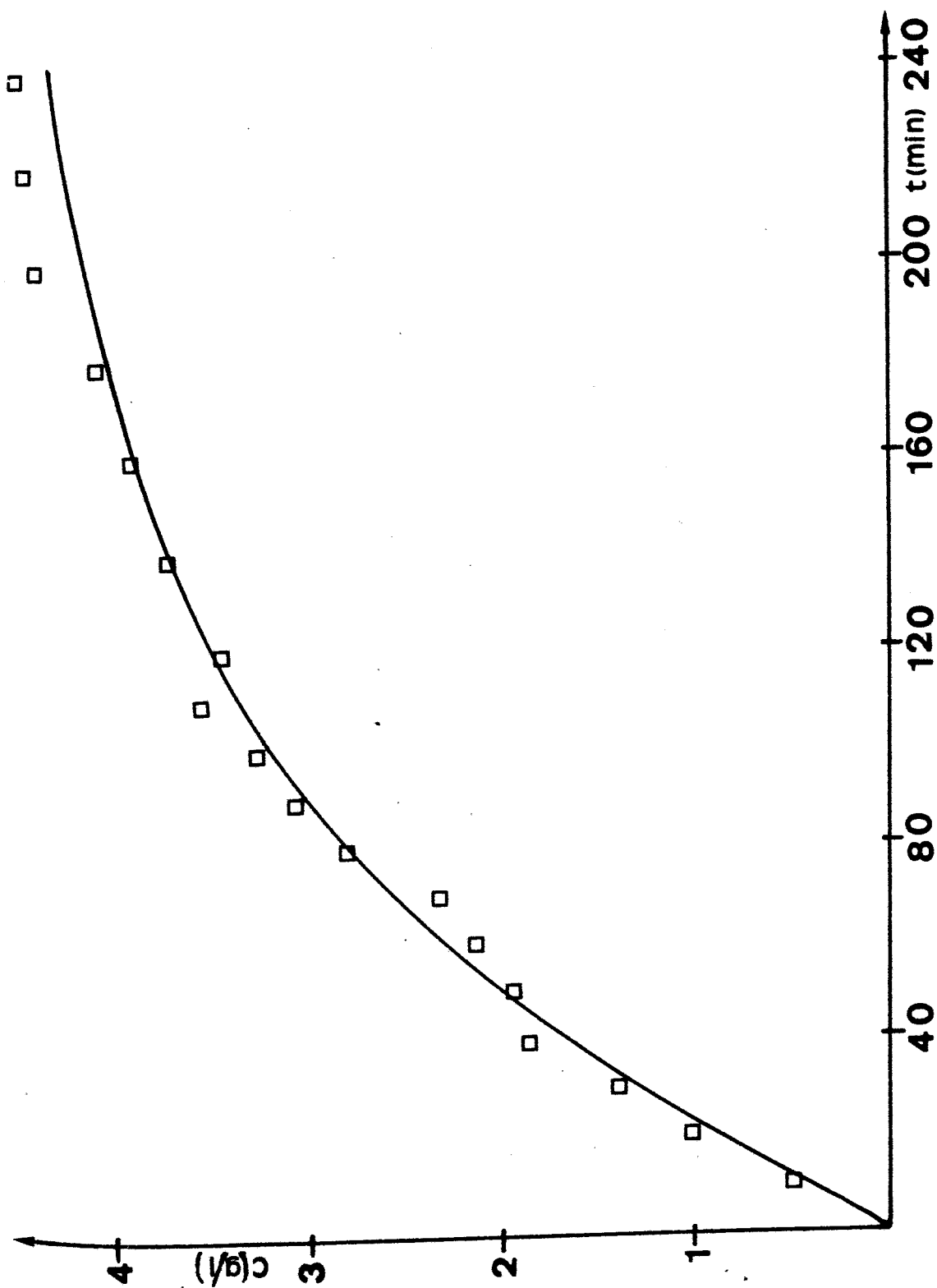


Fig. 7.9 - Resposta do sistema à saída da zona de fermentação a um degrau positivo de xilose, usando o modelo proposto
 □ valores experimentais

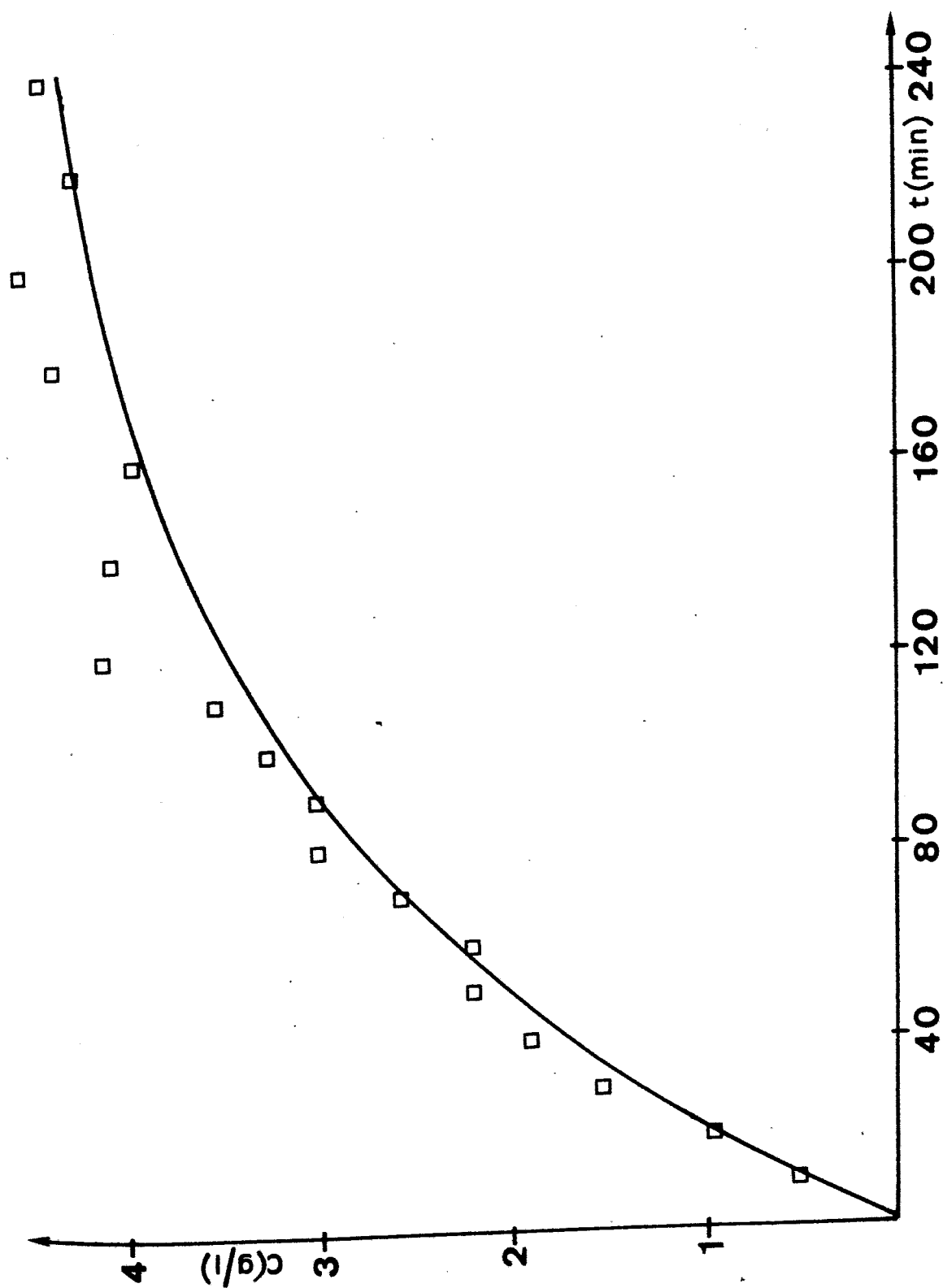


Fig. 7.10 - Resposta do sistema à saída do hidrociclone a um grau positivo de xilose, usando o modelo proposto
 □ valores experimentais

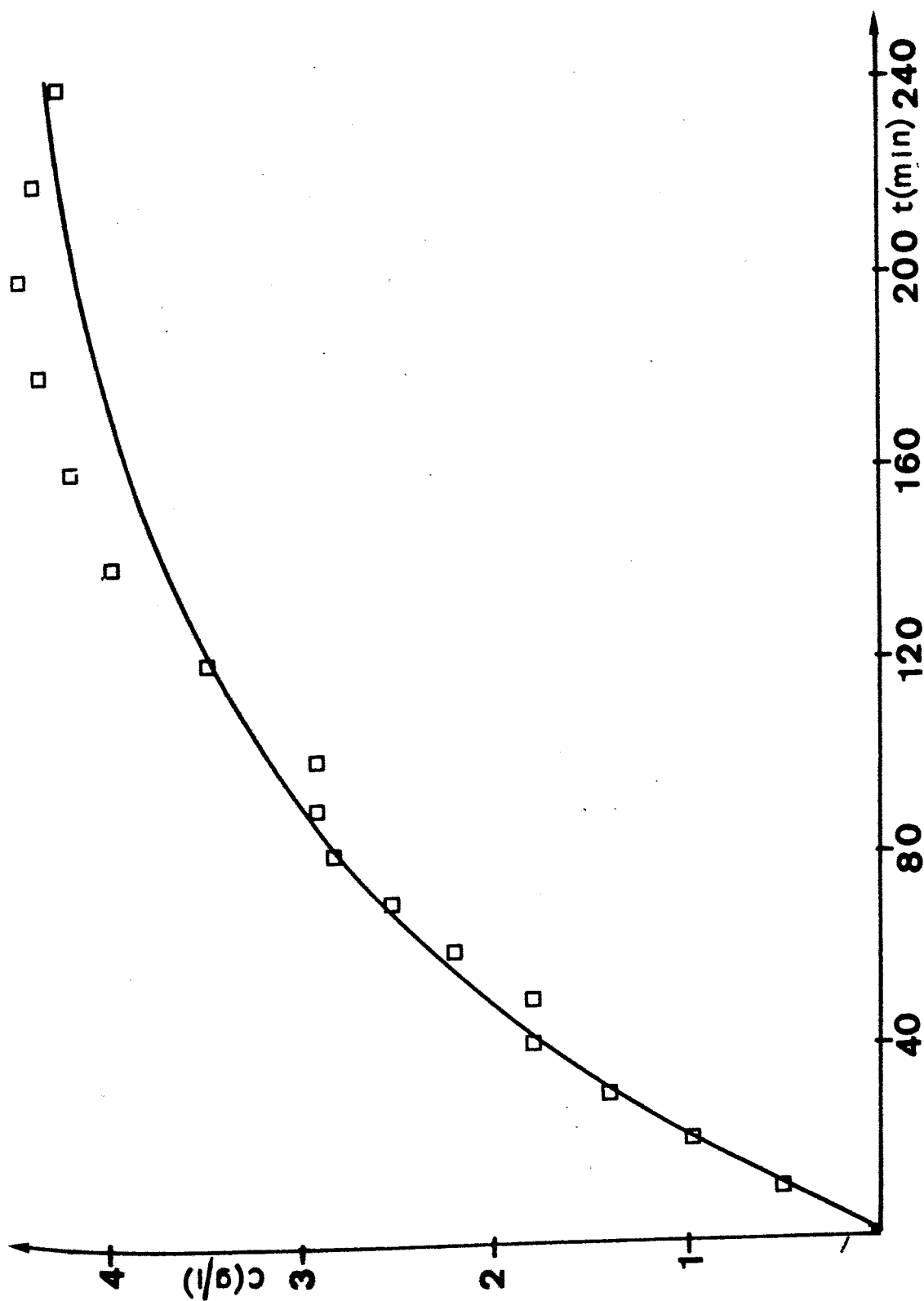


Fig. 7.11 - Resposta do sistema à saída do sedimentador (zona perfeitamente agitada) a um degrau positivo de xilose, usando o modelo proposto
 □ valores experimentais

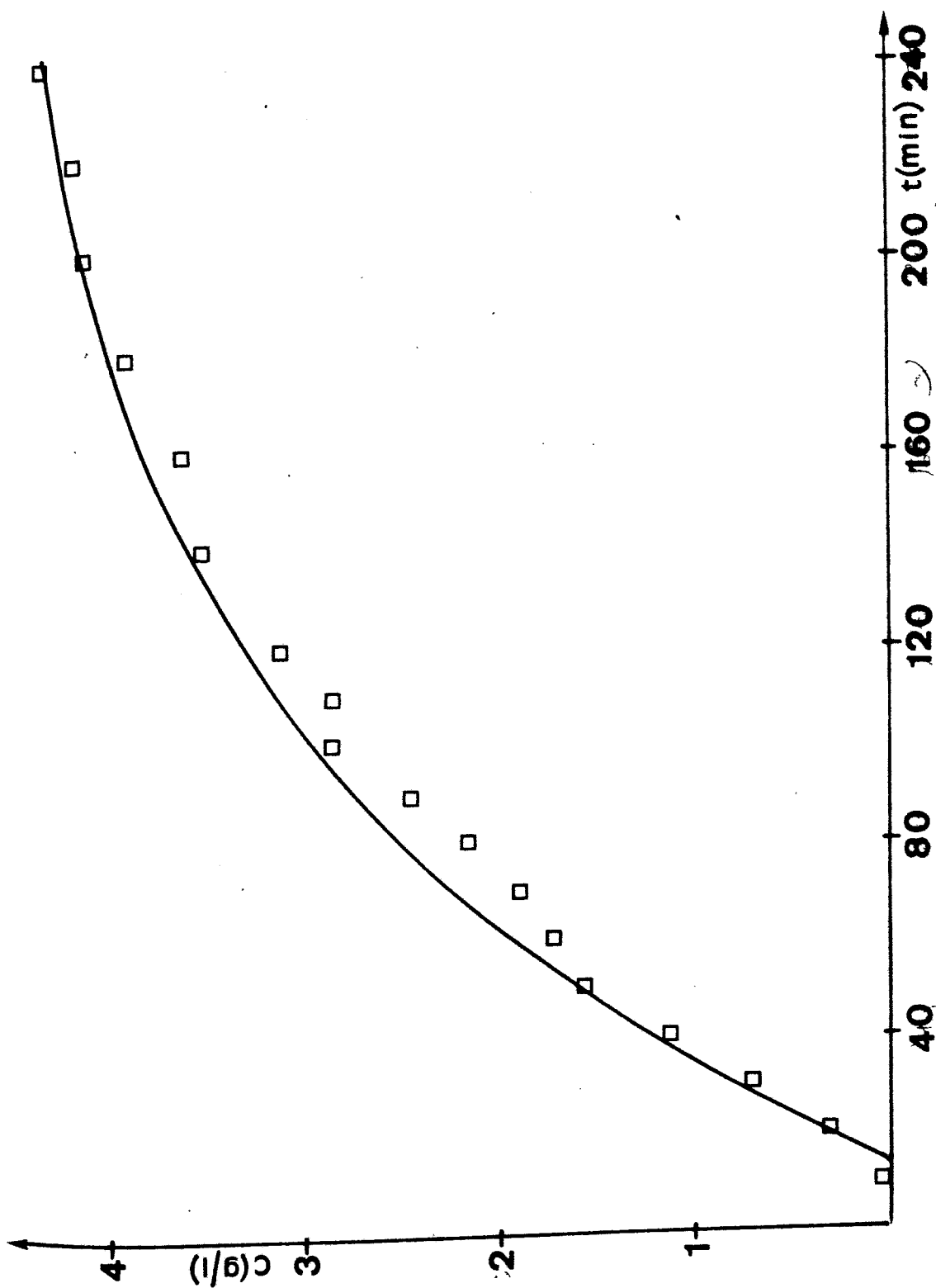


Fig. 7.12 - Resposta do sistema à saída do sistema global a um

degrau positivo de xilose, usando o modelo proposto

□ valores experimentais

nos diferentes pontos de amostragem os seguintes valores:

Amostra recolhida em 1	_____	4.71
Amostra recolhida em 2	_____	5.35
Amostra recolhida em 3	_____	5.44
Amostra recolhida em 4	_____	7.49

O desvio percentual mais elevado obtido para o tempo 10 minutos no efluente pode ser justificado por um curto-circuito que não é relevante para o modelo proposto.

Os resultados obtidos para as concentrações de xilose pelo modelo seleccionado encontram-se representados nas Figs. 7.9, 7.10, 7.11 e 7.12.

Uma análise cuidada dos diferentes valores determinados experimentalmente indica que a densidade dos flocos é o parâmetro susceptível de ser mais afectado por imprecisão, pelo que foi feita uma análise de sensibilidade do modelo à densidade dos flocos (variação $\pm 3\%$).

TAB. 7.1 - Análise de sensibilidade do modelo à variação na densidade de flocos

Densidade	1.117	1.151	1.083
X_1 (%)	3.88	3.52	4.27
Y_1 (%)	72.81	72.59	73.03
G_1 (%)	23.31	23.89	22.70

Os resultados obtidos (Tab. 7.1) demonstram que as fracções volúmicas de líquido e gás no fermentador são praticamente independentes dos desvios experimentais a que é sujeita a determinação da densidade dos flocos, sendo a fracção de sólidos aquela que é, percentualmente, mais afectada.

7.6. Modelização Cinética

Neste parágrafo referimos somente as equações desenvolvidas nos capítulos anteriores e, que caracterizam:

- a variação de concentração em biomassa no interior do fermentador (X) com a taxa de diluição referida ao volume útil de fermentação (D_F) e a concentração inicial de substrato (S_0).

$$X = (-0.072 S_0 + 4.27) + (2.58 S_0 - 94.00) D_F \quad (6.5)$$

e taxa específica de produção de etanol (v)

$$v = 2.215 \exp (- .049 \cdot P) \quad (6.6)$$

Estas equações , como anteriormente referido, foram desenvolvidas para estado estacionário.

7.7 Modelo global

Em função das relações anteriormente definidas, poderemos

Simplificando e substituindo v e X pelas equações 6.5 e 6.6, obtém-se a seguinte expressão que caracteriza a produção de etanol (P_S) no sistema de floculação:

$$P_S = (2.215 \exp (-.049 \times .489 \times (S_0 - S)) \times \\ \times ((-.072 S_0 + 4.27) + (2.58 S_0 - 94.00) \times D_F)) / D_F \quad (7.21)$$

Esta expressão é função apenas da taxa de diluição e da concentração do substrato na gama de taxas de diluição e concentrações de lactose experimentais

Na Tab. 7.2 é confirmada a validade da equação 7.21, mediante o cálculo dos desvios percentuais (E) entre a concentração de etanol medida e a calculada.

TAB. 7.2 -Comparação entre os valores experimentais de concentração de etanol e os calculados

S_0 (g/l)	D_F (h ⁻¹)	P_{exp} (g/l)	P_{cal} (g/l)	E (%)
57.2	.210	28.80	28.88	.3
	.460	27.45	30.69	10.5
	.848	28.13	29.63	5.1
76	.223	36.89	35.61	3.6
	.458	36.87	35.98	2.5

O modelo global desenvolvido permite a previsão em estado estacionário da concentração em biomassa no interior do fermentador e

da concentração em etanol no efluente para um conjunto alargado de condições experimentais, com uma precisão de 5%.

Em relação aos resultados obtidos neste capítulo, deve ser salientado que, por este método conseguiu efectuar-se o cálculo do "hold-up".

As determinações existentes na literatura (Murthy V.V.P.S. et al. (1987)) não consideram no cálculo do "hold-up" a componente resultante do gás libertado no decorrer da fermentação.

O método por nós utilizado considera esse factor que, como a seguir demonstramos, contribui, em culturas de alta densidade celular, com uma fracção importante para o "hold-up".

De facto, considerando, por exemplo, que no interior do fermentador a concentração em biomassa é 40 g/l e que a taxa específica de consumo de lactose é 3 g/g.h (Cap.6) podemos, recorrendo à estequiometria da reacção de conversão da lactose em etanol e CO₂ (Cap.2), calcular o caudal de CO₂ libertado durante a fermentação (Q_{CO2}) pela expressão:

$$Q_{CO1} = -q_s \times \frac{n'_{CO2} \times M_{MCO2}}{M_{Mlactose}} \times X_1 \times \frac{1}{M_{MCO2}} \times \bar{V}_{CO2} \quad (7.22)$$

em que:

$-q_s$	— taxa específica de consumo de lactose (g/g.h)
n'_{CO_2}	— n° de moles de CO_2 libertados por mole de lactose consumida
$M_{M_{CO_2}}$	— massa molecular de CO_2
$M_{M_{lactose}}$	— massa molecular de lactose
X_1	— concentração em biomassa (g/l)
$\bar{V}_{CO_2}$	— volume molar de CO_2

O valor obtido para o caudal de gás libertado é 31.4 l/h.

Ora, se nos lembrarmos que o débito de arejamento é, aproximadamente, 3 l/h, verificamos que o CO_2 libertado representa 90% do volume ocupado, em cada instante, pela fase gasosa. Daí a razão de, em nossa opinião, sempre que não se entrar em linha de conta com o CO_2 libertado, se cometer um erro altamente significativo no cálculo do "hold-up".

CAPITULO 8: CONCLUSÕES

A primeira conclusão a extrair dos resultados obtidos e que foi fundamental para a realização de todo o trabalho é que foi possível induzir, utilizando uma metodologia de fermentação em contínuo, uma estirpe floculante de Kluyveromyces marxianus a partir de uma variedade não floculante.

Com a obtenção desta estirpe, puderam ser eliminadas as diferenças existentes entre variedades pertencentes à mesma espécie mas com características metabólicas diferentes e evidenciar as diferenças nas características cinéticas e as diferenças da composição das paredes celulares relacionadas com a floculação.

A comparação em descontinuo, dos parâmetros cinéticos da variedade floculante com os da variedade não floculante ao demonstrar uma diminuição quer da taxa específica de crescimento (mais significativa) quer de produção de etanol sugeriu a existência de limitações difusionais no interior dos agregados das leveduras.

A confirmação de tal facto foi possível mediante o cálculo do factor de eficácia utilizando um microreactor de membrana especialmente concebido para o efeito. Este sistema também permitiu analisar a influência de um aditivo de floculação (resina catiónica) no controle das limitações difusionais no interior dos agregados. Associado ao cálculo do factor de eficácia determinamos a porosidade dos flocos, com ou sem aditivo indicando os valores obtidos que o factor de eficácia é directamente proporcional à porosidade.

O estudo da composição bioquímica das paredes das duas estirpes permitiu detectar diferenças significativas no conteúdo proteico: na variedade floculante o teor em proteína é cerca de 30% superior ao da não floculante. Paralelamente, verificamos que a incubação das células floculantes com pepsina eliminava a capacidade de floculação que também era fortemente reduzida após esterificação com uma mistura metanol/HCl. Estes resultados permitiram concluir que existe uma proteína implicada no mecanismo de floculação.

Por electroforese em gel de poliacrilamida realizada com as proteínas de parede celular detectamos na variedade floculante a presença de uma proteína com um peso molecular aparente de 37 000 daltons que não existia na estirpe não floculante.

A análise da fisiologia de floculação da levedura Kluveromyces marxianus foi complementada determinando a influência do pH e de diferentes catiões (di, tri e tetraivalentes) na formação de agregados. Entre estes deu-se particular relevo ao cálcio.

A constatação de que as células não floculantes exibiam uma retenção de cálcio 3 vezes mais elevada que as células floculantes e que a quantidade retida após submetidas a tratamento químico ou enzimático era substancialmente reduzida, associada ao factor de ter sido necessário aumentar a concentração de cálcio (adição de 1 g/l de CaCl_2) na corrente de alimentação no fermentador contínuo durante o processo de indução de floculação permitiu concluir que a presença de cálcio era necessária mas não suficiente para a floculação.

A acção do pH na floculação indica que o mecanismo de formação dos flocos de leveduras é baseado em ligações iónicas (tipo ácido fraco) entre as cargas negativas da parede celular. O estabelecimento de pontes é efectuado por diferentes catiões conforme pudemos concluir pela realização de testes de sedimentação da estirpe floculante de K. marxianus na presença de iguais quantidades de catiões di, tri e tetraivalentes.

O fermentador utilizado nos processos em contínuo e constituído por uma zona de fermentação e outra de separação, apresenta, na gama de taxas de diluição testadas, uma taxa de acumulação de biomassa que representa cerca de 90% da taxa de crescimento, o que demonstra a sua elevada eficiência como sistema de culturas de alta densidade celular. Foi possível obter, para uma concentração de substrato na alimentação de apenas 57 g/l e operando a uma taxa de diluição (referida ao volume da zona de fermentação) de $0.64h^{-1}$, uma concentração de biomassa no fermentador igual a 45 g/l (peso seco) que é cerca de dez vezes superior à obtida nos quimiostatos convencionais.

Outro aspecto importante do fermentador utilizado reside na obtenção, para todas as taxas de diluição, de rendimentos de conversão de lactose em etanol da ordem dos 90%. Em termos de produtividade em etanol obtivemos, nas mesmas condições acima referidas, um valor de 24.4 g/l.h, que é cerca de 12 vezes mais elevado que o obtido nos quimiostatos convencionais.

De qualquer modo, em condições que significam uma maior actividade fermentativa, o sistema é altamente instável, manifestando-se tal fenómeno pela purga sistemática de biomassa.

A análise da influência da taxa de diluição nos parâmetros cinéticos de fermentação indica que a renovação mais rápida do meio tem como principais consequências a eliminação das paragens de fermentação e o aumento das velocidades de crescimento e de consumo de lactose. Este aumento dos parâmetros de fermentação para as taxas de diluição mais elevadas sugere a existência de um microambiente nocivo no interior dos flocos que é melhorado pela renovação mais rápida do meio.

O aumento da taxa de recirculação apresenta igualmente um efeito positivo na actividade do fermentador, principalmente na sua estabilidade.

**CAPITULO 9: SUGESTÕES PARA TRABALHO
FUTURO**

O trabalho apresentado esclarece apenas alguns dos aspectos relacionados com a floculação das leveduras, nomeadamente Kluyveromyces marxianus.

O desenvolvimento de ideias para trabalho futuro constitui um aspecto extremamente importante a extrair dos resultados obtidos.

Na parte de projecto, seria de encarar a melhoria do desenho do bioreactor, de modo a eliminar a instabilidade existente nas condições de maior actividade fermentativa e, como tal, permitir alargar a análise efectuada a maiores concentrações de biomassa resultantes da utilização de concentrações de substrato na alimentação e de taxas de diluição mais elevadas.

Outros aspectos importantes a desenvolver em trabalho futuro prendem-se com o estudo da fisiologia de floculação.

O isolamento e caracterização do pseudomicélio em flocos de Kluyveromyces marxianus constitui um desses aspectos. Outro aspecto a desenvolver é a investigação da composição e da estrutura da proteína de floculação e das suas propriedades, assim como a regulação da sua expressão. Associado aos fenómenos ligados à regulação da floculação é necessário, além da já descrita indução de floculação a partir de um estirpe não floculante, o desenvolvimento de culturas síncronas de forma a ter grande quantidade de células no mesmo estado fisiológico, podendo então a composição parietal ser analisada com mais rigor.

Importante é também continuar a análise da acção dos diferentes catiões nos mecanismos de floculação.

O controle dos mecanismos de difusão nos flocos é uma variável de extrema importância pelo que é necessário alargar a outros aditivos a análise feita com a resina catiónica BPA 1000. Esse controle associado ao alargamento do modelo desenvolvido permitirá encarar a médio prazo a possibilidade de controle adaptativo ao processo de fermentação.

Como ideia final para trabalho futuro, o estudo efectuado com Kluyveromyces marxianus deve ser alargado a outras estirpes de leveduras.

APENDICE A.1: Indução de floculação
em fermentação
contínua de S. bayanus

Indução da floculação em fermentação contínua de Sacharomyces bayanus

Usando o mesmo princípio desenvolvido para a indução de floculação em Kluyveromyces marxianus tentamos a indução de floculação em S. bayanus.

A selecção foi feita em contínuo, no fermentador descrito na Fig. A.1.1.

O sistema é todo em vidro e tem um volume interior de 42 cm³. Apresenta uma camisa exterior para ser possível controlar a temperatura de operação.

A parte inferior é separada da parte superior onde existe um funil invertido para impedir a saída de flocos do interior do fermentador.

O arejamento e a alimentação são feitos na base do sistema e a temperatura mantida a 30°C.

O meio nutritivo é idêntico ao usado na indução de floculação em K. marxianus, sendo a lactose substituída, como fonte de carbono, pela sacarose (40 g/l). O pH é mantido constante e igual a 4.0 (pela adição de tampão citrato/fosfato constituído por 55.9% (v/v) de ácido cítrico 0.1 M e 44.1% (v/v) de Na₂ HPO₄ 0.2 M).

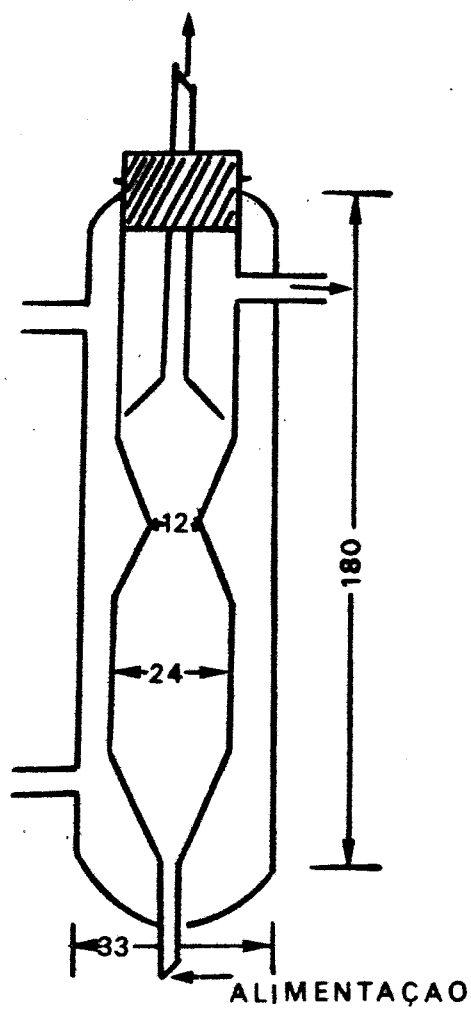


Fig. A.1.1 - Reactor utilizado na indução de floculação em *Sacharomyces bayanus*

A taxa de diluição de arranque foi 0.06 h^{-1} , tendo sido gradualmente aumentada até 0.25 h^{-1} .

O sistema manteve-se em operação mais de 60 dias e no final deste período efectuamos o teste de sedimentação de Helm modificado para confirmar o que já tínhamos detectado por microscopia óptica - formação de flocos em Sacharomyces bayanus.

Na Fig. A1.2 representamos os resultados obtidos neste ensaio que indicam a indução de floculação em S. bayanus.

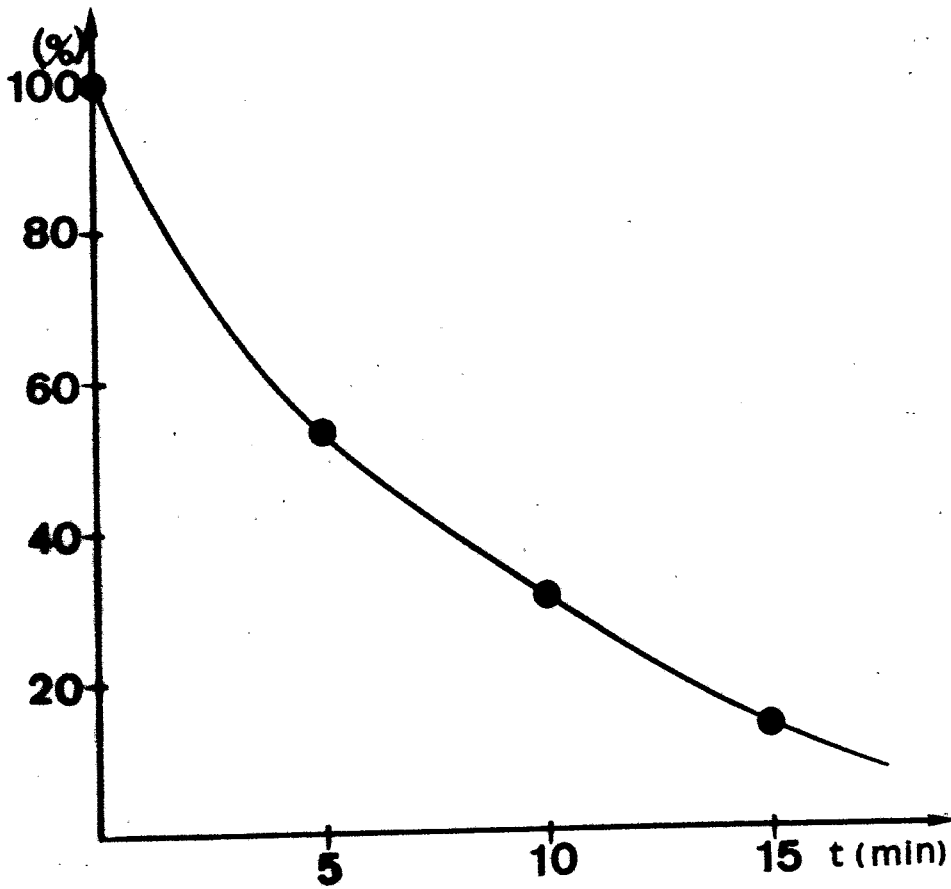


Fig. A.1.2 - Teste de sedimentação da estirpe flocculante de S. bayanus

APENDICE A.2: Indução fisiológica de
floculação em
diferentes estirpes de
leveduras

Indução fisiológica de floculação em leveduras

A verificação da existência de pseudomicélio em Kluyveromyces marxianus após a indução da floculação colocou-nos a seguinte pergunta:

- será que o crescimento de outras estirpes, em meio susceptível de induzir formação de pseudomicélio, pode provocar o aparecimento de flocos?

Para tentar responder a esta pergunta cultivamos diferentes estirpes de leveduras em caixas de Petri num meio sólido (20 g/l de agar) referido como indutor de pseudomicélio (Eubanks V.L., Beuchat L.K. (1982)) e com a seguinte composição, por litro de água corrente:

Extrato de levedura	3 g/l
Extrato de malte	3 g/l
Peptona	5 g/l
Glucose	10 g/l

Para o crescimento de Kluyveromyces marxianus a glucose era substituída por igual concentração de lactose.

As leveduras testadas foram:

Kluyveromyces marxianus

Sacharomyces uvarum

Sacharomyces bayanus

Sacharomyces carlsbergensis

Sacharomyces sake

Sacharomyces cerevisiae UG5

Zigosacharomyces rouxii

Schizosacharomyces ICVM

Candida pseudotropicalis

Passadas três semanas após a inoculação em caixa de Petri das diferentes leveduras verificamos nos bordos das colônias formadas pelas diferentes estirpes o aparecimento de formações alongadas que supusemos ser pseudomicélio.

Nesta data, transferimos as células que apareciam nas estruturas pseudomiceliares de cada estirpe para quatro matrizes com

50 ml dos seguintes meios de cultura:

Meio A - YM Broth-Difco (meio rico)

Meio B - YM Broth-Difco, ao qual eram adicionados 50 g/l de glucose (meio rico).

Meio C - Meio semi-sintético com a seguinte composição:

KH ₂ PO ₄	5 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/l
Extrato de levedura	1 g/l
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0.4 g/l
Glucose	10 g/l

Meio D - Meio idêntico ao anterior, mas com 50 g/l de glucose (meio pobre).

Para o crescimento de K. marxianus a glucose era substituída por igual quantidade de lactose.

Todos os meios foram preparados em água corrente e o pH dos meios C e D foi ajustado a 4 pela adição de ácido ortofosfórico.

As culturas foram crescidas a 30°C numa incubadora orbital.

O processo utilizado para induzir, ou tentar induzir, a floculação foi o seguinte:

- Após as leveduras terem atingido a fase estacionária de

crescimento, a agitação era eliminada e permitia-se durante um período de aproximadamente 30 minutos que as células sedimentassem. Seguidamente, o sobrenadante era decantado e adicionava-se, esterilmente, a cada um dos matrizes meio de cultura com a composição correspondente e que tinha sido previamente preparado.

O processo foi repetido, em média, durante cinco culturas.

No fim deste período, recolhemos o sedimento de biomassa de cada um dos matrizes e realizamos o teste de sedimentação para cada uma das estirpes, estando os resultados representados nas Figs. A2.1 a A2.9.

A análise dos resultados dos testes de sedimentação indica que:

- no meio A (meio rico com menor concentração em glucose) todas as estirpes, exceptuando Schizosacharomyces ICVM formaram flocos.

- no meio B (meio rico com maior concentração em açúcar) há, relativamente ao meio A, uma diminuição do número de variedades que formaram flocos.

- no meio C (meio pobre com menor concentração em açúcar) o sucesso na indução de floculação é idêntico ao obtido em B.

- no meio D (meio pobre com maior teor em açúcar) só Kluyveromyces marxianus e Sacharomyces bayanus flocularam.

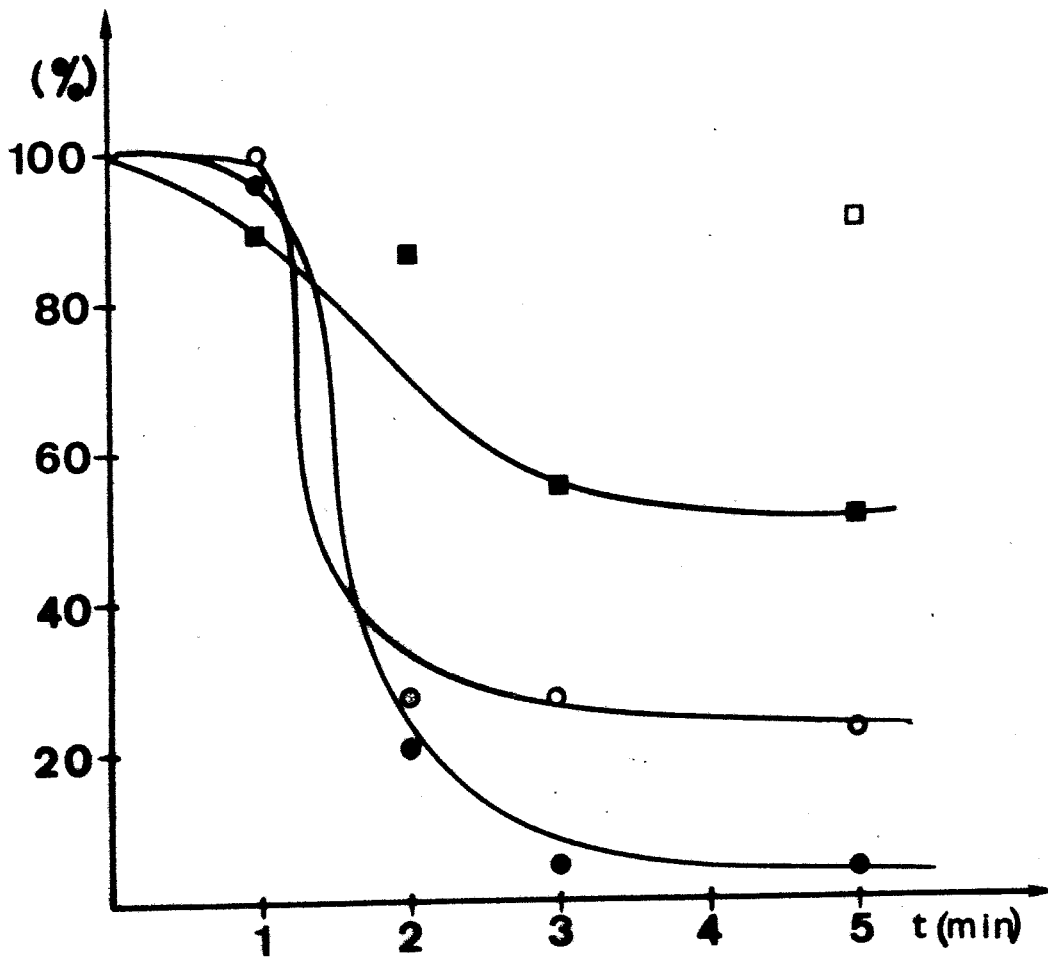


Fig. A.2.1 - Teste de sedimentação de *K. marxianus* crescida em

● meio A; ○ meio B

■ meio C; □ meio D

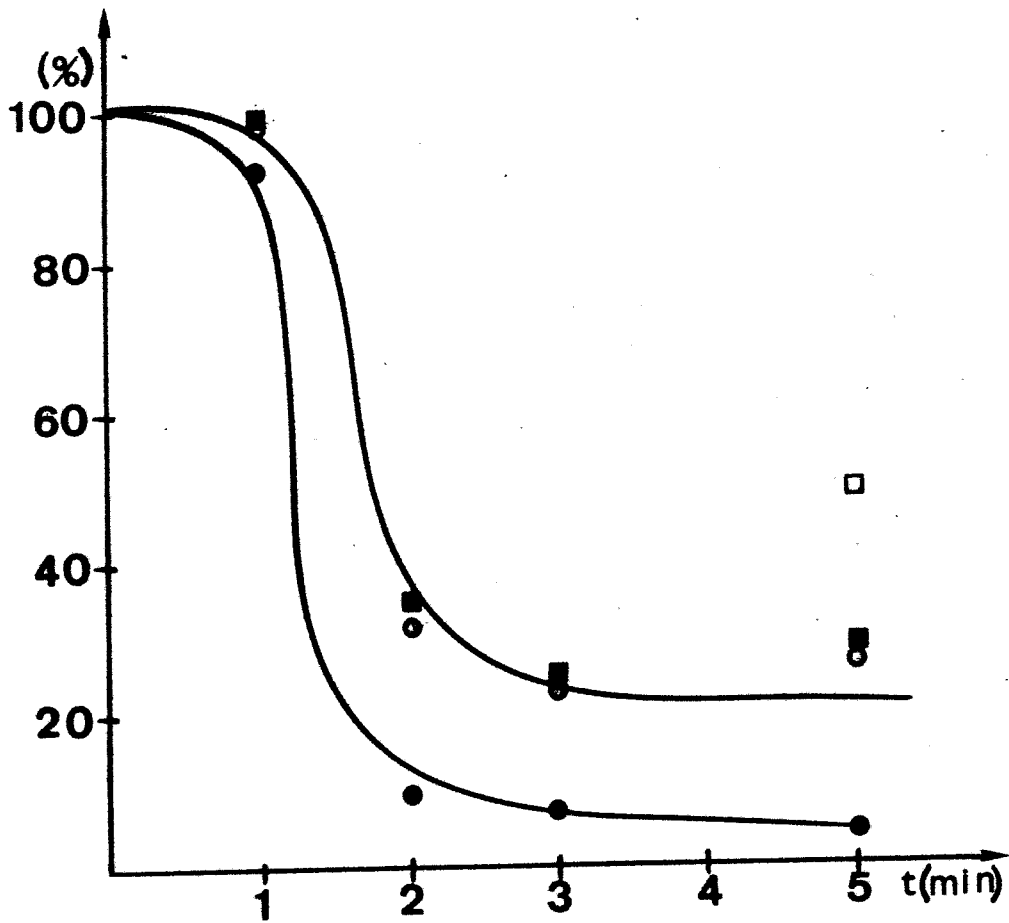


Fig. A.2.2 - Teste de sedimentação de *Sacharomyces uvarum* crescida em

● meio A; ○ meio B

■ meio C; □ meio D

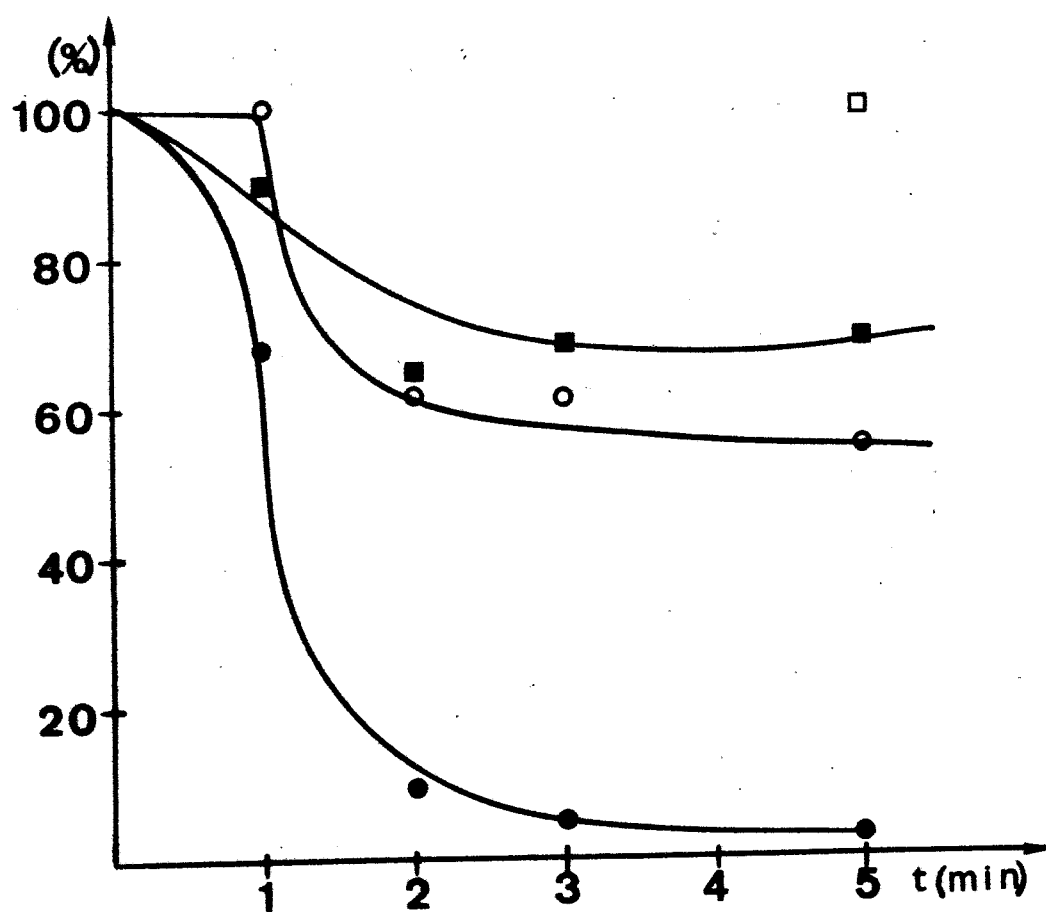


Fig. A.2.3 - Teste de sedimentação de *Sacharomyces bayanus* crescida em

● meio A; ○ meio B

■ meio C; □ meio D

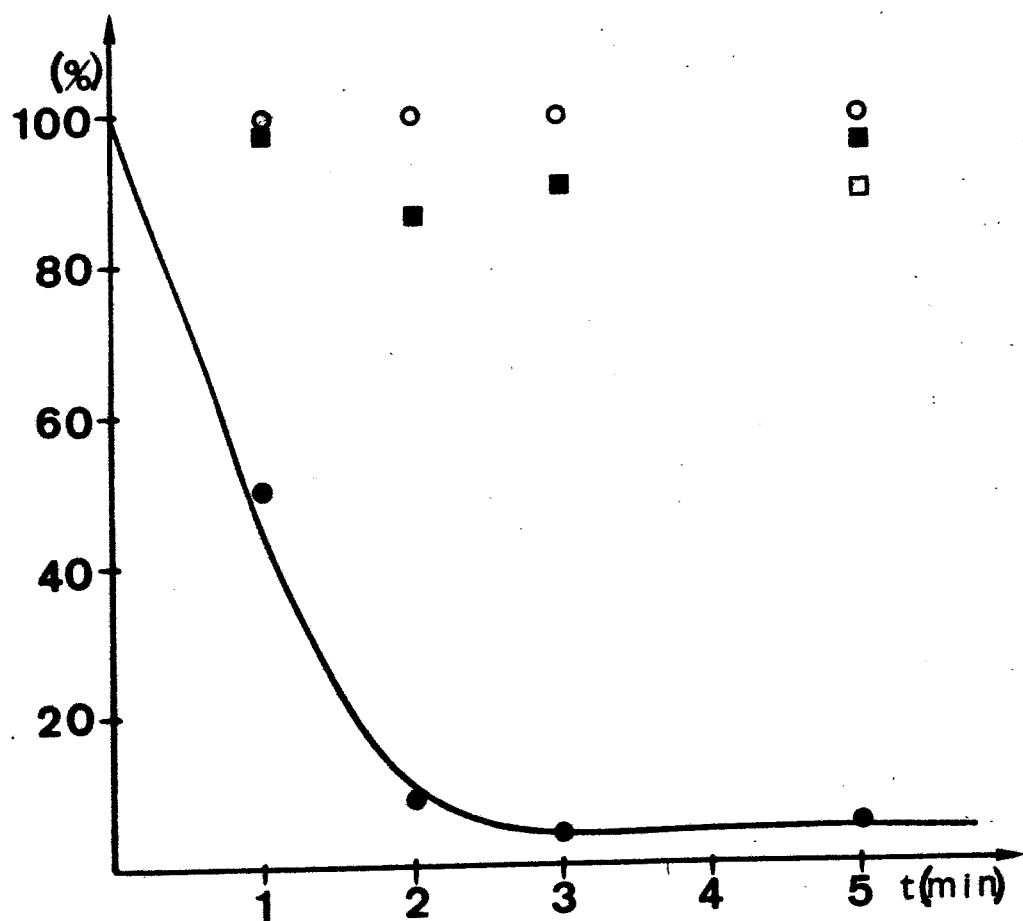


Fig. A.2.4 - Teste de sedimentação de *Saccharomyces carlsbergensis* crescida em

● meio A; ○ meio B

■ meio C; □ meio D

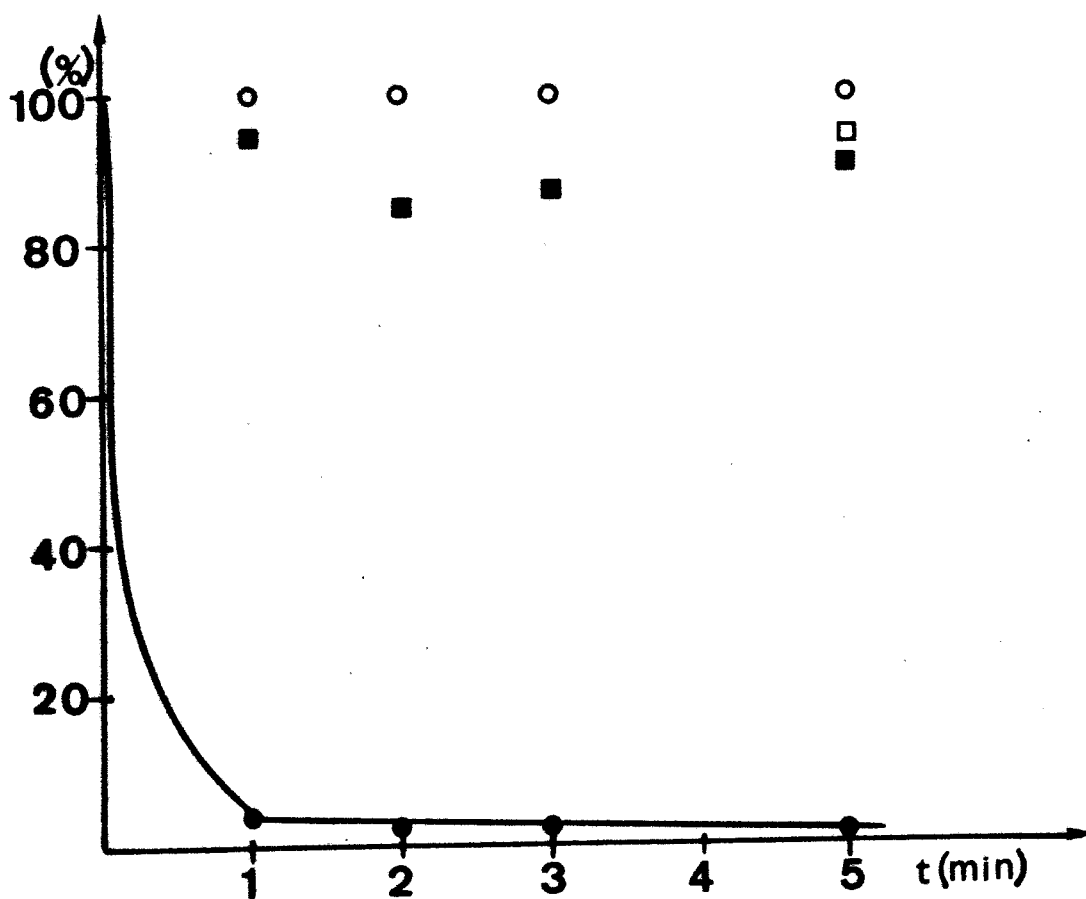


Fig. A.2.5 - Teste de sedimentação de *Sacharomyces sake* crescida em

● meio A; ○ meio B

■ meio C; □ meio D

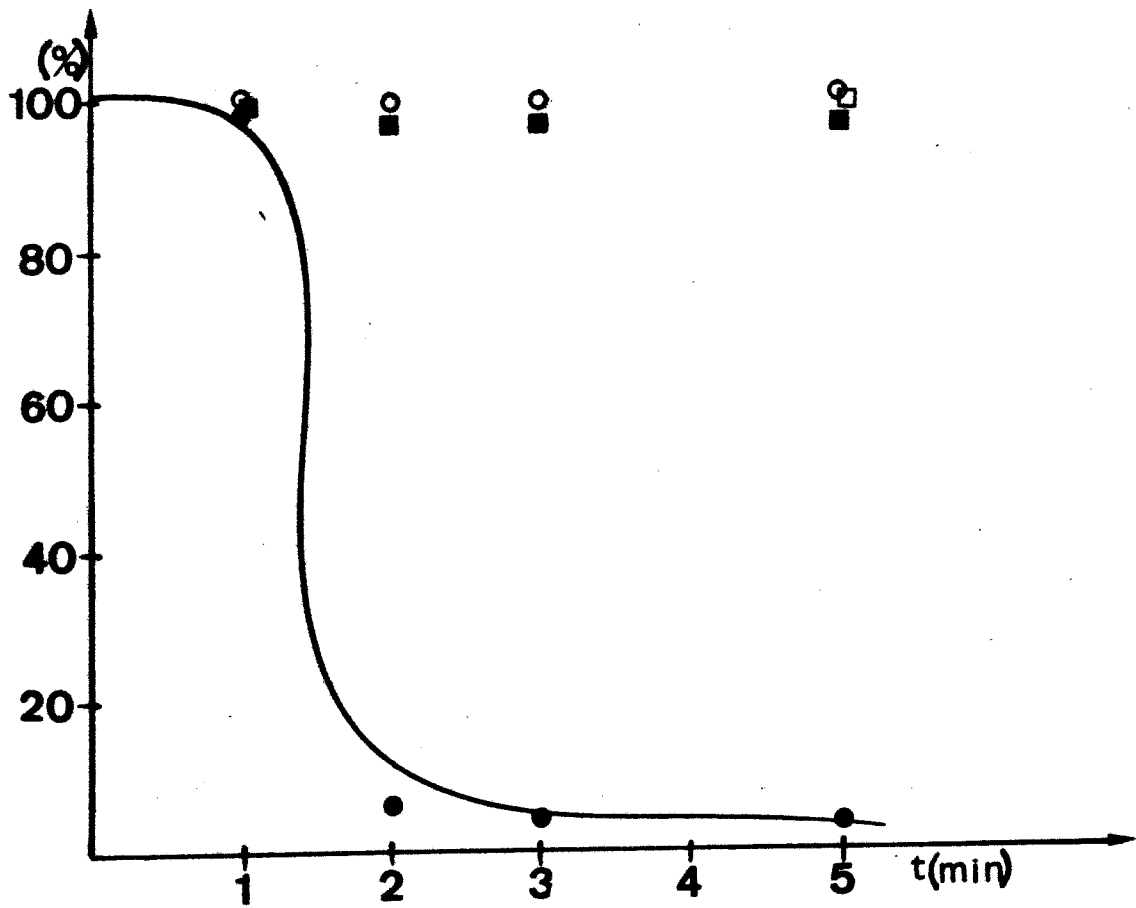


Fig. A.2.6 - Teste de sedimentação de *Sacharomyces cerevisiae* UG5
crescida em

● meio A; ○ meio B
■ meio C; □ meio D

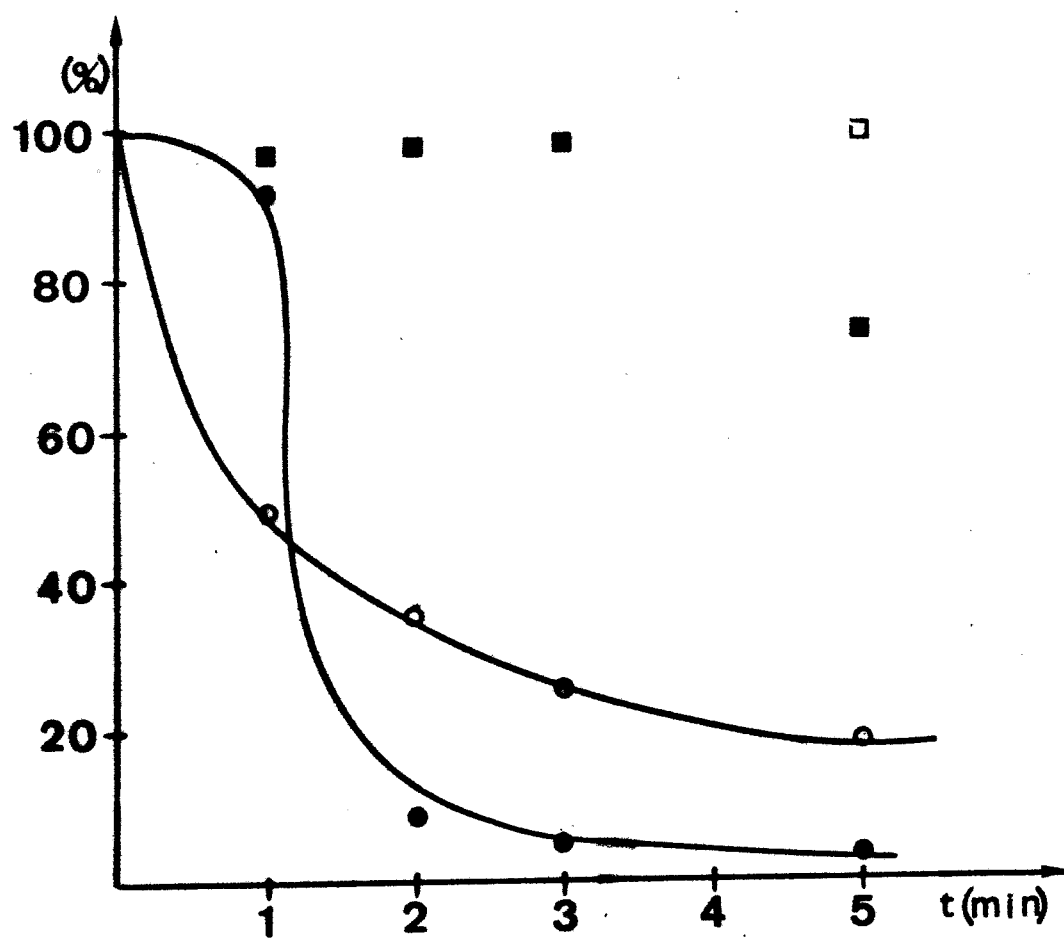


Fig. A.2.7 - Teste de sedimentação de *Zigosacharomyces rouxii*
crescida em
● meio A; ○ meio B
■ meio C; □ meio D

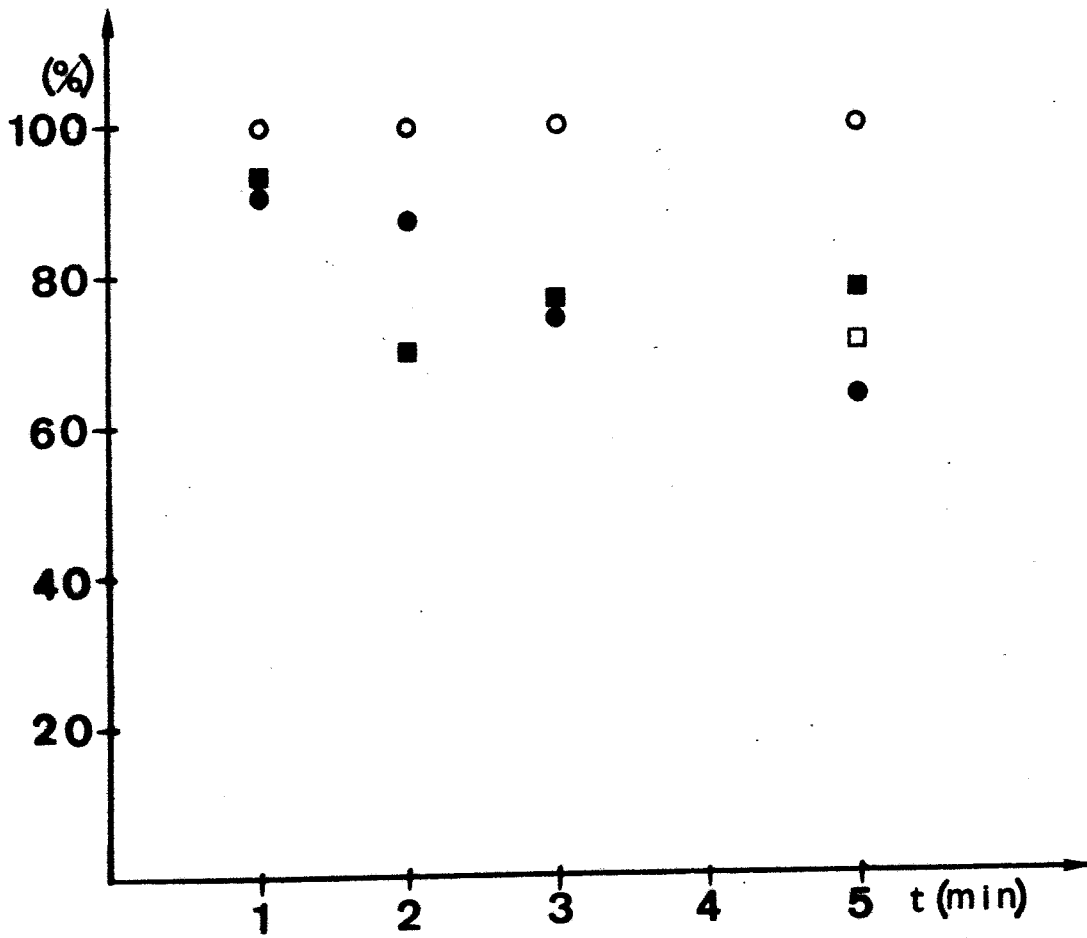


Fig. A.2.8 - Teste de sedimentação de Schizosacharomyces ICVM crescida em

● meio A; ○ meio B

■ meio C; □ meio D

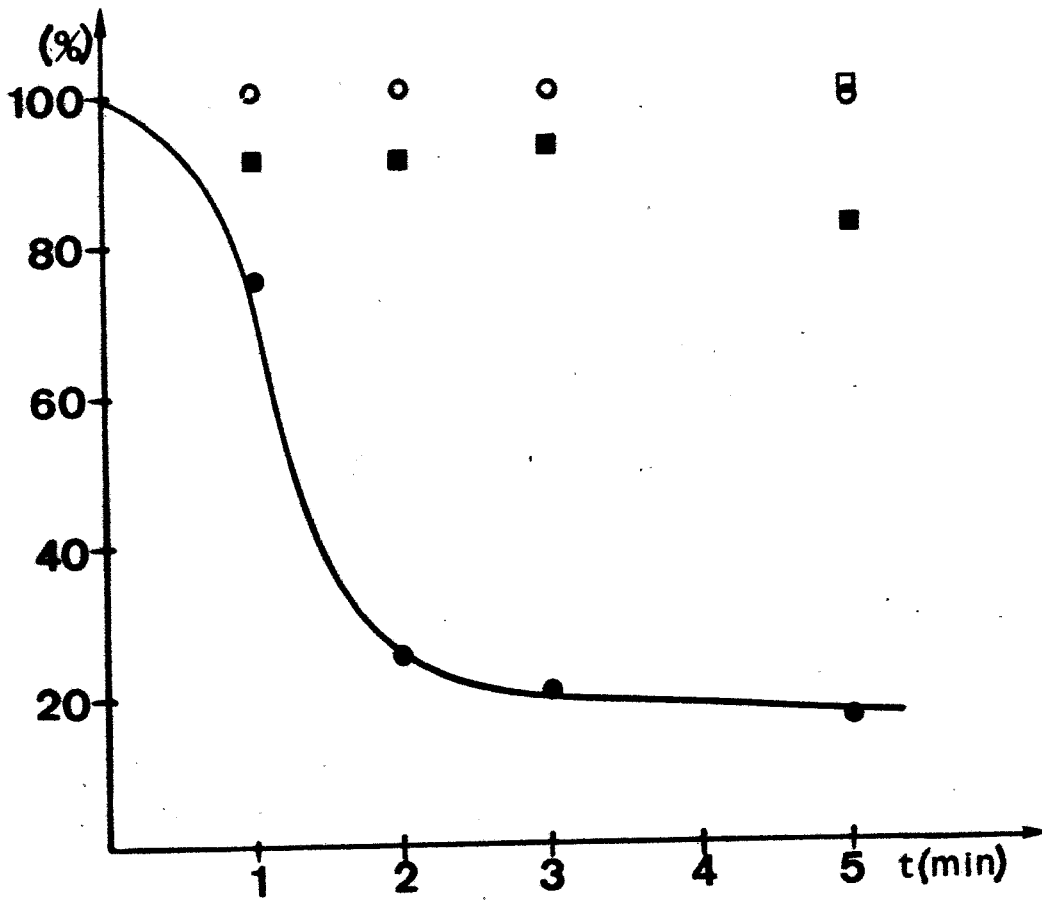


Fig. A.2.9 - Teste de sedimentação de *Candida pseudotropicalis* crescida em

● meio A; ○ meio B

■ meio C; □ meio D

Em função destes resultados algumas questões podem ser levantadas e conclusões retiradas:

- provavelmente, as culturas são ainda bastante jovens para haver associado ao aparecimento de flocos, formação de pseudomicélio.

- a diminuição da capacidade de floculação pode estar associada ao abaixamento do pH que se verifica nas culturas com maior concentração em açúcar. O abaixamento do pH pode alterar o equilíbrio iónico existente e inibir a formação de flocos.

- outra hipótese, para a menor eficácia na indução de floculação pode ser a acção inibidora das maiores concentrações em açúcar.

- por outro lado, o facto de no meio A, quase todas as estirpes flocularem, sugere a existência na sua composição de algum ou alguns elementos fundamentais para a floculação.

- a floculação não está associada à reprodução sexuada das leveduras, uma vez que foi possível induzi-la em Candida pseudotropicalis (levedura não esporulante) (Guiraud J., Galzy P. (1980), Kreger van Rij N.J.W. (1984)).

- será que é necessário crescer inicialmente as leveduras em meio indutor da formação de pseudomicélio, para obter floculação?

Este conjunto de resultados e os problemas por eles levantados constituem elementos de base para trabalho futuro.

APENDICE A.3: Sistema automático de
medição de caudais
gasosos

Sistema automático de medição de caudais gasosos

O conhecimento dos caudais gasosos libertados no decurso de uma fermentação é uma variável de extrema importância. Quando os caudais são pequenos a leitura torna-se extremamente difícil aendo necessário o desenvolvimento de métodos simultaneamente rigorosos e simples.

Nesta secção, descrevemos um sistema (Fig. A3.1) baseado na contagem de impulsos eléctricos desencadeados pelo movimento de um electrólito, num recipiente calibrado, por acção da pressão dos gases de fermentação. Os impulsos eléctricos gerados vão, através de uma interface A/D ligada a um microcomputador ZX Spectrum 48K, controlar o sentido do fluxo dos gases numa válvula solenóide de quatro vias e permitir, deste modo, a leitura de caudais gasosos em períodos previamente definidos pelo utilizador.

O electrólito utilizado é uma solução aquosa 0.25 N de NaCl e os eléctrodos são constituídos por fio metálico (usado em soldadura a acetileno). A válvula solenóide é controlada por um programa desenvolvido em linguagem máquina (Fig. A3.2) que, através da interface A/D permite a transformação dos sinais eléctricos gerados em sinais que vão actuar a válvula.

A determinação dos caudais gasosos é feita do seguinte modo:

- No arranque, a válvula encontra-se na posição P2, sendo os gases de fermentação libertados para a atmosfera e os eléctrodos

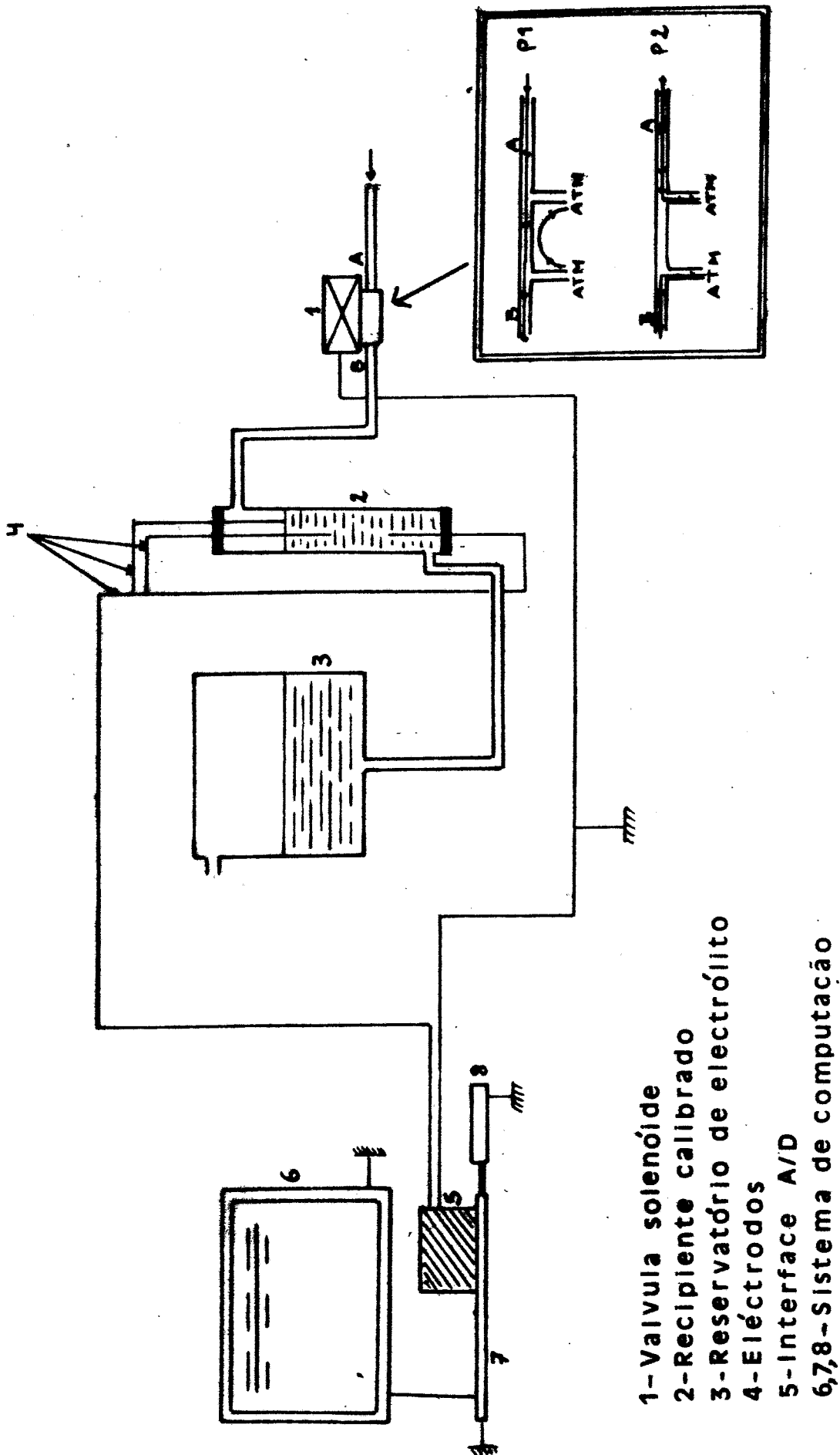


Fig. A.3.1 - Representação esquemática do sistema automático de medição de caudais gasosos.


```

1  REM INTERFACE.M
3  DEF FN w(d)=INT (100*d+.5)/100
5  DEF FN m(x,y)=(x+y+ABS (x-y))/2
6  DEF FN u()=(65536*PEEK 23674+256*PEEK 23673+PEEK 23672)/50
7  DEF FN t()=FN m(FN u(),FN u())
8  CLEAR 49985
9  PRINT "hh:mm:ss   tmed.(s)   caudal(cc/s)": PRINT "-----"
10 PRINT
10 LET t=FN t()
11 LET b=ABS (FN t()-t)
12 IF b>=120 THEN GO TO 23
13 GO TO 11
24 LET t=FN t(): LET t3=FN t(): GO SUB 2000
25 RESTORE 70
30 FOR i=0 TO 39
40 READ a
50 POKE (49987+i),a
60 NEXT i
70 DATA 62,129,211,127,219,95,230,3,254,3,194,71,195,33,0,0,62,255,21:
95,35,205,0,196,219,95,230,3,254,0,194,87,195,34,0,198
75 DATA 62,0,211,95,201
80 RESTORE 130
90 FOR i=0 TO 10
100 READ a
110 POKE (50176+i),a
120 NEXT i
130 DATA 245,213,22,36,21,194,4,196,209,241,201
1000 LET o=5: LET l=o+1
1010 DIM f(1): LET f=0
1020 FOR j=1 TO 1
1030 RANDOMIZE USR 49987
1035 LET f(j)=179.7*1e-6*(256*PEEK 50689+PEEK 50688)
1036 LET f=f+f(j)
1038 LET r=f-f(1)
1040 NEXT j
1070 LET q=r/(1-1)
1080 IF FN w(q)*10<>INT (FN w(q)*10) THEN GO TO 1086
1085 PRINT ;"   ";; PRINT FN w(q);"0";; GO TO 1087
1086 PRINT ;"   ";; PRINT FN w(q);
1087 LET q1=8.633375*60/q
1088 IF FN w(q1)*10<>INT (FN w(q1)*10) THEN GO TO 1091
1089 PRINT TAB 23;FN w(q1);: PRINT "0";: GO TO 1093
1091 PRINT TAB 23;FN w(q1)
1093 BEEP .2,15: PAUSE 5: BEEP .2,15: PAUSE 5: BEEP .2,15
1094 GO TO 11
2000 LET h=t3/3600
2010 LET hh=INT h
2020 LET m=(h-hh)*60
2040 LET mm=INT m
2050 LET s=(m-mm)*60
2060 IF hh<10 THEN PRINT "0";hh;"::": GO TO 2080
2070 PRINT hh;"::"
2080 IF mm<10 THEN PRINT "0";mm;"::": GO TO 2100
2090 PRINT mm;"::"
2100 IF INT s<10 THEN PRINT "0";INT s;: GO TO 2130
2110 PRINT INT s;
2130 RETURN

```

Fig. A.3.2 - Listagem de programa utilizado para o controle do sistema automático de medição de caudais gasosos.

estão ambos mergulhados no electrólito. Inicia-se então a execução do programa, definindo os intervalos de tempo para as leituras dos caudais. Decorrido o primeiro período, a válvula é activada, passa para a posição P1 e os gases de fermentação vão empurrar o electrólito até os dois eléctrodos de topo ficarem fora do líquido.

Simultaneamente o programa mede o tempo decorrido desde que a válvula foi activada até ao momento em que os eléctrodos de topo deixam de estar mergulhados no líquido. Nesse instante, a válvula é de novo activada passando para a posição P2 e os gases de fermentação e os gases no interior do recipiente graduado de electrólito são descarregados para a atmosfera, até os eléctrodos estarem de novo em contacto com o líquido o que vai, mais uma vez, provocar a mudança da posição da válvula (P1).

O sistema está programado de modo a realizar 6 determinações consecutivas do tempo de descida, após o que mantém a válvula na posição P2 até ser atingido novo período de leitura. Após cada conjunto de 5 leituras úteis (a primeira é desprezada) é calculado e escrito no écran o caudal volumétrico de gases de fermentação (obtido por uma média aritmética simples).

O volume do electrólito deslocado em cada leitura é previamente determinado por leitura directa ou recorrendo a uma calibração prévia com o auxílio de um medidor de gases (tipo bolha de sabão, por exemplo).

A leitura do tempo de descida até ao micro-segundo permite a obtenção de caudais até ao centésimo de cm^3/min .

APENDICE A.4: Determinação da
fracção volúmica de
sólidos no fermentador

Determinação da fracção volúmica de sólidos no fermentador numa base sem gás

A determinação experimental, por termogravimetria, da composição mássica dos flocos, permitiu obter:

água em torno dos flocos (A)	= 0.5920
água intracelular (B)	= 0.1801
matéria seca (C)	= 0.2279

A densidade dos flocos (d_f) determinada, por picnometria, a 25°C, era 1.117 e a concentração de biomassa no interior do reaktor 38 g/l (peso seco) (X_1).

Realizando um balanço mássico à água nos flocos, determinamos a densidade da matéria seca (d_s) e a densidade celular (d_c), a partir das equações

$$\frac{1}{d_f} = C \times \frac{1}{d_s} + (A + B) \times \frac{1}{d_{H_2O}} \quad (A4.1)$$

$$\frac{1}{d_c} = \frac{1}{d_s} \times \frac{C}{C + B} + \frac{1}{d_{H_2O}} \times \frac{B}{C + B} \quad (A4.2)$$

obtendo

$$d_c = 1.345$$

Efectuando a divisão $\frac{C}{C + B}$, obtemos a fracção que o peso

seco representa na massa total da células $X'_1 = 0.5586$

A fracção volúmica de sólidos no fermentador numa base sem gás

$$\text{é } \bar{X}_1 = \frac{X_1}{X'_1} \times \frac{1}{d_c} \times 10^{-3} = 0.05058$$

APENDICE A.5 : Cromatografia
do etanol

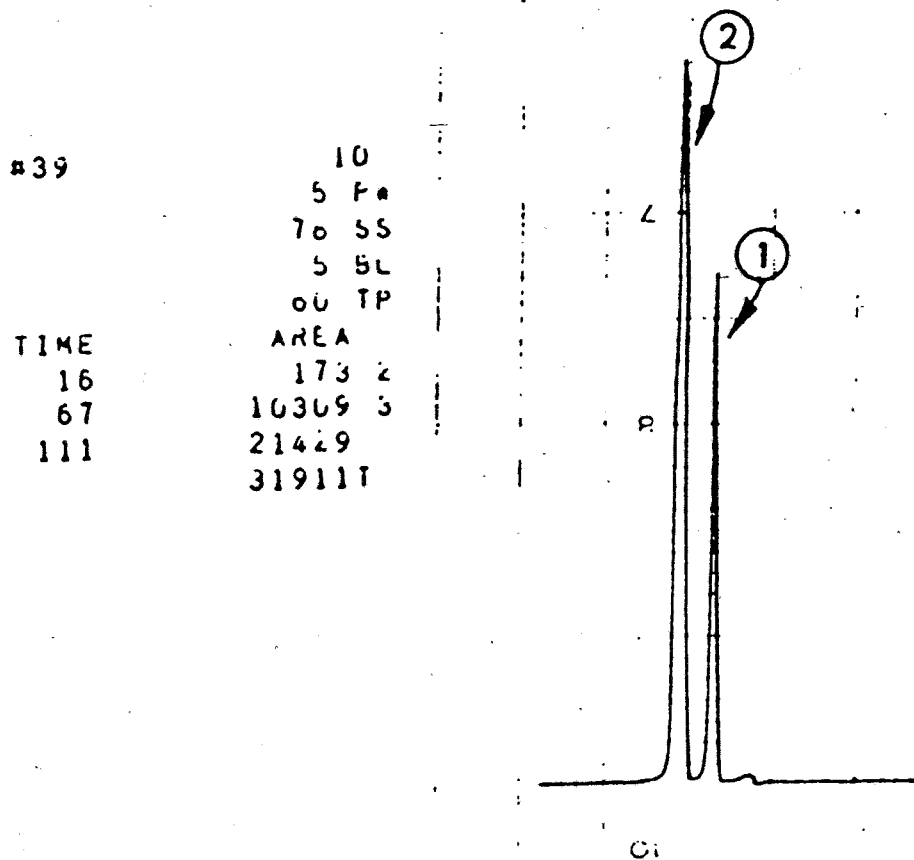


Fig. A.5.1 - Exemplo de um cromatograma de uma solução alcoólica

- 1 - Pico do etanol
- 2 - Pico do isopropanol

APENDICE A.6: Tabelas de valores
experimentais

TAB. A6.1 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 19.6$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.162	19.57	0.86
2	0.179	19.57	1.18
4	0.285	19.52	1.90
6	0.471	17.41	3.35
8	0.789	14.33	5.10
10	1.030	10.64	7.45
12	1.227	6.38	9.96
13.75	1.660	1.25	10.15
23.25	1.665	0.85	10.22

TAB. A6.2 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 28.5$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.157	27.96	—
2	—	—	0.93
3	0.211	28.53	—
4	0.277	28.19	1.18
6	0.458	26.82	1.92
8	0.738	23.86	3.30
10	0.943	—	4.86
12	1.187	16.67	6.85
13.75	1.485	12.44	8.66
23.25	1.929	1.03	14.49
26.75	1.700	0.83	13.39
32.75	1.778	0.81	14.30

TAB. A6.3 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "Batch" ($S_0 = 38.8$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.160	38.81	0.64
2	0.192	38.46	0.84
4	0.281	37.89	1.19
6	0.497	36.29	2.05
8	0.767	32.99	3.39
10	0.971	30.25	4.97
12	1.117	26.25	7.04
13.75	1.547	21.12	9.31
23.25	2.242	1.53	18.90
26.75	2.162	0.93	18.82
32.75	2.267	0.83	19.10

TAB. A6.4 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "Batch" ($S_0 = 50.1$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.162	49.67	0.95
2	0.196	50.05	1.00
4	0.275	49.77	1.58
6	0.491	47.70	2.60
8	0.751	44.20	3.88
10	1.142	40.50	5.67
12	1.436	35.90	8.12
13	1.474	33.80	9.04
14	1.568	30.40	10.50
16	2.181	23.70	13.50
19	2.995	13.00	18.80
25	3.227	1.49	25.20
28	3.218	1.43	23.80
31	3.082	1.48	23.92
36	3.289	1.34	23.68
42	3.296	0.80	23.75
48	3.349	0.80	23.50

TAB. A6.5 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 50.1$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.171	97.20	0.56
2	0.210	97.70	0.71
4	0.326	97.70	0.97
6	0.560	94.40	2.01
8	0.839	91.50	4.11
10	1.130	86.90	5.85
12	1.330	82.50	7.93
13.5	1.390	—	8.14
14.25	1.520	—	—
16	2.110	71.93	12.72
18	2.390	65.70	16.28
19.5	2.880	—	—
20	2.790	60.83	18.60
20.25	2.780	—	—
22	2.980	54.64	20.29
24	3.340	—	—
25.5	3.530	35.96	26.43
26.25	3.520	—	—
28	3.560	28.48	31.16
30	—	24.18	32.53
34	3.680	17.85	32.30
38.5	—	—	35.55
46	—	—	37.35
48	3.590	9.70	36.65
54	3.780	9.13	—
58	3.780	8.48	—

TAB. A6.6 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 157.0$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.180	157.0	0.65
2	0.187	157.8	0.58
4.5	0.244	154.7	0.71
6	0.333	159.8	1.29
8	0.533	157.8	1.84
10	0.754	155.9	3.05
14	1.026	—	4.96
16	1.247	—	6.22
18.5	1.882	—	9.34
22.5	2.635	—	13.69
24	2.808	111.4	18.26
28.5	3.166	96.2	22.49
32.5	3.368	87.7	25.64
42.5	3.551	—	23.06
48.5	3.510	78.4	30.01
52.5	—	75.4	30.60
72.5	3.370	71.7	30.71

TAB. A6.7 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 194.6$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.279	194.6	0.95
2	0.356	197.2	1.10
4.5	0.549	194.0	1.82
6	0.743	192.7	3.09
8	0.949	—	—
10	1.156	181.7	7.13
12	1.316	175.9	9.45
14	1.650	165.6	11.43
16	2.004	155.3	11.47
18	—	150.8	15.98
22	2.230	141.8	19.15
26	2.430	139.2	21.53
28	—	135.9	22.68
30	—	135.3	23.93
34	2.520	135.5	24.51
50	2.570	125.3	26.49
53	—	120.3	26.05
58	—	121.4	26.51
90	—	119.1	26.67

TAB. A6.8 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 30.8$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.170	30.83	0.84
2	0.188	31.33	1.13
3.75	0.175	30.46	1.15
5.75	0.216	27.84	1.92
7.75	0.260	25.93	1.45
9.25	0.388	24.95	1.80
10.75	0.545	24.72	2.38
13.00	0.697	21.41	3.63
14.75	0.945	18.47	4.95
22.75	1.680	0.296	11.63
24.75	—	0.153	

TAB. A6.9 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 39.8$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.156	37.81	0.74
2	0.182	39.76	0.72
3.8	0.204	37.32	0.77
6	0.267	38.05	1.00
8	0.375	36.21	1.36
11.4	0.726	30.95	2.90
13.5	0.864	30.09	4.10
15.25	1.130	27.40	5.66
23.3	2.200	5.21	13.06
25.3	2.430	1.87	14.81
27.6	2.480	0.249	16.14

TAB. A6.10 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 51.3$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.214	51.27	0.67
2	0.228	48.58	0.92
4	0.291	48.21	1.04
6	0.411	46.38	1.33
8	0.604	44.17	2.12
10	0.785	45.58	3.64
12	1.249	38.30	4.90
14	1.455	31.81	7.44
16	1.831	26.79	9.34
23.5	2.966	5.16	17.54
26.5	3.497	0.269	20.26

TAB. A6.11 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa, lactose e etanol para a levedura não floculante numa fermentação "batch" ($S_0 = 97.7$ g/l)

Tempo (h)	Biomassa (g/l)	Lactose (g/l)	Etanol (g/l)
0	0.190	97.65	.75
2	0.210	94.71	.94
4	0.225	93.73	1.06
6	0.270	94.74	1.38
8	0.425	91.53	1.85
10	0.470	87.37	3.04
12	0.860	88.83	5.76
14	1.045	88.34	6.72
16	1.375	78.55	9.80
24.3	2.233	59.70	15.70
26	2.189	54.31	17.28
28	2.706	47.94	18.46
30	2.915	46.23	20.71
32	3.256	40.74	21.37
34	3.245	39.28	23.85
38	3.894	31.32	26.44
48	4.235	15.35	32.06
52.5	4.51	0.11	34.95

TAB. A6.12 — Análise comparativa dos valores experimentais e calculados da concentração em biomassa na fermentação "batch" realizada com a estirpe não floculante para uma concentração inicial de substrato de 50.1 g/l

Tempo (horas)	X _{exp} (g/l)	X _{calc} (g/l)	$\frac{X_{exp} - X_{calc}}{X_{exp}} \times 100$
6	.491	.491	-
8	.817	.751	8.1
10	1.142	1.088	4.7
12	1.435	1.469	2.4
13	1.474	1.667	13.1
14	1.568	1.861	18.7
16	2.181	2.223	1.9
19	2.995	2.693	10.1
25	3.227	3.285	1.8
28	3.218	3.347	4.0
48	3.349	3.348	-

TAB. A6.13 — Análise comparativa dos valores experimentais e calculados da concentração em lactose na fermentação "batch" realizada com a estirpe não floculante para uma concentração inicial de substrato de 50.1 g/l

Tempo (horas)	S _{exp} (g/l)	S _{calc} (g/l)	$\frac{S_{exp} - S_{calc}}{S_{exp}} \times 100$
6	47.7	47.7	-
8	44.6	44.2	0.9
10	40.0	40.5	1.3
12	35.5	35.9	1.1
13	33.8	33.3	1.5
14	30.4	30.6	.7
16	23.7	24.9	5.1
19	13.0	16.3	25.3
25	1.49	1.87	25.5
28	1.43	.01	99.3
48	.8	0	100.0

TAB. A6.14 — Análise comparativa dos valores experimentais e calculados da concentração em etanol na fermentação "batch" realizada com a estirpe não floculante para uma concentração inicial de substrato de 50.1 g/l

Tempo (horas)	P _{exp} (g/l)	P _{calc} (g/l)	$\frac{P_{exp} - P_{calc}}{P_{exp}} \times 100$
6	2.60	2.60	-
8	3.88	3.80	2.1
10	5.67	5.59	1.4
12	8.12	7.84	3.4
13	9.04	9.11	.8
14	10.5	10.5	0.0
16	13.5	13.3	1.5
19	18.8	17.5	6.9
25	25.2	24.5	2.8
28	23.8	25.5	7.1
48	23.5	25.5	8.5

TAB. A6.15 — Ensaio de sedimentação para células antes e após tratamento químico e enzimático

Tempo (minutos)	Absorvância		
	S/ tratamento	C/ tratamento enzimático	C/ tratamento químico
0	0.848	0.683	0.675
1	0.063	0.679	0.704
2	0.045	0.675	0.674
3	0.045	0.626	0.674
5	0.040	0.664	0.664

TAB. A6.16 — Ensaio de sedimentação para células na presença de iguais quantidades de diferentes catiões

Tempo (minutos)	Absorvância					
	Agua ultra-pura	Mn ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺		
0	1.507	1.247	0.976	0.821		
1	1.501	1.256	0.859	0.831		
2	1.490	1.225	0.890	0.576		
3	1.484	1.208	0.767	0.265		
5	1.482	0.894	0.463	0.179		
	Co ²⁺	Sr ²⁺	Fe ²⁺	Ce ³⁺	Al ³⁺	Sn ⁴⁺
0	1.500	1.162	1.139	1.219	1.475	1.198
1	1.344	0.992	0.740	1.164	1.448	1.098
2	0.572	0.447	0.367	1.184	1.314	0.508
3	0.372	0.263	0.245	1.106	0.951	0.083
5	0.318	0.200	0.191	0.762	0.527	0.054

TAB. A6.17 — Evolução com o tempo das diferentes variáveis de fermentação para uma concentração de substrato na alimentação de 57.7 g/l

Tempo (dias)	$D_f(h^{-1})$	X_1 (g/l)	X_S (g/l)	S_f (g/l)	S_S (g/l)	P (g/l)
2	0.159	2.97	2.97	0.53	0.48	—
3		2.66	2.49	0.61	0.48	—
4		2.62	2.26	1.78	0.95	—
5 (8h)		2.75	2.32	—	—	—
5 (18h)	0.212	2.27	2.13	8.52	9.27	—
6		2.97	2.96	0.78	0.53	—
9		4.45	0.02	0.50	0.57	—
10	0.265	1.62	0.02	—	21	—
11	0.159	2.27	0.04	2.49	2.11	—
12		2.39	0.04	1.02	1.06	—
13		2.16	0.03	1.11	0.98	—
16		2.58	0.10	3.41	2.27	—
17		—	—	—	6.82	—
18		—	0.07	—	23.7	—
19		3.02	0.09	—	22	—
23	0.210	—	—	—	1.0	—
24		11.41	0.01	0.55	0.61	28.8
25	0.460	12.8	0.10	0.34	0.55	—
26		15.9	0.15	—	0.40	27.02
27		19.17	0.20	—	0.35	—
30						

TAB. A6.17 — Continuação

Tempo (dias)	$D_f(h^{-1})$	$X_1 (g/l)$	$X_S(g/l)$	$S_f(g/l)$	$S_S(g/l)$	P (g/l)
31 (8h)		11.0	0.13	1.82	1.68	—
31 (18h)		13.8	0.10	0.89	1.06	—
32 (8h)		18.9	0.22	1.12	0.44	—
32 (18h)		23.5	0.22	—	—	—
33		25.3	0.25	—	—	27.45
34		21.4	0.41	1.46	2.26	—
37	0.396	26.8	0.42	—	—	—
38		26.2	0.23	—	—	27.67
39	0.884	22.8	0.83	—	1.59	—
40		16.9	—	—	—	—
41(8h)		19.3	0.18	9.8	10.8	18.82
41(18h)		19.6	0.11	1.0	1.5	25.08
44(8h)	0.846	37.0	0.26	0.66	0.43	28.18
44(18h)		—	—	—	—	28.37
45		37.8	0.12	0.49	0.50	28.61
51		40.1	1.70	0.40	0.48	—
52		42.4	0.60	0.40	0.47	—
54		39.9	0.33	0.44	0.44	—
58		41.1	—	—	—	—

TAB. A6.18 — Evolução com o tempo das diferentes variáveis de fermentação para uma concentração de substrato na alimentação de 76.0 g/l

Tempo (dias)	$D_f(h^{-1})$	$X_f(g/l)$	$X_s(g/l)$	$S_f(g/l)$	$S_s(g/l)$	P (g/l)
0	0.223	10.82				
2		14.93	0.62	1.27		—
3		18.83	—	—		—
6		19.34	1.36	1.48		—
7		18.43	1.65	—		36.89
8	0.440	4.50	—	47.9		
9		11.43	1.36	27.2		22.95
10		14.23	0.93	25.4		27.90
13		40.9	0.69	0.77		39.76
14	0.457	46.8	0.71	0.58		36.87
15		45.1	0.41	1.07		34.96
16		27.1	—	12.0		—
17		16.1	0.89	—		26.05
18		7.76	—	—		
20(8h)		27.9	2.24	29.5		21.98
20(18h)		16.0	1.66	—		
21		22.4	3.29	1.50		—
22	0.474	33.4	0.66	1.14		36.30
23		37.1	0.65	1.32		—
24		41.1	0.53	0.75		37.51
27		44.4	0.76	0.91		36.00
28		43.2	1.25	1.00		35.37
29(8h)		35.4	1.41	2.25		35.38
29(18h)		21.0	—	—		
30		37.5	0.77	1.01		36.71
31		34.8	0.63	0.92		—
33		35.8	0.64	0.76		35.40
34		36.0	1.03	—		—
35		14.2	—	—		—

Tab.A6.18 - Continuação

Tempo (dias)	$D_f(h^{-1})$	$X_f (g/l)$	$X_S(g/l)$	$S_f(g/l)$	$S_S(g/l)$	P (g/l)
37	1	19.5	0.81	17.5	—	—
40	.441	1.07	—	—	—	—
41		3.30	1.09	—	—	—
42		2.96	0.44	50.3	—	—
43		4.48	0.35	32	—	—
44		23.1	1.09	10.6	26.32	—
47		30.8	1.00	0.82	—	—
50		26.9	1.08	6.8	—	—
51		27.5	0.96	2.8	28.88	—
54		28.9	0.96	1.1	—	—
57						
58		32.2	1.00	—	33.24	—
59		29.4	1.04	4.9	34.18	—

TAB. A6.19 — Evolução com o tempo das diferentes variáveis de fermentação para uma concentração de substrato na alimentação de 93.8 g/l

Tempo (dias)	$D_f(h^{-1})$	$X_f(g/l)$	$X_S(g/l)$	$S_f(g/l)$	$S_S(g/l)$	P (g/l)
0	0.332	6.7	0.71	—	—	
1		5.8	1.21	—	—	
2		2.19	1.48	—	47.2	
3		6.47	—	—	—	
6	0.357	13.4	3.30	—	16.0	
7		12.40	1.80	—	22.5	
8		5.75	2.22	—	—	
13		8.11	3.56	35.0	36.0	
14		16.00	2.00	22.5	21.8	
15		21.81	1.32	27.0	24.9	
16		25.61	1.79	—	—	
17		—	—	—	—	40.22
20		30.0	5.68	1.98	1.86	41.27
21		30.0	8.39	0.75	0.53	39.00
22		32.7	9.7	0.69	0.48	39.53
28		14.21	1.63	—	—	
29		14.6	1.50	—	—	
35		5.7	1.07	—	—	
36		6.0	—	—	—	
37		6.3	0.92	—	—	
38		15.0	1.00	—	—	
41	0.324	28.6	0.65	1.61	1.56	35.88
43		32.4	.76	—	—	37.68
44		30.7	1.00	—	—	45.52
48						

TAB. A6.20 — Variação, com o tempo, das concentrações de lactose e biomassa no fermentador e no efluente para uma taxa de diluição de 0.189 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 58.1 g/l

Tempo (h)	Sf (g/l)	Xf (g/l)	Xs (g/l)
0	51.41	6.76	0.078
2	47.36	7.15	0.123
4	28.56	7.72	0.097
6	33.69	7.89	0.101
8	27.85	8.37	0.085
10	7.96	9.29	0.090
12	8.76	8.60	0.118
14	5.02	9.83	0.086
16	1.96	9.91	0.092
18	1.30	10.62	0.080
22	0.94	11.95	0.079
25	0.58	9.96	0.069
30	0.64	10.68	0.082

TAB. A6.21 — Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de lactose e de produção e acumulação de biomassa para uma taxa de diluição de 0.189 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 58.1 g/l

Tempo (h)	- $q_s (\text{h}^{-1})$	$\mu (\text{h}^{-1})$	$\mu_{ac} (\text{h}^{-1})$
2	0.568	0.058	0.054
4	—	—	—
6	1.029	0.026	0.023
8	1.034	0.031	0.029
10	1.644	0.051	0.050
12	—	- 0.038	- 0.040
14	1.214	0.064	0.063
16	1.230	0.006	0.004
18	0.984	0.035	0.033
22	0.915	0.029	0.028
25	1.107	- 0.065	- 0.067
30	1.020	0.015	0.013

TAB. A6.22 — Variação, com o tempo, das concentrações de lactose e biomassa no fermentador e no efluente para uma taxa de diluição de 0.424 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 61.2 g/l

Tempo (h)	Sf (g/l)	Xf (g/l)	Xs (g/l)
0	56.2	2.70	0.152
2	45.1	4.62	0.103
4	43.8	5.61	0.084
6	37.1	7.74	0.093
8	22.4	8.61	0.062
10	16.9	10.05	0.080
13	6.78	12.99	0.059
16	1.46	15.56	0.054
19	1.22	17.08	0.058
23	0.77	18.08	0.048
25	0.69	19.35	0.039
29	0.43	22.15	0.042

TAB. A6.23 — Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de lactose e de produção e acumulação de biomassa para uma taxa de diluição de 0.424 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 61.2 g/l

Tempo (h)	- $q_s (\text{h}^{-1})$	$\mu (\text{h}^{-1})$	$\mu_{ac} (\text{h}^{-1})$
2	2.680	0.217	0.208
4	1.430	0.095	0.088
6	1.752	0.143	0.138
8	2.763	0.053	0.051
10	2.141	0.075	0.072
13	2.035	0.077	0.075
16	1.741	0.057	0.055
19	1.492	0.032	0.030
23	1.422	0.015	0.014
25	1.327	0.03	0.033
29	1.168	0.032	0.032

TAB. A6.24 — Variação, com o tempo, das concentrações de lactose e biomassa no fermentador e no efluente para uma taxa de diluição de 0.635 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 60.0 g/l

Tempo (h)	Sf(g/l)	Xf (g/l)	Xs (g/l)
0	40.21	4.09	0.066
2	42.0	5.42	0.056
4	43.3	5.58	0.109
6	34.5	6.98	0.173
8.5	25.4	9.17	0.073
11.5	15.7	13.48	0.079
14	6.78	15.67	0.063
17	3.21	19.05	0.088
21	1.47	21.74	0.332
24	1.22	21.63	0.041

TAB. A6.25 — Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de lactose e de produção e acumulação de biomassa para uma taxa de diluição de 0.635 h^{-1} e uma concentração de substrato na alimentação de 60.0 g/l

Tempo (h)	- $q_s (\text{h}^{-1})$	$\mu (\text{h}^{-1})$	$\mu_{ac} (\text{h}^{-1})$
2	2.058	0.130	0.123
4	1.887	0.027	0.014
6	3.080	0.117	0.100
8.5	2.933	0.101	0.096
11.5	2.443	0.110	0.107
14	2.506	0.059	0.056
17	1.979	0.073	0.070
21	1.826	0.032	0.021
24	1.826	- 0.069	- 0.070

TAB. A6.26 — Variação, com o tempo, das concentrações de lactose e de biomassa no fermentador e no efluente para uma taxa de recirculação de $5800\text{cm}^3/\text{h}$

Tempo (h)	Sf(g/l)	Xf (g/l)	Xs(g/l)
0	48.5	10.36	0.628
2	36.0	11.34	0.592
4	30.7	12.42	0.472
6	18.7	12.30	0.449
8	12.9	13.49	0.304
10	4.86	13.28	0.316
12.5	1.85	14.46	0.300
14.5	0.82	14.00	0.304
23.25	0.51	17.93	0.389
27.50	0.48	17.51	0.255
33.	0.40	19.40	0.248

TAB. A6.27 – Variação, com o tempo, das concentrações de biomassa no fermentador e de cálcio no fermentador e no efluente, para uma taxa de recirculação de $5800\text{cm}^3/\text{h}$

Tempo (h)	- $q_s (\text{h}^{-1})$	$\mu (\text{h}^{-1})$	$\mu_{ac} (\text{h}^{-1})$
2	1.132	0.057	0.043
4	0.857	0.053	0.043
6	1.409	0.005	- 0.005
8	1.203	0.050	0.044
10	1.408	- 0.001	- 0.008
12.5	1.018	0.039	0.033
14.5	1.194	- 0.010	- 0.016
23.25	0.911	0.032	0.026
27.5	0.931	- 0.002	- 0.006
33	0.840	0.022	0.018

TAB. A6.28 — Variação, com o tempo, das concentrações de lactose e de biomassa no fermentador e no efluente para uma taxa de recirculação de 17300 cm³/h

Tempo (h)	Sf (g/l)	Xf (g/l)	Xs (g/l)
0	53.93	4.76	0.267
2	44.52	7.12	0.191
4	—	7.31	0.208
6	30.64	7.82	0.242
8	17.8	9.52	0.225
11	13.2	9.97	0.221
13.75	0.90	10.35	0.278
22.25	0.46	12.61	0.170
27	0.46	13.00	0.159

TAB. A6.29 — Variação com o tempo, das velocidades específicas do consumo de substrato e produção e acumulação de biomassa para uma taxa de recirculação de 17300 cm³/h

Tempo (h)	- q _s (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μ _{ac} (h ⁻¹)
2	1.168	0.173	0.166
4	—	—	—
6	1.300	0.029	0.022
8	1.672	0.094	0.089
11	1.211	0.020	0.015
13.75	1.295	0.019	0.013
22.25	1.063	0.024	0.021
27	1.027	0.010	0.006

TAB. A6.30 — Variação, com o tempo, das concentrações de biomassa no fermentador e de cálcio no fermentador e no efluente, para uma taxa de recirculação de $5800\text{cm}^3/\text{h}$

Tempo (h)	Xf(g/l)	Ca _f (mg/l)	Ca _s (mg/l)
0	10.36	20.38	20.74
2	11.34	19.93	20.32
4	12.42	19.42	19.54
6	12.30	20.19	19.03
8	13.49	18.91	18.40
10	13.28	18.38	17.92
12.5	14.46	18.71	17.53
14.5	14.00	18.79	17.63
23.25	17.93	18.67	14.46
27.5	17.51	18.77	18.10
33	19.40	18.24	17.75

Concentração de cálcio na alimentação — 20.40 mg/l

TAB. A6.31 — Variação com o tempo das concentrações de biomassa no fermentador e de cálcio no fermentador e no efluente para um caudal de recirculação de 17300 cm³/h

Tempo (h)	X _f (g/l)	Ca _f (mg/l)	Ca _s (mg/l)
0	4.76	17.73	17.31
2	7.12	17.16	15.90
6	7.82	15.75	15.54
8	9.52	15.62	14.24
11	9.97	14.32	14.05
13.75	10.35	15.06	13.81
22.25	12.61	14.78	14.05
27	13.00	14.59	

Concentração de cálcio na alimentação — 17.75 mg/l

TAB. A6.32 — Distribuição do tamanho dos flocos para um caudal de recirculação de 5800 cm³/h

Tamanho (μm)	% mássica
37	2.4
53	11.9
105	66.6
149	6.6
180	3.5
210	3.8
>210	5.7

TAB. A6.33 — Distribuição do tamanho dos flocos para um caudal de recirculação de 17300 cm³/h

Tamanho (μm)	% mássica
37	70.8
53	11.8
105	5.7
149	3.8
180	3.0
210	2.4
>210	3.5

TAB. A6.34 — Variação, com o tempo, da concentração de lactose nos diferentes ensaios para a determinação do factor de eficácia em flocos de leveduras

Estirpe	Biomassa (g)	Tempo (min)	Lactose (g/l)	Agitação(r.p.m.)
F ⁻	0.6015	10	10.381	60
		20	8.690	
		25	7.785	
		30	6.666	
F ⁻	0.1883	12.5	9.143	120
		22.5	8.571	
		32.5	7.928	
		40	7.571	
F ⁺ ad	0.4584	15	8.571	60
		20	8.190	
		25	7.857	
		30	7.492	
F ⁺	0.4094	15	9.357	60
		20	9.119	
		25	8.738	
		30	8.524	
		35	8.262	
		40	7.881	
F ⁻	estirpe não floculante			
F ⁺	estirpe floculante			
F ⁺ ad	estirpe floculante tratada com aditivo			

TAB. A6.35 — Variação com o tempo de concentração de xilose (g/l) nos pontos de amostragem A e D, após a injeção de um degraú positivo de xilose

Tempo (min.)	C _A	C _D
0	0	0
10	.23	.3
20	.65	.48
30	.81	.65
40	.94	.8
50	1.11	1.01
60	1.28	1.16
75	1.37	1.34
90	1.49	1.42
105	1.59	1.53
120	1.64	1.62
140	1.74	1.79
160	1.92	1.97
180	1.92	2.08
210	2.04	2.16
240	2.12	2.22
285	2.22	2.23
340	2.33	2.33
375	2.32	2.42
425	2.38	2.39
471	2.44	

Concentração de xilose na alimentação — 2.5 g/l

TAB. A6.36 — Variação com o tempo de concentração de xilose (g/l) nos pontos de amostragem B e E, após a injeção de um degrau positivo de xilose

Tempo (min.)	C _B	C _E
0	0	0
10	.39	.24
20	.58	.44
30	.77	.62
40	1.01	.94
50	1.07	1.08
60	1.24	1.3
75	1.37	1.42
90	1.44	1.53
105	1.54	1.62
120	1.61	1.74
140	1.92	1.79
160	1.98	1.86
180	2	2.02
210	2.09	2.08
240	2.18	2.01
285	2.19	2.13
330	2.29	2.17
375	2.32	2.12
420	2.29	2.13
465	2.33	

Concentração de xilose na alimentação — 2.5 g/l

TAB. A6.37 — Variação com o tempo de concentração de xilose (g/l) nos pontos de amostragem C e F, após a injeção de um degrau positivo de xilose

Tempo (min.)	C _C	C _F
0	0	0
10	.31	.26
20	.52	.53
30	.72	.72
40	.92	.87
50	1.07	1.04
60	1.12	1.16
75	1.47	1.37
90	1.45	1.55
105	1.7	1.64
120	1.78	1.9
140	1.9	2.01
160	2.02	2.02
180	1.97	2.19
240	2.18	2.17
285	2.33	2.43
330	2.39	2.42
375	2.28	2.4
420	2.26	2.39
465	2.24	

Concentração de xilose na alimentação — 2.5 g/l

TAB. A6.38 — Variação com o tempo, da concentração de xilose (mg/l), nos diferentes pontos de amostragem, após a injeção de um de grau positivo de xilose

Tempo (min.)	C1	C2	C3	C4
10	538.6	556.3	545.6	75.8
20	1104.8	989.8	978.0	337.1
30	1492.2	1524.0	1400.0	722.4
40	1943.2	1899.3	1815.0	1128.4
50	1976.5	2193.0	1790.0	1575.0
60	2151.3	2193.5	2190.0	1715.5
70	2334.6	2601.5	2520.0	1886.5
80	2859.0	3015.0	2820.0	2178.0
90	3120.0	3036.5	2920.0	2469.5
100	3286.6	3267.0	2920.0	2842.7
110	3569.8	3550.0	3318.0	2848.0
120	3403.2	4159.0	3520.0	3110.0
140	3703.1	4093.0	4010.0	3507.9
160	3903.0	3963.0	4200.0	3579.2
180	4152.8	4420.0	4390.0	3874.0
200	4452.7	4616.0	4510.0	4135.0
220	4486.0	4290.0	4410.0	4155.0
240	4533.6	4485.0	4260.0	4376.0

Concentração de xilose na alimentação — 4.75 g/l

TAB. A6.39 — Análise comparativa dos valores experimentais e calculados da concentração de xilose (mg/l) no ponto de amostragem 1

Tempo (min.)	C _{exp}	C _{cal}	$\left \frac{C_{exp} - C_{cal}}{C_{exp}} \right \times 100$
10	5396	543	0.7
20	1105	1002	9.3
30	1493	1410	5.5
40	1943	1772	8.8
50	1977	2093	5.9
60	2115	2378	11.0
70	2335	2631	13.0
80	2859	2855	0.1
90	3120	3054	2.1
100	3287	3230	1.7
110	3570	3387	5.1
120	3403	3525	3.6
140	3703	3758	1.5
160	3903	3941	1.0
180	4153	4085	1.6
200	4453	4198	5.7
220	4486	4283	4.4
240	4534	4357	3.9

TAB. A6.40 — Análise comparativa dos valores experimentais e calculados da concentração de xilose (mg/l) no ponto de amostragem, 2

Tempo (min.)	C _{exp}	C _{cal}	$\left \frac{C_{exp} - C_{cal}}{C_{exp}} \right \times 100$
10	556	511	8.1
20	990	975	1.5
30	1524	1386	9.1
40	1899	1751	7.8
50	2193	2074	5.4
60	2194	2361	7.6
70	2602	2616	0.5
80	3015	2842	5.8
90	3037	3042	0.2
100	3267	3220	1.5
110	3550	3377	4.9
120	4159	3517	15.0
140	4093	3751	8.4
160	3963	3936	0.7
180	4420	4081	7.7
200	4616	4195	9.1
220	4290	4284	0.1
240	4485	4355	2.9

TAB. A6.41 — Análise comparativa dos valores experimentais e calculados da concentração de xilose (mg/l) no ponto de amostragem,3

Tempo (min.)	C _{exp}	C _{cal}	$\left \frac{C_{exp} - C_{cal}}{C_{exp}} \right \times 100$
10	546	471	14.0
20	978	939	4.0
30	1400	1354	3.3
40	1815	1722	5.1
50	1790	2049	14.0
60	2190	2339	6.8
70	2520	2596	3.0
80	2820	2824	0.1
90	2920	3026	3.6
100	2920	3206	9.8
110	3318	3365	1.4
120	3520	3506	0.2
140	4010	3743	6.7
160	4200	3929	6.5
180	4390	4075	7.2
200	4510	4190	7.1
220	4410	4281	2.9
240	4260	4352	2.2

TAB. A6.42 — Análise comparativa dos valores experimentais e calculados da concentração de xilose (mg/l) no ponto de amostragem A

Tempo (min.)	C _{exp}	C _{cal}	$\left \frac{C_{exp} - C_{cal}}{C_{exp}} \right \times 100$
10	76	0	—
20	337	310	8.1
30	722	796	10.0
40	1128	1227	8.8
50	1575	1610	2.2
60	1716	1949	14.0
70	1887	2250	19.0
80	2178	2518	16.0
90	2470	2754	12.0
100	2843	2965	4.3
110	2848	3151	11.0
120	3110	3316	6.6
140	3508	3593	2.4
160	3579	3811	6.5
180	3874	3983	2.8
200	4135	4118	0.4
220	4155	4224	1.7
240	4376	4307	1.6

NOMENCLATURA

- C - concentração de xilose (mg/l)
 D - taxa de diluição (h^{-1})
 D_F - taxa de diluição referida ao volume do fermentador (h^{-1})
 d - densidade
 F_C - factor de concentração
 G - fracção volúmica na fase gasosa
 G_1 - "hold-up"
 K_p - constante de inibição do produto sobre o crescimento (g/l)
 K'_p - constante de inibição do produto sobre a produção (g/l)
 k_s - constante de limitação do substrato sobre o crescimento (g/l)
 K'_s - constante de limitação do substrato sobre a produção (g/l)
 K_{1a} - coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio (h^{-1})
 M - concentração de traçador no instante t (mg/l)
 M_0 - concentração inicial de traçador (mg/l)
 MM - massa molecular
 n - nº de moles
 P - concentração em etanol (g/l)
 P_{crit} - concentração máxima de tolerância ao produto (g/l)
 P_F - produtividade em etanol referida ao volume do fermentador (g/l.h)
 P_t - produtividade global (g/l.h)
 Q - caudal volúmico (cm^3/h)
 $-q_s$ - taxa específica de consumo de substrato (g/g.h)
 $-q_{sm}$ - taxa específica de consumo máximo de substrato (g/g.h)
 R_p - factor de conversão de lactose em etanol (g/g)
 R_x - factor de conversão de lactose em biomassa (g/g)
 r_p - velocidade de produção de etanol (g/l.h)

- r_s - velocidade de consumo de substrato (g/l.h)
- r_x - velocidade de crescimento (g/l.h)
- S - concentração de substrato (g/l)
- t - tempo (min.)
- V - volume (ml)
- V - volume molar (l/mole)
- X - concentração de biomassa (g/l)
- X_m - concentração máxima de biomassa (g/l)
- $\bar{X}$ - fracção volúmica de sólidos numa base sem gás
- Y - fracção volúmica da fase líquida
- $\bar{Y}$ - fracção volúmica da fase líquida numa base sem gás
- $Y_{x/s}$ - rendimento de conversão de substrato em biomassa
- η - rendimento de conversão (%)
- μ - taxa específica de crescimento (h^{-1})
- μ_{ac} - taxa específica de acumulação de biomassa (h^{-1})
- μ_m - taxa específica máxima de crescimento (h^{-1})
- v - taxa específica de produção de etanol (g/g.h)
- v_m - taxa específica máxima de produção de etanol (g/g.h)
- θ - factor de eficácia
- τ - atraso (min.)

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Admassu W., Korus R.A., Heimsch R.C., Chemical Engineering Journal, 31, B1 (1985)
- 2 - Aiba S., Shoda M., Nagatani M., Biotechnol. Bioeng., 10, 845 (1968)
- 3 - Aiba S., Kobayashi K., Biotechnol. Bioeng., 13, 583 (1977)
- 4 - Amri M.A., Bonaly R., Duteurtre B., Moll M., European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7, 227 (1979)
- 5 - Amri M.A., Bonaly R., Duteurtre B., Moll M., European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7, 235 (1979)
- 6 - Amri M.A., Bonaly R., Duteurtre B., Moll M., Biochimie, 63, 575 (1981)
- 7 - Andrews G., Chem. Eng. J., 37, B31 (1988)
- 8 - Atkinson B., "Biochemical Reactors", Pion Limited, Londres (1974)
- 9 - Atkinson B., Daoud I.S., Adv. Biochem. Eng. 4, 41 (1976)

- 10 - Arnold W.N., em "Yeast Cell Envelopes", W.N. Arnold ed., CRC Press (1984)
- 11 - Baker D.A., Kirsop B.H., J. Inst. Brew, 78, 454 (1972)
- 12 - Barney M.C., Jansen G.P., Helbert J.R., ASBC Journal 38(2), 71 (1980)
- 13 - Bartlett G.R., J. Biol. Chem., 234, 466 (1959)
- 14 - Bernfeld P. (1957), citado em "Carbohydrate analysis- a practical approach", IRL Press, Washington D.C. (1986)
- 15 - Bonaly R., Amri M.A., Duteurtre B., Moll M., EBC Congress, 569 (1981)
- 16 - Borzani W., Queiroy M., Vairo M., Ferment. Technol., 61, 215 (1983)
- 17 - Budesinsky B.W., Analytica Chimica Acta, 71, 343 (1974)
- 18 - Bu' Lock J., Kristiansen B., em "Basic Biotechnology", Academic Press, Londres (1987)
- 19 - Butcher, em "Numerical Solutions of Ordinary Differential Equations", Academic Press, New York (1971)

- 20 - Calleja G.B., Archives of Biochemistry and Biophysics, 154, 382 (1973)
- 21 - Calleja G.B., Johnson B.F., Can. J. Microbiol., 23, 68 (1977)
- 22 - Chen L.F., Gong C.S., Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 208 (1986)
- 23 - Cheryan M., Mehaia M.A., Process Biochemistry, Dezembro, 204 (1984)
- 24 - Colowick J., Kaplan N. (1966) citado em "Manual of Methods for General Bacteriology", American Society for Microbiology, Washington D.C. (1986)
- 25 - Comberbach D.M., Bu' Lock J.D., Biotechnology Letters, 6(2), 129 (1984)
- 26 - Costa M., em "Análise de hidratos de carbono", Coimbra (1984)
- 27 - Costilow R.N., em "Manual of Methods for General Bacteriology" - American Society for Microbiology, Washington D.C. (1981)
- 28 - Cowland T.W., Maule D.R., J. Inst. Brew, 72, 480 (1966)
- 29 - Cysewski R., Wilke R., Lawrence Berkeley Lab. Report (1970)

- 30 - Cysewski G.R., Wilke C.R., Biotechnol. Bioeng., 19, 1125 (1977)
- 31 - Dalili M., Chau P.C., Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 500 (1987)
- 32 - David M.H., Kirsop B.H., J. Inst. Brew., 79, 20 (1973)
- 33 - Deverell R.F., Clark T.A., Biotechnol. Bioeng., 27, 1608 (1985)
- 34 - Dubois M., Gilles R.A., Hamilton J.K., Ribbers P.A., Smith F. (1956), citado em "Carbohydrate analysis - a practical approach", IRL Press, Washington D.C. (1986)
- 35 - Eddy A.A., M.A., Phill D., J. Inst. Brew, 64, 143 (1958)
- 36 - Eubanks V.L., Beuchat L.R., J. of Food Science, 47, 1717 (1982)
- 37 - Figueroa L.I., de Richard M.F., de van Broock M.R., Biotechnology Letters 6(3), 171 (1984)
- 38 - Fisher D.J., J. Inst. Brew., 81, 107 (1975)
- 39 - Gödia F., Casas C., Solà C., Process Biochemistry, April, 43 (1987)

- 40 - Goma G., Moreno M., Strehaiano P., 2nd Int. Symp. on conversion of cellulosic substances, New Delhi, 97 (1980)
- 41 - Grennshields R.N., Yates J., Sharp P.; Davies T.M.C., J. Inst. Brew., 78, 236 (1972)
- 42 - Greenshields R.N., Smith E.L., The Chem, Engineer, 249, 182 (1977)
- 43 - Guiraud J., Galzy P., "L' analyse microbiologique dans les industries alimentaires", Les Editions d' Usine Nouvelle, Paris (1980)
- 44 - Hanson R.S., Philips J.A., em "Manual of Methods for General Bacteriology" American Society for Microbiology, Washington D.C., 335-337 (1984)
- 45 - Hinshelwood C.N., em "Chemical Kinetics of the Bacterial Cell", Oxford University Press, Londres (1946)
- 46 - Holzer H., em "Aspects of yeast metabolism" Mill A.K., ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1968)
- 47 - Holzberg I., Finn K., Streinkraus K.H., Biotechnol. Bioeng., 9, 413 (1967)
- 48 - Hoppe G.K., Hansford G.S., Biotechnology Letters, 6, 681 (1984)

- 49 - Hough J., Lyons, J. Inst. Brew, 76, 564 (1970)
- 50 - Hough J., Lyons, J. Inst. Brew, 77, 300 (1971)
- 51 - Hussain T., Salhi O., Lematre J., Charpentier C., Bonaly R., Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 269 (1986)
- 52 - Ierusalimski N.D., em "Continuous Cultivation of Microorganisms", Malek I ed., Academic Press, Londres (1969)
- 53 - Jones S.T., Korus R.A., Admassu W., Heimsch R.C., Biotechnol. Bioeng., 26, 742 (1984)
- 54 - de Jonge P., Steensma H.Y., Linnekam M., Proc. IV Eur. Cong. Biotechn., 389 (1987)
- 55 - Juneja L.R., Terasawa M., Yamane T., Shimizu S., Biotechnology Letters, 8(6), 431 (1986)
- 56 - Kreger van Rij N.J.W., "The yeasts - a taxonomic study", elsevier Ed., (1984)
- 57 - Kunikane S., Lusse B., Hoyer O., Bunhardt H., Z. Wasser-Abwasse-Forsch, 19, 145 (1986)
- 58 - Laemmli U.K., Nature (London), 227, 680 (1970)

- 59 - Levenspiel O., *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1671 (1980)
- 60 - Limtnong S., Nakata M., Funahashi H., Yoshida T., Seki T., Kumnuanta J., Taguchi H., *J. Ferment. Technol.*, 62 (1), 55 (1984)
- 61 - Logan B.E., Hunt J.R., *Biotechnol. Bioeng.*, 31(2), 91 (1980)
- 62 - Luus R., Jakola T.H.I., *AIChE Journal*, 19(4), 760 (1973)
- 63 - Mahmoud S. Al., Giummely P., Bonaly R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 462 (1987)
- 64 - Marfey P., Sorensen S.B., Ottesen M., *Carlsberg Res. Commun.*, 42, 353 (1977)
- 65 - Margaritis A., Bajpai P., *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 283 (1986)
- 66 - Masschelein G.A., Jeunehomme-Ramos C., Castiau C., Devreux A., *J. Inst. Brew.*, 69, 332 (1963)
- 67 - Mavituna F., Park J.M., Gardner D., *Chem. Eng. J.*, 34, B1 (1987)
- 68 - Mehaia M., Cheryan M., *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 117 (1983)
- 69 - Merchant F.J.A., Margaritis A., Wallace J.B., Valdanis A., *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 936 (1987)

- 70 - Meyer R.R., Roth P.M., J. Ins. Maths. Applies., 9, 218 (1976)
- 71 - Miki B.L.A., Poon N.H., James A.P., Seligy V.L., "Current Developments in Yeast Research", Pergamon Press, 193 (1981)
- 72 - Miki B.L.A., Hung P.N., James A.P., Seligy V.L., Journal of Bacteriology, 150 (2), 878 (1982)
- 73 - Mill J., J. Gen. Microbiol., 35, 53 (1964)
- 74 - Mill J., J. Gen. Microbiol., 35, 61 (1964)
- 75 - Mill J., J. gen. Microbiol., 44, 329 (1966)
- 76 - Minier M., Goma G., Biotechnol. Bioeng., 24, 1565 (1982)
- 77 - Mitani Y., Nishzwa Y., Nagai S., J. Ferm. Technol., 62, 249 (1984)
- 78 - Mota M., Tese de doutoramento, INSA, Toulouse (1985)
- 79 - Mota M., Lafforgue C., Strehaiano P., Goma G., Bioproc. Eng., 2, 2 (1987)
- 80 - Murthy V.V.P.S., Ramachandran K.B., Ghose T.K., Process Biochemistry, Fevereiro, 3, (1987)

- 81 - Nagodawithana T.W., Steinkraus K.H., Appl. Envir. Microbiol., 31, 158 (1976)
- 82 - Netto C.B., Tese de doutoramento, INSA, Toulouse (1984)
- 83 - Netto C.B., Destruhaut A., Goma G., Biotechnology Letters, 7(5), 355 (1985)
- 84 - Nishiara H., Toraya T., Fukui S., Journal of Ferm. Technol. 54(6), 351 (1976)
- 85 - Nishiara H., Toraya T., Fukui S., Arch. Microbiol., 115, 19 (1977)
- 86 - Nishiara H., Toraya T., Fukui S., Arch. Microbiol., 131, 112 (1982)
- 87 - Novak M., Strehaiano P., Moreno M., Goma G., Biotechnol. Bioeng., 23, 201 (1981)
- 88 - Patel G.B., Ingledew W.M., Canadian J. Microbiol., 21(10), 1608 (1975)
- 89 - Patel G.B., Ingledew W.M., Canadian J. Microbiol., 21(10), 1614 (1975)
- 90 - Patel G.B., Ingledew W.M., J. Inst. Brew., 81, 123 (1975)

- 91 - Pierce J.S. (1970), citado em "Recommended Methods of Analysis - The Institute of Brewing", Londres (1977)
- 92 - Prince I.G., Barford J.P., Biotechnology letters, 4(10), 621 (1982)
- 93 - Rogers P.J., Stewart P.R., J. Gen. Microbiol., 79, 205 (1973)
- 94 - Russel I., Stewart G.G., Reader H.P., Johnston J.R., Martin P.A., J. Inst. Brew., 86, 120 (1980)
- 95 - Ryu D.D.Y., Kim Y.J., Kim J.H., Biotechnol. Bioeng., 26, 12 (1984)
- 96 - Sá-Correia I.S., Cabral J.M.S., Novais J.M., "Bioenergy-European Research and Development", Contractors' catalogue, 101 (1987)
- 97 - Salcedo, R., Gonçalves M.J., Azevedo S.F., SIMO'88, IGC, Toulouse, Setembro (1988)
- 98 - Sakaki K., Nozawa T., Furusaki S., Biotechnol. Bioeng. 31, 603 (1988)
- 99 - Shieh W., Chen L.F., Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 232 (1986)

- 100 - Somogy M. (1952), citado em "Carbohydrate analysis - a practical approach", IRL Press, Washington D.C. (1986)
- 101 - Stanley P.R., Pitt T.Y., Anal. Biochem., 133, 478 (1983)
- 102 - Stenesh J., "Experimental Biochemistry", Allyn and Bakon, Massachusets (1984)
- 103 - Stewart G.G., "The Brewers Digest", March, 42 (1975)
- 104 - Stewart G.G., Garrison I.F., Goring T.E., Meleg M., Pipasts P., Russel I., Kemia Kemi, 10 465 (1976)
- 105 - Stewart G.G., Goring T.E., J. Inst. Brew., 82, 341 (1976)
- 106 - Strehaiano P., Moreno M., Goma G., C.R., Acad. Sc. Paris, 286-D, 225 (1978)
- 107 - Strehaiano P., Mota M., Goma G., Biotechnol. Letters, 5, 135 (1983)
- 108 - Strehaiano P., Tese de doutoramento, INP., Toulouse (1984)
- 109 - Taylor N.W., Orton W.L., J. Inst. Brew., 79, 294 (1973)
- 110 - Taylor N.W., Orton W.L., J. Inst. Brew., 81(1), 53 (1975)

- 111 - Taylor N.W., Orton W.L., J. Inst. Brew., 84, 113 (1978)
- 112 - Thomas D., Hossak J., Rose A.H., Arch. Microbiol., 117, 39 (1978)
- 113 - Uribelarrea J.L., Pacaud S., Goma G., Biotechnol. Letters, 7(2), 75 (1985)
- 114 - de Uruburu F., Monreal J., Microbiol. Españ., 20, 219 (1967)
- 115 - Vega R., Dominguez A., Arch. Microbiol., 144, 124 (1986)
- 116 - White J., Munns D.J., Wallenstein Commun., 14, 119 (1951)
- 117 - Williams N.J., Wiseman A., Proceedings of the 532nd meeting of Biochem. Soc. Trans., 1(1), 291 (1973)
- 118 - Williams N.J., Wiseman A., Proceedings of the 532nd meeting of Biochem. Soc. Trans., 1(6), 1301 (1974)



FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000007584