



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

MESTRADO DE ENERGIAS RENOVÁVEIS E GESTÃO DE ENERGIA

Luís Miguel Ventura de Almeida Marques

Maio 2012

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

MESTRADO DE ENERGIAS RENOVÁVEIS E GESTÃO DE ENERGIA

Luís Miguel Ventura de Almeida Marques

Dissertação de Mestrado

Orientação pela Professora Doutora Maria Emília Costa

Coorientação pela Professora Doutora Sara Raposo

Agradecimentos

Agradeço à Prof. Dra. Maria Emília Costa, a oportunidade que me deu de desenvolver este trabalho no seu laboratório (LEBA), assim como a sua orientação e conhecimentos transmitidos. O meu agradecimento também à Prof. Dra. Sara Raposo, por toda a sua ajuda e orientação durante este trabalho.

Às minhas coleguinhas do LEBA: Catarina Tavares, Daniela Caiado, Catarina Duarte, Brígida Rodrigues, Marisa Santos, Filipa Rodrigues e Cristiana Maia que para além da grande ajuda prestada tanto a nível prático como teórico, demonstraram grande paciência e companheirismo.

Aos meus colegas de mestrado, em particular ao Tiago Mourinho, por ter sido um grande companheiro e amigo ao longo destes anos de mestrado.

Por fim, como não podia deixar de ser, agradeço à minha família e amigos, por serem quem são e por tudo aquilo que tem feito ao longo destes anos.

Índice

Resumo	vii
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	9
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1. Biocombustíveis Existentes	12
2.2. Bioetanol.....	13
2.2.1. Caracterização Química	13
2.2.2. Misturas de Bioetanol.....	14
2.2.3. Produção de Bioetanol no Mundo.....	15
2.3. Processos de Produção de Bioetanol	16
2.3.1. Fermentação	16
2.3.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.3.2. Separação e Purificação	19
2.4. Batata-doce	20
2.4.1. Caracterização	20
2.4.2. Batata-doce como Fonte de Bioetanol	21
2.5. Hidrólise Enzimática.....	22
2.5.1. α -amilase e Amiloglucosidase.....	22
2.5.2. Estratégias de Hidrólise Enzimática e Fermentação	22
3. Material e Métodos	23
3.1. Caracterização da Matéria-prima.....	23
3.2. Quantificação de Açúcares Redutores	24
3.2.1. Métodos Analíticos de Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC)	24
3.2.2. Método DNS	24
3.2.2.1. Preparação de Reagente DNS	25

3.2.2.2. Curva Padrão e Amostras	25
3.3. Extração Aquosa de Açúcares	26
3.3.1. Otimização do Rácio de Extração Sólido-Líquido (Batata-doce: Água)	27
3.3.2. Otimização do Método de Extração	27
3.3.2.1. Extração por Aquecimento a Refluxo	28
3.3.2.2. Extração por Liquefação a Altas Temperatura e Pressão (Autoclave).....	28
3.4. Hidrólise Enzimática da Matéria Fibrosa de Batata-doce.....	28
3.4.1. Otimização da Mistura Enzimática	29
3.5. Fermentação Alcoólica com Batata-doce	30
3.5.1. Microrganismo	30
3.5.2. Pré-inóculo	30
3.5.3. Determinação do Número de Células.....	31
3.5.4. Inoculação	33
3.5.5. Fermentação <i>Batch</i> em “Erlenmeyer”	33
3.5.6. Fermentação <i>Batch</i> em Reator Biológico.....	34
3.5.7. Fermentação <i>Fed-batch</i> em Reator Biológico	34
3.6. Estratégias de Hidrólise Enzimática e Fermentação.....	35
3.6.1. NSSF I.....	36
3.6.2. NSSF II.....	37
3.6.3. SHF.....	38
4. Resultados e Discussão.....	39
4.1. Extração Aquosa de Açúcares da Batata-doce.....	39
4.1.1. Otimização do Rácio de Extração	40
4.1.2. Otimização do Método de Extração	41
4.2. Fermentação <i>Batch</i> do Extrato da Batata-doce em “Erlenmeyer”	42
4.3. Fermentação <i>Batch</i> do Extrato da Batata-doce em Reator Biológico	47
4.4. Hidrólise Enzimática da Matéria Fibrosa da Batata-doce.....	49

4.5. Estratégias de Hidrólise Enzimática e Fermentação em Simultâneo.....	50
4.6. Fermentação <i>Fed-batch</i> em Reator Biológico	55
5. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	59
6. Bibliografia.....	61

Declaração do autor

Declaro que o trabalho presente nesta dissertação de mestrado foi levada a cabo de acordo com os regulamentos da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve. O trabalho é original, exceto onde indicado por referência especial no texto. Quaisquer visões expressas são as do autor e não representam de modo algum as visões da Universidade do Algarve. Este trabalho, no todo ou em parte, não foi apresentado para avaliação noutras instituições de ensino superior Portuguesas ou estrangeiras.

Assinatura:

Data: ___/___/___

Abreviaturas e Siglas

CO ₂	Dióxido de Carbono
EUA	Estados Unidos da América
UE	União Europeia
SHF	Hidrólise e fermentação separadas
SSF	Sacarificação e fermentação simultâneas
NSSF	Sacarificação e fermentação simultâneas não isotérmicas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
EP	Erro Padrão

Resumo

Muita da nossa necessidade energética primária é fornecida por fontes de origem fóssil. Infelizmente, o uso continuado de combustíveis fósseis para obtenção de energia deu origem à poluição atmosférica e emissões de gases de efeito estufa. Para além disso, as reservas de petróleo atuais não são extraíveis ou as dificuldades associadas à sua extração fazem com que os seus custos aumentem significativamente. Previsões apontam para que as reservas de petróleo existentes esgotem daqui a 50 anos. Assim é necessária uma busca e desenvolvimento de fontes de energia renováveis, sendo este um dos maiores desafios da humanidade neste momento.

Com este trabalho, pretende-se produzir bioetanol utilizando resíduos agroindustriais existentes na região do Algarve. Neste processo de produção foram efetuados estudos sobre a fermentação de extratos de açúcares solúveis de resíduos agrícolas e industriais para otimização do rendimento etanólico. A fonte de carbono foi batata-doce.

Foi possível obter um máximo de 32,9 g/l de etanol a partir de uma concentração de 76 g/l de açúcares totais em ensaio *batch* de “erlenmeyer”, o que corresponde a um rendimento de produto/substrato de 43% e uma produtividade máxima de etanol de 0,83 g/(l.h). No entanto, o maior valor de rendimento produto/substrato foi de 50% em ensaio *batch* com reator biológico, correspondendo à produção de 10,7 g/l de etanol a partir de uma concentração de 26 g/l de açúcares totais e uma produtividade máxima de etanol de 0,26 g/(l.h).

Palavras-chave: Bioprocessamento; Batata-doce; Bioetanol; Fermentação; *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Much of our need for primary energy is given by fossil fuels. Unfortunately, the sustained use of fossil fuels for energy has given origin to atmospheric pollution and greenhouse gas effect. Even more, current existent oil reserves are not extractable or its difficulties of extraction increase significantly the costs of extraction. Previsions indicate that the existent oil reserves lasts for more 50 years. So, a search and development of renewable sources of energy is needed, being this one of the highest challenge of mankind nowadays.

This work intends to produce bioethanol using agro-industrial wastes existent in the region of Algarve. In this production process, soluble sugar fermentative extract studies have been made with agriculture and industrial wastes for optimization of ethanolic yield. The carbon source used was sweet potato.

It was possible to obtain a maximum of 32,9 g/l of ethanol from a concentration of 76 g/l of total sugars in an erlenmeyer batch assay, which corresponds to a product/substrate yield of 43% and maximum ethanol productivity of 0,83 g/(l.h) . However, the maximum product/substrate yield was 50% in a batch assay performed on biological reactor, corresponding to the production of 10,7 g/l of ethanol from an initial concentration of 26 g/l total sugars and maximum ethanol productivity of 0,26 g/(l.h).

Keywords: Bioprocess; Sweet potato; Bioethanol; Fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introdução

A energia desempenha um papel vital no nosso quotidiano, sendo preponderante no desenvolvimento sócio económico de cada país. A energia é definida como a capacidade de realizar trabalho e fornecer calor. As fontes de energia podem ser classificadas em três grupos: fóssil, renovável e nuclear (Gupta & Demirbas, 2010). Os combustíveis fósseis formaram-se há muito tempo atrás e não são renováveis (Demirbas & Demirbas, 2010). A energia fóssil inclui petróleo, carvão, betume, gás natural, xisto betuminoso e areias de alcatrão. As fontes de energia renováveis incluem biomassa, hídrica, vento, solar, geotermal e marinha. As principais fontes de energia de fissão são o urânio e o tório, e apesar de existirem algumas reservas destes minerais, algumas classificações consideram-nos como fonte não renovável (Gupta & Demirbas, 2010).

Durante cerca de dez mil anos, o Homem tem usado biomassa como fonte de energia. A madeira é usada como fonte de calor para cozinhar e aquecimento. As primeiras tecnologias de energia renovável que surgiram eram mecânicas e não alcançavam grandes eficiências energéticas. As energias renováveis têm sido a fonte de energia primária na história da humanidade. No entanto, nestes últimos duzentos anos, a fonte de energia foi alterada para os combustíveis fósseis. A industrialização modificou o uso de fontes renováveis para fontes fósseis com uma maior capacidade energética, como o carvão e o petróleo. Durante o último século, a ideia de combustíveis fósseis ilimitados tornou-se mais aliciante e o rápido progresso e evolução tecnológica converteu o uso industrial de petróleo e carvão vantajoso economicamente.

O petróleo é a fonte de energia mais consumida pela população mundial (cerca de 4,8 barris/ano/pessoa), superando o carvão, gás natural, nuclear ou hidroelétrica (Gupta & Demirbas, 2010). Apesar de os combustíveis fósseis serem ainda atualmente gerados pelo calor e pressão exercidos no interior do planeta, a sua taxa de consumo é superior à taxa a que são originados. Assim, os combustíveis fósseis são considerados não renováveis, uma vez que não são repostos à mesma velocidade que são consumidos. O petróleo cru está em risco de se tornar escasso, passando o futuro pela utilização de fontes alternativas de energia. Felizmente, os desenvolvimentos tecnológicos estão a tornar essa transição possível.

Um dos grandes problemas com o petróleo é a sua distribuição não uniforme no mundo, uma vez que cerca de 2% da população mundial que vive no médio oriente tem 63% das reservas de petróleo (Gupta & Demirbas, 2010). As fontes de energias renováveis, por sua vez, estão melhor distribuídas que as fósseis ou nucleares e encontram-se em quantidade suficiente para satisfazer as necessidades energéticas globais.

Para além do problema da escassez de combustíveis fósseis, atualmente, a humanidade depara-se com problemas ambientais como o aquecimento global e poluição do ar, estando ambos relacionados com o uso a larga escala de combustíveis fósseis. O uso de energia está a ser reavaliado devido ao rápido aumento do preço do petróleo, consciencialização da poluição relacionada com a sua geração e a possibilidade de mudanças climáticas. Assim, tem-se assistido a um melhoramento significativo de eficiência energética em todos os setores, incluindo indústria, geração de energia, iluminação, eletrodomésticos, transporte e gestão energética em edifícios (Gupta & Demirbas, 2010).

A poluição do ar deve-se a substâncias nocivas (naturais ou produzidas pelo homem) que respiramos, incluindo partículas finas (produzidas pela queima de combustíveis fósseis), ozono (uma forma reativa de oxigénio que é um dos componentes do “smog” urbano), e gases como monóxido de carbono, vapores químicos, óxidos de azoto e dióxido de enxofre. Os efeitos nocivos dos poluentes do ar são conhecidos há cerca de 30 anos e para além de prejudicarem plantas e animais, afetam a saúde humana através de doenças cardiovasculares, asma, capacidade pulmonar e alergias (Gupta & Demirbas, 2010).

O gás natural é o combustível fóssil menos poluente e a lenhite o mais poluente em termos de emissões de CO₂. Atualmente, o carvão é responsável por 30-40% das emissões mundiais de CO₂ (Gupta & Demirbas, 2010).

Devido às atividades humanas, a concentração atmosférica de CO₂ aumentou em mais de 33% nos últimos 100 anos (Gupta & Demirbas, 2010). Este aumento é considerado por diversos cientistas como a causa do efeito de aquecimento global.

A produção de combustíveis a partir de biomassa contribui para a redução do consumo de combustíveis fósseis tendo como consequência uma diminuição na poluição ambiental. É expectável que se venham a expandir rapidamente nos próximos anos e que a sua produção ofereça novas perspetivas relativamente à diversidade dos combustíveis trazendo

benefícios, como sustentabilidade, redução de emissões de efeito estufa, desenvolvimento regional, um aumento de empregos em áreas rurais e segurança no fornecimento de energia (Gupta & Demirbas, 2010).

A grande diferença entre biocombustíveis e combustíveis derivados de petróleo é o conteúdo em oxigênio. Os biocombustíveis possuem 10-45% (fração de massa) de oxigênio e os combustíveis derivados de petróleo aproximadamente zero, tornando assim as propriedades químicas de ambos diferentes. Atualmente, existem dois biocombustíveis líquidos no mercado que podem substituir o petróleo: o etanol, que pode substituir a gasolina e o biodiesel, que pode substituir o diesel.

Os biocombustíveis de primeira geração – bioetanol e biodiesel, são derivados de hidratos de carbono e óleos vegetais, respectivamente. Os biocombustíveis de segunda geração são derivados de formas de biomassa (material lignocelulósico), incluindo madeira e relva.

Atualmente o bioetanol é o biocombustível líquido mais usado. É produzido por fermentação de açúcares, que podem ser obtidos por açúcares naturais, amido ou biomassa celulósica. A matéria-prima mais utilizada é a cana-de-açúcar ou beterraba-sacarina e a segunda mais usada é o amido de milho. O uso de biomassa celulósica é limitado devido às despesas de pré-tratamento que são necessárias para quebrar as estruturas cristalinas de celulose.

O bioetanol pode ser utilizado como aditivo da gasolina até 10%, sem necessitar de modificações no motor. No entanto, com algumas modificações de motor, o bioetanol pode ser utilizado em maior percentagem, como por exemplo o E85 (85% de etanol).

É esperado que o bioetanol seja um dos principais biocombustíveis renováveis no setor dos transportes dentro dos próximos vinte anos. Atualmente corresponde a mais de 94% da produção de biocombustíveis (Mojovic et al., 2009).

O desenvolvimento de tecnologias e a busca de novas fontes de matéria-prima, mais rentáveis e que não compitam com a alimentação humana continua a ser a prioridade de muitas instituições públicas e privadas por todo o mundo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biocombustíveis Existentes

Os biocombustíveis podem ser classificados de primeira geração e de segunda geração. Os de primeira geração são produzidos por meio de fermentação de amido, açúcares ou óleos vegetais a partir de produtos alimentícios como alguns cereais.

A segunda geração refere-se a combustíveis obtidos através de produtos que não competem com a alimentação, como a celulose, sobras agrícolas, madeira, árvores, resíduos alimentares ou aproveitamento de outra matéria orgânica.

De acordo com o decreto-lei nº 62/2006, são considerados biocombustíveis os seguintes produtos indicados:

- **Bioetanol** – etanol produzido a partir de biomassa e ou da fração biodegradável de resíduos para utilização como biocombustível;
- **Biodiesel** – éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores diesel, para utilização como biocombustível;
- **Biogás** – gás combustível produzido a partir de biomassa e ou da fração biodegradável de resíduos, que pode ser purificado até à qualidade do gás natural, para utilização como biocombustível, ou gás de madeira;
- **Biometanol** – metanol produzido a partir de biomassa para utilização como biocombustível;
- **Bioéter dimetílico** – éter dimetílico produzido a partir de biomassa para utilização como biocombustível;
- **Bio-ETBE (bioéter etil-ter-butílico)** – ETBE produzido a partir do bioetanol, sendo a percentagem volumétrica de bio-ETBE considerada como biocombustível de 47%;
- **Bio-MTBE (bioéter metil-ter-butílico)** – combustível produzido com base no biometanol, sendo a percentagem volumétrica de bio-MTBE considerada como biocombustível de 36%;

- **Biocombustíveis sintéticos** – hidrocarbonetos sintéticos ou misturas de hidrocarbonetos sintéticos produzidos a partir de biomassa;
- **Biohidrogênio** – hidrogênio produzido a partir de biomassa e ou da fração biodegradável de resíduos para utilização como biocombustível;
- **Óleo vegetal puro produzido a partir de plantas oleaginosas** – óleo produzido por pressão, extração ou métodos comparáveis, a partir de plantas oleaginosas, em bruto ou refinado, mas quimicamente inalterado, quando a sua utilização for compatível com o tipo de motores e os respectivos requisitos relativos a emissões.

2.2. Bioetanol

2.2.1. Caracterização Química

O etanol (C_2H_5OH), também chamado de álcool etílico e em linguagem corrente simplesmente álcool, é um líquido incolor e inflamável com um ponto de ebulição de 78,4 °C, ponto de fusão de -114,3 °C e uma densidade de 0,79 g/cm³. O etanol é usado em bebidas alcoólicas, solventes, perfumes, aromatizantes, tintas, medicamentos, compostos químicos e termômetros. Devido ao seu poder calorífico, o etanol, tem um longo historial de uso como combustível para aquecimento ou iluminação, e mais recentemente como combustível para motores. A fermentação de açúcares em etanol é uma das mais antigas reações orgânicas realizadas pelo Homem (Gupta & Demirbas, 2010).

Quando comparado com a gasolina, o etanol tem um maior número de octanas, amplo limite de inflamabilidade, maior velocidade de chama e maior calor de vaporização. Estas propriedades permitem uma maior taxa de compressão, menor tempo de queima e uma maior eficiência de combustão. O etanol é um combustível oxigenado que contém 35% de oxigênio, reduzindo as emissões de partículas e óxidos de azoto geradas na combustão. As desvantagens do etanol incluem uma menor energia específica que a gasolina, maior corrosão, dificuldade de arranque devido à baixa pressão de vapor, baixa luminosidade de chama, miscibilidade com água e alguma toxicidade para os ecossistemas (Gupta & Demirbas, 2010). A tabela 1 apresenta algumas dessas propriedades do bioetanol comparadas com as da gasolina.

Tabela 1 - Propriedades do bioetanol e da gasolina (Larsen et al., 2009).

Propriedade	Bioetanol	Gasolina
Peso Molecular (g/mol)	46,07	100-105
Carbono (% mássica)	52,2	85-88
Hidrogénio (% mássica)	13,1	12-15
Oxigénio (% mássica)	34,7	0
Densidade, 20°C (Kg/l)	0,792	0,72-0,78
Viscosidade (cST)	1,52 (20°C)	0,4-0,9 (16°C)
Temperatura de ebulição, 1 atm (°C)	78,4	27-225
Temperatura de autoignição (°C)	423	257
Calor de vaporização (KJ/Kg)	910	330-400
Calor de combustão (MJ/l)	21,3	32,45
Poder calorífico inferior (MJ/Kg)	26,9	42-44
Número de octanas	108	90-100

2.2.2. Misturas de Bioetanol

Devido ao seu alto valor em octanas, o etanol é adequado como combustível quando misturado com gasolina. Essa adição faz com que haja um aumento de octanas no combustível, protegendo o motor de ignições prematuras. No entanto, não é apropriado para motores a diesel, devido ao seu baixo valor em cetano e alto calor de vaporização que impede a autoignição.

O etanol pode ser geralmente produzido com dois tipos de pureza: anidro, o que significa que o teor de água é inferior a 1%, ou hidratado, quando tem um teor de água entre os 5% e os 10%. O etanol usado como aditivo é normalmente anidro, a fim de evitar a separação de fases da água e da gasolina.

No Brasil, é usado o etanol puro (E100) ou misturado com gasolina que é o E20 (cerca de 20% etanol e 80% gasolina). O E100 tem a vantagem de apresentar um menor custo na sua produção, uma vez que não requer do gasto energético que é necessário para se obter etanol anidro. No entanto, o E20 apresenta uma melhor capacidade de arranque a frio e maior valor energético por litro.

Em algumas partes dos Estados Unidos é usado o E10 (10% etanol e 90% gasolina) assim como outras misturas com maior teor em etanol (E85). Para além do Brasil e Estados Unidos, também o Canada (E10 e E85), Suécia (E5 e E85), Índia (E5), Austrália (E10),

Tailândia (E10), China (E10), Colômbia (E10), Peru (E10) e Paraguai (E7) utilizam veículos com misturas de etanol e gasolina (Gupta & Demirbas, 2010).

2.2.3. Produção de Bioetanol no Mundo

O bioetanol é o biocombustível com maior produção no mundo, com aproximadamente 74 bilhões de litros produzidos em 2009. Na tabela 2 encontram-se os valores da produção de bioetanol em todo o mundo no ano de 2009. Os principais produtores mundiais de bioetanol são os EUA, com uma produção estimada em mais de 40 bilhões de litros (54%), seguidos do Brasil, com 25 bilhões de litros (34%). A UE no seu total produziu um total de 3,7 bilhões de litros, enquanto que a Ásia, especialmente a China, Tailândia e Índia, embarcou numa produção em larga escala de produção de bioetanol e apresenta-se atualmente como uma grande potencial produtora de bioetanol nos próximos anos. Sendo a China a maior produtora Asiática com uma produção de aproximadamente 2 bilhões de litros de produção (Biofuels Platform, 2011).

Como fonte de biomassa para a produção do bioetanol, é usada principalmente a cana-de-açúcar no Brasil e o milho nos EUA. No caso da EU, a escolha evidencia uma maior heterogeneidade de matérias-primas para cada país.

Tabela 2 - Produção global de bioetanol em milhões de litros em 2009 (Fonte: Biofuels Platform, 2011).

País	Produção (Ml)	Produção (%)
EUA	40130	54
Brasil	24900	34
China	2050	3
Canada	1348	2
França	1250	2
Alemanha	750	1
Espanha	465	1
Tailândia	401	1
Índia	350	-
Colômbia	310	-
Austrália	220	-
Áustria	180	-
Suécia	175	-
Polónia	166	-
Hungria	150	-
Restantes Países	1110	2
Total Mundial	73954	100

2.3. Processos de Produção de Bioetanol

2.3.1. Fermentação

O bioetanol pode ser produzido a partir de qualquer matéria-prima de origem biológica que contenha quantidades apreciáveis de açúcar ou de materiais que possam ser transformados em açúcar, como o amido e a celulose. Os açúcares podem ser diretamente fermentados usando leveduras para produzir etanol. O amido e celulose tem que ser convertidos em açúcar por um processo de hidrólise ou pré-tratamento para serem fermentáveis.

A fermentação de sacarose é realizada usando leveduras. Primeiro, a enzima invertase presente nas leveduras converte a sacarose em glucose e frutose. Segundo, o metabolismo fermentativo converte a glucose e frutose em etanol e CO₂. Ou seja, a glucose e frutose são usadas pela levedura para produzir energia celular, produzindo-se etanol e CO₂ como produtos metabólicos residuais. De uma maneira geral a fermentação é realizada na ausência de oxigénio. Contudo a levedura *S. cerevisiae*, sendo uma estirpe de natureza facultativa, necessita de ligeira oxigenação para a síntese dos lípidos da parede celular.

A produção de etanol pode ser realizada através de quatro diferentes modos de operação: cultura descontínua (*batch*), cultura contínua, *fed-batch* e cultura semicontínua (Çaylak & Sukan, 1998).

Nas fermentações *batch*, o substrato e levedura são colocados no biorreator juntamente com os nutrientes. Atualmente, a maior parte das produções de etanol são realizadas deste modo, já que os custos de investimento são baixos, não requerendo muito controlo durante o processo e pode ser efetuado sem grandes qualificações.

No processo contínuo, o meio de cultura e outros nutrientes são introduzidos continuamente num recipiente agitado, onde se encontram os microrganismos ativos. O produto é retirado do topo do biorreator, contem etanol, células e açúcar residual.

A operação em *fed-batch*, que pode ser considerada como uma combinação de *batch* e cultura contínua é muito popular na indústria de etanol. Nesta operação a solução alimentada, que contém substrato, levedura, minerais e vitaminas, é adicionada a intervalos constantes enquanto que o efluente é removido de forma descontínua. A maior vantagem do

sistema *fed-batch* é que a inibição e repressão catabólica são prevenidas pela alimentação intermitente de substrato. Se o substrato tem um efeito inibitório, a adição intermitente aumenta a produtividade da fermentação mantendo uma concentração baixa de substrato. É essencial manter o volume da cultura constante na operação contínua enquanto existe uma variação de volume no processo *fed-batch*.

No processo semicontínuo, uma parte da cultura é removida periodicamente e meio novo é adicionado ao sistema. No processo contínuo é essencial manter o volume da cultura constante, enquanto existe uma variação de volume no processo semicontínuo. Este método tem algumas das vantagens das operações contínuas e em *batch*. Não há necessidade de separar o inóculo, exceto no início do processo. Não existem perdas de tempo em limpeza e esterilização. Outra vantagem desta operação é que não requer muito controle durante o processo. No entanto, existe um risco grande de contaminações e mutações devido ao longo período de cultura e manuseamento.

Tradicionalmente, a fermentação é realizada em reatores *batch*, onde o microrganismo é exposto a altas concentrações de etanol (inibidor da fermentação) quando o processo se aproxima do final. Assim, são necessários microrganismos com grande tolerância ao etanol que possam ser usados para fermentar substratos de baixo custo.

Os parâmetros mais importantes da fermentação são o intervalo de temperatura e de pH, tolerância ao álcool, tolerância osmótica e tolerância de inibição, taxa de crescimento, produtividade, especificidade, rendimento e estabilidade genética. Esforços significantes foram investidos para encontrar as condições ideais e microrganismo. Um microrganismo de escolha é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como levedura de padeiro.

2.3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariota unicelular que pertence ao Reino dos Fungos. Existem duas formas celulares: uma haploide e outra diploide. Na forma haploide possuem um ciclo de vida de mitose e crescimento, morrendo em condições de grande stress. Em diploide, que é a sua forma preferencial, possuem um ciclo de mitose e

crescimento, mas em condições de stress reproduzem-se por esporulação, entrando em meiose e produzindo esporos haploides.

É uma levedura amplamente utilizada em indústrias, principalmente do pão e de cerveja.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um produtor eficiente de etanol a partir de hexoses (monossacarídeos formados por uma cadeia de seis átomos de carbonos, como é o caso da frutose e glucose), mas é incapaz de fermentar pentoses (monossacarídeos formados por uma cadeia de cinco átomos de carbono). Não necessita de oxigenação, necessita de pH baixo e é relativamente resistente ao etanol e outros inibidores.

A produção de etanol é diretamente relacionada com o crescimento das células de levedura (biomassa), indicando que a levedura deve ser produzida como um coproduto (figura 1). A fermentação de glucose usando *S. cerevisiae* decorre por glicólise, sendo uma molécula de glucose metabolizada e produzidas duas moléculas de piruvato. O piruvato, em condições anaeróbicas, através de reações de oxi-redução, forma etanol e CO₂. O balanço teórico do rendimento de etanol e CO₂ a partir de glucose é de 51,1% e 48,9%, respetivamente (Bai et al., 2008). Durante a glicólise, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATPs) são produzidas, que irão ser usadas para as necessidades energéticas das células de levedura. O uso de ATP é necessário de modo a continuar a fermentação sem interrupção. Assim, a produção de etanol é dependente do crescimento celular (Bai et al., 2008).

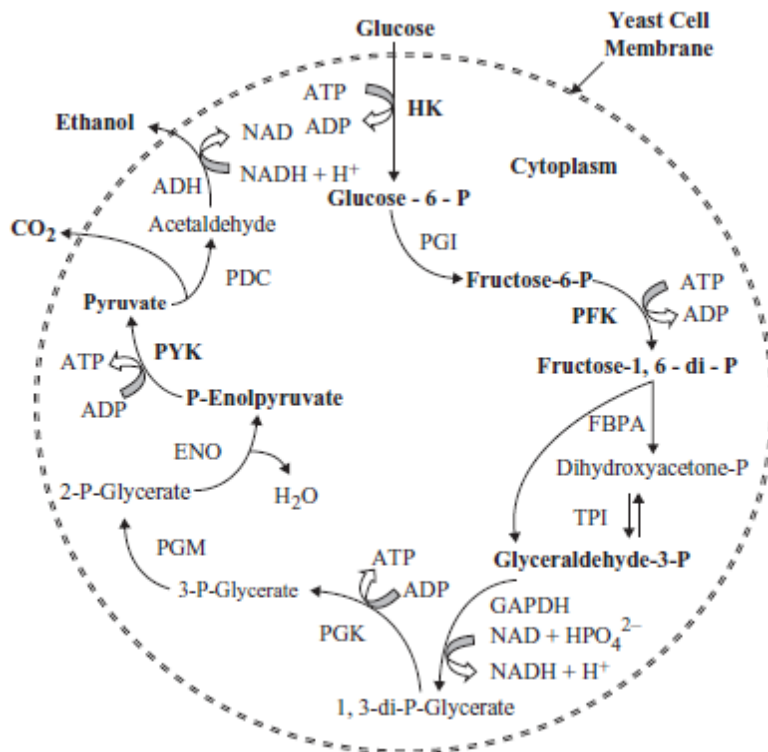


Figura 1 - Via metabólica da fermentação etanólica em *S. cerevisiae* (Bai et al., 2008). Abreviações: HK – hexoquinase; PGI: fosfoglucoisomerase; PFK: fosfofrutoquinase; FBPA: frutose bifosfato aldolase; TPI: triose fosfato isomerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK: fosfoglicerato quinase; PGM: fosfogliceromutase; ENO: enolase; PYK: piruvato quinase; PDC: piruvato descarboxilase; ADH: álcool desidrogenase.

2.3.2. Separação e Purificação

A fermentação apenas permite obter uma solução com uma concentração de 10% de álcool, mas para ser aplicável como combustível é necessário que esteja no seu estado puro, de 100% etanol. Assim, é necessário um significativo esforço energético para remoção da água existente na solução proveniente da fermentação. No primeiro passo é usada uma coluna de destilação, havendo uma grande quantidade de água que é removida juntamente com os sólidos, obtendo-se etanol a 37%. Este produto é posteriormente concentrado numa coluna de retificação até uma concentração de azeótropo (95%). Na concentração de azeótropo, em que existe uma mistura de duas ou mais substâncias, possuindo um ponto de ebulição constante e fixo, como se fosse uma substância pura, não é possível separar os seus componentes por um processo de destilação simples. Assim, para se remover a água dos 95% de etanol, existem várias técnicas que podem ser aplicadas: secagem com cal (óxido

de cálcio) ou sal (halita); secagem com uma peneira molecular; destilação azeotrópica; destilação sob pressão reduzida.

Na secagem com cal, o óxido de cálcio é misturado com a mistura de etanol/água. A cal, ao reagir com a água forma hidróxido de cálcio, que pode ser separado, havendo assim a remoção da água. O hidróxido de cálcio pode ser regenerado a cal através de aquecimento (Gupta & Demirbas, 2010).

Na secagem com peneira molécula, que é o método mais utilizado, são utilizadas peneiras zeólitas com poros de 3-angstrom (1 angstrom = 10^{-10} m). Os poros são suficientemente largos para a passagem das moléculas de água (cerca de 2,8 angstrom), mas demasiado pequenos para as moléculas de etanol (4,4 angstrom), o que faz com que haja retenção do etanol (Gupta & Demirbas, 2010).

Na destilação azeotrópica, uma pequena quantidade de benzeno é adicionado para criar um azeótropo terciário, que é mais volátil que o azeótropo composto por etanol – água. O azeótropo terciário é destilado, removendo-se praticamente toda a água no processo, juntamente com o benzeno residual. Devido à sua toxicidade, o benzeno foi substituído pelo ciclo-hexano nos últimos anos.

Na destilação sob pressão reduzida, utiliza-se uma pressão mais baixa que a atmosférica, o que faz com que o azeótropo da mistura de etanol – água se altere para uma mistura mais rica em etanol. Assim, obtêm-se uma destilação com mais de 96% de etanol. Em seguida, realiza-se uma nova destilação a pressão atmosférica obtendo-se etanol puro.

2.4. Batata-doce

2.4.1. Caracterização

A batata-doce (*Ipomoea batatas*) é uma planta dicotiledónea que pertence à família das convolvuláceas. Pensa-se que será originária da região entre a Península do México e o rio Orinico na Venezuela. É cultivada em regiões de clima tropical ou quente, desde que haja água suficiente para o seu crescimento, encontrando-se por toda a faixa tropical do globo terrestre. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) a produção mundial de batata-doce em 2004 foi de 127 milhões de toneladas. A

maioria provém da China, com a produção de 105 milhões de toneladas em 49 mil km² (FAO, 2004).

A batata-doce é de fácil cultivo, relativamente rústica, alta tolerância à seca e baixo custo de produção, embora apresente algumas limitações edafo-climáticas. A batata-doce apresenta múltiplos usos, tal como alimentação humana ou animal e matéria-prima para indústria. É uma raiz rica em hidratos de carbono (principalmente amido), com teores de 13,4 a 29,2%, açúcares redutores de 4,8 a 7,8%, fornecendo em cada 100 gramas, 110 a 125 calorias (Souza, 2005). No entanto, a sua composição química varia conforme a espécie, condições climáticas, época de colheita, tratos culturais, duração e condições de armazenamento.

2.4.2. Batata-doce como Fonte de Bioetanol

A indústria de produção de etanol necessita de matéria-prima barata em quantidade suficiente de modo a reduzir os custos de produção, que têm sido apontados como um ponto crítico na produção de etanol (Zhang & Feng, 2010).

Várias culturas têm potencial para a produção de etanol, destacando-se as que armazenam açúcares e amido. A cana-de-açúcar e o milho são as culturas mais utilizadas, no Brasil e Estados Unidos, respetivamente. No entanto, estas possuem um baixo valor energético e competem com o uso alimentar, pela ocupação de terrenos agrícolas e consumo de produtos destinados para a alimentação. Assim, é necessário procurar novas matérias-primas para a produção de etanol, que possam ter um rendimento energético mais elevado e não compitam com alimentação.

A batata-doce pode ser uma matéria-prima alternativa à cana-de-açúcar, uma vez que é uma cultura de grande potencial produtivo e energético. É caracterizada pela rusticidade e alta produtividade de energia (hidratos de carbono) por área, sendo uma principal fonte de alimento em países com baixo índice de desenvolvimento. É uma cultura que pode ser incorporada em projetos agrícolas, criando-se genótipos específicos para energia que não compitam com a produção de alimentos.

Os rendimentos dos processos fermentativos de batata-doce variam entre 87 e 93 %, de acordo com a cultivar e com o teor de matéria seca das raízes (Wu, 1988), que estão próximos dos 88 % obtidos no processo fermentativo do milho (Wall et al., 1983).

2.5. Hidrólise Enzimática

2.5.1. α -amilase e Amiloglucosidase

O amido é o principal constituinte da batata-doce e é um polissacarídeo constituído por várias unidades de glucose ligadas entre si através de ligações glicosídicas. Forma uma mistura de amilose e amilopectina, que são polímeros de glucose e encontra-se na natureza, insolúvel, em grânulos não dispersos, resistentes à quebra enzimática.

A enzima α -amilase, é uma endo-amilase, que rompe as ligações glicosídicas α -1,4 da amilose originando uma mistura de maltose, amilopectina e glucose. Rompe também as ligações α -1,4 da amilopectina, originando uma mistura de polissacarídeos denominados dextrinas. Após a ação da α -amilase, obtêm-se um substrato de menor tamanho molecular. Assim, a ação da enzima amiloglucosidase, uma exo-amilase que atua nas extremidades das moléculas, torna-se mais eficiente, já que esta hidrolisa as dextrinas e maltose em glucose. A amiloglucosidase quebra as ligações glicosídicas α -1,4 da amilose e amilopectina, assim como as ligações α -1,6 formando glucose.

2.5.2. Estratégias de Hidrólise Enzimática e Fermentação

Existem várias estratégias de hidrólise enzimática e fermentação. As mais utilizadas, especialmente, para hidrólises de celulose e hemicelulose são a hidrólise e fermentação separadas (SHF) e mais recentemente a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).

No método de SHF, primeiramente é realizado o processo de hidrólise enzimática, obtendo-se monossacarídeos que serão adicionados à fermentação. O rendimento de glucose neste método é tipicamente baixo devido a inibição por parte da glucose. A grande vantagem é, devido ao facto da hidrólise e fermentação serem processos separados, se poder realizar ambos os processos nas suas próprias condições ótimas (Taherzadeh & Karimi, 2007).

O método de SSF tem como vantagem o facto de não ocorrer inibição por glucose durante a hidrólise, uma vez que esta está a ser consumida na fermentação, já que estes processos estão a decorrer em simultâneo. Como desvantagem, a temperatura ótima para a hidrólise enzimática é tipicamente superior do que aquela que seria ótima para a fermentação usando levedura. Assim, as condições de temperatura e pH tem que ser ajustadas e praticáveis para ambos os processos de sacarificação e fermentação.

Há ainda um outro método, que é a sacarificação e fermentação em simultâneo não isotérmica (NSSF). Neste método, a sacarificação e fermentação ocorrem simultaneamente, mas em reatores separados com diferentes temperaturas. Deste modo, não existe o problema de a hidrólise enzimática não se realizar à sua temperatura ideal como ocorria com o método de SSF (Taherzadeh & Karimi, 2007).

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização da Matéria-prima

A batata-doce utilizada neste trabalho é proveniente do concelho de Aljezur e foi cedida pela Associação de Produtores de Batata-doce de Aljezur. Estas batatas-doces, devido ao seu reduzido tamanho não são comercializáveis para consumo humano, sendo por isso consideradas um resíduo de produção. A parte utilizada é a raiz adventícia da planta *Ipomoea batatas* L., que possui a forma piriforme alongada, cor púrpura ou castanho-avermelhada e polpa amarela.

A tabela 3 apresenta características analíticas da batata-doce de Aljezur, de acordo com o caderno de especificações elaborado pela Direção Regional de Agricultura do Algarve (DRAAlg.) no âmbito do programa INTERREG II Projeto “Melhoramento da batata-doce de Aljezur”.

Tabela 3 - Características químicas da batata-doce de Aljezur (Batata-doce de Aljezur – Indicação Geográfica Protegida; Caderno de especificações, 2008)

Características	Valores (%)
Humidade	65 a 67
Açúcares redutores	1,3 a 1,5
Açúcares totais	1,8 a 3,7
Cinzas	0,73 a 0,81
Amido	11,2 a 12,9

3.2. Quantificação de Açúcares Redutores

3.2.1. Métodos Analíticos de Cromatografia Líquida de Elevada Pressão (HPLC)

As amostras de açúcares e etanol provenientes das extrações e fermentações foram analisadas num cromatógrafo HPLC (high pressure liquid chromatography) equipado com um detetor RI (Hitachi L-2490, Elite LaChrom), Bomba (Hitachi L-2130, Elite LaChrom), Forno (Hitachi L-2300, Elite LaChrom) e Injetor Automático (Hitachi L-2200, Elite LaChrom). As colunas cromatográficas utilizadas foram: OH AY Merck KGaA e Aminex HPX 87P, 0,5 ml/min à temperatura ambiente, num sistema isocrático, com o eluente H₂SO₄ a 0,002 N. O software usado para quantificar e qualificar os açúcares e etanol foi o EZ Chrom Elite. Foram utilizados padrões de frutose, glucose e sacarose com uma gama de concentrações de 5 a 40 g/L. O padrão de etanol abrangeu uma concentração de 5 a 110 g/L.

Antes de serem analisadas, todas as amostras foram primeiro centrifugadas em “ependorfs” durante 2 minutos a 11000 rpm e posteriormente os seus sobrenadantes filtrados para “vials” usando filtros de 0,2 µm de poro através de seringas.

3.2.2. Método DNS

O método de Bernfeld (1955), consiste na redução em meio alcalino do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) a 3-amino-5 nitrossalicílico, por ação dos açúcares redutores. Esta

redução origina um complexo acastanhado, que é doseado colorimetricamente, no comprimento de onda de 540 nm.

3.2.2.1.Preparação de Reagente DNS

Pesaram-se, numa balança (XT 2200C IP65, Precisa), 300 g de tartarato de sódio e potássio 4-hidratado num “erlenmeyer” de um litro. Adicionou-se 16 g de hidróxido de sódio e 500 ml de água destilada. Em seguida, dissolveu-se a solução através de calor moderado. Após a dissolução, adicionaram-se 10 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico. Arrefeceu-se a temperatura ambiente, protegendo a solução da luz, e perpez-se até um litro com água destilada. Guardou-se num frasco cor de âmbar.

3.2.2.2.Curva Padrão e Amostras

Para quantificar os açúcares é necessário realizar uma curva padrão, através da qual se vai comparar os resultados obtidos nas amostras.

Pesou-se numa balança (XB 120A, Precisa), 0,2 g de glucose e perpez-se o volume com água destilada num balão volumétrico de 100 ml. Foram medidos volumes de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 ml da solução padrão em tubos de ensaio, aos quais se adicionaram 1,8; 1,6; 1,4; 1,2 e 1 ml de água destilada, respetivamente. Adicionou-se 1 ml do reagente DNS a cada tubo. Foi feito um tubo para o branco contendo 2 ml de água destilada e 1 ml de DNS. Em seguida, colocaram-se os tubos em água a ferver durante 15 minutos. Após este tempo, arrefeceram-se os tubos até temperatura ambiente. Adicionaram-se 9 ml de água destilada em cada tubo de ensaio. Misturou-se o conteúdo dos tubos com ajuda de um vortex e retirou-se 1 ml de cada tubo para as suas respetivas cuvettes. Leram-se as absorvâncias para cada concentração a 540 nm.

A figura 2 apresenta a curva padrão de glucose determinada pelo método de DNS e o respetivo coeficiente de correlação (R^2), declive e ordenada na origem.

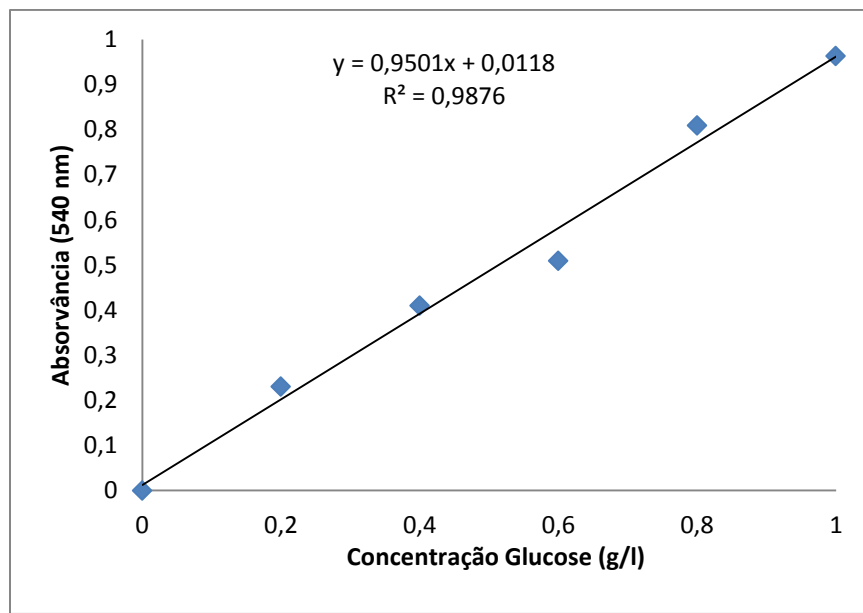


Figura 2 - Curva padrão para quantificação de glicose pelo método de Bernfeld (1995).

Um procedimento semelhante foi realizado para as amostras de hidrólise enzimática. Das soluções de hidrólise enzimática centrifugadas retirou-se 1 ml e colocou-se em tubos de ensaio. Adicionou-se 1 ml de DNS em cada tubo e colocaram-se os mesmos em água a ferver durante 15 minutos. Arrefeceu-se até temperatura ambiente e adicionou-se 10 ml de água destilada em cada tubo. Misturou-se com ajuda de um vortex e removeu-se 1 ml para cuvettes, em que se leram as respectivas absorvâncias a 540 nm. Com base na curva-padrão determinou-se a concentração de açúcares redutores.

3.3. Extração Aquosa de Açúcares

A primeira etapa deste processo de obtenção de etanol compreende a extração de açúcares solúveis da batata-doce. Com este processo pretende-se retirar todos os açúcares solúveis, como é o caso da sacarose, glicose, frutose e maltose. Estes açúcares serão posteriormente metabolizados no processo fermentativo obtendo-se etanol como produto final.

Inicialmente determinou-se o rácio da quantidade de batata-doce por volume de solvente que permitiu obter valores mais elevados de açúcares extraídos. A seguir, testaram-se vários métodos de extração, escolhendo-se aquele em que foi possível alcançar melhores resultados.

3.3.1. Otimização do Rácio de Extração Sólido-Líquido (Batata-doce: Água)

Tendo por base um método utilizado em alfarroba, descrito por Manso et al., (2010), testaram-se os seguintes rácios de peso de batata-doce por volume de água: 0,5:10 (5 g de batata-doce em 100 ml de água destilada); 1:10 (10 g de batata-doce em 100 ml de água destilada); 2:10 (20 g de batata-doce em 100 ml de água destilada); 3:10 (30 g de batata-doce em 100 ml de água destilada).

As raízes de batata-doce foram cortadas e trituradas numa picadora (Pikatti 1705, Flama) e posteriormente secas numa estufa durante 24 horas a 60 °C.

Incubou-se a mistura de batata-doce seca com água, a 25 °C durante 1 hora em “erlenmeyers” de 250 ml, de acordo com os rácios estabelecidos. Centrifugou-se o conteúdo dos “erlenmeyers”, utilizando uma centrífuga (Universal 320, Hettich Zentrifugen) a 5000 rpm durante 20 minutos. Filtraram-se os sobrenadantes provenientes da centrifugação utilizando uma bomba de vácuo (DOA-P104-BN, Gast), funil de Buchner e filtros Whatman 55 mm. Os filtrados foram centrifugados em eppendorfs durante 2 minutos a 11000 rpm, com uma centrífuga (5415D, Eppendorf). Analisou-se a quantidade de açúcares obtida pelo método de HPLC, descrito no ponto 3.2.1.

3.3.2. Otimização do Método de Extração

Para se seleccionar o melhor método de extração, foram testados dois métodos de extração em que se utilizou um com maior aquecimento, na tentativa de aumentar a eficiência de extração de açúcares. Estes dois métodos foram: aquecimento em refluxo e liquefação a alta temperatura e pressão. No caso do método por extração por aquecimento em refluxo, usaram-se vários solventes como a água, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e uma combinação de água com ácido sulfúrico, na tentativa de achar o melhor solvente.

3.3.2.1. Extração por Aquecimento a Refluxo

Cortaram-se e trituraram-se as raízes de batata-doce. Realizou-se um aquecimento a refluxo, colocando o rácio de 2:10 (200 g batata-doce em 1000 ml de solvente), em balões de fundo redondo. Foram testados como solventes a água destilada, ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 0,2 M e ácido clorídrico (HCl) a 6 M. O aquecimento foi feito por uma manta de aquecimento a 90 °C durante 7 horas. Após o aquecimento, centrifugaram-se os meios a 5000 rpm durante 20 minutos. Filtraram-se os sobrenadantes obtidos. Centrifugou-se em “ependorfs” durante 2 minutos a 11000 rpm e analisou-se a quantidade de açúcares, pelo método de HPLC, descrito no ponto 3.2.1.

3.3.2.2. Extração por Liquefação a Altas Temperatura e Pressão (Autoclave)

Este método foi baseado no trabalho realizado por Zhang & Feng (2010), em que é realizada uma liquefação de batata-doce durante 3 horas. Neste trabalho, foi utilizada a autoclave para realizar esta extração a 110 °C durante 1 hora e pressão de 110 bar.

Tal como na extração por aquecimento a refluxo, cortou-se e triturou-se a batata-doce e colocou-se em “erlenmeyers” de 2000 ml as quantidades necessárias de batata e água de modo a realizar um rácio de 2:10 (200 g batata-doce em 1000 ml de água destilada). Centrifugou-se a 5000 rpm, durante 20 minutos. Filtrou-se com funil de Buchner e filtros Whatman 55 mm. Centrifugou-se durante 2 minutos a 11000 rpm e foi feita a análise da quantidade de açúcares por HPLC, cujo método é descrito no ponto 3.2.1.

3.4. Hidrólise Enzimática da Matéria Fibrosa de Batata-doce

O amido, que é um polissacarídeo constituído por várias unidades de glucose ligadas entre si através de ligações glicosídicas, é o principal constituinte da batata-doce. Não é metabolizado pela *S. cerevisiae*, o que faz com que seja necessário decompô-lo nas suas unidades básicas que é a glucose, e que por sua vez já é passível de ser consumida pela levedura. Essa decomposição ou hidrólise pode ser realizada através de enzimas. Neste trabalho, foram utilizadas duas enzimas, a α -amilase e a amiloglucosidase.

A α -amilase é uma enzima que hidrolisa a ligação glicosídica α -1,4 formando glucose e maltose (dissacarídeo formado por duas glucoses), mas não é capaz de hidrolisar a ligação α -1,6. A amiloglucosidase é uma enzima que quebra ambas as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6, formando glucose (Russo et al., 2009). A utilização destas duas enzimas é um dos vários métodos que podem ser aplicados para a hidrólise de amido (Russo et al., 2009).

3.4.1. Otimização da Mistura Enzimática

Foram testadas várias concentrações e associações das enzimas α -amilase (Sigma A3403-500KU; 853 U/mg proteína) e amiloglucosidase (Sigma A7095-50 ml; 300 U/ml), no sentido de escolher a melhor combinação de enzimas para a realização de hidrólise enzimática.

A hidrólise foi realizada em tubos de ensaio, nos quais se colocou 1 g de batata-doce previamente utilizada em extração de açúcares e 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,02 M com cloreto de sódio 0,006 M, pH 6,9. Adicionaram-se quantidades variáveis de α -amilase aos tubos de ensaio e incubaram-se os mesmos a 20 °C durante 20 minutos. As concentrações de α -amilase utilizadas foram: 0,2; 1,8; 18,1; 90,6; 181,2; 452,9; 905,8; 1811,6 U/ml. Em seguida, acertou-se o pH da mistura para 4,5 e acrescentaram-se também concentrações variáveis de amiloglucosidase. As quantidades de amiloglucosidase usadas foram: 0,3; 0,51; 1,5; 3; 5,1; 7,5; 10,5; 15; 30 U/ml. Incubaram-se os tubos a 55 °C durante 30 minutos. Este procedimento foi realizado em duplicado. As temperaturas e pH utilizados foram os recomendados pela empresa fabricante.

Após a hidrólise enzimática, cada amostra foi centrifugada para separação do meio hidrolisado, para posteriormente se realizar a quantificação de açúcares redutores presentes em cada combinação enzimática, através do método descrito no ponto 3.2.2.

Após a análise dos resultados obtidos para cada combinação de enzimas, a melhor combinação foi escolhida para a realização da fermentação alcoólica *fed-batch* em reator biológico.

3.5. Fermentação Alcoólica com Batata-doce

A fermentação é o processo metabólico que vai permitir a obtenção de etanol a partir dos açúcares extraídos anteriormente. Esta metabolização de açúcares em etanol é levada a cabo por uma levedura. Foram realizadas três tipos de fermentações: *batch* em “erlenmeyer”, *batch* em reator biológico e *fed-batch* em reator biológico.

Antes de se iniciar um processo fermentativo é necessário, para além da extração de açúcares, ter uma cultura do microrganismo adequada para a produção de etanol, preparar um pré-inóculo e determinar o número de células desse microrganismo no pré-inóculo para finalmente se inocular e iniciar a fermentação.

3.5.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a *Saccharomyces cerevisiae*, F13A que é uma estirpe autóctone com tolerância à toxicidade ao etanol. Foi isolada a partir do mosto de uva em Laboratório do ISE da Universidade do Algarve, pela Prof. Célia Quintas e adaptada a elevadas concentrações de etanol no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA-CIMA/Ualg).

Esta levedura foi mantida numa incubadora (Incuberm, Raypa) a 30 °C, em placas de petri, sendo necessário efetuar repicagens periódicas para novas placas de petri contendo meio YEPD sólido (20 g/l de glucose, 20 g/l de peptona, 15 g/l de agar e 10 g/l de extrato de levedura).

3.5.2. Pré-inóculo

Efetuar-se os pré-inóculos da levedura de *Saccharomyces cerevisiae* F13A antes das fermentações, para que houvesse uma adaptação ao meio e crescimento da levedura. Os pré-inóculos foram feitos retirando-se com uma ansa esterilizada por chama, uma colónia de levedura, em crescimento na placa de petri, e transferindo-se para um “erlenmeyer” de 250 ml contendo 50 ml de meio YEPD líquido (10 g/l de extrato de levedura, 20 g/l de

peptona e 20 g/l glucose). Na fermentação em reator biológico, transferiu-se para um “erlenmeyer” de 250 ml com 50 ml de extrato de batata-doce contendo 10 g/l de extrato de levedura e 20 g/l de peptona.

Para se conhecer a concentração a que se encontra a levedura antes de se inocular e iniciar a fermentação, realiza-se uma contagem direta de células num microscópio, utilizando uma câmara de contagem tipo Neubauer também conhecida como hemacitometro.

3.5.3. Determinação do Número de Células

O número de células totais foi quantificado para saber qual a concentração celular e avaliar a viabilidade celular do pré-inóculo para possibilitar a reprodutibilidade das condições da fermentação alcoólica. A contagem de células pelo microscópio com câmara de Neubauer permite obter uma resposta rápida, uma observação de células vivas e presença de contaminantes.

A câmara de Neubauer consiste de uma lâmina de microscopia, mais espessa do que as normais, com um quadrante quadriculado. Observando ao microscópio, percebe-se que existem três tipos de quadrantes denominados A, B e C, que juntos formam um quadrado maior. A figura 3 representa essa lâmina de microscopia.

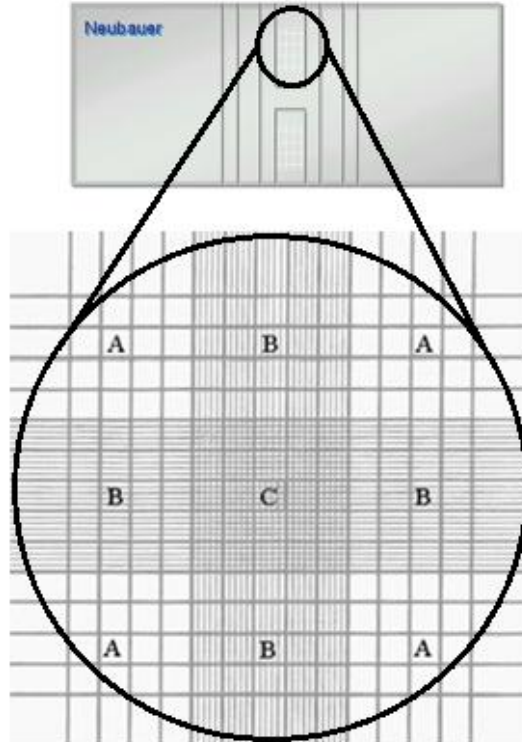


Figura 3 - Representação de uma lâmina de microscopia vista numa câmara de Neubauer.

É possível verificar que estes quadrantes têm sub-divisões diferentes. Usualmente células ou esporos de pequenas dimensões são contados no quadrante C, de tamanho intermediário no quadrante B e de grande dimensão no quadrante A. Para se contar as células de *S. cerevisiae*, apenas se utilizou o quadrante C. Neste quadrante, existem sub-divisões, que por sua vez são constituídas por quadrados de menor dimensão, perfazendo um total de vinte e cinco quadrados por sub-divisão. A contagem é feita, na sub-divisão do topo à esquerda, contando-se cinco quadrados na diagonal de cada sub-divisão. Após esta contagem, inicia-se a contagem na sub-divisão do topo direito, contando-se igualmente cinco quadrados por sub-divisão, fazendo um total de quarenta quadrados. Como a lâmina possui dois quadrantes tipo C, um na parte de cima e outro e na parte de baixo, realiza-se a mesma contagem para os dois, perfazendo no final uma contagem de oitenta quadrados. Para saber o número estimado de células/ml utiliza-se a equação 1:

$$\frac{n^{\circ} \text{ células}}{\text{ml}} = \frac{\text{células contadas}}{80 \text{ quadrados}} \times \text{fator diluição} \times \text{volume total quadrados} \quad (\text{Equação 1})$$

3.5.4. Inoculação

A inoculação realizou-se transferindo em condições de assepsia, um volume conhecido do pré-inoculo para o “erlenmeyer” ou reator contendo extrato de batata-doce. Esse volume foi calculado usando a equação 2:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \text{ (Equação 2)}$$

Em que C_i corresponde à concentração de células/ml obtida na equação 1, C_f a concentração de células/ml que se deseja ter de inoculo para iniciar a fermentação (cujo valor foi de 1×10^7 células/ml para todas as fermentações), V_f o volume de meio em que se pretende inocular e V_i o volume necessário de inoculo a colocar.

3.5.5. Fermentação *Batch* em “Erlenmeyer”

Utilizaram-se meios em que a fonte de carbono era extrato de batata-doce, obtido através de liquefação a alta temperatura e pressão (concentração inicial de 76 g/l de açúcares), ou através da extração por aquecimento em refluxo (concentração inicial de 60 g/l de açúcares), a um rácio de 2:10 (20 g batata-doce e 100 ml de água destilada), que foram designados por BE-ATP e BE-REF, respetivamente. A estes extratos foi adicionado 20 g/l de peptona e 10 g/l extrato de levedura. Foram retiradas amostras dos meios antes de se proceder à inoculação, que foram usados como branco na leitura das absorvâncias.

Foi feito um ensaio controlo para esta fermentação com glucose (20 g/l) como fonte de carbono, utilizando um “erlenmeyer” de 250 ml com meio YEPD líquido (10 g/l de extrato de levedura, 20 g/l de peptona e 20 g/l glucose) que foi designado por BE-GLU.

A concentração inicial de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* foi de 1×10^7 células/ml.

Após a inoculação, retiraram-se amostras periódicas de 1 e 2 ml durante 3 dias (63 horas) para análise de peso fresco, peso seco, açúcares e etanol e amostras de 100 µl para leitura de absorvância. A leitura da absorvância das amostras foi feita a 600 nm num

espectrofotometro (Cintra 202, GBC). Utilizou-se como branco ou referência, meio de cultura. Para algumas amostras foi necessário realizar diluições.

As fermentações decorreram numa incubadora orbital a 30 °C e agitação de 150 rpm.

3.5.6. Fermentação *Batch* em Reator Biológico

Foi usado nesta fermentação um reator de três litros (ADI 1010/1025, Applikon, Holland), agitado mecanicamente com uma turbina do tipo Rushton e munido com dispersor de ar em formato de L. As fermentações foram monitorizadas com um biocontrolador ADI 1010, consola ADI 1025, associado a um agitador ADI P100, um medidor de oxigénio, um eléctrodo de pH (Applisens) e bomba de arejamento Newair 1 IPX4 de caudal 60 l/h.

A fermentação foi realizada à temperatura de 30 °C, agitação de 250 rpm e arejamento de 0,13 vvm.

Usou-se como fonte de carbono, extrato de batata-doce obtido por liquefação a alta temperatura e pressão (concentração inicial de 26 g/l de açúcares), a um rácio de 2:10 (400 g de batata-doce em 2000 ml de água destilada). Ao meio foi adicionado 20 g/l de peptona, 10 g/l extrato de levedura e anti-espuma na proporção de 0,1 ml para cada litro de meio.

A concentração inicial de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* foi de 1×10^7 células/ml.

Retiraram-se amostras periódicas de 7 ml em duplicado durante 3 dias (72 horas) para análise de peso fresco, peso seco, açúcares e etanol e amostras de 100 µl para leitura de absorvâncias.

3.5.7. Fermentação *Fed-batch* em Reator Biológico

Realizou-se a fermentação num reator de três litros, já descrito em 3.5.6., nas mesmas condições de temperatura, agitação e arejamento, e um volume de trabalho de 1,5 litros.

Usou-se como fonte de carbono, extrato de batata-doce obtido por liquefação a alta temperatura e pressão (concentração inicial de 25 g/l de açúcares), a um rácio de 2:10 (400 g de batata-doce em 2000 ml de água destilada). Ao meio foi adicionado 20 g/l de peptona e 10 g/l extrato de levedura.

A concentração inicial de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* de 1×10^7 células/ml.

Adicionou-se 0,1 ml de anti-espuma para cada litro de meio.

Foi realizada uma adição de meio proveniente de hidrólise enzimática após 10 horas de fermentação. A adição foi de 700 ml de meio com uma concentração de 3 g/l de açúcares, tendo a hidrólise enzimática sido realizada num “erlenmeyer” de 4000 ml contendo batata-doce previamente liquefeita a alta temperatura e pressão a um rácio de 2:10 (400 g de batata-doce em 2000 ml de água destilada) com 20 g/l de peptona e 10 g/l extrato de levedura.

Retiraram-se amostras periódicas de 6 ml durante 3 dias (70 horas), em triplicado para análise de peso fresco, peso seco, açúcares e etanol e amostras de 100 µl para leitura de absorvâncias.

3.6. Estratégias de Hidrólise Enzimática e Fermentação

Na tentativa de se obter uma maior concentração de açúcares, a partir da mesma matéria-prima, procedeu-se a um estudo de várias estratégias em que se combinaram hidrólise enzimática e fermentação. Essas estratégias visaram a hidrólise enzimática da fibra da batata-doce, após a extração dos açúcares solúveis, de forma a se obterem as melhores condições que maximizassem a obtenção de etanol.

Realizaram-se três métodos diferentes em “erlenmeyer”, os quais foram designados por: NSSF I, NSSF II e SHF, representados nas figuras 4, 5 e 6 respetivamente.

No método NSSF I, procedeu-se a uma extração de açúcares solúveis a partir de batata-doce, seguindo-se uma hidrólise enzimática, do meio previamente extraído, com duas enzimas (primeiro pela ação de α -amilase e posteriormente de amiloglucosidase, cada uma com as suas condições específicas de temperatura e pH). O meio foi centrifugado para remoção de resíduos de batata-doce existentes no meio e procedeu-se à fermentação com o meio resultante destas duas operações.

O método NSSF II consistiu quase inteiramente ao método anterior, o NSSF I, com a exceção de que não se realizou a operação de centrifugação e realizou-se a fermentação com resíduos de batata-doce incorporados no meio.

O último método, o SHF, tal como os anteriores, iniciou-se com uma extração de açúcares solúveis. Efetuou-se uma centrifugação para remoção dos resíduos de batata-doce e a

hidrólise enzimática, primeiro com α -amilase e em seguida com amiloglicosidase em diferentes condições de temperatura e pH. Fez-se uma nova centrifugação do meio e iniciou-se a fermentação.

Para estes três métodos, fez-se um pré-inoculo na concentração de 1×10^7 células/ml, em “erlenmeyers” de 250 ml, utilizando 20 g/l de peptona e 10 g/l de extrato de levedura dissolvidos em 50 ml de meio de batata-doce previamente extraído a alta temperatura e pressão durante 1 hora.

As fermentações decorreram a 30 °C nos três casos e recolheram-se amostras em duplicado para cada “erlenmeyer”, para análise de peso fresco, peso seco, absorvância, açúcar e etanol.

3.6.1. NSSF I

Operou-se uma extração de açúcares a alta temperatura (121 °C) e pressão de 1 atm durante 1 hora. Utilizou-se um rácio de 2:10 (20 g de batata-doce em 100 ml de água destilada) em “erlenmeyers” de 250 ml, contendo 43 g/l de açúcares totais. Adicionou-se ao meio 20 g/l de peptona e 10 g/l de extrato de levedura.

Após a extração, acertou-se o pH da mistura para 6,9 adicionando gotas de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 5 M. Efetuou-se a hidrólise adicionando aos “erlenmeyers” 18116 U/ml de α -amilase. Incubaram-se os “erlenmeyers” a 20 °C durante 20 minutos. Em seguida, acertou-se o pH com solução de ácido clorídrico (HCl) a 5 M até se atingir um pH de 4,5. Adicionou-se 300 U/ml de amiloglicosidase e incubou-se a 55 °C durante 30 minutos. Obteve-se 15 g/l de açúcares neste processo de hidrólise.

Transferiu-se o conteúdo dos “erlenmeyers” para “falcons” de 50 ml e centrifugou-se a 4500 rpm durante 7 minutos. O sobrenadante foi posto em novos “erlenmeyers”, previamente autoclavados. Inoculou-se *S. cerevisiae* da estirpe F13A nos mesmos para se proceder à fermentação, conforme apresentado na figura 4.

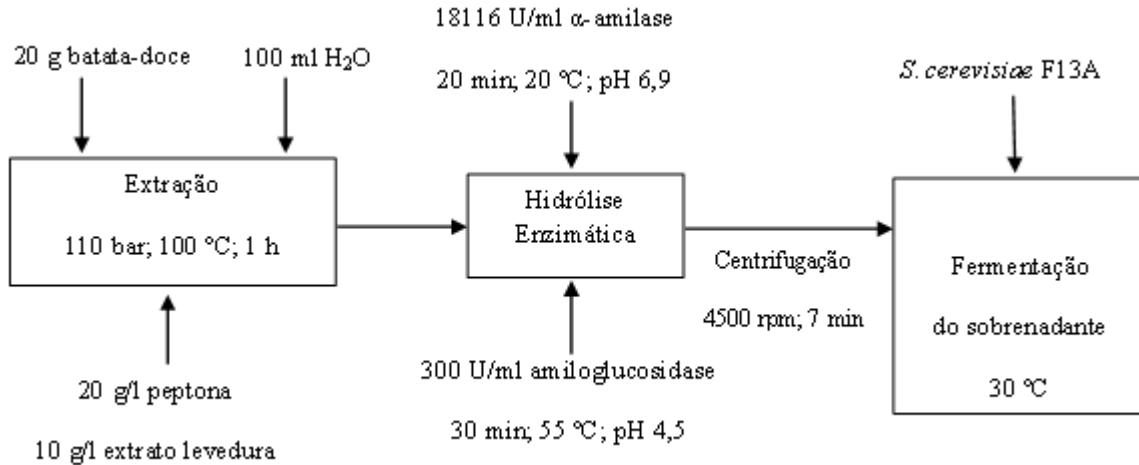


Figura 4 - Esquema representativo do procedimento utilizado para o método de hidrólise enzimática e fermentação NSSF I.

3.6.2. NSSF II

Este método é praticamente igual ao anterior, com a exceção de que não existe a centrifugação e remoção do meio hidrolisado. Assim, a fermentação é realizada imediatamente após o final da hidrólise enzimática, utilizando-se os mesmos “erlenmeyers” para inoculação da levedura.

As condições operacionais do ensaio foram semelhantes às descritas anteriormente, para o sistema

NSSF I, obtendo-se 39,3 g/l na extração e 22,2 g/l de açúcares totais na hidrólise enzimática.

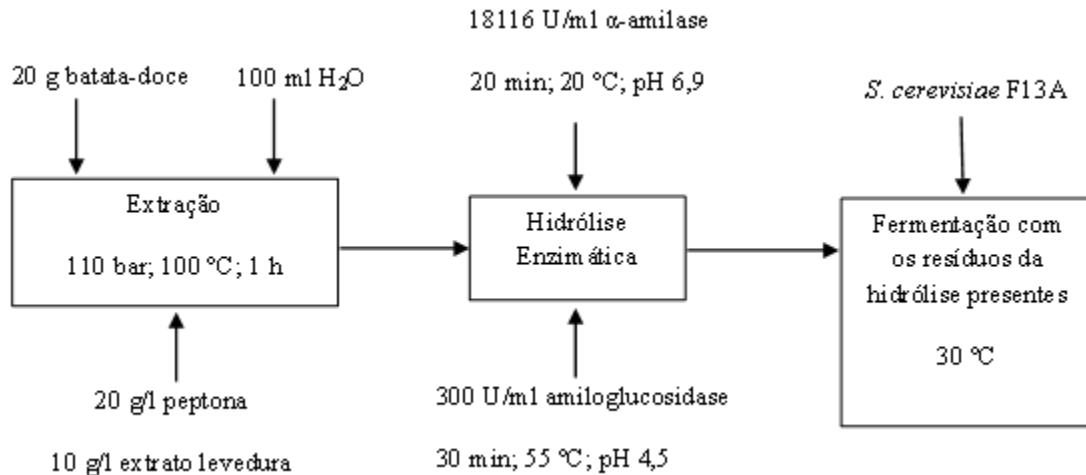


Figura 5 - Esquema representativo do procedimento utilizado para o método de hidrólise enzimática e fermentação NSSF II.

3.6.3. SHF

Neste método, tal como nos anteriores, foi realizada uma extração de açúcares a altas temperatura e pressão durante 1 hora, em que se extraiu 37,2 g/l de açúcares totais. Centrifugou-se o meio a 12000 rpm e 4 °C durante 20 minutos.

O sobrenadante foi colocado em novos “erlenmeyers”, adicionando-se 20 g/l de peptona e 10 g/l de extrato de levedura. Efetuou-se uma autoclavagem para esterilização e homogeneização dos meios.

Do “pellet” resultante da extração, retirou-se 1 g e transferiu-se para dois “falcons” autoclavados, aos quais se acrescentou ainda 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,02 M com cloreto de sódio 0,006 M, a pH 6,9, e 905,8 U/ml de α -amilase. Incubou-se a 20 °C durante 20 min e após esse período de tempo, acertou-se o pH para 4,5 com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 5 M e adicionaram-se 15 U/ml de amiloglucosidase. Da hidrólise enzimática resultaram 7,4 g/l de açúcares totais. Os “falcons” foram colocados a 55 °C durante 30 minutos. Centrifugou-se a 4500 rpm durante 7 minutos. Os sobrenadantes foram adicionados aos “erlenmeyers” já autoclavados. Inoculou-se o meio com *S. cerevisiae* F13A.

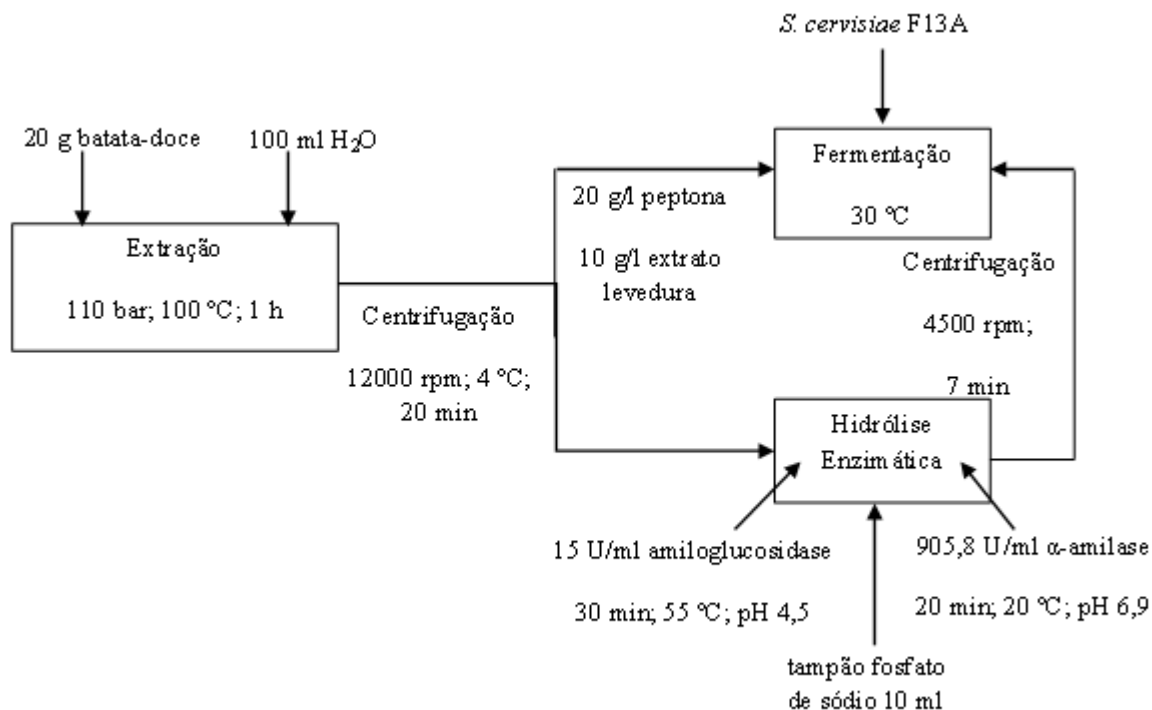


Figura 6 - Esquema representativo do procedimento utilizado para o método de hidrólise enzimática e fermentação SHF.

4. Resultados e Discussão

4.1. Extração Aquosa de Açúcares da Batata-doce

Nesta primeira etapa do processo de obtenção de etanol, cujo objetivo é extrair os açúcares presentes na batata-doce, para posteriormente se utilizar os mesmos no processo fermentativo, inicialmente definiu-se o rácio ideal de extração e o seu método mais eficaz para a remoção dos açúcares. Com este processo pretende-se retirar todos os açúcares solúveis, como é o caso da sacarose, glucose, frutose e maltose.

4.1.1. Otimização do Rácio de Extração

Os resultados obtidos para as extrações de batata-doce seca com água, a 25 °C durante 1 hora em “erlenmeyers” de 250 ml, usando os raios de 0,5:10 (5 g de batata-doce em 100 ml de água destilada), 1:10 (10 g de batata-doce em 100 ml de água destilada), 2:10 (20 g de batata-doce em 100 ml de água destilada) e 3:10 (30 g de batata-doce em 100 ml de água destilada) encontram-se representados na tabela 4:

Tabela 4 - Resultados das extrações realizadas em diferentes raios, com os açúcares identificados, concentração de açúcar (g/l), açúcar total (g/l), líquido recuperado (%) e o respetivo tempo de duração da extração (min).

Rácio	Açúcar Identificado	Concentração Açúcar (g/l)	Açúcar Total (g/l)	Líquido Recuperado (%)	Tempo de Extração (min)
0,5:10	Frutose	7,2	11,5	90	60
	Glucose	0,7			
	Sacarose	3,6			
1:10	Frutose	7,8	15,1	84	60
	Glucose	2,3			
	Sacarose	4,9			
2:10	Frutose	9,5	23,7	62	60
	Glucose	6,9			
	Sacarose	7,3			
3:10	Frutose	10,8	31,7	12	60
	Glucose	11,6			
	Sacarose	9,3			

De acordo com estes resultados, o rácio de 0,5:10 (p/v) teve a maior percentagem de líquido recuperado, contudo, a sua concentração de açúcares totais, tal como seria de esperar, foi a mais baixa de todos os raios analisados. O rácio de 1:10 (p/v) à semelhança do rácio visto anteriormente, também tem uma elevada percentagem de líquido recuperado, mas uma concentração de açúcares baixa. O rácio 3:10 (p/v) foi aquele que obteve a percentagem de açúcares totais mais elevada neste estudo, no entanto, a sua percentagem de líquido recuperado é a menor de todos os raios. Assim, o rácio de 2:10 (p/v) foi selecionado como o melhor devido à relação entre açúcares totais obtidos e percentagem de líquido recuperado, que neste caso foram de 23,7 g/l de açúcares e 62% de líquido recuperado.

4.1.2. Otimização do Método de Extração

Foram estudados vários métodos de extração para o rácio escolhido, 2:10 (p/v). Esses métodos encontram-se na tabela 5, juntamente com os correspondentes tempos de extração, temperatura e açúcares totais.

Tabela 5 - Resultados obtidos para a otimização do método de extração, com os diferentes tipos de extração realizados, para diferentes solventes, tempos de extração (min), temperaturas (°C) e os respetivos açúcares totais (g/l) obtidos.

Tipo de Extração	Solvente	Tempo de Extração (min)	Temperatura (°C)	Açúcar Total (g/l)
Aquecimento a refluxo	H ₂ O	180	90	23,8
Aquecimento a refluxo	H ₂ O	420	90	60,2
Aquecimento a refluxo	H ₂ O + H ₂ SO ₄	270	90	14,1
Aquecimento a refluxo	H ₂ SO ₄	120	90	15,3
Altas temperatura e pressão	H ₂ O	60	110	75,8
Agitação à temperatura ambiente (batata-doce seca)	H ₂ O	60	25	23,7
Agitação à temperatura ambiente (batata-doce fresca)	H ₂ O	60	25	6,7
Aquecimento a refluxo	HCl	120	90	16,4

Os métodos de extração em que se atingiram os valores mais elevados de concentração de açúcares totais são o método de liquefação a altas temperatura e pressão e o aquecimento em refluxo a 90 °C durante 3 horas.

Para a extração a altas temperatura e pressão, o valor de açúcares totais foi de 75,8 g/l, em que se identificaram como sendo 68,6 g/l de maltose, 5,8 g/l de glucose e 1,4 g/l de galactose.

A concentração de açúcares totais na extração por aquecimento em refluxo com água foi de 60,2 g/l, cuja composição foi determinada como 55,9 g/l de maltose, 0,7 g/l de galactose e 3,7 g/l de glucose. De referir que as concentrações de açúcar total extraído pode ser variável utilizando os mesmos métodos, pois dependerá do teor em açúcares existente na variedade e no lote de batata-doce utilizado.

De acordo com Gore (1923), em batatas-doces porto-riquenhas cozinhadas, o amido transforma-se quase todo em dextrinas e maltose. Tal deve-se ao facto de possuírem enzimas que hidrolisam o amido em maltose. Este facto pode explicar a presença de grandes quantidades de maltose nos resultados obtidos.

Escolheu-se como melhor método a extração a altas temperatura e pressão (em autoclave) devido à maior quantidade de açúcares totais extraídos e ao facto de ser um método mais simples e rápido do que o método de extração por aquecimento em refluxo. Assim, o método de extração de açúcares solúveis usado para todas as fermentações seguintes foi o de liquefação a altas temperatura e pressão.

4.2. Fermentação *Batch* do Extrato da Batata-doce em “Erlenmeyer”

Neste ensaio foram usados dois meios de cultura diferentes, um suplementado com extrato de batata-doce e outro com glucose, sendo este último designado como ensaio controlo (BE-CON). Usaram-se duas concentrações de açúcares extraídos da batata-doce. No ensaio BE-ATP utilizaram-se 76 g/l e no ensaio BE-REF 60 g/l. Realizaram-se fermentações em “erlenmeyer” de 250 ml ao longo de 63 horas, nas condições referidas em materiais e métodos (3.5.), sendo monitorizados a produção de etanol, da biomassa e o consumo de açúcares totais. Os resultados encontram-se representados nas figuras 7, 8 e 9.

Para analisar o parâmetro da biomassa, utilizou-se o peso seco, podendo-se utilizar também o peso fresco ou a absorvância a $\lambda = 600$ nm. Analisando a figura 7, que apresenta os dados do ensaio BE-CON, verifica-se que partindo de uma concentração baixa de fonte de carbono convencional (20 g/l de glucose), o crescimento da estirpe utilizada ocorreu em ótimas condições e sem inibição, como é visível pela produção de biomassa (peso seco). A concentração de glucose foi totalmente consumida às 20 horas, ocorrendo nessa altura o início da fase estacionária, justificando assim a baixa produção de biomassa (9,19 g/l) e de etanol (11,33 g/l). Para esta baixa concentração de glucose o metabolismo de *S. cerevisiae* está direccionado para a produção de energia usando a cadeia respiratória que se encontra ativa, pelo que o processo fermentativo é inibido (Deken, 1966). Na figura 7 observa-se um acumular de biomassa ao longo da fermentação e diminuição do processo fermentativo.

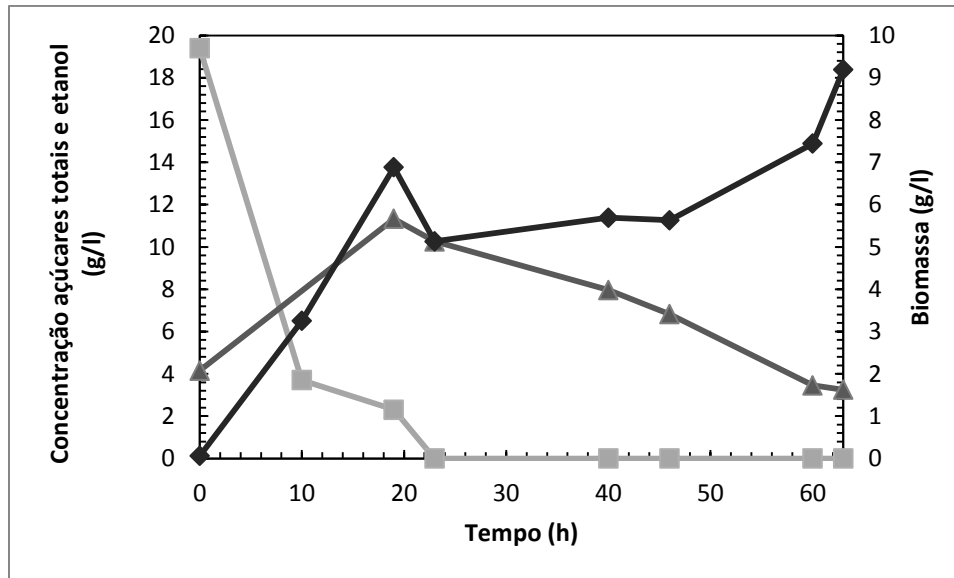


Figura 7 - Produção de etanol (▲) e biomassa (◆), e consumo de açúcares (■) numa fermentação *batch* realizada em “erlenmeyer” de 250 ml, com *S. cerevisiae* F13A, utilizando meio YEPD como substrato (20 g/l de concentração da fonte de carbono). A fermentação foi realizada a 30 °C e 150 rpm.

A figura 8, indica os resultados do ensaio BE-REF, em que se utiliza o extrato da batata-doce (60g/l) como fonte de carbono e observa-se que a cultura não atinge a fase estacionária até cerca das 60 horas, sugerindo que a atividade respiratória estava ainda ativa e com disponibilidade da fonte de carbono. A biomassa máxima atingida foi de 21,88 g/l, o etanol alcançado no início da fase estacionária foi cerca de 20g/l e o açúcar total cerca de 10g/l.

Não se verificou o consumo total de açúcares, mas estes foram consumidos rapidamente nas primeiras 20 horas de fermentação, mais lentamente até cerca das 40 horas e depois o conteúdo de açúcares manteve-se constante ao longo da curva de crescimento, sugerindo que os açúcares restantes não são fermentáveis pela *S. cerevisiae* F13A. Assim ao longo da produção de biomassa e consumo de açúcar verifica-se a produção de etanol, sendo o seu máximo de 26,4 g/l às 23 horas. Entre as 23 horas e cerca das 40 horas, o consumo de açúcar é muito mais lento até cerca de 5 g/l, permitindo que a biomassa aumente, embora com menor taxa de crescimento, mas a produção de etanol começa a diminuir. Esta diminuição de etanol acentua-se a partir das 40 horas, comprovando uma fase diáuxica na curva de crescimento, em que o etanol passa a ser fonte de carbono para que biomassa se mantenha em crescimento.

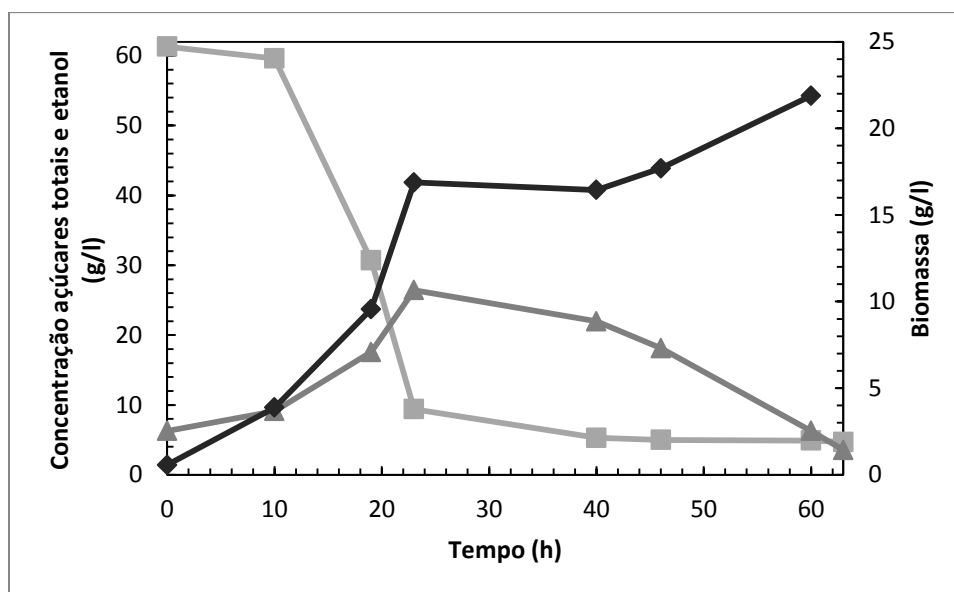


Figura 8 - Produção de etanol (▲) e biomassa (◆), e consumo de açúcares (■) numa fermentação *batch* realizada em “erlenmeyer” de 250 ml, com *S. cerevisiae* F13A, utilizando extrato de batata-doce como substrato (60 g/l de concentração da fonte de carbono). A fermentação foi realizada a 30 °C e 150 rpm.

A figura 9, para os dados do ensaio BE-ATP, mostra um início na fase estacionária às 34 horas, sendo a biomassa máxima atingida de 15,69 g/l às 63 horas e o máximo de etanol de 32,9 às 40 horas de fermentação. O etanol atingido no início da fase estacionária é de 26,4 g/l quando o açúcar total é 9,4 g/l. Tal como no ensaio BE-REF, não se verificou o consumo total dos açúcares, mas estes foram consumidos rapidamente nas primeiras 20 horas de fermentação e posteriormente de forma mais lenta até cerca das 40 horas. Após esse tempo, o conteúdo em açúcares manteve-se constante ao longo da curva de crescimento, indiciando que os açúcares restantes não são fermentáveis pela *S. cerevisiae* F13A.

Apesar de ter ocorrido uma redução de cerca de 10 g/l em etanol a partir das 40 horas, a fase diáuxica embora existente, não é tão significativa como no ensaio de 60 g/l de açúcar inicial, sugerindo que a concentração de etanol produzida tenha tido um maior efeito inibitório do que nesse ensaio.

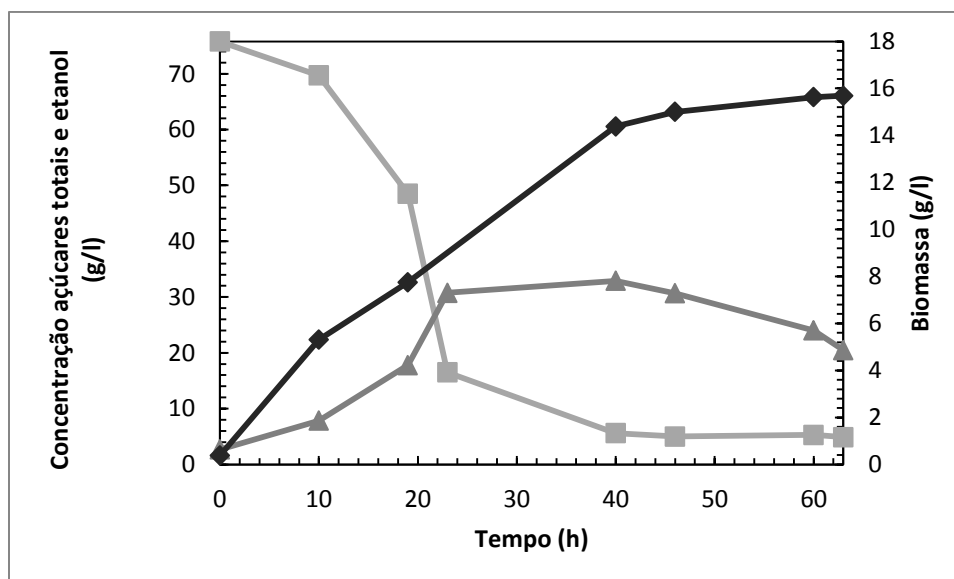


Figura 9 - Produção de etanol (\blacktriangle) e biomassa (\blacklozenge), e consumo de açúcares (\blacksquare) numa fermentação batch realizada em “erlenmeyer” de 250 ml, com *S. cerevisiae* F13A, utilizando extrato de batata-doce como substrato (76 g/l de concentração da fonte de carbono). A fermentação foi realizada a 30 °C e 150 rpm.

Na tabela 6, apresentam-se os valores da taxa específica de crescimento (μ_g), peso seco máximo ($X_{m\acute{a}x}$), rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$), máximo de etanol ($E_{m\acute{a}x}$), rendimento de etanol pelo substrato ($Y_{E/S}$), produtividade de etanol (P_E) e rendimento de etanol pela biomassa ($Y_{E/X}$), para as três fermentações *batch* realizadas em “erlenmeyer” com diferentes concentrações iniciais de açúcares (S_I). A taxa específica de crescimento foi calculada usando o software DMFIT modeling (<http://modelling.combase.cc>).

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos das fermentações em *batch* (BE-CON, BE-REF e BE-ATP) realizadas em “erlenmeyer” de 250 ml, para diferentes concentrações iniciais de açúcares (S_I) resultante do extrato da batata-doce.

Método	S_I (g/l)	μ_g (h ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$E_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{E/S}$ (g/g)	P_E [g/(l.h)]	$Y_{E/X}$ (g/g)
BE-CON	20	0,368 ± 0,043	9,2	0,444 ± 0,061	11,3	0,354 ± 0,089	0,380 ± 0,065	1,087 ± 0,121
BE-REF	60	0,471 ± 0,086	21,9	0,324 ± 0,041	26,4	0,363 ± 0,029	0,831 ± 0,223	1,140 ± 0,126
BE-ATP	76	0,391 ± 0,064	15,7	0,199 ± 0,015	32,9	0,426 ± 0,029	0,833 ± 0,192	2,129 ± 0,228

Valores ± EP; BE-CON – fermentação *batch* em “erlenmeyer” para o controlo (concentração inicial de 20 g/l de glucose); BE-REF – fermentação *batch* em “erlenmeyer” para matéria proveniente de extração por aquecimento a refluxo (concentração inicial de 60 g/l de açúcares); BE-ATP – fermentação *batch* em “erlenmeyer” para matéria proveniente de extração a elevada temperatura e pressão (concentração inicial de 76 g/l de açúcares)

Ao analisar as figuras 7, 8 e 9, e a tabela 6, verifica-se que o ensaio com mais produção de etanol foi o BE-ATP, tendo atingido o valor máximo de 32,9 g/l, seguido por BE-REF com 26,4 g/l e por último, devido à concentração de açúcar consideravelmente mais baixa, o BE-CO que obteve apenas 11,3 g/l. Este resultado era o esperado, pois o ensaio BE-ATP tinha uma maior concentração de açúcares, havendo assim uma maior conversão pela estirpe de açúcares em etanol. O consumo de açúcares verifica-se durante as primeiras 23 horas, período esse em que se dá a produção de etanol.

Nos ensaios BE-REF e BE-ATP, pode-se observar que ambos têm uma concentração mais elevada de substrato inicial (60 e 76 g/l, respetivamente), levando a crer que neste caso ocorre o efeito de Crabtree, onde o substrato é facilmente utilizado pela *S. Cerevisiae*, para a fermentação visto a glucose ser superior a 20g/l. No ensaio BE-REF a biomassa é elevada e a produção de etanol baixa ao contrário do ensaio BE-ATP em que se tem uma produção de etanol maior para uma biomassa inferior. Este facto verifica a capacidade da *S. cerevisiae*, um microrganismo facultativo, de seguir as duas vias metabólicas possíveis, respiratória e fermentativa, dependendo pois como se observa na tabela a cima, houve produção de etanol e biomassa. Os rendimentos de biomassa diminuem com o aumento da concentração de açúcar inicial.

Num processo fermentativo, em presença de elevadas concentrações de substrato em meios arejados, os microrganismos facultativos têm vantagens em relação aos microrganismos aeróbios. Assim, normalmente os processos fermentativos são favorecidos versus a produção de biomassa. Através do controlo, que foi feito para poder verificar a viabilidade celular, uma vez que reunia as condições em que se sabia que a estirpe de *S. cerevisiae* F13A teria um bom crescimento celular e boa produção de etanol, foi possível constatar uma boa adaptação da estirpe *S. cerevisiae* F13A ao meio com extrato de batata-doce como fonte de carbono.

4.3. Fermentação *Batch* do Extrato da Batata-doce em Reator Biológico

Nesta fermentação foi realizado o estudo da produção de etanol, biomassa e consumo de açúcares totais, a partir de extrato aquoso de batata-doce, utilizando *S. cerevisiae* F13A, em reator biológico agitado com um volume total de 3 litros, uma turbina Rushton e um dispersor de ar em forma de L. Utilizou-se um volume de trabalho de 2,4 litros, com uma concentração de açúcares inicial de 26 g/l. A fermentação foi realizada nas seguintes condições: 30 °C, agitação de 250 rpm e arejamento de 0,125 vvm (300 ml/h). De referir que a monitorização de pH não foi registada devido a um problema no medidor de pH.

Ao analisar a figura 10, verifica-se que a acumulação de biomassa estabiliza ao fim de aproximadamente 24 horas, iniciando-se a fase estacionária até cerca das 48 horas. A partir deste ponto da curva até ao final do crescimento (72 horas) existe um ligeiro aumento da biomassa, tal como nos ensaios de “erlenmeyer” anteriormente descritos. Observa-se igualmente que os açúcares são consumidos e ao mesmo tempo ocorre produção de etanol. Esta acontece ao longo da fase exponencial de crescimento (figura 10), bem como o consumo de açúcares até cerca das 24 horas de fermentação. Entre as 24 horas e as 48 horas de fermentação, a produção de etanol, tal como a produção de biomassa entram em fase estacionária. Constata-se que após as 48 horas de fermentação o etanol diminui até às 60 horas, sugerindo que este se tornou a fonte de carbono disponível para o crescimento celular nesta última fase denominada fase diáuxica, Esta observação está de acordo com os resultados obtidos nas fermentações de batata-doce em “erlenmeyer” e com os resultados obtidos com extrato de alfarroba como fonte de carbono para produção de bioetanol (Lima-Costa et al., 2012).

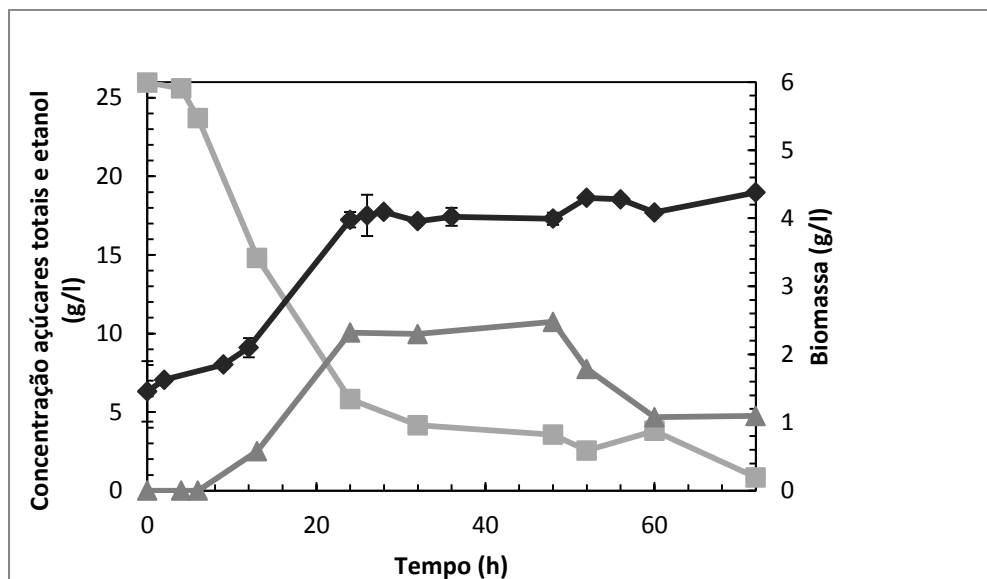


Figura 10 - Produção de etanol (▲) e biomassa (◆), e consumo de açúcares (■) numa fermentação *batch* realizada em reator biológico agitado com um volume total de 3 litros, uma turbina Rushton e um dispersor de ar em forma de L, com *S. cerevisiae* F13A, utilizando extrato de batata-doce como substrato (26 g/l de concentração da fonte de carbono). A fermentação foi realizada a 30 °C, 250 rpm e arejamento de 0,125 vvm. Os valores de biomassa correspondem à média de 3 amostras ± EP.

O máximo de etanol produzido foi de 10,7 g/l às 48 horas de fermentação, com um rendimento de 49,5% (tabela 7), muito próximo do valor teórico (51,1%), indicando que a via fermentativa se encontrava ativa.

Tabela 7 - Valores de taxa específica de crescimento (μ_g), peso seco máximo ($X_{m\acute{a}x}$), rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$), máximo de etanol ($E_{m\acute{a}x}$), rendimento de etanol pelo substrato ($Y_{E/S}$), produtividade de etanol (P_E) e rendimento de etanol pela biomassa ($Y_{E/X}$) a partir de uma concentração inicial de açúcar (S_i), para a fermentação em batch realizada em reator biológico agitado com um volume total de 3 litros, uma turbina Rushton e um dispersor de ar em forma de L, a 30 °C, 250 rpm e arejamento de 0,125 vvm.

Método	S_i (g/l)	μ_g (h ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$E_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{E/S}$ (g/g)	P_E [g/(l.h)]	$Y_{E/X}$ (g/g)
BR	26	0,102 ± 0,021	4,8	0,126 ± 0,013	10,7	0,495 ± 0,047	0,263 ± 0,058	2,502 ± 1,316

Valores ± EP; BR – fermentação *batch* em reator biológico (concentração inicial de 26 g/l de açúcares)

A acumulação de biomassa, taxa específica de crescimento (calculada através do software DMFIT modeling disponível em <http://modelling.combase.cc>) e o rendimento de biomassa (tabela 7) são menores do que os obtidos nos ensaio em “erlenmeyer” (BE-CON). Como a concentração de glucose era superior a 20 g/l não houve repressão dos genes que codificam

os citocromos da via respiratória, pelo que em simultâneo há respiração e fermentação enquanto existe fonte de carbono disponível para tal. Contudo a produção de etanol é inferior à que ocorre no ensaio controlo (BE-CON) (tabela 6) com uma quantidade semelhante de fonte de carbono, mas a produtividade de etanol em reator biológico (0,263 g/(l.h)) é inferior aos valores calculados para o ensaio em “erlenmeyer”.

4.4. Hidrólise Enzimática da Matéria Fibrosa da Batata-doce

Estes ensaios foram realizados para se estudar a reação enzimática de transformação da matéria celulósica presente na batata-doce em moléculas de glucose. Para tal, combinaram-se duas enzimas diferentes, a α -amilase e a amiloglicosidase em diferentes concentrações no sentido de se obter a combinação que permitisse transformar mais moléculas de celulose em glucose atendendo às concentrações de enzimas usadas no processo.

A glucose formada a partir da hidrólise de matéria fibrosa de batata-doce (tabela 8), foi quantificada pelo método de DNS (Bernfeld, 1955), em que se relacionou com a curva-padrão: $y = 0,9501x + 0,0118$, com $R^2 = 0,9876$.

Analisando a tabela 8, verifica-se que a combinação de 1811,6 U/ml de α -amilase e 30 U/ml de amiloglicosidase é aquela em que se obtêm maior eficiência hidrolítica da mistura enzimática e portanto o valor mais elevado de glucose, sendo 6,62 g/l, segue-se como segunda melhor a combinação de 905,8 U/ml de α -amilase e 15 U/ml de amiloglicosidase com o valor de 5,91 g/l. Uma vez que a diferença de valores de glucose não é assim tão grande e a sua diferença em termos de volume de enzima gasta é o dobro, considerou-se como melhor combinação os volumes de 905,8 U/ml de α -amilase e 15 U/ml de amiloglicosidase, dado que será o mais eficiente em termos de açúcar convertido por enzima consumida, isto é capacidade hidrolítica associada ao custo do processo.

No entanto, este valor obtido apresenta-se muito aquém do apresentado no trabalho de Souza (2005), cujo valor foi de 122,76 g/l de glucose, utilizando batata-doce e condições de trabalho semelhantes, mas um método de análise de glucose diferente, uma vez que foi usado o método de Somogyi-Nelson (NS), em vez de o método de Bernfeld (1955).

Tabela 8 - Concentrações de glicose obtidas através de hidrólise enzimática de material amiláceo de batata-doce, utilizando várias combinações das enzimas α -amilase e amiloglicosidase (U/ml).

α -amilase (U/ml)	Amiloglicosidase (U/ml)	Absorvância Média	Concentração de Glicose (g/l)
1811,6	30	0,641	6,62
905,8	15	0,573	5,91
452,9	7,5	0,391	3,99
452,9	3	0,381	3,89
452,9	1,5	0,381	3,89
452,9	0,3	0,377	3,84
181,2	7,5	0,329	3,34
181,2	3	0,342	3,47
181,2	1,5	0,327	3,32
181,2	0,3	0,300	3,03
90,6	7,5	0,286	2,89
90,6	3	0,312	3,15
90,6	1,5	0,263	2,64
90,6	0,3	0,257	2,58
18,1	10,5	0,415	4,24
18,1	7,5	0,338	3,44
18,1	3	0,380	3,87
18,1	1,5	0,287	2,90
18,1	0,3	0,285	2,87
1,8	5,1	0,242	2,42
0,2	0,5	0,216	2,15

4.5. Estratégias de Hidrólise Enzimática e Fermentação em Simultâneo

A finalidade deste estudo foi selecionar um método em que se conseguisse obter uma maior concentração de açúcares fermentáveis utilizando a hidrólise enzimática da fibra celulósica de batata-doce e fermentação em simultâneo ou sequencial. Foram realizados três métodos diferentes em vaso reacional de pequena escala (250 mL): NSSF I, NSSF II e SHF. Os três métodos foram efetuados em duplicado.

As fermentações decorreram a 30 °C nos três casos e recolheram-se amostras em duplicado para cada “erlenmeyer”, para análise de peso fresco, peso seco, absorvância, açúcar e etanol.

Os resultados obtidos para o método NSSF I, cuja extração e hidrólise foram realizadas em simultâneo seguido de fermentação do sobrenadante obtido (descrito em 3.6.1.), encontram-se representados na figura 11, em que é visível que partindo de uma concentração de 58 g/l de açúcares totais obteve-se uma concentração máxima de 17,7 g/l de etanol às 10 horas de fermentação. Após este tempo a concentração de etanol diminui. O facto de a biomassa aumentar ligeiramente a partir das 10 horas quando existe uma baixa concentração de açúcares no meio, suporta o facto de que, a partir deste ponto, as leveduras utilizam o etanol existente no meio para crescer. O máximo de biomassa atingido foi de 11,3 g/l para as 24 horas.

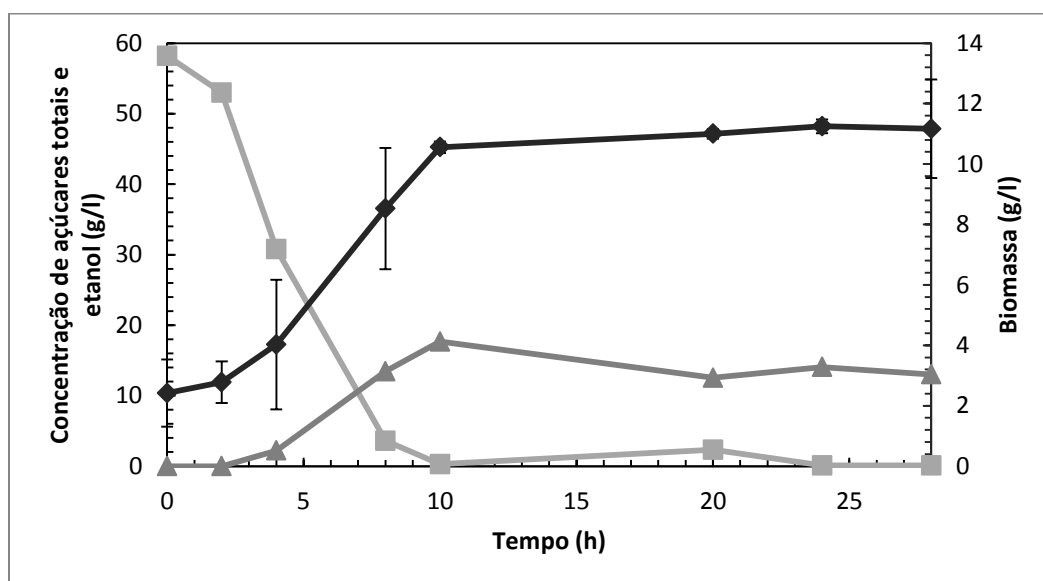


Figura 11 - Produção de etanol (▲) e biomassa (◆), e consumo de açúcares (■) numa fermentação *batch* realizada em “erlenmeyer” de 250 ml, com *S. cerevisiae* F13A. A extração e hidrólise foram realizadas em simultâneo e a fermentação após centrifugação. A concentração inicial de açúcares totais, neste método NSSF I, foi de 58 g/l. Os valores de biomassa correspondem à média de 3 amostras ± EP.

No método NSSF II (descrito em 3.6.2.), a extração, hidrólise e fermentação foram realizadas em simultâneo, partindo-se de uma concentração de 61,5 g/l de açúcares totais e obteve-se uma concentração máxima de 15,6 g/l de etanol às 10 horas de fermentação (figura 12). O etanol continua a ser produzido ao longo de toda a fermentação até às 28

horas, embora a partir das 10 horas diminua a concentração de etanol e existe um aumento de biomassa, cujo máximo foi de 21,4 g/l às 28 horas, apesar de a fonte de carbono se encontrar praticamente esgotada no meio, uma vez que a concentração de açúcares esgotou a partir das 8 horas, o que à semelhança do método anterior indica que o etanol é consumido pelas leveduras como fonte de carbono disponível.

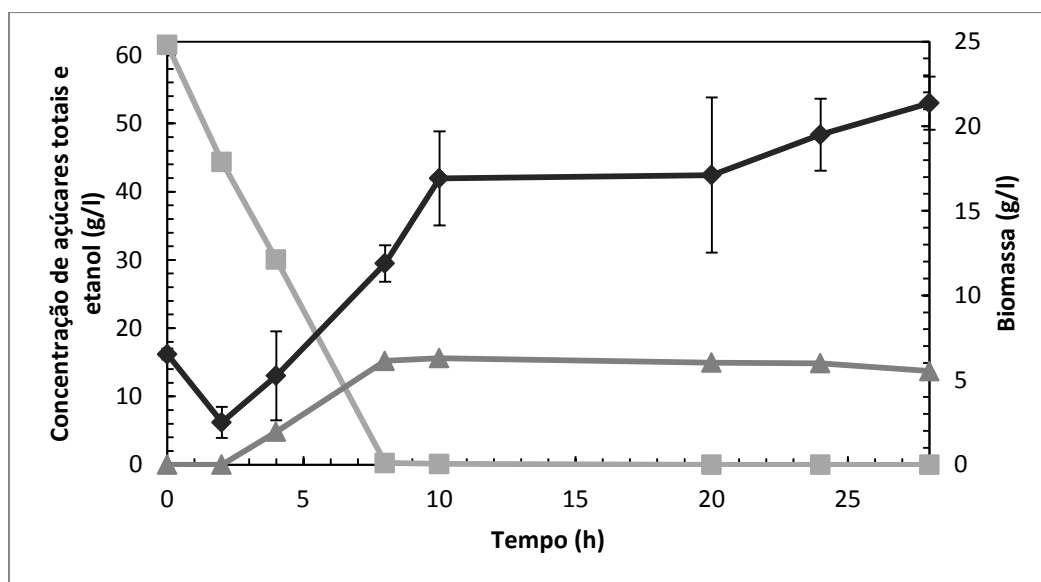


Figura 12 - Produção de etanol (▲) e biomassa (◆), e consumo de açúcares (■) numa fermentação *batch* realizada em “erlenmeyer” de 250 ml, com *S. cerevisiae* F13A. A extração, hidrólise e fermentação foram realizadas em simultâneo. A concentração inicial de açúcares totais, neste método NSSF II, foi de 61,5 g/l. Os valores de biomassa correspondem à média de 3 amostras ± EP.

Os resultados obtidos para o método SHF (descrito em 3.6.3.), em que a extração, hidrólise e fermentação foram realizadas em separado, estão representados na figura 13. Obtém-se uma concentração máxima de 10,5 g/l de etanol após 20 horas de fermentação, partindo de uma concentração inicial de 44,6 g/l de açúcares totais. A concentração de etanol diminui ligeiramente com o aproximar do final da fermentação. A biomassa aumenta constantemente até ao final da fermentação, sugerindo um efeito diáuxico a partir das 20 horas em que ocorre esgotamento dos açúcares. A biomassa máxima foi de 9,5 g/l às 28 horas de fermentação. O metabolismo respiratório encontra-se ativo durante toda a fermentação.

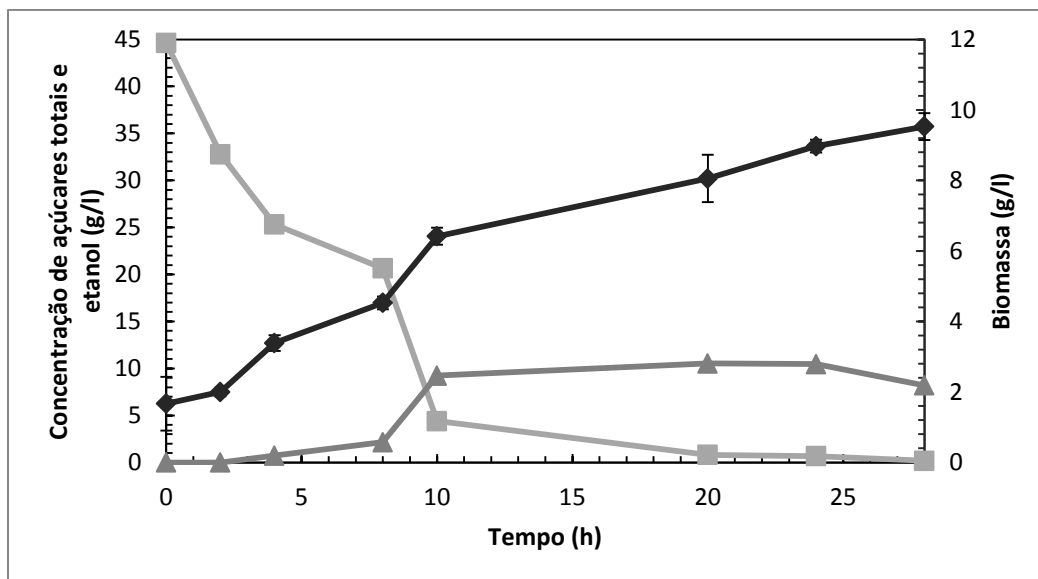


Figura 13 - Produção de etanol (▲) e biomassa (◆), e consumo de açúcares (■) numa fermentação *batch* realizada em “erlenmeyer” de 250 ml, com *S. cerevisiae* F13A. A extração, hidrólise e fermentação foram realizadas em separado. A concentração inicial de açúcares totais, neste método SHF, foi de 44,6 g/l. Os valores de biomassa correspondem à média de 3 amostras ± EP.

Analisando a tabela 9, que apresenta os valores iniciais de açúcares totais, valor máximo de biomassa e etanol máximo dos três métodos de hidrólise enzimática e fermentação, e as figuras 11, 12 e 13, verifica-se que o método em que se obtém um valor mais elevado de etanol é o NSSF II, seguido pelo NSSF I e por último o SHF. Estes resultados são esperados, uma vez que o NSSF II é aquele em que se parte de uma concentração superior de açúcares totais, seguindo-se o NSSF I e o SHF. O valor de biomassa máximo segue essa mesma ordem, devido aos açúcares totais iniciais de cada meio, mas no entanto, o valor de biomassa máximo para o NSSF II é quase o dobro do obtido no método NSSF I. Este valor explica-se pelo facto de no método NSSF II, a hidrólise enzimática e fermentação ocorrerem em simultâneo sem a existência de uma centrifugação pelo meio, o que faz com que não tenha ocorrido uma remoção de partes sólidas de batata-doce, que durante a amostragem foram também recolhidas e posteriormente influenciaram os valores do peso seco das amostras, conduzindo a esse erro experimental que indica a formação do dobro da biomassa por este método. Este factor pode ainda explicar os valores obtidos para a taxa específica de crescimento, no método NSSF II, uma vez que esta é calculada a partir dos valores obtidos de biomassa utilizando o software DMFIT modeling (<http://modelling.combase.cc>).

Tabela 9 - Valores de taxa específica de crescimento (μ_g), peso seco máximo ($X_{m\acute{a}x}$), rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$), máximo de etanol ($E_{m\acute{a}x}$), rendimento de etanol pelo substrato ($Y_{E/S}$), produtividade de etanol (P_E) e rendimento de etanol pela biomassa ($Y_{E/X}$) a partir de uma concentração inicial de açúcar (S_I) dos três métodos de hidrólise enzimática e fermentação: NSSF I, NSSF II e SHF.

Método	S_I (g/l)	μ_g (h ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$E_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{E/S}$ (g/g)	P_E [g/(l.h)]	$Y_{E/X}$ (g/g)
NSSF I	58,2	1,203 ± 0,035	11,3	0,143 ± 0,020	17,7	0,286 ± 0,043	1,934 ± 0,296	1,716 ± 0,224
NSSF II	61,5	2,690 ± 1,522	21,4	0,171 ± 0,075	15,6	0,280 ± 0,032	1,830 ± 0,255	0,836 ± 0,212
SHF	44,6	0,509 ± 0,156	9,5	0,183 ± 0,019	10,5	0,259 ± 0,042	0,601 ± 0,143	1,629 ± 0,264

Valores ± EP; NSSF I – extração, hidrólise e fermentação sequenciais com centrifugação a preceder a fermentação (concentração inicial de 58,2 g/l de glucose); NSSF II – extração, hidrólise e fermentação sequenciais sem centrifugação a preceder a fermentação (concentração inicial de 61,5 g/l de glucose); SHF – extração, hidrólise e fermentação por etapas (concentração inicial de 44,6 g/l de açúcares).

Apesar de o método SHF ter sido aquele em que se conseguiu identificar menor quantidade de etanol, a sua diferença de resultados pode ser explicada pela sua menor quantidade de açúcares totais inicial em relação aos outros dois métodos. Considerando que a diferença de etanol dos métodos NSSF I e NSSF II não é muito significativa comparativamente com o método SHF, atendendo às suas diferenças na concentração de açúcares totais inicial e às dificuldades associadas à recolha de amostras pelo método NSSF II, somando a vantagem que o método SHF possui de se poder realizar a hidrólise e fermentação às suas temperaturas ideais, optou-se pelo método SHF para se realizar uma fermentação *fed-batch* em reator biológico.

Comparando estes resultados (tabela 9) com os resultados obtidos nas fermentações anteriores (tabelas 6 e 7), verifica-se que apesar de as concentrações de açúcares totais nestes métodos de NSSF I, NSSF II e SHF, serem de 58,2, 61,5 e 44,6 g/l respetivamente, os rendimentos de etanol por substrato obtidos foram inferiores aqueles encontrados para as fermentações *batch* em “erlenmeyer” (tabela 6) e reator biológico (tabela 7). Os rendimentos de biomassa foram também inferiores aos de *batch* em “erlenmeyer”, mas superiores ao de reator biológico. Pode-se dizer, no entanto, que houve um maior favorecimento do processo fermentativo nestes métodos, embora não seja muito acentuado. As produtividades dos métodos de NSSF I e NSSF II foram bastante elevadas relativamente ao BE-ATP e BR, indicando que neste caso a metabolização de açúcares e formação de etanol foi realizada num espaço de tempo inferior a outras fermentações (BE-ATP e BR).

4.6. Fermentação *Fed-batch* em Reator Biológico

A fermentação *fed-batch* foi realizada em reator biológico agitado com um volume total de 3 litros, munido com uma turbina Rushton e um dispersor de ar em forma de L. Foi realizado o estudo da produção de etanol, biomassa e consumo de açúcares totais, a partir de extrato aquoso de batata-doce, utilizando *S. cerevisiae* F13A e um volume de trabalho de 1,5 litros, com uma concentração de açúcares inicial de 25 g/l. A fermentação foi realizada nas seguintes condições: 30 °C, com uma agitação de 250 rpm, arejamento de 0,125 vvm (300 ml/h) e pH 5,5. A adição de material amiláceo hidrolisado pelas enzimas α -amilase e amiloglucosidase ocorreu após 10 horas de fermentação.

Através dos resultados apresentados pela figura 14, é possível ver que existe um decréscimo na concentração de açúcares totais até às 10 horas de fermentação, sem que exista produção de etanol neste período de tempo. Verifica-se no entanto o aumento de biomassa, que podem ser confirmadas pelas curvas de peso seco e densidade ótica. Este facto sugere que a levedura durante este intervalo de tempo não tinha ativa a via fermentativa mas sim a via respiratória.

Às 20 horas obteve-se o pico máximo de etanol, que foi de 7,5 g/l ao qual corresponde a extinção de açúcares presentes no meio.

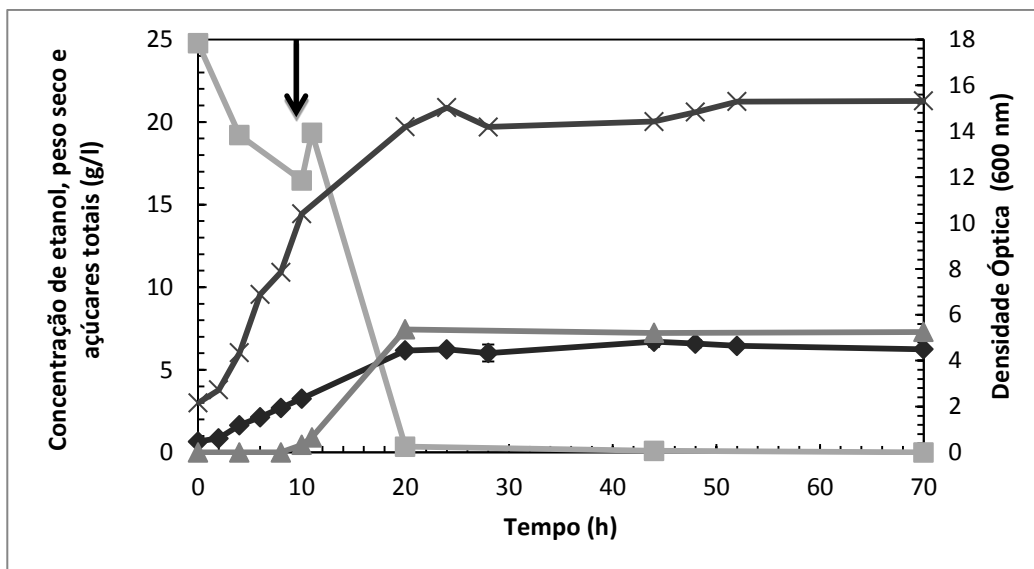


Figura 14 - Valores de etanol (▲), peso seco (◆), densidade óptica (×) e consumo de açúcares (■) para uma fermentação *fed-batch* em reator biológico agitado com um volume total de 3 litros, uma turbina Rushton e um dispersor de ar em forma de L, com *S. cerevisiae* F13A, utilizando extrato de batata-doce como substrato (25 g/l de concentração da fonte de carbono). A fermentação foi realizada a 30 °C, 250 rpm e arejamento de 0,125 vvm. A adição de meio amiláceo hidrolisado foi efetuada após 10 horas de fermentação. A → indica a adição de 3 g/l de meio hidrolisado às 10 horas de fermentação. Os valores de peso seco correspondem à média de 3 amostras ± EP.

A tabela 10, compara os valores das fermentações *batch* (BE-ATP) realizada em “erlenmeyer” de 250 ml, *batch* efetuada em reator biológico (BR) e *fed-batch* em reator biológico (FR) serve em termos de taxa específica de crescimento (μ_g), peso seco máximo ($X_{m\acute{a}x}$), rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$), máximo de etanol ($E_{m\acute{a}x}$), rendimento de etanol pelo substrato ($Y_{E/S}$), produtividade de etanol (P_E) e rendimento de etanol pela biomassa ($Y_{E/X}$) para uma dada concentração inicial de açúcares (S_I). A sua análise indica que a taxa específica de crescimento é superior no caso da fermentação *batch* em “erlenmeyer”, mas no entanto o rendimento de biomassa é superior no caso da fermentação *fed-batch* quando comparada com a *batch* em “erlenmeyer”. De acordo com o que foi referido anteriormente de que em condições aeróbicas a *S. cerevisiae* aumenta a sua biomassa em vez de produzir álcool a não ser que a concentração de glucose seja elevada e ocorra o efeito de Crabtree, o que não se verifica em ambas as fermentações em reator biológico, seria de esperar que o rendimento em biomassa e a taxa específica de crescimento (calculada usando o software DMFIT modeling, disponível em <http://modelling.combase.cc>) fossem superiores nas fermentações em reator biológico do que em “erlenmeyer”. Uma operação em *fed-batch*

controla a taxa específica de crescimento a um valor inferior à taxa de crescimento crítica, para que o metabolismo fermentativo seja suprimido. A concentração de glucose é mantida entre 0,1 e 0,25 g/l. Concentrações de glucose superiores a 0,25 g/l, fazem com que o metabolismo se torne fermentativo, já que a taxa de crescimento aumenta e ocorre o efeito de Crabtree ou constrangimento respiratório (Beck & Meyenburg, 1968; Barford and Hall, 1979; Rieger et al., 1981; Rieger et al., 1983; Sonnleitner & Kfipfeli, 1986). Neste caso, operou-se com uma concentração inicial de açúcares composta por 21 g/l de sacarose, 2 g/l de glucose e 2 g/l de frutose, sendo possível a existência de mais açúcares no meio, mas no entanto apenas estes foram identificados. Posto isto, seria esperado que o metabolismo se tornasse fermentativo, devido ao efeito de Crabtree.

O peso seco máximo e valor máximo de etanol foram superiores na fermentação em “erlenmeyer”, mas uma vez que esta possui valores iniciais de açúcares totais superiores, este valor é esperado. A fermentação *fed-batch* obteve um valor superior de peso seco máximo em relação à fermentação *batch* em reator, mas no entanto o seu valor de etanol máximo é inferior. A produtividade de etanol foi superior na fermentação *batch* em “erlenmeyer”, seguindo-se da fermentação *fed-batch* em reator biológico e por último a *batch* em reator.

Tabela 10 - Comparação das fermentações *batch* (BE-ATP) realizada em “erlenmeyer” de 250 ml, *batch* realizada em reator biológico (BR) e *fed-batch* em reator biológico (FR) em termos de taxa específica de crescimento (μ_g), peso seco máximo ($X_{m\acute{a}x}$), rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$), máximo de etanol ($E_{m\acute{a}x}$), rendimento de etanol pelo substrato ($Y_{E/S}$), produtividade de etanol (P_E) e rendimento de etanol pela biomassa ($Y_{E/X}$) para uma dada concentração inicial de açúcares (S_I).

Método	S_I (g/l)	μ_g (h ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$E_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{E/S}$ (g/g)	P_E [g/(l.h)]	$Y_{E/X}$ (g/g)
BE-ATP	76	0,391 ± 0,064	15,7	0,199 ± 0,015	32,9	0,426 ± 0,029	0,833 ± 0,192	2,129 ± 0,228
BR	26	0,102 ± 0,021	4,8	0,126 ± 0,013	10,7	0,495 ± 0,047	0,263 ± 0,058	2,502 ± 1,316
FR	25 + 3	0,296 ± 0,018	6,7	0,230 ± 0,016	7,5	0,310 ± 0,014	0,368 ± 0,114	1,438 ± 0,219

Valores ± EP; BE-ATP – fermentação *batch* em “erlenmeyer” para matéria proveniente de extração por altas temperatura e pressão (concentração inicial de 76 g/l de açúcares); BR – fermentação *batch* em reator biológico (concentração inicial de 26 g/l de açúcares); FR – fermentação *fed-batch* em reator biológico (concentração inicial de 25 g/l com uma adição de 3 g/l de açúcares após 10 horas de fermentação)

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com alguns resultados de outros autores, como Zhang et al., (2011), em que através de fermentação de batata-doce em “erlenmeyer” usando *S. cerevisiae*, alcançou um máximo de etanol ($E_{m\acute{a}x}$) de 128,5 g/l, uma produtividade de etanol (P_E) de 4,76 g/(l.h) e rendimento de etanol pelo substrato ($Y_{E/S}$) de 91,4 % (0,91 g/g); Lima-Costa et al., (2012), utilizando extrato de alfarroba como fonte carbono e *S. cerevisiae* F13A, nos seus trabalhos em “erlenmeyer” ($E_{m\acute{a}x} = 106,5$ g/l; $P_E = 1,9$ g/(l.h); $Y_{E/S} = 0,45$ g/g), em *batch* com reator biológico ($E_{m\acute{a}x} = 110,6$ g/l; $P_E = 2,0$ g/(l.h); $Y_{E/S} = 0,45$ g/g) e *fed-batch* em reator biológico ($E_{m\acute{a}x} = 126,7$ g/l; $P_E = 0,7$ g/(l.h); $Y_{E/S} = 0,50$ g/g); Cot et al., (2007), que em fermentação *fed-batch* com glucose como fonte de carbono e usando *S. cerevisiae* atingiu $P_E = 3,1$ g/(l.h), $Y_{E/S} = 0,43$ g/g e uma concentração final de 147 g/l de etanol verifica-se que em termos de rendimento de etanol pelo substrato os valores encontram-se próximos dos apresentados na literatura, mas em termos de etanol máximo e produtividade de etanol encontram-se aquém do esperado (tabela 11).

Tabela 11 - Comparação de resultados de vários autores com os resultados obtidos neste trabalho, para diferentes fermentações *batch* em “erlenmeyer”, *batch* em reator biológico e *fed-batch* em reator biológico em termos de taxa específica de crescimento (μ_g), peso seco máximo ($X_{m\acute{a}x}$), rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$), máximo de etanol ($E_{m\acute{a}x}$), rendimento de etanol pelo substrato ($Y_{E/S}$), produtividade de etanol (P_E) e rendimento de etanol pela biomassa ($Y_{E/X}$) para uma dada concentração inicial de açúcares (S_I).

	S_I (g/l)	μ_g (h ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$E_{m\acute{a}x}$ (g/l)	$Y_{E/S}$ (g/g)	P_E (g/l.h)
BE-ATP	76	0,391	15,7	0,199	32,9	0,43	0,8
Zhang et al., (2011)-BE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	128,5	0,91	4,8
Lima-Costa et al., (2012)-BE	248	0,100	11,5	0,055	106,5	0,45	1,9
BR	26	0,102	4,8	0,126	10,7	0,50	0,3
Lima-Costa et al., (2012)-BR	255	0,133	8,1	0,052	110,6	0,45	2,0
FR	25 + 3	0,296	6,7	0,230	7,5	0,31	0,4
Cot et al., (2007)-FR	n.d.	0,430	16,0	0,041	n.d.	0,43	3,1
Lima-Costa et al., (2012)-FR	249	0,011	5,8	0,007	126,7	0,50	0,7

BE – fermentação *batch* em “erlenmeyer”; BR – fermentação *batch* em reator biológico; FR – fermentação *fed-batch* em reator biológico; n.d. – dados não disponíveis.

A baixa quantidade de açúcares totais usados nestas experiências pode explicar este facto, levando a crer que seria necessário realizar testes com diferentes cultivares de batata-doce para se tentar extrair uma quantidade superior de açúcares, uma vez que esta depende das cultivares, da época do ano em que a batata-doce é cultivada e as suas condições de cultivo.

O facto de se ter utilizado batatas-doce de dimensões reduzidas pode explicar o baixo teor em açúcares e amido.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Pode-se dizer que o extrato de batata-doce é viável para produção de etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* estirpe F13A, obtendo-se rendimentos de produção próximos dos máximos teóricos, tanto em ensaios em reator biológico como em ensaios em “erlenmeyer”.

No ensaio *batch* com reator biológico produziu-se 10,7 g/l de etanol a partir de uma concentração de 26 g/l de açúcares totais, um rendimento de produto/substrato cerca de 50% e uma produtividade máxima de etanol de 0,263 g/(l.h) e no ensaio em *fed-batch* 7,5 g/l de etanol a partir de uma concentração de 25 g/l de açúcares totais, um rendimento de produto/substrato de 31% e uma produtividade máxima de etanol de 0,368 g/(l.h). Os valores mais elevados de produção de etanol, no entanto, foram de 32,9 g/l a partir de uma concentração de 76 g/l de açúcares totais, um rendimento de produto/substrato de 43% e uma produtividade máxima de etanol de 0,833 g/(l.h) em ensaio *batch* de “erlenmeyer”.

A quantidade de açúcar extraído para a realização das fermentações foi notoriamente inferior aquela que se tinha obtido anteriormente nos ensaios *batch* em “erlenmeyer”, apesar de o método de extração ter sido o mesmo. Este facto pode ser justificado através de um decréscimo da qualidade da batata-doce que se encontrava armazenada, uma vez que com o decorrer do tempo a sua composição de açúcares vai diminuindo. O mesmo pode ser aplicado para o seu teor em amido, que resultou numa baixa conversão de açúcares na hidrólise enzimática ou então em açúcares não fermentáveis que não são passíveis de ser metabolizados pelo microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*.

Conclui-se com este trabalho, que a batata-doce pode ser utilizada para obtenção de etanol. No entanto, a sua aplicabilidade seria bastante mais viável em complemento com resíduos de outros produtos agrícolas existentes na região, como seria o caso da alfarroba, de licor de citrinos e outros. Deste modo, existiria uma maior fonte de açúcares fermentáveis para a produção de etanol, aumentando-se assim consequentemente a produção deste.

Em estudos futuros deve ser desenvolvida mais investigação sobre a hidrólise enzimática de amido, para otimizar a extração de maiores quantidades de açúcares. Este estudo poderá ser complementado com hidrólise enzimática da fibra celulósica de batata-doce, utilizando enzima celulase e β -glucosidase, ou uma mistura enzimática, de última geração, com as diferentes capacidades hidrolíticas de polissacarídeos potenciadas (α -amilase e amiloglucosidase, celulase e β -glucosidase) hidrólise de amido. Uma vez otimizada a hidrólise enzimática, poderia ser interessante rentabilizar as mesmas, utilizando resíduos industriais de batata provenientes da indústria alimentar, dado que a batata é rica em amido, realizando-se assim uma combinação de resíduos de batata-doce com batata e, eventualmente, outros resíduos agro-alimentares ricos em açúcares ou celulósicos. Estes resíduos podem constituir uma matéria-prima de elevado potencial para uma biorrefinaria de bioetanol de 2ª geração a implementar no nosso país, sem competir com a produção alimentar.

6. Bibliografia

Arapoglou D, Varzakas T, Vlyssides A, Israilides C, (2010). Ethanol production from potato peel waste (PPW). *Waste Management* 30, pp. 1898-1902.

Bai F, Anderson W, Moo-Young M, (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* 26, pp. 89-105.

Barford P, Hall J, (1979). An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. *Journal of general microbiology* 114, pp. 267-275.

Barford P, (1990). A general model for aerobic yeast growth: Batch growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, pp. 907-920.

Batata doce de Aljezur – Indicação Geográfica Protegida; Caderno de especificações (2008). Direcção Regional de Agricultura do Algarve (DRAAAlg.) no âmbito do programa INTERREG II Projecto “Melhoramento da batata doce de Aljezur”.

Beck C, Meyenburg. HK yon, (1968). Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. *Journal of bacteriology* 96, pp. 479-486.

Bernfeld P, (1955). Amylases: α and β . *Methods in Enzymology*, eds, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. *Academic Press*, New York, pp. 149-158.

Biofuels Platform (2011), < <http://www.biofuels-platform.ch/en/home/index.php> >. Acesso em: 20-01-2012

Bramorski A, Soccol C, Christen P, Revah S, (1998). Fruity Aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Review of Microbiology* 29.

Castro L, Emygdio B, (2009). Batata-doce para produção de biocombustível. Artigo em Hypertexto. < http://www.infobibos.com/Artigos/2009_4/BatataDoce/index.htm >. Acesso em: 15-02-2012.

Chang I, Kim B, Shin P, (1997). Use of Sulfite and Hydrogen Peroxide To Control Bacterial Contamination in Ethanol Fermentation. *American Society for Microbiology* 63 (1).

Choteborská P, Palmarol-Adrados B, Galbe M, Zacchi G, Melzoch K, Rychtera M, (2002). Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering* 61, pp. 561-565.

Çaylak B, Sukan F, (1998). Comparison of Different Production Processes for Bioethanol. *Turk Journal Chemistry* 22, pp. 351-359.

Cot M, Loret M, François J, Benbadis L, (2007). Physiological behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Res* 7, pp. 22-32.

Crabtree H, (1928). CLX. The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. *Journal of Biochemistry* 22, pp. 1289.

Crabtree H, (1929). LXI. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Journal of Biochemistry* 23, pp. 536.

Daramola M, Zampraka L, (2008). Experimental study of the production of biomass by *Saccharomyces cerevisiae* in a fed batch fermentor. *African Journal of Biotechnology* 7 (8), pp. 1107-1114.

Davis R, (2008). Parameter Estimation for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Food Waste Into Ethanol Using Matlab Simulink. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 147, pp. 11-21.

Deken R, (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology* 44, pp. 149-156.

Demain A, (2009). Biosolutions to the energy problem. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, pp. 319-332.

Demirbas A, Demirbas M, (2010). Algae Energy – Algae as a New Source of Biodiesel. *Springer*.

Dombek K, Ingram L, (1987). Ethanol Production during Batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: Changes in Glycolytic Enzymes and Internal pH. *American Society for Microbiology* 53 (6).

Ejiofor A, Chisti Y, Moo-Young M, (1996). Fed-batch production of baker's yeast using millet (*Pennisetum typhoides*) flour hydrolysate as the carbon source. *Journal of Industrial Microbiology* 16, pp. 102-109.

Ernandes F, Garcia-Cruz C, (2009). *Zymomonas mobilis*: a promising microorganism for alcoholic fermentation. *Ciências Agrárias, Londrina*, 30 (2), pp. 361-380.

FAO, Production Yearbook (2004). FAE Statistic Series 134. Roma, Italia.

Garcia-Castello E, Alcaraz N, Gras M, Mayor L, Arguelles A, Vidal-Brotóns D, (2010). Pectinesterase extraction from Orange juice solid wastes. *International Conference on Food Innovation*, pp. 25-28.

Gore H, (1923). Formation of Maltose in Sweet Potatoes on Cooking. *Industrial and Engineering Chemistry* 15 (9).

Gupta R, Demirbas A, (2010). Gasoline, Diesel, and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants. *Cambridge University Press*; 1ª edição. United States of America.

Kong Q-X, Cao L-M, Zhang A-L, (2007). Overexpressing *GLT1* in *gpd1* – mutant improve the production of ethanol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, pp. 1382-1386.

Laopaiboon L, Thanonkeo P, Jaisil P, Laopaiboon P, (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, pp. 1497-1501.

Larsen U, Johansen T, Schramm J, (2009). Ethanol as a Fuel for Road Transportation – Main Report. *IEA Implementing Agreement on Advanced Motor Fuels*. Technical University of Denmark.

Lima-Costa M, Tavares C, Raposo S, Rodrigues B, Peinado J, (2012). Kinetics os sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, DOI 10.1007/s10295-011 – 1079-4.

Manso T, Nunes C, Raposo S, Lima-Costa M, (2010). Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.

Mata T, Martins A, Caetano N, (2009). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, pp. 217-232.

Mojovic L, Pejin D, Grujic O, Markov S, Pejin J, Rakin M, Vukasinovic M, Nikolic S, Savic D, (2009). Progress in the production of bioethanol on starch-based feedstocks. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 15 (4), pp. 211-226.

Orlowski JH, Barford JP (1987). The mechanism of uptake of multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture under fully aerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25, pp. 459-463.

Rass-Hansen J, Falsig H, Jorgensen B, Christensen H, (2007). Perspective – Bioethanol: fuel or feedstock? *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82, pp. 320-333.

Reed G, Pepler J, (1973). Yeast technology. Westport, C. T. AVI Pub. Co.

Rieger M, Kfippeli O, Fiechter A (1981). The respiratory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Current Developments in Yeast Research (Stewart GG, Russel I eds. Pergamon, Toronto. pp. 369-373.

Rieger M, Kfippeli O, Fiechter A (1983). The role of limited respiration in the complete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 129, pp. 653-661.

Russo M, Truss R, Halley P, (2009). The enzymatic hydrolysis of starch-based PVOH and polyol plasticized blends. *Carbohydrate Polymers* 77, pp. 442-448.

Shokrollahzadeh S, Bonakdarpour B, Vahabzadeh F, Sanati M, (2007). Growth kinetics and Pho84 phosphate transporter activity of *Saccharomyces cerevisiae* under phosphate-limited conditions. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology* 34, pp. 17-25.

Sims R, Taylor M, Saddler J, Mabee W, (2008). From 1st – to 2nd – Generation Biofuel Technologies – An overview of current industry and RD&D activities. *International Energy Agency*.

Skinner K, Leathers T, (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology* 31, pp. 401-408.

Sonnleitner B, Kfippeli O (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering* 28, pp. 927-937.

Souza A, (2005). Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] por meio de células imobilizadas para produção de etanol. *Dissertação de curso de mestrado em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins*.

Taherzadeh M, Karimi K, (2009). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* 2 (4), pp. 707-738.

Tomás-Pejo E, Oliva J, González A, Ballesteros I, Ballesteros M, (2009). Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel* 88, pp. 2142-2147.

Wall S, Bothast J, Lagoda A, Sexson R, Wu V, (1983). Effect of recycling distillers solubles on alcohol and feed production from corn fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 31 (4), pp.770-775.

Wilkins M, Widmer W, Grohmann K, (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry* 42, pp. 1614-1619.

Wu V, (1988). Characterization of sweet potato stillage and recovery of stillage solubles by ultrafiltration and reverse osmosis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36 (2), pp. 252-256.

Zhang K, Feng H, (2010). Fermentation potentials of *Zymomonas mobilis* and its application in ethanol production from low-cost raw sweet potato. *African Journal of Biotechnology* 9 (37), pp. 6122-6128.

Zhang L, Zhao H, Gan M, Jin Y, Gao X, Chen Q, Guan J, Wang Z, (2011). Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology* 102 (6), pp. 4573-9.