



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**CINÉTICA DE INIBIÇÃO DO ETANOL E CONSUMO DE
AÇÚCAR, EM REATOR BIOLÓGICO, USANDO RESÍDUOS
INDUSTRIAIS DE CITRINOS E DE ALFARROBA. AUMENTO
DE ESCALA DE PRODUÇÃO EM UNIDADE-PILOTO**

André Jerónimo Guerra

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

Trabalho efetuado sob a coorientação de:

Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo

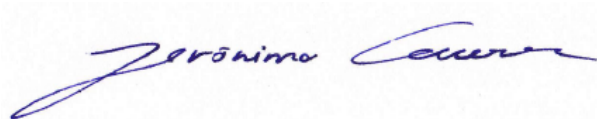
2013

**CINÉTICA DE INIBIÇÃO DO ETANOL E CONSUMO DE
AÇÚCAR, EM REATOR BIOLÓGICO, USANDO RESÍDUOS
INDUSTRIAIS DE CITRINOS E DE ALFARROBA. AUMENTO
DE ESCALA DE PRODUÇÃO EM UNIDADE-PILOTO**

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores de trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Assinatura

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jerónimo Guerra', is written over a light blue rectangular background.

(Jerónimo Guerra)

Copyright

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Assinatura

A handwritten signature in blue ink, reading "Jerónimo Guerra". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping underline.

(Jerónimo Guerra)

“Se não puder destacar pelo talento, vença pelo esforço.”

(Dave Weinbaum)

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação de mestrado só foi possível devido à colaboração e disponibilidade de um conjunto de pessoas que me apoiaram ao longo de todo este percurso. Por isso, quero aqui dirigir os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste presente estudo. Assim agradeço:

À minha orientadora pelo apoio, disponibilidade, ajuda e colaboração dada.

A todas as pessoas que se disponibilizaram do seu tempo para me ajudar no processo experimental.

Por último, mas não menos importante, à minha família, amigos e outras pessoas significativas sempre disponíveis para me apoiar durante a concretização deste trabalho.

A Deus que de certa forma contribuí para o meu crescimento e sucesso na minha vida.

Resumo

A produção de etanol como biocombustível alternativo, tem recebido atenção nas últimas décadas por contribuir para a redução do impacto ambiental gerado pelos combustíveis fósseis. Os resíduos resultantes da indústria de processamento de alfarroba e citrinos apresentam um grande potencial para a produção de etanol, devido aos altos teores em açúcar e por proporcionar características importantes no crescimento de microrganismos. Neste trabalho foram analisadas cinéticas de consumo de substrato e produção de etanol em sistema descontínuo, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Após verificar rendimentos próximos do valor máximo teórico ($0,510 - 0,470 \text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) em ensaios com alfarroba e citrinos, realizaram-se combinações 33:67, 50:50 e 67:33 (alfarroba:citrinos), a 250g/l. Selecionou-se a combinação 33:67, visto apresentar uma concentração de etanol de $84 \text{g}_{\text{etanol}}/\text{l}$ e um rendimento de $0,498 \text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$. Ao efetuar aumento de escala laboratorial da combinação, em reator de 3L, verificou-se uma maior conversão de açúcares para produção de etanol, obtendo um rendimento de $0,432 \text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$.

No estudo de várias concentrações de citrinos (130, 180 e 330g/l), verificou-se maior produção de etanol ($0,428 \text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) na concentração de 180g/l, enquanto a maior produção de biomassa ($0,089 \text{g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) foi observada a 330g/l.

Devido ao papel importante do azoto na biossíntese, otimizou-se a quantidade de uma nova fonte orgânica, ureia, na produção de etanol, de forma a tornar viável em produção industrial. A ureia a 1,5g/l, obteve melhores resultados de rendimento ($0,497 \text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) e demonstrou ser facilmente assimilada, representando assim uma melhoria no custo-benefício em processos fermentativos.

Num ensaio teste na unidade piloto de 20L, utilizando glucose como fonte de carbono, constatou-se uma boa conversão de substrato em etanol ($0,447 \text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$), sendo contudo necessário definir critérios de aumento de escala.

A eficiência fermentativa entre alfarroba e citrinos, a elevadas concentrações, com a estirpe *S. cerevisiae* F13A mostrou ser promissora para o uso em biorrefinarias de etanol.

Palavras-chave: Fermentação, Extrato de Alfarroba, Licor de Citrinos, *Saccharomyces cerevisiae*, Etanol, Sistema descontínuo.

Abstract

The production of ethanol as a biofuel has received attention in recent decades to contribute to reducing the environmental impact generated by fossil fuel. Waste resulting from the industrial processing of citrines and carob exhibits great potential for producing ethanol due to the high concentration of sugar and features to provide for the growth of microorganisms. This study analyzes the kinetics of substrate consumption and ethanol production in a batch system using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

After checking yields that approached the maximum theoretical value ($0,510 - 0,470 \text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) in trials with carob and citrines, the following combinations resulted: 33:67, 50:50 and 67:33 (carob:citrines), 250 g/l. We selected the combination 33:67 as it obtained an ethanol concentration of $84 \text{g}_{\text{ethanol}}/\text{l}$ and a yield of $0,438 \text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{substrate}}$. When performing laboratorial increase in scale of the combination, in a 3l reactor, there was a greater conversion of sugar versus ethanol, obtaining a yield of $0,432 \text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{substrate}}$.

In the study of various concentrations of citrines (130, 180 and 330 g/l), there was an increased production of ethanol ($0,428 \text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{substrate}}$) at a concentration of 180g/l, whereas a higher biomass ($0,089 \text{g}_{\text{biomass}}/\text{g}_{\text{substrate}}$) was observed at 330g/l.

Due to the important role of nitrogen in biosynthesis, and optimized quantity of a new organic source, urea, was observed in ethanol production, thereby making it viable in industrial production. Urea at 1,5g/l, obtained better results, which demonstrated its easy assimilation, representing an improvement in the cost-benefit ratio of the fermentation process.

In a trial experiment in a pilot unit of 20l, using glucose as the carbon source, there was a good substrate conversion in ethanol ($0,447 \text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{substrate}}$), being nevertheless necessary to define criteria for increasing scale.

The fermentation efficiency between carob and citrines at high concentrations with strain *S.cerevisiae* F13A was shown to be promising for use in ethanol bio-refineries.

keywords: Fermentation, Carob Extract, Liqueur of Citrines, *Saccharomyces cerevisiae*, Ethanol, Discontinuous system.

Objetivos

O principal objetivo da presente investigação consiste em criar condições favoráveis à capacidade fermentativa, para produção de etanol, através da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fontes de carbono proveniente de subprodutos da indústria agroalimentar.

Perante o objetivo principal delineado, foram colocadas as seguintes metas de investigação:

- Otimização do processo de extração do licor de laranja a partir da matéria-prima adquirida;
- Comparação do comportamento da levedura, em *Erlenmeyer*, entre as fontes de carbono comerciais, glucose, sacarose e frutose e os resíduos agroindustriais, extrato de alfarroba e licor de citrinos;
- Avaliação, em *Erlenmeyer*, da melhor concentração de açúcares no meio contendo licor de citrinos, para produção de etanol;
- Estimação, em *Erlenmeyer*, do melhor rácio extrato de alfarroba e licor de citrinos, para promover a produção de etanol;
- Análise em reator mecanicamente agitado e arejado de 3 litros, de um sistema descontínuo (STR), da melhor combinação entre licor de citrinos e alfarroba, obtido nos ensaios preliminares;
- Elaboração de um método de extração do composto D-limoneno, presente no licor de citrinos;
- Verificação, em *Erlenmeyer*, do desenvolvimento da levedura na presença de licor de citrinos sem o D-limoneno;
- Análise do efeito de uma nova fonte orgânica de azoto na produção de etanol, em fermentações realizadas em pequena escala (*Erlenmeyer*);
- Realização de um ensaio teste em Unidade Piloto de 20 litros, utilizando glucose como fonte de carbono, para estudar a produção de etanol em modo descontínuo.

Índice

I. Introdução	27
1. Enquadramento teórico	28
1.1. Biocombustíveis	28
1.2 Biocombustível na União Europeia.....	28
1.2.1 Legislação nacional	29
1.2.2 Situação nacional.....	29
1.3 Tipos de biocombustíveis.....	29
1.3.1 Classificação de biocombustíveis.....	30
2. Etanol.....	31
2.1 Matéria-prima	31
3. Meios de fermentação	32
3.1 Uso de subprodutos como meios de cultura.....	32
4. Alfarroba.....	33
4.1 Alfarrobeira	33
4.2 Composição	34
4.3 Aplicações	34
4.4 Extração de açúcares	35
5. Citrinos	35
5.1 Resíduos resultantes do processamento de citrinos.....	36
5.2 Composição dos resíduos	37
5.2.1 D-Limoneno	38
6. Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
6.1 Aspectos metabólicos.....	39
6.2 Metabolismo celular	40
6.2.1 Mecanismos de transporte dos açúcares.....	41
6.2.2 Metabolismo dos açúcares.....	41
6.2.3 Glicólise	42
6.2.4 Destinos metabólicos do piruvato	44
6.2.4.1 Fermentação alcoólica.....	44
6.3 Comportamento da levedura	46
7. Processo fermentativo	46
7.1 Reatores biológicos	46

7.2	Aplicação industrial.....	47
7.3	Produção industrial de etanol	48
7.3.1	Reator em modo descontínuo	48
7.3.1.1	Curva de crescimento	48
7.3.1.2	Produção de Etanol.....	49
II.	Materiais e Métodos	50
1.	Matérias-primas.....	50
1.1	Preparação da matéria-prima.....	50
1.1.1	Alfarroba	50
1.1.2	Licor de citrinos.....	51
1.2	Microrganismo e condições de cultura.....	51
1.2.1	Manutenção e utilização de culturas microbianas puras	51
1.2.2	Microrganismo	51
1.3	Preparação dos meios de cultura	52
1.3.1	Meios de cultura de microrganismo	52
1.3.2	Preparação dos meios do pré-inoculo e condições de cultura.....	53
1.3.3	Preparação dos meios fermentativos e condições de cultura	54
1.4	Amostragem	54
1.4.1	Ensaio em <i>Erlenmeyer</i>	54
1.4.2	Ensaio em Reator	56
1.5	Métodos Analíticos	57
1.5.1	Determinação do crescimento celular	57
1.5.1.1	Contagem de células.....	57
1.5.2	Determinação do pH.....	58
1.5.3	Determinação da concentração de biomassa celular	58
1.5.3.1	Densidade ótica (D.O.).....	58
1.5.3.2	Peso fresco e peso seco	59
1.5.4	Quantificação de açúcar e de etanol por HPLC	60
1.5.4.1	Curvas padrões	61
1.5.5	Quantificação de açúcares por refractômetro.....	61
1.5.6	Unidades Formadores de Colônias (UFCs).....	62
1.5.7	Determinação do azoto total (Método de <i>Kjeldahl</i>)	63
1.5.7.1	Padronização da solução de HCl.....	64

1.6 Ensaio de Crescimento.....	66
1.6.1 Ensaio realizado em <i>Erlenmeyer</i>	66
1.6.1.1 Diferentes fontes de carbono.....	66
1.6.1.2 Diferentes concentrações de licor de citrinos.....	67
1.6.1.3 Diferentes rácios entre extrato de alfarroba e licor de citrinos.....	67
1.6.1.4 Licor de citrinos sem D-Limoneno	68
1.6.1.4.1 Extração do D-limoneno por destilação a vapor	68
1.6.1.5 Diferentes fontes de azoto	70
1.6.2 Ensaio realizado em Reator Biológico.....	71
1.6.2.1 Rácio 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos	71
1.6.3 Ensaio realizado na Unidade Piloto	73
1.6.3.1 Glucose como fonte de carbono	73
1.7 Caracterização da cinética de crescimento.....	73
1.7.1 Taxa específica de crescimento máximo e concentração de biomassa máxima ..	73
1.7.2 Rendimento de biomassa em função do substrato consumido	74
1.7.3 Rendimento de biomassa em função do etanol produzido	74
1.7.4 Rendimento de etanol em função do substrato consumido	75
1.7.5 Produtividade máxima de etanol	75
1.7.6 Taxa específica de produção de etanol.....	75
1.7.7 Taxa específica de consumo do substrato	76
1.7.8. Concentração de substrato consumido	76
1.7.9. Concentração de substrato fermentado.....	77
1.7.10 Percentagem de açúcares consumidos.....	77
1.7.11 Análise estatística.....	77
III. Resultados e Discussão	79
1. Fermentação em sistema descontínuo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F13A em diferentes fontes de carbono para a produção de etanol, em <i>Erlenmeyer</i>	79
2. Efeito de diferentes tipos de rácios contendo extrato de alfarroba e licor de citrinos na produção de etanol pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F13A em <i>Erlenmeyers</i> , sistema descontínuo.....	86
3. Análise do crescimento e produção de etanol no rácio de 33% de extrato de Alfarroba com 67% de licor de Citrinos, pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F13A, em reator biológico de 3L, sistema descontínuo.	94

4. Efeito do licor de citrinos sem D-limoneno, em fermentação de sistema descontínuo com um rácio 50% de extrato de alfarroba com 50% de licor de citrinos, no crescimento e produção de etanol pela <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F13A, em Erlenmeyer.	101
4.1 Extração do D-limoneno	102
5. Efeito de diferentes concentrações de licor de citrinos no desenvolvimento e produção de etanol, pela levedura <i>Saccharomyces Cerevisiae F13A</i> , em sistemas descontínuos, <i>Erlenmeyer</i>	107
6. Comparação da produção de etanol em diferentes concentrações de ureia e meio YEPD	114
6.1 Percentagem de Azoto total.....	122
7. Estudo do crescimento e produção de etanol em fermentação descontínua da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F13A, em sistema descontínuo na Unidade Piloto de 20 litros.	123
IV. Conclusões Gerais	128
V. Prespetivas de trabalho futuro	131
VI. Referências Bibliográficas.....	132
VII. Anexos	135

Índice de Equações

Equação 1 – Reação da transformação da glicose em piruvato.	43
Equação 2 – Balanço do processo anaeróbio do piruvato.	45
Equação 3 – Reação global do consumo de etanol pelo processo anaeróbio.	45
Equação 4 – Determinação da concentração de células ($g_{células}/ml$).....	58
Equação 5 – Concentração de células obtidas por UFCs ($g_{células}/ml$).....	62
Equação 6 - Percentagem de azoto (%).....	64
Equação 7 – relação estequiométrica entre o Na_2CO_3 e o HCl.....	65
Equação 8 – Relação molar no ponto final de titulação do Na_2CO_3 e o HCl.....	65
Equação 9 – Determinação da concentração molar de HCl utilizado (mol/ml).....	65
Equação 10 – Rendimento de biomassa em função do substrato consumido ($g_{biomassa}/g_{Substrato}$)	74
Equação 11 – Rendimento de biomassa em função do etanol produzido ($g_{biomassa}/g_{etanol}$).	74
Equação 12 – Rendimento de etanol em função do substrato consumido ($g_{etanol}/g_{substrato}$).	75
Equação 13 – Produtividade máxima de etanol ($g_{etanol}/l \cdot h^{-1}$).....	75
Equação 14 – Taxa específica de produção de etanol ($g_{etanol}/g_{biomassa} h$).	75
Equação 15 – Taxa específica de consumo do substrato ($g_{Substrato}/g_{biomassa} h$).	76
Equação 16 – Concentração de substrato consumido (M).	76
Equação 17 – Concentração substrato fermentado alcoolicamente (M).	77
Equação 18 – Percentagem de açúcares consumidos (%).....	77

Índice de Figuras

Figura 1- Cadeia de processos de produção de combustível (Imagem adaptada de Rutz & Janssen, 2007).	30
Figura 3 - A via glicolítica dividida em três etapas (imagem adaptada de Stryer et al., 2007)..	43
Figura 4 - Os diferentes destinos do piruvato (Imagem adaptada de Stryer et al., 2007)	44
Figura 5 - Reação da transformação do piruvato em etanol (Imagem adaptada de Stryer et al., 2007).....	45
Figura 6 - Curva de crescimento típica de uma cultura descontínua (imagem adaptada de Fonseca & Teixeira, 2007)	48
Figura 7 - Câmara de <i>Neubauer</i> (Imagem adaptada de Cristina, A. s/d)	57
Figura 8 - Na imagem do lado esquerdo, mostra as linhas da câmara de <i>Neubauer</i> , na imagem da direita mostra o sentido em que devem ser contadas as células no interior da câmara (Imagem adaptada de Cruz, N. 2010).....	57
Figura 9 - Sistema de destilação a vapor.	69
Figura 10 - Perfis de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em <i>Erlenmeyer</i> , em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em diferentes fontes de carbono. Extrato de alfarroba 270 g/l (A), licor de citrinos 130 g/l (B) e rácio de açúcares frutose: glucose: sacarose (25:25:50) 120 g/l (C). (◆)Absorvância, (■) Etanol, (●) Açúcares totais	80
Figura 11 – Perfil de biomassa quantificada pelo peso seco da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A, crescida em <i>Erlenmeyer</i> , em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em extrato de alfarroba 270 g/l. A linha contínua representa a modelação DMFit modelling Tool , usando um modelo bifásico, sem fase de latência.....	82
Figura 12 – Representação gráfica da concentração de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em <i>Erlenmeyer</i> , em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em diferentes fontes de carbono. Extrato de alfarroba 270 g/l (A), licor de citrinos 130 g/l (B) e rácio	

de açúcares frutose: glucose: sacarose (25:25:50) 120 g/l (C). (◆)Substrato consumido e (■)Substrato fermentado..... 84

Figura 13 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rácios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l (A), 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos 288 g/l (B) e 67% de extrato de alfarroba + 33% de licor de citrinos 215 g/l (C). (◆)Absorvância, (Δ) Etanol, (■) A c cares totais. 87

Figura 14 - Representa o gráfica da concentra o de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rácios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l (A), 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos 288 g/l (B) e 67% de extrato de alfarroba + 33% de licor de citrinos 215 g/l (C). (◆)Substrato consumido e (■)Substrato fermentado..... 92

Figura 15 - Representa o gráfica da concentra o de etanol produzida (A) e absorvância (B) da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rácios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l (◆), 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos 288 g/l (■) e 67% de extrato de alfarroba + 33% de licor de citrinos 215 g/l (Δ)..... 93

Figura 16 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agita o de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentra o total de a c cares iniciais de 250 g/l..... 94

Figura 17 - Taxa específica de produ o de etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agita o de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentra o total de a c cares iniciais de 250 g/l..... 96

- Figura 18 - Perfil de crescimento expressos em unidades formadoras de colónias por mililitro ao longo do tempo de fermentação da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l..... 97
- Figura 19 - Perfil de consumo de glucose, sacarose e frutose ao longo do crescimentos da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l..... 98
- Figura 20 - Taxa específica de consumo de glucose, sacarose e frutose da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l..... 99
- Figura 21 - Representação gráfica da concentração de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A. (A) crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l. (B) crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rácios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l. (◆)Substrato consumido e (■)Substrato fermentado..... 100
- Figura 22 - Diferença de miscibilidade entre os composto existentes na amostra de destilado, proveniente da destilação a vapor efetuada ao licor de citrinos para extração do composto aromático D-limoneno, após adição de n-Hexano. 102

- Figura 23 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, (A) no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos sem D-limoneno, a uma concentração total inicial de 288g/l e (B) no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos com D-limoneno, a uma concentração total inicial de 288g/l. (◆)Absorvância, (Δ) Etanol, (■) Açúcares totais. 103
- Figura 24 - Representação gráfica da concentração de substrato consumidos e de substrato fermentados da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, (A) no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos sem D-limoneno, a uma concentração total inicial de 288g/l e (B) no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos com D-limoneno, a uma concentração total inicial de 288g/l. (◆)substrato consumidos e (■)substrato fermentados alcoolicamente. 106
- Figura 25 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes concentrações iniciais de licor de citrinos. 130 g/l (A), 180 g/l (B) e 330 g/l (C). (◆)Absorvância, (Δ) Etanol, (■) Açúcares totais 108
- Figura 26 - Perfis de consumo de Glucose, Sacarose e Frutose ao longo do crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes concentrações de licor de citrinos. 130 g/l (A), 180 g/l (B) e 330 g/l (C). (◆) Glucose, (■) Sacarose, (○) Frutose. 112
- Figura 27 - Representação gráfica da concentração de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes concentrações de licor de citrinos. 130 g/l (A), 180 g/l (B) e 330 g/l (C). (◆)substrato consumido e (■)substrato fermentado. 113
- Figura 28 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (A), ureia a 3 g/l (B) e meio YEPD reduzido (5 g/l

extrato levedura e 3 g/l peptona) (C). (◆) Absorvância, (Δ) Etanol, (■) Açúcares totais.
..... 115

Figura 29 - Taxa específica de produção de etanol com a concentração de etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (Ureia 1,5 g/l), ureia a 3 g/l (ureia 3 g/l) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (YEPD)..... 118

Figura 30 - Perfis de consumo de Glucose, Sacarose e Frutose ao longo do crescimentos
Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (A), ureia a 3 g/l (B) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (C). (◆) Glucose, (■) Sacarose, (●) Frutose. 119

Figura 31 - Taxa específica de consumo da glucose, sacarose e frutose da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (A), ureia a 3 g/l (B) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (C). (◆) qS (Sacarose), (■) qS (Glucose), (●) qS Frutose..... 120

Figura 32 - Representação gráfica da concentração de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (A), ureia a 3 g/l (B) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (C). (◆) substrato consumido e (■) substrato fermentado..... 121

Figura 33 - Determinação do azoto total existe no meio ao longo do tempo de fermentação da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (Ureia 1,5 g/l), ureia a 3 g/l (ureia 3 g/l) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (YEPD)..... 122

Figura 34 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 vvm e a 30 °C, tendo glucose como fonte de carbono..... 123

Figura 35 - Taxa específica de produção específica de etanol com a concentração de etanol da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 l/h e a 30 °C, tendo glucose como fonte de carbono.	125
Figura 36 - Perfil de consumo O ₂ com a produção de etanol (A) e absorvância (B), da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 l/h e a 30 °C, tendo glucose como fonte de carbono.	126
Figura 37 - Perfis da concentração de glucose consumido e de glucose fermentado da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 l/h e a 30 °C, com glucose como fonte de carbono.	127

Índice de Tabela

Tabela 1 - Meio YEPD, utilizado para crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F13A em meio sólido.	52
Tabela 2 - Meio YEPD, utilizado para crescimento em meio líquido.	54
Tabela 3 - Exemplo de um plano de amostragem, para fermentações em <i>Erlenmeyers</i>	55
Tabela 4 – Volume de amostra a retirar de cada <i>Erlenmeyer</i> consoante os diferentes tipos de análises.	55
Tabela 5 - Volume de amostra a retirar consoante os diferentes tipos de análises.	56
Tabela 6 - Tipos de colunas usadas nas diferentes fermentações.	60
Tabela 7 – Soluções padrão com as respetivas concentrações.	61
Tabela 8 - Composição das fontes de azoto presentes nos meios de fermentação e nos pré-inoculos.	66
Tabela 9 - Caracterização dos ensaios realizados em <i>Erlenmeyers</i> com uma razão de glucose, frutose e sacarose (“Mix”), extrato de alfarroba e licor de citrinos como fonte de carbono.	66
Tabela 10 - Caracterização dos ensaios realizados em <i>Erlenmeyers</i> com diferentes concentrações de licor de citrinos como fonte de carbono.	67
Tabela 11 - Rácios entre extrato de alfarroba e licor de citrinos realizados em ensaios de <i>Erlenmeyers</i>	68
Tabela 12 - Caracterização dos ensaios realizados em <i>Erlenmeyers</i> com diferentes rácios de extrato de alfarroba e licor de citrinos.	68
Tabela 13 - Rácio selecionados entre extrato de alfarroba e licor de citrinos realizado em ensaio de <i>Erlenmeyer</i>	70
Tabela 14 - Caracterização do ensaio realizado em <i>Erlenmeyer</i> com o rácio de extrato de alfarroba e licor de citrinos.	70

Tabela 15 - Caracterização dos ensaios realizados em <i>Erlenmeyers</i> com diferentes fontes de azoto.	71
Tabela 16 - Caracterização do ensaio realizados em reator com o rácio 33:67 de extrato de alfarroba e licor de citrino.	72
Tabela 17 - Caracterização do ensaio realizados em Unidade piloto com glucose.....	73
Tabela 18 – Cinética de biomassa e etanol da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A, crescida em <i>Erlenmeyer</i> , em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes de carbono. Extrato de alfarroba 270 g/l (Alf), licor de citrinos 130 g/l (Cit) e rácio de açúcares frutose: glucose: sacarose (25:25:50) 120 g/l (“Mix”).	81
Tabela 19 - Cinética de biomassa e etanol da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em <i>Erlenmeyer</i> , em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rácios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l (Alf33%+Cit67%), 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos 288 g/l (Alf50%+Cit50%) e 67% de extrato de alfarroba + 33% de licor de citrinos 215 g/l (Alf67%+Cit33%).	88
Tabela 20 - Cinética de biomassa e etanol da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l.....	95
Tabela 21 - Cinética de biomassa e etanol da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em <i>Erlenmeyer</i> , em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos a 248 g/l sem d-limoneno (Alf50%+Cit50% sem D-Limoneno) e no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos a 248 g/l com d-limoneno (Alf50%+Cit50% com D-Limoneno).	104
Tabela 22 - Cinética de biomassa e etanol da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em <i>Erlenmeyer</i> , em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm	

e a 30 °C, com diferentes concentrações iniciais de licor de citrinos 130 g/l, 180 g/l e 330 g/l.....	109
Tabela 23 – Perfis de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em <i>Erlenmeyer</i> , em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (Ureia 1,5 g/l), ureia a 3 g/l (ureia 3 g/l) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (YEPD).....	116
Tabela 24 - Percentagem de azoto total existente nos meios fermentativos, tendo como fonte de carbono extrato de alfarroba utilizando com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (Ureia 1,5 g/l), ureia a 3 g/l (ureia 3 g/l) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (YEPD).....	122
Tabela 25 - Perfis de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 vvm e a 30 °C, com glucose como fonte de carbono.....	124

Lista de abreviaturas

ADP - adenosina difosfato;

AGRUPA – Agrupamento de Alfarroba e Amêndoa;

ATP – Adenina Trifosfato;

BTL - Biomassa-para-líquido (BTL, do inglês *Biomass-to-liquids*);

CE – Comunidade Europeia;

CIMA – Centro de Investigação Marinha e Ambiental;

CO₂ – Dióxido de carbono;

D.O. – Densidade optica;

ETBE - Éter etil-terciário-butílico (ETBE, do inglês *Ethyl tert – butyl ether*);

FADH₂ - Flavina adenina dinucleotídeo;

FAEE – Éter etílico de ácidos gordos (FAEE, do inglês *Fatty acid ethyl ester*);

FAME – Éter metílico de ácidos gordos (FAME, do inglês *Fatty acid methyl ester*);

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;

FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia;

GEE – Gases de Efeito Estufa;

H⁺ - Ião hidrogénio;

H₂O – Água;

HPLC - *High-Performance Liquid Chromatography*;

INE – Instituto Nacional de Estatística;

LBG – *Locust Bean Gum*;

LEBA – Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental;

LRP - Gasolina aditivada com substituto do chumbo (LRP, do inglês *Lead Replacement Petrol*);

NAD⁺ - Ião Nicotina adenina dinucleotide;

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotide desidrogenase;

O₂ – Oxigénio;

P_i – Fosfato;

PPO - Óleo vegetal (PPO, do inglês *Pure Plant Oil*);

S-N-K - *Student-Newman-Keuls test*;

STR - *Stirred tank reactor*;

UALG – Universidade do Algarve;

UE – União Europeia;

UFCs – Unidade formadora de Colónias;

UPi – Unidade Piloto;

YEPD – *Yeast Extract-Peptone-Dextrose*;

Lista de símbolos

μ_{Max} – Taxa específica de crescimento máximo;

P_{Max} - Produtividade máxima;

q_E – Taxa de produção específica de etanol;

q_S – Taxa de consumo específica de substrato;

S_c – Concentração de substrato consumido;

S_F – Concentração de substrato fermentado;

X_{Max} – Biomassa máxima;

$Y_{E/S}$ – Rendimento do etanol/substrato;

$Y_{X/E}$ – Rendimento de biomassa/etanol;

$Y_{X/S}$ – Rendimento de biomassa/substrato;

Unidades

% - Percentagem;

g – Gramas;

g/l – Gramas por litro;

l – Litros;

l/h – Litros por hora;

M – Molar;

ml – Mililitros;

mM – Milimolar;

nm – Nanómetros;

p/V – Peso por volume;

RPM – Rotações por minuto;

UFCs/ml – Unidades formadoras de colônias por mililitro;

μm – Micrómetros;

I. Introdução

Ao longo do tempo, vários autores, têm mencionado a pesquisa de novas fontes de carbono, provenientes de subprodutos industriais e resíduos agrícolas, para a produção de bioetanol.

Consideramos o presente tema de elevada pertinência tendo em conta a necessidade de compreender e adquirir novos conhecimentos sobre a utilização de diferentes subprodutos industriais, permitindo posteriormente implementar estratégias mais adequadas e eficazes, para o desenvolvimento dos biocombustíveis, contribuindo assim para uma melhoria no ambiente.

Neste sentido, tivemos como principal objetivo contribuir para o estudo da produção de etanol através de resíduos biológicos de citrinos e alfarroba.

Para a prossecução deste objetivo, foi organizado o trabalho em VII capítulos distintos que procuram organizar de forma coerente os contributos teóricos e empíricos. No capítulo I foi realizada a revisão da literatura acerca das variáveis em estudo, onde se encontram descritos os estudos mais atuais publicados sobre o tema. No capítulo II foram determinados os procedimentos metodológicos deste estudo englobando as variáveis e os procedimentos utilizados. Por último, no capítulo III foram apresentados os resultados e a respectiva análise e discussão dos mesmos.

1. Enquadramento teórico

1.1. Biocombustíveis

A queima de combustíveis fósseis resulta na acumulação de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera e de mudanças climáticas no planeta terra. Através do relatório final 2006 do Conselho Assessor de Biocombustíveis da União Europeia, foi possível concluir que os veículos de transporte motorizados contribuem cerca de 30% para o consumo total de energia na Comunidade Europeia (CE). Ao longo dos próximos 25 anos, a escassez de petróleo e outros combustíveis líquidos crescerá de forma exponencial no sector dos transportes do que em qualquer outro sector de utilização final (Nevoigt 2008). Os biocombustíveis são apontados como uma das soluções a curto prazo, em termos de redução das emissões de Gases de Efeito Estufa (GEE) a nível dos transportes. No entanto tanto a sua produção como comercialização continuam envolvidas em grandes debates (Rutz & Janssen, 2007).

As limitadas reservas de combustíveis fósseis, a instabilidade no preço do petróleo e, mais recentemente, o aumento da pressão ambiental e política, deram motivação adicional para os pesquisadores que trabalham com fontes alternativas de combustível, alcançarem alguma solução o mais rápido possível (Vaheed et al., 2010).

A utilização de terras agrícolas para produções energéticas tem originado inúmeras preocupações, das quais se destacam as de ordem humana relativamente à falta de alimentos à subida dos preços face ao crescente interesse pelos biocombustíveis e as de ordem ambiental, devido à utilização intensiva dos solos, além de promover a libertação de GEE em maior escala do que em um terreno em pousio, promove a elevada utilização de pesticidas ou outros tipos de químicos e conseqüentemente um elevado gasto de combustíveis fósseis para a sua cultura (Rutz & Janssen, 2007).

1.2 Biocombustível na União Europeia

A União Europeia (UE) não se encontra desatenta na procura de uma estratégia viável para o uso sustentável de biomassa e dos biocombustíveis. Essa estratégia assenta na utilização dos recursos locais e de produtos importados, causados pelas alterações na legislação a nível da qualidade dos combustíveis com vista a aumentar a percentagem de biocombustíveis, já existente, nos combustíveis fósseis em circulação (Rutz & Janssen, 2007).

São propostos dois tipos de políticas para a promoção do uso de biocombustível na UE:

- A isenção fiscal dos biocombustíveis;
- A obrigatoriedade das empresas de combustíveis convencionais terem de incorporar nos seus combustíveis um certo teor de biocombustíveis. Esta medida só será possível mediante a alteração da diretiva sobre a qualidade dos combustíveis.

A UE definiu a meta de 5,75% de biocombustíveis até ao ano de 2010 e 20% até ao ano de 2020 (Rutz & Janssen, 2007).

1.2.1 Legislação nacional

Portugal como país membro da UE deve adoptar as Diretivas Europeias para a sua lei através do Decreto de Lei nº 62 de 2006 que transpõe a Diretiva nº 2003/30/CE da UE.

A problemática do cumprimento das metas estabelecidas pela UE e que se traduzem nas metas nacionais leva a que seja prevista a imposição de “quotas mínimas de incorporação obrigatória destes combustíveis nos combustíveis de origem fóssil”.

O decreto lei promove ainda a “utilização de biodiesel em frotas de transportes públicos” exigindo no entanto que a sua “incorporação nos combustíveis fósseis seja superior a 10%”. (Rutz & Janssen, 2007).

1.2.2 Situação nacional

O mercado português à semelhança da Europa é caracterizado por um elevado número de veículos a gasóleo (29% do consumo é em gasolina e 62% de gasóleo), ficando assim limitado a uso de bioetanol e havendo uma procura muito maior de biodiesel. Para a produção de biodiesel utilizam-se essencialmente culturas oleaginosas e sua posterior esterificação. Para a produção de bioetanol utilizam-se derivados da fermentação das culturas ricas em celulosas, açúcares e amido. Em Portugal as principais culturas são os cereais (cevada, milho, trigo, centeio e sorgo) e os tubérculos (beterraba e batata) (Rutz & Janssen, 2007).

1.3 Tipos de biocombustíveis

Todos os combustíveis podem ser classificados em combustíveis fósseis e combustíveis renováveis. Para a produção de combustíveis fósseis e renováveis é necessário diferentes tipos de fontes primárias de energia. A figura 1. ilustra as diferentes cadeias de processos para todos os combustíveis, bem como as diferentes possibilidades de produção de combustível a partir da biomassa (Rutz & Janssen, 2007).

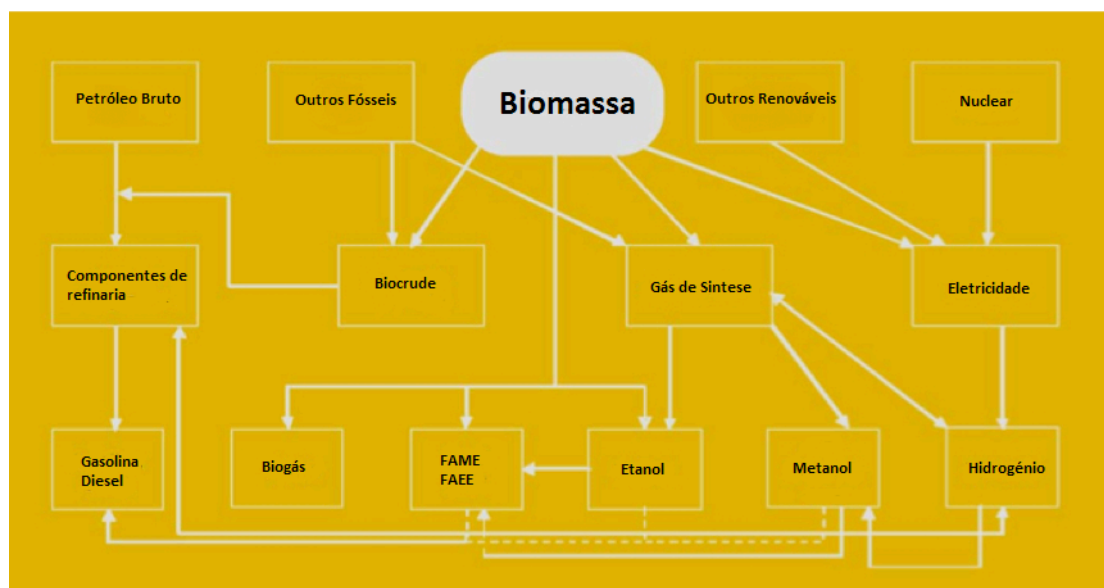


Figura 1- Cadeia de processos de produção de combustível (Imagem adaptada de Rutz & Janssen, 2007).

O crude em bruto é a principal fonte de produção para os combustíveis utilizados até ao presente, mas no entanto, como pode ser observado no esquema da figura 1. existem diversas possibilidades de produção de combustíveis a partir de biomassa. Assim a utilização de biomassa como fonte de matéria-prima não cria necessariamente um tipo de combustível diferente do que é usado nos dias de hoje, sendo esta é a principal vantagem uma vez que as estruturas existentes não têm que ser intensamente modificadas para a recepção de combustíveis provenientes da biomassa (Rutz & Janssen, 2007).

1.3.1 Classificação de biocombustíveis

Um outro tipo de classificação que pode ser aplicada aos biocombustíveis consiste na designação de primeira geração ou de segunda geração.

O óleo vegetal (PPO, do inglês Pure Plant Oil), o biodiesel, o éter etil-terc-butílico (ETBE, do inglês Ethyl tert – butyl ether) e bioetanol são considerados biocombustíveis de primeira geração, uma vez que as tecnologias de conversão e mecanismo são amplamente desenvolvidas e aprovadas na prática. Embora estes biocombustíveis difiram em propriedades, requisitos técnicos, aspectos económicos e potenciais estes contribuem para garantir mobilidade a longo prazo (Rutz & Janssen, 2007).

Em contraste, os biocombustíveis de segunda geração não se encontram comercialmente disponíveis, visto que as tecnologias de conversão têm vindo ao longo dos tempos evoluindo. Este grupo inclui como exemplo os biocombustíveis etanol a partir de amido e biomassa-para-

líquido (BTL, do inglês Biomass-to-liquids), ou seja, qualquer processo que produza combustível líquido a partir de biomassa (Rutz & Janssen, 2007).

2. Etanol

O etanol tem amplas aplicações como solvente, tanto a nível de perfumes como na medicina, e têm também uma longa história a nível de aplicações, como exemplo os combustíveis para aquecimento.

A demanda por combustíveis gerados a partir de recursos renováveis tem aumentado nos últimos anos devido ao preço do petróleo, às preocupações sobre a produção de GEE e devido à crescente dependência de fontes estrangeiras de energia nos Estados Unidos e na Europa (López et al., 2010).

Tanto como renovável e ambientalmente amigável, acredita-se que o etanol pode ser uma das melhores alternativas para a substituição da gasolina, o que levou a um aumento dramático na sua capacidade de produção. Na prática, a pesquisa focada na fermentação do etanol encontra-se em andamento desde o choque da crise do petróleo bruto em 1970 (Vaheed et al., 2010). Embora muitos progressos tenham sido feitos, permanecem os altos custos de produção como o principal obstáculo para a comercialização do etanol (Zhou et al., 2008).

2.1 Matéria-prima

O etanol obtido de processos fermentativos a partir de fontes renováveis de combustíveis ou aditivos para combustíveis designam-se de bioetanol (Rutz & Janssen, 2007).

O bioetanol pode ser produzido a partir de qualquer matéria-prima biológica que contém quantidades apreciáveis de açúcar ou de materiais que podem ser convertidos em açúcar, tal como amido ou celulose. Cereais de milho, trigo, cevada, centeio e outros são matérias-primas típicas que contêm amido nas suas sementes. O amido pode ser facilmente convertido em açúcar e em seguida a etanol (Rutz & Janssen, 2007). Outra cultura interessante e rica em carboidratos que é uma fonte potencial para a produção de bioetanol é a *Ceratonia siliqua*, mais comumente conhecida como alfarroba (Vaheed et al., 2010).

O açúcar e o amido utilizados atualmente para a produção de bioetanol são chamados de matérias-primas de primeira geração, devido a serem caracterizados pelo fato de só uma parte da planta ser utilizada para a produção de biocombustível. Contrariamente, os tipos de matérias-primas de última geração proporcionam a oportunidade de usar quase toda a planta para a produção de biocombustíveis e não apenas certas partes da mesma, como por exemplo

sementes, caules ou folhas. Para tal, são necessárias tecnologias avançadas para a produção de biocombustíveis através de matérias-primas de segunda geração (Rutz & Janssen, 2007).

3. Meios de fermentação

Para um crescimento eficiente, os microrganismos requerem a presença de certos compostos no meio de cultura, como água, fonte de carbono, azoto, minerais e vitaminas. Numa produção à escala industrial o meio de fermentação deve preencher certos requisitos, para que os processos fermentativos sejam viáveis, tais como, permitir a produção máxima de um produto ou biomassa por grama de substrato, permitir uma taxa máxima de formação de produto, evitar a formação de produtos indesejados, ser de qualidade e estar disponível ao longo do ano, causar o mínimo de problemas durante a formulação, esterilização, arejamento, agitação, extração, purificação e tratamento de resíduos (Lima-Costa et al. 2001).

Os componentes de um meio fermentativo representam 38 a 73% do custo total do processo fermentativo, sendo a fonte de carbono usualmente o componente mais dispendioso.

Em grande escala, o meio fermentativo deverá permitir uma concentração máxima de biomassa e a produção de uma cultura de alta qualidade a um baixo preço. O uso de produtos comerciais ou subprodutos das indústrias de alimentos, tais como fontes de azoto ou carbono, tendem a atender à maioria dos critérios para meios de produção devido a serem substratos baratos. No entanto, a presença de produtos indesejáveis ou problemas de não-homogeneidade dos subprodutos pode limitar a sua utilização em processos industriais (Lima-Costa et al. 2001).

3.1 Uso de subprodutos como meios de cultura

Quando um resíduo a partir de um processo pode ser utilizado como matéria-prima em outros processos, o nome mais apropriado é coproduto ou subproduto. A virtude principal da matéria de desperdícios é o seu baixo custo. Por definição, os resíduos têm pouco valor económico aparente e muitas vezes podem ser adquiridos por pouco mais do que o custo do seu transporte, a partir do seu ponto de origem até uma zona de processamento (Thomsen, 2005).

Em países onde a economia é baseada na agricultura os resíduos resultantes desta prática são abundantes, sendo a sua eliminação dificultada pelo aumento dos custos e devido a restrições no uso de aterros (Thomsen, 2005; Couto, 2008). Esses resíduos são ricos em açúcares, que devido à sua natureza orgânica são facilmente assimilados pelos microrganismos, fazendo com que sejam muito apropriados para a sua exploração como matérias-primas na produção

de compostos industrialmente relevantes. Além disso, é de grande interesse a reutilização de resíduos biológicos, devido à legislação ambiental, como tal a indústria tenta encontrar cada vez mais alternativas ao uso da matéria residual (Couto, 2008).

4. Alfarroba

4.1 Alfarrobeira

A alfarrobeira, *Ceratonia siliqua L.*, é uma árvore nativa da bacia do mediterrâneo e sudoeste da Ásia. O cultivo desta árvore foi efetuada em toda a região do Mediterrâneo, durante cerca de 4000 anos. Portugal e Espanha possuem aproximadamente cerca de 100.000 hectares de alfarrobeiras e processam mais de metade do abastecimento mundial de alfarroba (Fletcher et al., 1997). Por ser uma planta xerófita adaptada a ambientes de clima seco, possui diversos mecanismos de adaptação, podendo crescer em diversos tipos de solos requerendo pouca manutenção. Apresenta-se como uma cultura de elevado rendimento e um recurso valioso para a reflorestação e controlo da erosão em terrenos não cultivados (Battle et al., 1997; Santos et al., 2005).

A *Ceratonia siliqua L.* pertence à família das leguminosas (*Fabaceae*), uma das maiores famílias de plantas com flor, em que as sementes crescem em vagem. A alfarrobeira pode atingir cerca de 10 metros de altura, apresentando um tronco áspero e grosso, ramos resistentes e folhas perenes. O fruto da *Ceratonia siliqua L.* é a alfarroba, uma vagem comestível, de cor castanha e sabor adocicado, que pode ter entre 10 a 20 centímetros de comprimento, 1,5 a 2 centímetros de largura e 1 centímetro de espessura (Battle et al., 1997; Ayaz et al., 2007).

Mundialmente a produção de alfarroba está estimada em aproximadamente 400.000 toneladas por ano. Os seus principais produtores e exportadores de alfarroba são Espanha (42%), Itália (16%), Portugal (10%), Marrocos (8%), Grécia (6,5%), Chipre (5,5%) e Turquia (4,8%) (R. Fletcher et al., 1997; Santos et al., 2005). Portugal é considerado o terceiro maior produtor e exportador de alfarroba do mundo, com uma produção de 50 mil toneladas por ano que contribuem para a sua economia (Lima-Costa et al., 2011). Apesar de dispersas por todo o país é na região do Algarve, nomeadamente no barrocal algarvio, região entre a serra e a orla litoral, que a cultura de alfarroba assume especial atenção (Biner et al., 2007). O preço da alfarroba têm oscilado ao longo do tempo, custando cerca de 200€/tonelada (Lima-Costa et al., 2011).

4.2 Composição

O fruto da alfarrobeira é a vagem de alfarroba. Os dois principais componentes do fruto são a polpa e as sementes. As sementes representam cerca de 10% do peso do fruto enquanto a polpa representa os restantes 90%. A sua composição depende grandemente da variedade, clima, região e técnicas de cultivo (Biner et al., 2007; Petit., 1994; Lima-Costa et al., 2011, Mendes et al., 2007).

A polpa tem um alto teor de açúcares e fenóis e um baixo teor de proteína (3%) e gordura (0,6%) (Santos et al., 2005). Os açúcares principais são a sacarose (65-75% dos açúcares totais), glucose e frutose (15-25% dos açúcares totais) e um baixo teor de outros açúcares tais como xilose, maltose, entre outros (Petit et al., 1994; Naghmouchi et al., s/d). Além dos açúcares, a polpa de alfarroba contém também em menor porção fibras (hemicelulose e celulose), pinitol, lenhina, cinzas e um alto teor de tanino que limita o seu consumo pelo gado, por causa da reduzida digestibilidade (Santos et al., 2005).

As sementes são formadas por três partes distintas: o revestimento, o endosperma e o embrião. A partir do endosperma é extraída a goma da alfarroba conhecida por “Locust Bean Gum” (LBG) constituída por polissacarídeos (galactomananos) (Santos et al., 2005).

4.3 Aplicações

Hoje em dia diversos produtos são produzidos a partir da semente e da polpa da alfarroba, sendo que a importância económica da cultura resulta principalmente do seu uso pelas indústrias (Biner et al., 2007).

Atualmente existem dois tipos de indústrias de transformação da alfarroba, a indústria de 1ª transformação que separa a polpa e a semente e a indústria de 2ª transformação que separa a semente em endosperma e embrião. No Algarve, existe apenas uma fábrica da transformação da semente de alfarroba, a Victus Industrial Fareense, e quase toda a sua produção é exportada para países industrializados como o Japão, EUA, Dinamarca, Alemanha e Holanda (Manso et al., 2010).

O endosperma extraído das sementes que serve para produzir galactomananos, é responsável pelas propriedades espessantes, o LBG, um produto amplamente utilizado nas indústrias alimentares como espessante em preparados alimentares, devido à sua capacidade em formar soluções viscosas e de estabilizar emulsões (Santos et al., 2005; Barracose et al., 2007). Também pode ser utilizada em aplicações no ramo da indústria têxtil, do papel, química,

farmacêutica, cosmética, petróleo e explosivos. O embrião é utilizado apenas na alimentação animal e humana devido ao seu alto teor em proteínas (Manso et al., 2010)

As vagens de alfarroba são amplamente utilizados como matérias-primas para a produção de xaropes ou como um substituto de cacau na indústria alimentar, ou mesmo diretamente na dieta dos animais de exploração (Lima-Costa et al., 2011; Petit et al., 1994; Biner et al., 2005). Dada a elevada concentração em açúcares a polpa é usada como alimento energético para gado, mas a baixa quantidade em proteína e os elevados níveis de polifenóis limita o seu uso devido a baixa digestibilidade (Petit et al., 1994; Mendes et al., 2007; Santos et al., 2005).

Dadas as altas concentração de açúcares presentes no fruto de alfarroba e as características robustas do crescimento da alfarrobeira, surgiram métodos de conversão desses açúcares em etanol. Estes métodos possibilitaram um papel preponderante na utilização da alfarroba como fonte viável na produção de combustíveis alternativos (Vaheed et al., 2010).

4.4 Extração de açúcares

Devido ao elevado teor em açúcar presente na polpa de alfarroba tornou-se necessário desenvolver métodos para a extração do mesmo, para a produção de xaropes que podem ser usados como substratos em processos fermentativos (Mendes et al., 2007; Lima-Costa et al., 2010).

A produção de açúcares de alfarroba pratica-se a nível industrial em Portugal mas apenas para o uso em tecnologias não-fermentativas. Apesar da alfarroba já ter sido usada em estudos de fermentação líquida, sólida e semissólida, foi descrito inibição do crescimento bacteriano, devido à presença de ácido tânico, polifenóis de baixo peso molecular e outras substâncias não referidas como biologicamente tóxicas.

5. Citrinos

A produção mundial de frutas cítricas tem experimentado um crescimento contínuo nas últimas décadas. O Brasil, os países mediterrânicos (especialmente Espanha e Itália), Estados Unidos e China têm sido os principais produtores mundiais, representando quase dois terços das produções mundiais de frutas cítricas. A Food and Agriculture Organization (FAO) estimou uma produção total de citrinos em mais de 105 milhões de toneladas por ano no período entre 2000 a 2004 (Rivas et al., 2008).

Os citrinos, no seu conjunto, representam 31% da produção total de frutos frescos de Portugal continental. A laranja é a segunda espécie com maior peso na produção de frutos frescos representando 24% do seu volume total.

De acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), existiam em 1999, no continente português, 37 657 explorações com citrinos, ocupando uma área total de 22 428 hectares. A dimensão média das explorações era de 0,6 hectares. A região do Algarve, com 67% da área de citrinos tinha apenas 27% do total das explorações com pomares de citrinos.

O calendário de produção de laranjas no Algarve abrange praticamente todo o ano, desde Outubro até Junho, podendo algumas variedades chegar até Setembro (GPP, 2007).

5.1 Resíduos resultantes do processamento de citrinos

Uma grande parte da produção de frutos cítricos é dirigida à extração industrial de suco o que leva a enormes quantidades de resíduos (Rivas et al., 2008). O principal resultado da indústria de produção de laranja é o sumo da própria fruta, mas existe uma variedade de outros produtos como o óleo de laranja doce, flor de laranjeira, mel de flor de laranjeira e marmelada (López et al., 2010). Aproximadamente cerca de 50-60% dos citrinos processados tornam-se resíduos. Estes resíduos são constituídos essencialmente por águas de lavagem, cascas, celulose, sementes e as membranas que sobraram após extração do suco (Mark R et al., 2007; Rivas et al., 2008; Thomsen, 2005).

Até há relativamente pouco tempo os resíduos, provenientes do processamento dos citrinos, levaram a problemas de descarte significativos devido a não existir um meio de tratamento satisfatório, sendo despejados em aterros ou mesmo em terrenos adjacentes aos locais de produção. Este tipo de despejos originam grandes extensões de terrenos contendo quantidades significativas de resíduos putrefatos que apresentavam um risco significativo para os cursos de água locais e em alguns casos, levava a uma produção descontrolada de metano (López et al., 2010).

Tradicionalmente, as únicas vias de eliminação de resíduos de laranja era no seu uso com matéria-prima no fabrico de alimentos para os animais ou simplesmente a sua queima, tendo como consequência principal a libertação para o ambiente de produtos resultantes da combustão. O problema da eliminação estimulou o interesse recente pelo desenvolvimento de novas formas responsáveis de lidar com os resíduos de laranja, tendo como objetivo

preferencial produzir produtos de alto valor e estabelecer abordagens ambientais mais responsáveis no seu processamento (López et al., 2010).

Como a maioria dos substratos de plantas são uma fonte atraente de nutrientes para as comunidades microbianas em particular aquelas que residem na flora intestinal e no estômago (rúmen) dos animais ruminantes. Devido a tal fato, os resíduos de laranja têm vindo a ser exportados para a alimentação para este tipo de animais, promovendo o crescimento microbiano e a lactação, ou seja, a produção de leite (López et al., 2010). Embora, devido ao seu baixo valor nutricional permite apenas um sucesso limitado na reutilização deste subprodutos. Outras aplicações incluem extração de pectina, recuperação de óleos essenciais, produção de agentes espessantes, remoção e purificação de carotenóides para obtenção de pigmentos naturais adequados para alimentos e coloração (Rivas et al., 2008).

Estes subprodutos contem também outros carboidratos solúveis e insolúveis que os tornam uma matéria-prima atraente para produtos de valor agregado, pela química ou hidrólise enzimática e subsequentemente conversão biológica (Rivas et al., 2008).

5.2 Composição dos resíduos

A composição das frutas cítricas é afetada por fatores como as condições de crescimento, grau de maturidade, tipo de enxertos, combinação entre espécies e o clima. As frutas cítricas normalmente contêm N (1-2 g/Kg), lípidos (oleico, linoléico, linolénico, palmíticos, ácido esteárico, glicerol e um fitoesterol), açúcares (glucose, frutose e sacarose), ácidos (cítrico, málico, tartárico, benzoico, oxálico e succínico), carboidratos solúveis (pectina e celulose), enzimas (pectinesterase, fosfatase, peroxidase), flavonoides (hesperidina, naringina), princípios amargos (limonina, isolimonin), óleo de casca (d-limoneno), constituintes voláteis (álcoois, aldeídos, cetonas, esterres, hidrocarbonetos, ácidos), pigmentos (carotenos, xantofilas), vitaminas (complexo de vitamina B, carotenóides) e minerais (cálcio e potássio) (Bampidis et al., 2006).

A casca da laranja é constituída principalmente por açúcares solúveis como glucose, frutose e sacarose, enquanto que os polissacáridos insolúveis das paredes celulares são basicamente celulose, hemicelulose e pectina. A hemicelulose é um composto constituído principalmente por unidades de xilose ligados entre si, mas também pode conter hexoses e ácido urónico, enquanto que a pectina é principalmente constituída por ácido urónicos e outros açúcares, tais como a ramnose e galactose. A hidrólise enzimática deste produto no seu estado comercial bruto, com pectinases celulares e hemicelulases, libertam glucose a partir de celulose, ácido

urónico de pectina e arabinose, ramnose, galactose e xilose de pectinas e hemiceluloses. Também são extraídas grandes quantidades de glucose e frutose dos tecidos membranares e das cascas, juntamente com alguns compostos inibitórios, principalmente limoneno residual, que deve ser removido antes de prosseguir para processos de fermentação (Rivas et al., 2008).

5.2.1 D-Limoneno

O D-limoneno (1-metil-4-(1-metiletenil)ciclo-hexano) é um monoterpene monocíclico, um constituinte importante em vários óleos provenientes de citrinos, como o da laranja, limão, tangerina e toranja. Devido à sua fragrância, o D-limoneno é amplamente usado como aditivo em comidas ou em aromas para perfumes (Sun, 2007).

Devido ao D-limoneno ser conhecido por inibir o crescimento de leveduras, Wilkins e colaboradores, estudaram o efeito de diferentes concentrações de D-limoneno, em licor de citrinos, na produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Concentrações iniciais de D-limoneno de 0,33% ($V_{\text{citrinos}}/V_{\text{D-limoneno}}$) apresentaram concentrações de etanol produzido ao fim de 24h menores do que concentrações iniciais de D-limoneno de 0,14% ($V_{\text{citrinos}}/V_{\text{D-limoneno}}$). Uma maneira de contornar este problema pode ser aumentar a concentração de células iniciais a inocular na fermentação, permitindo que a levedura supere os efeitos inibitórios do D-limoneno.

Os efeitos inibitórios do D-limoneno sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* são atribuídos a uma ruptura da membrana celular causando a libertação de componentes celulares importantes para o exterior da célula, bem como perturbações no transporte de iões de hidrogénio (H^+) e iões de potássio (K^+) no processo de glicólise (Wilkins et al., 2007).

Várias espécies de leveduras são conhecidas por serem capazes de converter o D-limoneno em outro tipo de produtos, tais como: isopiperitone, trans-1,2-dihidroxilimoneno e ácido pirillic. A *Saccharomyces cerevisiae* não converte o D-limoneno em outros produtos, na presença de oxigénio, devido a todas as biotransformações do limoneno serem catalisadas por monooxigenases, que necessitam de oxigénio presente no meio fermentativo (Wilkins et al., 2007).

6. Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras constituem um grupo de microrganismos explorado pelo homem há milhares de anos. Existem aproximadamente 350 espécies diferentes de leveduras agrupadas em cerca de 39 géneros, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a que possui um maior interesse.

A *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo não patogénico, eucariótico, unicelular, pertencente ao reino *Fungi* e à classe dos *Saccharomycetes*. A sua dimensão típica é de 1 a 5 µm de diâmetro e 5 a 30 µm de comprimento, apresentando uma forma oval ou esférica. O seu tamanho e largura variam de acordo com as condições ambientais e nutricionais em que se encontra (Fonseca & Teixeira, 2007).

As células da levedura possuem uma parede celular rígida constituída principalmente por polissacarídeos, como glucanas, proteínas e quitina, que conferem à célula uma maior resistência a alterações da pressão osmótica. Na superfície interna da parede celular encontra-se o periplasma, um local onde podem ser encontradas algumas enzimas específicas, como a invertase e a fosfatase ácida. A membrana plasmática é constituída principalmente por proteínas e lípidos e possui uma grande importância por determinar quais as espécies químicas que podem ser transferidas entre a célula e o meio ambiente. A membrana circunda o citoplasma, organizado estruturalmente por um citoesqueleto que encontra-se dividido em vários compartimentos ligados à membrana, incluindo um núcleo envolvido por uma membrana nuclear, mitocôndrias, vacúolos, retículo endoplasmático, grânulos de reserva e o complexo de Golgi (Fonseca & Teixeira, 2007; Quintas et al., 2008).

A reprodução das leveduras pode dar-se vegetativamente por gemulação, ou seja, reprodução assexuada, ou por esporulação, reprodução sexuada. Em condições normais de crescimento as leveduras reproduzem-se por gemulação que consiste na formação de uma gema na superfície da célula mãe, dando origem a uma nova célula (Fonseca & Teixeira, 2007).

Para uma aplicação em larga escala em produção de bioetanol a partir de substratos de carbono C6, a *Saccharomyces cerevisiae* surge como a mais promissora plataforma de engenharia metabólica para a produção de bioetanol a partir de hidrolisados de plantas (Van Maris et al., 2006).

6.1 Aspectos metabólicos

As exigências nutricionais de algumas células de levedura durante o processo de fermentação, podem ser divididas em duas categorias distintas: os micronutrientes, que mostram concentrações iguais ou inferiores a 10^{-6} mol/l e os macronutrientes concentrações maiores que 10^{-3} mol/l. Os macronutrientes apresentam-se como carbono, hidrogénio, oxigénio, fósforo, potássio, azoto, enxofre e magnésio, sendo o carbono o elemento principal em combinação com o hidrogénio, oxigénio e azoto. Enquanto que os micronutrientes são responsáveis pelas funções enzimáticas e estruturais das biomoléculas, tais como ferro, cobre,

zinco, manganês e molibdênio, estes são exigidos por quase todos os organismos, como cofactores de enzimas (Rodrigues, 2006).

Todos estes nutrientes encontram-se presentes na composição dos microrganismos, devendo ser suplementados ao meio de cultura durante o desenvolvimento dos mesmos.

Para além da presença dos macro e micronutrientes, os aspectos físicos, tais como a temperatura, a luz, a viscosidade e a pressão hidrostática podem afetar o crescimento da levedura. A temperatura exerce influência sobre os metabolismos através de várias maneiras, ocorrendo o aumento das exigências nutricionais a temperaturas mais elevadas (Rodrigues, 2006).

A fonte de azoto é um fator de grande influência sobre a produção de enzimas. Tanto o azoto orgânico como o azoto inorgânico apresentam um importante papel na síntese enzimática. As fontes de azoto mais utilizadas são: hidrolisados enzimáticos de proteínas (peptona), aminoácidos, ureia, nitrato e sais de amônia. A seleção da fonte de azoto mais adequada depende do microrganismo usado e da associação com outros ingredientes do meio de cultura (Flávia, 2007).

6.2 Metabolismo celular

Os seres vivos são sistemas complexos e organizados que têm na base da sua constituição química um conjunto único de macromoléculas como as proteínas, os glícidos, os lípidos e os ácidos nucleicos. Os organismos são capazes de extrair do meio ambiente a energia e as matérias-primas necessárias para o seu crescimento, manutenção e duplicação, usando para isso, um conjunto de reações químicas bem coordenadas e reguladas, designadas por metabolismos (Quintas et al., 2008).

O metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*, bem como de qualquer outro ser vivo, pode ser dividido em dois grupos: anabolismo e catabolismo. O processo de anabolismo diz respeito a reação de síntese de material celular, que requer energia, enquanto que no processo de catabolismo as moléculas mais complexas são degradadas e oxidadas, sendo que a energia química produzida nessas reações é acumulada sob a forma de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) (Quintas et al., 2008).

metabolização da energia sofrem adaptações às necessidades de cada tipo de espécie ou de célula (Otterstedt et al., 2004; Fonseca & Teixeira, 2007).

O piruvato gerado através da via glicolítica pode ser catabolizado aerobiamente, ou seja na presença de oxigénio (O_2), no sistema complexo piruvato desidrogenase e no ciclo do ácido cítrico produzindo moléculas transportadores de electrões, o ião nicotina adenina dinucleotide (NAD^+), o ião hidrogénio (H^+) e a Flavina adenina dinucleotídeo ($FADH_2$), o qual permitem a produção de grandes quantidades de ATP. Desta forma a molécula de glucose é oxidada a dióxido de carbono (CO_2) e a água (H_2O) (Quintas et al., 2008; Stryer et al., 2007).

A glicólise também pode realizar-se anaerobiamente, ou seja na ausência de oxigénio, sendo esta a via de grande importância para os organismos fermentativos. Neste caso o produto final deixa de ser o piruvato e passa a ser uma molécula mais reduzida como o lactato, através da fermentação láctica, ou para etanol, através da fermentação alcoólica. (Quintas et al., 2008; Stryer et al., 2007).

6.2.3 Glicólise

A glicólise consiste no conjunto de 10 reacções que ocorrem no citoplasma, onde transforma a glucose em piruvato (figura 3.). Numa primeira etapa, a glucose é convertida em frutose-6-fosfato por uma fosforilação, uma isomerização e uma segunda fosforilação. Duas moléculas de ATP são consumidas por molécula de glucose nestas reacções, que são a iniciação à síntese global de ATP. Na segunda etapa, a frutose 1,6-bifosfato é clivada pela aldolase a di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, que são prontamente interconvertíveis. Por último na terceira etapa que prossegue é gerado o ATP. O gliceraldeído 3-fosfato é oxidado e fosforilado, formando 1,3-bisfosfoglicerato e um acil-fosfato. Esta molécula transfere uma fosforila (P_i) para adenosina difosfato (ADP), formando ATP e 3-fosfoglicerato. Através de um deslocamento da fosforila e uma desidratação forma-se o fosfoenolpiruvato, um segundo intermediário com alto potencial de transferência da fosforila. Gera-se outra molécula da ATP quando o fosfoenolpiruvato é transformado em piruvato. No total há um balanço de ganho de duas moléculas de ATP na formação de duas moléculas de piruvato a partir de uma molécula de glucose (equação 1.).

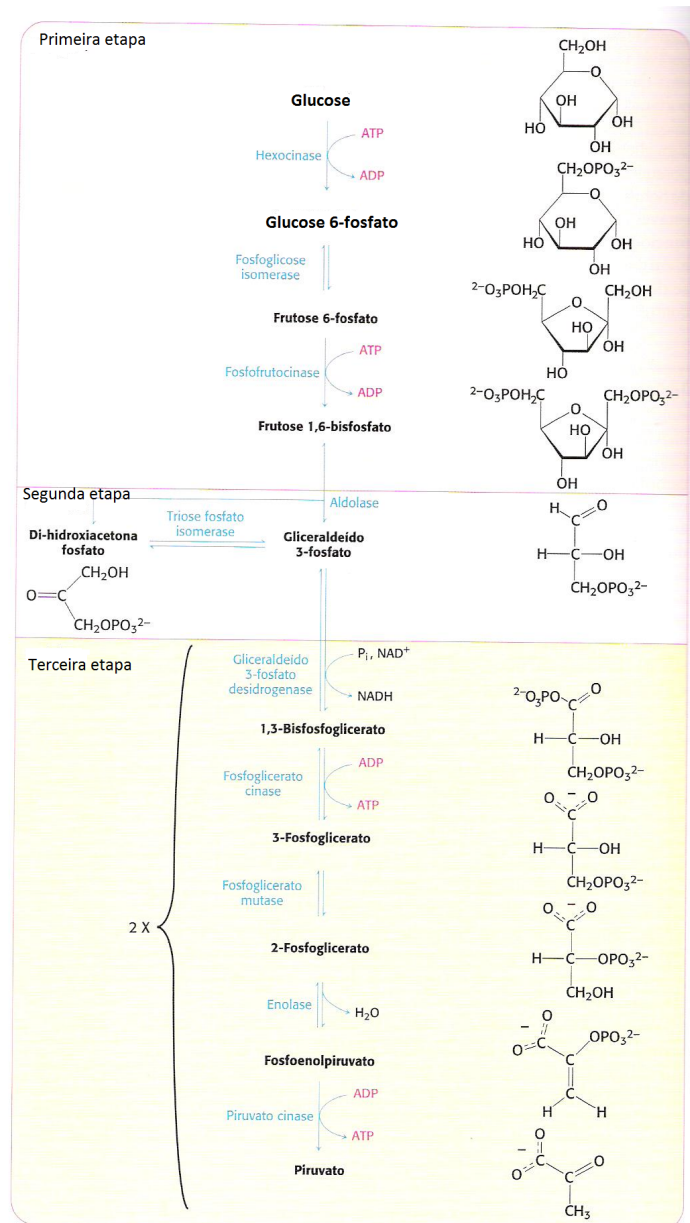
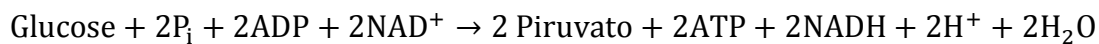


Figura 3 - A via glicolítica dividida em três etapas (imagem adaptada de Stryer et al., 2007).

O balanço da reação na transformação da glicose em piruvato é:

Equação 1 – Reação da transformação da glicose em piruvato.



O aceitador de elétrões na oxidação do gliceraldeído 3-fosfato é o NAD^+ que precisa ser regenerado para que a glicólise prossiga. Dessa maneira em organismos aeróbios, o nicotinamida adenina dinucleotide desidrogenase (NADH) formado na glicólise, transfere elétrões para o O_2 através da cadeia de transporte de elétrões, que assim regenera o NAD^+ .

Em condições anaeróbias e em alguns microrganismos, o NAD^+ é regenerado pela redução do piruvato a lactato, ou pela redução do piruvato a etanol (Stryer et al., 2007).

A frutose entra diretamente na via glicolítica através da hexocinase que a fosforila no sexto carbono. Seguindo depois as mesmas reações que a glucose, até ao produto final, piruvato.

6.2.4 Destinos metabólicos do piruvato

A sequência de reações de glucose a piruvato é semelhante na maioria dos organismos e na maior dos tipos celulares. Ao contrário, o destino do piruvato é variável, podendo seguir três diferentes reações, a transformação em etanol, ácido láctico ou dióxido de carbono (figura 4.). As duas primeiras reações são fermentações, que ocorrem na ausência de oxigénio. Na presença de oxigénio, o piruvato é metabolizado a dióxido de carbono e água através do ciclo do ácido cítrico e da cadeia transportadores de eletrões (Stryer et al., 2007).

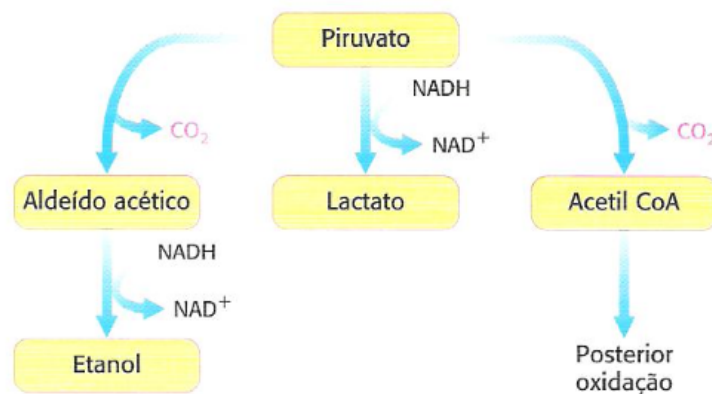


Figura 4 - Os diferentes destinos do piruvato (Imagem adaptada de Stryer et al., 2007)

6.2.4.1 Fermentação alcoólica

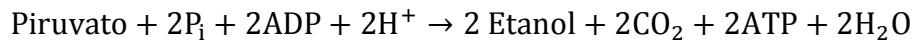
Em condições anaeróbias, o NADH formado pela reação catalisada pelo enzima 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase deixa de ser oxidado na cadeia transportadora de eletrões, visto que esta não funciona na ausência de oxigénio, tornando necessárias vias alternativas de regeneração. As leveduras e outros tipos de organismos utilizam estratégias diferentes para regenerar o NAD^+ produzindo etanol (Quintas et al., 2008). A primeira etapa é a descarboxilação do piruvato, sendo catalisada pelo piruvato descarboxílase, na qual necessita da coenzima tiamina pirofosfato. A segunda etapa é a redução do aldeído acético a etanol pelo NADH , numa reação catalisada pela álcool desidrogenase. Este processo regenera o NAD^+ necessário no processo de glicólise (Stryer et al., 2007).



Figura 5 - Reação da transformação do piruvato em etanol (Imagem adaptada de Stryer et al., 2007)

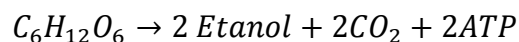
A transformação da glicose em etanol é um exemplo da fermentação alcoólica. O balanço deste processo anaeróbico é:

Equação 2 – Balanço do processo anaeróbico do piruvato.



Resumindo, se a molécula de glucose seguir uma a via anaeróbia, após glicólise, o seu balanço global seria o seguinte:

Equação 3 – Reação global do consumo de etanol pelo processo anaeróbico.



As leveduras não podem viver indefinidamente em condições anaeróbias devido à necessidade que têm de oxigénio para sintetizar componentes da membrana. A capacidade que as leveduras têm de viver em meios anaeróbios deve ser vista como uma vantagem adaptativa, as leveduras conseguem produzir etanol até uma concentração superior a 10%, inibindo assim o crescimento de outros microrganismos devido à toxicidade do mesmo (Quintas et al., 2008).

A fermentação alcoólica é um bioprocesso complexo que resulta da interação de inúmeros parâmetros genéticos, metabólicos e ambientais (Albertin et al., 2011). Para uma caracterização relevante da fermentação alcoólica é necessário considerar diferentes níveis de integração celular e analisar os seus relacionamentos. Em particular, uma elevada taxa de fermentação pode ser alcançada de duas maneira distintas: por um aumento da taxa de CO₂ por célula, ou pelo aumento do número de células por população (Albertin et al., 2011).

6.3 Comportamento da levedura

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo facultativo, sendo capaz de mudar para um metabolismo fermentativo misto, resultando na produção de etanol, caso a concentração de glicose exceda os 0,8 mM. Assim a *S. cerevisiae* controla a fermentação contra a respiração principalmente em resposta ao nível de açúcar (Otterstedt et al., 2004).

S. cerevisiae é um microrganismo relativamente tolerante a baixos valores de pH, de açúcar e elevadas concentrações de etanol, podendo reduzir o risco de contaminação em fermentações industriais. Além disso, a levedura, é bastante resistente a inibidores presentes em hidrolisados de biomassa sendo capaz de crescer anaerobiamente (Nevoigt, 2008).

Estudos realizados por Soe e colaboradores (2009), indicaram que a aeração durante a fermentação pode melhorar o desempenho da fermentação e etanol em termos da concentração final no meio de cultura e na produtividade do mesmo.

7. Processo fermentativo

O sucesso de um dado processo fermentativo depende muito de uma correta definição de quatro pontos básicos: microrganismo, meio de cultura, a forma de condução do processo e as etapas de recuperação do produto. Os três primeiros itens correspondem ao “*ups-tream processes*” enquanto que o último item corresponde ao “*downstream processes*”. Estes quatro itens correlacionam-se enormemente, sendo necessário defini-los de forma conjunta, levando a considerações de aspectos biológicos e econômicos (Vaz et al., s/d).

7.1 Reatores biológicos

Na biotecnologia industrial o reator é o elemento central, pois é nele que se desenvolvem as transformações de interesse. A principal função de um reator biológico é a criação de um ambiente controlado para a multiplicação e/ou maturação de células animais, vegetais ou microrganismos, de maneira a se obter o produto desejado, quer este seja a biomassa ou metabolitos produzidos pela cultura (Lima-Costa et al., 2007; Vaz et al., s/d).

Existem variados tipos de reatores biológicos no mercado, entre eles os mais conhecidos são: tanque agitado, leito fixo, leito fluidizado, coluna de bolhas e *air-lift*. Os reatores biológicos mecanicamente agitados, são extensivamente usados na indústria e em aplicações biológicas a partir de culturas microbianas (Lima-Costa et al., 2007). A determinação de um reator biológico depende principalmente da sensibilidade do processo ao ambiente mantido no

recipiente. O material utilizado na construção dos reatores deve ser atóxico, resistente a variações de pressão e à corrosão química (Vaz et al., s/d).

O arejamento e agitação são dois fatores de extrema importância durante o processo fermentativo. A principal função do arejamento é fornecer ao organismo submerso no meio de cultura o oxigênio necessário enquanto que a agitação têm como função a obtenção de uma suspensão uniforme de células por todo o meio de cultura (Stanbury et al., 1994).

Em qualquer dos reatores é necessário projetar e dimensionar o vaso e os equipamento de agitação e arejamento. Um dos principais objetivos da agitação é obter uma mistura eficientemente homogênea e quebrar as bolhas de ar provenientes do arejamento, para aumentar a oxigenação da cultura e a prevenção da formação de agregados celulares de grandes dimensões. Os agitadores normalmente usados nas fermentações são classificados em axiais e radiais (turbinas de *Rushton*) influenciando o fluxo de convecção produzido. Os dispersores de ar mais utilizados são os dispersores porosos e em L, perfurado na base, constituído por um crivo metálico ou de poliuretano em que os diâmetros dos orifícios são variáveis de acordo com dimensão das microbolhas de ar que se pretende difundir na suspensão celular (Lima-Costa et al., 2007).

A formação de espuma é um importante condicionante do processo que se encontra relacionada com o causal de arejamento, com a composição do meio nutricional, com o desenvolvimento do microrganismo e com a geometria do reator. As bolhas de ar ao emergirem à superfície do meio, juntamente com compostos de elevada viscosidade excretados pelas células, formam espuma na superfície. Desta forma é criada uma zona de elevada heterogeneidade e de difícil transferência de massa, que pode ser contornada com a utilização de solução anti-espuma (Lima-Costa et al., 2007).

7.2 Aplicação industrial

Para uma aplicação industrial, espera-se que o microrganismo selecionado apresente características gerais como: uma elevada eficiência na conversão do substrato em produto, que permita o acúmulo do produto no meio, de forma a se ter elevada concentração do produto no caldo fermentativo, que não produza substâncias incompatíveis com o produto pretendido, que não exija condições de processo muito complexas, que os meios de cultura utilizados não sejam dispendiosos e que exista uma rápida libertação do produto para o meio fermentativo (Vaz et al., s/d).

7.3 Produção industrial de etanol

O etanol pode ser produzido através de três modos de operação industrial, em biorreatores: em modo descontínuo (“Batch”), contínuo e semi-contínuo (“Fed-batch”) (Stanbury et al. 1995).

7.3.1 Reator em modo descontínuo

Um reator em modo descontínuo é caracterizado pela variação ao longo do tempo da concentração celular, de nutrientes e de produtos. Nos processos descontínuos, todos os nutrientes necessários para uma fermentação, com exceção do oxigênio molecular, em processos aeróbios, e os compostos para correção do pH e anti-espuma, são adicionados antes do arranque do processo fermentativo (Fonseca & Teixeira, 2007).

7.3.1.1 Curva de crescimento

Através do comportamento das células vivas presentes no meio líquido ao longo do tempo é possível obter uma curva de crescimento característica de cada microrganismo, ilustrada na figura 6., onde podem ser encontrados quatro períodos distintos (Fonseca & Teixeira, 2007; Stanbury et al., 1995).

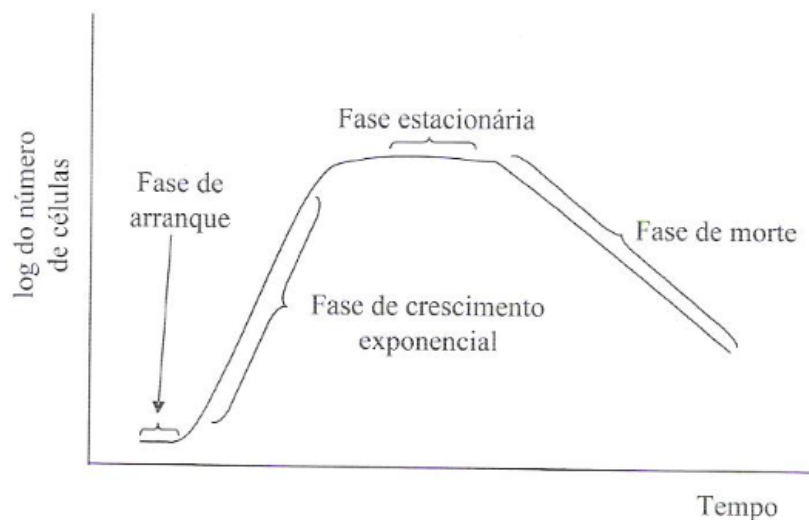


Figura 6 - Curva de crescimento típica de uma cultura descontínua (imagem adaptada de Fonseca & Teixeira, 2007)

No primeiro período, designado por fase de arranque, fase “lag” ou latência ocorre após inoculação do meio fermentativo, correspondendo ao período de adaptação das células as condições de cultura e à síntese de enzimas necessárias ao seu metabolismo. Nesta fase não existe registo de crescimento celular ($\mu = 0$) e a sua duração depende da concentração inicial de células inoculadas, da idade do microrganismo, do tipo de microrganismo e do seu estado

fisiológico. Se o microrganismo inoculado provem de o mesmo tipo de meio nutricional e se encontra numa fase exponencial de crescimento, a sua fase de arranque será bastante curta. O segundo período corresponde à fase exponencial de crescimento, durante a qual a concentração celular aumenta exponencialmente com o tempo, atingindo uma taxa específica de crescimento máxima ($\mu = \mu_{\text{máx}}$). O terceiro período é a fase estacionária, durante o qual a concentração celular total se mantém constante, embora a percentagem de células não viáveis aumente ao longo do tempo. Esta fase é caracterizada pela ausência da crescimento ($\mu=0$) devido à escassez de nutrientes e à acumulação de metabolitos. O quarto e ultimo período corresponde á fase de morte, na qual, para além da diminuição das células viáveis, ocorre também a lise celular e o valor de concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de novas células ($\mu < 0$) (Fonseca & Teixeira, 2007; Stanbury et al., 1995).

Existe, todavia, desvios a esta representação da evolução da biomassa com o tempo em reatores descontínuos, podendo ocorrer devido à redução da concentração de células viáveis da biomassa do inoculo às novas condições de fermentação, devido à ocorrência do efeito de diauxia na levedura, que consiste no consumo sequencial de dois substratos, ou seja, após o esgotamento do principal substrato verifica-se uma segunda fase de arranque durante a qual as células se estão a adaptar ao novo substrato, devido à multiplicação simultânea, que causa uma fase de arranque mais curta do que é usual devido às células estarem no mesmo estado fisiológico e devido à sobreavaliação da concentração celular no início da fase estacionária, como consequência de alterações fisiológicas da biomassa (Fonseca & Teixeira, 2007)

7.3.1.2 Produção de Etanol

A maior parte do etanol produzido até ao presente é feito através de fermentações descontínuas (“*batch*”), uma vez que os custos de investimento são mais baixos que os outros tipos de processos, não requerendo um elevado controlo, podendo ser realizadas por trabalhadores não qualificados. O sistema de esterilização e de gestão das matérias-primas são mais fáceis do que nos outros processos. As maiores desvantagens das fermentações tipo “*batch*” são a existência de fenómenos de inibição nas células pelo substrato, pelo produto e por outros metabolitos e também devido a terem uma produtividade mais baixa em relação aos outros tipos de fermentação, em que o substrato é adicionado constantemente ou em determinados intervalos de tempo (“*fed-batch*”) (Çaylak & Sukan, 1998).

II. Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA), pertencente ao Centro de Investigação Marinha e Ambiental (CIMA), da Faculdade de Ciências e Tecnologias (FCT) da Universidade do Algarve (UALG) *Campus Gambelas*.

1. Matérias-primas

As principais-matérias primas utilizadas neste trabalho foram subprodutos agroalimentares, alfarroba e citrinos. A alfarroba foi fornecida na forma de granulado “Kibble”, pela fábrica Victus Industrial Fareense do Algarve (Cooperativa AGRUPA – Cooperativa de Alfarroba e Amêndoa) ao abrigo do contrato de co-promoção entre esta cooperativa e a Universidade do Algarve – Projeto Alfaetílico, financiado pela QREN. Os resíduos citrinos foram fornecidos sob a forma de licor pela LARA – Laranjas do Algarve, Lda, sediada em Silves – Monte da Jóia.

1.1 Preparação da matéria-prima

1.1.1 Alfarroba

De forma a poderem ser utilizados os subprodutos originários da indústria da transformação de alfarroba, tornou-se necessário submeter a mesma a um pré-tratamento com o objetivo de extrair os açúcares fermentáveis para a sua utilização, como fonte de substrato dos diferentes ensaios.

No que respeita à obtenção da polpa de alfarroba na forma de melaço, foi necessário secar toda a água existente na alfarroba na estufa (Binder) a 50°C durante cerca de 1 dia. Após ter evaporado a água contida nas sementes e na casca, submeteu-se a uma trituração (Flama-Pikatti 1705FL – 700Watts) no sentido de ser obtida uma granulometria bastante reduzida, sendo posteriormente lixiviada numa razão de 300 gramas de alfarroba para 1 litro de água destilada, obtendo uma concentração de 0,3% (p/V), à temperatura de 30±1°C na estufa orbital (IKA-KSA4000i), a 150 rpm, durante 60 minutos. Centrifugou-se (Beckman J14-MC – Roto JA-14) o resultado da lixiviação a 12000 rpm, a uma temperatura de 4°C durante aproximadamente 30 minutos. Recolheu-se cuidadosamente o sobrenadante para um frasco de vidro e efetuou-se uma filtração a vácuo (Papel de filtro qualitativo: VWR European Cat.No. 516-0813, size: 75mm, contentes: 100/pk, médium filtration rate perticle retentio: 5-13 µm). Para obter o melaço a uma elevada concentração, utilizou-se o evaporador rotativo (Heidolph 94200 – Biolock Scientific) a 70±1°C.

1.1.2 Licor de citrinos

Como o licor de citrinos, fornecido pela indústria LARA, continha demasiadas partículas em suspensão, tornou-se necessário desenvolver um pré-tratamento, antes de usar o licor como fonte de carbono nos diferentes meios fermentativos.

Para obter um licor de citrinos homogêneo, realizou-se unicamente uma centrifugação (Beckman J14-MC – Rotor JA-14) a 12 000 rpm, temperatura de 4°C durante 30 minutos, obtendo assim um sobrenadante limpo de partículas de citrinos em suspensão. Para obter um licor de citrinos com uma elevada concentração, utilizou-se o evaporador rotativo (Heidolph 94200 – Biolock Scientific) a $70\pm 1^\circ\text{C}$.

1.2 Microrganismo e condições de cultura

1.2.1 Manutenção e utilização de culturas microbianas puras

É fundamental manter num laboratório uma cultura pura para haver uma boa prática a nível microbiológico. A execução eficaz deste método é fundamental por razões de segurança e por razões a nível da qualidade do trabalho experimental a desenvolver. Quando surge uma contaminação em uma cultura, é preferível não utilizar essa placa de cultura, pois existe a possibilidade de não ser capaz de distinguir a cultura contaminada da cultura original, colocando em causa o trabalho a executar. Por isso, sempre que possível, deve-se ter a mesma cultura utilizada no trabalho experimental plaqueada em mais que uma placa de cultura, mantendo o *stock* em condições de assepsia e também deverá ter-se culturas congeladas em alíquotas.

O preparo de culturas microbianas, em particular a inoculação da estirpe ou das estirpes microbianas de interesse para o trabalho, envolvem uma série de procedimentos assépticos que deverão ocorrer em condições apropriadas.

Os meios de cultura sólidos utilizados nas placas de cultura têm como objetivo criar condições para a multiplicação, isolamento, conservação e contagem de colónias dos microrganismos isolados. O isolamento de determinados microrganismos é conseguido com maior rapidez e eficácia se o mesmo for realizado em meios de cultura seletivos e diferenciados.

1.2.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, tolerante a etanol, isolada num laboratório da UALG. A estirpe foi mantida em placas de Petri estéreis, contendo

meio “*Yest Extracte-Peptone-Dextrose*” (YEPD) cuja composição foi 10 g/l de extrato de levedura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de glucose e 15 g/l de agar e incubada a $30\pm 1^\circ\text{C}$ na estufa (Selecta, Espanha), sendo sujeita a repicagens periódicas de modo a manter a sua viabilidade.

1.3 Preparação dos meios de cultura

1.3.1 Meios de cultura de microrganismo

A preparação dos meios de cultura, em particular a inoculação de uma nova estirpe que pretende-se crescer, envolvem uma série de procedimentos assépticos que deverão ocorrer em condições apropriadas. Todo o material deve-se encontrar esterilizado, inclusive os meios de cultura e o local onde se vai desenvolver a inoculação, para poder garantir o máximo de assepsia sem correr o risco de contaminação.

A possibilidade de cultivar um determinado microrganismo em laboratório é essencial para o seu isolamento e caracterização do ponto de vista morfológico, fisiológico, bioquímico ou genético.

Utilizou-se o meio YEPD (Tabela 1.), previamente esterilizado, em todos os procedimentos para culturas em meio sólido. O meio YEPD fornece um excesso de carbono e azoto, assim como de aminoácidos, precursores de nucleóticos, vitaminas e metabolitos essenciais para um ótimo crescimento celular.

Tabela 1 - Meio YEPD, utilizado para crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* F13A em meio sólido.

Substância	Concentração
Extrato de Levedura	5 g/l
Peptona	10 g/l
Glucose	20 g/l
Agar	15 g/l

Após esterilização do meio, distribui-se uniformemente e cuidadosamente em placas de Petri estéreis de plástico (VWR, Portugal). O procedimento foi efetuado em câmara de fluxo laminar, em condições de assepsia.

Antes de proceder à sementeira das placas, estas foram convenientemente marcadas na parte marginal do fundo de modo a conter os seguintes dados: Meio de Cultura; Organismo plaqueado; e Data do plaqueamento.

Efetua-se a esterilização da ansa à chama antes e depois de ser utilizada, devendo ser aquecida até ficar ao rubro para assegurar que todos os esporos são destruídos. Retirou-se uma porção da cultura a isolar e fez-se deslizar a ansa sempre com o cuidado para não danificar a superfície do agar. Espalhou-se a porção de cultura riscando a superfície da placa, passando ansa pela chama entre cada novo riscado.

Incubou-se as placas em posição invertida, durante 2 a 3 dias, na estufa (Selecta, Espanha) a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para realizar a manutenção das estirpes é necessário realizar periodicamente novos inoculos para uma placa de Petri nova.

1.3.2 Preparação dos meios do pré-inoculo e condições de cultura

Os meios de cultura líquidos possibilitam o desenvolvimento de espécies contidas em populações mistas e permitem a realização de estudos de crescimento e nutrição.

Torna-se essencial uma boa esterilização dos meios para garantir o crescimento da levedura, sem contaminações. A esterilização foi realizada por calor húmido na autoclave. Este tipo de esterilização conduz à destruição rápida e segura dos microrganismos por coagulação das proteínas constituintes das suas células, devido á temperatura elevada. A temperatura de funcionamento da autoclave é de $121\pm 1^{\circ}\text{C}$. O tempo de esterilização foi de 50 minutos. Todos os frascos a esterilizar devem ter as tampas de rosca um pouco apertadas e os que não possuem tampas de rosca, devem ser revestidos com papel de alumínio.

Todos os meios líquidos referidos no presente trabalho foram submetidos a esterilização por calor húmido, utilizando a autoclave vertical do laboratório (Uniclave 87, Portugal).

Após esterilização do meio pré-inoculo, através de uma ansa estéril adicionou-se em condições de assepsia a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, proveniente do crescimento em meio sólido descrito anteriormente, em um balão de *Erlenmeyer* de 150 ml contendo 50 ml de meio YEPD (tabela 2.).

A composição do meio YEPD varia na fonte de carbono consoante cada ensaio realizado, ou seja, a fonte de carbono a utilizar em cada meio de pré-inoculo é semelhante á utilizado no meio fermentativo a inocular.

Depois da inoculação do meio pré-inoculo, colocou-se em crescimento numa agitadora orbital (Neifo Pentlad, Portugal) durante aproximadamente 38 horas a uma temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ em uma agitação de 150 rpm.

Tabela 2 - Meio YEPD, utilizado para crescimento em meio líquido.

Substância	Concentração
Extrato de Levedura	5 g/l
Peptona	10 g/l
Fonte de Carbono	150 g/l

1.3.3 Preparação dos meios fermentativos e condições de cultura

Os compostos para cada meio fermentativo foram pesados na balança analítica (Precisa XB 120 A) e o respetivo volume para cada ensaio foi aferido com água destilada. Posteriormente, esterilizaram-se os meios em autoclave, a uma temperatura de $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 50 minutos. Após a esterilização, os meios fermentativos foram retirados da autoclave e inoculados a uma concentração inicial de 1×10^7 células por mililitro de meio. O respetivo volume de inoculação foi determinado através da contagem de células ao microscópio presente no pré-inoculo, utilizando a câmara de *Neubauer*. Posteriormente, consoante o tipo de ensaio, realizou-se a respetiva incubação.

1.4 Amostragem

No decorrer das fermentações foram retiradas amostras para avaliação do crescimento celular, quantificação de substratos e produtos celulares. De modo a minimizar as alterações das condições de cultura, nomeadamente na razão volume de liquido/volume total, o volume da amostra retirada foi o mais reduzido possível.

1.4.1 Ensaio em *Erlenmeyer*

O manuseamento dos balões de *Erlenmeyer* foram efetuados em regime de esterilidade, recorrendo para isso ao uso do bico de bunsen ou da câmara de fluxo laminar (Telstar BioIIA) e de material estéril. Imediatamente antes da inoculação retirou-se amostras de todas os meios fermentativos, que serviram de referência nas análises subsequentes realizadas no espectrofotómetro. Após a inoculação retirou-se amostras de cada *Erlenmeyer*, designando como amostra inicial “t0”, ou seja, amostra do tempo zero, sendo as restantes amostras retiradas em intervalos de tempo planeados.

Na tabela 3. encontra-se representada um exemplo de um plano de amostragens, com o respetivo “t” e posteriormente o respetivo tempo do intervalo da amostra realizada. Os intervalos de tempo entre amostras podem variar ligeiramente, consoante o crescimento celular no meio fermentativo.

Tabela 3 - Exemplo de um plano de amostragem, para fermentações em *Erlenmeyers*.

Amostras com intervalos de 2horas	Amostras com intervalos de 3horas	Amostras com intervalos de 4horas	Amostras com intervalos de 4horas	Amostras com intervalos de 5horas
t0 – 9:00	t24 – 09:00	t48 – 09:00	t72– 09:00	t96 – 09:00
t2 – 11:00	t27 – 12:00	t52 – 13:00	t76 – 13:00	
t4 – 13:00	t30 – 15:00	t56 – 17:00	t80 – 17:00	
t6 – 15:00	t33 – 19:00	t60 – 21:00		
t8 – 17:00	t36 – 21:00			
t10 – 19:00				
t12 – 21:00				
t14 – 23:00				

As amostras foram retiradas com auxílio de micropipetas com pontas estéreis. O volume a retirar da amostra dependeu do estudo a realizar posteriormente. Na tabela 4. encontram-se representados os diferentes volumes das amostras a retirar de cada Erlenmeyer, consoante os diferentes tipos de análises.

Tabela 4 – Volume de amostra a retirar de cada *Erlenmeyer* consoante os diferentes tipos de análises.

	Nº de Réplicas	Volume a retirar (ml)	Análise a realizar
Eppendorf	3*	1,2	Peso Seco; Concentração de Etanol; Concentração de substrato
	1		Congelar a -20°C
Cuvette	1	0,05 **	Densidade Ótica (D.O.)
Tubo de ensaio	1***	0,1	Unidades formadores de colónias (UFCs)

*O número de réplicas dependeu do tipo de análise a ser efetuada consoante a fermentação em causa;

** O volume a retirar para a cuvette vai depender diretamente do tipo de diluição efetuada consoante o resultado da leitura, neste caso iniciou-se com uma diluição de 1:20;

***O número de réplicas dependeu do número de ensaios que estão a ser feitos por fermentação.

As análises efetuadas em todos os ensaios e a todas as réplicas serão descritas posteriormente.

1.4.2 Ensaios em Reator

O manuseamento do reator deve ser realizado junto de um maçarico e com material esterilizado, para garantir um ambiente estéril na zona de trabalho. Antes da inoculação retirou-se amostras do meio fermentativo, que serviram de referência nas análises realizadas no espectrofotómetro. Após a inoculação retirou-se a primeira amostra “t0” sendo as restantes amostras retiradas em intervalos de tempo planeados. O plano de amostragem é idêntico ao descrito no ponto anterior (1.4.1.). Os intervalos de tempo entre amostras podem variar consoante o crescimento celular no meio fermentativo.

A amostra foi retirada para um frasco próprio do reator, sendo de seguida efetuado a repartição consoante cada análise a realizar, junto do bico de bunsen ou na câmara de fluxo laminar (Telstar BioIIA) com auxílio de micropipetas e pontas esterilizadas. O volume a retirar da amostra dependeu do estudo a realizar posteriormente. Na tabela 5. encontram-se representados os diferentes volumes das amostras a retirar, consoante os diferentes tipos de análises.

Tabela 5 - Volume de amostra a retirar consoante os diferentes tipos de análises.

	Nº de Réplicas	Volume a retirar (ml)	Análise a realizar
Falcons	3*	7	Peso Seco; Concentração de Etanol; Concentração de substrato; Kjeldahl
Eppendorf	1	1,2	Congelar a -20°C
Cuvete	1	0,05 **	Densidade Ótica (D.O.)
Tubo de ensaio	1***	0,1	Unidades formadores de colónias (UFCs)

*O número de réplicas dependeu do tipo de análise a ser efetuada consoante a fermentação em causa.

** O volume a retirar para a cuvete vai depender diretamente do tipo de diluição efetuada consoante o resultado da leitura, neste caso iniciou-se por um diluição de 1:20

***O número de réplicas dependeu do número de ensaios que estão a ser feitos por fermentação.

As análises efetuadas em todos os ensaios e a todas as réplicas serão descritas posteriormente.

1.5 Métodos Analíticos

1.5.1 Determinação do crescimento celular

Com o objetivo de monitorizar o crescimento da levedura nos pré-inoculos, foi necessário realizar um dos vários métodos de análise, o qual vai ser descrito de seguida.

1.5.1.1 Contagem de células

Após crescimento do microrganismo nos meios de pré-inoculo, procedeu-se a contagem de células na câmara de *Neubauer* (Blau Brand, Alemanha) (figura 7.).

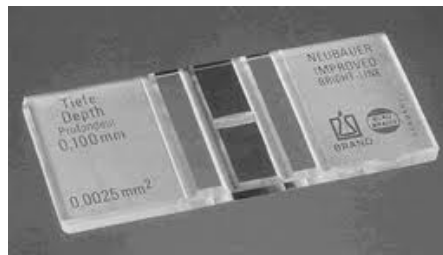


Figura 7 - Câmara de *Neubauer* (Imagem adaptada de Cristina, A. s/d)

Para efetuar a contagem na câmara de *Neubauer* foi necessário efetuar uma diluição de 1:10 da amostra recolhida nos pré-inoculos com água destilada. Após montar a câmara, aplicou-se a amostra cuidadosamente para evitar a formação de bolhas. Realizou-se a contagem das células na câmara inferior e superior, na diagonal da zona central, onde cruzam as linhas da câmara (figura 8.) ou seja, a contagem é feita na diagonal dos quadrados pequenos percorrendo os quadrados grandes na diagonal da câmara.

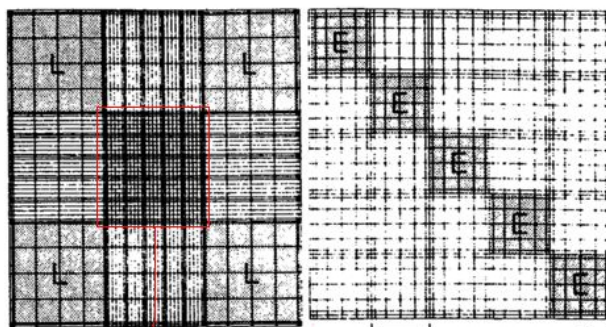


Figura 8 - Na imagem do lado esquerdo, mostra as linhas da câmara de *Neubauer*, na imagem da direita mostra o sentido em que devem ser contadas as células no interior da câmara (Imagem adaptada de Cruz, N. 2010)

Após contagem das células, somou-se o valor obtido em ambas as câmaras, superior e inferior, e aplicou-se na seguinte formula (equação 4), com o objetivo de saber a concentração de células existentes no pré-inoculo em questão.

Equação 4 – Determinação da concentração de células ($g_{células}/ml$)

$$[Células] = \frac{n^{\circ} \text{ de Células}}{80} \times \text{Diluição} \times 4 \times 10^6$$

Sendo:

[Células] = Concentração de células ($g_{células}/ml$);

n° de células = número de células obtidas na contagem na câmara de *Neubauer*;

Diluição = fator de diluição efetuado na amostra antes de aplicar na câmara de *Neubauer*.

Após obter a concentração de células, efetuaram-se os cálculos para saber o volume de pré-inoculo necessário a inocular o meio fermentativo com 1×10^7 células por mililitro.

1.5.2 Determinação do pH

Efetuuou-se a calibração do potenciômetro (Crison pH Meter GPL21, Portugal) na gama de pH onde se encontrava o valor expectável da amostra com soluções tampão de diferentes pH (padrões de calibração de pH 7 e pH 4,01 da Crison, á temperatura de 25°C). Antes de efetuar a leitura do pH, lavou-se o elétrodo com água destilada, secou-se com papel e introduziu-se no ensaio respetivo á leitura. A análise só foi feita em um dos triplicados de cada ensaio fermentativo, para evitar contaminação em todos os *Erlenmeyers*. Após efetuar a medição, procede-se novamente à limpeza do elétrodo com água destilada, sendo de seguida imerso em solução de armazenamento (Crison, Portugal).

A análise do pH só foi efetuada em fermentações com *Erlenmeyers*, visto que os reatores possuíam sensores próprio, que registavam ao longo do tempo o pH do meio fermentativo.

1.5.3 Determinação da concentração de biomassa celular

1.5.3.1 Densidade ótica (D.O.)

A concentração celular de uma cultura microbiana em crescimento foi regularmente estimada por medição da absorvância, através de um espectrofotómetro (Cintra 202 – GBC) com um comprimento de onde de 590 nm. Foram retiradas alíquotas da cultura em crescimento em determinados intervalos de tempo (Tabela 5.). Efetuou-se a leitura utilizado como referência padrão, ou seja, como zero, o meio de cultura isento de inoculo. Inicialmente realizaram-se

diluições na amostra padrão de 1:20. Pós verificar valores de absorvância superiores a 1 foram realizadas diluições na amostra padrão de 1:40.

Foram efetuadas leituras em triplicado de cada amostra retirada, ou seja, em fermentações de *Erlenmeyers* efetuaram-se leituras em triplicado de cada *Erlenmeyer* presente em cada ensaio fermentativo, enquanto que nas fermentações em reator realizaram-se, pelo menos, triplicados de cada amostra retirada.

1.5.3.2 Peso fresco e peso seco

A concentração de biomassa foi também obtida através da quantificação da concentração de biomassa fresca e seca.

Nos ensaios realizados em *Erlenmeyers*, pipetou-se 1,5 ml de amostra para *ependorfs* previamente secos e pesados (Precisa XB 120A). A amostra foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5415D) a 13000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi retirado para doseamento de monossacáridos e produtos resultantes do metabolismo microbiano. Uma nova centrifugação foi feita durante 1 minuto, para eliminar qualquer vestígio de meio que pudesse existir nas paredes do *Eppendorf*. Descartou-se o sobrenadante existente e pesaram-se os *ependorfs*, obtendo assim o peso fresco da biomassa celular. Para a determinação do peso seco, os *ependorfs* foram colocados a secar na estufa (Binder) durante 48 horas a $50\pm 1^\circ\text{C}$ e só depois pesados, obtendo assim o peso seco da biomassa celular.

Em cada fermentação realizada em *Erlenmeyer*, as determinações dos pesos frescos e pesos secos foram realizadas em pelo menos duplicado, por cada amostra.

Nos ensaios realizados em reator biológico, as condições para a determinação destes parâmetros foram diferentes. Foram pipetados 7 ml de amostra para *Falcons* de 15 ml previamente secos e pesados (Precisa XB 120A). Todos os passos seguintes foram semelhantes aos anteriormente enunciados, à exceção das condições de centrifugação. As amostras foram centrifugadas (Hettich Zentrifugen – Universal 320) a 5000 rpm durante 10 minutos.

Para cada fermentação em reator as determinações dos pesos frescos e pesos secos foram realizadas em pelo menos duplicado, por cada amostra.

1.5.4 Quantificação de açúcar e de etanol por HPLC

O poder de resolução de todas as técnicas de cromatografia por coluna podem ser substancialmente melhoradas através da utilização de uma técnica chamada de *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), que é um método de cromatografia de coluna muito utilizado em bioquímica e em química analítica, a nível de identificação de proteínas e de compostos químicos. Os materiais da coluna são finamente divididos, havendo locais de interação mais forte e assim um maior poder de resolução. (Aparecida et al., 2006).

A concentração de açúcares (sacarose, frutose e glucose) e de etanol foram determinadas em um HPLC *Elite LaChrom Hitachi*, que possui uma bomba de duplo pistão L2130, injetor automático L-2200 e um detetor de índice de refração L-2490.

As amostras para estudo foram previamente centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos (Centrifuga 5415D – Eppendorf), sendo de seguida filtrado o sobrenadante com filtros de 0,22 µm de diâmetro da *Milipore*, para um *vial*. Os monossacáridos e produtos derivados do metabolismo microbiano, foram analisados em diferentes colunas utilizando eluente específico para cada (tabela 6.).

Tabela 6 - Tipos de colunas usadas nas diferentes fermentações.

Marca da coluna	Tamanho da coluna	Eluente	Fluxo de trabalho (ml/min)	Temperatura de trabalho da coluna (°C)	Temperatura de trabalho do eluente (°C)
Merck - Polyspher OA HY *	6,5 X 300 mm	0,001M H ₂ SO ₄	0,5	75	Ambiente
Waters Sugar-pak 1 **	6,5 X 300 mm	H ₂ O	0,6	83	80

*Só foi realizada a medição de Etanol, devido á coluna não estar nas melhores condições.

**Foi realizado a medição de Etanol, Sacarose, Frutose e Glucose.

A água bidestilada utilizada como eluente sofre um processo de filtração por filtros de 0,22 µm de diâmetro da *Milipore* e um processo de sonicação (Ultrason - Salecta) durante 30 min.

Em cada ensaio fermentativo foram feitos padrões dos compostos a identificar no HPLC, para poder obter os tempos de retenção dos picos referentes a cada analíto e para poder obter a concentração do composto pretendido.

1.5.4.1 Curvas padrões

As curvas padrões são obtidas através da análise de amostras com concentrações conhecidas, para obter os tempos de retenção e as áreas de cada composto. Para tal realiza-se várias soluções padrão com as seguintes concentrações:

Tabela 7 – Soluções padrão com as respectivas concentrações

	Etanol	Glucose	Sacarose	Frutose
Concentração (g/l)	5	5	5	5
	30	10	20	10
	60	20	50	20
	90	30	80	30
	110	40	110	40

Sabendo as áreas obtidas em cada concentração analisada foi possível elaborar um gráfico de concentração em função da área do pico de retenção de cada composto. Através de uma regressão linear simples, em cada gráfico, foi possível obter o valor do declive da reta (m) e uma constante (b).

Após saber a área de cada composto obtido nas amostras lidas (valor de Y), fez-se uma interceção á reta de regressão e obteve-se a concentração do composto em análise (valor de X).

1.5.5 Quantificação de açúcares por refractómetro

Refractómetro é um instrumento ótico utilizado para medir o índice de refração de uma substância translúcida. O aparelho faz uso do princípio do ângulo crítico. A luz que passa através do meio, sofrendo uma mudança de ângulo de incidência, que medido revela características próprias da amostra. Pode ser utilizado para determinar a concentração de substâncias dissolvidas em outras, ou também determinar a pureza de uma determinada substância. O uso mais comum é determinar a concentração de açúcares totais em uma amostra, também conhecido por índice de Brix.

Após efetuar a calibração do refractómetro com água, colocou-se a amostra previamente centrifugada a 13000 rpm durante 10 minutos, na superfície do prisma e procedeu-se à leitura.

Aguardou-se alguns segundos e o dispositivo apresentou o valor com índice Brix, onde um grau Brix corresponde a uma grama de açúcar sacarose em 100 g de solução. Após retirar a amostra analisada, procedeu-se á lavagem da superfície do prisma com água, antes de realizar uma nova leitura.

O refractómetro foi utilizado para determinar os açúcares totais das diferentes fonte de carbono no preparo de todos os meios fermentativos e também foi utilizado para medir os açúcares totais presentes em todas as amostras recolhidas em algumas fermentações realizadas em *Erlenmeyers*.

1.5.6 Unidades Formadores de Colônias (UFCs)

A técnica de diluição seriada torna-se útil quando se deseja saber quantas UFCs existem em uma amostra. Esta técnica foi aplicada para determinar a viabilidade das células e verificar indiretamente o nível de crescimento das mesmas, consoante o número de colônias formadas nas diferentes diluições.

Transferiu-se alíquotas de 0,1ml de amostra para um tubo de ensaio contendo 9,9 ml de uma solução tampão fosfato 0,1M a pH 7.0, obtendo assim a primeira diluição (10^{-1}). A partir da diluição inicial, efetuou-se as seguintes diluições no mesmo tipo de solução tampão fosfato 0,1M a pH 7.0, obtendo assim as seguintes diluições 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ml. Após efetuar as diluições seriadas, transferiu-se 20 μ l de cada para placas de *Petri* contendo meio YEPD. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Incuberm - Raypa) no mínimo 48 horas á temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após retirar as placas de *Petri* da estufa, realizou-se a contagem das colônias formadas em cada diluição e determinou-se a concentração de células efetuando o seguinte cálculo (equação 5).

Equação 5 – Concentração de células obtidas por UFCs ($\text{g}_{\text{células}}/\text{ml}$)

$$\left[\begin{array}{l} \text{Concentração} \\ \text{de Células} \end{array} \right] = N^{\circ} \text{ de células} \times \text{Diluição} \times \frac{1}{V \text{ inóculado}}$$

Sendo:

[Concentração de Células] = Concentração de Células em uma determinada concentração (UFCs/ml);

Nº de células = Número de células contadas em uma determinada concentração;

Diluição = Factor de diluição efetuado;

V inóculado = Volume da amostra inóculado na placa de *Petri* (ml).

1.5.7 Determinação do azoto total (Método de *Kjeldahl*)

O termo “*Kjeldahl*” refere-se à combinação de amónia e azoto orgânico. O método de determinação de *Kjeldahl* foi desenvolvido em 1883 por *Johan Kjeldahl*, e tornou-se um método de referência para determinação de azoto. O método consiste de uma completa digestão das amostras em ácido sulfúrico concentrado na presença de catalisadores tais como sais de cobre e titânio a altas temperaturas (Aparecida et al., 2006). Os compostos orgânicos na presença de ácido sulfúrico, convertem o azoto quantitativamente, em sulfato de amónio (Esteves, E.G., 2006). Este por ação de uma solução concentrada de soda cáustica liberta amoníaco que é fixado num soluto de ácido de título conhecido. Por titulação com soluto de título conhecido e na presença de um indicador determina-se a quantidade de amoníaco e consequentemente a quantidade de azoto contida na amostra (Aparecida et al., 2006; Esteves, E.G., 2006).

Introduziu-se a amostra em um tubo de *Kjeldahl* de forma a que não fique material aderido ao tubo. Adicionou-se a cada amostra uma pequena porção de catalisador e 25 ml de ácido sulfúrico concentrado. De seguida colocou-se os tubos na bateria de digestão aumentando gradualmente a temperatura até 400°C, terminando a digestão quando se verificou que a solução ficou incolor. Transferiu-se a amostra para o aparelho de destilação. No tubo de saída do aparelho de destilação pró-nitro colocou-se um balão *Erlenmeyer* de 250 ml contendo 10 ml de ácido bórico e 3 gotas de indicador misto, iniciando assim a destilação. A quantidade de NaOH a 35% a adicionar ao tubo de *Kjeldahl* deve ser suficiente para neutralizar o excesso de ácido contido na amostra. A destilação termina após a viragem do indicador de rosa para azul correspondendo a um volume total de destilado de 100 ml. Titulou-se o destilado do balão *Erlenmeyer*, com HCl 0,01M até que o indicador virou para rosa, registando-se o volume de HCl gasto.

Para obter a percentagem de azoto contida na amostra, foi necessário efetuar o seguinte calculo utilizando a equação 6.

Equação 6 - Percentagem de azoto (%)

$$\% N = \frac{V \times f \times 0,014}{P} \times 100$$

Sendo:

V = Volume de HCl gasto na titulação (ml);

f = Título do HCl (mol/ml);

P = Peso da amostra (g);

0,014 = Valor (g) de N que reage com 1 ml de HCl 1N (g/mol).

1.5.7.1 Padronização da solução de HCl

Uma solução é uma mistura homogênea de duas ou mais substâncias, ou seja, corresponde ao estado em que as substâncias estão subdivididas de modo que as partículas estejam em dimensões moleculares, atômicas ou iônicas, nos quais correspondem á natureza das substâncias.

Quando um reagente não se encontram na sua forma mais pura, como é no caso da maior parte dos hidróxidos alcalinos e de alguns ácidos inorgânicos, é necessário preparar inicialmente soluções que tenham aproximadamente a molaridade desejada. Para determinar com exatidão a concentração da solução preparada torna-se necessário padronizar as soluções por processos de titulação contra uma solução de uma substância pura, de concentração conhecida com exatidão.

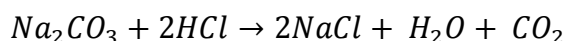
Conhecendo a estequiometria da reação, os volumes das soluções utilizadas e uma das concentrações, foi possível determinar uma outra concentração através da adição do titulante, parando quando os reagentes apresentarem proporções estequiometrias, ou seja, no ponto de equivalência, que geralmente é identificado pela adição de um indicador (Nunes et al., 2009).

Colocou-se aproximadamente 1 g de Na₂CO₃ a secar na mufla a 300°C durante 1 hora. Após arrefecimento no exsiccador, transferiu-se de 0,1500 a 0,1800 g de Na₂CO₃ seco para um

Erlenmeyer de 250 ml. Dissolveu-se o mesmo com 25 ml de água destilada e adicionou-se 2 a 3 gotas de indicador verde de bromocresol. Após lavagem da bureta electrónica com a solução de HCl preparada, efetua-se a titulação da solução de Na₂CO₃ até ao ponto de equivalência. Registou-se o volume utilizado da solução de HCl. Aqueceu-se a solução titulada até ao ponto de ebulição registando a cor que a mesma tomou. Se a mesma apresentar uma coloração azul, significa que houve excesso de HCl, caso contrário procede-se ao arrefecimento da solução em água corrente até à temperatura ambiente e volta-se a titular até á viragem do indicador utilizado para verde pálido. Registando-se o valor de HCl utilizado. Caso a solução fique com uma coloração amarela significa que houve excesso de ácido.

Sabendo que a relação estequiométrica entre o Na₂CO₃ e o HCl é dada pela seguinte equação 7:

Equação 7 – relação estequiométrica entre o Na₂CO₃ e o HCl



No ponto final de titulação obtém-se a seguinte relação 8:

Equação 8 – Relação molar no ponto final de titulação do Na₂CO₃ e o HCl

$$n_{\text{HCl}} = 2n_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$$

Através do volume de HCl utilizado foi possível calcular a concentração do ácido pela seguinte equação 9:

Equação 9 – Determinação da concentração molar de HCl utilizado (mol/ml).

$$C_{\text{HCl}} = \frac{n_{\text{HCl}}}{V_{\text{HCl}}}$$

Sendo:

C_{HCl} = Concentração molar de HCl utilizado (mol/ml)

n_{HCl} = Número de moles de HCl (mol)

V_{HCl} = Volume de HCl utilizado (ml)

1.6 Ensaios de Crescimento

Todos os ensaios realizados continham meios baseados na composição do meio YEPD (Tabela 8.), efetuando a variação da fonte de carbono consoante os diferentes ensaios realizados.

Tabela 8 - Composição das fontes de azoto presentes nos meios de fermentação e nos pré-inoculos.

Substância	Concentração (g/l) Meios de pré-inoculo	Concentração (g/l) Meios de Fermentação
Peptona	10	5
Extrato de levedura	5	3

1.6.1 Ensaios realizados em *Erlenmeyer*

1.6.1.1 Diferentes fontes de carbono

Realizaram-se três ensaios de modo a estudar os efeitos das diferentes fontes de carbono no crescimento da levedura e produção de etanol. Um ensaio com uma razão entre glucose (25%), frutose (25%) e sacarose (50%), denominado “Mix”, um outro com extrato de alfarroba e um com licor de citrinos. Os ensaios foram realizados em *Erlenmeyers* de 250 ml, em triplicado, apresentando as seguintes concentrações representadas na tabela 9. Após efetuar a esterilização dos meios, efetuou-se a transferência do meio fermentativo contendo licor de citrinos para um novo *Erlenmeyer* esterilizado junto á chama, para evitar a presença de precipitado, resultante da esterilização do licor, nos meios fermentativos. Todos os *Erlenmeyers* foram inoculados a uma concentração de células inicial de 1×10^7 UFCs/ml e incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ com agitação orbital de 150 rpm (IKA-KSA4000i). Foram recolhidas amostras (tabela 4.) nos intervalos de tempo apresentados na tabela 3.

Tabela 9 - Caracterização dos ensaios realizados em *Erlenmeyers* com uma razão de glucose, frutose e sacarose (“Mix”), extrato de alfarroba e licor de citrinos como fonte de carbono.

Fonte de carbono	Volume final de meio (ml)	Concentração final de açúcares totais (g/l)	Fonte de azoto e sais minerais
50% Sacarose, 25% Frutose e 25% Glucose	150	120	Extrato de Levedura e Peptona
Extrato de alfarroba		240	
Licor de citrinos		130	

A concentração final de açúcar para o licor de citrinos foi escolhida consoante a concentração do licor presente no laboratório. A concentração do meio “mix” foi escolhida para comparação com a do licor de citrinos testada. A concentração do meio com extrato de alfarroba a 240g/l, foi característico de estudos anteriormente realizados no laboratório, que representa a concentração máxima de substrato, na qual a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A apresentou melhores rendimentos de etanol.

1.6.1.2 Diferentes concentrações de licor de citrinos

Foram realizados quatro ensaios de diferentes concentrações de licor de citrinos como fonte de carbono, para estudar o crescimento da levedura e produção de etanol. Os ensaios foram realizados em *Erlenmeyers* de 250 ml, em triplicado, apresentando as seguintes concentrações representadas na tabela 10. As condições e parâmetros estudados foram semelhantes às descritas no ponto 1.6.1.1. Os *Erlenmeyers* contendo extrato de levedura, peptona e água destilada foram esterilizados sem o licor de citrinos, sendo o mesmo esterilizado à parte, devido á sua precipitação, e só posteriormente adicionado cuidadosamente o respetivo volume de licor para perfazer a concentração final desejada, na câmara de fluxo laminar.

Tabela 10 - Caracterização dos ensaios realizados em *Erlenmeyers* com diferentes concentrações de licor de citrinos como fonte de carbono.

Fonte de carbono	Volume final de meio (ml)	Concentração final de açúcares totais (g/l)	Fonte de azoto e sais minerais
Licor de citrinos	150	130	Extrato de levedura e peptona
		180	
		330	

1.6.1.3 Diferentes rácios entre extrato de alfarroba e licor de citrinos

Foram estudados os diferentes efeitos da mistura de dois subprodutos da indústria agroalimentar, licor de citrinos e extrato de alfarroba. Foram testados diferentes rácios, representados na tabela 11., tendo em consideração uma concentração final de açúcares total de 250 g/l.

Tabela 11 - Rácios entre extrato de alfarroba e licor de citrinos realizados em ensaios de *Erlenmeyers*.

Nome	Extrato de alfarroba	Licor de citrinos
Extrato de alfarroba 33% e licor de citrinos 67%	82,5 g/l	167,5 g/l
Extrato de alfarroba 50% e licor de citrinos 50%	125 g/l	125 g/l
Extrato de alfarroba 67% e licor de citrinos 33%	167,5 g/l	82,5 g/l

Os ensaios foram realizados em *Erlenmeyers* de 250 ml em triplicado, apresentando as seguintes características representadas na tabela 12.

Tabela 12 - Caracterização dos ensaios realizados em *Erlenmeyers* com diferentes rácios de extrato de alfarroba e licor de citrinos.

Fonte de carbono	Volume final de meio (ml)	Concentração final de açúcares totais (g/l)	Fonte de azoto e sais minerais
Extrato de alfarroba 33% e licor de citrinos 67%	150	250	Extrato de Levedura e Peptona
Extrato de alfarroba 50% e licor de citrinos 50%			
Extrato de alfarroba 67% e licor de citrinos 33%			

Utilizou-se uma concentração de substrato de 250 g/l, devido aos resultados obtidos anteriormente no laboratório com o uso de extrato de alfarroba e para fins comparativos em análises posteriores no capítulo de resultados e discussão.

As condições de parâmetros estudados nestes ensaios foram semelhantes às descritas nos pontos anteriores 1.6.1.1.. Efetuou-se novamente a transferência dos meios para novos *Erlenmeyers*, após esterilização, devido à precipitação do licor de citrinos.

1.6.1.4 Licor de citrinos sem D-Limoneno

Para verificar o efeito do composto aromático D-Limoneno no crescimento da levedura e produção de etanol, resolveu-se efetuar uma destilação a vapor do licor de citrinos para extrair o composto aromático.

1.6.1.4.1 Extração do D-limoneno por destilação a vapor

A destilação a vapor é utilizada para isolar substâncias que se decompõem nas proximidades dos seus pontos de ebulição e que são insolúveis em água ou nos seus vapores de arraste. A

destilação em corrente de vapor oferece, ainda, a grande vantagem da seletividade porque algumas substâncias são arrastadas com o vapor e outras não, além daquelas que são arrastadas tão lentamente que permitem a realização de boas separações através desta técnica. Através da utilização do vapor de água para fazer o arraste, à pressão atmosférica, o resultado será uma separação do componente de ponto de ebulição mais alto, a uma temperatura inferior a 100°C.

Colocou-se cerca de 30ml de licor de citrinos em um balão de fundo redondo de 250 ml. Montou-se o sistema de destilação a vapor (figura 9.) e procedeu-se à destilação até que todo o material orgânico, tenha destilado, ou seja, até que destile somente água. Para assegurar que o destilado apresentava uma única fase, efetuou-se a recolha do mesmo para um Erlenmeyer, que de seguida foi colocado em ampolas de decantação, para se verificar a existência de duas fases contidas no destilado. Adicionou-se 30 ml de n-Hexano em cada ampola de decantação. Agitou-se a ampola e deixou-se repousar durante a noite, com o objetivo de verificar a miscibilidade entre o composto aromático (D-limoneno) e a água.

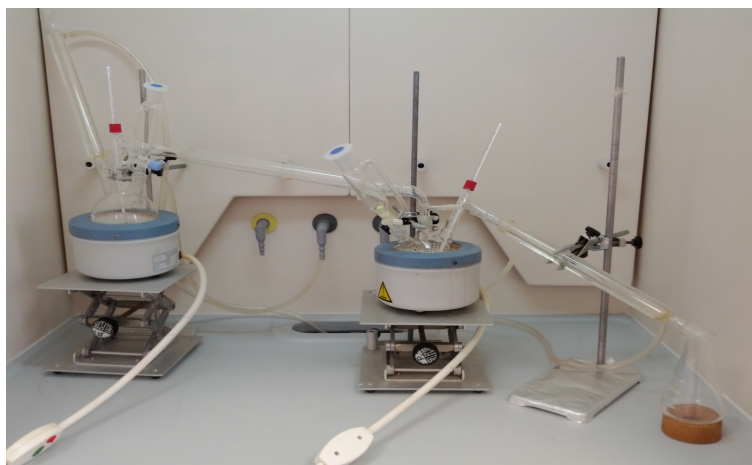


Figura 9 - Sistema de destilação a vapor.

Após extração do D-Limoneno realizou-se um ensaio em *Erlenmeyer* de 250ml, em triplicado, com o seguinte rácio representado na tabela 13., e as seguintes características representadas na tabela 14.

Tabela 13 - Rácio selecionados entre extrato de alfarroba e licor de citrinos realizado em ensaio de *Erlenmeyer*.

Nome	Extrato de alfarroba	Licor de Citrinos sem D-limoneno
Extrato de alfarroba 50% e licor de citrinos 50%	125 g/l	125 g/l

O cálculo das concentrações do rácio foram efetuadas tendo em consideração a concentração final de açúcares totais de 250 g/l.

Tabela 14 - Caracterização do ensaio realizado em *Erlenmeyer* com o rácio de extrato de alfarroba e licor de citrinos.

Fonte de carbono	Volume final de meio (ml)	Concentração final de açúcares totais (g/l)	Fonte de azoto e sais minerais
Extrato de alfarroba 50% e licor de citrinos 50%	150	250	Extrato de Levedura e Peptona

As condições de parâmetros estudados no ensaio realizado foram semelhantes às descritas nos pontos anteriores, incluindo a transferência dos meios para novos *Erlenmeyers*, após esterilização.

1.6.1.5 Diferentes fontes de azoto

Para avaliar o efeito de diferentes fontes de azoto na levedura, realizou-se um ensaio comparativo entre diferentes concentrações de ureia e meio YEPD. A fonte de carbono utilizada foi extrato de alfarroba a uma concentração final de 250 g/l. Os ensaios foram realizados em *Erlenmeyers* de 250 ml em triplicado, apresentando as seguintes concentrações representadas na tabela 15.

Tabela 15 - Caracterização dos ensaios realizados em *Erlenmeyers* com diferentes fontes de azoto.

Fonte de carbono	Volume final de meio (ml)	Concentração final de açúcares totais (g/l)	Fonte de azoto e sais minerais
Extrato de alfarroba	150	250	Ureia (Concentração de 1,5 g/l)
			Ureia (Concentração de 3 g/l)
			Extrato de levedura (3 g/l) e Peptona (5 g/l)

As condições de parâmetros estudados no ensaio realizado foram semelhantes às descritas nos pontos anteriores.

1.6.2 Ensaios realizados em Reator Biológico

Após ter visto que a estirpe de levedura em estudo, cresceu nos diferentes rácios estudados em *Erlenmeyers* (tabela 11.), selecionou-se o rácio que continha 33% de extrato de alfarroba (82,5 g/l) com 67% de licor de citrinos (167,5 g/l), como a melhor combinação entre as duas fontes de carbono para o crescimento da levedura e conseqüentemente, para a produção dos produtos resultantes do seu metabolismo (A justificação encontrar-se-á mais fundamentada no III capítulo dos Resultados e discussão).

1.6.2.1 Rácio 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos

O rácio selecionado foi realizado num biorreator mecanicamente agitado (BioBundle System, Applikon Biotechnology) com um volume total de 3 litros e um volume útil de 2,4 litros. A agitação foi feita utilizando uma turbina de *Rushton* com seis pás verticais e o arejamento foi efetuado por um dispersor em L perfurado na base. Com o objetivo de se minimizarem as perdas por evaporação no vaso do reator, utilizou-se dois condensadores ligados a uma corrente de água fria.

Calibrou-se a sonda de pH através das soluções padrões (padrões de calibração de pH 7 e pH 4,01 da Crison, à temperatura de 25°C), antes de introduzir a mesma no reator.

Realizou-se a esterilização do extrato de alfarroba no interior do reator e a esterilização do licor de citrinos, previamente centrifugados durante 30 minutos a 12000 rpm à temperatura de 4°C, foi realizada em um *Erlenmeyer* de 2 litros. Após esterilização efetuou-se a passagem do licor de citrinos, cuidadosamente evitando a passagem do precipitado, para o interior do vaso

do reator na câmara de fluxo laminar (Telstar BioIIA). Adicionou-se 1,5 ml de anti-espuma (Sigma A-5757) após a junção dos dois substratos, para diminuir a formação da espuma resultante da adição do licor de citrinos.

A sonda de O₂ foi calibrada em dois pontos, 100% e 0% de saturação, após esterilização do sistema e arrefecimento do reator. A calibração dos 100% consistiu no arejamento do meio até à sua saturação, ou seja, até se verificar a estabilização da percentagem de O₂. A calibração do 0% foi efetuado através da remoção de todo o O₂ presente no meio, pela adição de N₂ na sua forma gasosa.

A monitorização da temperatura de fermentação foi efetuada com uma sonda de temperatura. A temperatura de fermentação foi mantida estável através da utilização de uma manta de aquecimento.

Todas as variáveis foram monitorizadas e controladas através dos controladores *Bio Controller ADI 1010*, *Bio Console ADI 1025* e os dados foram adquiridos pelo software *BioXpert Lite Applikon Biotechnology*, versão 2.1.

As características do ensaio realizado em reator encontram-se descritas na tabela 16.

Tabela 16 - Caracterização do ensaio realizados em reator com o rácio 33:67 de extrato de alfarroba e licor de citrino.

Fonte de carbono	Volume final de meio (l)	Concentração final de açúcares totais (g/l)	Fonte de azoto e sais minerais
Extrato de alfarroba 33% e licor de citrinos 67%	2,4	250	Extrato de Levedura e Peptona

O reator foi inóculado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A a uma concentração de células inicial de 1×10^7 UFCs/ml.

O ensaio em reator foi executado a uma temperatura e 30 ± 1 °C, com uma agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 l/h (0,13vvm).

Foram recolhidas amostras consoante a tabela 5. nos intervalos de tempo apresentados na tabela 3.

1.6.3 Ensaio realizados na Unidade Piloto

1.6.3.1 Glucose como fonte de carbono

De modo a estudar o efeito da Glucose como única fonte de carbono no crescimento da levedura e produção de etanol, realizou-se um ensaio na unidade piloto (UPi) com volume total de 20 litros a um volume útil de 15 litros. O meio fermentativo apresentou uma concentração final de glucose de 250 g/l. As características do ensaio realizado encontram-se descritas na tabela 17.

Tabela 17 - Caracterização do ensaio realizados em Unidade piloto com glucose.

Fonte de carbono	Volume final de meio (l)	Concentração final de açúcares totais (g/l)	Fonte de azoto e sais minerais
Glucose	15	250	Extrato de Levedura e Peptona

A esterilização do selo duplo mecânico e da válvula de saída do reator (Bottom Drain Valve) foram efetuadas em separado, enquanto que a esterilização do vaso de cultura foi efetuada automaticamente e em modo sequencial, pelo próprio programa da UPi.

Após efetuar-se a esterilização, inoculou-se o meio fermentativo, com a ajuda de um maçarico, a uma concentração inicial de células de 1×10^7 UFCs/ml.

A agitação foi feita por três turbinas de *Rushton* com seis lâminas a 250 rpm. O aquecimento foi realizado por uma camisa de aquecimento a uma temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. O arejamento foi proporcionado por um dispersor em L que debitou cerca 0,3 l/h (0,13vvm).

Foram recolhidas amostras consoante a tabela 5. nos intervalos de tempo apresentados na tabela 3.

1.7 Caracterização da cinética de crescimento

Em todas as fermentações foram feitos cálculos à posteriori de rendimentos, taxa de produtividade, taxas específicas de crescimento celular, taxa específica de conversão dos açúcares e concentração de substrato consumido e fermentado.

1.7.1 Taxa específica de crescimento máximo e concentração de biomassa máxima

A taxa específica de crescimento máximo, μ_{Max} e a biomassa máxima, X_{Max} , foram determinadas através do programa **DMFit modelling Tool** (<http://modelling.combase.cc>), que

consiste em uma aplicação *on-line* do logaritmo da concentração celular obtida através do peso seco em função do tempo de fermentação.

1.7.2 Rendimento de biomassa em função do substrato consumido

O rendimento de biomassa/substrato, $Y_{x/s}$, fornece uma relação linear entre a quantidade de biomassa, X , produzida e a quantidade de substrato, S , consumido. O $Y_{x/s}$ foi determinado pela seguinte equação:

Equação 10 – Rendimento de biomassa em função do substrato consumido ($g_{\text{biomassa}}/g_{\text{Substrato}}$)

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{(-\Delta S)} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)}$$

Sendo:

ΔX - Diferença entre a concentração de biomassa final (X_f) e a concentração de biomassa inicial (X_i);

$(-\Delta S)$ – Diferença entre a concentração de substrato inicial (S_i) e a concentração de substrato final (S_f).

1.7.3 Rendimento de biomassa em função do etanol produzido

O rendimento de biomassa/etanol, $Y_{X/E}$, fornece uma relação linear entre a quantidade de biomassa, X , produzida e a quantidade de etanol também produzido, E . O $Y_{X/E}$ foi determinado pela seguinte equação:

Equação 11 – Rendimento de biomassa em função do etanol produzido ($g_{\text{biomassa}}/g_{\text{etanol}}$).

$$Y_{X/E} = \frac{\Delta X}{(-\Delta E)} = \frac{(X_f - X_i)}{(E_i - E_f)}$$

Sendo:

ΔX - Diferença entre a concentração de biomassa final (X_f) e a concentração de biomassa inicial (X_i);

$(-\Delta E)$ – Diferença entre a concentração de etanol inicial (E_i) e a concentração de etanol final (E_f).

1.7.4 Rendimento de etanol em função do substrato consumido

O rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$) fornece uma relação linear entre a quantidade de etanol (E) produzido e a quantidade de substrato (S) consumido. O $Y_{E/S}$ foi determinado pela seguinte equação:

Equação 12 – Rendimento de etanol em função do substrato consumido ($g_{\text{etanol}}/g_{\text{substrato}}$).

$$Y_{E/S} = \frac{\Delta E}{(-\Delta S)} = \frac{(E_f - E_i)}{(S_i - S_f)}$$

Sendo:

ΔE - Diferença entre a concentração de etanol final (E_f) e a concentração de etanol inicial (E_i);

$(-\Delta S)$ – Diferença entre a concentração de substrato inicial (S_i) e a concentração de substrato final (S_f).

1.7.5 Produtividade máxima de etanol

A produtividade máxima de etanol, P_{Max} , foi determinada pela seguinte equação:

Equação 13 – Produtividade máxima de etanol ($g_{\text{etanol}}/l \cdot h^{-1}$).

$$P_{Max} = \frac{E_{Max}}{t}$$

Sendo:

E_{Max} – Concentração máxima de etanol produzida (g/l);

t – Tempo de fermentação (h).

1.7.6 Taxa específica de produção de etanol

A taxa específica de produção de etanol, qE , expressa a quantidade de etanol produzido por unidade de biomassa e por tempo de fermentação. O qE foi determinada da seguinte maneira:

Equação 14 – Taxa específica de produção de etanol ($g_{\text{etanol}}/g_{\text{biomassa}} \cdot h$).

$$qE = \frac{\left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)}{X}$$

Sendo:

ΔE – Diferença entre a concentração de etanol final (E_f) e a concentração de etanol inicial (E_i);

Δt – Diferença entre o tempo final (t_f) e o tempo inicial (t_i);

X – Concentração de biomassa.

1.7.7 Taxa específica de consumo do substrato

A taxa específica de consumo do substrato, q_S , expressa a quantidade de etanol produzido por unidade de biomassa e por tempo de fermentação (h). O q_S foi determinado da seguinte maneira:

Equação 15 – Taxa específica de consumo do substrato ($\text{g}_{\text{Substrato}}/\text{g}_{\text{biomassa}} \text{ h}$).

$$q_S = \frac{\left(\frac{\Delta S}{\Delta t}\right)}{X}$$

Sendo:

ΔS – Diferença entre a concentração de substrato final (S_f) e a concentração de substrato inicial (S_i);

Δt – Diferença entre o tempo final (t_f) e o tempo inicial (t_i);

X – Concentração de biomassa.

1.7.8. Concentração de substrato consumido

A concentração molar de substrato consumido, S_c , foi determinada pela razão entre a concentração de substrato total inicial (S_i) e a concentração substrato final (S_f). O cálculo foi realizado da seguinte maneira:

Equação 16 – Concentração de substrato consumido (M).

$$S_c = \frac{S_i}{S_f}$$

Sendo:

S_i – Concentração de substrato inicial (mol/l);

S_f – Concentração de substrato final (mol/l).

1.7.9. Concentração de substrato fermentado

Segundo a equação da estequiometria da fermentação alcoólica, por cada mol de glucose consumida são produzidas 2 moles de etanol. Assim sendo, a concentração de substrato fermentado alcoolicamente foi determinada da seguinte maneira:

Equação 17 – Concentração substrato fermentado alcoolicamente (M).

$$S_F = \frac{E}{2}$$

Sendo:

E – Concentração de etanol (mol/l);

1.7.10 Percentagem de açúcares consumidos

A percentagem de açúcares consumidos ($T_{A\zeta UC}$) corresponde à percentagem de açúcares totais que foram consumidos pela levedura para produção dos seus metabolitos. A $T_{A\zeta UC}$ foi determinada pela seguinte equação:

Equação 18 – Percentagem de açúcares consumidos (%)

$$T_{A\zeta UC} = \frac{S_C}{S_i} \times 100$$

Sendo:

S_C – Concentração de açúcares consumidos (g/l);

S_i – Concentração de açúcares inicial (g/l).

1.7.11 Análise estatística

Os dados obtidos e calculados em cada ensaio, foram sujeitos a análise estatística usando a opção de análise de dados no *Microsoft Office Excel 2013 Preview* para *Windows 7 Ultimate*.

Os resultados dos ensaios de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A foram submetidos a análise de variância e separação de médias usando o *Student-Newman-Keuls* (S-N-K) *test* ($P < 0,05$) no software *SigmaPlot* (versão 12 para *Windows*).

III. Resultados e Discussão

1. Fermentação em sistema descontínuo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em diferentes fontes de carbono para a produção de etanol, em *Erlenmeyer*.

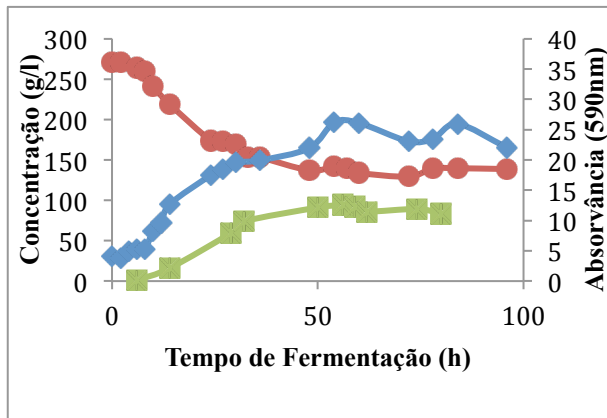
Inicialmente realizaram-se estudos em *Erlenmeyers* com o intuito de monitorizar o crescimento da levedura e produção de etanol em diferentes fontes de carbono. Para isso realizaram-se três ensaios em *Erlenmeyers*. Duas das fontes de carbono utilizadas neste ensaio, foram estudadas anteriormente por Lima-Costa., et al (2012) e por Maia (2011). Lima-Costa., et al (2012) estudou a cinética de consumo de açúcares e de inibição de etanol na fermentação de polpa de alfarroba, enquanto que Maia (2011) estudou a utilização de licor de citrinos como fonte de carbono na produção de um agente de controlo biológico.

Após revisão de ambas as literaturas, concluiu-se que tanto o extrato de alfarroba como o de licor de citrinos apresentam características propícias ao desenvolvimento da leveduras e produção de etanol. Lima-Costa., et al (2012) deduziram que os resíduos da indústria de processamento de alfarroba são um potencial recurso para a produção de segunda geração de bioetanol através da utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A. Os mesmos obterão valores de etanol na ordem dos 130 g_{etanol}/l, em fermentações utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono, em modo de produção semi-contínuo. Maia (2011) verificou no seu estudo a capacidade da levedura *Penicillium expansum*, em usar os açúcares presentes no licor de citrinos como fonte de carbono, obtendo assim grandes produções de biomassa, com um rendimento na ordem dos 0,449 g_{biomassa}/g_{substrato} em baixas concentrações de substrato, 12,5 g/l. A mesma não efetuou estudos de quantificação do etanol.

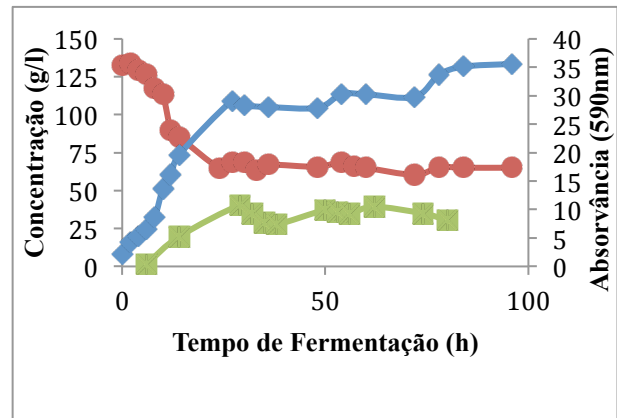
A composição base do meio de cultura foi alterada, em relação as composições utilizadas nos estudos anteriormente referidos, devido a Rodrigues (2011) ter concluído que a diminuição nas concentrações das fontes de azoto não afetam a produção de etanol, ou seja, para este ensaio e para os seguintes foi utilizado extrato de levedura a 3 g/l e peptona a 5 g/l. Estes nutrientes são de extrema importância devido a fornecerem aminoácidos, péptidos, vitaminas e poucos hidratos de carbono capazes de promover um rápido crescimento da levedura.

Para estudar o crescimento e produção de etanol da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, utilizou-se, como fonte de carbono extrato de alfarroba, licor de citrinos e uma mistura de açúcares comerciais de glucose (25%), frutose (25%) e sacarose (50%), denominado “Mix”. Este ultimo, teve como objetivo de simular a composição e proporção dos açúcares presentes no licor de citrinos, exceptuando os restantes compostos presentes no licor original.

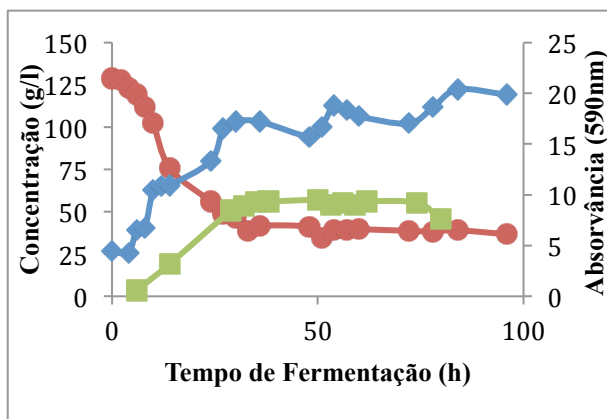
A variação dos parâmetros de crescimento ao longo de tempo de fermentação, encontram-se descritos nas figuras 10. de A a C e os valores correspondentes á cinética e aos parâmetros energéticos encontram-se representados na tabela 18..



(A)



(B)



(C)

Figura 10 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em diferentes fontes de carbono. Extrato de alfarroba 270 g/l (A), licor de citrinos 130 g/l (B) e rácio de a c res frutose: glicose: sacarose (25:25:50) 120 g/l (C). (◆)Absorvância, (■) Etanol, (●) A c res totais

A cinética de biomassa, produ o de etanol e de consumo de a c res totais, foram caracterizadas de modo a compreender o processo de fermenta o. Numa análise global   figura 10., foi possível observar que todas as fontes de carbono e de azoto, utilizadas neste ensaio, contribuir m para um crescimento favorável da levedura.

Tabela 18 – Cinética de biomassa e etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A, crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes de carbono. Extrato de alfarroba 270 g/l (Alf), licor de citrinos 130 g/l (Cit) e rácio de a c ares frutose: glicose: sacarose (25:25:50) 120 g/l (“Mix”).

Fonte de carbono	$Y_{E/S}$ (g _{etanol} /g _{su} bstrato)	$T_{A�uC}$ (%)	$E_{máx}$ (g _{etanol} /l)	P_{Max} (g _{etanol} /l h)	$Y_{X/E}$ (g _{biomassa} /g etanol)	μ_{Max} (h ⁻¹)	X_{Max} (g _{biomassa} /l)	$Y_{X/S}$ (g _{biomassa} /g substrato)
Alf	0,510 ± 0,065 ^a	48,768	94,201 ± 9,514 ^a	1,745 ± 1,346 ^a	0,084 ± 0,007 ^b	0,108 ± 0,018 ^b	8,37	0,062 ± 0,003 ^b
Cit	0,470 ± 0,022 ^b	51,005	40,255 ± 6,290 ^b	1,491 ± 1,210 ^{a,b}	0,240 ± 0,022 ^a	0,180 ± 0,068 ^a	9,89	0,125 ± 0,012 ^a
“Mix”	0,510 ± 0,014 ^a	71,503	56,868 ± 7,847 ^c	1,185 ± 1,043 ^b	0,081 ± 0,009 ^b	0,030 ± 0,007 ^c	6,87	0,057 ± 0,004 ^c

Valores médios ± desvio padrão, realizados em três replicados.

Rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$), Percentagem de a c ares consumidos ($T_{A uC}$), Etanol máximo ($E_{máx}$), Produtividade máxima de etanol (P_{Max}), Rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$), Taxa específica de crescimento máximo (μ_{Max}), biomassa máxima (X_{Max}) e Rendimento de biomassa/substrato ($Y_{X/S}$).

Dentro de cada coluna, os valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$)

A taxa específica de crescimento máximo (μ_{Max}) e a biomassa máxima (X_{Max}) foram determinadas através de modela o bifásica, usando o programa de modela o **DMFit modelling Tool** (<http://modelling.combase.cc>), através da biomassa quantificada pelo peso seco. Este tipo de modela o permite uma análise mais detalhada do processo de crescimento da levedura ao longo do tempo de fermenta o.

Na figura 11. encontra-se representado, como exemplo, a modela o bifásica efetuada ao ensaio contendo extrato de alfarroba.

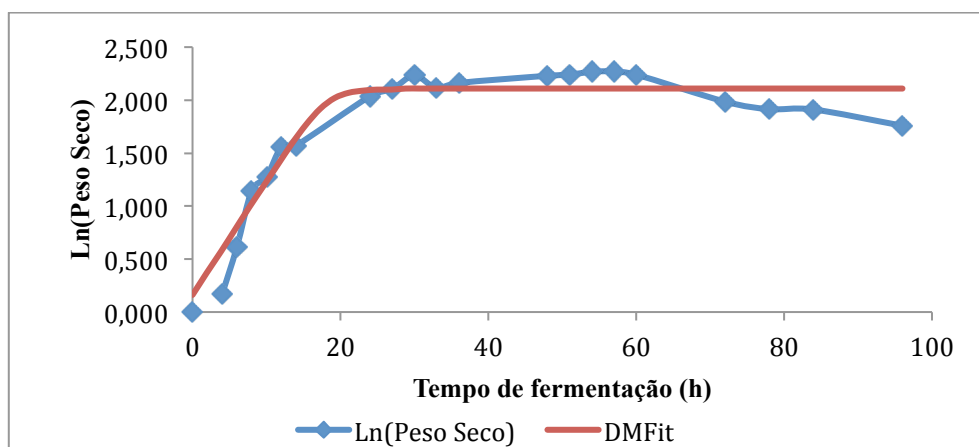


Figura 11 – Perfil de biomassa quantificada pelo peso seco da levedura *S. cerevisiae* F13A, crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em extrato de alfarroba 270 g/l. A linha contínua representa a modelação **DMFit** *modelling Tool*, usando um modelo bifásico, sem fase de latência.

A quantificação de açúcares, nesta fermentação, foi efetuada por refractómetro. O aparelho só quantifica os açúcares totais, ou seja, a leitura efetuada pelo mesmo corresponde à concentração do teor total em glucose, frutose e sacarose existentes em amostra analisada.

A concentração inicial de açúcares totais no meio contendo extrato de alfarroba foi de 270 g/l e não 240 g/l, como foi planeado inicialmente. Esta diferença de concentração foi devido a possíveis erros experimentais provenientes da má homogeneização do extrato de alfarroba antes da medição dos açúcares ou de erros na preparação do meio fermentativo, antes do início da fermentação. Os restantes meios apresentaram concentrações iniciais correspondentes ao estipulado.

Nos perfis de crescimento (Figura 10. e Tabela 18.) foi possível verificar que no meio contendo alfarroba, a fase exponencial iniciou a partir das 2h, com cerca de 2,463% do açúcar iniciais consumidos, obtendo uma taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de 0,108 h⁻¹. A fase estacionária foi atingida por volta das 54h, onde se obteve uma biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$) de 8,37 g_{biomassa}/l. Nas restantes horas verificou-se um crescimento celular paticamente nulo até ao final da fermentação.

No meio contendo licor de citrinos não se verificou aparentemente nenhuma fase de latência, iniciando o crescimento exponencial logo após a inoculação, obtendo assim um $\mu_{\text{máx}}$ de 0,180 h⁻¹. A fase estacionária foi iniciada por volta das 27h com cerca de 48,247% dos açúcar iniciais consumidos. A partir das 72h até ao final da fermentação, verificou-se um novo aumento de biomassa e concomitantemente diminuição na concentração de etanol. Este tipo

de situação, em que existe um segundo aumento de biomassa e diminuição do etanol, pode indicar que estamos perante um comportamento de diauxia por parte da levedura, em que a fonte de carbono utilizada para o aumento da biomassa, a partir de um determinado tempo de fermentação, tenha sido o etanol em vez dos hidratos de carbono iniciais. Este comportamento não foi comprovado devido ao tipo de quantificação efetuado aos açúcares presentes em cada amostra. Após a segunda fase de crescimento celular, obteve-se o valor de $X_{m\acute{a}x}$ de 9,89 $g_{biomassa}/l$.

No ensaio “Mix”, a levedura passou por uma fase de latência de aproximadamente 4h, onde consumiu cerca de 4,404% dos açúcares iniciais. A fase exponencial foi caracterizada por um $\mu_{m\acute{a}x}$ de $0,030 h^{-1}$, na qual se prolongou até ao final da fermentação e onde se obteve um valor $X_{m\acute{a}x}$ de 6,87 $g_{biomassa}/l$.

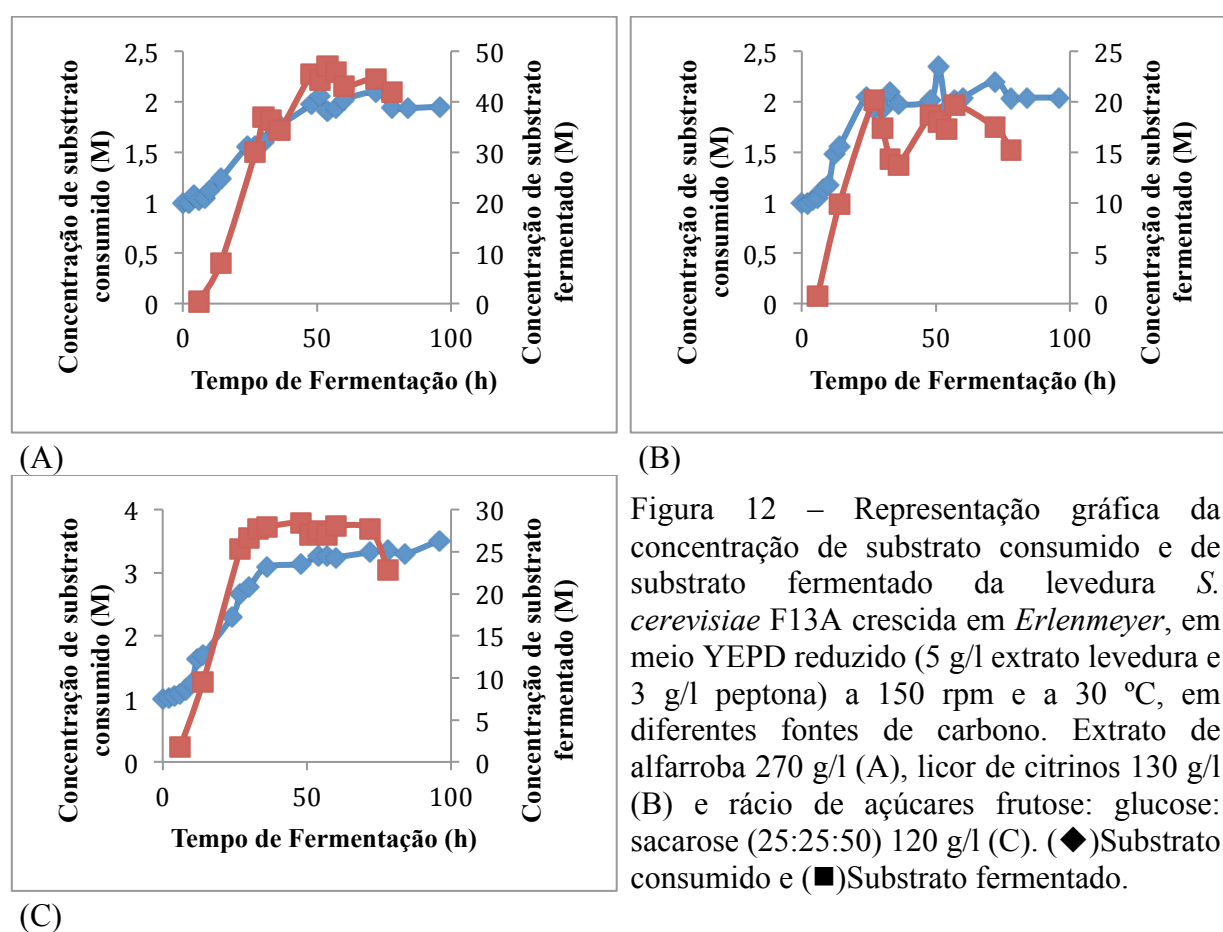
Analisando o consumo de açúcar nos três ensaios, verificou-se um elevado consumo de açúcares nas primeiras 36h, o que corresponde à fase de crescimento exponencial da levedura. No final da fermentação, os açúcares não foram consumidos na sua totalidade, sugerindo que alguns açúcares não foram metabolizáveis pela levedura, resultando em baixos valores de percentagem de açúcares consumidos ($T_{A\acute{c}uC}$), 48,768% no meio de alfarroba, 51,005% no meio com citrinos e 71,503% no meio “Mix”.

Em todos os meios ensaiados, verificou-se que a produção de etanol acompanhou a fase exponencial e estacionária da levedura, registando uma ligeira redução às 29h no meio contendo licor de citrinos e a partir das 74h de fermentação, em todos os ensaios realizados.

Através da análise dos resultados do etanol produzido (Tabela 18.) foi possível verificar que a fermentação com alfarroba obteve um pico de etanol máximo ($E_{m\acute{a}x} = 94,201 g_{etanol}/l$) por volta das 56h, mesmo sem ter consumido todos os açúcares existentes no meio (51,005%). No meio contendo licor de citrinos foi obtido um $E_{m\acute{a}x}$ (40,255 g_{etanol}/l) às 29h, enquanto que no meio “Mix” foi possível verificar o $E_{m\acute{a}x}$ (56,868 g_{etanol}/l) às 48h. Pela produtividade máxima de etanol ($P_{m\acute{a}x}$) foi possível afirmar que no meio contendo alfarroba, a levedura teve maior capacidade de produzir etanol por hora (1,745 $g_{etanol}/l h$), do que nos restantes meios fermentativos. Esta afirmação comprova que quanto maior for a quantidade de substrato presente no meio fermentativo, maior será a produção de etanol pela levedura. Sendo esta a causa de se verificar grandes diferenças nas produções de etanol entre os ensaios realizados.

O rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$) obtido no meio contendo alfarroba e “Mix” foi bastante próximo do valor teórico máximo ($0,510 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$), tendo o meio com licor citrinos obtido um valor de $Y_{E/S}$ igual a $0,470 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$. Os altos valores de $Y_{E/S}$ comprovam que os substratos utilizados foram facilmente assimilados pela levedura, para processos fermentativos, proporcionando condições favoráveis à produção de etanol.

Na figura 12. encontra-se representado a concentração de substrato consumido pelo metabolismo celular da levedura e a concentração de substrato utilizados em processos de fermentação alcoólica.



Visto que ambos os ensaios apresentaram concentrações iniciais de açúcares diferentes, não foi possível correlacionar os resultados entre ambos sobre ambas as concentrações calculas. Contudo é possível verificar individualmente que, conforme mencionado anteriormente, a levedura tendeu a um consumo constante de substrato para processos fermentativos alcoólicos após terminar o seu crescimento exponencial, até ao final da fermentação. Houve uma exceção no ensaio realizado com licor de citrinos, no qual deparou-se com uma ligeira quebra no consumo exponencial de substrato fermentado alcoolicamente após as 27h. Depois da retoma da diminuição, a levedura manteve consumo constante até ao final da fermentação.

Os valores de $Y_{X/S}$ fornecem uma relação linear entre a quantidade de biomassa produzida e a quantidade de substrato consumido, ou seja, quanto maior o valor de $Y_{X/S}$ menor o consumo de substrato para a produção de biomassa. Comparando os valores obtidos, verificou-se que a levedura na presença de licor de citrinos consome mais substrato para produção de biomassa do que nos restantes ensaios, devido ao valor de $Y_{X/S}$ ser o mais alto.

Relativamente aos valores de rendimento de biomassa/etanol calculados ($Y_{X/E}$), que caracteriza a quantidade de etanol produzida por cada unidade de biomassa existente em cultura, entre todos os ensaios testados, foi no meio contendo licor de citrinos que se verificou maior valor de $Y_{X/E}$ ($0,240 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{etanol}}$), devido ao baixo valor de $Y_{E/S}$ e ao alto valor de $Y_{X/S}$. Este baixo rendimento teve como consequência a quebra do processo de fermentação alcoólica identificado na perfil anterior (Figura 12.), sobre a concentração de substrato fermentado.

Ao comparar todos os perfis estudados das três diferentes fontes de carbono utilizadas, verificou-se que o meio contendo extrato de alfarroba, foi o que apresentou os melhores resultados, principalmente a nível da produtividade em etanol ($1,745 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l h}$). No entanto foi no meio com licor de citrinos que apresentou um crescimento celular bastante elevado ($0,180 \text{ h}^{-1}$), tornando a população de células superior quando se utiliza o licor de citrinos na constituição do meio de cultura. Globalmente ambos os substratos proporcionam um boa capacidade de produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* F13A, devido aos altos valores de $Y_{E/S}$ obtidos.

Nos estudos efetuados por Lima-Costa., et al (2012) em ensaios de *Erlenmeyer* contendo uma concentração de açúcar inicial semelhante à utilizada neste trabalho, na ordem dos 235 - 255 g/l de extrato de alfarroba, verificou-se comparativamente que a produção de etanol ($E_{\text{Máx}} = 106,5 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$) foi ligeiramente superior à obtida neste ensaio ($94,21 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$). Em relação ao rendimento $Y_{E/S}$ verificou-se que o mesmo foi próximo do valor teórico máximo ($Y_{E/S} = 0,45 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$), correspondente ao alcançado neste ensaio ($Y_{E/S} = 0,510 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$). O rendimento de $Y_{X/S}$ foi bastante inferior ($Y_{X/S} = 0,055 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$), em comparação com o adquirido neste ensaio ($Y_{X/S} = 0,084 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) sugerindo que o processo respiratório neste trabalho esteve mais ativo do que o fermentativo, pelo que a produção de etanol obtida foi menor. Esta diferença pode ser comprovada através da discrepância entre as taxas específicas de crescimento ($\mu_{\text{Máx}}$), na qual o ensaio realizado por Lima-Costa., et al (2012)

obteve um valor de $\mu_{\text{Máx}}$ inferior ao deste ensaio, resultando assim num baixo consumo de substrato para produção de biomassa.

Verificou-se também um maior valor de $T_{\text{AçuC}}$ nos estudos realizados por Lima-Costa., et al (2012) ($T_{\text{AçuC}} = 95,4\%$), do que no ensaio realizado ($T_{\text{AçuC}} = 51,2\%$), esta diferença pode ter sido devido ao tipo de quantificação feita ao açúcar, protagonizando diferentes metodologias, logo não foi possível comparar os valores entre ambos os ensaios.

A dissemelhança entre alguns dos resultados comparativos pode ser devido à concentração de açúcare inicial. Este ensaio deteve uma concentração de açúcares iniciais de 270 g/l, enquanto que o ensaio de Lima-Costa., et al (2012) a concentração inicial de açúcares totais foi de aproximadamente 235 g/l. Esta pequena diferença pode induzir efeitos inibitórios causados pela elevada concentração de açúcar presente no meio fermentativo.

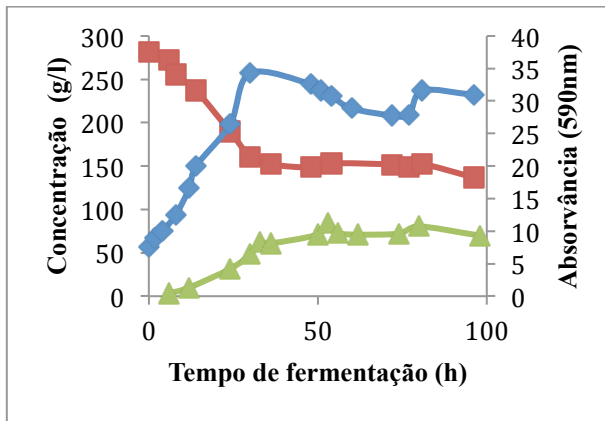
Após verificar a alta capacidade da levedura produzir etanol em meios contendo alfarroba e licor de citrinos, resolveu-se efetuar combinações dos dois e poder estudar a produção de etanol.

2. Efeito de diferentes tipos de rácios contendo extrato de alfarroba e licor de citrinos na produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em *Erlenmeyers*, sistema descontínuo.

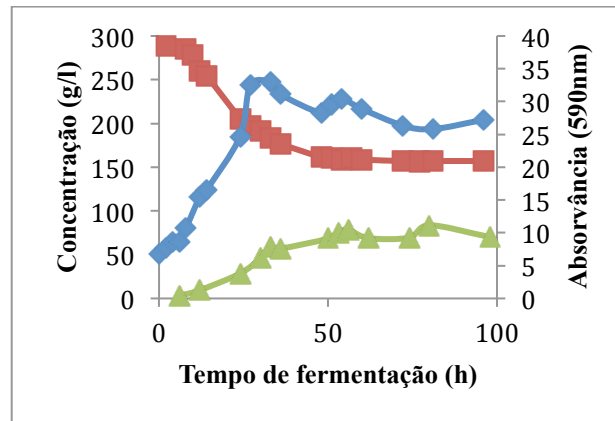
Foram realizados estudos para testar misturas de subprodutos da indústria agroalimentar. Para além do licor de citrinos, decidiu-se utilizar extrato de alfarroba devido aos bons resultados obtidos nos ensaios anteriores.

Neste ensaio, foram testados três rácios com o objetivo de estudar o efeito da mistura de dois substratos, no crescimento e produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* F13A. Os rácios estipulados foram: 82,5 g/l de extrato de alfarroba + 167,5 g/l de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%), 125 g/l de extrato de alfarroba + 125 g/l de licor de citrinos (Alf50%+Cit50%) e 167,5 g/l de extrato de alfarroba + 82,5 g/l de licor de citrinos (Alf67%+Cit33%). Todos os rácios testados, perfizeram uma concentração de açúcares iniciais de 250 g/l.

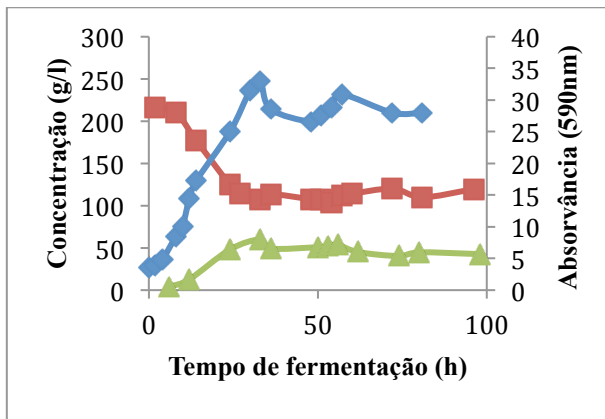
Para avaliar o desenvolvimento da cultura analisou-se a absorvância, consumo de açúcares e produção de etanol ao longo de tempo de fermentação. Foram elaborados gráficos de perfis (Figura 13.) e efetuado cálculos de cinética e parâmetros energéticos (tabela 19.), correspondente a cada rácio.



(A)



(B)



(C)

Figura 13 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rácios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l (A), 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos 288 g/l (B) e 67% de extrato de alfarroba + 33% de licor de citrinos 215 g/l (C). (◆) Absorvância, (Δ) Etanol, (■) Açúcares totais.

Ao observar os perfis de A a C na figura 13. foi possível afirmar que todos os rácios seleccionados e a fonte de azoto escolhida foram propícios ao crescimento da levedura e produção de etanol. O crescimento celular, o consumo de açúcar e a produção de etanol apresentaram uma variação semelhante ao longo do tempo de fermentação.

A taxa específica de crescimento máxima (μ_{Max}) e a biomassa máxima (X_{Max}) foram determinadas através de modelação bifásica, pelo programa de modelação **DMFit modelling Tool**.

Tabela 19 - Cinética de biomassa e etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rácios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l (Alf33%+Cit67%), 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos 288 g/l (Alf50%+Cit50%) e 67% de extrato de alfarroba + 33% de licor de citrinos 215 g/l (Alf67%+Cit33%).

Rácios	$Y_{E/S}$ (g _{etanol} /g _{su} bstrato)	$T_{AçuC}$ (%)	$E_{máx}$ (g _{etanol} /l)	P_{Max} (g _{etanol} /l h)	$Y_{X/E}$ (g _{biomassa} /g etanol)	μ_{Max} (h ⁻¹)	X_{Max} (g _{biomassa} /l)	$Y_{X/S}$ (g _{biomassa} /g substrato)
Alf33% + Cit67%	0,498 ± 0,069 **	51,361	84,107 *	1,557 *	0,147 ± 0,028 ^b	0,015 ± 0,004 ^c	23,27	0,100±0,0 08 ^a
Alf50% + Cit50%	0,510 ± 0,032 **	45,665	83,663 *	1,087 *	0,059 ± 0,012 ^c	0,034 ± 0,003 ^b	18,61	0,037±0,0 06 ^b
Alf67% + Cit33%	0,510 ± 0,071 **	48,995	60,783±6, 847	1,840±1,1 92	0,177 ± 0,014 ^a	0,120 ± 0,019 ^a	14,04	0,096±0,0 76 ^a

Valores médios ± desvio padrão, realizados em três replicados

Rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$), Percentagem de açúcares consumidos ($T_{AçuC}$), Etanol máximo ($E_{máx}$), Produtividade máxima de etanol (P_{Max}), Rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$), Taxa específica de crescimento máximo (μ_{Max}), biomassa máxima (X_{Max}) e Rendimento de biomassa/substrato ($Y_{B/S}$).

Dentro de cada coluna, os valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$)

* Os valores de $E_{máx}$ e de P_{Max} nos rácios Alf33%+Cit67% e Alf50%+Cit50% não apresentam desvio padrão devido ao número de replicados, viáveis para estudo estatístico, ser muito baixo.

** As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento não são grandes o suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença é devido á variabilidade de amostragem aleatória, não há uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,446$).

** O poder do teste realizado (0,049) é inferior ao poder desejado de 0,8000. Menor que a potencia desejada indica que são menos propensas a detectar a diferença quando um realmente existe.

A levedura iniciou a sua fase de crescimento exponencial, em ambos os rácios, logo após a inoculação. A fase de crescimento prolongou-se até às 33h, terminando o crescimento após ter consumido cerca de 42,959% da concentração inicial de açúcares totais no rácio Alf33%+Cit67%, 36,301% no rácio Alf50%+Cit50% e 50,232% no rácio Alf67%+Cit33%. O período de crescimento exponencial foi caracterizado por uma taxa específica ($\mu_{Máx}$) de 0,120 h⁻¹ no rácio Alf57%+Cit33%, 0,034 h⁻¹ no Alf50%+Cit50% e de 0,015 h⁻¹ no rácio Alf33%+Cit67%.

Foi por volta das 33h que se obteve o pico máximo de biomassa ($X_{\text{máx}}$) em ambos os rácios. No rácio Alf33%+Cit67% obteve-se um valor de $X_{\text{máx}}$ na ordem dos 23,27 $\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{l}$, no rácio de Alf50%+Cit50%, 18,61 $\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{l}$, e no rácio de Alf67%+Cit33% de 14,04 $\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{l}$.

Após as 33h, verificou-se em ambos os rácios, uma diminuição da absorvância, indicando um decréscimo no crescimento celular. No rácio Alf33%+Cit67% esse decréscimo foi acompanhado por uma ligeira diminuição na concentração de etanol presente no meio fermentativo. A absorvância voltou a aumentar, no rácio Alf67%+Cit33%, após as 77h, sem haver alteração na produção de etanol, enquanto que no rácio Alf33%+Cit67% e no rácio Alf50%+Cit50% a absorvância volta a aumentar após as 48h, juntamente com o aumento da produção de etanol.

A quantificação de açúcares, foi realizada novamente pelo refractómetro. Ao analisar o gráfico da concentração de açúcares totais verificou-se que a concentração inicial em ambos os rácios foi diferente do estipulado (250 g/l). Os rácios Alf33%+Cit67% e Alf50%+Cit50% apresentaram um valor inicial superior, de 281 g/l e 288 g/l respetivamente. Enquanto que no rácio Alf67%+Cit33% a concentração inicial foi inferior, cerca de 215 g/l.

Houve um grande consumo de açúcares durante a fase de crescimento exponencial, passando para valores constantes, após a quebra no crescimento, por volta das 33h até ao final da fermentação. Conclui-se que a partir das 33h a quantificação de açúcar total pelo refractómetro, tornou-se incoerente pela comparação com os restantes resultados obtidos, devido a se verificar produção de etanol até ao final da fermentação, constatando-se que a levedura consumiu substrato. Visto este aspeto, conclui-se que não é possível utilizar o refractómetro para medição de açúcares totais ao longo do processo fermentativo, logo considerou-se que os valores calculados da percentagem de açúcares consumidos ($T_{\text{AçuC}}$), não foram representativos do verdadeiro perfil de crescimento e produção de etanol efetuado pela levedura nestes ensaios.

A produção máxima de etanol ($E_{\text{Máx}}$) no rácio Alf67%+Cit33% foi de 60,783 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{l}$ por volta das 33h de fermentação, verificou-se de seguida uma lenta diminuição na produção de etanol até ao final da fermentação. Nos restantes rácios, a produção de etanol prolongou-se até às 80h, onde o valor de $E_{\text{Máx}}$ no rácio Alf33%+Cit67% foi de 84,107 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{l}$, por volta das 53h, e no rácio Alf50%+Cit50% de 83,663 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{l}$, aproximadamente das 80h de fermentação.

Nunca apreciação global de todos os valores discutidos anteriormente, pode-se concluir que quanto maior for a razão de licor de citrinos presente no meio fermentativo, maior será a produção máxima de etanol ($E_{M\acute{a}x}$) e maior será o valor de biomassa máximo ($X_{m\acute{a}x}$) obtido.

Ao longo de toda a produção de etanol foi possível verificar um decréscimo, por volta das 33h, no rácio Alf67%+Cit33%. Este tipo de decréscimo foi representativo de um efeito de diauxia na levedura.

A *S. cerevisiae* em concentrações elevadas de glucose, tende a consumir por ordem preferencial a glucose, frutose e sacarose. Após termino das mesmas a levedura inicia o consumo de etanol, para poder manter o seu metabolismo e viabilidade celular. Este tipo de comportamento pode gerar duas curvas de crescimento diferentes para estes dois tipos de substratos, um rápido crescimento representativo do consumo de glucose e um crescimento mais lento representativo do consumo de etanol (Al-mhana, 2010). Analisando o perfil de crescimento (Alf67%+Cit33%) representado pelos valores de absorvância, foi possível identificar os dois crescimentos característicos de um comportamento de diauxia.

Em trabalhos futuros para contornar o comportamento da diauxia na levedura, deve-se efetuar culturas em processos semi-contínuos, ou seja, efetuar adições controladas de substrato em determinados intervalos de tempo. Este tipo de procedimento, aumenta a glucose livre, diminuindo actividade da invertase, mas têm um inconveniente, a diluição do etanol levando à diminuição da concentração do mesmo existente no meio fermentativo.

A identificação deste comportamento veio a confirmar o erro na quantificação do consumo dos açúcares totais ao longo da fermentação, provocado pelo refractómetro.

Após realizar cálculos com os valores obtidos de etanol (Tabela 19.) verificou-se que os rendimentos de etanol/substrato ($Y_{E/S}$) foram bastante elevados, próximos do valor teórico máximo ($0,510 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) em todos os ensaios realizados. Através destes resultados foi possível afirmar que grande parte do açúcar consumido pela levedura foi principalmente utilizado em processos fermentativos do que na síntese de biomassa.

Observando os valores de rendimento biomassa/etanol ($Y_{X/E}$) obtidos neste ensaio e no ensaios anteriores (Tabela 18.), foi possível deduzir os seguintes aspetos: se a levedura demonstrar uma produção constante de etanol num longo período de tempo de fermentação, o valor de $Y_{X/E}$ tende a ser menor, devido aos altos valores de $Y_{E/S}$ obtidos; quando se verifica uma grande produção de biomassa e uma baixa produção de etanol, ou seja, maior valor de

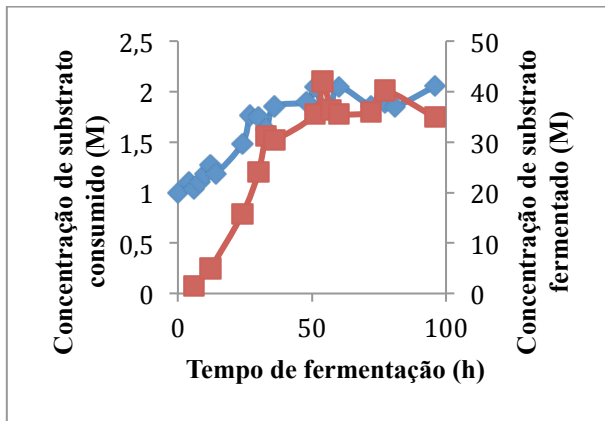
$Y_{X/S}$ e menor valor de $Y_{E/S}$, o valor de $Y_{X/E}$ será elevado; e quando existe uma grande quebra na produção de etanol durante a fermentação, maior será o valor de $Y_{X/E}$. A última afirmação pode ser aplicável ao efeito de diauxia na levedura, na qual o valor $Y_{X/E}$ tende a aumentar, devido a baixos valores de $Y_{E/S}$ causados pelo consumo do etanol.

Após serem deduzidos todos estes aspectos tornou possível entender a diferença entre o valor de $Y_{X/E}$ obtido no rácio Alf50%+Cit50% e os restantes valores de $Y_{X/E}$, obtidos nos restantes rácios. A principal causa dessa diferença foi, devido a produções constantes de etanol (altos valores de $Y_{E/S}$) no rácio Alf33%+Cit67%, enquanto que no rácio Alf67%+Cit33% foi devido ao comportamento de diauxia, resultante da queda repentina do crescimento celular e na produção de etanol (baixos valores de $Y_{X/S}$).

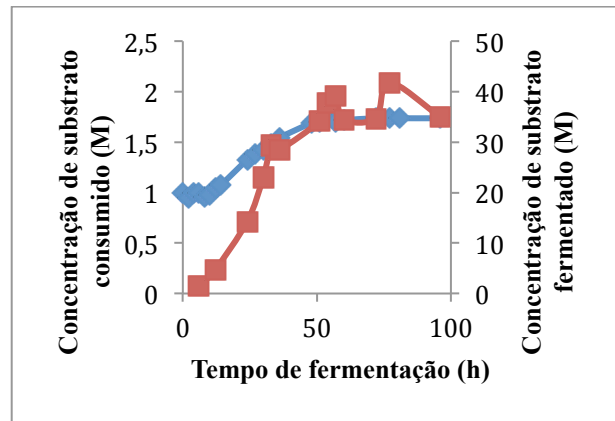
Todas as afirmações feitas sobre o $Y_{E/S}$ e o $Y_{X/E}$, podem ser confirmadas posteriormente na representação do perfil de substrato consumido e substrato fermentado alcoolicamente (ver figura 14.).

A maior produtividade de etanol ($P_{máx}$) foi obtida no rácio Alf67%+Cit33% (1,840 g_{etanol}/l h), devido a ter sido obtido um pico de etanol máximo relativamente cedo (33h) em relação aos restantes rácios. Através deste valor pode-se afirmar que o extrato de alfarroba em maiores concentrações proporciona uma produção de etanol mais rápida, enquanto que o licor de citrinos proporciona a produção contínua de etanol durante mais tempo. Esta afirmação só é exequível tendo em consideração a presença de substrato a uma concentração constante durante todo o processo fermentativo.

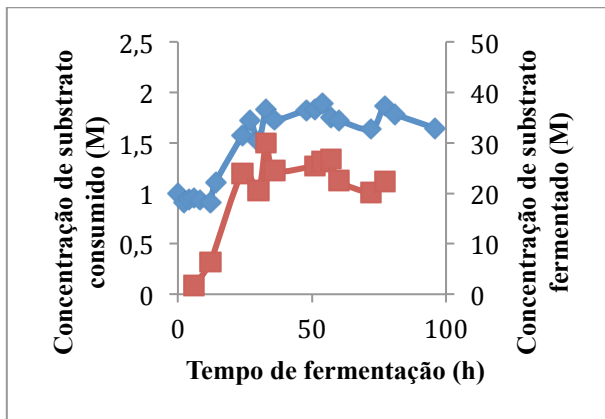
Através da concentração de açúcares totais e do etanol produzido, ao longo do tempo de fermentação, foi possível calcular a concentração de açúcares consumidos e a concentração de açúcares fermentados pela via alcoólica.



(A)



(B)



(C)

Figura 14 - Representação gráfica da concentração de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rácios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l (A), 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos 288 g/l (B) e 67% de extrato de alfarroba + 33% de licor de citrinos 215 g/l (C). (◆)Substrato consumido e (■)Substrato fermentado.

Na análise dos gráficos representados na figura 14., foi possível verificar, por volta das 30h e às 57h, as várias diminuições pontuais no consumo de açúcares fermentados pela via alcoólica, em todos os rácios. Contudo, foi no rácio Alf33%+Cit67% que se verificou um maior consumo de substrato para produção de etanol.

Para poder identificar e correlacionar as diminuições verificadas nos gráficos anteriores, elaboraram-se gráficos da absorvância e da concentração de etanol, ao longo do tempo de fermentação, de todos os ensaios (figura 15.).

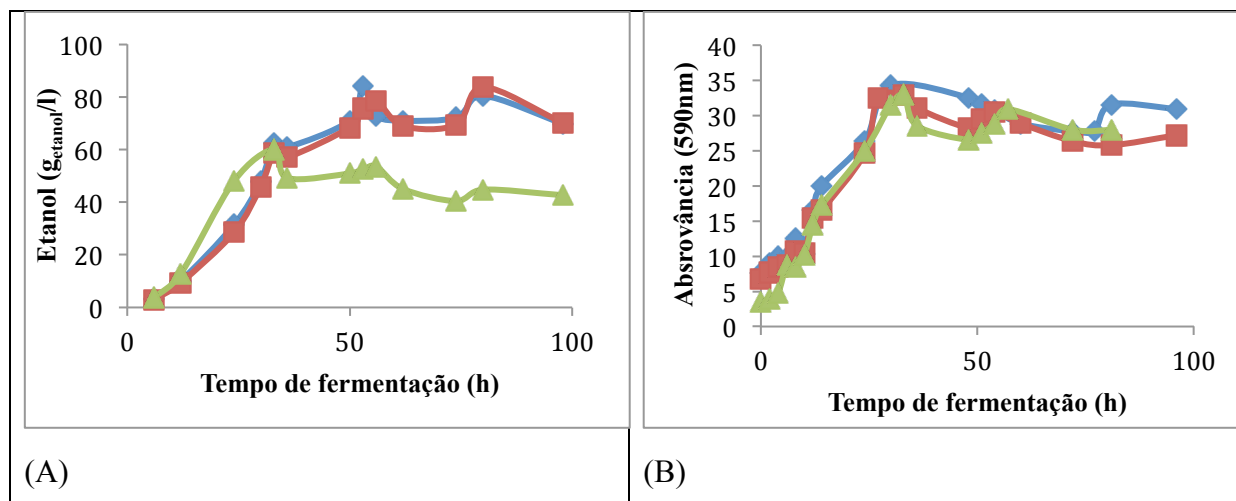


Figura 15 - Representação gráfica da concentração de etanol produzida (A) e absorvância (B) da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em rários de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l (◆), 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos 288 g/l (■) e 67% de extrato de alfarroba + 33% de licor de citrinos 215 g/l (Δ).

Ao analisar os gráficos da figura 15., entre as 30h e às 57h, foi possível identificar as quebras, tanto na concentração de etanol como na leitura da absorvância, mencionadas anteriormente na análise à figura 14.. Sendo assim foi possível comprovar, com uma maior certeza, que a levedura sofreu efeito de diauxia em todos os rários testados neste ensaio.

Através do rendimento de biomassa/substrato ($Y_{X/S}$), que fornece uma relação linear entre a quantidade de biomassa produzida e a quantidade de substrato consumido, constatou-se, em comparação com os restantes rários, que no rário Alf33%+Cit67% houve um maior consumo de substrato para a produção de biomassa, visto ter obtido o maior valor de $Y_{X/S}$ ($0,100 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$).

Maia (2011) testou as mesmas combinações entre extrato de alfarroba e licor de citrinos, com um microrganismo *Penicillium expansum*, na produção do agente de controlo biológico, a uma concentração de açúcar inicial de 50 g/l em meio YEPD. A mesma verificou, no perfil de consumo de açúcares, um consumo bastante rápido de glucose e frutose, por volta das 18h, mantendo a sacarose constante ao longo de todo o tempo, sem ser consumida pelo microrganismo. Em relação a este ensaio, mesmo sem caracterizar o consumo diferenciado dos três açúcares presentes no meio, foi também possível verificar uma semelhança no rápido consumo de açúcares nas primeiras 33h, referentes ao crescimento exponencial da *S. cerevisiae* F13A. Relativamente aos resultados cinéticos obtidos por Maia (2011), verificou na taxa específica de crescimento e no rendimento de biomassa/substrato, diferenças

estatisticamente não significativas entre os três rácios (segundo *Duncan's Multiple Range Test* ($P < 0,005$)), concluiu que os parâmetros estudados para o rácio Alf33%+Cit67% apresentaram resultados estatisticamente superiores para prosseguir com os estudos.

Através de todos os resultados apresentados foi decidido planejar o aumento de escala laboratorial, do rácio Alf33%+Cit67%, para poder estudar o comportamento da levedura *S. cerevisiae* F13A e verificar se existe uma maior produ o de etanol.

3. Análise do crescimento e produ o de etanol no rácio de 33% de extrato de Alfarroba com 67% de licor de Citrinos, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, em reator biológico de 3L, sistema descontínuo.

Visto que a estirpe *S. cerevisiae* F13A, cresceu de diferentes formas nos diferentes rácios estudados em *Erlenmeyers*, selecionou-se o rácio que continha Alf33%+Cit67%, como a melhor combina o entre as duas fontes de carbono para o crescimento da levedura e produ o de etanol. Como tal efetuou-se o aumento de escala em laboratório, em um reator de 3 litros agitado mecanicamente (STR) a funcionar em sistema descontínuo.

A cinética de crescimento, consumo de a o ar e a produ o de etanol foram determinados a fim de compreender a fisiologia do processo de fermenta o da levedura, após o aumento de escala. A varia o desses parâmetros durante a fermenta o descontínua encontram-se representados graficamente na figura 16. e os correspondentes valores dos cálculos efetuados, estão apresentados na tabela 20..

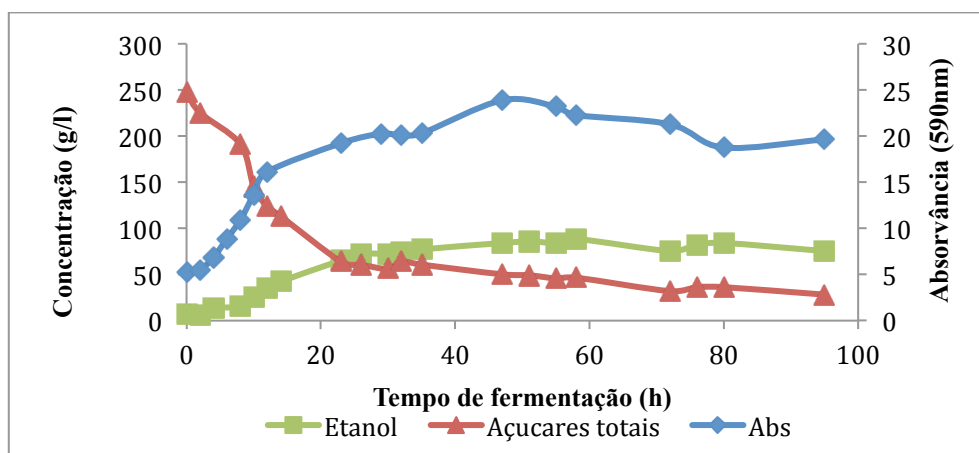


Figura 16 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30 C, agita o de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentra o total de a cares iniciais de 250 g/l.

A taxa específica de crescimento máximo, μ_{Max} e a biomassa máxima, X_{Max} foram determinadas através de modelação bifásica do programa **DMFit modelling Tool**.

Tabela 20 - Cinética de biomassa e etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l.

Fonte de carbono	$Y_{E/S}$ (g _{etanol} /g _{su} bstrato)	$T_{A\text{çu}C}$ (%)	$E_{\text{máx}}$ (g _{etanol} /l)	P_{Max} (g _{etanol} /l h)	$Y_{X/E}$ (g _{biomassa} /g etanol)	μ_{Max} (h ⁻¹)	X_{Max} (g _{biomassa} /l)	$Y_{X/S}$ (g _{biomassa} /g substrato)
Alf33%+	0,432 ±	88,602	88,630 ±	1,528 ±	0,115 ±	0,087 ±	10,84	0,046 ±
Cit67%	0,036		9,365	1,230	0,006	0,075		0,004

Valores médios ± desvio padrão, realizados em três replicados.

Rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$), Percentagem de açúcares consumidos ($T_{A\text{çu}C}$), Etanol máximo ($E_{\text{máx}}$), Produtividade máxima de etanol (P_{Max}), Rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$), Taxa específica de crescimento máximo (μ_{Max}), biomassa máxima (X_{Max}) e Rendimento de biomassa/substrato ($Y_{B/S}$).

Ao comparar os resultados da cinética de crescimento e produção de etanol obtidos entre STR e *Erlenmeyer* com Alf33%+Cit67%, deparou-se numa apreciação global, ter havido uma menor produção de biomassa ($X_{\text{Máx}}$ em STR = 10,85 g_{biomassa}/l e $X_{\text{Máx}}$ em *Erlenmeyer* = 23,27 g_{biomassa}/l) e um ligeiro aumento na concentração máxima de etanol obtida ($E_{\text{Máx}}$ em STR = 88,630 g_{etanol}/l e $E_{\text{Máx}}$ em *Erlenmeyer* = 84,107 g_{etanol}/l). Contudo decidiu-se proceder à análise detalhada dos perfis e resultados obtidos no aumento de escala, efetuado em STR.

Após a fase *lag* de aproximadamente 4h, a levedura realizou um crescimento exponencial acelerado até às 47h de fermentação. Sendo esse crescimento, caracterizado por uma taxa específica de ($\mu_{\text{máx}}$) 0,087 h⁻¹ e um valor máximo de biomassa ($X_{\text{Máx}}$) de 10,84 g_{biomassa}/l. Após terminar a fase exponencial, com cerca de 79,711% dos açúcar iniciais consumidos, a levedura entrou em fase de morte celular sem efetuar uma fase estacionária, logo após as 47h. A fermentação terminou às 95h com uma percentagem de açúcares totais consumidos ($T_{A\text{çu}C}$) de 88,602%.

Verificou-se que a produção de etanol acompanhou o crescimento da levedura até cerca das 58h de fermentação, na qual foi obtido o máximo da concentração etanol ($E_{\text{máx}}$) de 88,630 g_{etanol}/l e uma produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$) de 1,528 g_{etanol}/l h. Comparando com os valores obtidos em *Erlenmeyer* ($E_{\text{Máx}}$ =84,107 g_{etanol}/l e $P_{\text{Máx}}$ =1,557 g_{etanol}/l h) especulou-se ter uma produção de etanol superior na ordem dos 130 g_{etanol}/l com o aumento de escala laboratorial, visto que em estudos realizados por Lima-Costa., et al. (2012), o aumento de escala

laboratorial em meios contendo extrato de alfarroba a uma concentração de 250 g/l, proporcionou valores de $E_{Máx}$ na ordem dos 126,7 g_{etanol}/l com um $P_{Máx}$ de 0,69 g_{etanol}/l h.

O rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$) foi de 0,432 g_{etanol}/g_{substrato}, próximo do valor teórico máximo (0,510 g_{etanol}/g_{substrato}) e semelhante ao obtido no mesmo ensaio em *Erlenmeyer* ($Y_{E/S} = 0,498$ g_{etanol}/g_{substrato}), afirmando que grande parte do substrato foi utilizado pela levedura em processos fermentativos para produção de etanol.

Ao comparar os valores de rendimento de biomassa/substrato obtidos em ambos os ensaios ($Y_{X/S}$ em STR = 0,046 g_{biomassa}/g_{substrato} e $Y_{X/S}$ em *Erlenmeyer* = 0,100 g_{biomassa}/g_{substrato}), concluiu-se que o aumento de escala proporcionou à levedura melhores condições para produção de etanol, visto a ter apresentado um menor rendimento no consumo de substrato para produção de biomassa, do que no ensaio em *Erlenmeyer*.

A cinética de produção de etanol foi analisada quantitativamente e as taxas específica de produção foram calculada (qE) em relação a concentração de etanol.

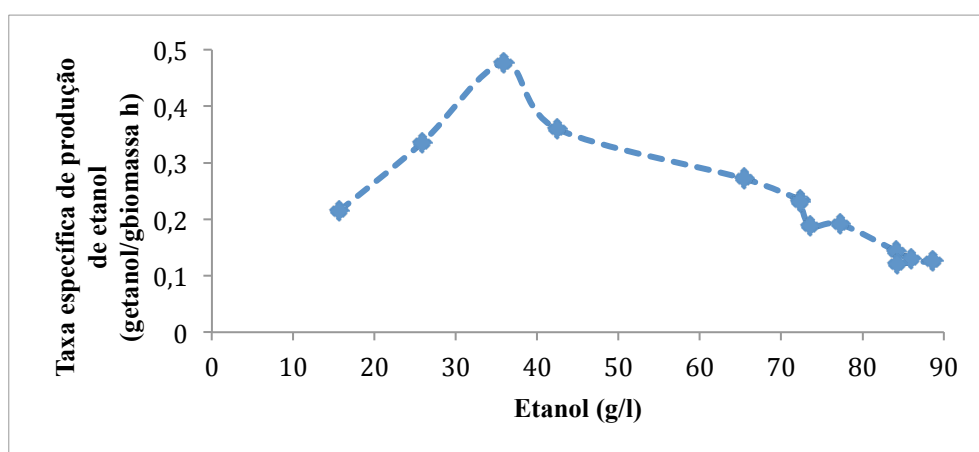


Figura 17 - Taxa específica de produção de etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l.

Como podemos observar na figura 17., os valores de qE tendem a diminuir consoante o aumento da concentração de etanol, ou seja, atinge valores próximos de zero para concentrações de etanol superiores a 88 g_{etanol}/l, demonstrando assim um efeito inibitório do etanol a elevadas concentrações.

O etanol a elevadas concentrações pode alterar a composição da camada lipídica da membrana e a síntese de proteínas, causando alterações na modulação dos processos de troca iónica. Esta inibição pode ser explicada pela transição entre o crescimento ilimitado, devido ao excesso de monossacáridos livres e o crescimento limitado, pela hidrólise da sacarose.

Contudo uma explicação alternativa pode ser uma maior inibição na actividade da invertase, do que a inibição do transporte de monossacáridos para o interior da levedura. Hyun-Beom., et al. (2009) afirmou que o próprio etanol a concentrações na ordem os 100 g_{etanol}/l inibe o crescimento celular e a própria produção de biomassa, logo se houver uma inibição no crescimento celular não há produção de etanol. A única maneira de contornar este efeito é através do aumento do arejamento, para poder proteger as células contra os efeitos adversos das elevadas concentrações de etanol.

Durante o processo fermentativo foram realizados ensaios de propagação de células viáveis em intervalos de amostras seleccionados, obtendo assim o seguinte perfil de concentração de células viáveis por mililitro ao longo do tempo de fermentação (figura 18.).

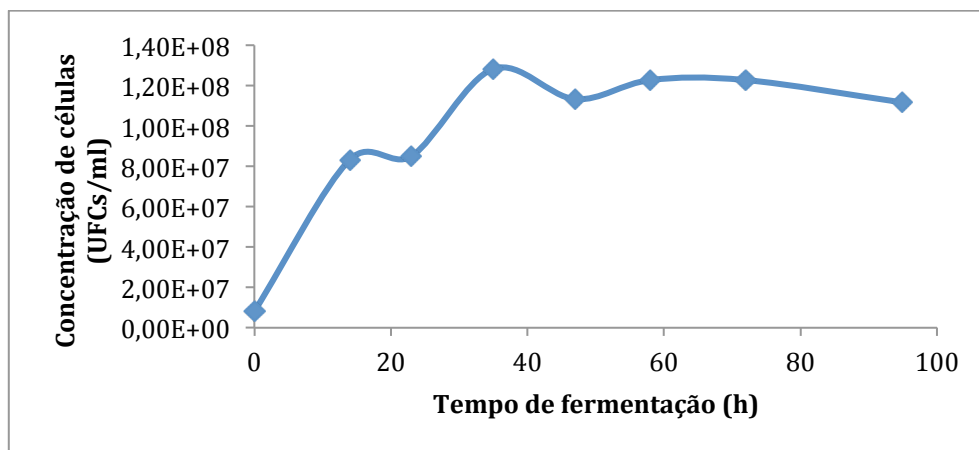


Figura 18 - Perfil de crescimento expressos em unidades formadoras de colónias por mililitro ao longo do tempo de fermentação da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l.

Após a fase *lag* da inoculação de $8,22 \times 10^6$ UFCs/ml, a levedura obteve um crescimento exponencial, que terminou por volta das 35h com um máximo de concentração de células viáveis na ordem dos $1,28 \times 10^8$ UFCs/ml. Depois do crescimento, a concentração de células tendeu a diminuir até ao final da fermentação, obtendo ás 95h $1,12 \times 10^8$ UFCs/ml.

Visto que a quantificação dos açúcares foi efetuado por HPLC, foi possível caracterizar o consumo diferenciado de cada substrato (glucose, frutose e sacarose) ao longo do tempo de fermentação (figura 19.).

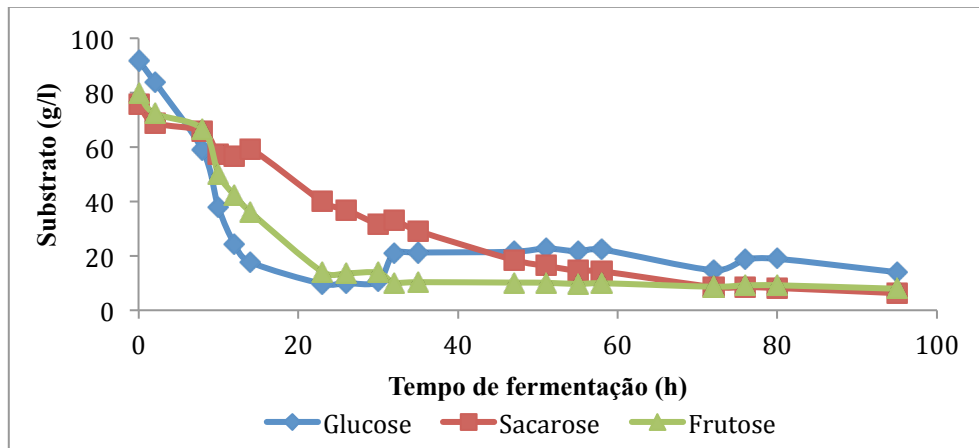


Figura 19 - Perfil de consumo de glucose, sacarose e frutose ao longo do crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l.

As concentrações iniciais de glucose, frutose e sacarose foram de 92 g/l, 80 g/l e 76 g/l, respectivamente, o que perfaz aproximadamente uma concentração total inicial de 250 g/l.

Durante a fase de crescimento exponencial verificou-se que a glucose foi o primeiro monossacárido a ser consumido, sendo logo de seguida a frutose. As células da levedura *S. cerevisiae* devido a não conseguirem utilizar diretamente a sacarose, uma vez que as membranas são impermeáveis a açúcares dissacarídeos, torna necessário a conversão dos mesmos em monossacáridos, através da enzima invertase. Contudo neste ensaio verificou-se que a diminuição da sacarose ocorreu concomitante com o consumo de frutose e glucose. A principal causa desta variação, foi devido às células terem provindo de um meio (inóculo) em que houve escassez de glucose, logo a levedura proveio com alguma enzima invertase produzida que permitiu a hidrólise da sacarose existente no meio inóculado.

Após o termino da glucose por volta das 30h, verificou-se um aumento rápido do mesmo, derivado da rápida transformação de sacarose em glucose pela enzima invertase.

A fermentação terminou às 95h com alguma concentração de glucose, resultante da hidrólise e com uma concentração próxima de zero de sacarose e frutose.

Na comparação dos perfil do consumo de substrato e produção de etanol (Figura 16.), verificou-se que em altas concentrações de glucose houve produção de etanol, devido à concentração do mesmo aumentar, logo após à fase *lag*. Este tipo de comportamento pode ser explicado pelo chamado efeito *Crabtree*.

O efeito de *Crabtree* descreve o fenómeno pelo qual a levedura *S. cerevisiae*, produz etanol em condições aeróbias na presença de altas concentrações de glucose, em vez de produzir biomassa através do ciclo de ácido cítrico. O aumento da glucose no interior da célula, acelera a glicólise resultando na produção de grandes quantidades de ATP e de piruvato através de processos de fosforilação, originando uma redução da necessidade de fosforilação oxidativa pelo ciclo do ácido cítrico através da cadeira de transporte de eletrões. Diminuindo assim o consumo de oxigénio pela levedura, fazendo com que o piruvato siga por processos fermentativos, aumentando a produção de etanol (Al-mhanna, 2010, Van den Brink, 2009).

A cinética de consumo de açúcares foi analisada quantitativamente e as taxas específicas de consumo para cada, foram calculadas (q_s) e representadas em relação ao longo do tempo de fermentação.

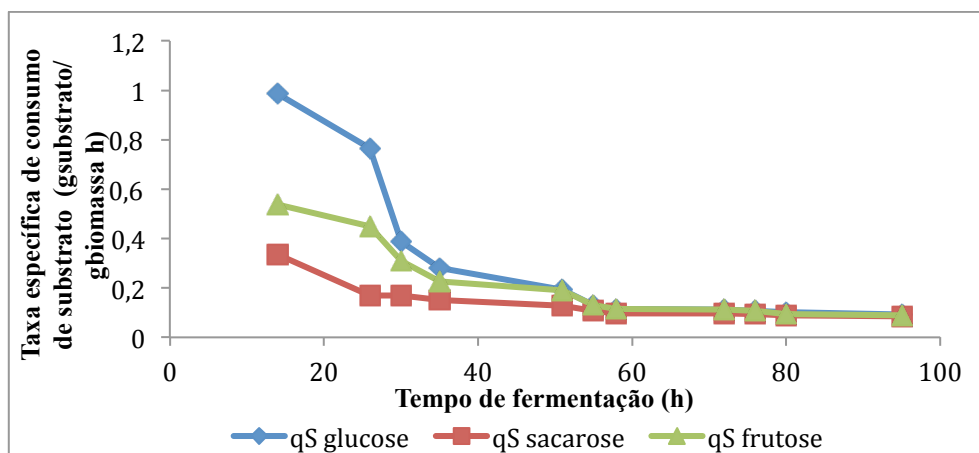


Figura 20 - Taxa específica de consumo de glucose, sacarose e frutose da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l.

Como descrito anteriormente, foi possível verificar diretamente na figura 20., que a levedura *S. cerevisiae* consome primeiro os dois monossacáridos presentes no meio fermentativo. Sendo a molécula de glucose a que apresenta maior afinidade pela permease, para efetuar o seu transporte para o interior de célula.

Através da concentração de açúcares totais e do etanol produzido foi possível elaborar o perfil da concentração de substrato consumido e de substrato fermentados alcoolicamente, pela levedura (figura 21. - A).

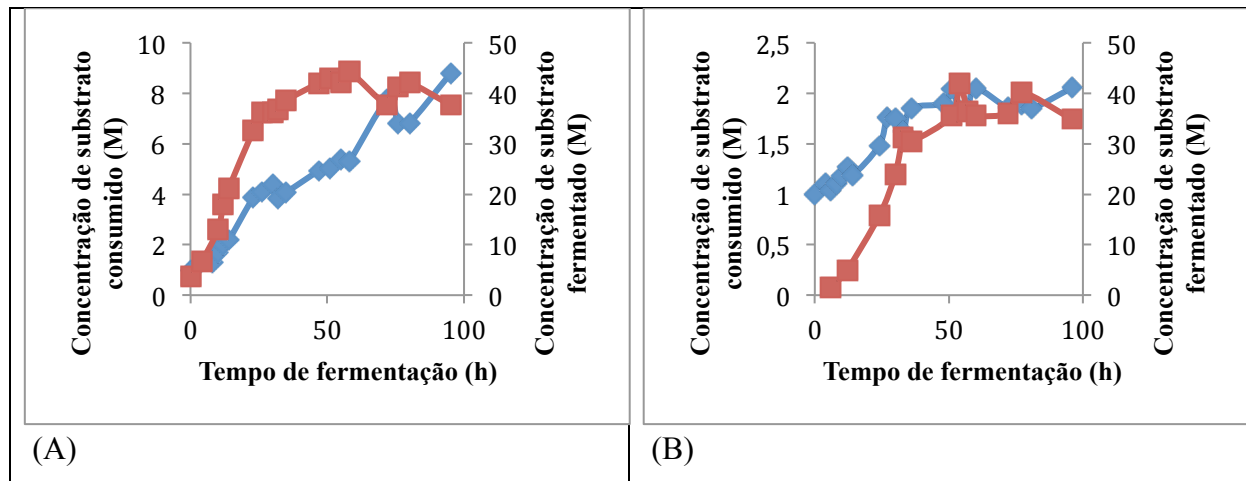


Figura 21 - Representação gráfica da concentração de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A. (A) crescida em reator biológico mecanicamente agitado de 3L, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a uma temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e arejamento de 0,3 vvm. 33% de extrato de alfarroba com 67% de licor de citrinos (Alf33%+Cit67%) a uma concentração total de açúcares iniciais de 250 g/l. (B) crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, em raios de diferentes fontes de carbono. 33% de extrato de alfarroba + 67% de licor de citrinos 281 g/l. (◆)Substrato consumido e (■)Substrato fermentado.

A comparar ambos os perfis (figura 21. A e B), do mesmo rácio antes e depois do aumento de escala laboratorial, tornou-se possível verificar que ao efetuar o aumento de escala a levedura tendeu a consumir a mesma quantidade substrato para produção de etanol, devido ao perfil da concentração de substrato fermentado apresentar aproximadamente os mesmos valores. Contudo, foi no ensaio em STR que a levedura iniciou mais cedo o consumo de substrato para produção de etanol, apresentando uma maior concentração de substrato consumido.

Verificou-se uma grande diferença entre os resultados obtidos da concentração de substrato consumido, devido pela quantificação dos açúcares, em *Erlenmeyer*, ter sido realizado por refractómetro, enquanto que no reator a quantificação foi realizada por HPLC.

Através do valor do rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$) obtido (0,115 $g_{biomassa}/g_{etanol}$) e pela comparação com o $Y_{X/E}$ do ensaio em *Erlenmeyer* ($Y_{X/E} = 0,147 g_{biomassa}/g_{etanol}$), concluiu-se que o aumento de escala proporcionou um menor rendimento devido principalmente à produção constante de etanol e ao baixo valor de $Y_{X/S}$. Esta afirmação comprova, mais uma

vez, que o aumento proporcionou melhores condições para a levedura produzir etanol do que biomassa.

Em estudos efetuados por Lima-Costa., et al (2012), em ensaios STR com extrato de alfarroba a uma concentração de açúcar iniciais na ordem dos 235 - 255 g/l, foi verificado maiores produções de etanol obtendo um valor de $E_{Máx}$ de 110,6 g_{etanol}/l, enquanto que neste ensaio o valor de $E_{Máx}$ obtido foi menor ($E_{Máx} = 88,630$ g_{etanol}/l). Na comparação com os valores da $\mu_{Máx}$ ($\mu_{Máx}$ neste ensaio = 0,087 h⁻¹, $\mu_{Máx}$ obtido por Lima-Costa., et al (2011) = 0,133 h⁻¹), constatou-se que a levedura apresentou uma maior taxa específica de crescimento nos ensaios de de Lima-Costa., et al (2012), mesmo tendo obtido um valor de $X_{Máx}$ menos que neste ensaio ($X_{Máx}$ obtido por Lima-Costa., et al (2011) = 8,08 g_{biomassa}/l; $X_{Máx}$ obtido neste ensaio = 10,84 g_{biomassa}/l).

Visto não haver grandes diferenças nos valores de $Y_{E/S}$ e de $Y_{X/S}$ obtidos por Lima-Costa., et al (2012) ($Y_{E/S}$ obtido por Lima-Costa., et al (2011) = 0,45 g_{etanol}/g_{substrato}; $Y_{X/S}$ obtido por Lima-Costa., et al (2011) = 0,052 g_{Biomassa}/g_{Substrato} e $Y_{E/S} = 0,432$ g_{etanol}/g_{substrato}; $Y_{X/S} = 0,046$ g_{Biomassa}/g_{Substrato}, respectivamente) deduziu-se que a levedura na presença de licor de citrinos produz grandes quantidades de etanol e de biomassa, podendo alcançar elevadas taxas de produção em fermentações tipo “*feed-batch*”.

Ao efetuar o aumento de escala do rácio Alf33%+Cit67%, verificou-se uma maior conversão de substrato para produção de etanol do que para síntese de biomassa, mesmo sem ter sido obtidos elevados valores de concentração de etanol no meio fermentativo como se pretendia. Deduz-se que a principal causa da pouca produção de etanol pode ter sido devido ao composto inibitório D-limoneno presente no licor de citrinos. Estipulou-se preparar um ensaio contendo licor de citrinos sem D-limoneno para poder verificar o efeito do mesmo na produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* F13A.

4. Efeito do licor de citrinos sem D-limoneno, em fermentação de sistema descontínuo com um rácio 50% de extrato de alfarroba com 50% de licor de citrinos, no crescimento e produção de etanol pela *Saccharomyces cerevisiae* F13A, em Erlenmeyer.

O D-limoneno é suspeito de inibir do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na presença de oxigénio (Wilkins., et al, 2007). Devido a tal facto, tentou-se extrair este composto, do licor de citrinos utilizado na preparação dos meios fermentativos através de um método apresentado por Gonçalves., et al. (s/d).

4.1 Extração do D-limoneno

Para efetuar a extração do D-limoneno decidiu-se efetuar uma destilação a vapor do licor de citrinos (Figura 9.), sendo esta a única maneira possível de realizar a extração no laboratório. O procedimento de extração foi descrito no subcapítulo 1.6.1.4.1 do II capítulo.

Devido a não existir métodos nem material, qualificado no laboratório par quantificar o D-limoneno extraído, decidiu-se elaborar o processo de extração durante 3 horas.

Ao longo do processo de extração foram coletadas cinco amostras de destilado, para diferentes ampolas de decantação, com objetivo de identificar através da adição de n-Hexano a existência de D-limoneno.

Após adição de n-Hexano a cada amostra de destilado, foi possível verificar a existência de três fases distintas na amostra (figura 22.), referentes as diferenças de densidades de casa solução ($\rho(\text{D-limoneno}) = 0,840 \text{ g/ml}$; $\rho(\text{n-Hexano}) = 0,660 \text{ g/ml}$; $\rho(\text{Água}) = 1 \text{ g/ml}$). Verificou-se, por ordem decrescente de densidade, que na primeira camada, em cada ampola de decantação, encontrava-se o n-Hexano adicionado, na segunda camada encontrava-se o D-limoneno extraído do licor de citrinos e na ultima camada, a água.

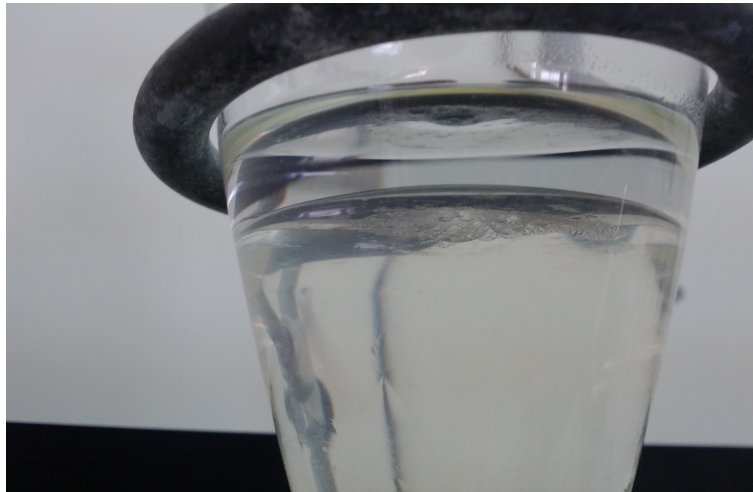


Figura 22 - Diferença de miscibilidade entre os composto existentes na amostra de destilado, proveniente da destilação a vapor efetuada ao licor de citrinos para extração do composto aromático D-limoneno, após adição de n-Hexano.

Após terminar a destilação, utilizou-se o licor de citrinos para estudar o efeito da ausência do composto D-limoneno no crescimento e produção de etanol, pela *S. cerevisiae* F13A. Como tal, preparou-se um rácio em *Erlenmeyer*, contendo 50% de extrato de alfarroba e 50% de licor de citrinos (Alf50%+Cir50% sem D-limoneno). Foi selecionado este tipo de rácio

(50:50) devido a ser a melhor combinação entre ambos os subproduto, não criando excesso de compostos da parte de qualquer um substrato.

A variação dos parâmetros cinéticos ao longo de tempo de fermentação, foram descritos na figuras 23. – A e os valores correspondentes á cinética e aos parâmetros energéticos foram apresentados na tabela 21..

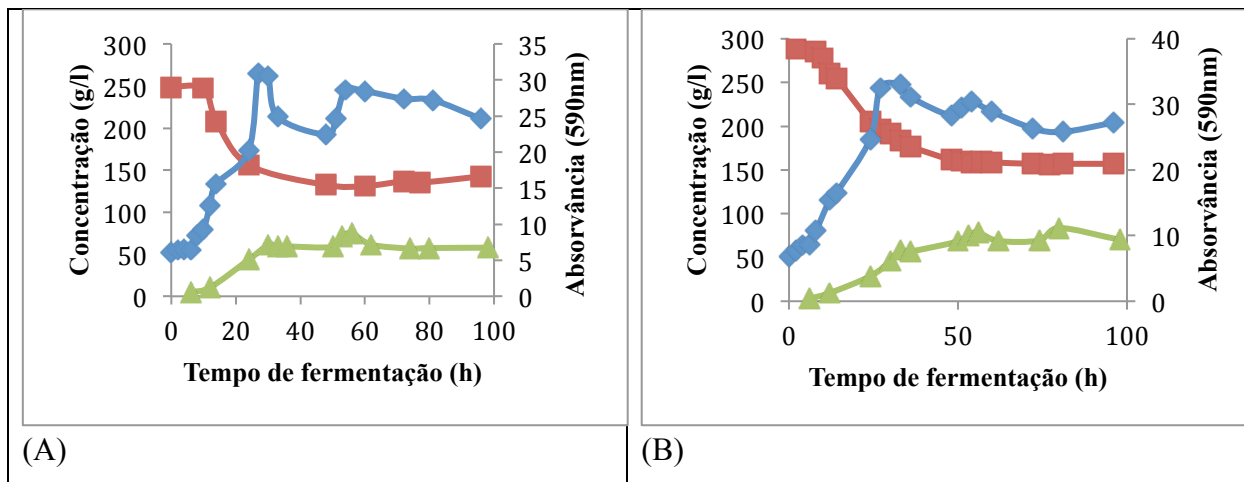


Figura 23 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, (A) no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos sem D-limoneno, a uma concentração total inicial de 288g/l e (B) no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos com D-limoneno, a uma concentração total inicial de 288g/l. (◆) Absorvância, (Δ) Etanol, (■) Açúcares totais.

A cinética de crescimento, produção de etanol e consumo de açúcares totais, foram caracterizados de modo a compreender a fisiologia do processo de fermentação e poder comparar com os resultados do mesmo ensaio (Alf50%+Cit50%) com do D-limoneno.

Tabela 21 - Cinética de biomassa e etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos a 248 g/l sem d-limoneno (Alf50%+Cit50% sem D-Limoneno) e no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos a 248 g/l com d-limoneno (Alf50%+Cit50% com D-Limoneno).

Fonte de carbono	$Y_{E/S}$ ($\frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{su}}}$ $\frac{b_{\text{strato}}}{b_{\text{strato}}}$)	$T_{A\text{ç}u C}$ (%)	$E_{\text{máx}}$ ($\frac{g_{\text{etanol}}}{l}$)	$P_{\text{Máx}}$ ($\frac{g_{\text{etanol}}}{l h}$)	$Y_{X/E}$ ($\frac{g_{\text{biomassa}}}{g}$ $\frac{\text{etanol}}{\text{etanol}}$)	$\mu_{\text{Máx}}$ (h^{-1})	$X_{\text{Máx}}$ ($\frac{g_{\text{biomassa}}}{l}$)	$Y_{X/S}$ ($\frac{g_{\text{biomassa}}}{g}$ $\frac{\text{substrato}}{\text{substrato}}$)
Alf50%+ Cit50% sem D- limoneno	0,428 ± 0,055 ^a	42,627	74,872 **	1,314 **	0,143 ± 0,012 ^a	0,070 ± 0,015 ^a	11,56	0,051 ± 0,004 ^a
Alf50%+ Cit50% com D- limoneno	0,510 ± 0,032 ^b	45,665	83,663 **	1,087 **	0,059 ± 0,012 ^b	0,034 ± 0,003 ^b	18,61	0,037 ± 0,006 ^b

Valores médios ± desvio padrão, realizados em três replicados.

Rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$), Percentagem de açúcares consumidos ($T_{A\text{ç}u C}$), Etanol máximo ($E_{\text{máx}}$), Produtividade máxima de etanol ($P_{\text{Máx}}$), Rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$), Taxa específica de crescimento máximo ($\mu_{\text{Máx}}$), biomassa máxima ($X_{\text{Máx}}$) e Rendimento de biomassa/substrato ($Y_{B/S}$).

* Valores repetidos para fins estatísticos de comparação, com o mesmo tipo de rácio Alf50%+Cit50% estudado no subcapítulo 2. Do capítulo Resultados e Discussão.

** Os valores de $E_{\text{máx}}$ e de $P_{\text{Máx}}$ em ambos os rácios, com e sem D-limoneno, não apresentaram desvio padrão devido ao número de replicados, viáveis para estudo estatístico, ser muito baixo.

A taxa específica de crescimento máximo, $\mu_{\text{Máx}}$ e a biomassa máxima, $X_{\text{Máx}}$ foram determinados através de modelação bifásica, pelo programa **DMFit modelling Tool**.

No perfil de crescimento celular, caracterizado pela absorvância (Figura 23. – A), foi possível verificar um período de adaptação da levedura ao meio fermentativo de aproximadamente 6h. Após a fase *lag* a levedura iniciou a fase de crescimento exponencial, terminando às 27h com cerca de 37% do açúcar inicial consumido. Nessa fase foi obtido uma taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{Máx}}$) de $0,070 h^{-1}$, terminando a mesma, ao atingir um valor de biomassa máximo ($X_{\text{Máx}}$) de $11,19 g_{\text{biomassa}}/l$. Após as 27h verificou-se um declínio no crescimento celular até às 48h. A levedura durante esta fase suspende a produção de etanol e consumiu cerca de 10% do açúcar existente no meio para voltar a crescer. Às 48h verificou-se uma ligeira produção de etanol, juntamente com um novo crescimento celular até às 54h, entrando de seguida em fase estacionária por volta das 72h e imediatamente a seguir a levedura inicia

uma lenta morte celular até ao final da fermentação, terminando com uma percentagem de açúcares iniciais consumidos ($T_{A_{cuC}}$) de 42,627%.

Após a levedura ter decrescido por volta das 30h e ter suspenso a produção de etanol, a mesma, não necessitou de consumir etanol presente no meio para voltar a crescer. Visto isto foi possível afirmar que o declínio no crescimento celular não foi causado pelo comportamento de diauxia na levedura. Deduziu-se que o mesmo teve como causa o término do consumo de glucose e o início da síntese da enzima invertase para converter a sacarose. Esta conclusão não pode ser comprovada, visto que a quantificação do consumo de açúcar foi efetuada por refractómetro e o aparelho não ser fíavel em quantificações a partir de um certo tempo de fermentação, tendo já obtido esta conclusão em discussões anteriores.

Comparando com os resultados do mesmo rácio com D-limoneno (figura 23. – B), verificou-se que a levedura obteve um menor valor de $\mu_{Máx}$, terminando a fase de crescimento com um valor maior de $X_{Máx}$ ($\mu_{Máx} = 0,034 \text{ h}^{-1}$ $X_{Máx} = 18,61 \text{ g}_{biomassa}/l$, respectivamente). Após a fase de crescimento, às 27h, houve uma pequena diminuição nos valores de absorvância, sem ter afetado a produção de etanol. A levedura entrou em uma fase lenta de morte celular após o segundo crescimento celular, terminando a fermentação com um valor de $T_{A_{cuC}}$ de 45,665%.

Nos estudos realizados por Wilkins et al., (2007), não foram referidos quaisquer tipos de interferência deste composto tanto na taxa específica de crescimento celular como no valor máximo de biomassa. Visto este aspecto, pode-se afirmar que na ausência de D-limoneno a levedura tende a ter um maior crescimento celular e contrariamente, uma menor produção de biomassa.

Ao analisar os parâmetros de etanol acima representados (tabela 21.), verificou-se que o rácio sem D-limoneno obteve em pico máximo de produção de etanol ($E_{Máx}$) de 74,872 g_{etanol}/l , às 57h de fermentação, após efetuar o segundo crescimento exponencial, sendo caracterizado por uma produtividade de etanol máxima ($P_{máx}$) de 1,314 $\text{g}_{etanol}/l \text{ h}$. Comparando com os resultados da fermentação com D-limoneno, o pico de etanol máximo obtido foi mais tarde, por volta das 77h, verificando-se um valor de $E_{máx}$ de 83,603 g_{etanol}/l e um $P_{máx}$ de 1,087 $\text{g}_{etanol}/l \text{ h}$.

Relativamente ao rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$), no ensaio sem D-limoneno, pode-se concluir que a levedura utilizou grande parte do substrato presente no meio para a síntese de etanol, visto ter obtido um valor elevado ($Y_{E/S} = 0,428 \text{ g}_{etanol}/\text{g}_{substrato}$), na fermentação com D-

limoneno, também foi obtido um alto valor de $Y_{E/S}$, perto do valor teórico máximo ($0,510 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$). A pequena diferença entre os valores de $Y_{E/S}$, pode dever-se à maior produção de etanol no rácio Alf50%+Cit50% com D-limoneno.

Pelo rendimento biomassa/etanol ($Y_{X/E}$) foi possível verificar que na presença de D-limoneno, devido a uma maior produção de etanol, o valor de $Y_{X/E}$ foi menor ($0,059 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{etanol}}$) do que na ausência do mesmo composto ($0,143 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{etanol}}$). Esta diferença foi devido aos baixos valores de etanol e aos altos valores de biomassa obtidos neste ensaios.

Através da concentração de açúcares totais e da concentração de etanol produzido foi possível calcular a concentração de substrato consumido e a concentração de substrato utilizado no processo de fermentação alcoólica, pela levedura.

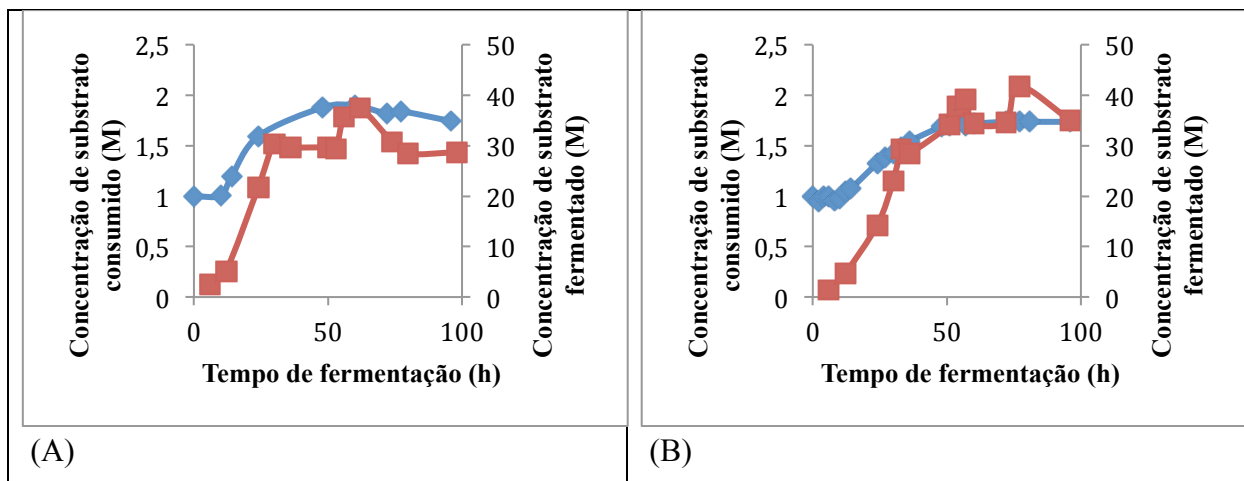


Figura 24 - Representação gráfica da concentração de substrato consumidos e de substrato fermentados da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, (A) no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos sem D-limoneno, a uma concentração total inicial de 288g/l e (B) no rácio 50 % de extrato de alfarroba + 50 % de licor de citrinos com D-limoneno, a uma concentração total inicial de 288g/l. (◆)substrato consumidos e (■)substrato fermentados alcoolicamente.

Observando ambos os gráficos na figura 24., constatou-se que a levedura na presença de D-limoneno utilizou uma maior quantidade de substrato para conversão a etanol pelo processo fermentativo, do que na ausência de D-limoneno. A representação da concentração de substrato fermentados alcoolicamente, em ambos os ensaios, veio a confirmar a diferença entre os valores de $Y_{E/S}$ e de $E_{\text{máx}}$ obtidos no ensaio com D-limoneno. Relativo à concentração de substrato consumido, verificou-se que a levedura teve um alto consumo nas primeiras 48h referentes à fase de crescimento celular. Após ter visto este aspecto, juntamente com as baixas

concentrações de etanol, obteve-se um rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$) maior, do que no ensaio com D-limoneno.

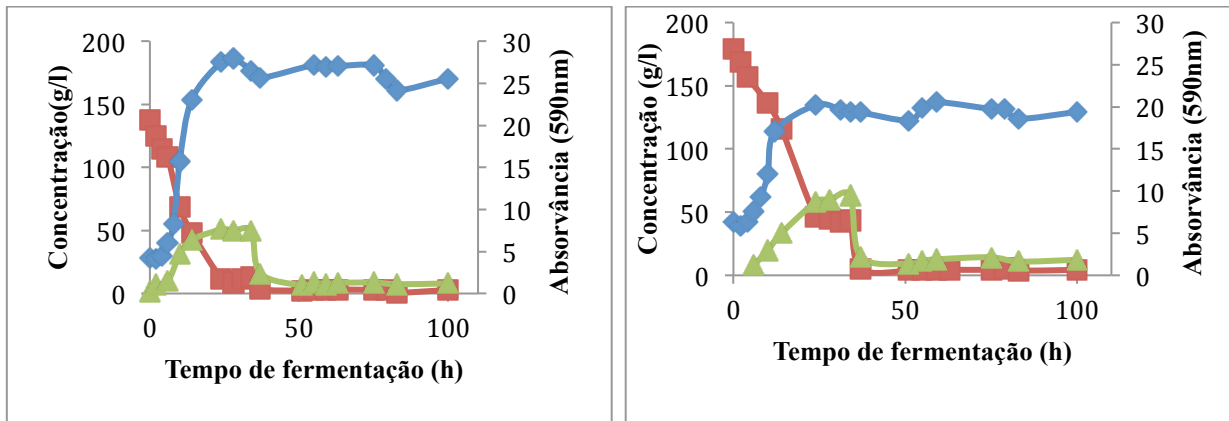
Analisando globalmente todos os valores obtidos neste ensaio sem D-limoneno e no ensaio com D-limoneno, foi possível concluir que o D-limoneno têm efeito no crescimento celular e na produção de etanol, diminuindo ambos os valores na sua ausência. O efeito na produção de etanol, não foi de encontro com o principal objetivo deste estudo demonstrado por Wilkins., et al.(2007). Devido ao mesmo ter verificado diminuições na concentrações de etanol, em fermentações com concentrações de D-limoneno iguais ou superiores a 0,14% ($V_{\text{citrinos}}/V_{\text{D-limoneno}}$). Visto esta situação, colocou-se em causa as conclusões obtidas no ensaio realizado, devido a não ter sido possível quantificar o D-limoneno, existente na amostra de licor de citrinos, antes e depois da sua extração.

Porém Wilkins., et al. (2007) afirma que na presença de D-limoneno, a produção de etanol tende a ser maior se efetuar-se correção do pH para valores de 6.0 antes de iniciar a fermentação. Este aspecto pode ser interessante para futuros ensaios com licor de citrinos, visto que não foi efetuado qualquer tipo de correção de pH em todas as fermentações efetuadas com licor de citrinos.

5. Efeito de diferentes concentrações de licor de citrinos no desenvolvimento e produção de etanol, pela levedura *Saccharomyces Cerevisiae F13A*, em sistemas descontínuos, *Erlenmeyer*.

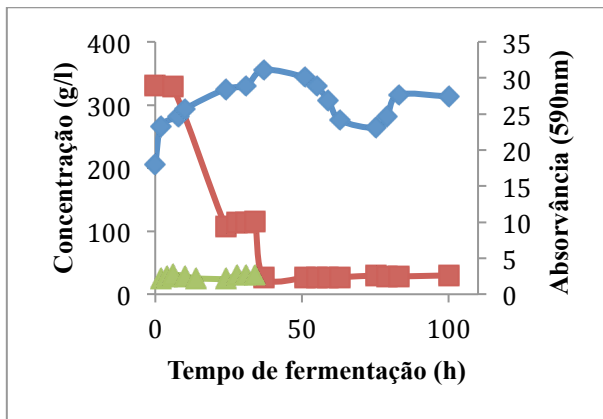
Neste ensaio foram testadas diferentes concentrações de licor de citrinos, apresentando uma concentração inicial de 130, 180 e 330 g/l, com o objetivo de selecionar a melhor concentração de citrinos para a produção de etanol e crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A.

Avaliou-se periodicamente vários parâmetros cinéticos, como a absorvância, consumo de açúcares e produção de etanol, com objetivo de representar estes parâmetros ao longo do tempo de fermentação, para cada concentrações de licor de citrinos testada (figuras 25. A – C) e de efetuar cálculos correspondentes à cinética e aos parâmetros energéticos (tabela 22).



(A)

(B)



(C)

Figura 25 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes concentrações iniciais de licor de citrinos. 130 g/l (A), 180 g/l (B) e 330 g/l (C). (◆) Absorvância, (Δ) Etanol, (■) Açúcares totais

Analisando os gráficos representados na figura 24. A – C, constatou-se que todas as concentrações de licor de citrinos e a fonte de azoto escolhida foram favoráveis ao crescimento do microrganismo, obtendo diferentes perfis de crescimento em cada concentração estudada.

A taxa específica de crescimento máximo, μ_{Max} e a biomassa máxima, X_{Max} foram determinadas através de modelação bifásica, usando o programa de modelação **DMFit modelling Tool**.

Tabela 22 - Cinética de biomassa e etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes concentrações iniciais de licor de citrinos 130 g/l, 180 g/l e 330 g/l.

Licor de citrinos	$Y_{E/S}$ (g _{etanol} /g _{substrato})	$T_{A\text{ç}u\ C}$ (%)	$E_{\text{máx}}$ (g _{etanol} /l)	P_{Max} (g _{etanol} /l h)	$Y_{X/E}$ (g _{biomassa} /g _{etanol})	μ_{Max} (h ⁻¹)	X_{Max} (g _{biomassa} /l)	$Y_{x/s}$ (g _{biomassa} /g _{substrato})
130 g/l	0,382 ± 0,026 ^b	99,577	50,734 ± 6,962 ^b	2,114 ± 1,486 ^a	0,242 ± 0,016 ^b	0,153 ± 0,018 ^a	11,24	0,089 ± 0,004 ^a
180 g/l	0,428 ± 0,023 ^a	97,944	63,033 ± 8,051 ^a	1,854 ± 1,342 ^a	0,119 ± 0,009 ^c	0,081 ± 0,019 ^c	7,85	0,037 ± 0,003 ^b
330 g/l	0,132 ± 0,018 ^c	91,867	30,872 ± 5,521 ^c	0,908 ± 0,959 ^b	0,375 ± 0,066 ^a	0,115 ± 0,069 ^b	37,01	0,036 ± 0,007 ^b

Valores médios ± desvio padrão, realizados em três replicados.

Rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$), Percentagem de açúcares consumidos ($T_{A\text{ç}u\ C}$), Etanol máximo ($E_{\text{máx}}$), Produtividade máxima de etanol (P_{Max}), Rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$), Taxa específica de crescimento máximo (μ_{Max}), biomassa máxima (X_{Max}) e Rendimento de biomassa/substrato ($Y_{B/S}$).

Dentro de cada coluna, os valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$)

No ensaio com uma concentração de 130 g/l, a levedura após 4h de adaptação ao meio (fase “lag”), entra na fase de crescimento exponencial com cerca de 16,876% dos açúcares iniciais consumidos, até às 28h. Verificou-se de seguida, um abrandamento no crescimento celular até às 37h, causado pela falta de substrato no meio fermentativo. O início da fase estacionária foi caracterizada pelo efeito de diauxia, sendo este comportamento visível posteriormente, pela análise da taxa específica de consumo do substrato. Após iniciar o consumo de etanol, a levedura manteve-se no estado estacionário até final da fermentação.

A levedura no ensaio a 180 g/l, passou por um fase “lag” de 4h. Após ter consumido cerca de 12,356% dos açúcares iniciais, iniciou a fase de crescimento exponencial até às 24h. Devido à falta de substrato a levedura adquire o comportamento de diauxia, após 34h, entrando em fase estacionária até ao final da fermentação.

No ensaio com 330 g/l, verificou-se um crescimento celular, logo após a inoculação. A levedura conclui a sua fase de crescimento depois de ter consumido todo o substrato presente no meio (91,867%), atingindo a sua fase estacionária por volta das 37h. Depois das 51h a levedura entra em fase de declínio, iniciando uma segunda fase de crescimento celular após as 75h. Devido à falta da quantificação do etanol presente no meio, após as 31h de fermentação, supôs-se que a segunda fase de crescimento foi caracterizada pelo início do consumo do

mesmo, devendo-se ao comportamento adquirido pela levedura nas restantes concentrações de licor de citrinos testadas.

No final da fermentação obtiveram-se percentagens de açúcares consumidos ($T_{AçuC}$) de 99,577% no meio com 130 g/l, de 97,944% no meio com 180 g/l e de 91,867% no meio com 330 g/l, indicando que houve o consumo total de todos os açúcares iniciais.

As fermentações iniciaram com uma concentração de açúcares totais, inferior ao estipulado, devido ao licor de citrinos ter precipitado após a esterilização. Contudo, mesmo sabendo que os mesmos iriam precipitar, foi feita uma decantação e uma filtração do meio, durante a passagem do volume inicial esterilizado para cada *Erlenmeyer*. O ensaio que ficou com mais partículas de precipitado em suspensão foi o ensaio de 330 g/l. O precipitado afetou determinadas leituras, como por exemplo a concentração de células através do peso seco, os valores de absorvância e principalmente a determinação do etanol a partir das 34h no ensaio a 330 g/l.

Devido ao excesso de precipitado, causado pela esterilização do meio fermentativo, os valores da concentração de células obtidas pelo peso seco no ensaio a 330 g/l, ficaram bastante alteradas, como tal verificou-se uma modelação bifásica errada, levando a não considerar credíveis, para fins comparativos com os restantes ensaios, os valores obtidos da taxa de crescimento máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$) e o valor de biomassa máximo ($X_{m\acute{a}x}$).

A taxa específica de crescimento celular foi estatisticamente diferentes entre ambos os ensaios. No ensaio a 130 g/l o valor obtido de $\mu_{m\acute{a}x}$ foi o mais elevado ($0,153\text{ h}^{-1}$), enquanto que no meio a 180 g/l o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ foi igual a $0,081\text{ h}^{-1}$. Em relação ao valor de $X_{m\acute{a}x}$, foi verificado o maior valor no ensaio a 130 g/l ($11,25\text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{l}$), do que no ensaio a 180 g/l ($7,85\text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{l}$), ambos os valores foram atingidos logo após o final da fase de crescimento.

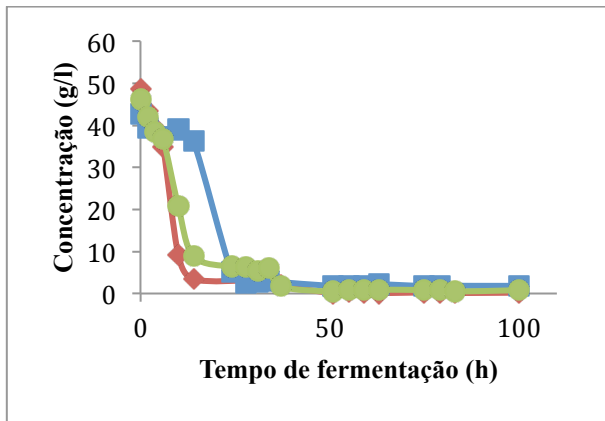
Através dos dados obtidos pela quantificação do etanol, foi possível verificar que houve maior produção de etanol durante a fase de crescimento exponencial, obtendo assim o máximo da concentração de etanol ($E_{M\acute{a}x}$) no final dessa fase em cada ensaio. O valor $E_{M\acute{a}x}$ obtido no meio contendo 180 g/l, por volta das 34h de fermentação, foi de $63,033\text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$, sendo este o maior valor obtido entre os três ensaios. No meio a 130 g/l, obteve-se um valor de $E_{M\acute{a}x}$ igual a $50,734\text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$ e no ensaio a 330 g/l o valor $E_{M\acute{a}x}$ foi de $30,872\text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$. Contudo verificou-se um maior produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$) na primeira concentração ($P_{m\acute{a}x}$

130 g/l = 2,114 g_{etanol}/l h) devido ao valor de $E_{Máx}$ ter sido obtido às 24h, relativamente cedo em comparação com as restantes concentrações.

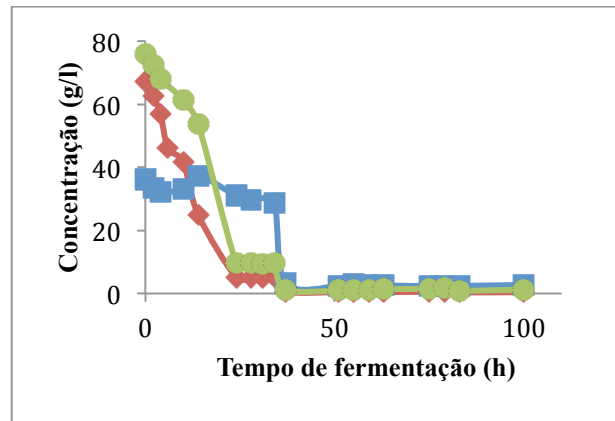
Devido aos problemas de precipitado no ensaio a 330 g/l, concluiu-se que houve maior produção de etanol na maior concentração de licor de citrinos. Comprovou-se assim a afirmação feita nos ensaios anteriores realizados em rácios (Subcapítulo 2. – III Capítulo).

Em relação ao valor do rendimento biomassa/etanol ($Y_{X/E}$) obtido, verificou-se que o ensaio a 180 g/l apresentou um menor rendimento (0,119 g_{etanol}/g_{substrato}), devido à levedura utilizar grande parte do substrato para a produção de etanol ($Y_{E/S} = 0,428$ g_{etanol}/g_{substrato}). Enquanto que no ensaio 130 g/l, a levedura utilizou mais o substrato para a produção de biomassa ($Y_{X/S} = 0,089$ g_{biomassa}/g_{substrato}), sendo comprovado pelos altos valores de absorvância, proporcionando assim um alto valor de $Y_{X/E}$ (0,242 g_{etanol}/g_{substrato}).

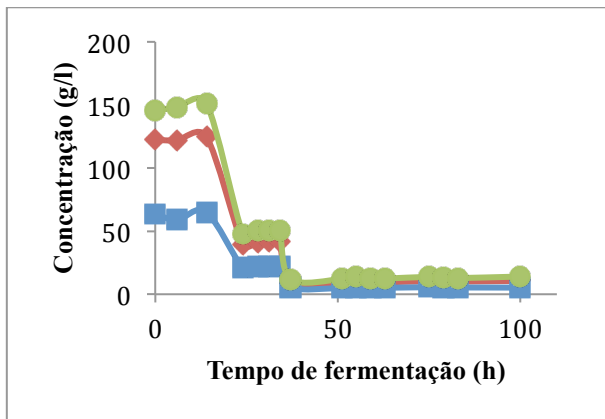
O licor de laranja apresenta maioritariamente na sua composição três tipos de açúcares que podem ser consumidos pela levedura *S. cerevisiae* F13A. Dado que a análise dos açúcares foi efetuada através de HPLC foi possível representar os perfis de consumo da glucose, frutose e sacarose ao longo do tempo de fermentação, nas diferentes concentrações em estudo.



(A)



(B)



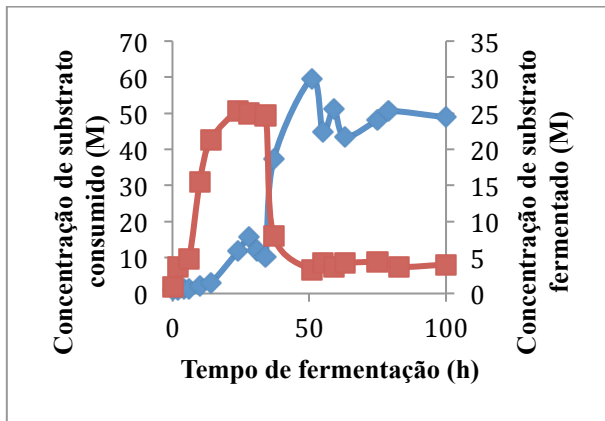
(C)

Figura 26 - Perfis de consumo de Glucose, Sacarose e Frutose ao longo do crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes concentrações de licor de citrinos. 130 g/l (A), 180 g/l (B) e 330 g/l (C). (◆) Glucose, (■) Sacarose, (●) Frutose.

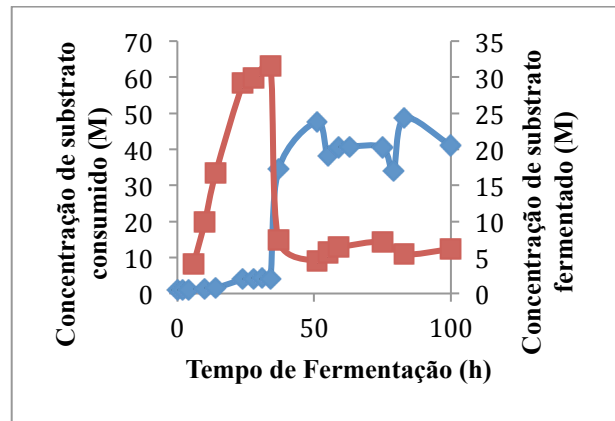
Através da observação da figura 26. - A a C, foi possível verificar na concentração 130 g/l, 180 g/l que o primeiro açúcar a ser consumido pela levedura foi a glucose e a frutose, seguida da sacarosa após término da glucose. Na concentração 330 g/l verificou-se um consumo semelhante dos três açúcares analisados, ao longo do tempo de fermentação, podendo dever-se à escassez de glucose do meio de inoculação, com a consequente ativação da produção da invertase.

Verificou-se que houve um consumo total do substrato por volta das 34h de fermentação, na qual coincidiu com o decréscimo na produção de etanol, mencionada anteriormente, nos ensaios a 130 e 180 g/l.

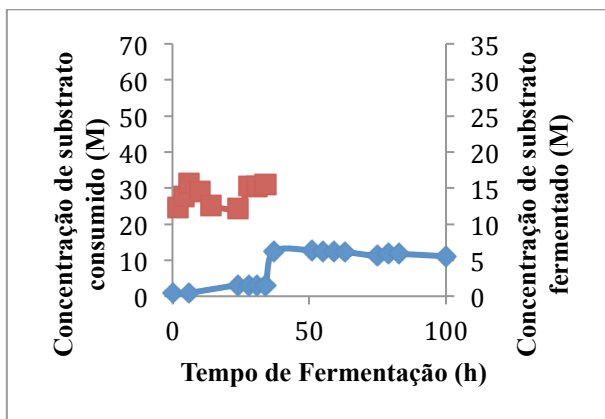
Através da concentração de açúcares totais e do etanol produzido foi possível calcular a concentração de substrato consumido e de substrato fermentado via alcoólica, pela levedura.



(A)



(B)



(C)

Figura 27 - Representação gráfica da concentração de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes concentrações de licor de citrinos: 130 g/l (A), 180 g/l (B) e 330 g/l (C). (◆)substrato consumido e (■)substrato fermentado.

Analisando os gráficos da concentração de substrato consumido e fermentado (figura 27.), verificou-se que durante o crescimento da levedura houve um maior consumo de substrato em processos de fermentação alcoólica do que em síntese de biomassa, confirmando o início da produção de etanol logo após a inoculação. A partir das 34h surge uma queda bastante acentuada na concentração de substrato fermentado, aumentando significativamente a concentração de substrato consumido, indicando assim o efeito de diauxia. A levedura prosseguiu com a manutenção e síntese de biomassa, através do consumo de etanol, terminando a produção do mesmo. Estes resultados vieram a comprovar os altos valores de rendimentos de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$) obtidos nestes ensaios, causados pelo efeito de diauxia na levedura.

Maia (2011) testou diferentes concentrações de licor de citrinos, 12,5 g/l, 25 g/l, 37,5 g/l e 50 g/l, com um microrganismo *Penicillium expansum*, na produção do agente de controlo biológico, em meio YEPD. Em uma análise global aos parâmetros cinéticos, a mesma verificou que os resultados foram mais favoráveis no ensaio realizado a 50 g/l. Havendo contudo algumas exceções. Em relação ao $Y_{X/S}$, a mesma obteve um maior na concentração de açúcar mais baixa. A mesma não realizou estudos sobre a produção de etanol. Através dos

resultados do perfil de consumo diferenciado dos açúcares, foi possível verificar através de todas as concentrações, que também houve um consumo de todos os açúcares após as 18h de fermentação.

Comparando com resultados cinéticos obtidos no licor de citrinos a uma concentração de 130 g/l (tabela 18. do subcapítulo 1 – III capítulo), mesmo sem ter sido possível quantificar corretamente o consumo de açúcar ao longo do tempo de fermentação, verificou-se que houve uma maior produção de etanol ($Y_{E/S} = 0,470 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) num maior espaço de tempo ($P_{M\acute{a}x} = 1,491 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l h}$), uma taxa específica de crescimento celular maior ($\mu_{M\acute{a}x} = 0,180 \text{ h}^{-1}$) em relação à mesma concentração neste ensaio realizado ($Y_{X/S} = 0,382 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$; $P_{M\acute{a}x} = 2,114 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l h}$; $\mu_{M\acute{a}x} = 0,153 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Em relação ao consumo de etanol durante a fermentação, verificou-se um ligeiro consumo no ensaio comparativo por volta das 24h, porém com a realização de mais ensaios verificou-se a mesma situação em todos os ensaios contendo licor de citrinos. Concluiu-se que a discrepância entre os resultados, com a mesma concentração de licor de citrinos, tenha sido devido à diferença entre inóculos.

Analisando globalmente os parâmetros cinéticos apresentados na tabela 22. foi possível concluir que diferentes concentrações iniciais de licor de citrinos presentes no meio fermentativo, influenciaram de maneiras diferentes o crescimento e produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* F13A. Para uma maior produção de biomassa a levedura tem preferência por baixas concentrações e licor de citrinos e para maiores produções de etanol a levedura tem preferência por concentrações mais altas. Para haver produção contínua de ambos produtos deve haver sempre presente a mesma concentração de substrato ao longo da fermentação.

6. Comparação da produção de etanol em diferentes concentrações de ureia e meio YEPD

Rodrigues F. (2011) otimizou a fonte de azoto no meio de fermentação da *Saccharomyces cerevisiae* F13A para produção de etanol, a partir da polpa de alfarroba. Concluiu que a ureia foi a melhor fonte de azoto, pelo facto de apresentar uma elevada produção de etanol ($107,3 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$), um rendimento etanol/substrato próximo do máximo teórico ($0,48 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$), por promover o consumo quase total dos açúcares (93%) e por representar uma das fontes de azoto menos dispendiosas.

Para complementar o estudo realizado por Rodrigues F. (2011), realizou-se um ensaio variando a concentração inicial de ureia, com o objetivo de verificar se a levedura obtém bons

níveis de produção e rendimento de etanol, comparar os resultados com fontes orgânicas de azoto utilizadas no meio YEPD e decidir qual a menor concentração de ureia a utilizar.

A absorvância, o consumo de açúcares totais e a produção de etanol foram medidos e representados na figura 28.. Os resultados correspondentes aos estudos cinéticos encontram-se representados na tabela 23.

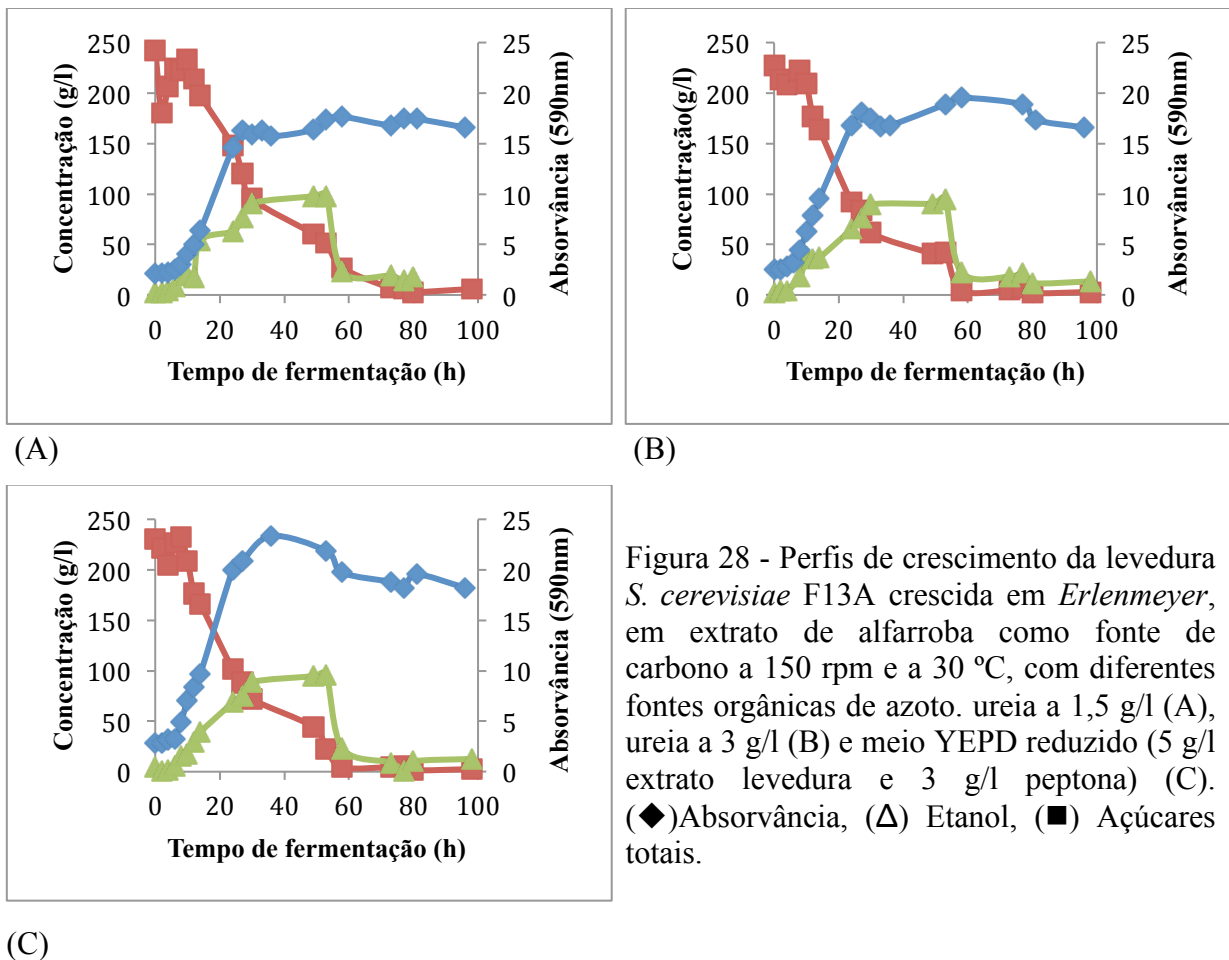


Figura 28 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (A), ureia a 3 g/l (B) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (C). (◆)Absorvância, (Δ) Etanol, (■) Açúcares totais.

Analisando a figura 28. - A a C, verificou-se que todas as fontes de azoto foram favoráveis ao crescimento e desenvolvimento da levedura. Os parâmetros de crescimento e cinética de fermentação mostram diferenças estatísticas, que serão discutidas de seguida.

A taxa específica de crescimento máximo, μ_{Max} e a biomassa máxima, X_{Max} foram determinadas através do **DMFit modelling Tool**.

Tabela 23 – Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (Ureia 1,5 g/l), ureia a 3 g/l (ureia 3 g/l) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (YEPD).

Fonte de azoto	$Y_{E/S}$ (g _{etanol} /g _{substrato})	$T_{A\zeta uC}$ (%)	$E_{m\acute{a}x}$ (g _{etanol} /l)	$P_{M\acute{a}x}$ (g _{etanol} /l h)	$Y_{X/E}$ (g _{biomassa} /g _{etanol})	$\mu_{M\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	$X_{M\acute{a}x}$ (g _{biomassa} /l)	$Y_{X/S}$ (g _{biomassa} /g _{substrato})
Ureia 1,5g/l	0,497 ± 0,041 ^a	97,543	97,920	1,702	0,047 ± 0,004 ^b	0,078 ± 0,015 ^b	8,32	0,020 ± 0,003 ^b
Ureia 3,0g/l	0,446 ± 0,036 ^c	98,700	94,747 ± 9,640 [*]	1,788 ± 1,324 ^{**}	0,045 ± 0,006 ^c	0,026 ± 0,007 ^c	7,68	0,020 ± 0,003 ^b
YEPD	0,471 ± 0,019 ^b	98,889	95,990 ± 9,974 [*]	1,811 ± 1,370 ^{**}	0,050 ± 0,005 ^a	0,067 ± 0,016 ^a	7,06	0,022 ± 0,003 ^a

Valores médios ± desvio padrão, realizados em três replicados.

Rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$), Percentagem de açúcares consumidos ($T_{A\zeta uC}$), Etanol máximo ($E_{m\acute{a}x}$), Produtividade máxima de etanol ($P_{M\acute{a}x}$), Rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$), Taxa específica de crescimento máximo ($\mu_{M\acute{a}x}$), biomassa máxima ($X_{M\acute{a}x}$) e Rendimento de biomassa/substrato ($Y_{B/S}$).

Dentro de cada coluna, os valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$).

* As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento não são grandes o suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença é devido á variabilidade de amostragem aleatória, não há uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,495$).

** As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento não são grandes o suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença é devido á variabilidade de amostragem aleatória, não há uma diferença estatisticamente significativa ($\mu=0,925$).

** As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento não são grandes o suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença é devido á variabilidade de amostragem aleatória, não há uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,697$).

*,** O poder do teste realizado (0,047; 0,047; 0,049, respectivamente) é inferior ao poder desejado de 0,8000. Menor que a potencia desejada indica que são menos propensos a detectar a diferença quando um realmente existe.

Nos perfis de crescimento correspondentes à absorvância foi possível verificar um comportamento diferente nos três ensaios efetuados. Em ambos os ensaios, a levedura sofreu um processo de adaptação ao meio de aproximadamente 4h, sem consumo de substrato. Após adaptação ao meio, iniciou a fase de crescimento exponencial até às 27h. Após as 27h no meio YEPD a levedura entra lentamente em fase de morte celular, enquanto que nos restantes ensaios (Ureia 1,5 e 3,0 g/l) verificou-se um ligeira diminuição de biomassa, entrando em fase estacionária até às 72h de fermentação e de seguida em morte celular.

No meio YEPD a levedura entra em morte celular logo após o consumo total do substrato inicial, contrariamente em ambos os ensaios com ureia a levedura permaneceu aproximadamente 24h em fase estacionária, mesmo tendo consumido todo o substrato inicial, entrando de seguida em morte celular até ao final da fermentação.

Obtiveram-se percentagens de açúcares consumidos ($T_{AçuC}$) de 97,543% no ensaio com ureia a 1,5 g/l, 98,700% no ensaio a 3,0g/l e no ensaio contendo meio YEPD obteve-se um valor de 98,889%.

A fase exponencial foi mais acentuada no ensaio com YEPD, apresentando uma elevada taxa específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de $0,067\text{ h}^{-1}$, atingindo um valor máximo de biomassa ($X_{M\acute{a}x}$) de $7,06\text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{l}$. No ensaio com ureia a 1,5 g/l, a fase de crescimento foi caracterizada por um valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ de $0,038\text{ h}^{-1}$ e um valor de $X_{M\acute{a}x}$ igual a $8,32\text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{l}$. O ensaio contendo ureia a 3,0 g/l verificou-se um valor de $X_{M\acute{a}x}$ igual a $7,68\text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{l}$ e o menor valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ de $0,026\text{ h}^{-1}$.

A produção de etanol, nos três ensaios, acompanhou o crescimento da levedura. Terminando a sua produção após escassez do substrato. Foi no ensaio contendo ureia a 1,5 g/l que se verificou o maior valor de produção máxima de etanol ($E_{m\acute{a}x}$), chegando a obter $97,920\text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$ por volta das 58h de fermentação, mesmo sem todo o substrato ter sido consumido. Este valor proporcionou uma produtividade de etanol ($P_{m\acute{a}x}$) de $1,702\text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l h}$. No meio YEPD, foi onde se verificou o maior valor de $P_{m\acute{a}x}$ igual a $1,811\text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l h}$, devido ao pico de etanol ter sido alcançado mais cedo, em relação aos restantes ensaios.

O rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$) foi praticamente semelhante nos três ensaios, destacando-se o maior valor no meio com ureia a 1,5 g/l ($Y_{E/S} = 0,497\text{ g}_{\text{etanol}}/\text{Substrato}$), concluindo que a maior parte do substrato foi utilizado no processo fermentativo da levedura, ou seja, na produção de etanol e não unicamente utilizado para a síntese de biomassa. Dos restantes ensaios foi no meio contendo ureia a 3,0 g/l que apresentou o menor valor de $Y_{E/S}$ ($0,446\text{ g}_{\text{etanol}}/\text{Substrato}$).

Mesmo na presença do efeito de diauxia na levedura, em ambos os ensaios, o valor de rendimento biomassa/etanol ($Y_{X/E}$) foi baixo, devido a ter-se obtido elevados valores de rendimento etanol/substrato ($Y_{E/S}$) e baixos valores de rendimento biomassa/substrato ($Y_{X/S}$).

A cinética de produção de etanol foi analisada quantitativamente e a taxa específica de produção foi calculada (q_E) em relação a concentração de etanol.

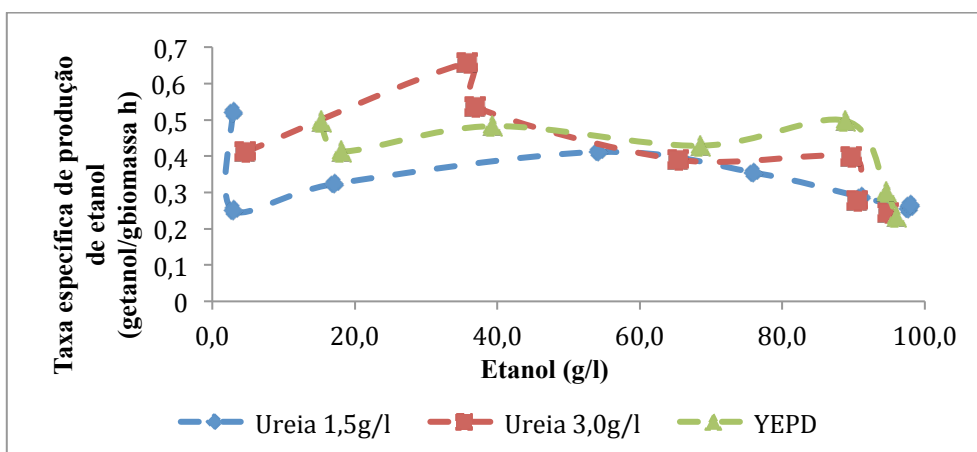


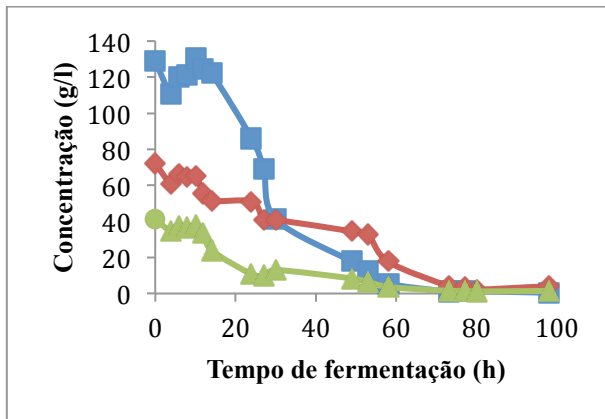
Figura 29 - Taxa específica de produção de etanol com a concentração de etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto. ureia a 1,5 g/l (Ureia 1,5 g/l), ureia a 3 g/l (ureia 3 g/l) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (YEPD).

Como podemos observar na figura 29., os valores de q_E começam a atingir valores próximos de zero após o aumento da concentração de etanol, o que demonstra mais uma vez o efeito inibitório na levedura de altas concentrações de etanol.

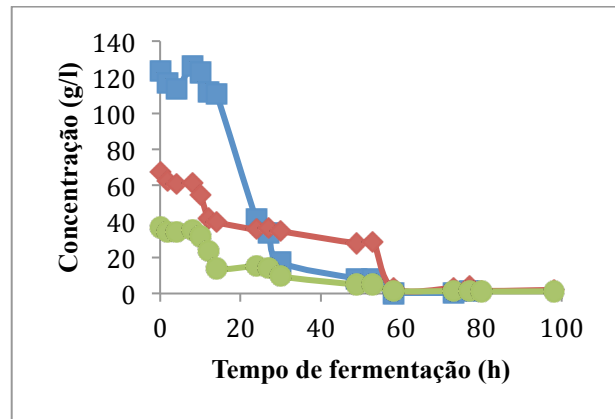
Sabendo que a taxa específica de produção de etanol encontra-se diretamente proporcional à produção de etanol, se a levedura tiver sempre disponível substrato no meio fermentativo, os valores de q_E tendem a aumentar. Torna-se indispensável ter em consideração, para os valores de q_E aumentarem, a necessidade de contornar os efeitos inibitórios do etanol através do aumento do arejamento no meio fermentativo, consoante mencionado por Hyun-Beom., et al. (2009).

Durante o processo fermentativo foram realizados ensaios de propagação de células viáveis, em intervalos de amostras selecionados, obtendo uma concentração de células viáveis por mililitro ao longo do tempo de fermentação. Através da análise dos resultados, verificou-se que ambos os meios iniciaram a fermentação com aproximadamente $5,00 \times 10^6$ UFCs/ml. O máximo de concentração de células viáveis obtidas durante a fermentação foi de $4,83 \times 10^7$ UFCs/ml, correspondentes ao pico máximo da fase exponencial, no meio contendo ureia a 3,0 g/l.

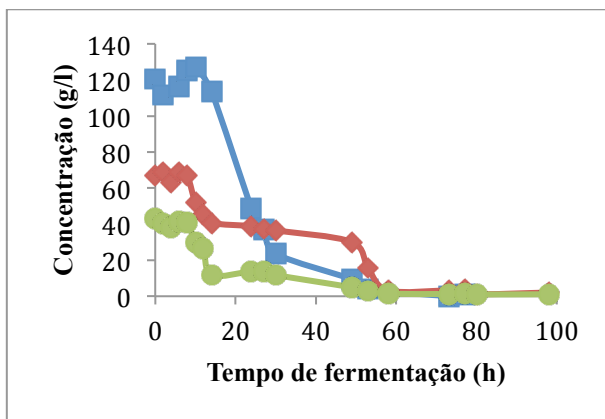
Dado que a análise dos açúcares foi efetuada através de HPLC, foi possível representar os perfis de consumo da glucose, frutose e sacarose ao longo do tempo de fermentação, nos três ensaios.



(A)



(B)

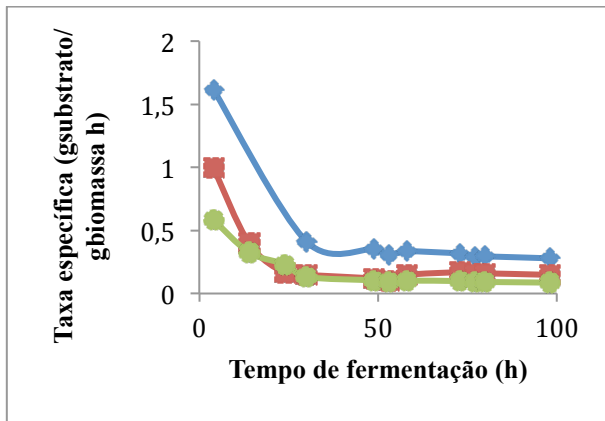


(C)

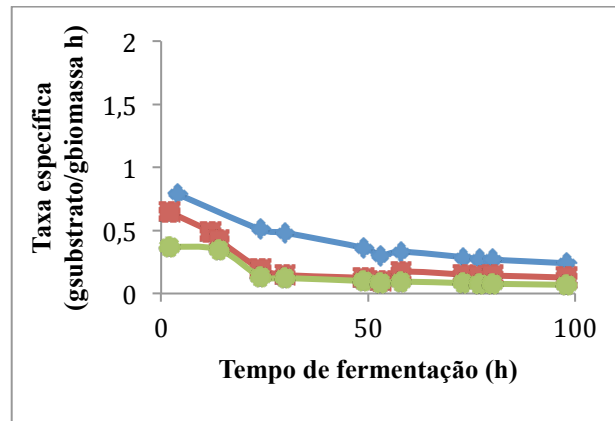
Figura 30 - Perfis de consumo de Glucose, Sacarose e Frutose ao longo do crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto: ureia a 1,5 g/l (A), ureia a 3 g/l (B) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (C). (◆) Glucose, (■) Sacarose, (●) Frutose.

Ao observar a figura 30. - A a C, constatou-se que em todos os ensaios a levedura iniciou o consumo dos açúcares a partir após as 8h, devido à fase *lag*. Após essa fase, verificou-se a preferência pelo açúcar glucose e frutose, característico do crescimento exponencial. Durante a fase estacionária verificou-se a hidrólise da sacarose, o que fez aumentar ligeiramente a concentração glucose livre no meio fermentativos. Por volta das 58h, o consumo de todos os açúcares terminou, assim como a síntese de etanol, iniciando a fase de morte celular.

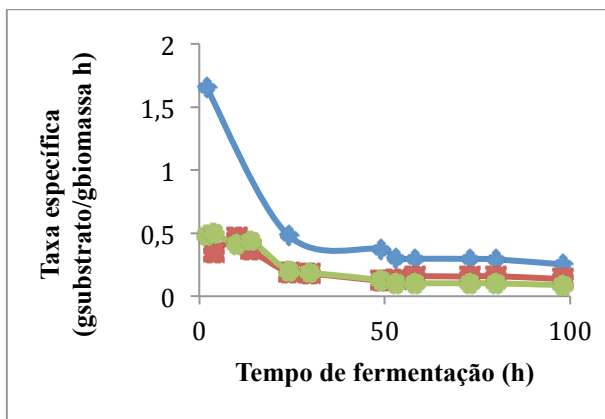
A cinética de consumo de açúcares foi analisada quantitativamente e as taxas de consumo específicos para cada açúcar, foram calculadas (q_s) e representadas em relação ao tempo de fermentação (figura 31.).



(A)



(B)

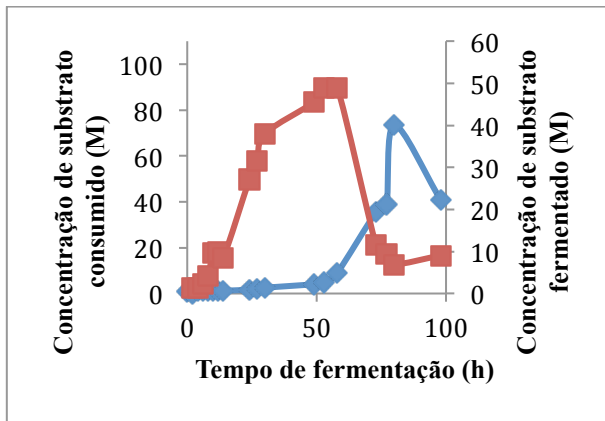


(C)

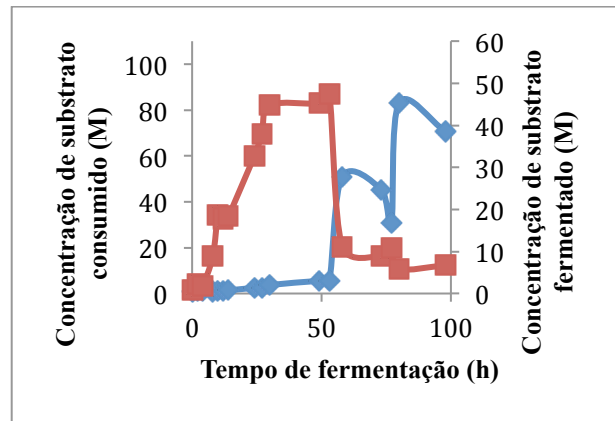
Figura 31 - Taxa específica de consumo da glicose, sacarose e frutose da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto: ureia a 1,5 g/l (A), ureia a 3 g/l (B) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (C). (◆) qS (Sacarose), (■) qS (Glucose), (●) qS Frutose

Como descrito anteriormente, a levedura *S. cerevisiae*, hidrolisa a sacarose utilizando a invertase, na qual é reprimida na presença de altas concentrações de glicose. Os monossacáridos (glicose e frutose) presentes no meio fermentativo, são os primeiros açúcares a entrar para dentro das células, competindo pela molécula permease. Este comportamento foi sustentado pela análise da taxa de consumo específico do açúcar, onde foi possível verificar que a molécula de glicose foi a primeira a decrescer devido à preferência pelo seu transporte para o interior da célula. O ligeiro aumento da taxa específica da glicose por volta das 14h, foi referente à conversão da sacarose. O consumo dos açúcares cessa após as 58h de fermentação.

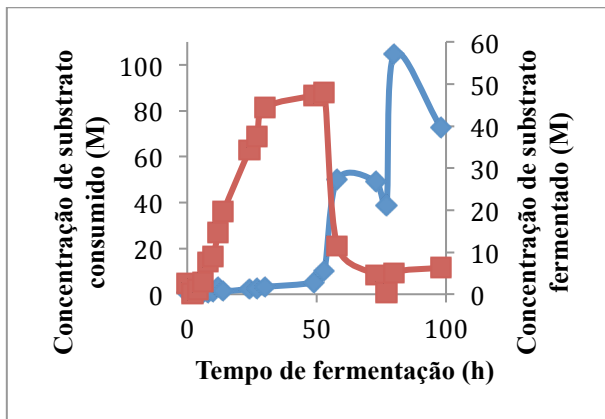
Sabendo a concentração de açúcares totais e a quantidade de etanol produzido ao longo do tempo de fermentação, foi possível representar a concentração de substrato consumido e de substrato fermentado alcoolicamente pela levedura.



(A)



(B)



(C)

Figura 32 - Representação gráfica da concentração de substrato consumido e de substrato fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto: ureia a 1,5 g/l (A), ureia a 3 g/l (B) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (C). (◆) substrato consumido e (■) substrato fermentado.

Analisando as representações gráficas da figura 32. de A a C, verificou-se que houve um comportamento semelhante entre ambas as concentrações de substrato calculadas. Destaca-se em ambos os ensaios, que a produção de etanol iniciou logo após a fase da latência e que a levedura sofreu efeito de diauxia após as 49h de fermentação.

Estes resultados vieram a comprovar a semelhança entre os valores de $Y_{E/S}$ e $Y_{X/S}$ obtidos em ambos os ensaios.

6.1 Percentagem de Azoto total

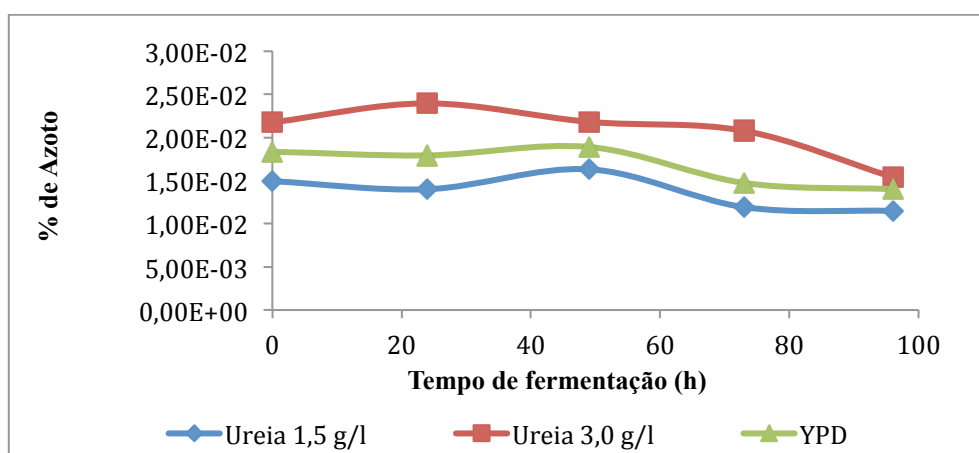


Figura 33 - Determinação do azoto total existente no meio ao longo do tempo de fermentação da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em *Erlenmeyer*, em extrato de alfarroba como fonte de carbono a 150 rpm e a 30 °C, com diferentes fontes orgânicas de azoto: ureia a 1,5 g/l (Ureia 1,5 g/l), ureia a 3 g/l (ureia 3 g/l) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (YEPD).

Tabela 24 - Percentagem de azoto total existente nos meios fermentativos, tendo como fonte de carbono extrato de alfarroba utilizando com diferentes fontes orgânicas de azoto: ureia a 1,5 g/l (Ureia 1,5 g/l), ureia a 3 g/l (ureia 3 g/l) e meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) (YEPD).

Meio fermentativo	% Azoto total	
	Inicial	Final
Ureia 1,5 g/l	1,49x10 ⁻²	1,15x10 ⁻²
Ureia 3,0 g/l	2,18x10 ⁻²	1,54x10 ⁻²
YEPD	1,84x10 ⁻²	1,40x10 ⁻²

Os resultados representados na figura 33. mostram claramente que existe um consumo semelhante do azoto total, ao longo do tempo de fermentação, entre o meio YEPD e os meios contendo a ureia. Relativamente à percentagem de azoto total existente no meio fermentativo antes da inoculação (tabela 24.) verificou-se uma semelhança entre o meio YEPD (1,84x10⁻² %_N) e o meio contendo ureia a 1,5 g/l (1,49x10⁻² %_N), enquanto que o meio contendo ureia a 3,0 g/l, a quantidade de azoto inicial foi mais alta (2,18x10⁻² %_N). Após terminar a fermentação verificou-se a existência de azoto em ambos os ensaios, concluindo que o azoto existente inicialmente foi o suficiente para proporcionar condições à levedura de crescimento e viabilidade, durante todo o tempo de fermentação.

Estes resultados ofereceram uma grande sustentabilidade no uso de uma baixa concentração de ureia (1,5 g/l), com fonte principal de azoto, na produção de etanol em processos

fermentativos com a levedura *S. Cerevisiae* F13A, visto que aos resultados obtidos de $E_{M\acute{a}x}$ de 97,920 g_{etanol}/l, $Y_{E/S}$ 0,497 g_{etanol}/g_{substrato} e de $Y_{E/S}$ 0,027 g_{biomassa}/g_{substrato}, terem sido bastante benévolos.

7. Estudo do crescimento e produção de etanol em fermentação descontínua da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, em sistema descontínuo na Unidade Piloto de 20 litros.

Para poder compreender o funcionamento da unidade piloto (Upi), realizou-se inicialmente uma fermentação com um só substrato, glucose. Este ensaio teve como principal objetivo estudar todo o processo de fermentação realizado em escala pré-industrial, da levedura *S. Cerevisiae* F13A, e verificar o modo de funcionamento de todos os aparelhos existentes na Upi, como posteriormente objectivo de efetuar um estudo com extrato de alfarroba e/ou licor de citrinos.

A cinética da biomassa, o consumo de açúcares e a produção de etanol foram determinados a fim de compreender a fisiologia do processo de fermentação. A variação desses parâmetros durante a fermentação descontínua encontram-se demonstrados na figura 34. e os correspondentes dos cálculos cinéticos encontram-se representados na tabela 25..

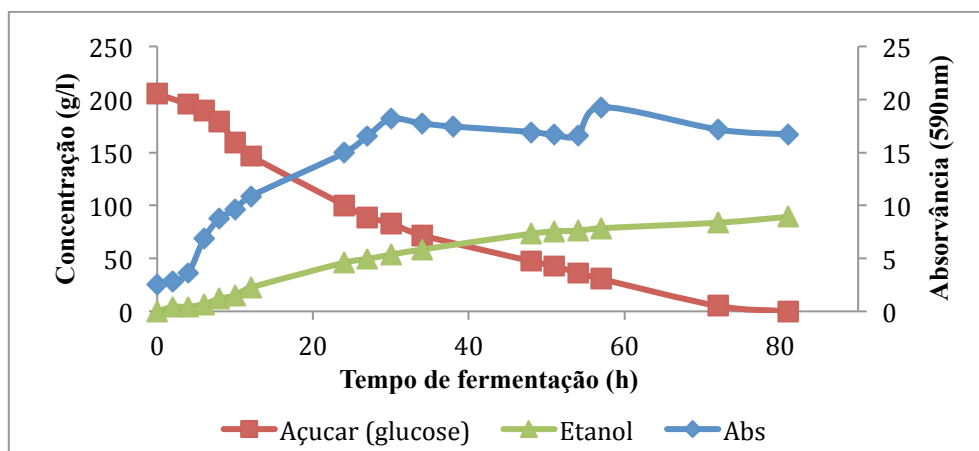


Figura 34 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 vvm e a 30 °C, tendo glucose como fonte de carbono.

Através de modelação bifásica, usando o programa de modelação **DMFit modelling Tool**, foi possível efetuar uma análise detalhada do processo de crescimento da levedura, obtendo o valor da taxa específica de crescimento máximo ($\mu_{M\acute{a}x}$) e o valor de biomassa máxima ($X_{M\acute{a}x}$).

Após inoculação, a levedura iniciou a sua fase de crescimento juntamente com a produção de etanol. A fase exponencial de crescimento foi caracterizada por um valor $\mu_{M\acute{a}x}$ de 0,236 h⁻¹,

terminando por volta das 30h de fermentação após ter consumido 59% do açúcar inicial. Depois da fase de crescimento a levedura iniciou a sua fase estacionária, continuando a produção de etanol e consumo de substrato. Verificou-se um aumento da absorvância por volta das 54h, sem causar qualquer alteração do restantes perfis estudados. A levedura entra numa ligeira fase de declínio após às 57h de fermentação, garantindo continuidade na produção de etanol pelo substrato presente no meio, até ao final da fermentação (81h). O valor de $X_{Máx}$ obtido foi de 6,56 $g_{biomassa}/l$.

Tabela 25 - Perfis de crescimento da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 vvm e a 30 °C, com glucose como fonte de carbono.

Fonte de carbono	$Y_{E/S}$ (g_{etanol}/g_{su} $bstrato$)	$T_{Açuc}$ (%)	$E_{máx}$ (g_{etanol}/l)	$P_{Máx}$ ($g_{etanol}/l\ h$)	$Y_{X/E}$ ($g_{biomassa}/g$ $etanol$)	$\mu_{Máx}$ (h^{-1})	$X_{Máx}$ ($g_{biomassa}/l$)	$Y_{x/s}$ ($g_{biomassa}/g$ $substrato$)
Glucose	0,447 ±	97,487	89,192 ±	1,101 ±	0,056 ±	0,236 ±	6,56	0,032 ±
	0,009		9,420	1,054	0,006	0,015		0,003

Valores médios ± desvio padrão, realizados em três replicados.

Rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$), Percentagem de açúcares consumidos ($T_{Açuc}$), Etanol máximo ($E_{máx}$), Produtividade máxima de etanol ($P_{Máx}$), Rendimento de biomassa/etanol ($Y_{X/E}$), Taxa específica de crescimento máximo ($\mu_{Máx}$), biomassa máxima ($X_{Máx}$) e Rendimento de biomassa/substrato ($Y_{B/S}$).

Constatou-se que a levedura obteve, no final da fermentação, uma percentagem de açúcares consumidos ($T_{Açuc}$) de 97,487%, comprovando a conversão por completo da glucose para fins de crescimento e viabilidade da sua atividade metabólica.

Pelos resultados apresentados na tabela 25. e pelo perfil de concentração de etanol na figura 34., constatou-se que a produção de etanol foi crescente em todo o tempo de fermentação, obtendo o máximo de etanol produzido ($E_{Máx}$) de 89,192 g_{etanol}/l , no final da fermentação. Este pico máximo de etanol foi caracterizado por uma produtividade máxima ($P_{Máx}$) de 1,101 $g_{etanol}/l\ h$. Visto que o substrato era constituído unicamente por glucose a altas concentrações, fez com que a levedura sofresse o efeito ode *Crabtree*, iniciando bastante cedo a produção de etanol sem qualquer tipo de interrupção.

O rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S}$) determinado foi de 0,447 $g_{etanol}/g_{substrato}$, afirmando-se que grande parte do substrato utilizado foi fermentado pela levedura para produção de etanol e não unicamente utilizado para a síntese de biomassa. Devido à produção continua de etanol o valor do rendimento biomassa/etanol ($Y_{X/E}$) foi baixo (0,056 $g_{biomassa}/g_{etanol}$)

A cinética de produção de etanol foi analisada quantitativamente e as taxas de produção específica foram calculadas (q_E) em relação a concentração de etanol produzida.

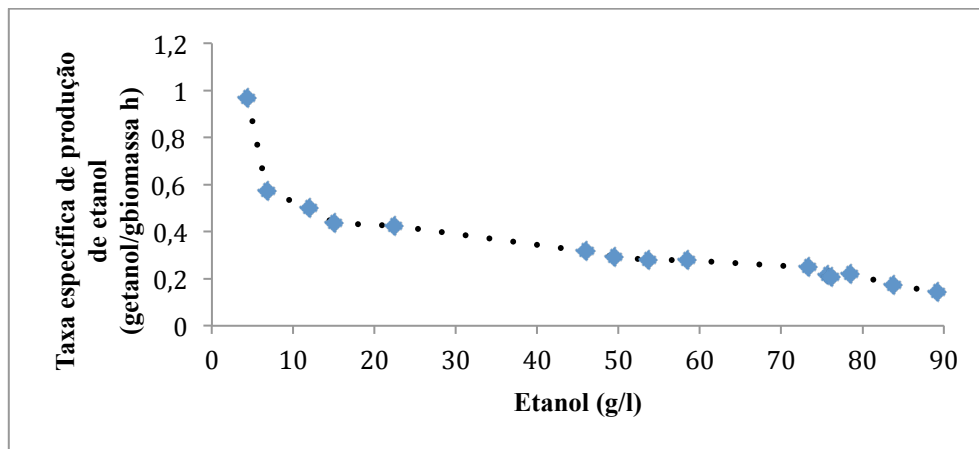


Figura 35 - Taxa específica de produção específica de etanol com a concentração de etanol da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 l/h e a 30 °C, tendo glucose como fonte de carbono.

Como podemos observar na figura 35., os valores de q_E ao longo do tempo vão diminuindo consoante o aumento da produção de etanol. Quanto maior for a produção de etanol pela levedura mais os valores se aproximam de zero, o que significa mais uma vez que o etanol a elevadas concentrações provoca efeito inibitório na levedura.

A Upi possui no vaso fermentativo um analisadores de gases libertados durante a fermentação e analisador de oxigénio dissolvido no meio. Após obter os dados dessas variáveis foi possível representar graficamente a quantidade oxigénio dissolvido (O_2), poder comparar com o etanol produzido e o crescimento de biomassa caracterizado pela absorvância (figura 36.).

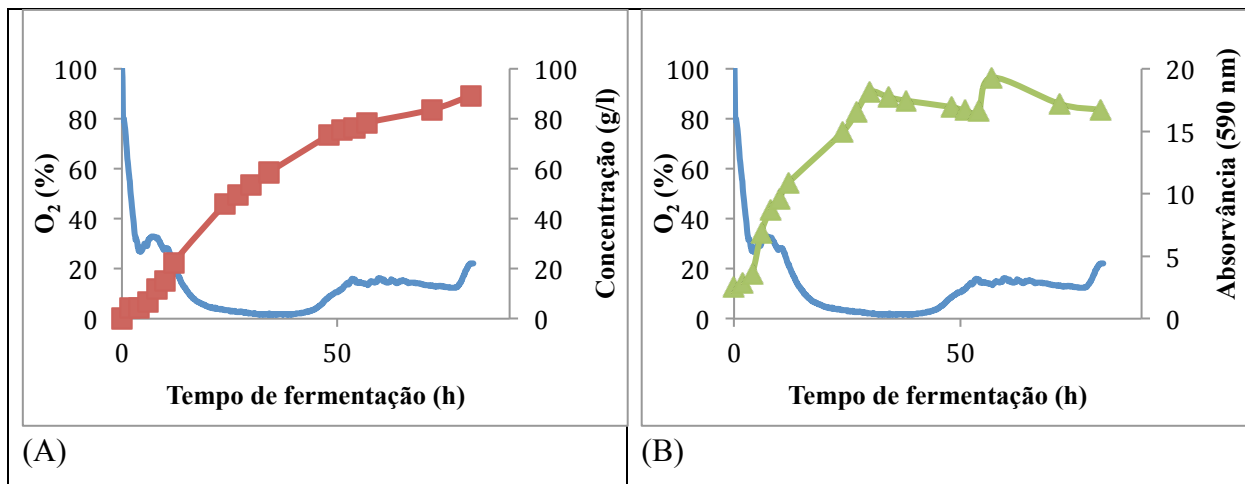


Figura 36 - Perfil de consumo O₂ com a produção de etanol (A) e absorvância (B), da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 l/h e a 30 °C, tendo glucose como fonte de carbono.

Calibrou-se o 100% de percentagem de O₂ antes de iniciar a fermentação. Após inoculação do meio com a levedura a percentagem de O₂ decresceu rapidamente para valores de 31%, coincidindo com o tempo que a levedura levou para se adaptar as condições do novo meio (≈ 2h). De seguida o oxigénio diminuiu ao longo do tempo, como resultado da respiração celular. Embora esteja sempre presente no meio de cultura torna-se indetectável ao fim das 25h de fermentação, pelo facto de a taxa de consumo de oxigénio ser superior à taxa de transferência. Este tempo corresponde ao tempo em que a levedura termina a sua fase de crescimento exponencial, ou seja, a levedura deixa de consumir O₂ em processos de crescimento celular e passa a realizar unicamente processos anaeróbios para síntese de etanol. Depois das 50h de fermentação os valores de O₂ tenderam a crescer ligeiramente, indicando que a levedura deixa de consumir oxigénio, devido ao início da fase de morte celular.

Através da concentração de glucose e do etanol produzido foi possível calcular a concentração de glucose fermentada alcoolicamente e de glucose consumida.

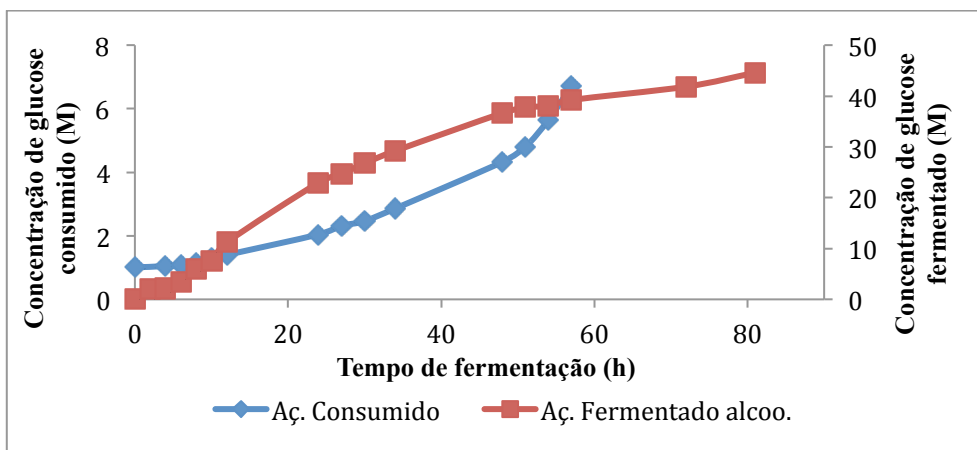


Figura 37 - Perfis da concentração de glucose consumido e de glucose fermentado da levedura *S. cerevisiae* F13A crescida em Unidade Piloto, em meio YEPD reduzido (5 g/l extrato levedura e 3 g/l peptona) a 250 rpm, arejamento de 0,3 l/h e a 30 °C, com glucose como fonte de carbono.

Analisando o gráfico (figura 38.) comprovou-se que logo após a inoculação do meio, a levedura metabolizou a glucose via alcoólica, produzindo constantemente etanol até ao final da fermentação.

Observando os valores obtidos de $Y_{X/S}$ e de $Y_{E/S}$ ($0,032 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$; $0,447 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$), foi possível afirmar que a levedura utilizou maioritariamente substrato para a síntese de etanol, proporcionando um baixo valor no rendimento biomassa/etanol ($Y_{X/E}$).

A fermentação realizada permitiu principalmente conhecer o modo de funcionamento da Upi, contudo, verificou-se que devem ser feitos estudos de aumentos de escala laboratorial, como por exemplo avaliações de transferência de oxigénio no reator (KL_a). Contudo verificou-se que a levedura produziu etanol desde o início da fermentação, atingindo um máximo de $89,2 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$ no final da fermentação.

Analisando todos os dados obtidos, concluiu-se que caso houve-se uma concentração constante de glucose, em todo o tempo de fermentação, a levedura tenderia a aumentar a síntese de etanol podendo chegar a elevadas concentrações no meio fermentativo. Contudo, pretende-se futuramente corrigir os problemas de evaporação do etanol e testar adições de substrato em determinados intervalos de tempo, ou seja, experimentar uma fermentação em *fed-batch*.

IV. Conclusões Gerais

Neste trabalho foram utilizados dois subprodutos da indústria alimentar, o licor de citrinos, subproduto da indústria produtora de sumos de laranja e extrato de alfarroba, um subproduto da indústria de transformação da alfarroba. O licor de citrinos devido a ser considerado efluente industrial, tornou-se necessário otimizar o processo de extração para obter um produto final com grande potencial no uso em meio de cultura.

A produção de etanol a partir de subprodutos agro industriais, requer um estudo extensivo de todos os parâmetros do processo fermentativo. Como tal, tornou-se necessário realizar vários ensaios em diferentes condições, para se poder obter bons resultados e seleccionar o melhor substrato para prosseguir os estudos de aumento de escala. A escolha de um meio de cultura adequado ao crescimento do microrganismo e síntese de etanol, aliado ao baixo custo de produção, são factores a ter em conta quando se inicia um processo fermentativo. Contudo deve ser garantido o máximo de rentabilidade, para tonar a produção viável.

Os resultados deste estudo demonstraram que o licor de citrinos juntamente com extrato de alfarroba, proporcionam condições favoráveis à fermentação e produção de etanol, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A.

Realizaram-se, inicialmente, ensaios em *Erlenmeyer* com *S. cerevisiae* F13A, para avaliar o comportamento da levedura em fontes de carbono contendo extrato de alfarroba, licor de citrinos e um rácio de açúcares comerciais glucose, frutose e sacarose. O licor de citrinos apresentou um elevado valor na taxa de crescimento celular de $0,180 \text{ h}^{-1}$ e um rendimento etanólico ($Y_{E/S} = 0,470 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) bastante próximo do máximo teórico. Verificou-se, tanto no ensaio com extrato de alfarroba e no ensaio do rácio, que os rendimentos obtidos foram idênticos ao valor máximo teórico ($Y_{E/S} = 0,510 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$). Os dois subprodutos industriais mostraram elevada potencialidade para a produção de bioetanol, devido à elevada concentração de açúcares que têm. Nesse sentido, realizaram-se ensaios procedendo à combinação, por rácios, do licor de citrinos e extrato de alfarroba.

Os estudos dos vários rácios, entre os dois subprodutos, permitiram concluir que a mistura de $83,7 \text{ g/l}$ de extrato de alfarroba com $167,5 \text{ g/l}$ de licor de citrinos (Alf33% + Cit67%), demonstrou ser a mais propícia para a produção de bioetanol, obtendo um elevado rendimento etanol/substrato ($Y_{E/S} = 0,498 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) e atingindo uma quantidade máxima de etanol de $84,107 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$ em pouco tempo de fermentação ($t \approx 36\text{h}$).

Tendo em conta os resultados obtidos no ensaio realizado anteriormente, procedeu-se ao aumento de escala em reator biológico de 3 litros, do rácio Alf33%+Cit67%. Este ensaio permitiu avaliar a capacidade fermentativa da levedura num maior volume de meio. Constatou-se um aumento na produção de etanol ($E_{\text{máx}} = 88,602 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$) e na taxa de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}} = 0,087 \text{ h}^{-1}$), em relação ao ensaio do mesmo rácio realizado em *Erlenmeyer* ($\mu_{\text{máx Erlenmeyer}} = 0,015 \text{ h}^{-1}$ e $E_{\text{máx Erlenmeyer}} = 84,107 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$). Identificou-se um maior consumo de substrato para processos de fermentação alcoólica, concluindo que na existência de substrato a uma concentração constante no meio fermentativo, proporcionaria à levedura todas as condições para produzir constantemente etanol.

Sabendo que o composto aromático D-limoneno presente no licor de citrinos poderá inibir o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, decidiu-se extrair o composto, através de uma destilação a vapor. Verificou-se, que na fermentação da *S. cerevisiae* F13A em *Erlenmeyer* no rácio de 125 g/l de extrato de alfarroba com 125 g/l de licor de citrinos (Alf50%+Cit50%) sem o D-limoneno, houve uma maior produção de etanol e menor de biomassa ($Y_{\text{E/S}} = 0,428 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ e $Y_{\text{X/S}} = 0,051 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$, respectivamente), em comparação com o mesmo rácio na presença de D-limoneno ($Y_{\text{E/S}} = 0,510 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ e $Y_{\text{X/S}} = 0,037 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$, respectivamente). Contudo colocou-se em causa as conclusões obtidas neste ensaio realizado, devido a não ter sido possível quantificar o D-limoneno existente na amostra de citrinos antes e depois do processo de extração.

Sendo o licor de citrinos um potencial resíduo agroindustrial para a produção de bioetanol procedeu-se à otimização da sua concentração, utilizando a levedura *S. cerevisiae* F13A. Para tal, avaliou-se em *Erlenmeyer* a capacidade de produção de etanol e viabilidade em diferentes concentrações iniciais de açúcar. Obteve-se uma maior produção de etanol ($E_{\text{máx}} = 97,955 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{l}$) e um maior rendimento etanólico ($Y_{\text{E/S}} = 0,428 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) na concentração de licor de citrinos a 180 g/l. Contudo concluiu-se que para uma maior produção de biomassa a levedura tem preferência por baixas concentrações e licor de citrinos e para maiores produções de etanol a levedura tem preferência por concentrações mais altas.

Devido à fonte de azoto ter uma grande influência na produção de etanol, em condições anaeróbias e por influenciar bastante nos custos finais de um bioprocessos, testaram-se duas concentrações de uma fonte de azoto mais económica, ureia, a uma concentração inicial de 3 e 1,5 g/l em ensaios de *Erlenmeyer*, utilizando como fonte de carbono extrato de alfarroba a 250 g/l. Concluiu-se que a ureia a uma concentração de 1,5 g/l foi suficiente para promover a

produção de etanol, crescimento e viabilidade da levedura, apresentando elevados valores de rendimento de etanol/substrato ($Y_{E/S} = 0,497 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) em comparação com o ensaio em meio YEPD ($Y_{E/S} = 0,471 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$). Afirmando-se que o extrato de levedura e a peptona, presentes no meio YEPD podem ser substituídos por ureia, sem verificar perda no rendimento etanólico, constituindo assim uma fonte de azoto rentável para processos industriais.

Com o objetivo de se continuar os estudos de produção de etanol do rácios Alf33%+Cit67%, com a levedura *S. cerevisiae* F13A para uma escala semi-piloto, foi realizado um ensaio teste de 20 litros com glucose a uma concentração de 250 g/l. Embora o rendimento etanólico tenha sido próximo do máximo teórico ($Y_{E/S} = 0,447 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) e a concentração máxima de etanol de 97,487 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{l}$, verificou-se que o processo necessita de melhoria nos estudos de dimensionamento, tendo como definição critérios de aumento de escala apropriados para a produção de etanol.

V. Perspectivas de trabalho futuro

Os resultados obtidos neste estudo foram bastante promissores, pois permitiram a complementação da utilização de dois resíduos agroindustriais existentes em grande quantidade na região do Algarve.

Como propostas de trabalhos futuros seria importante ter em conta vários aspetos na sua realização, nomeadamente:

- Tendo em conta que o licor de citrinos precipitar em demasia após a esterilização, deveria ser desenvolvido um processo de filtração do licor antes desse mesmo processo ou desenvolver métodos mais eficazes de remoção do precipitado após esterilização;
- Devido a se constatar ao longo do estudo uma baixa produção de etanol no rácio realizado em reator biológico de 3 litros, sugere-se que sejam efetuados novos estudos de aumento de escala dos restantes rácios, para poder existir uma melhor comparação dos resultados e caso seja necessário, otimizar a produção de etanol;
- Deverão ser feitas melhorias no processo de extração do D-limoneno e desenvolver um processo de quantificação do mesmo;
- Deverão ser realizados vários ensaios com diferentes concentrações de D-limoneno para poder entender, se existe ou não, inibição na levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13;
- Deveria ser realizado um ensaio em *Erlenmeyer* com licor de citrinos, a uma concentração inicial 250 g/l, para poder complementar a decisão da melhor concentração de licor, que proporcione à levedura condições para produzir grandes quantidades de etanol;
- Dependendo dos resultados obtidos na escolha da melhor concentração de licor de citrinos para produção etanol, deveria ser feito um aumento de escala em reator biológico de 3 litros.
- Deveriam ser realizados em unidade piloto, estudos de definição de critérios de aumento de escala indicados, para a maximização do processo fermentativo e produção de etanol.
- Sugere-se a realização de uma fermentação com licor de citrinos em modo “*feed-batch*”, para analisar a existência ou não de uma maior síntese de etanol.

VI. Referências Bibliográficas

- Al-Mhanna**, N. M. M. (2010). Observation of crabtree effect and diauxic behavior of yeast by using absorption. *Chemical Engineering Transactions*, 21, p.1465-1470.
- Aparecida** J., Cotta O., Salami F. H., Marques A. R., Oliverira M. O., & Landgraf, M. D. R. (2006). Validação do método para determinação de nitrogênio *Kjeldahl* total. *Revista Analytica*, Instituto de Química São Carlos – Universidade de São Paulo.
- Ayaz**, F. A., Torun, H., Ayaz, S., Correia, P. J., Alaiz, M., Sanz, C., Grúz, J., & Strnad, M. (2007). Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): Sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30 (6), p.1040-1055.
- Bampidis**, V. A., Robinson, P. H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 128 (3), p.175-217.
- Barracosa**, P., Osório, J., & Cravador, A. (2007). Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region. *Scientia Horticulturae*, 114 (4), 250–257.
- Battle**, I. E. & Tous, J. (1997). Carob tree, *Ceratonia siliqua* L., Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. IPGRI – Institute Plant Genetic Resources Institute.
- Berg**, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. 5ª Edição. Freeman: New York.
- Biner**, B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M., & Pekmezci, M. (2007). Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100 (4), p.1453–1455.
- Casal**, M., Schuller D., Rodrigues G., & Pais, C. (2004). Métodos convencionais em microbiologia. Retirado em 2 de Setembro de 2012 do seguinte endereço de internet: repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2241/1/U1.pdf.
- Çaylak**, B. & Sukan, F. V. (1998). Comparison of Different Production Processes for Bioethanol. *Turkish Journal of Chemistry*, 22, p.351-359.
- Costa**, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., & Viñas, I. (2001). Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (3-4): 367-371.
- Cristina**, A. *Hematologia e Hemoterapia* – Amigonerd.net. Endereço de Internet: <http://amigonerd.net/trabalho/25246-contagem-de-leucocitos>. (Página da Internet consultada em 30 de Maio de 2012)
- Cruz**, N. (2010). *O laboratorista veterinário – Instrução Normativa nº1*. Endereço de Internet: http://olaborativaveterinario.blogspot.pt/2010_04_01_archive.html (Página da Internet consultada em 30 de Maio de 2012)
- Esteves**, E. G. (2006). *Componentes nitrogenados: Metodologias analíticas e associação com outros indicadores de qualidade do leite cru refrigerado*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – UFMG.

Flávia, A. G. G. (2007). *Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso*. Tese de doutoramento. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia de UFMG.

Fletcher, R. (1997). Carob agroforestry in Portugal and Spain. *The Australian New Crops Newsletter*. Retirado em 29 de Agosto de 2012 do Web Site: <http://www.newcrops.uq.edu.au/newslett/ncnl7-13.htm>.

Fonseca, M. M. & Teixeira, J. A. (2007). *Reactores biológicos. Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: LIDEL – Edições técnicas.

Gonçalves, A. S., Carreira, F. C., Valadares, L. F., De Santis, M. A. C., & Machado, M. B. *Seminário de Orgânica Experimental I*. Extração do Limoneno: Universidade Estadual Paulista.

GPP - Gabinete de planeamento e políticas (2007). Ministério da Agricultura do desenvolvimento rural e das pescas – “Citrimos”.

Hyun-Beom S. H., Yeon, J., Jeong, M. H., Kang, D. H., Lee, H., & Jung, K. (2009). Aeration Alleviates Ethanol Inhibition and Glycerol production during fed-batch Ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, p. 599-605.

Lima-Costa, M. E. L., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B., & Peinado, J. M. (2012). Kinetic of sugar consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39 (5), p. 789-797.

Lima-Lima-Costa, M. E. & Raposo, S. (2007) Reactores para culturas de células vegetais. In: M. M. Fonseca, J. A. Teixeira (Eds.), *Reactores Biológicos*. Fundamentos e aplicações: Lidel.

López, J. Á., Li, Q., & Thompson, I. (2010). Biorefinery of waste Orange peel. Informa Healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30 (1), p. 63-69.

Maia, C. C. P. (2011). *Produção de um agente de control biológico recorrendo a subprodutos da industria agro-alimentar*. Tese de mestrado. Faculdade de Ciência e Tecnologia: Universidade do Algarve.

Manso, T., C. Nunes, S. Raposo, & Lima-Costa, M. E. (2010). Carob Pulp as Raw material for production the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(11), p. 1145-1155.

Mark R., Wilkins, Lilis suryawati, Niels O. Maness, Donna Chrz (2007). Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of Orange-peel oil. *World Journal Microbiology and Biotechnology*,

Mendes, A., Guerra, P., Madeira, V., Ruano, F., T. Lopes da Silva, T., & Reis, A. (2007). Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, p. 1209–1215.

Naghmouchi, S., Khouja, M. L., Khaldi, A., Rejeb, N. (2012). Biochemical Diversity of Wild Carob Tree Populations and its Economic Value. INRGREF – Institute of Research in Rural Engineering, Water and Forestry, p. 25-26.

- Nevoigt E.** (2008). Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72 (3), p.379-412.
- Novaki, L.** (2009). Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus caseiellus*. Tese de Mestrado. Centro de Engenharias e Ciências Exatas: Universidade do Paraná.
- Nunes, A., Ferreira, C. A. S., & Bonfim, T.** (2009). *Padronização de soluções*. Universidade Estadual de Maringá: Departamento de Química.
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R. M., Stahlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., & Gustafsson, L.** (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Sccharomyces cerevisiae*. *Scientific Report*, 5, p. 532-537.
- Petit, M. D. & Pinilla, J. M.** (1994). Production and Purification of a Sugar Syrup from Carob Pods. *Food Science and Technology*, 28, p.145-152.
- Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, M. J.** (2008). *Bioquímica: Organização molecular da vida*. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas
- Rivas, B., Torrado, A., Torres, P., Converti, A., & Domínguez, J. M.** (2008). Suberges Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, p. 2380-2387.
- Rodrigues, F. A.** (2011). *A influência de diferentes fontes de azoto na produção de etanol a partir do extrato da polpa de alfarroba*. Tese de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia: Universidade do Algarve.
- Rodrigues, K.** (2006). *Uso de reactores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética*. Tese de doutoramento. Escola de Engenharia de São Carlos: Universidade de São Paulo.
- Rutz, D. & Janssen, R.** (2007). *BioFuel Technology Handbook*. Munchen: WIP Renewable Energies.
- Santos, M., A. Rodrigues, & J. A. Teixeira** (2005). Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*, 25, p. 1–6.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J.** (1995). *Principles of fermentation technology*. 2^a Edition. Oxford: Pergamon Press, p. 93-121.
- Stryer, L., Berg, J. M., & Tymoczko, J. L.** (2007). *Bioquímica*. 6^a Edição. Guanabara Koogan.
- Sun, J.** (2007). D-limonene: Safety and Clinical Applications. *Alternative Medicine Review*, 12 (3), p. 259-264.
- Thomsen, M. H.** (2005). Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Applied Microbioly Biotechnology*, 68 (5), 598-606.
- Vaheed, H., Shojaosadati, S. A., & Galip, H.** (2010). Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 38 (1), p. 101-111.

Van der Brink, J., Akeridy, M., Hoeven, R., Pronk, J. T., Winde, J. H. & Daran-Lapujade (2008). Energetic limits to metabolic flexibility: responses of *Saccharomyces cerevisiae* to glucose-galactose transition. *Microbiology*, 155 (4), 1340-1350.

Van Maris, A. J. A., Derek, A. A., Eleonora, B., Joost, V. D. B., Kuyper, M., Luttik, M. A. H., Wisselink, H.W., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Springer Science + Business Media*, 90, p. 391-418.

Vaz, R. S., Prado, M. R. M., & Carvalho, F. (2007-2008). Biotecnologia na indústria farmacêutica. *Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento*, 37, p. 36-39.

Wilkins, M. R., Widmer, W. W., & Grohmann, K. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces* to produce ethanol. *Process Biochemistry*, 42 (12), p.1614-1619.

Zhou, W., Widmer, W., & Grohmann, K. (2008). Developments in Ethanol Production from Citrus Peel Waste. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 121, p.307-310.

VII. Anexos

- Análise de dados
 - Regressões lineares;

- Curvas de calibração (HPLC);
 - Coluna *Merck-Polysher* OA HY;
 - *Waters Sugar-Pak 1*.
- ANOVA - *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$).
- Registo Fotográfico:
 - Material utilizado;
 - Equipamentos utilizados;
 - Esquema de montagem do sistema de destilação a vapor.