



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Produção de bioetanol a partir de resíduos industriais de alfarroba.

Cinética de inibição do etanol para diferentes concentrações do nutriente limitante. Fermentação com recirculação de células livres e células imobilizadas

Brígida Gonçalves Rodrigues

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de : Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

Novembro de 2012



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Produção de bioetanol a partir de resíduos industriais de alfarroba.

Cinética de inibição do etanol para diferentes concentrações do nutriente limitante. Fermentação com recirculação de células livres e células imobilizadas

Brígida Gonçalves Rodrigues

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de : Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

Novembro de 2012

Produção de bioetanol a partir de resíduos industriais de alfarroba.

Cinética de inibição do etanol para diferentes concentrações do nutriente limitante. Fermentação com recirculação de células livres e células imobilizadas

Declaração de autoria do trabalho

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

A Universidade do Algarve tem o direito, perpetuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar 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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória

À Professora Doutora Maria Emília Lima Costa agradeço, o apoio, o interesse e disponibilidade demonstrada durante a orientação desta dissertação de mestrado.

À Professora Doutora Sara Raposo agradeço toda a ajuda prestada e o apoio dado.

Aos meus amigos e colegas por estarem sempre presentes quando precisei.

Aos meus pais, á minha sobrinha e ao João, Obrigada por tudo.

Resumo

O bioetanol produzido através de resíduos agroindustriais pode ser a resposta que visa solucionar parte das carências de biocombustíveis em Portugal. A alfarroba é um fruto de elevada produção no Algarve, os resíduos que resultam do processamento da alfarroba são uma potencial origem de produção de bioetanol de segunda geração. Para que a produção de bioetanol seja considerada rentável os custos de produção devem ser mantidos o mais baixos possível.

Para abordar esta problemática foram realizados ensaios que determinassem qual a concentração de açúcares totais ótima para a produção de bioetanol. Foram testadas várias concentrações de açúcares totais (20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 g/L) utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A concentração de açúcares totais que apresentou melhor relação de rendimentos foi a 250 g/l com rendimentos próximo do teórico.

Foi estudada a capacidade de recirculação celular por parte da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A na sua forma livre realizando para tal 2 recirculações celulares. Foi possível observar que as recirculações não variam profundamente o rendimento etanol em relação ao substrato e aumentam as produtividades máximas de etanol.

Verificou-se a capacidade de imobilização da levedura em quatro matrizes diferentes, alginato de cálcio, alginato de cálcio com alfarroba, *luffa cylindrica* e *kibbles* de alfarroba, e efetuaram-se ensaios de recirculação celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A na sua forma imobilizada. Foi possível concluir que a matriz de imobilização com *kibbles* de alfarroba além de ser um meio económico, de elevada disponibilidade e fácil imobilização é um meio robusto capaz de resistir a pelo menos duas recirculações, conduzindo a produtividades e $Y_{E/S}$ elevados mesmo ao fim de duas recirculações.

Abstract

Bioethanol is produced through agro industrial residues and may be the answer to the shortage of biofuels in Portugal. The carob is a fruit of large production in the Algarve and its residues, which come from its processing, are a potential source of second generation bioethanol production. For the production of bioethanol to be considered rentable the production costs must be kept as low as possible.

To tackle this issue, rehearsals were made that could determine the optimal total sugar concentration to produce bioethanol. There were several total sugar concentrations tested (20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 g/L) using carob extract as a source of carbon. The total sugar concentration that presented the best ethanol yields ratio was 250 g/L, with values very close to the theoretical estimates.

The capacity for cell recycle by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* F13A in its free form was studied using two cell recycle. It was observed that the cell recycle doesn't affect very much the ethanol yield and they increase the maximum productivity of ethanol.

The capacity for immobilizing the carob yeast was observed in four different matrixes, calcium alginate, calcium alginate with carob, *luffa cylindrica* and carob kibbles and rehearsals were made for the cell recycle of yeast *Saccharomyces cerevisiae* F13A in its immobilized form. It was possible to conclude that the immobilizing matrix using carob kibbles, in addition of being a cheap, highly available and of easy immobilization, is a robust environment capable of resisting to at least two recirculation, with high productivity and high $Y_{E/S}$, even after two cell recycle.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENQUADRAMENTO	1
1.1.1. Análise Económica da Produção de Bioetanol	2
1.2. PRODUÇÃO DE ETANOL	3
1.2.1. Processo geral de produção de bioetanol.....	3
1.2.2. Biomassas.....	3
1.2.2.1. A Alfarroba	4
1.2.3. Microrganismo Fermentativo	5
1.2.3.1. <i>Levedura Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.3. APERFEIÇOAMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL	7
1.3.1. Recirculação de células.....	7
1.3.2. Imobilização celular.....	8
1.3.2.1. <i>Métodos de imobilização celular em suportes sólidos</i>	8
1.3.2.1.1. <i>Ligação ou adsorção a superfícies do transportador</i>	9
1.3.2.1.2. <i>Oclusão numa matriz porosa</i>	9
1.3.2.2. <i>Suportes</i>	9
1.3.2.3. <i>Efeito da imobilização na cinética e propriedades celulares</i>	10
1.4. OBJECTIVOS	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1. MATÉRIA-PRIMA	12
2.1.1. Extração dos açúcares solúveis da alfarroba	12
2.2. MICRORGANISMO.....	13
2.3. MEIOS DE CULTURA	13
2.4. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E CRESCIMENTO	13
2.4.1. Armazenamento.....	13
2.4.2. Pré-inoculo	14
2.4.3. Crescimento em erlenmeyer	14
2.5. IMOBILIZAÇÃO CELULAR	14
2.5.1. Alginato de cálcio	14
2.5.2. Alginato de cálcio com alfarroba	15

2.5.3.	Luffa cylindrica	15
2.5.4.	Kibbles de alfarroba	15
2.6.	ENSAIOS EXPERIMENTAIS	16
2.6.1.	Fermentação com diferentes concentrações de açúcares totais utilizando como fonte de carbono o extrato de alfarroba	16
2.6.2.	Ensaio de recirculação de células livres	16
2.6.3.	Fermentação de células imobilizadas em 4 matrizes diferentes	17
2.6.4.	Recirculação de células imobilizadas em 4 matrizes diferentes	17
2.7.	PARÂMETROS FERMENTATIVOS	18
2.7.1.	Determinação do crescimento celular	18
2.7.1.1.	<i>Espectrofotometria</i>	18
2.7.1.2.	<i>Contagem de células viáveis</i>	18
2.7.1.3.	<i>Determinação de biomassa</i>	19
2.7.2.	Métodos analíticos	19
2.7.2.1.	<i>Monitorização do pH</i>	19
2.7.2.2.	<i>Quantificação dos açúcares e etanol</i>	19
2.7.2.3.	<i>Monitorização da atividade da água (a_w)</i>	20
2.8.	CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO	20
2.8.1.	Taxa específica de crescimento (μ)	20
2.8.2.	Tempo de duplicação celular (td)	20
2.8.3.	Rendimento da biomassa produzida em função do substrato consumido ($Y_{X/S}$)	21
2.8.4.	Rendimento do etanol produzido em função do substrato consumido ($Y_{E/S}$)	21
2.8.5.	Produtividade máxima de etanol (Produtividade)	21
2.8.6.	Taxa específica de consumo de substrato (qS)	21
2.9.	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	22
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1.	ENSAIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AÇUCARES TOTAIS UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO O EXTRATO DE ALFARROBA	23
3.2.	ENSAIO DE RECIRCULAÇÃO DE CÉLULAS LIVRES	29
3.3.	ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO DE CÁLCIO, ALGINATO DE CÁLCIO COM ALFARROBA, KIBBLES DE ALFARROBA E LUFFA CYLINDRICA	32
3.4.	ENSAIO DE RECIRCULAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS	35
4.	CONCLUSÃO	39
5.	TRABALHOS FUTUROS	41

6. BIBLIOGRAFIA.....	42
-----------------------------	-----------

Lista de Tabelas

Tabela 1 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, com diferentes concentrações de açúcares totais utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono, em erlenmeyers que decorreu numa agitadora orbital a 30 °C, 150 rpm durante 96 h

Tabela 2 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em erlenmeyers da fermentação previamente descrita a 250 g/l após uma recirculação celular e após duas recirculações celulares utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A fermentação decorreu durante 96 h enquanto as recirculações decorreram durante 78 h, numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Tabela 3 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em erlenmeyers com diferentes matrizes de imobilização utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C

Tabela 4 Parâmetros cinéticos de fermentação (valores médios) obtidos em fermentações em batch com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em diversas matrizes de imobilização a 30 °C.

Tabela 5 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em alginato de cálcio, em alginato de cálcio com alfarroba, luffa cylindrica e em kibbles de alfarroba após uma primeira recirculação utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A recirculação decorreu durante 96 h numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Tabela 6 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em, luffa cylindrica e em kibbles de alfarroba após uma segunda recirculação utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A recirculação decorreu durante 72 h numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C

Lista de Figuras

Figura 1 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, em erlenmeyer, em diferentes concentrações de açúcares totais utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono acompanhando o logaritmo do peso seco, modelação pelo *software* DMFIT, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Figura 2 Perfis de consumo dos açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em erlenmeyer com diferentes concentrações de açúcares totais utilizando extrato alfarroba como fonte de carbono, em fermentações que decorreram a 30 °C, 150 rpm numa agitadora orbital durante 96 h . Os perfis de consumo são acompanhados pelas taxas específicas de consumo da glucose (qG), frutose (qF) e açúcares totais (qT) e pelas concentrações da frutose (Fru), sacarose (Sac) e glucose (Glu) ao longo do tempo.

Figura 3 Atividades da água (a_w) nas diferentes concentrações de açúcares totais utilizando o extrato de alfarroba como fonte de carbono.

Figura 4 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A livre em erlenmeyers da fermentação previamente descrita a 250 g/l (A) após uma recirculação celular (B) e após duas recirculações celulares (C) acompanhando logaritmo do peso seco, modelação pelo *software* DMFIT, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 96 h e as recirculações durante 78 h, numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Figura 5 Perfil de consumo dos açúcares individuais pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A livre em erlenmeyers da fermentação previamente descrita a 250 g/l (A) após uma recirculação celular (B) e após duas recirculações celulares (C) acompanhando as concentrações da sacarose (Sac), glucose (Glu) e da frutose (Fru). A fermentação decorreu durante 96 h e as recirculações durante 78 h, numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Figura 6 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em erlenmeyers com diversas matrizes de imobilização, alginato de cálcio (A), alginato de cálcio com alfarroba (B), luffa cylindrica (C) e kibbles de alfarroba (D), expresso em peso seco, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C

Figura 7 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em alginato de cálcio (A1) em alginato de cálcio com alfarroba (B1) luffa cylindrica (C1) e em kibbles de alfarroba (D1) após uma primeira recirculação acompanhando a concentração de peso seco, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 96 h numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Figura 8 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em luffa cylindrica (C2) e em kibbles de alfarroba (D2) após uma segunda recirculação acompanhando a concentração de peso seco, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 72 h numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Lista de Abreviaturas

a_w	Atividade da água
Fru	Concentração da Frutose
Glu	Concentração da Glucose
Sac	Concentração da Sacarose
Etanol _{máx}	Concentração máxima de Etanol atingida
EUA	Estados Unidos da América
qF	Taxa específica de consumo de frutose
GEE	Gases de Efeito Estufa
qG	Taxa específica de consumo de glucose
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência
$Y_{x/S}$	Rendimento de biomassa relativamente ao substrato
$Y_{E/S}$	Rendimento de etanol em relação ao substrato
rpm	Rotações por Minuto
μ_{max}	Taxa específica de crescimento
$t_{estacionária}$	Tempo de início da fase estacionária
$t_{etanol\ max}$	Tempo de obtenção do máximo de Etanol
UE	União Europeia
WTO	World Trade Organization
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENQUADRAMENTO

Um dos desafios deste século é a mudança de energias de origem fóssil para combustíveis renováveis. Os biocombustíveis são encarados como uma das respostas ao contínuo aumento do preço do petróleo, à escassez das fontes fósseis, na contribuição para o combate ao aquecimento global através da redução das emissões dos gases de efeito estufa (GEE), a dependência fóssil dos países politicamente instáveis do Médio Oriente e às exigências colocadas pelo Protocolo de Kyoto e o Plano de Ação de Bali que incentivam a procura de novas fontes de energias renováveis.

O sector que mais contribui para o consumo de combustíveis é o dos transportes públicos correspondente a 25 % do consumo final de energia em 1999. Para combater todos estes problemas, a Comissão Europeia lançou uma diretiva de promoção do uso de biocombustíveis - Diretiva 2003/30/CE, onde é apontada uma meta de colocação de biocombustíveis no mercado em cada estado membro, de 5,75 % até 2010 e de 20 % até 2020 (sendo esta última obrigatória). A diretiva comunitária identifica 11 diferentes tipos de biocombustíveis, sendo os mais utilizados o bioetanol e o biodiesel. Portugal como país membro da União Europeia (UE) em 21 de Março de 2006 transcreve a diretiva 2003/30/CE para uma ordem judicial nacional decreto-lei nº 62/2006, em 26 de Fevereiro de 2009 o decreto-lei nº 49/2009 que define quotas de incorporação obrigatória de biocombustíveis em gasóleo rodoviário e mais recentemente em 25 de Outubro de 2010 o decreto-lei nº 117/2010 define os limites de incorporação obrigatória de biocombustíveis para os anos de 2011 a 2020.

Biocombustível é o combustível líquido ou gasoso para transportes produzido a partir de biomassa, que se entende como sendo a fração biodegradável de produtos e resíduos provenientes da agricultura (incluindo substâncias vegetais e animais), da silvicultura e das indústrias conexas, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos (definição da Diretiva 2003/30/CE). Podem ser designados de primeira geração quando são produzidos a partir de matérias vegetais produzidas pela agricultura, o que levanta inúmeros problemas como a biodiversidade, a utilização de terras, a competição com a alimentação humana e o aumento do preço de produtos alimentares. Os biocombustíveis de segunda geração surgem de forma a arranjar alternativas mais

eficientes utilizando resíduos agroindustriais, permitindo assim a valorização de produtos de baixo valor comercial (Lima-Costa et al., 2012).

A escolha de subprodutos agroindustriais tem de ser feita tendo em conta as principais indústrias das regiões. Em Portugal são produzidas 55000 toneladas de alfarroba por ano, tornando-o o segundo maior produtor mundial, as indústrias transformadoras recuperam a semente e parte da polpa sendo o restante considerado desperdício.

Os processos fermentativos na produção de etanol são conhecidos mas os custos de produção ainda são um impedimento-chave para a sua implementação. As tecnologias que não estão totalmente desenvolvidas e as dificuldades biológicas intrínsecas do processo requerem que o esforço seja contínuo de forma a tornar este processo eficiente.

1.1.1. Análise Económica da Produção de Bioetanol

Há 15 anos atrás os custos de produção de etanol a partir de substratos celulósicos eram de 0.827 €/l (Verma et al., 2011).

Os custos da produção de etanol são superiores aos custos de produção de gasolina, porem o etanol tem incentivos subsidiários governamentais como o Energy Policy Act de 2005 nos Estados Unidos da América (EUA) e o World Trade Organization (WTO) na EU.

O E85 é uma mistura de 85 % de bioetanol com 15 % de gasolina que pode ser usado em carros adaptados é vendido por 0.641 €/l (e85prices, 2012).

Num estudo de performance económica e do design do processo os custos estimados da produção de etanol utilizando alfarroba como matéria-prima da produção de etanol e a taxa de retorno foram de 0.55 €/L e 7 % respetivamente (Sánchez-Segado S et al., 2012).

1.2. PRODUÇÃO DE ETANOL

1.2.1. Processo geral de produção de bioetanol

A obtenção dos açúcares necessários à fermentação varia consoante a disponibilidade destes na biomassa. Os açúcares solúveis de fácil acesso podem ser extraídos através de uma extração aquosa, porém os que açúcares presentes em biomassas lenho celulósicas requerem um tratamento mais complexo. Sendo a alfarroba um material lenho celulósico, os seus açúcares encontram-se na celulose e na hemicelulose na forma de polímeros, estes apresentam-se intercalados entre si e cobertos pela lenhina uma macromolécula aromática complexa que constitui a parede celular vegetal uma estrutura de difícil destabilização. De forma a se poder obter os açúcares fermentáveis presentes na celulose e na hemicelulose é necessário quebrar a ligação destes com a lenhina através de um pré-tratamento da massa fibrosa. Destes pré-tratamentos resultam diversos subprodutos que inibem o crescimento celular como o ácido acético, o furfural e o hidroximetilfurfural. Após o pré-tratamento é realizada uma hidrólise enzimática de forma a converter a celulose e a hemicelulose em monómeros de açúcar fermentáveis (Girio et al., 2010).

Realiza-se uma fermentação em batch de forma a converter os açúcares obtidos nas etapas anteriores em etanol, este é extraído do meio por destilação.

1.2.2. Biomassas

Segundo o decreto-lei 62/2006 de 21 de Março de 2006, biomassa *é a fração biodegradável de produtos e resíduos provenientes da agricultura (incluindo substâncias vegetais e animais), da silvicultura e das indústrias conexas, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos.*

Na produção de etanol é possível utilizar diferentes tipos de biomassas ricas em, açúcares fermentáveis, em amido que tem de sofrer hidrólise enzimática para obter-se açúcares simples e lenho celulósicas que requerem pré – tratamento e hidrólise enzimática. Atualmente açúcares simples podem ser retirados da cana-de-açúcar (Dias et al 2012), beterraba sacarina (Zheng et al., 2012), sorgo (Laopaiboon et al., 2012), soro de leite (Mohammadreza et al., 2012) e o resíduo utilizado neste trabalho de mestrado a alfarroba (Lima-Costa et al., 2012), as matérias-primas ricas em amido podem ser entre outras o milho (Yao et al., 2012), o trigo (Singh et al., 2012) e a batata

(Koga et al., 2012), o material lenho celulósico pode resultar de madeiras (Piemonte, 2012), palhas (Ibrahim, 2012) e resíduos agrícolas (Sarkar et al., 2012).

1.2.2.1. A Alfarroba

A alfarrobeira (*Ceratonia siliqua L.*) é uma árvore do pomar tradicional de sequeiro e pode sobreviver climas secos sem irrigação e está bem adaptada a ambientes secos com precipitação média anual entre 250 e 500 mm por ano (Tous e Batlle, 1990), muito cultivada nos países da orla mediterrânica Espanha, Itália, Portugal, Marrocos, Grécia e Turquia (Turhan et al., 2010). Tem uma produção mundial estimada em 400 000 toneladas por ano sendo que 55 000 toneladas são produzidas no Algarve (profe emila).

A alfarrobeira pertence á subfamília *Caesalpinaceae* e da família *Leguminoseae* (*sin. Fabaceae*), é constituída pela polpa (90 %) e sementes (10 %). A polpa tem um elevado teor de açúcares (48-56 %) principalmente sacarose, frutose e glucose, tem também na sua constituição celulose e hemicelulose (18 %) e uma grande quantidade de taninos condensados nas vagens maduras (16-20 %). A semente tem o tegumento (30-33 %), o endosperma (42-46 %), e o embrião (23-25 %) relativamente ao peso da vagem da alfarroba (Battle e Tous, 1997).

As indústrias transformadoras retiram da alfarroba a semente e parte da polpa, sendo o restante fruto considerado desperdício. Atualmente a aplicação da alfarroba é principalmente a partir das sementes pois obtém-se a goma de alfarroba (aditivo E-410) que tem interesse na indústria alimentar, têxtil, farmacêutica e cosmética. A polpa é menos utilizada inclusivamente na alimentação animal e a sua adição deve ser limitada devido aos seus elevados níveis de taninos pois contribuem para um sabor amargo, adstringência e pode interferir na digestão reagindo com proteínas ou desativando enzimas proteolíticas (Wursch et al., 1984). Vários estudos têm sido feitos para poder valorizar este subproduto de baixo-custo como para a ração animal (Gasmi-Boubaker et al., 2012; Obeidat et al., 2012), pelo seu poder antioxidante (Kumazawa et al., 2002), como potencial controlador dos níveis de colesterol nos animais e nos humanos (Pérez-Olleros et al., 1999; Zunft et al., 2003) e como fonte de carbono na produção de etanol (Roukas, 1994; Lima-Costa et al., 2012). Este trabalho consistiu no uso de extratos aquosos de alfarroba, provenientes da polpa de alfarroba como fonte de carbono no meio de cultura.

1.2.3. Microrganismo Fermentativo

O bioetanol produzido mundialmente é majoritariamente obtido por fermentação da glucose do milho nos EUA e da sacarose da cana do açúcar no Brasil.

Fermentação pode ser definida como um processo metabólico onde o substrato orgânico é submetido a transformações químicas devido á atividade enzimática de enzimas excretadas pelos microrganismos. Esta pode ser aeróbica ou anaeróbica consoante as necessidades de oxigénio do processo. A reação fermentativa é anaeróbica mas o processo de produção de bioetanol é em geral aeróbico (pequena adição de oxigénio).

Para a produção de bioetanol efetua-se uma fermentação alcoólica que é um processo metabólico onde ocorre conversão de açúcares em etanol e CO₂ em condições anaerobiose, sem a utilização de uma cadeia respiratória.

Múltiplos estudos e revisões têm sido publicados sobre a produção fermentativa de bioetanol com microrganismos de diversas categorias, as bactérias *Zymomonas mobilis* (Mazaheri et al., 2012) e *Escherichia coli* (Lindsay SE et al., 1995), as leveduras *Kluyveromyces marxianus* (Limtong et al., 2009) e *Saccharomyces cerevisiae* (Turhan et al., 2012) e o bolor *Rhizopus oryzae* (Millati et al., 2005).

As leveduras principalmente a *Saccharomyces cerevisiae* são a primeira escolha para a produção industrial de etanol, devido às suas taxas específicas de crescimento e de produção de etanol, elevada tolerância ao etanol e outros inibidores (formados durante os pré-tratamentos e a fermentação), capacidade de crescer rapidamente em anaerobiose (condições características de trabalho em reatores de larga escala), além de serem geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) (Mussato et al., 2010).

1.2.3.1. Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo unicelular, anaeróbio facultativo, capaz de se dividir rapidamente num meio definido e tem a capacidade de crescer em meios com sacarose, glucose, frutose, maltose e trealose.

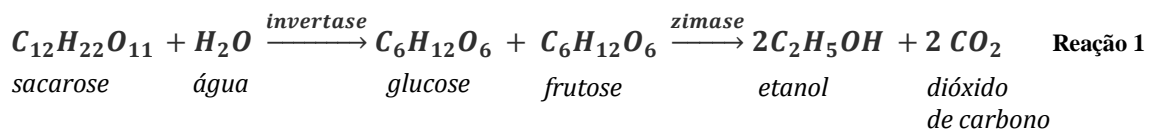
A fonte de carbono preferencialmente consumida é a glucose, influenciando os padrões de consumo da levedura através dos mecanismos de catabolismo dos outros açúcares por indução ou repressão dos transportadores e das enzimas.

Em condições anaeróbicas *Saccharomyces cerevisiae* pode fermentar glucose ou etanol, em condições aeróbicas ocorre preferencialmente a respiração podendo porem ocorrer

também fermentação devido á repressão pela glucose. Em meios com elevadas concentrações de glucose (superior a 20 g/l) ocorre uma diminuição da taxa específica de consumo de O₂, juntamente com uma degradação dos componentes da via respiratória e uma repressão das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. A este fenómeno de fermentação alcoólica em condições aeróbias dá-se a designação de Efeito de *Crabtree*.

Os dissacarídeos para serem metabolizados necessitam de hidrólise prévia, esta pode ocorrer fora da membrana celular no espaço periplasmático ou no interior da célula. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a maioria da hidrólise é feita com a invertase extracelular.

A invertase que atua como catalisador e ajuda a converter a sacarose em glucose e frutose, que pela ação da enzima zímase são convertidos em etanol e dióxido de carbono (Reação 1).



As leveduras são expostas a diferentes tipos de stress durante o processo fermentativo tais como pressão osmótica, etanol, pH baixo, esgotamento de nutrientes, temperatura. Durante a produção fermentativa de etanol, as células estão sujeitas à diminuição do teor de açúcar, diminuição do pH extracelular e ao aumento do teor de álcool e de CO₂, que intensificam os efeitos das outras formas de stresse referidas.

Uma forma de proteger as células das agressões do meio fermentativo é a imobilização celular que também permite a sua reutilização com maior facilidade.

1.3. APERFEIÇOAMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

As margens de lucro com a produção de etanol são baixas, retorno de capital é incerto devido às oscilações do preço de petróleo, os custos de produção devem ser mantidos o mais baixos possível. De forma a ultrapassar os preços do mercado e a baixar os custos de produção, os processos fermentativos devem ser melhorados. Vários métodos têm sido utilizados de forma a melhorar a produção de etanol como a recirculação de células e a imobilização celular pois diminuem os custos de produção, aumentam as produtividades e os rendimentos de conversão.

1.3.1. Recirculação de células

A recirculação de células é a reutilização celular de processos fermentativos.

Existem diversos métodos de recirculação celular por sedimentação, centrifugação, filtração (*hollow fiber*, *spin fiber* e *cross filtration*), ressonância acústica e imobilização celular.

Um método de recirculação clássico usado é o processo Melle-Boinot que consiste na separação de células no final de um ciclo de fermentação para inocular a fermentação seguinte.

A separação geralmente é efetuada por centrifugação com uma recuperação celular de 85 %, porém a centrifugação é demasiado complexa para ser rentável em larga escala, a utilização de métodos de separação mais simples é importante para tornar este passo de recuperação celular economicamente viável. Através da imobilização celular a separação torna-se bastante mais simples sem ser necessário recorrer à centrifugação (Martins da Matta e Andrade Medronho, 2000).

A recirculação de células é importante na produção fermentativa de etanol e tem como principais vantagens a economia do processo pois aumenta a densidade celular e a produtividade e diminui o tempo da operação, o tamanho dos bioreatores diminui o que torna o processo mais flexível, o processo é mais fácil de iniciar, baixos tempos de residência conduzem a produtos com melhor qualidade, redução dos gastos associados à preparação de inoculo e seleção das leveduras mais resistentes devido às condições operacionais exigentes como o stress osmótico, concentrações de etanol, contaminação microbológica e acidificação do meio (Amorim et al., 2011). Como desvantagens o

risco de contaminação, aumento dos custos analíticos e eventual problemas de licenciamento do sistema.

Diversos estudos têm sido publicados recentemente sobre produção fermentativa de etanol com recirculação celular (Wang et al., 2011; Bicalho et al., 2012; Landaeta et al., 2012). Com uma recirculação foram obtidas melhorias no rendimento $Y_{E/S}$ de cerca de 75.4% (Wang et al., 2011).

1.3.2. Imobilização celular

Na 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971) definiu-se que biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados numa região definida do espaço, com retenção das suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000).

A imobilização tem um papel importante na produção fermentativa de etanol pois aumenta a densidade celular e conseqüentemente o rendimento e a produtividade, diminui do tempo de residência, aumenta a proteção das células contra inibidores (produtos secundários, etanol e substrato) e facilita a separação das células da fase líquida, onde os produtos de interesse estão presentes (Corcoran, 1985). A produção de etanol por células imobilizadas tem sido vastamente estudada (Yu et al., 2010; Behera et al., 2010; Yan et al., 2012).

A escolha de um método e suporte de imobilização depende das características do microrganismo e das condições de trabalho do microrganismo imobilizado. Não existe um método geral e nem um suporte universal, adequados para qualquer processo, esta escolha recai no binômio suporte-método que apresentar maior retenção da atividade (Vitolo, 1988).

1.3.2.1. Métodos de imobilização celular em suportes sólidos

Existe uma vasta gama de procedimentos básicos que visam a imobilização de biocatalisadores. Os métodos de imobilização celular em suportes sólidos dividem-se em duas grandes categorias, por ligação ou adsorção a superfícies do transportador e por oclusão em matrizes porosas.

1.3.2.1.1. Ligação ou adsorção a superfícies do transportador

Imobilização por interação iônica ou adsortiva é um método de elevado interesse uma vez que é simples, económico e permite a regeneração da matriz usada, tem como principal desvantagem o desprendimento de células para o meio reacional, que gera um equilíbrio entre as células adsorvidas e as livres (Groboillot et al., 1994). Imobilização por ligações covalentes resulta numa interação biocatalisador-suporte mais forte, sendo a principal desvantagem o risco de danos à membrana celular, no caso de imobilização de células (Groboillot et al., 1994). As superfícies dos suportes são geralmente tratadas quimicamente para que permitam a ligação covalente (Xiao et al., 1997).

1.3.2.1.2. Oclusão numa matriz porosa

A imobilização por meio de oclusão em matrizes porosas baseia-se na inclusão artificial das células numa malha rígida ou semirrígida que impede a difusão destas para o meio de cultivo, mas permite a troca de nutrientes, metabólitos, gases durante o processo fermentativo.

Este método de imobilização tem como principais vantagens a facilidade de preparação do suporte, a disponibilidade dos materiais, a proteção conferida pelo suporte aos ataques das hidrolases e dos inibidores e a manutenção da integridade da estrutura macromolecular do biocatalisador, como desvantagens a impossibilidade de regeneração do suporte, a baixa estabilidade mecânica do gel, as limitações de transferência de massa por difusão molecular e baixa longevidade do suporte que pode ser destruído devido ao crescimento celular ou libertação de CO₂ (Fernandes et al., 2003).

1.3.2.2. Suportes

Na imobilização celular a seleção de um suporte é uma etapa crucial. Os fatores importantes para a escolha do suporte de imobilização são a sua natureza (orgânico, inorgânico, natural ou sintético), existência de grupos funcionais reativos, resistência química, mecânica e biológica, morfologia, custo e disponibilidade. Devido à elevada quantidade de características a ter em conta, é frequente que a matriz obtida seja o resultado de um compromisso das melhores condições possíveis, por exemplo a

utilização de uma matriz porosa permite reter uma elevada carga de biocatalisador, o diâmetro das partículas do suporte tem um papel importante na transferência de massa por difusão, porém se o meio reacional for agressivo a oclusão deverá ser feita numa matriz porosa que garanta a proteção do biocatalisador mesmo que isso seja desfavorável em termos de transferência de massa (Fernandes et al., 2003).

Diversos suportes têm sido utilizados na produção fermentativa de etanol com imobilização celular como o alginato, agar (Behera et al., 2010), goma carragena (Nigam, 2000), peças de madeira (Razmovski e Pejin, 1996), cerâmica (Zhang et al., 1996), casca de laranja (Plessasa et al., 2007) e *luffa cylindrica* (Behera et al., 2011).

Acredita-se que o desenvolvimento de novos suportes de imobilização, possam contribuir para o desenvolvimento de novos processos em larga escala.

Neste trabalho foram usados como suportes de imobilização o alginato de cálcio, o alginato de cálcio com alfarroba, a *luffa cylindrica* e os *kibbles* de alfarroba.

1.3.2.3. Efeito da imobilização na cinética e propriedades celulares

Consoante o método de imobilização utilizado a atividade fisiológica das células pode mudar. Estas mudanças podem ocorrer devido a limitações de transferência de massa por efeitos de difusão, variações no padrão de crescimento (taxa específica de crescimento), efeitos de tensão de superfície e de pressão osmótica, diminuição da atividade da água, dificuldades na comunicação entre células, mudanças na morfologia celular devido a alterações nas propriedades físico-químicas do microambiente e na permeabilidade da membrana, disponibilidade de nutrientes do meio, diminuição da inibição por substrato e aumento da tolerância ao etanol.

1.4. OBJECTIVOS

Esta dissertação de mestrado tem como objetivo principal otimizar as condições fermentativas para a produção de bioetanol usando como fonte de carbono o extrato de alfarroba um subproduto da indústria agro-industrial. As metas a alcançar foram:

- Avaliar, em ensaios realizados em erlenmeyer, qual a melhor concentração de açúcares iniciais para a produção de bioetanol e entender as diferentes cinéticas de consumo de açúcares.
- Verificar a capacidade de recirculação celular por parte da *Saccharomyces cerevisiae* F13A na sua forma livre.
- Estudar diferentes matrizes de imobilização económicas e que aumentem as eficiências metabólicas da levedura .
- Verificar a capacidade de recirculação celular por parte da *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em diferentes matrizes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATÉRIA-PRIMA

Neste trabalho a principal matéria-prima utilizada é a polpa da alfarroba, um subproduto agroalimentar da indústria transformadora de alfarroba Victus Industrial Fareense do Algarve pela sua colaboração como Projeto Alfaetílico, financiado pelo QREN, Pro Algarve. As vagens de alfarroba fornecidas encontravam-se parcialmente processadas na forma de kibble.

2.1.1. Extração dos açúcares solúveis da alfarroba

O método de extração dos açúcares da alfarroba já se encontra otimizado (Manso et al., 2010). De forma a remover a humidade dos kibbles e tornar o processo de extração mais eficiente, estes secaram numa estufa (Binder FD53,EUA) a 50 °C durante a noite. Após a secagem foram triturados por um moinho (IKA-MF10B, Alemanha). A extração aquosa foi feita num rácio de 0,3% (p/v) com a temperatura de 25 ± 1 °C, agitação de 150 rpm durante 1 h numa agitadora orbital (IKA-KS4000i, Alemanha). O extrato obtido foi centrifugado numa ultracentrifuga (Beckman Coulter J14MC, EUA) a 12 000 rpm, com uma temperatura de 4 °C durante 20 minutos, o sobrenadante recolhido foi filtrado com uma bomba de vácuo utilizando filtros com uma porosidade de 0.45 µm (Whatman 1). Nesta fase o extrato de alfarroba apresenta um concentração de aproximadamente 140 g/l. Após a filtração procedeu-se á sua concentração através de um evaporador rotativo (Heidolph 94200, Alemanha) a uma temperatura de 70 °C. No fim deste processo o extrato de alfarroba tem uma concentração de aproximadamente 500 g/l, O extrato de alfarroba concentrado é armazenado a uma temperatura de -20 °C.

2.2. MICRORGANISMO

Levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A isolada no ISE/UA1g do mosto do vinho (Prof Célia Quintas) e adaptada a condições de tolerância ao etanol no LEBA/CIMA.

2.3. MEIOS DE CULTURA

Todos os meios de cultura foram esterilizados na autoclave (Uniclave 87, Portugal) por calor húmido a 121 ± 1 °C durante 20 minutos.

Para o armazenamento o meio utilizado foi o Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) sólido constituído por 10 g/l extrato de levedura, 20 g/l de peptona e 20 g/l de glucose e suplementado com 10 g/l de agar.

Para a ativação de culturas o meio utilizado foi o YPD líquido constituído por 10 g/l extrato de levedura, 20 g/l de peptona e 20 g/l de glucose.

O meio do pré-inoculo é constituído por 3 g/l de extrato de levedura e 5 g/l de peptona, a fonte de carbono utilizada é a mesma da fermentação mas com a concentração aproximadamente 1/3 da utilizada na fermentação.

O meio de fermentação é constituído por 3 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de peptona e extrato de alfarroba a concentrações a definir consoante o objetivo do ensaio experimental.

2.4. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E CRESCIMENTO

2.4.1. Armazenamento

Para armazenamento a longo prazo a cultura foi mantida a - 80 °C em microtubos com meio YPD líquido com 30 % v/v de glicerol por tempo indeterminado.

Em armazenamento a curto prazo a levedura foi repicada para placas com meio YPD sólido suplementado com 10 g/l de agar, incubadas em estufa (Selecta, Espanha) durante 24 a 48 h a 30 ± 1 °C, e depois mantidas a 4 °C.

2.4.2. Pré-inoculo

De forma a ativar a levedura do armazenamento a curto prazo, a placa é posta durante 24 h a 30 ± 1 °C na estufa para seguidamente inocular em 50 ml meio YPD líquido num balão erlenmeyer de 150 ml e ficar a incubar na agitadora orbital (IKA 4s 4000) a 30 ± 1 °C e 150 rpm durante 24 h.

O pré-inoculo é iniciado com 10 % de suspensão celular proveniente do meio de ativação e fica a incubar na agitadora orbital a 30 ± 1 °C e 150 rpm durante pelo menos 18 h, após este tempo é realizada a contagem de células pela câmara de *Neubauer* (Blau Brand, Alemanha) para poder calcular o volume de inoculo a utilizar para que a fermentação seja iniciada com uma concentração celular de 1×10^7 células / ml.

2.4.3. Crescimento em erlenmeyer

Todas as fermentações foram efetuadas em triplicado, sendo o manuseamento dos balões erlenmeyer efetuado em regime de esterilidade, recorrendo para isso ao uso de uma câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II A) e de material estéril. As fermentações realizaram-se em triplicado em balões erlenmeyers de 250 ml com 150 ml de meio. Após inoculação os crescimentos foram colocados numa agitadora orbital (IKA 4s 4000) a 30°C e 150 rpm. A fermentação foi acompanhada com monitorização do pH, análise da densidade ótica por espectrofotometria, contagem de células viáveis pelas unidades formadoras de colónias, concentração de biomassa e quantificação de açúcares e etanol por HPLC como serão descritos em 2.7.

2.5. IMOBILIZAÇÃO CELULAR

Para todas as matrizes de imobilização o pré-inóculo foi efetuado com descrito em 2.4.2. Todas as soluções foram esterilizadas na autoclave (Uniclave 87, Portugal) por calor húmido a 121 ± 1 °C durante 20 minutos.

2.5.1. Alginato de cálcio

A solução de alginato de sódio a 2% (w/v) foi preparada dissolvendo a alginato de sódio em água destilada, esterilizada por calor húmido durante 5 min a 121 °C e guardada durante a noite a 4 °C. Após a determinação do volume de pré inoculo a utilizar para

iniciar a fermentação a 1×10^7 células / ml, em condições de total esterilidade foi misturada numa proporção de 1:1 o meio do pré-inoculo com o alginato de sódio a 2% (w/v). A mistura foi colocada numa seringa e gotejada para uma solução agitada de CaCl_2 0.1 M, onde as esferas ficaram a solidificar durante 20 minutos. (Razmovski e Vučurović, 2011) Após a solidificação das esferas de alginato estas são removidas da solução e lavadas 4 x com NaCl 0,9 % (w/v). As esferas são reservadas a 4 °C numa solução de CaCl_2 3 g/l.

2.5.2. Alginato de cálcio com alfarroba

Para formar as esferas de alginato com alfarroba, antes da esterilização do alginato de sódio juntou-se 0.3 g de farinha de alfarroba com 10 ml de uma solução de NaCl 0.9 % (Razmovski e Vučurović, 2011).

Todo o resto do procedimento é igual ao descrito em 2.5.1.

2.5.3. Luffa cylindrica

A luffa cylindrica deve ser cortada em quadrados de mais ou menos 0.8 cm de lado e esterilizada por calor húmido durante 20 min a 121 °C. Inserir a luffa cylindrica esterilizada no erlenmeyer do pré-inoculo quando este estiver á concentração celular desejada para iniciar a fermentação e deixar a agitar durante 15 minutos. Após este tempo separar a luffa cylindrica e lavar com meio fresco da fermentação para remover as células livres. No final da lavagem inocular a fermentação as células que ficaram imobilizadas na luffa cylindrica.

2.5.4. Kibbles de alfarroba

O procedimento a seguir é semelhante ao descrito em 2.5.3, porem neste caso não é necessário cortar os kibbles pois já vêm em tamanhos fáceis de trabalhar.

2.6. ENSAIOS EXPERIMENTAIS

2.6.1. Fermentação com diferentes concentrações de açúcares totais utilizando como fonte de carbono o extrato de alfarroba

Realizaram-se oito ensaios de modo a estudar os efeitos de diferentes concentrações de açúcares totais utilizando como fonte de carbono o extrato de alfarroba. As concentrações de açúcares totais estudadas foram 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 g/l. O ensaio decorreu com o meio de cultura YPD líquido descrito em 2.3, em triplicado em erlenmeyers de 250 ml com um volume final de meio de 150 ml. Após a esterilização os meios foram inoculados com uma concentração inicial de células de 1×10^7 cel/ml e foram a incubar a 30 ± 1 °C com agitação de 150 rpm numa agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha). Foram recolhidas amostras de 2 em 2 h e a cada 12 h espaçou-se a amostragem aumentando 1 h, até perfazer um tempo total de fermentação de 96 h. Para cada amostra foi analisado o crescimento celular por espectrofotometria, concentração de biomassa, contagem de células viáveis, monitorização do pH, quantificação dos açúcares e do etanol e monitorização da atividade da água, utilizando a metodologia descrita em 2.7.

2.6.2. Ensaio de recirculação de células livres

Realizou-se um ensaio de crescimento com uma concentração de açúcares totais de aproximadamente 250 g/l utilizando como fonte de carbono o extrato de alfarroba e o meio de cultura YPD líquido descrito em 2.3. Este ensaio foi realizado em triplicado em erlenmeyers de 250 ml com um volume final de meio de 150 ml, com uma concentração inicial de células de 1×10^7 cel/ml e foram a incubar a 30 ± 1 °C com agitação de 150 rpm numa agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha). Foram recolhidas amostras de 2 em 2 h e a cada 12 h espaçou-se a amostragem aumentando 1 h, até perfazer um tempo total de fermentação de 96 h. Para cada amostra foi analisado o crescimento celular por espectrofotometria, concentração de biomassa obtida pela correlação, contagem de células viáveis, monitorização do pH, quantificação dos açúcares e do etanol, utilizando a metodologia descrita em 2.7. Para a primeira recirculação celular no fim da fermentação o meio foi transferido para falcons de 50 ml e centrifugado (Hettich Zentrifugen – Universal 320) durante 15 min a 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado

e o pellet ressuspendido em meio fresco, inoculando assim a fermentação seguinte. O ensaio da 1ª recirculação decorreu durante 76 h nas mesmas condições da fermentação, e foram analisados os mesmos parâmetros. O processo da 2ª recirculação foi idêntico ao da 1ª recirculação e a terceira fermentação decorreu durante 96 h nas mesmas condições da fermentação, e foram analisados os mesmos parâmetros.

2.6.3. Fermentação de células imobilizadas em 4 matrizes diferentes

Realizou-se um ensaio com 4 matrizes de imobilização celular alginato de cálcio, alginato de cálcio com alfarroba, luffa cylindrica e kibbles de alfarroba, num meio YPD líquido com composição descrita em 2.3 com uma concentração de açúcares totais de aproximadamente 250 g/l utilizando como fonte de carbono o extrato de alfarroba.

Efetuuou-se a imobilização celular nas quatro matrizes diferentes, processo descrito em 2.5. Após a imobilização o meio foi inoculado com as diferentes matrizes. Este ensaio foi realizado em triplicado em erlenmeyers de 250 ml com um volume final de meio de 150 ml e foram a incubar a 30 ± 1 °C com agitação de 150 rpm numa agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha). Foram recolhidas amostras de 2 em 2 h e a cada 12 h espaçou-se a amostragem aumentando 1 h, até perfazer um tempo total de fermentação de 96 h. Para cada amostra foi analisado o crescimento celular por espectrofotometria, concentração de biomassa, contagem de células viáveis, monitorização do pH, quantificação dos açúcares e do etanol, utilizando a metodologia descrita em 2.7.

2.6.4. Recirculação de células imobilizadas em 4 matrizes diferentes

Realizou-se um ensaio com 4 matrizes de imobilização celular alginato de cálcio, alginato de cálcio com alfarroba, luffa cylindrica e kibbles de alfarroba, num meio YPD líquido com composição descrita em 2.3 com uma concentração de açúcares totais de aproximadamente 250 g/l utilizando como fonte de carbono o extrato de alfarroba.

Efetuuou-se a imobilização celular nas quatro matrizes diferentes, processo descrito em 2.5. Após a imobilização o meio foi inoculado com as diferentes matrizes. Este ensaio foi realizado em triplicado em erlenmeyers de 250 ml com um volume final de meio de 150 ml e foram a incubar a 30 ± 1 °C com agitação de 150 rpm numa agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha). Foram recolhidas amostras de 2 em 2 h e a cada 12 h

espaçou-se a amostragem aumentando 1 h, até perfazer um tempo total de fermentação de 96 h. Para cada amostra foi analisado o crescimento celular por espectrofotometria, concentração de biomassa, contagem de células viáveis, monitorização do pH, quantificação dos açúcares e do etanol, utilizando a metodologia descrita em 2.7. No fim da fermentação com o auxílio de uma rede separou-se as matrizes de imobilização do meio fermentativo, foram lavadas com meio fresco para remover as células livres e inoculou-se a fermentação seguinte fazendo assim a primeira recirculação celular. O ensaio da 1ª recirculação decorreu durante 96 h nas mesmas condições da fermentação, e foram analisados os mesmos parâmetros. O processo da 2ª recirculação foi idêntico ao da 1ª recirculação e a terceira fermentação decorreu durante 96 h nas mesmas condições da fermentação, e foram analisados os mesmos parâmetros.

2.7. PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Ao longo do decorrer da fermentação são feitas diversas amostragens, As análises efectuadas para todos os ensaios e a todas as réplicas foram as que de seguida se descrevem.

2.7.1. Determinação do crescimento celular

2.7.1.1. Espectrofotometria

O crescimento celular pode ser seguido através da densidade ótica por espectrofotometria na gama do visível num comprimento de onda de 590 nm. A amostra é lida no espectrofotómetro (Cintra 202 – GBC) utilizando como branco uma amostra do meio antes de ser inoculado. Quando é necessário efetuar diluições na amostra esta também é realizada no branco. Este é um método que quantifica células viáveis e não viáveis, mas tem como vantagens a sua simplicidade e rapidez de obtenção de resultados.

2.7.1.2. Contagem de células viáveis

O crescimento celular pode ser seguido através da contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs). Efetuam-se diluições sucessivas das amostras em tubos de ensaio com tampão fosfato 0,1M a pH 7.0. As diluições nestes ensaios vão de 1×10^2 a 1×10^7

vezes e devem ser perfeitamente homogêneas antes de iniciar uma nova diluição, no fim todas as diluições são inoculadas com 3 gotas de 20 µL em placas com meio YPD sólido. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Incuberm - Raypa) no mínimo 48 horas à temperatura de 25 ± 1 °C. Este método tem a vantagem de quantificar apenas células viáveis, mas a obtenção dos resultados é mais morosa do que por espectrofotometria.

2.7.1.3. Determinação de biomassa

Para a determinação dos pesos secos celulares retiraram-se 1.2 mL de amostra para 2 eppendorfs de 1.5 mL previamente secados e pesados. A amostra foi colocada na centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415D) a 13200 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi retirado para uma posterior quantificação dos açúcares e etanol presentes no meio. Efetuou-se uma nova centrifugação de 30 segundos para retirar qualquer resíduo de meio. Os eppendorfs foram colocados a secar na estufa (Binder FD53, EUA) durante 48 h a 60 ± 1 °C e só depois pesados. Com os dados da biomassa seca foi possível efetuar a correlação (Equação 1) entre a densidade ótica e o peso seco celular.

$$y = 0.412 x - 0.0151 \quad \text{Equação 1}$$

Esta correlação foi utilizada para calcular o peso seco do ensaio 2.6.1 em diante.

2.7.2. Métodos analíticos

2.7.2.1. Monitorização do pH

Durante todas as fermentações o pH foi medido com um potenciômetro (Crison GLP 21 ou Crison Basic 2). Este é calibrado a cada 24 h para garantir a veracidade dos resultados. Este acompanhamento do pH é feito num erlenmeyers inoculado exclusivamente para esse efeito.

2.7.2.2. Quantificação dos açúcares e etanol

A quantificação dos açúcares (glucose frutose e sacarose) e etanol foi realizada através do método de cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC). O equipamento de HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom) é constituído por um detector (IR L-2490), uma

bomba (L-2130), um forno (L-2300), um auto-injector (L-2200) e uma coluna cromatográfica (Aminex HPX-87P Biorad) equipada com uma pré-coluna (Carbo-P Biorad). A quantificação foi realizada a 85 °C usando como eluente água Mili-Q num fluxo de 0.6 ml/min esta foi filtrada com um filtro 0.22 µm (Milipore) e sonicada num banho de sonicação (Ultrason - Salecta) durante 30 min.

As amostras foram centrifugadas como descrito em 2.7.1.3 e filtradas com filtros de seringa com um diâmetro de poro de 0.2 µm (Milipore) para um *vial*.

2.7.2.3. Monitorização da atividade da água (a_w)

As medições da atividade água foram realizadas num medidor de atividade da água (Rotronic HygroLab 3) para amostras líquida. As amostras eram colocadas nos suportes e lido diretamente no equipamento com um tempo de espera de 5 minutos.

2.8. CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

2.8.1. Taxa específica de crescimento (μ)

A taxa específica de crescimento foi determinada através do programa de modelação DMFit (<http://modelling.combase.cc>). Este *software* on-line determina a taxa específica de crescimento com base em modelos de aproximação e utiliza o logaritmo da concentração celular obtida através do peso seco em função do tempo de fermentação. A taxa específica de crescimento é expressa em h⁻¹.

2.8.2. Tempo de duplicação celular (td)

O tempo de duplicação celular foi determinado pela Equação 2.

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Equação 2

O tempo de duplicação é expresso em h.

2.8.3. Rendimento da biomassa produzida em função do substrato consumido ($Y_{x/s}$)

O rendimento da biomassa produzida (X) em função do substrato consumido (S) corresponde ao declive calculado por regressão linear dos valores de biomassa (modelada por DMFIT) em relação aos açúcares totais consumidos em função do tempo. Este rendimento é expresso em g biomassa produzida / g substrato consumido.

2.8.4. Rendimento do etanol produzido em função do substrato consumido ($Y_{E/S}$)

O rendimento do etanol produzido (E) em função do substrato consumido (S) corresponde ao declive calculado por regressão linear dos valores de etanol produzido em relação aos açúcares totais consumidos em função do tempo. Este rendimento é expresso em g etanol produzido / g substrato consumido.

2.8.5. Produtividade máxima de etanol (Produtividade)

A produtividade máxima de etanol foi calculada através da Equação 3.

$$Produtividade = \frac{Etanol_{máximo}}{t_{Etanol_{máximo}}} \quad \text{Equação 3}$$

O etanol_{máximo} é expresso em g/l, o t_{etanol máximo} em h, e a produtividade em g/l.h.

2.8.6. Taxa específica de consumo de substrato (qS)

A taxa específica de consumo do substrato expressa a quantidade de substrato consumido por unidade de biomassa em função do tempo de fermentação (h). As taxas de consumo de glucose e frutose foram calculadas a partir das suas concentrações ao longo do tempo, onde pegando no exemplo da glucose G_T é a concentração de glucose, G_0 a concentração de glucose inicial, G_H a glucose obtida a partir da hidrólise da sacarose e G_C a glucose consumida pelas células. O balanço total de glucose é dado pela Equação 4.

$$G_T = G_0 + G_H - G_C \quad \text{Equação 4}$$

A evolução ao longo do tempo é obtida por derivação como representada na Equação 5.

$$\frac{dG_T}{dt} = \frac{dG_H}{dt} - \frac{dG_C}{dt} \quad \text{Equação 5}$$

Estas se forem expressas em mol, as taxas de produção de glucose a partir da frutose são iguais á sua taxa de hidrólise, uma vez que uma mole de sacarose produz uma mole de glucose e outra de frutose. A taxa de consumo celular é igual a taxa específica de consumo da glucose q_G expressa por moles de glucose consumida por grama de biomassa (X) por hora calculada pela Equação 6.

$$q_G = \frac{\left(\frac{dG_T}{dt} - \frac{dS}{dt}\right)}{X} \quad \text{Equação 6}$$

$\frac{dG_T}{dt}$ e $\frac{dS}{dt}$ são determinadas por regressão de um intervalo de tempo, e a biomassa (X) em g/l corresponde á biomassa modelada com o DMFIT no tempo médio do intervalo (Lima-Costa et al., 2012).

2.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todos os dados calculados em cada ensaio foram submetidos a análise estatística as regressões lineares foram efetuadas no Microsoft Office Excel 2010 e as análises de variância foram efetuadas pelo teste Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$) no software SigmaPlot versão 12.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de extração de açúcares, temperatura, arejamento e ensaios de pré-tratamento e hidrólise enzimática da celulose que determinavam vários parâmetros fisiológicos e bioenergéticos de forma a avaliar a estirpe *Saccharomyces cerevisiae* F13A tinham anteriormente sido realizados no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental. O presente estudo procurou numa primeira fase determinar qual a concentração inicial de açúcares que permite obter o melhor rendimento etanol/ substrato. Numa segunda fase, com o parâmetro de concentração inicial de açúcares estabelecido procedeu-se a fermentações com células imobilizadas em 4 suportes diferentes (alginato de cálcio, alginato de cálcio + alfarroba, *kibbles* de alfarroba e *luffa cylindrica*). Numa terceira e última fase executaram-se diversos ensaios de recirculação, (i) células livres (ii) células provenientes de fermentações com inibidores do pré-tratamento ácido otimizado dentro do projeto Alfaetílico (ii) células imobilizadas.

Ao longo do trabalho, para a apresentação dos valores relativos aos vários parâmetros cinéticos determinados, todos os ensaios foram realizados com 3 repetições.

3.1. ENSAIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AÇUCARES TOTAIS UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO O EXTRATO DE ALFARROBA

Para que a produção do bioetanol seja rentável é necessário determinar a concentração de açúcares inicial que obtém melhor rendimento etanol / substrato e produtividades de etanol. Procedeu-se ao crescimento celular com um inoculo inicial de 1×10^7 células/ml em Erlenmeyer com 150 ml de meio com a composição descrita anteriormente nos Materiais e Métodos e com as concentrações de açúcar iniciais provenientes do extrato de alfarroba de 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 g/l, com a temperatura de 30 ± 1 °C e uma agitação de 150 rpm. Efetuaram-se análises para a quantificação do crescimento celular, monitorização de pH, quantificação de açúcares e etanol por HPLC e monitorização de atividade da água. A fermentação decorreu durante 96 h.

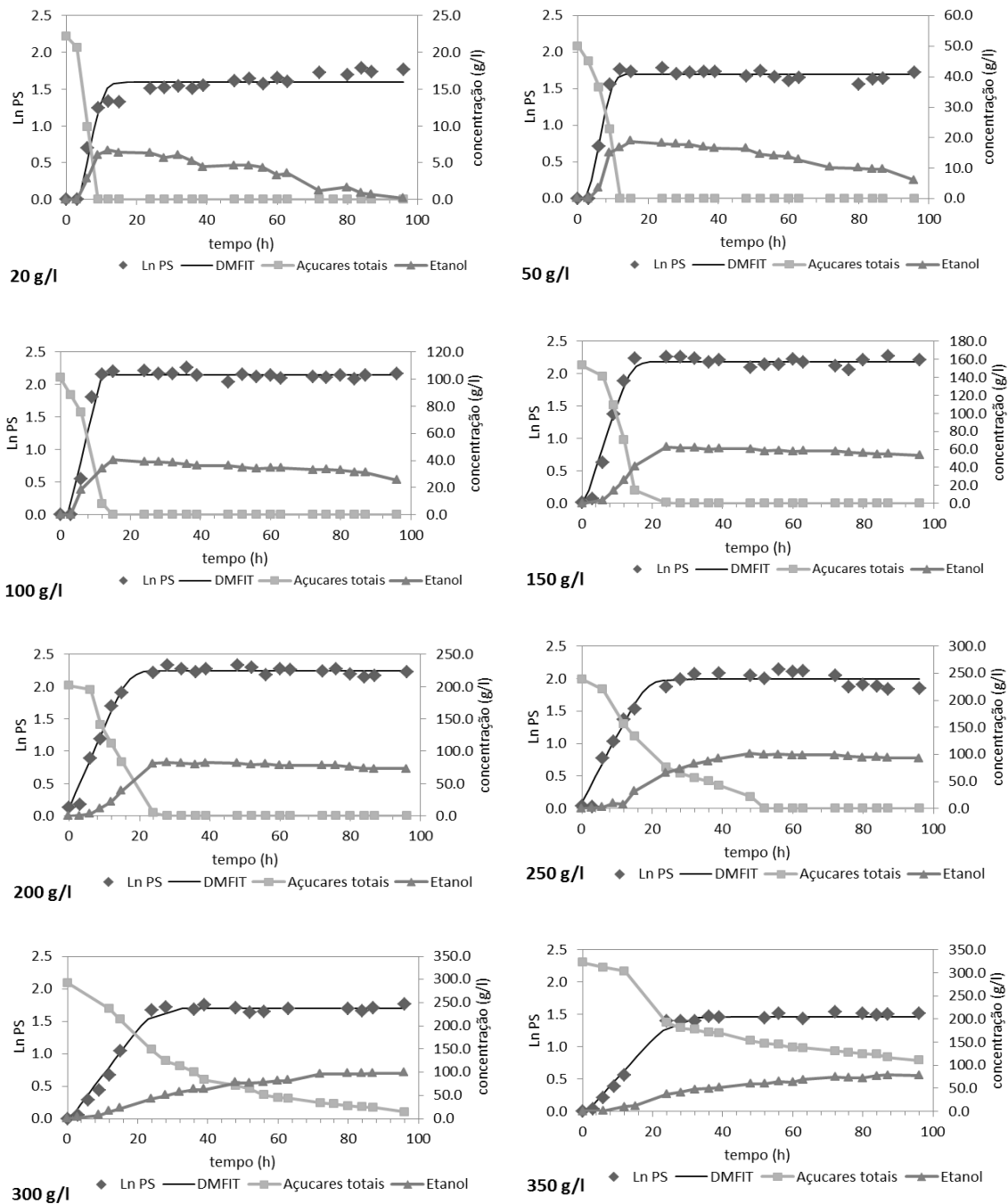


Figura 1 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, em erlenmeyer, em diferentes concentrações de açúcares totais utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono acompanhando o logaritmo do peso seco, modelação pelo *software* DMFIT, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Tabela 1 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A, com diferentes concentrações de açúcares totais utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono, em erlenmeyers que decorreu numa agitadora orbital a 30 °C, 150 rpm durante 96 h

concentração (g/l)	μ (h^{-1})	td (h)	$t_{\text{estacionária}}$ (h)	Etanol máx (g/l)	$t_{\text{etanol máx}}$ (h)	Conversão de açúcares (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)	Produtividade etanol (g/l.h)
20	0.224 ± 0.0215 ^b	3.10	12	6.09 ± 0.034 ^h	9	100.00	0.131 ± 0.0048 ^a	0.312 ± 0.0110 ^c	0.557 ± 0.0029 ^h
50	0.226 ± 0.0103 ^a	2.88	12	18.84 ± 0.104 ^g	15	100.00	0.113 ± 0.0175 ^b	0.384 ± 0.0173 ^b	1.256 ± 0.0069 ^e
100	0.207 ± 0.0124 ^a	3.10	12	40.55 ± 0.389 ^f	15	100.00	0.089 ± 0.0064 ^c	0.387 ± 0.0288 ^b	2.703 ± 0.0259 ^b
150	0.164 ± 0.0122 ^c	4.22	15	62.89 ± 0.842 ^e	24	100.00	0.057 ± 0.0028 ^d	0.406 ± 0.0045 ^b	2.620 ± 0.0351 ^c
200	0.125 ± 0.0054 ^d	5.53	24	81.30 ± 0.036 ^c	24	100.00	0.044 ± 0.0019 ^e	0.410 ± 0.0034 ^b	2.962 ± 0.0013 ^a
250	0.076 ± 0.0110 ^e	6.74	24	101.62 ± 1.173 ^a	48	100.00	0.032 ± 0.0018 ^f	0.483 ± 0.0133 ^a	2.117 ± 0.0244 ^d
300	0.070 ± 0.0044 ^f	9.59	24	98.04 ± 1.821 ^a	96	95.24	0.017 ± 0.0014 ^g	0.347 ± 0.0097 ^{bc}	1.021 ± 0.0190 ^f
350	0.054 ± 0.0037 ^e	11.49	28	77.83 ± 0.298 ^d	96	65.81	0.016 ± 0.0012 ^g	0.375 ± 0.0086 ^b	0.811 ± 0.0031 ^g

Valores de taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de início da fase estacionária ($t_{\text{estacionária}}$), concentração máxima de etanol atingida (Etanol máx), tempo de obtenção do máximo de etanol ($t_{\text{etanol máx}}$), conversão de açúcares, rendimento de biomassa relativamente ao substrato ($Y_{X/S}$), de etanol em relação ao substrato ($Y_{E/S}$) e produtividade do etanol. Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P < 0.05$)

Como podemos observar por análise das curvas de crescimento acima apresentadas (figura 1) não existe praticamente fase de latência nas concentrações do ensaio da fonte de carbono testada. A fase exponencial fica mais prolongada com o aumento da concentração de açúcares e conseqüentemente a taxa específica de crescimento diminui. Há uma exceção neste comportamento na concentração de 20 g/l que pode ser explicado pela falta de dados neste ensaio durante a fase exponencial, o cálculo da taxa específica de crescimento teve de integrar um último ponto que já se encontra no limiar da fase estacionária. O tempo de duplicação aumenta cerca de 1.26 ± 0.125 h entre concentrações. Todos os ensaios entram em total fase estacionária com exceção da concentração de 20 g/l que não estabiliza totalmente, havendo um ligeiro crescimento, acompanhado de diminuição do teor de etanol, o que pode indicar uma possível entrada em crescimento diáuxico.

Através do $Y_{X/S}$ podemos observar que aumentando a concentração de açúcares totais o substrato é menos utilizado para a produção de biomassa, o que pode indicar que este está a ser utilizado para a produção e etanol.

Observando a figura 1 podemos analisar que devido ao esgotamento da fonte de carbono ocorre consumo de etanol nos ensaios com 20, 50, 100, 150, 200 e 250 g/l de açúcares totais. Nos restantes ensaios não há consumo de etanol visto os açúcares serem totalmente convertidos até ao final da fermentação. A concentração de etanol mais elevada foi obtida no ensaio de 250 g/l, com um valor de 101.62 ± 1.173 g/l às 48 h de fermentação. Nas concentrações de 300 e 350 g/l o máximo etanólico não chega a ser atingido uma vez que o valor mais elevado corresponde ao último tempo de fermentação. O $Y_{E/S}$ tem um comportamento crescente até á concentração de 250 g/l com um máximo de 0.483 ± 0.0133 g/g, valor próximo do máximo teórico (0.51 g/g),

para depois decrescer nas concentrações seguintes. O ensaio que apresenta melhor produtividade é com a concentração de 200 g/l.

Os ensaios de 300 e 350 g/l apresentam $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$ baixos o que pode indicar que as elevadas concentrações de açúcares totais condicionam todo o comportamento da levedura, impedindo-a de crescer e de fermentar.

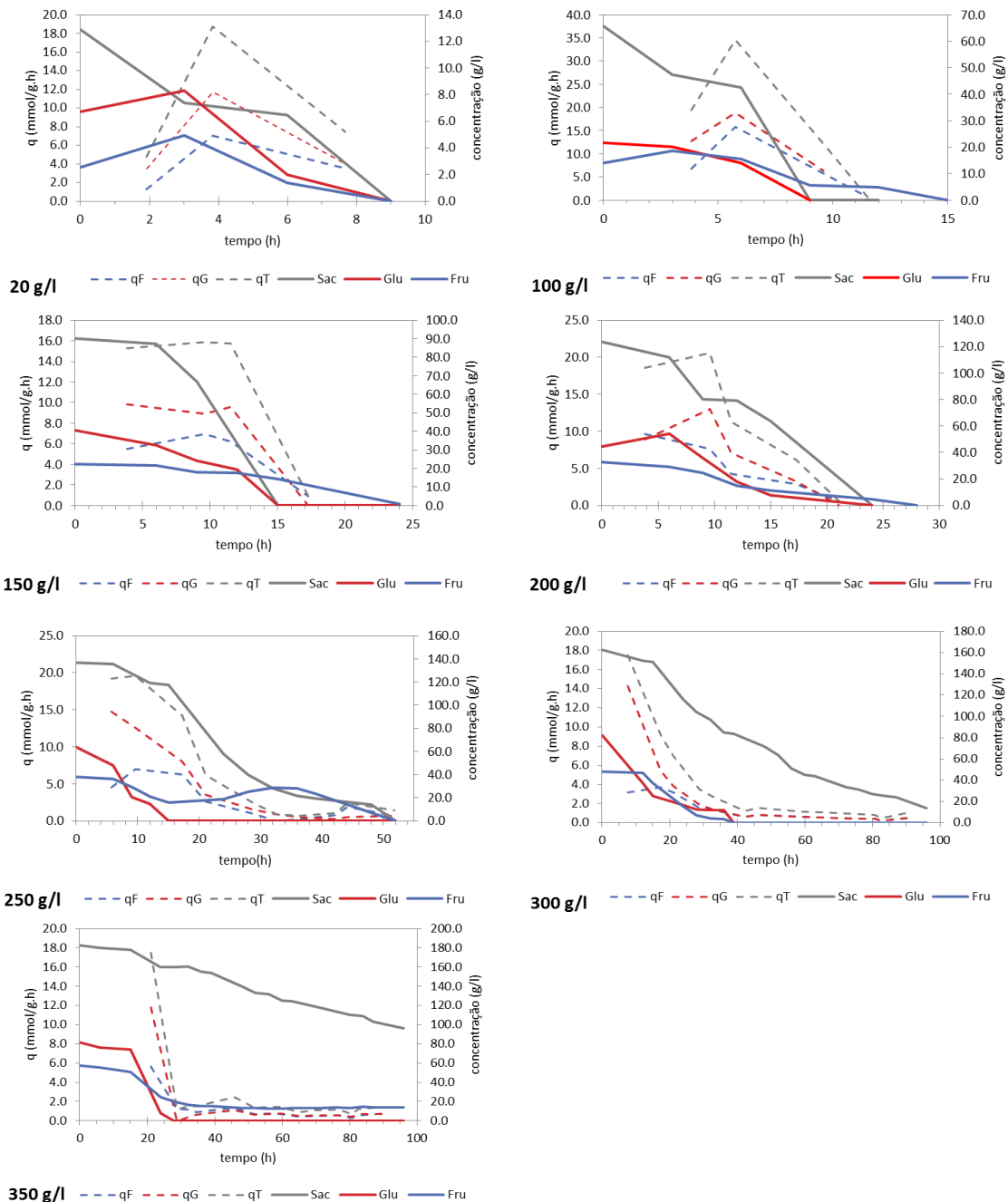


Figura 2 Perfis de consumo dos açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em erlenmeyer com diferentes concentrações de açúcares totais utilizando extrato alfarroba como fonte de carbono, em fermentações que decorreram a 30 °C, 150 rpm numa agitadora orbital durante 96 h . Os perfis de consumo são acompanhados pelas taxas específicas de consumo da glucose (qG), frutose (qF) e açúcares totais (qT) e pelas concentrações da frutose (Fru), sacarose (Sac) e glucose (Glu) ao longo do tempo.

Habitualmente nas primeiras horas de fermentação num meio com baixas concentrações de glucose, ocorre indução da atividade da invertase iniciando o processo de hidrólise da sacarose em glucose e frutose, podendo levar á acumulação de açúcares no meio devido á diferença entre as taxas de consumo e de hidrolise. Em meios com concentrações de glucose superiores a 10 g/l a atividade da invertase e o transporte da frutose são reprimidos. A glucose é a primeira a ser consumida com taxas de consumo superiores ás da frutose, ao longo do tempo estas tendem a ficar idênticas e na fase de esgotamento da glucose, a frutose adquire taxas superiores (Lima-Costa et al., 2012).

Estes dados podem ser confirmados nas concentrações mais baixas de açúcar, no ensaio de 20 g/l é aparente que ocorreu ativação da invertase uma vez que o meio tem cerca de 6.70 ± 0.013 g/l de glucose (abaixo do limite), permitindo a hidrólise da sacarose havendo inclusive acumulação de sacarose e frutose no meio. A invertase só retoma a atividade às 6 h de fermentação quando a glucose volta a estar presente em concentrações baixas. No ensaio com 100 g/l já não ocorre acumulação significativa de açúcares pois a taxa de consumo é superior à taxa de hidrólise da sacarose. Contudo verifica-se o mesmo comportamento da hidrólise da sacarose que só é iniciada quando a glucose se encontra em valores perto do limite.

A 20 g/l devido a concentração ser baixa, os açúcares são consumidos praticamente ao mesmo tempo. Nas concentrações de 100, 150 e 200 g/l a glucose é sempre consumida em primeiro lugar seguida da sacarose sendo a frutose sistematicamente a ultima a ser convertida. No entanto no ensaio com 250 g/l podemos observar que este comportamento sofre uma desaceleração uma vez que a concentração da frutose e da sacarose estão bastante próximas no fim da fermentação. Nas fermentações de 300 e 350 g/l a sacarose passa a ser hidrolisada muito lentamente devido à disponibilidade dos monossacarídeos no meio. Às 96 h de fermentação na concentração de 350 g/l ainda existe 96.20 g/l de sacarose e apenas 14.00 g/l de frutose.

As taxas de consumo dos açúcares individuais no início da fermentação apresentam um comportamento bastante distinto, nos ensaios de 20 a 100 g/l de açúcares totais estas são baixas com tendência a aumentar até atingir um pico máximo para depois entrar em declínio, de 150 a 200 g/l são elevadas e permanecem contantes algumas horas para novamente entrar em queda, a 250 g/l este comportamento sofre uma desaceleração as taxas inicialmente são elevadas mas com tendência a diminuir gradualmente e de 300 a 350 g/l as taxas no inicio são elevadas mas entram em queda rapidamente. Com o

aumento da concentração de açúcares totais as taxas de consumo iniciais aumentam e o seu tempo de permanência nesse estado diminui.

Alguns autores (Puligundla et al., 2011; Bai e Zhao, 2012; Liu et al., 2011) justificam esta dificuldade de operar em concentrações superiores a 300 g/l com o stress osmótico causado pela baixa atividade da água (a_w). O limite mínimo de a_w que permite o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é de 0.90 (Meyers et al., 1997) porem como podemos ver na figura 3 as a_w das culturas crescidas com as concentrações referidas para cada um destes ensaios ficam muito aquém deste valor. Segundo Albertyn et al. (1994) com a_w de 0.96, 0.97 e 0.98 as células diminuem cerca de 69, 66 e 52 % do seu tamanho inicial, retomando o seu tamanho em cerca de apenas 44, 59 e 89 % passadas algumas horas, as taxas específicas de crescimento diminuem e a produção de glicerol aumenta, havendo até libertação deste para o meio extracelular. Após o choque osmótico o crescimento é retomado mas a taxas muito baixas. Apesar de estas a_w permitirem o crescimento celular, limitam todo o desempenho da levedura podendo conduzir por isso a variações no crescimento e dos consumos da fonte de carbono.

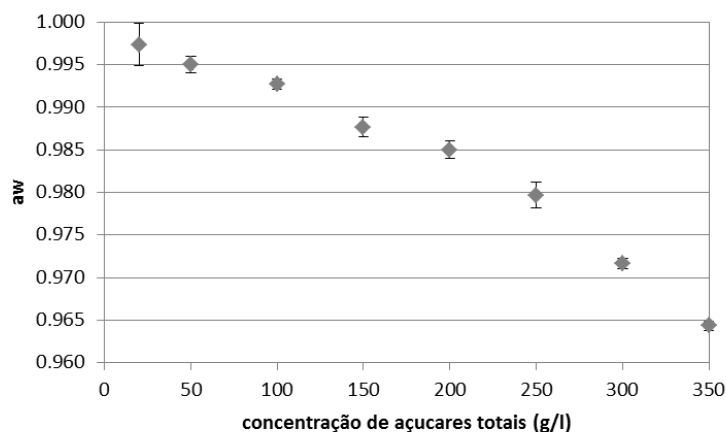


Figura 3 Atividades da água (a_w) nas diferentes concentrações de açúcares totais utilizando o extrato de alfarroba como fonte de carbono.

A a_w a concentração de 250 g/l de açúcares totais encontra-se no limite das atividades que podem provocar danos celulares, o que pode explicar o porquê desta concentração apresentar uma relação de $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$ substancialmente melhor do que a 300 e 350 g/l.

De uma forma geral para a produção de bioetanol a partir de extrato de alfarroba a concentração que apresenta o melhor compromisso é a 250 g/l de açúcares totais, pois apresenta a melhor relação entre rendimentos, um $Y_{X/S}$ baixo e $Y_{E/S}$ elevado indica que o substrato está a ser utilizado principalmente para a produção de etanol e que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A está num nível fermentativo bastante elevado.

3.2. ENSAIO DE RECIRCULAÇÃO DE CÉLULAS LIVRES

Na indústria a recirculação celular é uma prática bastante comum por ser um método económico ao permitir a reutilização de células da última fermentação como inóculo, diminuindo o tempo total da fermentação e ainda promover a capacidade adaptativa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* o que poderá aumentar a produtividade do etanol. Neste trabalho experimental procura-se adaptar esta técnica para a produção do bioetanol usando como fonte de carbono o extrato de alfarroba. Procedeu-se ao crescimento celular em erlenmeyer com 150 ml de meio com a composição descrita anteriormente e uma concentração de açúcares inicial de aproximadamente de 250 g/l com a temperatura de 30 ± 1 °C e uma agitação de 150 rpm. Efetuaram-se análises ao crescimento celular, monitorização de pH, UFC's e quantificação de açúcares e etanol por HPLC. Realizaram-se 2 recirculações de células livres que decorreram durante 78 h.

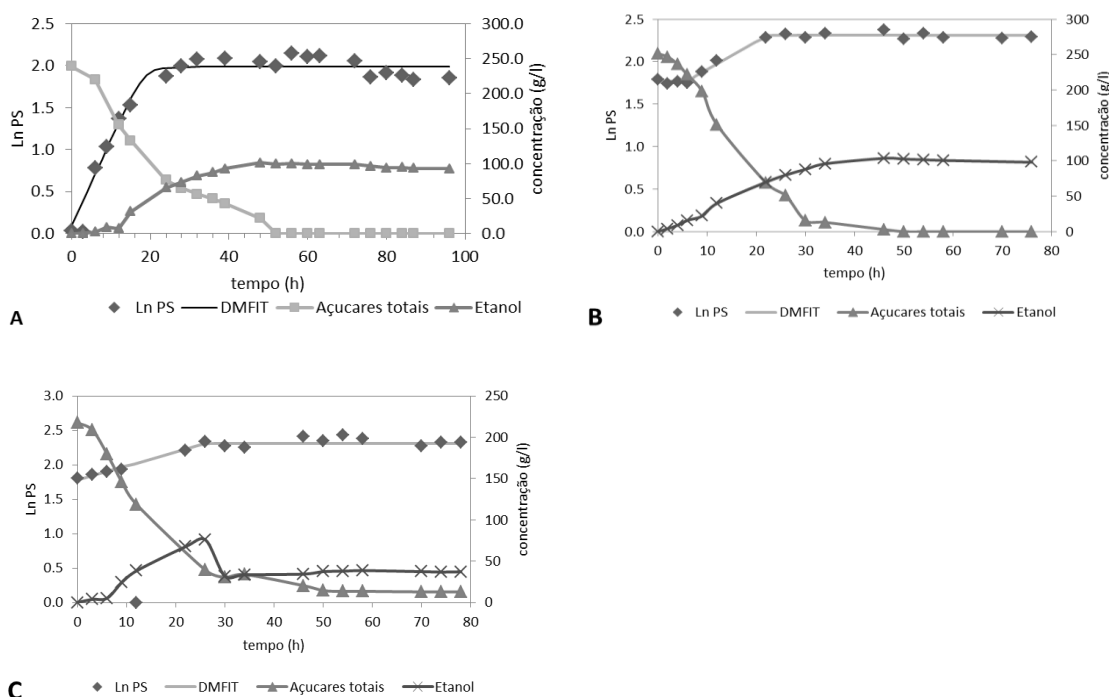


Figura 4 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A livre em erlenmeyers da fermentação previamente descrita a 250 g/l (A) após uma recirculação celular (B) e após duas recirculações celulares (C) acompanhando logaritmo do peso seco, modelação pelo *software* DMFIT, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 96 h e as recirculações durante 78 h, numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Tabela 2 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em erlenmeyers da fermentação previamente descrita a 250 g/l após uma recirculação celular e após duas recirculações celulares utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A fermentação decorreu durante 96 h enquanto as recirculações decorreram durante 78 h, numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

	μ (h^{-1})	td (h)	t_{est} (h)	Etanol máx (g/l)	$t_{etmáx}$ (h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)	Produtividade etanol (g/l.h)
fermentação	0.0758 ± 0.0110^a	6.7	24	101.62 ± 1.173^a	48	0.0319 ± 0.0018^a	0.483 ± 0.0133^a	2.117 ± 0.0244^c
1ª recirculação	0.0323 ± 0.0029^b	21.5	22	103.63 ± 1.507^a	46	0.0218 ± 0.0009^c	0.395 ± 0.0077^b	2.253 ± 0.0014^b
2ª recirculação	0.0202 ± 0.0028^b	34.3	26	75.87 ± 1.578^b	26	0.0258 ± 0.0011^b	0.421 ± 0.0155^b	2.918 ± 0.0607^a

Rendimento de biomassa em relação com o substrato ($Y_{X/S}$), o rendimento de etanol em relação com o substrato ($Y_{E/S}$) e a produtividade para as diferentes matrizes de imobilização. Valores médios ($n=3$) \pm erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P<0.05$)

Analisando as curvas de crescimento da figura 5 e comparando-as com a fermentação a 250 g/l anteriormente descrita a fase lag diminui com o aumento do número de recirculações indicando que a levedura está a adaptar-se ao meio de fermentação. A taxa específica de crescimento é mais curta.

Os açúcares são totalmente consumidos na fermentação e na primeira recirculação, porém após uma segunda recirculação a taxa de conversão dos açúcares é de 94.13 %, também o rendimento de biomassa em relação ao substrato é superior na fermentação.

O máximo de etanol é atingido cada vez mais cedo (Tabela 4) o que se reflete na produtividade no caso do ensaio com 2 recirculações com o valor de 2.918 ± 0.0607 g/l.h O rendimento etanol/substrato é superior no caso da fermentação.

Podemos concluir que o rendimento etanol/substrato é superior no caso da fermentação sem recirculação de células, mas a concentração de etanol máxima está otimizada após uma recirculação celular e a produtividade etanolica é maior com duas recirculações (Tabela 4).

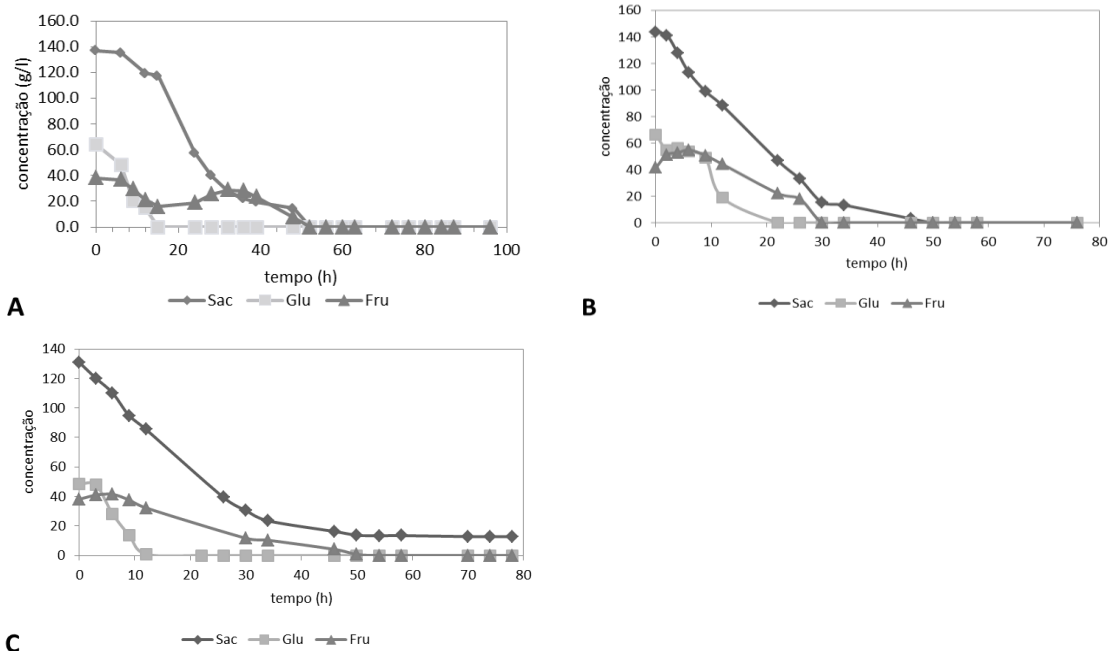


Figura 5 Perfil de consumo dos açúcares individuais pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A livre em erlenmeyers da fermentação previamente descrita a 250 g/l (A) após uma recirculação celular (B) e após duas recirculações celulares (C) acompanhando as concentrações da sacarose (Sac), glucose (Glu) e da frutose (Fru). A fermentação decorreu durante 96 h e as recirculações durante 78 h, numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Como foi anteriormente descrito, o consumo de açúcares foi total nos dois primeiros ensaios. Após a realização das duas recirculações a sacarose é a que apresenta mais dificuldades em ser convertida, o que pode indicar que a atividade ou a síntese da invertase pode estar comprometida devido às reutilizações celulares.

A recirculação celular é económica pois faz reaproveitamento de inóculo, diminui os custos do *downstream* e permite uma adaptação da levedura ao meio fermentativo. Com este estudo foi possível concluir que apesar da complexidade do extrato de alfarroba é possível efetuar pelo menos uma recirculação celular sem perder a viabilidade celular e a produtividade de etanol aumenta.

3.3. ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO DE CALCIO, ALGINATO DE CÁLCIO COM ALFARROBA, KIBBLES DE ALFARROBA E LUFFA CYLINDRICA

A imobilização celular pode desempenhar um papel muito importante no decorrer de uma fermentação, pois a sua ação protetora da viabilidade celular pode potenciar a produção de etanol. Vários estudos têm sido feitos com diversas matrizes de imobilização para melhorar a produção de bioetanol mas apenas o alginato de cálcio foi estudado em meios que utilizem extrato de alfarroba como fonte de carbono. Neste trabalho experimental é realizado um rastreio de 4 matrizes diferentes, o alginato de cálcio bastante estudado mas pouco aprofundado em meios com extrato de alfarroba em concentrações mais elevadas, o alginato de cálcio com alfarroba como novo meio de imobilização que alia dois métodos de fixação, a oclusão na esfera de alginato e a ligação adsortiva à superfície da alfarroba, a *luffa cylindrica* já utilizada como matriz para produção de bioetanol mas nunca testada em meio com extrato de alfarroba e os *kibbles* de alfarroba também como novo meio de imobilização que permitem criar uma ligação na sua superfície celulósica. Procedeu-se ao crescimento celular em erlenmeyer com 150 ml de meio com a composição descrita anteriormente e uma concentração de açúcares inicial de aproximadamente de 250 g/l com a temperatura de 30 ± 1 °C e uma agitação de 150 rpm. Efetuaram-se análises ao crescimento celular, monitorização de pH e quantificação de açúcares e etanol por HPLC. A fermentação decorreu durante 96 h.

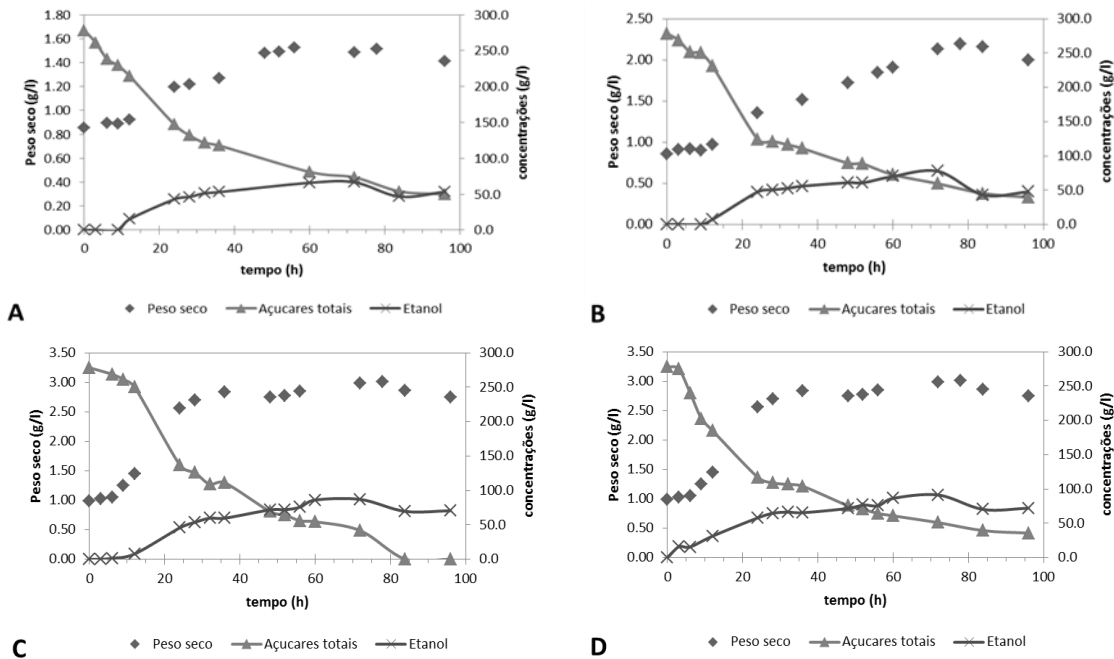


Figura 6 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em erlenmeyers com diversas matrizes de imobilização, alginato de cálcio (A), alginato de cálcio com alfarroba (B), luffa cylindrica (C) e kibbles de alfarroba (D), expresso em peso seco, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Como é possível observar pela figura 4 e pela tabela 2 em todos os ensaios houve consumo de açúcares porem apenas no caso da luffa cylindrica é que estes foram totalmente consumidos tendo o alginato, o alginato com alfarroba e os kibbles taxas de conversão de 82.01, 85.78 e 87.23 % respetivamente.

Os valores máximos obtidos de concentração de etanol, $Y_{X/S}$, $Y_{E/S}$ e produtividade correspondem ao método de imobilização com os kibbles de alfarroba de 91.20 ± 3.499 g/l, 0.017 ± 0.0007 g/g, 0.383 ± 0.0115 g/g e 1.267 ± 0.0486 g/l.h respetivamente. Os kibbles têm $Y_{E/S}$ e produtividade superiores aos das células livres.

Tabela 3 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A em erlenmeyers com diferentes matrizes de imobilização utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Método de imobilização	Biomassa máxima (g/l)	Etanol máximo (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)	Produtividade (g/l.h)
células livres	n.a.	98.04 ± 1.821 ^a	0.017 ± 0.0014 ^a	0.347 ± 0.0097 ^b	1.021 ± 0.0190 ^d
alginato de cálcio	1.524 ± 0.2376 ^d	66.53 ± 1.975 ^e	0.004 ± 0.0003 ^c	0.348 ± 0.0104 ^b	0.924 ± 0.0274 ^e
alginato de cálcio e alfarroba	2.193 ± 0.3431 ^c	77.62 ± 0.305 ^d	0.005 ± 0.0002 ^c	0.347 ± 0.0116 ^b	1.078 ± 0.0042 ^c
luffa cylindrica	3.009 ± 0.0888 ^b	86.93 ± 1.351 ^c	0.008 ± 0.0003 ^b	0.356 ± 0.0083 ^b	1.196 ± 0.0188 ^b
kibbles de alfarroba	5.650 ± 0.2653 ^a	91.20 ± 3.499 ^b	0.017 ± 0.0007 ^a	0.383 ± 0.0115 ^a	1.267 ± 0.0486 ^a

Rendimento de biomassa em relação com o substrato ($Y_{X/S}$), o rendimento de etanol em relação com o substrato ($Y_{E/S}$) e a produtividade para as diferentes matrizes de imobilização. Valores médios (n=3) \pm erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05)

Relativamente á robustez da matriz é possível ver pela biomassa máxima presente no meio da tabela 2 que há perda de células para o meio fermentativo para todas as matrizes, as esferas de alginato de cálcio são menos porosas e menos sujeitas a erosão, no caso do alginato de cálcio com alfarroba, o tecido fibroso desta torna a esfera mais frágil promovendo a libertação das leveduras para o meio, na luffa cylindrica ocorre fixação por ligações iónicas á superfície da matriz (Çaylak, 1998). Neste tipo de imobilização o transportador é sujeito a um elevado nível de erosão e há maior exposição celular o que provoca a libertação das células para o meio, os kibbles de alfarroba estabelecem ligações ainda mais frágeis do que as da luffa pois neste caso a concentração de biomassa no meio fermentativo é superior.

Tabela 4 Parâmetros cinéticos de fermentação (valores médios) obtidos em fermentações em batch com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em diversas matrizes de imobilização a 30 °C.

Matrizes de imobilização	concentração de etanol (g/l)	$Y_{E/S}$ (g/g)	produtividade (g/l.h)	referência
agar	88.23	0.401	0.919	Çaylak e Sukan , 1998
alginato de cálcio	40.10	0.463	3.190	Ercan et al.,2012
alginato de cálcio com milho	60.36	0.493	2.510	Razmovski e Vučurović, 2011
luffa cylindrica	100.33	0.456	1.045	Çaylak e Sukan , 1998
pedaços de maçã	85.00	-	1.083	Kourkoutas et al., 2001
materiais celulósicos sem lenhina	104.00	-	2.888	Iconomou et al., 1995
alginato de cálcio	66.53	0.348	0.924	actual trabalho
alginato de cálcio e alfarroba	77.62	0.347	1.078	actual trabalho
luffa cylindrica	86.93	0.356	1.196	actual trabalho
kibbles de alfarroba actual	91.20	0.383	1.267	actual trabalho

As matrizes de imobilização utilizadas neste trabalho de alginato de cálcio e de alginato de cálcio com alfarroba por comparação com outras previamente estudadas (alginato de cálcio e alginato de cálcio com milho) conseguem obter concentrações de etanol superiores mas as suas produtividades ficam aquém do conseguido nestes estudos anteriores (Tabela 3). Os ensaios realizados com a *luffa cylindrica* como matriz apresentam produtividades de etanol superiores e uma concentração de etanol inferior ao referido por outros autores (Tabela 3). Nos ensaio com os kibbles de alfarroba a concentração de etanol foi superior ao referido com a maçã como matriz de imobilização, mas inferior á concentração alcoólica obtida pelo material celulósico (Tabela 3).

De uma forma geral a imobilização que apresenta melhores valores de produção de etanol é a matriz com kibbles de alfarroba, com $Y_{E/S}$ e produtividade superiores aos apresentados na fermentação com células livres e com valores relativamente altos em comparação com outras matrizes de imobilização tendo como principais vantagens o facto de ser económico por ser um resíduo agro-industrial disponível e o seu processo de imobilização ser bastante simples. Para além disto os kibbles são uma matéria-prima rica em açúcares solúveis pelo que a sua utilização como matriz de imobilização celular

pode ainda potencializar uma maior concentração da fonte de carbono no meio ao longo do processo fermentativo.

3.4. ENSAIO DE RECIRCULAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS

A imobilização celular protege as células contra inibidores, aumenta a densidade celular e facilita a separação dos microrganismos do meio fermentativo aliando estas vantagens á recirculação celular é possível atingir configurações ótimas que tornem a produção de bioetanol a partir de extrato de alfarroba um processo economicamente mais rentável. Neste trabalho experimental realizaram-se duas recirculações de células imobilizadas em alginato de cálcio, alginato de cálcio com alfarroba, *luffa cylindrica* e *kibbles* de alfarroba, tal como anteriormente com as células livres. Procedeu-se ao crescimento celular em erlenmeyer com 150 ml de meio com a composição descrita anteriormente e uma concentração de açúcares inicial de aproximadamente de 250 g/l com a temperatura de 30 ± 1 °C e uma agitação de 150 rpm. Efetuaram-se análises ao crescimento celular, monitorização de pH, UFC's e quantificação de açúcares e etanol por HPLC. As recirculações decorreram durante 96 h.

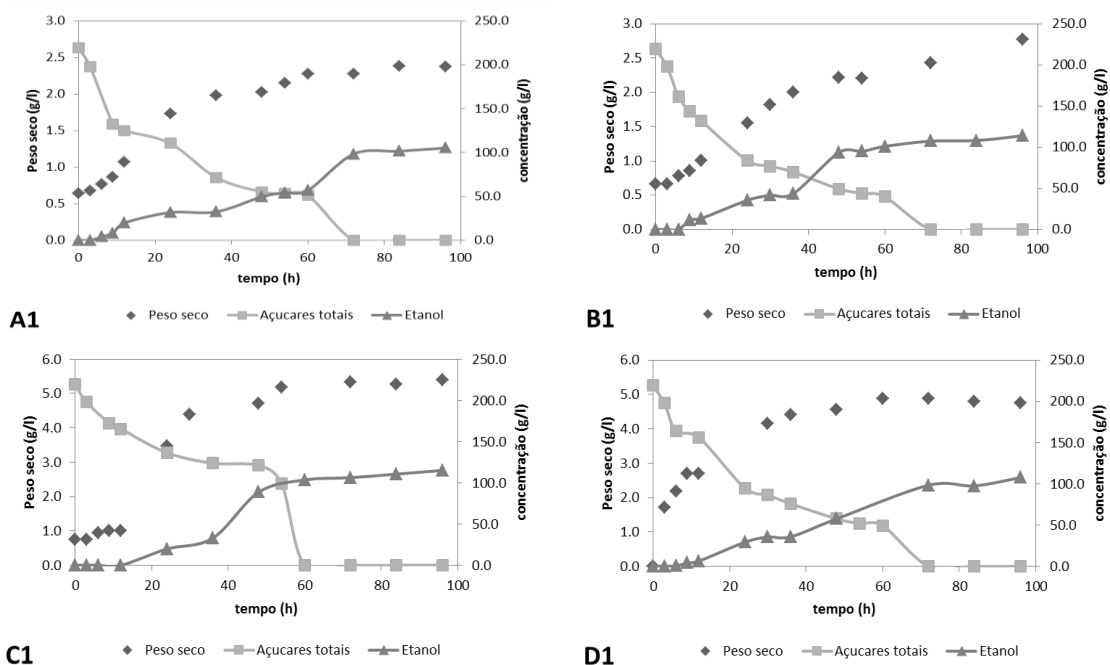


Figura 7 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em alginato de cálcio (A1) em alginato de cálcio com alfarroba (B1) luffa cylindrica (C1) e em kibbles de alfarroba (D1) após uma primeira recirculação acompanhando a concentração de peso seco, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 96 h numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Tabela 5 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em alginato de cálcio, em alginato de cálcio com alfarroba, luffa cylindrica e em kibbles de alfarroba após uma primeira recirculação utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A recirculação decorreu durante 96 h numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Método de imobilização	Biomassa máxima (g/l)	Etanol máximo (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)	Produtividade (g/l.h)
alginato de cálcio	2.383 ± 0.2558 ^c	105.165 ± 1.4051 ^a	0.008 ± 0.0004 ^b	0.463 ± 0.0606 ^a	1.095 ± 0.0146 ^b
alginato de cálcio e alfarroba	2.767 ± 0.0964 ^c	113.961 ± 1.6341 ^b	0.010 ± 0.0005 ^b	0.474 ± 0.0843 ^a	1.187 ± 0.0170 ^a
luffa cylindrica	5.400 ± 0.3452 ^a	115.113 ± 1.5513 ^b	0.023 ± 0.0012 ^a	0.489 ± 0.0743 ^a	1.199 ± 0.0162 ^a
kibbles de alfarroba	4.872 ± 0.1452 ^b	107.458 ± 1.0877 ^a	0.022 ± 0.0010 ^a	0.498 ± 0.0578 ^a	1.119 ± 0.0113 ^b

Rendimento de biomassa em relação com o substrato ($Y_{X/S}$), o rendimento de etanol em relação com o substrato ($Y_{E/S}$) e a produtividade para as diferentes matrizes de imobilização. Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05)

Analisando a figura 7 e a tabela 5 de uma forma geral comparando com os dados referentes á fermentação com células imobilizadas (figura 4 e tabela 2) verifica-se que na primeira recirculação celular não ocorre aumento das perdas de biomassa para o meio, visto que em cada matriz observar uma concentração de biomassa relativamente constante no meio. O método que liberta mais células para o meio na primeira recirculação é a *luffa cylindrica*, contrariamente do que ocorria durante a fermentação, onde os *kibbles* apresentavam no meio uma concentração celular superior. As matrizes que apresentaram menor libertação celular foram as que utilizaram o método por oclusão, o alginato de cálcio e o alginato de cálcio com alfarroba.

Na generalidade, as concentrações de etanol obtidas nas fermentações com recirculação celular foram superiores às obtidas na fermentação sem recirculação. Os métodos de imobilização que conseguiram obter uma concentração de etanol mais elevada foram a luffa cylindrica e o alginato com alfarroba, tendo uma melhoria relativamente á fermentação sem recirculação de 24.5 e 31.9 % respetivamente.

Os valores de $Y_{X/S}$ foram superiores aos da fermentação, o alginato de cálcio e o alginato de cálcio com alfarroba possuem rendimentos semelhantes e inferiores aos da luffa cylindrica e dos kibbles, o que pode ser explicado pelo método de imobilização, a oclusão restringe fisicamente as células a uma área definida pela esfera, condicionado o crescimento celular.

Quanto aos valores de $Y_{E/S}$ após a primeira recirculação não há diferenças significativas entre as matrizes de imobilização, mas estão todos próximos do rendimento teórico (0.51 g/g) e superiores aos obtidos na fermentação sem recirculação.

A produtividade etanólica foi superior nas matrizes de alginato de cálcio com alfarroba e de luffa cylindrica, onde houve registo das concentrações de etanol mais elevadas.

No fim do ensaio da primeira recirculação as matrizes com alginato de cálcio e alginato de cálcio com alfarroba apresentavam um desgaste evidente por isso não foi feita uma segunda recirculação com estes meios de imobilização. A composição da esfera de alginato de cálcio deve ser adaptada para este meio, de forma a conseguir resistir á erosão provocada pela fermentação e recirculação, assim como ao crescimento celular que ocorre no interior desta e que provoca o seu rompimento. Tal como na matriz de alginato de cálcio a esfera de alginato de cálcio com alfarroba deve ser mais estudada para estabelecer o melhor rácio entre alfarroba e alginato que não fragilize a estrutura de transporte. A esfera com alginato de cálcio com alfarroba é um novo meio de imobilização que deve ser mais estudado pois apresentou bons resultados que devem ser mais aprofundados.

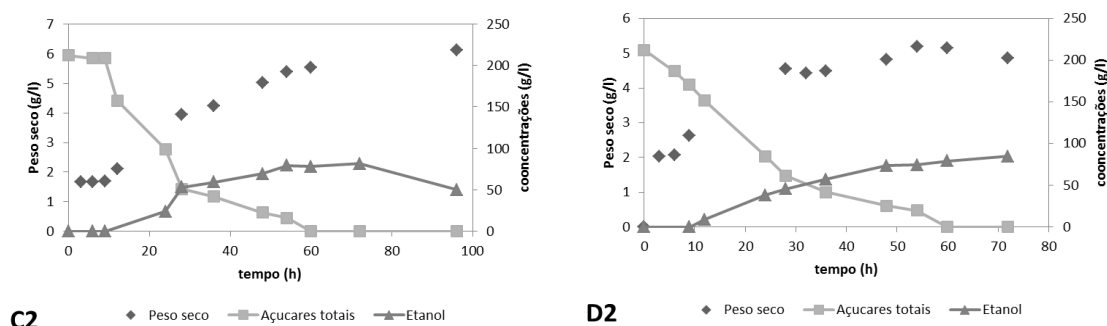


Figura 8 Perfil de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em luffa cylindrica (C2) e em kibbles de alfarroba (D2) após uma segunda recirculação acompanhando a concentração de peso seco, produção de etanol e consumo de açúcares totais. A fermentação decorreu durante 72 h numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Tabela 6 Parâmetros de crescimento determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A imobilizada em, luffa cylindrica e em kibbles de alfarroba após uma segunda recirculação utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. A recirculação decorreu durante 72 h numa agitadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

Método de imobilização	Biomassa máxima (g/l)	Etanol máximo (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)	Produtividade (g/l.h)
luffa cylindrica	5.378 ± 0.2885^a	81.801 ± 0.8111^a	0.019 ± 0.0005^a	0.375 0.0165 ^b	1.136 ± 0.0113^a
kibbles de alfarroba	5.188 ± 0.3016^a	84.734 ± 1.9685^a	0.017 ± 0.0009^a	0.485 0.0239 ^a	1.177 ± 0.0273^a

Rendimento de biomassa em relação com o substrato ($Y_{X/S}$), o rendimento de etanol em relação com o substrato ($Y_{E/S}$) e a produtividade para as diferentes matrizes de imobilização. Valores médios (n=3) \pm erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P < 0.05$)

Por análise dos dados da figura 8 e da tabela 6 e comparando-os com os dados referentes á fermentação com células imobilizadas (figura 4 e tabela 2) e à primeira recirculação de células imobilizadas (figura 7 e tabela 5) na segunda recirculação celular não há aumento da libertação de biomassa para o meio, para cada matriz a concentração

de células no meio mantem-se relativamente constante pois estabelece-se um equilíbrio entre as células imobilizadas e as células livres no meio.

As concentrações de etanol máximo sofrem diminuição, tal como aconteceu com as células livres (Tabela 4) não havendo distinção entre as duas matrizes.

Os valores de $Y_{X/S}$ diminuíram em ambas as matrizes enquanto o $Y_{E/S}$ e a produtividade diminuíram para a luffa cylindrica mas mantiveram-se constante para os kibbles.

Podemos assim concluir que a matriz de imobilização com kibbles de alfarroba além de ser um meio económico, de elevada disponibilidade e fácil imobilização como já referido é uma imobilização celular robusta capaz de resistir a pelo menos duas recirculações, conduzindo a produtividades e $Y_{E/S}$ elevados mesmo ao fim de duas fermentações realizadas com células recirculadas.

4. CONCLUSÃO

Para que o bioetanol tenha uma produção competitiva diversos fatores devem ser estudados para diminuir os seus custos de fabrico. Os açúcares provenientes do extrato de alfarroba são uma fonte com grande potencial para a produção de bioetanol de segunda geração. A concentração de açúcares totais iniciais foi estudada de forma a obter as melhores condições fermentativas, melhores produtividades e rendimentos de etanol, realizaram-se ensaios em erlenmeyer com várias concentrações de açúcares de totais (20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 g/L) utilizando extrato de alfarroba como fonte de carbono. Foi possível concluir que o padrão de consumo dos açúcares individuais é distinto consoante a concentração de açúcares iniciais, as taxas específicas de consumo iniciais aumentam com o aumento das concentrações de açúcares elevadas, mas o tempo de permanência nessas taxas diminui. A pressão osmótica tem um papel muito decisivo em concentrações de açúcares totais elevadas pois a morfologia da célula modifica-se o que pode conduzir a alterações no crescimento celular e no consumo de monossacarídeos e principalmente nos dissacarídeos. Em termos de eficiência fermentativa de uma forma geral para a produção de bioetanol a partir de extrato de alfarroba a concentração que apresenta o melhor compromisso é a 250 g/l de açúcares totais, com a melhor relação entre rendimentos com $Y_{X/S}$ de 0.032 ± 0.0018 g_{biomassa}/g_{substrato} e $Y_{E/S}$ de 0.483 ± 0.0133 g_{etanol}/g_{substrato}.

Uma das formas de tornar a produção de bioetanol mais económica é o reaproveitamento de inóculo. Foi estudada a capacidade de recirculação celular por parte da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A na sua forma livre realizando-se para tal 2 recirculações celulares. É possível concluir que as recirculações não variam profundamente o rendimento do etanol em relação ao substrato mas o máximo de etanol é atingido cada vez mais cedo o que se reflete na produtividade no caso do ensaio com 2 recirculações.

Verificou-se a capacidade de imobilização da levedura em quatro matrizes diferentes, alginato de cálcio, alginato de cálcio com alfarroba, luffa cylindrica e kibbles de alfarroba. A matriz de imobilização que apresenta melhores valores de produção de etanol são os kibbles de alfarroba com $Y_{E/S}$ de 0.383 ± 0.0115 g/g e produtividade de 1.267 ± 0.0486 g/l.h superiores aos apresentados na fermentação com células livres e com valores relativamente altos em comparação com outras matrizes de imobilização

tendo como principais vantagens o facto de ser económico, existe em bastante quantidade e o seu processo de imobilização é bastante simples.

Efetuarão-se ensaios de recirculação celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A na sua forma imobilizada. Foi possível concluir que a matriz de imobilização com kibbles de alfarroba além de ser um meio económico, de elevada disponibilidade e fácil imobilização é um meio robusto capaz de resistir a pelo menos duas recirculações, conduzindo a Y E/S de 0.485 ± 0.0239 g/g e produtividades de 1.177 ± 0.0273 g/l.h ambos elevados mesmo ao fim de duas recirculações. Este fato pode ser crucial na viabilização económica de uma produção de bioetanol em larga escala, considerando a imobilização celular da levedura *S. cerevisiae* F13 A em matriz sólida de polpa de alfarroba, como determinante para se obter uma produtividade e rendimentos elevada com baixo custo de produção quer nas matérias-primas quer nos custos associados à manutenção do bioprocessos

5. TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste estudo são promissores, no entanto podem ser melhorados e complementados.

O impacto das diferentes concentrações de açúcares totais na levedura *Saccharomyces cerevisiae* F13A usando extrato de alfarroba como fonte de carbono, pode ser mais aprofundado fazendo o acompanhamento da atividade da invertase nas diferentes concentrações ao longo da fermentação para melhor entender o comportamento do perfil particular do consumo de açúcares individuais.

Poderão ser feitos estudos de recirculação múltipla usando como fonte de carbono o extrato de alfarroba, para perceber até que ponto a levedura pode ser reciclada sem perder a sua eficiência metabólica.

Duas matrizes de imobilização foram construídas neste trabalho experimental, a construção destas deveria ser mais aprofundada, uma vez que obtiveram resultados interessantes. A composição da esfera de alginato de cálcio com alfarroba deveria ser mais analisada de forma a garantir que esta possua uma estrutura de imobilização mais robusta. Os kibbles apresentam bons valores de produção de etanol porem tem uma elevada perda celular para o meio fermentativo, a ligação estabelecida entre célula e a superfície do transportador deveria ser mais estudada pois esta poderia ser fortificada.

6. BIBLIOGRAFIA

Amorim HV, Lopes ML, Oliveira JVC, Buckeridge MS, Goldman GH (2011) Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *App Micro and Bio* 91(5): 1267-1275

Bai FW, Anderson WA, Young MM (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnology Advances*. 26:89–105.

Bai FW, Zhao XQ (2012) High Gravity Ethanol Fermentations and Yeast Tolerance. *Microbial stress tolerance for biofuels* 22: 117-135

Battle I, Tous J Carob tree. *Ceratonia siliqua* Promoting conservation and use of underutilized and neglected crops vol 17 institute of plants genetics and crops plant research/ International plant genetic resources institute, 1997, Gatersleben/Rome Italy p 78

Behera S, Kar S, Mohanty RC, Ray RC (2010) Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Applied Energy* 87(1):96-100

Behera S, Mohanty RC, Ray RC (2011) Ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffa cylindrica* L. sponge discs. *Applied Energy*. 88(1):212-215

Bicalho IC, Mognon JL, Shimoyama J, Ataíde CH, Claudio R. Duarte CR, (2012) Separation of yeast from alcoholic fermentation in small hydrocyclones. *Separation and Purification Technology* 87:62-70

Çaylak B (1998) Comparison of different production processes for bioethanol. *Turk J Chem* 22:351-359

Çaylak B, Sukan FV (1998) Comparison of different production processes for bioethanol. *Turk J chem* 22:351-359

Corcoran E. (1985) The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. England: Ellis Horwood. 10:12-50

Dias MOS, Junqueira TL, Jesus CDF, Rossel CEV, Filho RM, Bonomi A (2012) Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. *Energy* 43(1): 246-252

e85prices [http:// e85prices.com](http://e85prices.com) acedido a 5 de Novembro de 2012

Ercan Y, Irfan T, Mustafa K (2012) Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource Technology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.006>

Fernandes, P., Aires-Barros, M. R., Cabral, J.M.S. (2003). Capítulo X, Biocatálise Aplicada in Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações, Lima, N., Mota, M., Edições Lidel, Lisboa.

Gasmi-Boubaker A, Salah FB, Hassen H, Bergaoui R, A (2012) Carob (*Ceratonia siliqua*) pulp as an energy source in diet for growing rabbits. Wageningen Academic Publishers 129: 157-160

Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresource Technology 101:4775–4800

Global Renewable Fuels Alliance, <http://www.globalrfa.org/pr_021111.php> [accessed September 2012].

Groboillot A, Boadi DK, Poncelet D, Neufeld RJ (1994) Immobilization of cells for application in the food industry. Critical Reviews in Biotechnology. 14:75-107

Ibrahim HA(2012) Pretreatment of straw for bioethanol production, Energy Procedia 14:542-551

Iconomou L, Psarianos C, Koutinas AA (1995) Ethanol fermentation promoted by delignified cellulosic material J. Ferment. Bioeng., 79 : 294–296

Katchalski-Katsir E; Kraemer DM. (2000) Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. Journal of Molecular Catalysis. 10:157-176

Koga N, Kajiyama T, Senda K, Iketani S, Tamiya S, Tsuda S (2012) Energy efficiency of potato production practices for bioethanol feedstock in northern Japan. European Journal of Agronomy 44:1-8

Kourkoutas Y, Komaitis M, Koutinas AA, Kanellaki M (2001) Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. J. Agric. Food Chem., 49:1417–1425

Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, Shimura M, Kwon MS, Nakayama T (2002) Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. J Agric. Food Chem. 50:373–377

Landaeta R, Aroca G, Acevedo F, Teixeira JA, Mussatto SI (2012) Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. *Applied Energy*

Laopaiboon L, Laopaiboon P (2012) Ethanol production from sweet sorghum juice in repeated-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on corncob. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28(2):559-566

Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W, (2007) Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. Bioresource Technology 98(17):3367-3374

Lindsay SE, Bothast RJ, Ingram LO (1995) Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production. Applied Microbiology and Biotechnology 43(1):70-75

- Liu C, Lin Y, Bai F** (2011) A kinetic growth model for *Saccharomyces cerevisiae* grown under redox potential-controlled very-high-gravity environment. *Biochemical Engineering Journal* 56(1–2):63-68
- Manso T, Nunes C, Raposo S, Lima-Costa ME** (2010) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* PBC-1 in a stirred tank reactor by batch and fed-batch cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26:725-735
- Martins da Matta V, Andrade Medronho R** (2000) A new method for yeast recovery in batch ethanol fermentations: Filter aid filtration followed by separation of yeast from filter aid using hydrocyclones. *Bioseparation* 9(1):43-53
- Mazaheri D, Shojaosadati SA, Mousavi SM, Hejazi P, Saharkhiz S** (2012) Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Applied Energy* 99: 372-378
- Millati R, Edebo L, Taherzadeh MJ** (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme and Microbial Technology* 36(2–3): 294-300
- Mohammadreza K, Mojtaba J, Mohammadhosein A** (2012) Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *Journal of Food Science and Technology* 49(5):619-614
- Mussato SI, Dragone G, Guimarães PMR, Silva JPA, Carneiro LM, Roberto IC, Vicente A, Domingues L, Teixeira JA** (2010) Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. *Biotechnology Advances* 28:817-830
- Myers DK, Lawlor DTM, Attfield PV** (1997) Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 63(1):145–150
- Nigam JN** (2000) Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J Biotechnol* 80:189–193
- Obeidat BS, Alrababah MA, Alhamad MN, Gharaibeh MA, Abu Ishmais MA** (2012) Effects of feeding carob pods (*Ceratonia siliqua L.*) on nursing performance of Awassi ewes and their lambs, *Small Ruminant Research* 105(1–3):9-15
- Pérez-Olleros L, Garcia-Cuevas M, Ruiz-Roso B** (1999) Note: Influence of pulp and natural carob fiber on some aspects of nutritional utilization and cholesterolemia in rats. *Food Sci. Technol. Int.* 5:425–430
- Piemonte V** (2012) Wood Residues as Raw Material for Biorefinery Systems: LCA Case Study on Bioethanol and Electricity Production. *J Polym Environ* 20:299–304
- Plessasa S, Bekatoroua A, Koutinasa AA, Soupionia M, Banatb IM, Marchantb R** (2007) Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technology.* 98(4):860-865

- Puligundla P**, Mogrovcova D, Obulam V, Ko S (2011) Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38(9):1133-1144
- Razmovski R**, Pejin D (1996) Immobilization of *Saccharomyces diastaticus* on wood chips for ethanol production. *Folia Microbiologica*. 41(2):201-207
- Razmovski R**, Vučurović V (2011) Ethanol production from sugar beet molasses by *S cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix. *Enzyme and microbial technology* 48:378-385
- Roukas T** (1994) Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production *Applied Microbiology and Biotechnology* 41(3): 296-301
- Sánchez-Segado S**, Lozano LJ, Ríos AP, Hernández-Fernández FJ, Godínez C, Juan D (2012) Process design and economic analysis of a hypothetical bioethanol production plant using carobpod as feedstock. *Bioresour Technol* 104:324–328
- Sarkar N**, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* 37(1): 19-27
- Singh A**, Bishnoi NR (2012) Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization. *Industrial Crops and Products* 41:221-226
- Tous J**, Batlle I (1990) *El algarrobo*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Tous J**, Romero A, Hermoso JF, Ninot A, Plana J, Batlle I (2009) Agronomic and Commercial Performance of Four Spanish Carob Cultivars *Hortechology* .19(2)
- Turhan I**, Bialkab KL, Demircib A, Karhan M (2010) Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 101(14): 5290–5296
- Verma N**, Vivek K, Bansal MC (2011) Importance of cellulases in bioethanol from biomass: A review. [Online] 2011. [Cited: September 16, 2011.] www.compete-bioafrica.net/events/events2/seminar_india/.../5-5-Verma.pdf.
- Vitolo M**.(1998) Imobilização de células e enzimas. *Biocologia: Agropecuária - Energia – Saúde*.
- Wang FZ**, Xie T, Hui M (2011) Increase of Ethanol Productivity by Cell Recycle Fermentation of Flocculating Yeast. *Applied Biochemistry and Microbiology* 47(5): 527–531
- Wheals AE**, Basso LC, Alves DMG, Amorim HV (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology* 17:482–487
- Wursch P**, Del Vedovo S, Rosset J and Smiley M (1984) The tannin granules from ripe carob pod. *Food Sci. Technol. Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* 17, 351–354.
- Xiao SJ**, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Keller B, Sigrist H (1997) Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg–Gly–Asp–Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8(12): 867-872

Yan S, Chen X, Wu J, Wang P (2012) Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94(3):829-838

Yao L, Lee S, Wang T, Moura JMLN, Johnson LA (2012) Effects of fermentation substrate conditions on corn–soy co-fermentation for fuel ethanol production. *Bioresource Technology* 120:140-148

Yu J, Yue G, Zhong J, Zhang X, Tan T (2010) Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to modified bagasse for ethanol production, *Renewable Energy*, 35(6):1130-1134

Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration *Appl Microbiol Biotechnol* 56:17–34

Zhang Y, Kennedy JF, Knill CJ (1996) Kinetic analysis of ethanol production from glucose fermentation by yeast cells immobilized onto ceramic supports. *J Biomater Sci Polym Ed*. 7(12):1119-26.

Zheng Y, Yu C, Cheng, Lee , Simmons CW, Dooley TM, Zhang R, Jenkins BM, VanderGheynst JS (2012) Integrating sugar beet pulp storage, hydrolysis and fermentation for fuel ethanol production. *Applied Energy* 93:168-175

Zunft HJF, Lueder W, Harde A, Haber B, Graubaum HJ, Koebnick C, Gruenwald J (2003) Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Eur. J. Nutr.* 42:235–242