

Liliana Martins Costa

# UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS CELULÓSICOS COMO MATÉRIA-PRIMA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, orientada pelo Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Coimbra, Setembro de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Liliana Martins Costa

# UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS CELULÓSICOS COMO MATÉRIA-PRIMA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, inserida no projeto *Biorrefinaria Integrada na Indústria da Pasta de Papel (BIIPP)*, orientada pelo Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

CIEPQPF - Centro de Investigação de Engenharia de Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, DEQ/FCTUC  
DEQ - Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra  
RAIZ - Instituto de Investigação da Floresta e Papel

Coimbra, Setembro de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## AGRADECIMENTOS

Reservei este espaço para agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, aos quais me sinto imensamente grata.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Jorge Rocha que aceitou orientar-me nesta etapa final do meu curso e que ao longo de todos estes meses me apoiou e me guiou, com vista a atingir o sucesso.

Aos que comigo partilharam as tristezas e as pequenas vitórias alcançadas em cada dia passado no B27 (o laboratório). À Eng<sup>a</sup> Cátia Mendes pela amizade e inestimável ajuda na componente laboratorial deste trabalho e à Fabrícia, ao Renan, ao Filipe e ao Ivo pela boa disposição e pelo ótimo ambiente de trabalho.

A todos os professores e funcionários do DEQ, nomeadamente ao Sr. Amado, ao Sr. José e à D. Dulce, a quem recorri inúmeras vezes em busca de auxílio, e à Eng<sup>a</sup> Maria João que me acolheu e me facilitou a permanência no ‘Centro’ após o seu horário de saída.

Ao RAIZ - Instituto de Investigação da Floresta e Papel – pelo fornecimento dos hidrolisados, sem os quais este trabalho não teria sido possível e em particular à Eng<sup>a</sup> Sara Fernandes e ao Eng<sup>o</sup> Alexandre Gaspar por todas as informações prestadas acerca da preparação dos hidrolisados.

Quero expressar a minha gratidão às pessoas que me ouviram interminavelmente falar de ‘leveduras’ e de ‘etanol’ e com quem ri, chorei e fiz esperar: aos meus amigos (Daniela, Lília e Cardoso); à minha família, especialmente os meus pais (Carlos Costa e Anabela Costa), que sempre me apoiaram em tudo; e ao André, o meu namorado.

Por fim, resta-me agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

A todos muito Obrigada!



*“Eles não sabem que o sonho  
é vinho, é espuma, é fermento  
(...)”*

Gedeão, A. (1956). *Pedra filosofal,  
Movimento Perpétuo*





## RESUMO

A indústria da pasta e papel é uma das maiores indústrias nacionais de maior impacto económico, dando origem a uma quantidade significativa de produtos secundários residuais, habitualmente depositados em aterros ou, quando muito, utilizados como corretor de solos florestais ou para compostagem e uso na agricultura. Desses resíduos destacam-se as lamas primárias, compostas por uma considerável carga orgânica, com potencial de aproveitamento. Noutro contexto situa-se a dificuldade no aumento de escala de certos processos tecnológicos de valorização, onde frequentemente se encontram limitações de exequibilidade prática, que podem ser ou não superadas, pondo neste caso em causa a viabilidade do projeto. A finalidade do presente trabalho foi estudar a fermentação alcoólica dessas lamas primárias, previamente hidrolisadas no RAIZ (Instituto de Investigação da Floresta e Papel) de modo a obter uma elevada concentração de açúcares fermentáveis, e a reprodução dos melhores resultados em maior escala, num reator/fermentador de bancada.

Para concretizar estes objetivos fizeram-se ensaios laboratoriais, em regime descontínuo e em SHF (*separate hydrolysis and fermentation*), de modo a selecionar o microrganismo mais adequado (resistente e produtivo), e a perceber os fatores mais influentes no crescimento celular e na produção de etanol por fermentação. As técnicas utilizadas na identificação e quantificação dos reagentes e dos produtos formados foram a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrofotometria UV/Vis ( $\lambda=540\text{nm}$ ), sendo que esta última foi indispensável no acompanhamento do crescimento celular e na determinação dos açúcares redutores pelos métodos do DNS e do DNS modificado.

Informações da literatura levam a crer que as leveduras são preferíveis às bactérias devido às suas características, como a rápida e eficiente fermentação, o crescimento em meios que desfavorecem a contaminação bacteriana e a sua resistência e estabilidade genética, com especial enfoque para a *Saccharomyces cerevisiae*, que se distingue das demais, por apresentar maior tolerância ao etanol - o principal produto da fermentação alcoólica. Sendo o bioetanol o composto obtido em maior concentração, é natural que a sua principal aplicação se insira na área dos biocombustíveis. A aplicação do bioetanol no setor dos transportes passa por substituir os 10% em volume de gasolina por biocombustíveis líquidos, previstos na lei para os próximos anos.

Mediante o estudo dos diversos fatores com influência no crescimento celular e na produção de etanol retirou-se que a esterilização é um passo dispensável se se mantiver o pH da cultura ligeiramente abaixo de 5, fator de grande importância quando se trata da minimização de custos operacionais. Obteve-se também que um aumento na concentração de etanol, presente na cultura, induz as células a consumir uma maior quantidade de glucose, provavelmente utilizada na síntese de trealose, que as protege em ambientes adversos. A quantidade de oxigénio fornecida à mistura reacional é outro fator de grande importância na obtenção de produtos e subprodutos da fermentação, carecendo de um processo de otimização que vise a maximização da concentração final de etanol.

A reprodução dos resultados à escala de reator de bancada (até 5L) foi bem-sucedida, obtendo-se concentrações máximas de etanol muito próximas, e em alguns casos até superiores, das obtidas à escala laboratorial, com incubação em Erlenmeyer. A concentração máxima de etanol rondou os 34g/L nos ensaios com hidrolisados de lamas primárias, a qual

correspondeu a uma concentração inicial de glucose de  $\sim 65,5\text{g/L}$ . O pico de concentração em etanol situou-se entre as 24 e as 48h e foram atingidos rendimentos acima dos 90% e produtividades entre 0,56 e  $1,09\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h}$ . De forma geral verificou-se que os rendimentos e as produtividades obtidas em maior escala foram superiores às obtidas em Erlenmeyer o que pode dever-se essencialmente à melhor homogeneização da mistura e ao modo de fornecimento de ar. Ficou também evidente que a viabilidade da operação é dependente da concentração inicial de glucose e conseqüentemente da concentração em etanol produzida, na medida em que é necessária uma fração mássica de etanol igual ou superior a 3%, com base na literatura, para que a separação do etanol por destilação, a jusante do fermentador, seja energeticamente viável. As experiências realizadas permitiram a obtenção de 3,45% utilizando um hidrolisado de lamas primárias com extratos (extrato de levedura, extrato de malte e peptona) dissolvidos, o que confirma a possibilidade de uma operação de destilação a jusante do fermentador.

## ABSTRACT

The pulp and paper industry is one of the Portuguese biggest industries of greater economic impact, giving rise to a significant amount of secondary waste products, usually landfilled or used as soil corrector or for agriculture and composting. Among these residues primary sludge is highlighted, which is composed by a considerable organic load, with potential for exploitation. In another context lies the difficulty of scaling up some technological processes of valorization where frequently are found practical feasibility constraints that may be or not overcome, risking the viability of the project. The purpose of this work was to study the fermentation of these primary sludge, previously hydrolyzed in RAIZ (Research Institute of Forest and Paper), in order to obtain a high concentration of fermentable sugars and the reproduction of the best results at a bench-scale reactor/fermenter.

To achieve these goals laboratory tests were made in batch systems and SHF (separate hydrolysis and fermentation), in order to select the most suitable microorganism (resistant and productive) and realize the most influential factors in cell growth and ethanol production by fermentation. The techniques used in the identification and quantitation of reagents and products formed were high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometry UV/Vis ( $\lambda = 540\text{nm}$ ). The latter one was essential to monitor cell growth and to determine the reducing sugars by DNS and modified DNS methods.

Literature information lead to believe that the yeast are preferable to bacteria due to its characteristics, such as rapid and efficient fermentation, growth on media that disfavor bacterial contamination and genetic stability and their resistance, with special focus on the *Saccharomyces cerevisiae*, distinguished from others by presenting greater ethanol tolerance, an important factor taking into account that ethanol is the main product of alcoholic fermentation. Since bioethanol is the compound obtained in higher concentration, it's natural that its main application falls in the area of biofuels. The application of bioethanol in the transportation sector has as main purpose to replace 10% of gasoline volume by liquid biofuels, as provided by law for the next years.

Through the study of several factors with influence on cell growth and ethanol production it was found that the sterilization step is unnecessary if the pH of the culture is maintained below 5, a very important factor when the goal is to minimize the operating costs. It was also obtained that an increase in the concentration of ethanol present in the culture medium induces the cells to consume greater amounts of glucose, probably used in the synthesis of trehalose, that protect them in harsh environments. The amount of oxygen supplied to the reaction mixture is another major factor in getting products and byproducts of fermentation, which lacks of an optimization process that seeks to maximize the final ethanol concentration.

The reproduction of the results in a bench scale reactor (up to 5L) was successful, achieving ethanol peak concentrations very close, and in some cases even superior, to those obtained on a laboratory scale, incubated in Erlenmeyers. The maximum ethanol concentration was around 34g/L in assays with primary sludge hydrolyzed, which corresponded to an initial glucose concentration of ~65.5 g/L. The ethanol peak concentration was in a range between 24 and 48 hours, reaching yields above 90% and productivities between 0.56 and 1.09gEtOH/Lh. In general it was found that yields and productivities

obtained in bench scale reactor were greater than those gotten in Erlenmeyers which may be due to better homogenization of the mixture and to air supply mode. It was also evident that the viability of the operation is dependent of the initial glucose concentration and ethanol concentration thus produced, being required an ethanol mass fraction greater than 3%, based on the literature, for the energetically feasibility of ethanol distillation. The experiments performed allowed to obtain 3.45% using a primary sludge hydrolyzed with extracts (yeast extract, malt extract and peptone) dissolved, confirming the possibility of a distillation operation downstream of the fermenter.

# ÍNDICE

1. Introdução .....	1
2. Estado da Arte.....	3
2.1 A descoberta e evolução da fermentação .....	3
2.2 Dos resíduos celulósicos à hidrólise.....	4
2.2.1 A origem dos resíduos celulósicos .....	4
2.2.2 Estrutura da biomassa celulósica e resíduos celulósicos do processo de pasta para papel .....	6
2.2.3 Pré-tratamento e Hidrólise.....	9
2.3 Fermentação dos açúcares obtidos na hidrólise dos resíduos celulósicos .....	10
2.3.1 Seleção do tipo de microrganismo fermentativo .....	10
2.3.2 Crescimento microbiano e produção de metabolitos.....	11
2.3.3 Necessidade de esterilização .....	12
2.4 Produção de etanol: via química vs. via biológica.....	13
2.5 Panorama mundial relativamente à produção de bioetanol .....	14
2.6 Utilização de etanol como combustível e legislação associada.....	15
2.7 Mudança de escala em fermentadores .....	17
2.8 Produtividades, rendimentos e concentrações de etanol já alcançadas noutros trabalhos.. .....	19
3. Métodos e Procedimentos.....	21
3.1 Composição dos meios de cultura utilizados.....	21
3.2 Ensaio em Erlenmeyer – Culturas celulares .....	21
3.3 Acompanhamento do crescimento celular – Método espectrofotométrico .....	23
3.4 Métodos de caracterização e quantificação de açúcares e produtos da fermentação .....	24
3.4.1 Métodos de determinação dos açúcares redutores.....	24
3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	24
3.4.3 Caracterização dos hidrolisados .....	25
3.5 Ensaio no fermentador de bancada .....	26
3.6 Relação entre a densidade ótica e a concentração celular .....	27
4. Apresentação e Discussão de Resultados .....	29
4.1 Ensaio à escala laboratorial.....	29
4.1.1 Curvas de crescimento de diversas leveduras.....	29
4.1.2 Influência da esterilização na curva de crescimento .....	31

4.1.3	Influência da concentração de etanol do meio na curva de crescimento .....	34
4.1.4	Influência da quantidade de oxigênio fornecido na curva de crescimento e nos produtos da fermentação .....	38
4.1.5	Influência da quantidade de glucose fornecida (fonte de carbono) na curva de crescimento e nos produtos da fermentação .....	40
4.1.6	Utilização de hidrolisados de lamas primárias como fonte de carbono .....	42
4.1.7	Influência dos extratos de levedura, de malte e da peptona no crescimento celular	45
4.1.8	Utilização de um meio alternativo aos extratos como fontes de azoto e de outros nutrientes .....	48
4.1.9	Rácio Carbono/Azoto (C/N) .....	54
4.2	Ensaio à escala de reator de bancada .....	56
4.2.1	Ensaio 1 .....	56
4.2.2	Ensaio 2 .....	58
4.2.3	Ensaio 3 .....	58
4.2.4	Ensaio 4 .....	59
4.2.5	Ensaio 5 .....	60
4.3	Comparação entre as duas escalas (laboratorial e de reator de bancada).....	61
4.3.1	Como aumentar a concentração de produto, a eficiência e a produtividade .....	63
4.4	Balanço mássico aos compostos intervenientes na fermentação .....	63
5.	Conclusões e Sugestões de Trabalho Futuro .....	65
	Bibliografia .....	69
	ANEXO I – Método de determinação dos açúcares redutores (Método do DNS e Método do DNS modificado) .....	III
	ANEXO II – Curvas de calibração do DNS para a quantificação dos açúcares redutores em concentração de equivalente de glucose .....	V
	ANEXO III – Comparação da quantificação de açúcares pelo método do DNS e pelo método de HPLC .....	VII
	ANEXO IV – Linearização da fase exponencial de crescimento de culturas em meio geral para leveduras .....	IX
	ANEXO V – Linearização da fase exponencial de crescimento de culturas esterilizadas e não esterilizadas .....	XI
	ANEXO VI – Apresentação de ensaios apenas com extratos em cuja densidade ótica (D.O.) foi superior à de ensaios com meio geral para leveduras .....	XIII
	ANEXO VII – Efeito do rácio C/N no crescimento de leveduras.....	XVII
	ANEXO VIII – Balanço mássico aos reagentes e aos produtos obtidos nos ensaios com o fermentador de bancada .....	XIX

ANEXO IX – Identificação do pico com tempo de retenção $\approx 25$ min.....	XXV
ANEXO X – Curvas de calibração utilizadas no método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e tempos de retenção dos diferentes compostos.....	XXVII





## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 (a) – Composição dos principais resíduos celulósicos (adaptado de Verardi, <i>et al.</i> , 2012).....	5
Tabela 2.1 (b) – Composição dos principais resíduos celulósicos (adaptado de Das & Singh, 2004). ....	5
Tabela 2.2 – Leveduras tipicamente usadas em fermentação alcoólica e bactérias candidatas para o mesmo tipo de fermentação (Walker, 2010).....	11
Tabela 2.3 – Custos de produção da gasolina e de etanol produzido a partir de diferentes matérias-primas (Walker, 2010).....	17
Tabela 2.4 – Constantes b e c de diversos trabalhos (compilados por Alam & Razali, 2005).....	18
Tabela 2.5 – Compilação de resultados apresentados em diversas referências.....	20
Tabela 3.1 – Composição do meio geral para leveduras (DSMZ, 2007). ....	21
Tabela 3.2 – Resultados obtidos pela medição da absorvância de uma mesma amostra em cuvets diferentes (2 <sup>a</sup> coluna), na mesma cuvete (3 <sup>a</sup> coluna) e respetivos intervalos de confiança com 95% de certeza. ....	24
Tabela 3.3 – Resultados obtidos pela injeção da mesma amostra no HPLC e respetivos intervalos de confiança com 95% de certeza.....	25
Tabela 3.4 – Caracterização dos hidrolisados pelo método do DNS modificado e por HPLC. A determinação dos açúcares redutores foi feita em duplicado ou triplicado.....	26
Tabela 4.1 – Taxas específicas máximas de crescimento, encontradas na literatura, para cada uma das leveduras. ....	31
Tabela 4.2 – Comparação dos valores de densidade ótica (D.O.) obtidos para a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 ao fim de 24h, da diferença entre a D.O. às 24h e às 0h e das taxas específicas de crescimento em todos os ensaios (esterilizados e não esterilizados) mencionados acima, para uma concentração de glucose inicial de aproximadamente 10g/L. ....	33
Tabela 4.3 – Tolerância de cada uma das leveduras ao etanol.....	34
Tabela 4.4 – Concentração máxima de etanol alcançada, rendimentos e produtividades em etanol (obtidas para o instante de máxima concentração em etanol) e tempo para o qual foram calculados, em ensaios com adição de glucose (substrato ‘sintético’) e com hidrolisado de lamas primárias (substrato ‘natural’). A concentração de glucose inicial apresentada no ‘substrato sintético’ foi a adicionada aquando da preparação do meio de cultura e a do ‘substrato natural’ a determinada pelo método do DNS modificado (secção 3.4.3). ....	45
Tabela 4.5 – Registos da densidade ótica e da taxa específica de crescimento dos diferentes ensaios apenas com extratos e com meio completo ao final de 24h.....	48
Tabela 4.6 – Descrição dos compostos alternativos (CA) utilizados no meio de cultura para leveduras (adaptado de Saghbini, <i>et al.</i> 2001).....	48
Tabela 4.7 – Máxima concentração de etanol obtida, rendimentos e produtividades em etanol (obtidos no instante de máxima concentração de produto) e tempo para o qual foram calculados e ainda a máxima produtividade em etanol obtida, para os ensaios com e sem tampa de papel de alumínio.....	54
Tabela 4.8 – Rácios carbono/azoto encontrados em diversas referências para diferentes estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes fontes de carbono. ....	55
Tabela 4.9 – Contribuições de alguns compostos para o carbono e o azoto presentes no meio.....	55
Tabela 4.10 – Rácios C/N para os diferentes ensaios desta secção.....	55

Tabela 4.11 – Caudais de ar utilizados na produção de etanol com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , organizados por ordem decrescente. ....	59
Tabela 4.12 – Principais diferenças entre a escala laboratorial e a escala de reator de bancada. ....	61
Tabela 4.13 – Ensaio à escala laboratorial e à escala de reator de bancada, comparação entre as concentrações iniciais de glucose, as concentrações máximas de etanol, os rendimentos, as produtividades e respetivo instante em que foram alcançadas, bem como as produtividades máximas em etanol e os respetivos instantes. Note-se que as concentrações iniciais de glucose apresentadas foram obtidas no instante inicial de cada ensaio por HPLC, embora os hidrolisados de lamas primárias e de pasta branqueada estejam caracterizados na secção 3.4.3. ....	62
Tabela VIII.1 – Balanço mássico aos reagentes e aos produtos formados na operação de fermentação para o Ensaio 1, tendo em conta os dados da Figura 4.27 e Figura 4.28. ....	XXI
Tabela VIII.2 – Balanço mássico aos reagentes e aos produtos formados na operação de fermentação para o Ensaio 3. ....	XXII
Tabela VIII.3 – Balanço mássico aos reagentes e aos produtos formados na operação de fermentação para o Ensaio 5. ....	XXIII
Tabela X.1 – Tabela que apresenta os tempos de retenção obtidos para cada composto, tendo em conta a coluna e o método utilizado. ....	XXIX

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema representativo da glicólise e das duas vias alternativas: a da fermentação alcoólica e a da respiração (adaptado de Alba-Lois e Segal-Kischinevzky, 2010).	4
Figura 2.2 – Representação da biomassa celulósica.	6
Figura 2.3 – Diagrama simplificado do processo de produção de celulose a partir do processo <i>kraft</i> , de produção de pasta para papel (adaptado de Piotto, 2003).	8
Figura 2.4 – Esquema representativo da ETAR de uma fábrica de pasta para papel (adaptado de Menezes, 2013).	8
Figura 2.5 – Esquema representativo das matérias-primas utilizadas na hidrólise e na fermentação.	10
Figura 2.6 – Representação das diferentes fases da curva de crescimento de uma levedura: (a) fase de adaptação; (b) fase de crescimento exponencial; (c) fase estacionária; (d) fase de decaimento endógeno.	12
Figura 2.7 – Distribuição da produção mundial de etanol pelos diversos continentes, no ano de 2006 (adaptado de Nag, 2008).	15
Figura 3.1 – Ensaio realizados em Erlenmeyer: (a) tapados apenas com rolha de algodão; (b) tapados com rolha de algodão e papel de alumínio.	22
Figura 3.2 – Representação das matérias-primas recebidas, hidrolisados de lamas primárias e de pasta branqueada.	25
Figura 3.3 – Reator/fermentador de bancada BIOSTAT® Bplus (Sartorius).	27
Figura 3.4 – Curva que permite relacionar a concentração celular com a densidade ótica a 540nm.	28
Figura 4.1 – Curvas de crescimento de cada uma das leveduras (obtidas a 540nm): (a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602; (b) estirpe comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; (c) <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 1426; (d) <i>Pichia stipitis</i> DSM 3651.	30
Figura 4.2 – Curvas de crescimento (obtidas a 540nm) para culturas esterilizadas e não esterilizadas: (a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602; (b) <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 1426; (c) <i>Pichia stipitis</i> DSM 3651.	32
Figura 4.3 – Perfis de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 para ensaios não esterilizados (“Não Est. (1)” e “Não Est. (2)”) e ensaios esterilizados (“Est.”, “A” e “B”).	33
Figura 4.4 – Efeito do etanol no crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602: (a) Curvas de crescimento com adição de diferentes quantidades de etanol após 3h da inoculação; (b) linearização da fase exponencial de crescimento para a obtenção da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ).	35
Figura 4.5 – Perfil de D.O.’s, obtidas 24h após a inoculação, tendo em conta concentrações crescentes de etanol.	36
Figura 4.6 – Fração de açúcares redutores ao longo do tempo, expressa em concentração $Eq_{Glu}$ em cada instante relativamente à concentração $Eq_{Glu}$ no início ( $[eq. \text{glucose}]_t/[eq. \text{glucose}]_i$ ). Dados obtidos para os ensaios com 0, 30, 50 e 60g/L de etanol. A curva de calibração utilizada para o cálculo das concentrações equivalentes de glucose encontra-se expressa no ANEXO II.	37
Figura 4.7 – Perfil de $\mu$ 's tendo em conta a variação da concentração de etanol.	37
Figura 4.8 – Representação da interpolação cúbica obtida pela função <i>spline</i> do MATLAB, para a taxa específica de crescimento em função da concentração de etanol.	38

Figura 4.9 – (a) Curva de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 ( $\lambda=540\text{nm}$ ) obtida para um mesmo volume de meio de cultura, mas diferentes áreas superficiais ( $\approx 50\text{cm}^2$ no Erlenmeyer de 250mL e $\approx 87\text{cm}^2$ no Erlenmeyer de 500mL), através das quais o $\text{O}_2$ é fornecido à mistura; (b) respectivas linearizações das fases exponenciais de crescimento para obtenção de $\mu$ .	39
Figura 4.10 – (a) Concentração de açúcares redutores ao longo do tempo expressa em concentração $\text{Eq}_{\text{Glu}}$ ; (b) concentração de etanol ao longo do tempo.	40
Figura 4.11 – (a) Curva de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 para diferentes concentrações de glucose (75, 100 e 150g/L) e (b) respectivas linearizações da fase exponencial de crescimento para determinação de $\mu$ .	41
Figura 4.12 – (a) Fração de açúcares redutores ao longo do tempo, expressos em concentração $\text{Eq}_{\text{Glu}}$ final sobre a concentração $\text{Eq}_{\text{Glu}}$ inicial, para os ensaios com 75, 100 e 150g/L de glucose inicial; (b) concentração de etanol ao longo do tempo para os mesmos ensaios.	42
Figura 4.13 – (a) Curva de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 para hidrolisados de lamas primárias com diferentes concentrações de açúcares; (b) fração de glucose ao longo do tempo, para cada ensaio, determinada a partir dos dados obtidos por HPLC.	43
Figura 4.14 – Evolução do pH das culturas.	44
Figura 4.15 – Concentração de etanol ao longo do tempo para cada um dos ensaios.	44
Figura 4.16 – (a) Curvas de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 para os ensaios com meio de cultura completo e apenas extratos; (b) evolução da concentração de açúcares redutores nos ensaios com meio completo e apenas com extratos; (c) fração da glucose presente no meio.	47
Figura 4.17 – Esquema representativo das combinações de compostos feitas nos ensaios descritos acima.	49
Figura 4.18 – (a) Curvas de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 para os ensaios “CA+HLP”, “CA+Glu”, “Ext+HLP” e “Ext+Glu”; (b) linearização da fase exponencial de cada ensaio, para obtenção dos $\mu$ 's e (c) evolução da concentração de açúcares redutores para cada ensaio.	50
Figura 4.19 – (a) Curvas de crescimento obtidas com Erlenmeyers tapados apenas com rolha de algodão e (b) tapados com rolha de algodão e papel de alumínio.	52
Figura 4.20 – Concentração de etanol ao longo do tempo nos ensaios (a) apenas tapados com rolha de algodão e (b) tapados com rolha de algodão e com folha de alumínio.	52
Figura 4.21 – Concentração de glucose (determinada por HPLC) ao longo do tempo: (a) para ensaios apenas com rolha de algodão e (b) com rolha de algodão e tampa de papel de alumínio por cima.	53
Figura 4.22 – Evolução da concentração dos reagentes e dos produtos formados ao longo do ensaio.	57
Figura 4.23 – Comparação entre a concentração de açúcares redutores, determinada pelo método do DNS modificado, e a soma das concentrações de glucose e de xilose, determinadas por HPLC.	57
Figura 4.24 – (a) Curvas de crescimento para os ensaios 1 e 2; (b) Evolução da concentração de etanol para os ensaios 1 e 2.	58
Figura 4.25 – (a) Curvas de crescimento dos ensaios 3 e 4; (b) Concentração de etanol ao longo do tempo.	60
Figura 4.26 – (a) Crescimento celular e (b) concentração de reagentes e produtos da fermentação (obtidos por HPLC), para o ensaio 5.	61
Figura 4.27 – Cromatograma da mistura inicial do ensaio 1.	64
Figura 4.28 – Cromatograma da mistura final (no instante de maior concentração de etanol) do ensaio 1.	64

Figura II.1 – Exemplo de curva de calibração do método do DNS.....	V
Figura III.1 – Comparação entre os açúcares redutores, expressos em concentração $E_{q_{Glu}}$ , e a soma entre a concentração de glucose e de xilose determinada por HPLC para: (a) um ensaio de hidrolisado de lamas primárias ( $\approx 106\text{g/L}$ de glucose) com compostos alternativos; (b) um ensaio de hidrolisado de lamas primárias ( $\approx 106\text{g/L}$ de glucose*) com extratos; (c) um ensaio de hidrolisado de pasta branqueada ( $\approx 114\text{g/L}$ de glucose*) com extratos, sendo os ensaios de (a), (b) e (c) tapados apenas com rolha de algodão e os de (d), (e) e (f) idênticos aos anteriores, mas tapados com mais uma tampa de alumínio. Dados correspondentes aos ensaios da Figura 4.19. ....	VIII
Figura IV.1 – Média da linearização da fase exponencial de crescimento para cada uma das leveduras: (a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602, (b) estirpe comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , (c) <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 1426 e (d) <i>Pichia stipitis</i> DSM 3651. ....	IX
Figura V.1 – Linearização da fase exponencial de crescimento para cada uma das leveduras: (a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602; (b) <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 1426; (c) <i>Pichia stipitis</i> DSM 3651.....	XI
Figura VI.1 – (a) Curvas de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 para o ensaio com extratos “Ext(1)” e o seu duplicado “Ext(2)”; (b) linearização da fase exponencial de crescimento e (c) concentração dos açúcares redutores ao longo do tempo. ....	XIII
Figura VI.2 – (a) Curvas de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 para um ensaio com meio completo “MC”, um ensaio com extratos “Ext(1)” e o seu duplicado “Ext(2)”; (b) linearização da fase exponencial de crescimento para cada um dos ensaios e (c) a evolução dos açúcares redutores. ....	XIV
Figura VI.3 – (a) Curvas de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> (estirpe comercial) para um ensaio com meio completo “MC(1)” e o seu duplicado “MC(2)”, um ensaio apenas com glucose “GLU” e um ensaio com extratos “EXT”; (b) linearização da fase exponencial de crescimento e (c) concentração dos açúcares redutores ao longo do tempo. ....	XV
Figura VI.4 – (a) Curvas de crescimento da <i>P. stipitis</i> DSM 3651 para um ensaio com extratos “Ext(1)” e seu duplicado “Est(2)”; (b) linearização da fase exponencial de crescimento e (c) concentração dos açúcares redutores ao longo do tempo.....	XVI
Figura VII.1 – Evolução do pH ao longo dos ensaios com diferentes rários C/N.....	XVII
Figura VII.2 – Curvas de crescimento obtidas com diferentes rários C/N, sendo que o rário 30A foi obtido diluindo o hidrolisado de lamas primárias e adicionando sulfato de amônio na mesma concentração indicada na Tabela 4.6, e o rário 30B foi obtido adicionando o hidrolisado tal e qual e aumentando o teor em sulfato de amônio para $\sim 7,6\text{g/L}$ .....	XVIII
Figura VII.3 – Fração de açúcares redutores ao longo do tempo para os ensaios com diferentes rários C/N. ....	XVIII
Figura IX.1 – Ambos os compostos, xilitol e sorbitol, têm um tempo de retenção próximo dos 25min, não sendo possível identificar com toda a certeza qual deles é o composto presente nas amostras analisadas por HPLC.....	XXV

Figura X.1 – Curva de calibração da glucose que relaciona o índice de refração com a concentração de glucose.....	XXVII
Figura X.2 – Curva de calibração da xilose que relaciona o índice de refração com a concentração de xilose. ....	XXVII
Figura X.3 – Curva de calibração do ácido acético que relaciona o índice de refração com a concentração de ácido acético. ....	XXVIII
Figura X.4 – Curva de calibração do glicerol que relaciona o índice de refração com a concentração de glicerol.....	XXVIII
Figura X.5 – Curva de calibração do etanol que relaciona o índice de refração com a concentração de etanol.....	XXIX

## NOMENCLATURA

$a^*$ ,  $b$ ,  $c$  – constantes

$C^*$  – concentração máxima de oxigênio dissolvido (solubilidade do oxigênio) (g/L)

CA+Glu – Ensaio constituído por compostos alternativos, com adição de glucose

CA+HLP – Ensaio constituído por compostos alternativos dissolvidos num hidrolisado de lamas primárias

$C_L$  – concentração de oxigênio dissolvido (g/L)

D – Sem rolha de papel de alumínio ('destapado')

D/T – Sem rolha de papel de alumínio ('destapado') ou com rolha de papel de alumínio ('tapado')

$dC_L/dt$  – concentração de oxigênio dissolvido por unidade de tempo (g/L.h)

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

D.O. – Densidade ótica (unidades de absorvância)

$Eq_{Glu}$  – Equivalentes de glucose

Ext+HLP – Ensaio composto por extrato de malte, extrato de levedura e peptona dissolvidos num hidrolisado de lamas primárias

Ext+HPB – Ensaio composto por extrato de malte, extrato de levedura e peptona dissolvidos num hidrolisado de pasta branqueada

$Glu_i$  – Glucose inicial

HLP – Hidrolisado de lamas primárias

HPB – Hidrolisado de pasta branqueada

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

IC – Intervalo de confiança

$k_{La}$  – Coeficiente de transferência de massa volumétrico do oxigênio ( $h^{-1}$ )

LPR – Lamas de papel reciclado

$m(j)$  – massa do componente  $j$  (g)

$M(j)$  – massa molar do componente  $j$  (g/mol)

$P_g/V_L$  – Potência consumida no arejamento por volume de meio ( $W/m^3$ )

$Prod_{EtOH}$  – Produtividade em etanol ( $g_{EtOH}/(L.h)$ )

$Prod_{EtOH} máx.$  – Máxima produtividade em etanol ( $g_{EtOH}/(L.h)$ )

S – Desvio padrão amostral

T – Com rolha de papel de alumínio ('tapado')

$t$  – tempo (h)

$t_{N-1}$  – Distribuição  $t$  de Student com  $N-1$  graus de liberdade

$v_g$  – Velocidade superficial do ar (m/s)

$v_{vm}$  – caudal de ar por volume de mistura reacional (L de ar/L de mistura.min)

$\bar{X}$  – Média amostral

$\alpha$  – Nível de significância (probabilidade do erro se encontrar fora do intervalo de confiança calculado)

$\eta_{EtOH}$  – Rendimento em etanol (%)

$\lambda$  – Comprimento de onda (nm)

$\mu/\mu_{máx}$  – Taxa específica de crescimento ou taxa específica de crescimento máxima ( $h^{-1}$ )

$\rho$  – Massa específica (g/L)





# 1. INTRODUÇÃO

Portugal tem uma vasta produção de pasta para papel, sendo a indústria papelreira a terceira maior exportadora do país, segundo dados de 2010 (Diário Digital & Lusa, 2010), o que se reflete numa grande quantidade de resíduos, cerca de 300 mil toneladas só em lamas (Celpa, 2009), que têm como habitual destino a deposição em aterros ou a utilização em agricultura e compostagem. Desses resíduos destacam-se as lamas primárias com uma carga orgânica considerável, que podem ser valorizadas através de processos fermentativos. Para que tal aconteça é necessário estudar a viabilidade do processo e a sua exequibilidade a uma escala maior, que permita a absorção dessas matérias, de modo a resolver o problema do tratamento de resíduos em simultâneo com a geração de produtos úteis à sociedade.

O aumento de escala é um aspeto de extrema importância quando se pretende reproduzir em larga escala resultados alcançados à escala laboratorial. É nessa fase que se estabelecem e afinam os parâmetros que se mantêm constantes e aqueles que devem ser alterados para a obtenção das especificações e da qualidade pretendida para o produto em causa. Além de importante a fase de aumento de escala pode revelar-se crítica, na medida em que podem surgir limitações, facilmente ultrapassáveis ou, por outro lado, que ponham em causa toda a viabilidade do processo.

Foi considerando a valorização de resíduos provenientes da indústria de pasta e papel e toda a problemática associada ao aumento de escala que surgiu a realização desta tese. Este trabalho, inserido no projeto *Biorrefinaria Integrada na Indústria da Pasta de Papel (BIIPP)*, em colaboração com o RAIZ (Instituto de Investigação da Floresta e Papel), teve como objetivos: (i) o estudo da capacidade de obtenção de produtos da fermentação a partir de matérias-primas celulósicas (hidrolisados de resíduos resultantes do processo de pasta para papel) provenientes do RAIZ; (ii) a seleção do microrganismo mais adequado ao processo; (iii) a identificação dos produtos em maior concentração; (iv) o estudo dos parâmetros de maior influência no crescimento celular e na geração do produto; (v) a reprodução dos resultados mais favoráveis numa escala de reator de bancada; (vi) o estudo dos parâmetros que se mantêm constantes no aumento de escala e daqueles que necessitam de sofrer alterações; (vii) a seleção e teste de um meio de cultura mais económico que o tipicamente utilizado à escala laboratorial; (viii) a identificação dos parâmetros que carecem de otimização para o aumento da eficiência e da produtividade; (ix) e a avaliação, de forma superficial, da viabilidade económica da operação. É de destacar que alguns desses objetivos foram surgindo à medida

que o trabalho se foi desenvolvendo, uma vez que conforme se avançou na investigação mais questões foram sendo colocadas.

Para atingir esses objetivos foi efetuado trabalho experimental, que decorreu nos laboratórios do Departamento de Engenharia Química da FCTUC e do Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta.

Esta Tese está estruturada em diferentes capítulos, começando, no capítulo 2, por uma breve explicação acerca da origem da fermentação e dos resíduos de natureza celulósica, potenciais para a fermentação alcoólica. São mencionados com especial relevância os resíduos provenientes do processo de pasta para papel, onde se descreve o processo que leva à sua geração, bem como as etapas de pré-tratamento e hidrólise que antecedem a fermentação. Segue-se a seleção do microrganismo mais adequado à fermentação, onde se enumeram as vantagens das leveduras em detrimento da utilização de bactérias; assim como a identificação das fases de crescimento microbiano, o tipo de metabolitos produzidos e as alternativas à esterilização para controlo de contaminações, no âmbito da fermentação dos açúcares obtidos na operação de hidrólise. Ainda no capítulo 2 abordam-se as duas principais formas de produção de etanol, por via química e por via biológica; os principais países produtores de bioetanol, bem como as respetivas matérias-primas usadas e as previsões de evolução futura; a principal aplicação do bioetanol como biocombustível; a necessidade e a problemática associada ao aumento de escala e por fim um levantamento bibliográfico acerca das concentrações máximas em etanol, dos rendimentos e das produtividades obtidas em fermentações com resíduos celulósicos.

O capítulo 3 é reservado à metodologia utilizada nos ensaios experimentais, nomeadamente a preparação das culturas e os métodos analíticos de HPLC e espectrofotometria UV/Vis que permitiram identificar e quantificar os compostos presentes em solução e acompanhar o crescimento celular.

Todo o trabalho experimental efetuado, a fim de satisfazer os objetivos atrás mencionados, é detalhado e discutido no capítulo 4, onde se estudam diversos aspetos influenciadores do crescimento microbiano e da obtenção de produto, assim como as condições inerentes ao aumento de escala e à reprodução dos resultados obtidos em Erlenmeyer.

Por último, o capítulo 5 sumaria as principais conclusões antevistas na apresentação e discussão de resultados. Mas como à medida que se avança num determinado tema mais questões vão sendo necessariamente levantadas, tornando-se extremamente difícil dar resposta a todas elas em tempo útil, para finalizar, é reservado um espaço de sugestões para trabalho futuro.

Acresce ainda dizer que o texto é complementado por uma série de anexos onde se adiciona mais alguma informação e se detalham determinados assuntos.

# 2. ESTADO DA ARTE

## 2.1 A DESCOBERTA E EVOLUÇÃO DA FERMENTAÇÃO

Os primeiros indícios relativos à descoberta do vinho, e conseqüentemente da fermentação, remontam há cerca de 7000 anos atrás, contudo a sua produção só começou a ser levada a cabo por volta de 1700-1100 A.C..

A palavra fermentação deriva do latim *fervere*, que significa “ferver”, devido à produção de bolhas (que hoje se sabe serem CO<sub>2</sub>), durante o período em que as uvas esmagadas se mantinham em recipientes, fazendo crer que estavam a ferver.

Apesar disso, ainda não se sabia da necessidade de microrganismos fermentativos na produção de bebidas alcoólicas, só em 1755 é que Samuel Johnson definiu o termo levedura como “o fermento colocado no interior da bebida para a fazer funcionar; e no interior do pão para o clarear e inchar” (Alba-Lois & Segal-Kischinevzky, 2010).

Foi com o químico francês Antoine Lavoisier que o mundo vislumbrou alguns dos segredos da fermentação. Por volta de 1789, Lavoisier decidiu estudar os mecanismos de conversão da cana-de-açúcar em álcool e dióxido de carbono pela fermentação. Começou por estimar as proporções de açúcares e de água no início da reação e as proporções de etanol e de CO<sub>2</sub> obtidas no final, concluindo que cerca de dois terços dos açúcares eram reduzidos para dar etanol e um terço era oxidado, formando CO<sub>2</sub>. No entanto, ainda não era claro o papel da levedura na fermentação. Os químicos da altura consideravam a possibilidade da levedura ser imprescindível, para dar início ao processo de fermentação alcoólica, mas não participar na reação, permanecendo inalterada durante o processo (Alba-Lois & Segal-Kischinevzky, 2010).

Só entre 1836 e 1838 é que Theodor Schwann, Friedrich Kützing e Christian Erxleben separadamente concluíram que as leveduras eram organismos vivos (Barnett, 1998).

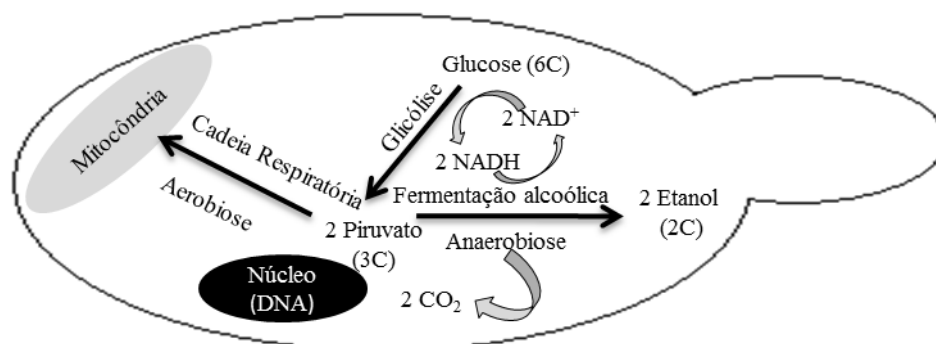
Porém, a fermentação só começou a ser compreendida com o trabalho do químico francês Louis Pasteur, no final da década de 1850, que demonstrou pela primeira vez que a fermentação resulta da ação de microrganismos vivos que permitem converter a glucose em etanol. Além disso, demonstrou que apenas os microrganismos têm a capacidade de converter açúcares em etanol, a partir do sumo de uvas, e que esse processo decorre na ausência de oxigénio. Pasteur definiu a fermentação como um processo vital, denominando-a de *respiração sem ar*; identificou a formação de outros produtos, para além daqueles mencionados por Lavoisier, tais como o glicerol ou o ácido succínico e percebeu que a fermentação é um processo orgânico que ocorre em paralelo com a multiplicação celular,

sendo uma consequência desta, como tal é necessário que as leveduras estejam ativas para que a fermentação ocorra (Alba-Lois & Segal-Kischinevzky, 2010).

Além das descobertas mencionadas, Pasteur conseguiu ainda identificar a ocorrência de um outro tipo de fermentação, a fermentação láctica, geradora de ácido láctico. A descoberta foi feita aquando da contaminação de uma unidade de produção de etanol por bactérias, que deram origem a ácido láctico em vez de etanol. Foi desta forma que o mundo teve conhecimento desses dois grandes tipos de fermentação – a fermentação alcoólica e a fermentação láctica (Alba-Lois & Segal-Kischinevzky, 2010).

Atualmente sabe-se que a levedura mais comumente utilizada na fermentação de bebidas alcoólicas e de pão é a *Saccharomyces cerevisiae*, a qual metaboliza açúcares como, a glucose, a manose e a frutose pela via *Embden-Meyerhof*, da glicólise (Figura 2.1) e a galactose pela via de *Leloir* (Van Maris, *et al.*, 2006). A par da fermentação dá-se a via da respiração a qual é representada pela equação (2.1).

A glicólise é uma via metabólica presente em todas as células vivas que permite a conversão de glucose em piruvato, a partir do qual se pode seguir uma de duas vias, a da respiração ou a da fermentação. Crê-se que a glicólise se tenha desenvolvido há cerca de 3,5 mil milhões de anos, na altura em que ainda não existia oxigénio no meio ambiente. A via completa da glicólise envolve dez reações químicas em sequência, que só foram realmente entendidas por volta de 1940 (Alba-Lois & Segal-Kischinevzky, 2010).



**Figura 2.1** – Esquema representativo da glicólise e das duas vias alternativas: a da fermentação alcoólica e a da respiração (adaptado de Alba-Lois e Segal-Kischinevzky, 2010).

## 2.2 DOS RESÍDUOS CELULÓSICOS À HIDRÓLISE

### 2.2.1 A ORIGEM DOS RESÍDUOS CELULÓSICOS

Este trabalho teve como objetivo a utilização de resíduos celulósicos, os quais se incluem na chamada biomassa celulósica, que contém, para além de celulose, também lenhina, extrativos e compostos inorgânicos (Das & Singh, 2004). Os resíduos celulósicos podem ser obtidos essencialmente de culturas agrícolas, de resíduos florestais, de resíduos do processo

de pasta e papel, de frutas, vegetais e sementes (Das & Singh, 2004; Verardi, *et al.*, 2012). A sua composição varia consoante a sua natureza, como se pode observar pela Tabela 2.1 (a) e (b), contudo na sua maioria a biomassa celulósica é composta por celulose (~33-51%), hemiceluloses (~19-34%), pectina (~2-20%) e lenhina (~20-30%) (Olsson, 2007).

**Tabela 2.1 (a)** – Composição dos principais resíduos celulósicos (adaptado de Verardi, *et al.*, 2012).

Materiais Celulósicos	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lenhina (%)
Gramma-bermudas costeira	25	35,7	6,4
Espigas de milho	45	35	15
Cabelos de sementes de algodão	80-95	5-20	0
Pasto	25-40	35-50	10-30
Madeira	40-55	24-40	18-25
Folhas	15-20	80-85	0
Papel de jornal	40-55	25-40	18-30
Cascas de nozes	25-30	25-30	30-40
Papel	85-99	0	0-15
Resíduos primários sólidos	8-15	N.D.	24-29
Hastes de madeira macia	45-50	25-35	25-35
Estrume bovino sólido	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Resíduos agropecuários	6,0	28	N.D.
<i>Switchgrass</i>	45	31,4	12,0
Resíduos de pasta para papel	60-70	10-20	5-10
Palha de trigo	30	50	15

N.D. – Não disponível

**Tabela 2.1 (b)** – Composição dos principais resíduos celulósicos (adaptado de Das & Singh, 2004).

Resíduos celulósicos	Celulose (%)	Lenhina (%)	Hemiceluloses (%)
<i>Resíduos agrícolas</i>			
Palha de cevada	44	7	27
Palha de aveia	41	11	16
Palha de aveia	42,8	-	-
Palha de arroz	33	7	26
Palha de arroz	32,1	-	-
Palha de trigo	39	10	36
Palha de trigo	30,5	-	-
Palha de sorgo	31	11	30
Casca de algodão	59	13	15
Bagaço de cana-de-açúcar	40	13	29
Bagaço inteiro	46	-	-
Fibra do bagaço	56,6	-	-
Interior do bagaço	55,4	-	-
<i>Frutas e vegetais</i>			
Maçã	2,9	Traços	5,8
Banana	1,3	0,93	3,83
Limão	-	35	-
Laranja	-	14	-
Abacaxi	-	7,64	-
Morango	3,6	8,4	10
Batata	1,2	Traços	9,2
Cenoura	12,9	Traços	19
Couve-flor	13,4	Traços	13
Repolho	8,9	4,3	26
Tomate	9,1	5,3	11
Ervilha	14	2	36

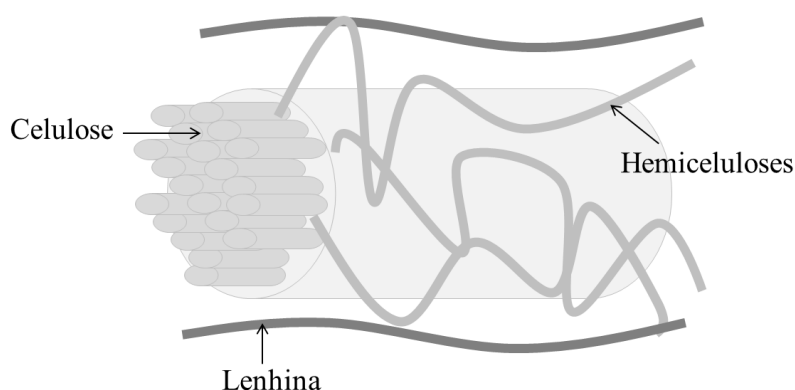
**Tabela 2.1 (b) (Continuação)** – Composição dos principais resíduos celulósicos (adaptado de Das & Singh, 2004).

Resíduos celulósicos	Celulose (%)	Lenhina (%)	Hemiceluloses (%)
<i>Sementes</i>			
Cevada	5,3	-	-
Milho	2,4	-	-
Trigo	2,1	-	-
Aveia	11,9	-	-
Sorgo	2,7	-	2,5
Amendoim	2,8	-	2,5

## 2.2.2 ESTRUTURA DA BIOMASSA CELULÓSICA E RESÍDUOS CELULÓSICOS DO PROCESSO DE PASTA PARA PAPEL

A celulose é um polímero linear constituído por unidades de anidro-D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, com grau de polimerização variável. Na verdade, devido a esse tipo de ligação, acontece que a unidade estrutural repetida ao longo da cadeia se trata da celobiose, um dissacarídeo (Carvalho, 1999; Olsson, 2007). As hemiceluloses são compostas por cadeias mais curtas e até ramificadas, cujas unidades estruturais se dividem em hexoses (D-glucose, D-manose ou D-galactose) e pentoses (D-xilose ou L-arabinose). A lenhina é um polímero fenólico altamente ramificado que tem como função conceder rigidez e proteger as células vegetais de ações microbianas, sendo que a celulose juntamente com a lenhina e as hemiceluloses (Figura 2.2) tornam os materiais de origem vegetal mais estáveis a químicos e a enzimas (Olsson, 2007).

O processo utilizado em Portugal na produção de pasta para papel é designado de processo ao sulfato ou processo *kraft* (Figura 2.3), assim denominado devido à maior resistência físico-mecânica obtida nas pastas produzidas dessa forma, sendo que *kraft* significa ‘resistente’ em sueco e alemão (Carvalho, 1999).



**Figura 2.2** – Representação da biomassa celulósica.

A madeira habitualmente utilizada em Portugal provém da espécie *Eucalyptus globulus*, por ser uma espécie de crescimento rápido; com ciclos de abate curtos e facilidade no processamento, devido à sua composição química, que consiste em baixo teor de lenhina e alto de celulose (Carvalho, 1999).

O processo *kraft* dá início no parque de madeiras, onde a madeira é armazenada para ser destrocada e dar origem a aparas, que serão crivadas para permitir um cozimento mais homogêneo. É no cozimento que ocorre a separação das fibras, através da dissolução da lenhina e de parte das hemiceluloses no licor de cozimento ou licor branco, constituído por hidróxido e sulfureto de sódio, como agentes químicos ativos. O cozimento pode ser contínuo ou descontínuo e realiza-se num equipamento denominado ‘digestor’, a pressões e temperaturas elevadas, por um período variável, dependente do grau de deslenhificação pretendido (Carvalho, 1999; Piotto, 2003; Gonçalves, *et al.*, 2007).

Para além da operação de cozimento, a deslenhificação pode realizar-se, por exemplo, através da utilização de oxigénio em meio alcalino, sendo o licor branco oxidado o composto que confere a alcalinidade (Piotto, 2003).

Após o cozimento dá-se a extração do licor negro (material não celulósico dissolvido), que é encaminhado para o ciclo de recuperação. As aparas cozidas são lançadas num tanque, onde ocorre uma despressurização violenta, que provoca a sua desintegração em fibras, originando a pasta crua. O licor negro fraco é concentrado num conjunto de evaporadores de múltiplo efeito, dando origem ao licor negro forte, o qual é incinerado na caldeira de recuperação, formando o *smelt* que dissolvido em água permite obter o licor verde. É, também, na caldeira de recuperação que se adiciona o sulfato de sódio (*make up*) com o objetivo de compensar os reagentes perdidos, este, apesar de não participar na deslenhificação, é o composto que dá o nome ao processo (‘processo ao sulfato’). O licor verde, por sua vez, sofre caustificação para recuperar o licor branco, o qual será reutilizado no cozimento.

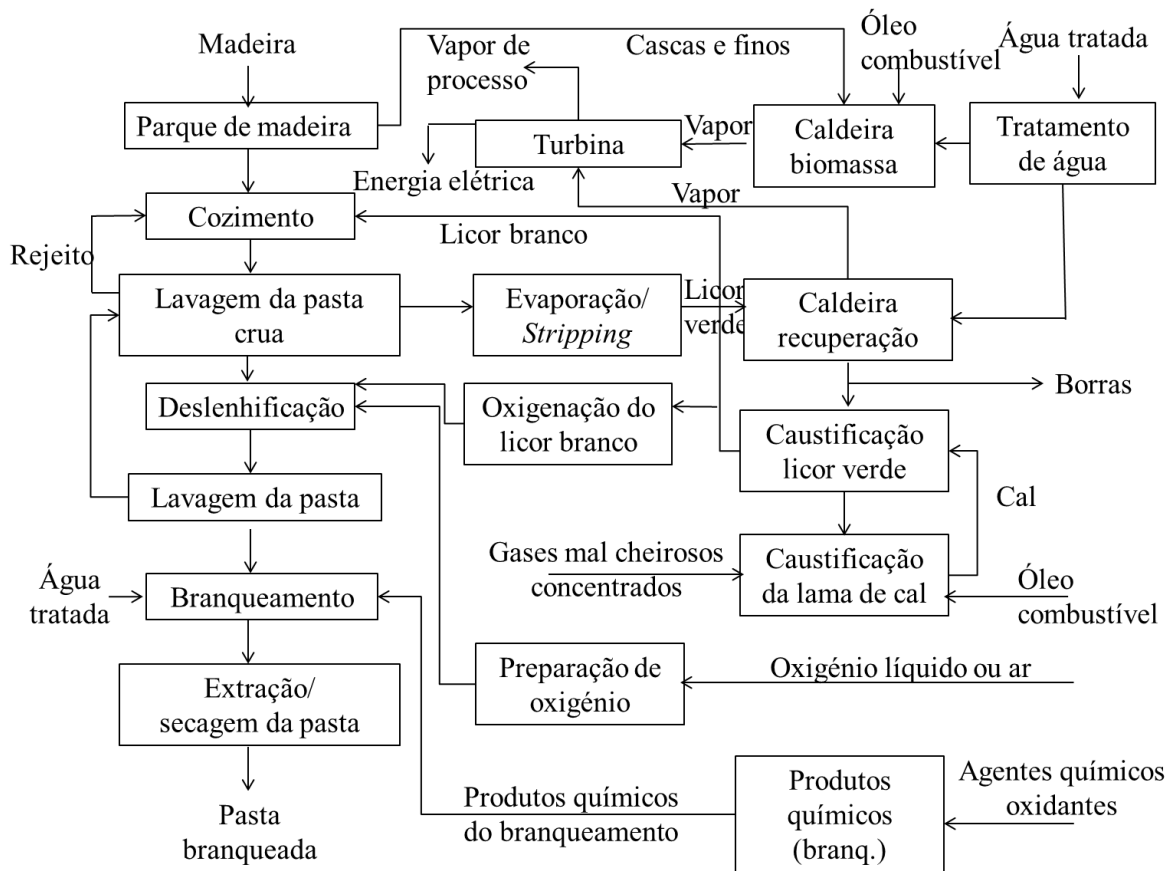
No caso de se pretenderem fabricar papéis brancos a pasta crua terá que passar por uma etapa de branqueamento, na qual se adicionam vários produtos químicos, no sentido de destruir os grupos cromóforos da lenhina, que não foi removida nos estágios anteriores.

Segue-se a etapa de secagem, onde a pasta branqueada é prensada e seca, para depois ser cortada e disposta em fardos, forma vulgarmente conhecida por ‘pasta de mercado’ (Carvalho, 1999; Piotto, 2003; Gonçalves, *et al.*, 2007).

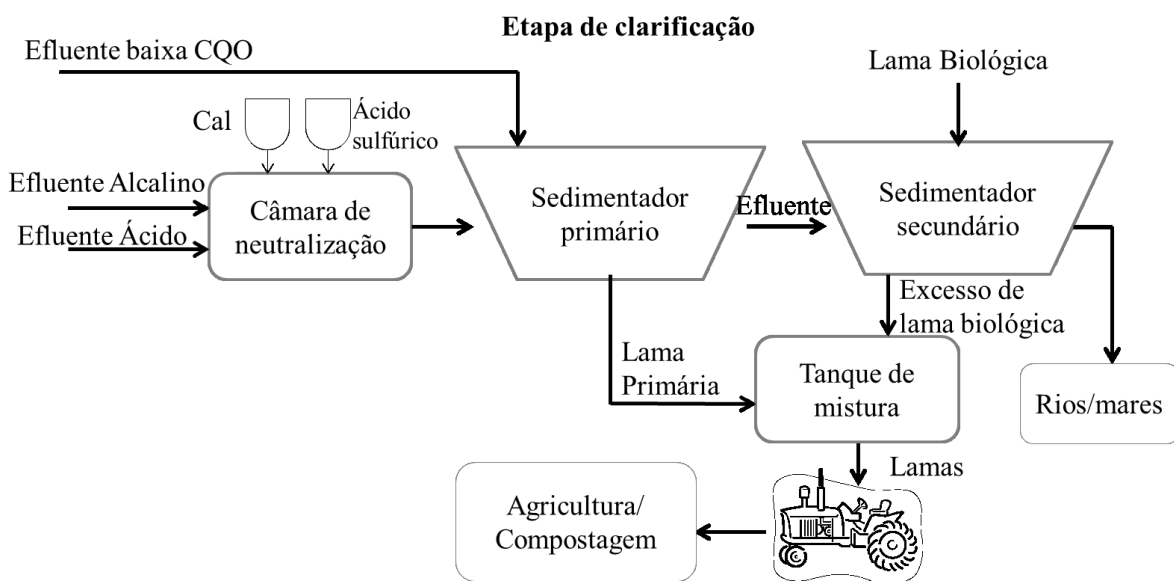
No processo para obtenção de pasta para papel geram-se efluentes de natureza diversa, seja ela ácida, alcalina ou com baixa CQO (carência química de oxigénio), onde se incluem fibras celulósicas curtas e químicos residuais. Esses efluentes seguem para a ETAR (estação de tratamento de águas residuais), na qual passam por um tratamento primário, a fim de remover os sólidos suspensos, por sedimentação, originando lamas primárias (Figura 2.4). As lamas primárias geradas pelas fábricas portuguesas produtoras de pasta para papel apresentam, tipicamente, a seguinte composição (em base seca): 45-60% (m/m) de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose), 5-20% (m/m) de lenhina e 35-50% (m/m) de matéria inorgânica (cinzas) (Mendes, *et al.*, 2012).

Segundo dados da literatura (Celpa, 2009), as lamas representaram cerca de 300 mil das ~900 mil toneladas de resíduos sólidos produzidos na indústria portuguesa de pasta e papel, no ano de 2009. As lamas e as cinzas, provenientes da queima de biomassa, (22% do total de resíduos) tiveram como destino a agricultura e compostagem; 45% dos resíduos resultaram em valorização energética e 18% teve como destino a deposição em aterro. Como tal a utilização das lamas primárias (previamente hidrolisadas) em processos fermentativos dá-lhes um valor acrescentado, além de poder contribuir para a redução da utilização de

combustíveis fósseis, uma vez que o etanol é o principal produto da fermentação dos açúcares, obtidos na hidrólise dessas lamas, como se verá mais adiante.



**Figura 2.3** – Diagrama simplificado do processo de produção de celulose a partir do processo *kraft*, de produção de pasta para papel (adaptado de Piotto, 2003).



**Figura 2.4** – Esquema representativo da ETAR de uma fábrica de pasta para papel (adaptado de Menezes, 2013).



### 2.2.3 PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE

Para que as leveduras possam utilizar os materiais presentes na biomassa celulósica eles terão que sofrer uma sacarificação ou hidrólise, de modo a libertarem os açúcares simples, os quais já são passíveis de serem metabolizados pelos microrganismos fermentativos. O método mais promissor na hidrólise de celulose e hemiceluloses é a hidrólise enzimática, com celulases (Olsson, 2007).

Sabe-se que a conversão da celulose em glucose é um passo muito lento, devido à celulose estar muito bem protegida por uma matriz de lenhina e hemiceluloses, como tal, para que a hidrólise seja mais eficiente, isto é, para que as matérias-primas fiquem mais acessíveis à ação enzimática, torna-se necessário que passem por um pré-tratamento, de vários possíveis: tratamento ácido-base, tratamento térmico, método alcalino ou método físico em que se mói e tritura a biomassa.

No final dessa etapa espera-se obter: a recuperação de todos os hidratos de carbono; a reduzida ou nula obtenção de produtos da degradação da lenhina e dos açúcares; uma alta digestibilidade da celulose na etapa seguinte (a hidrólise); uma elevada concentração de sólidos e uma elevada concentração de açúcares libertados para a fração líquida; bem como um baixo consumo energético e um baixo custo operacional. Assim, o pré-tratamento ideal seria aquele que hidrolisasse as hemiceluloses nos seus açúcares simples e separasse a lenhina da celulose, resultando na diminuição da cristalinidade da celulose, no aumento da digestibilidade das fibras de celulose, na não necessidade de utilizar hemicelulases e no aumento da produtividade pelas celulases, visto que já não se ligariam à lenhina durante a hidrólise (Olsson, 2007).

A hidrólise enzimática é a quebra das ligações glicosídicas pelas celulases, uma mistura de celobiohidrolases e endoglucanases com  $\beta$ -glucosidases. Estas últimas não são consideradas celulases, na medida em que apenas quebram as ligações presentes nas moléculas de celobiose (um dissacarídeo com duas unidades de glucose), cuja hidrólise é de grande importância, visto que a celobiose inibe muitas celulases. Por outro lado sabe-se que a máxima atividade enzimática das celulases se dá aos  $50\pm 5^\circ\text{C}$  e a um pH entre 4,0 e 5,0, embora as condições ótimas para a hidrólise enzimática variem com o tempo de reação e com a natureza das enzimas (Olsson, 2007).

Ao contrário dos resíduos apresentados inicialmente os resíduos provenientes do processo de produção de pasta para papel sob a forma de pasta branqueada e de lamas primárias (Figura 2.3 e Figura 2.4), vêm livres ou quase livres de lenhina, porque grande parte desta foi removida na etapa de ‘Cozimento’ e na etapa de remoção adicional de lenhina – a ‘Deslenhificação’ (Figura 2.3). Uma vez chegados aos RAIZ, esses resíduos sofreram um pré-tratamento com HCl, de modo a remover o carbonato de cálcio (cinzas) aí presente. O  $\text{CaCO}_3$  é indesejável, visto que contribui para um pH superior ao pH ótimo de atuação das celulases. A reação com HCl não só remove o  $\text{CaCO}_3$  pela formação de  $\text{CO}_2$  e água, como permite o ajuste de pH para que a reação de hidrólise possa ocorrer. As matérias-primas utilizadas ao longo deste trabalho (lamas primárias e pasta branqueada como referência) foram previamente hidrolisadas no RAIZ, tendo sido recebidas sob a forma liquefeita.

A Figura 2.5 ilustra as etapas pelas quais as matérias-primas utilizadas passaram até chegarem ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (DEQ/FCTUC) onde foi realizada a sua fermentação.



Figura 2.5 – Esquema representativo das matérias-primas utilizadas na hidrólise e na fermentação.

## 2.3 FERMENTAÇÃO DOS AÇÚCARES OBTIDOS NA HIDRÓLISE DOS RESÍDUOS CELULÓSICOS

### 2.3.1 SELEÇÃO DO TIPO DE MICRORGANISMO FERMENTATIVO

Existem duas grandes classes de microrganismos vulgarmente usados em fermentações, as bactérias e as leveduras. Neste estudo apenas foram utilizadas leveduras, visto que as bactérias apresentam certas desvantagens relativamente às leveduras, tais como: a necessidade de serem geneticamente alteradas para tolerarem altas concentrações de etanol; a sua estabilidade genética não estar comprovada para tempos prolongados; haver grande probabilidade de contaminação por terem que ser cultivadas em pH's próximos do neutro (entre 6 e 8); haver obstáculos regulamentares que impeçam o seu uso em larga escala; serem menos seletivas na formação do produto, para o caso do etanol; serem menos resistentes que

as leveduras; bem como a percepção pública do perigo que podem representar, no caso das estirpes de *Escherichia coli* (McMillan, 1993; Dien, *et al.*, 2003; Olsson, 2007).

A Tabela 2.2 representa os microrganismos mais utilizados em fermentações alcoólicas, sendo que as leveduras são tipicamente mais utilizadas que as bactérias, tanto ao nível laboratorial como em larga escala.

As características desejáveis para os microrganismos a utilizar em fermentações alcoólicas são: a tolerância ao etanol; a fermentação rápida e eficiente; a possibilidade de utilização de novos substratos na fermentação; o crescimento em meios que não promovam a contaminação; a termotolerância; a tolerância a meios ácidos; a resistência à desidratação/re-hidratação; uma viabilidade/vitalidade a 100%; a resistência a tenções mecânicas e à pressão hidrostática; a estabilidade genética e a osmotolerância. É de salientar que muitos destes aspetos são manifestados pela levedura mais utilizada – a *Saccharomyces cerevisiae* (Walker, 2010).

**Tabela 2.2** – Leveduras tipicamente usadas em fermentação alcoólica e bactérias candidatas para o mesmo tipo de fermentação (Walker, 2010).

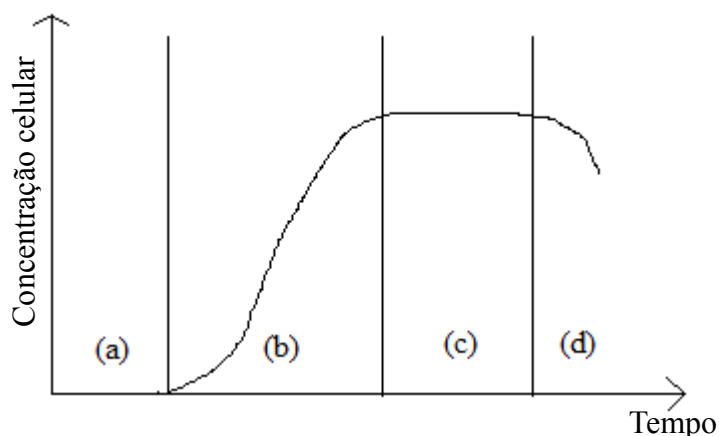
Bactérias	Leveduras
<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pichia stipitis</i>
<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>Candida shehatae</i>
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Pachysolen tannophilus</i>
	<i>Hansenula polymorpha</i>
	<i>Dekkera bruxellensis</i>
	<i>Candida krusei</i>

### 2.3.2 CRESCIMENTO MICROBIANO E PRODUÇÃO DE METABOLITOS

Outros aspetos a considerar, especialmente nos ensaios realizados em regime descontínuo, como é o caso, são as fases de crescimento dos microrganismos, nomeadamente das leveduras com capacidades fermentativas, que são: a fase de adaptação, a fase de crescimento exponencial, a fase estacionária e a fase de decaimento endógeno (Figura 2.6) (Carlile, 2001). No entanto, existem diversos fatores que podem influenciar ou inibir o crescimento, nomeadamente a concentração de substrato e de produto. Os microrganismos podem ser classificados de acordo com a sua sensibilidade à glucose como Crabtree positivas (sensíveis à glucose), de que é exemplo a *S. cerevisiae* (que tolera até 200-300g/L de glucose) (Lin & Tanaka, 2006) ou Crabtree negativas (não sensíveis à glucose), como a *Candida utilis*, a *Kluyveromyces marxianus* e a *Pichia stipitis* (Papini, 2012; Menezes, 2013). Podem ainda ser classificados quanto à sua tolerância ao etanol, onde se destaca a *S. cerevisiae* (que tolera até cerca de 197,6g/L de etanol) (Wang, *et al.*, 2007).

Os metabolitos primários são produtos formados pelos microrganismos durante o seu crescimento, nomeadamente aquando da fase exponencial de crescimento. Em culturas descontínuas essa produção tem tendência a realizar-se no final da fase exponencial, sendo posteriormente consumida durante a fase estacionária. As culturas contínuas são as ideais para a produção deste tipo de metabolitos, por se poderem manter na fase exponencial de

crescimento, requerendo no entanto um maior investimento e manutenção. Como exemplos de metabolitos primários há a destacar o etanol (obtido maioritariamente por fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*), o ácido cítrico (obtido com microrganismos aeróbios do género *Penicillium* ou da espécie *Aspergillus niger*), nucleótidos e aminoácidos (produzidos por bactérias), proteínas (produzidas por fungos filamentosos e bactérias), polissacarídeos extracelulares, nomeadamente a pululana (a partir de *Aureobasidium pullulans*), gorduras, como glicerol esterificado com ácidos gordos (acumulado em leveduras e bolores) e diversos ácidos orgânicos, como o ácido fumárico (obtido por espécies do género *Rhizopus*), o ácido itacónico (produzido por *Aspergillus terreus*) e o ácido glucónico (obtido por várias espécies do género *Aspergillus*) (Carlile, *et al.*, 2001).



**Figura 2.6** – Representação das diferentes fases da curva de crescimento de uma levedura: (a) fase de adaptação; (b) fase de crescimento exponencial; (c) fase estacionária; (d) fase de decaimento endógeno.

Por sua vez os metabolitos secundários são produtos que não são essenciais ao crescimento vegetativo das culturas puras, ocorrendo habitualmente nas fases estacionária e de decaimento, também associados à diferenciação e esporulação\* - fase de crescimento designada por John Bu'Lock de 'idiofase' em contraste com a 'tropofase' característica do metabolismo primário. A produção deste tipo de metabolitos é promovida por culturas em descontínuo. Como exemplos de metabolitos secundários têm-se aflatoxinas (obtidas por *Aspergillus parasiticus*), penicilinas (geradas por *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus nidulans*) e cefalosporinas (em *Cephalosporium acremonium*), entre outros (Carlile, *et al.*, 2001).

### 2.3.3 NECESSIDADE DE ESTERILIZAÇÃO

A esterilização é um passo necessário quando se pretende manter culturas puras, ou seja, sem interferência dos microrganismos do meio envolvente. Contudo, a esterilização, frequentemente realizada em autoclave, consome demasiada energia, tempo e recursos humanos, pelo que representa mais um custo, que a ser desnecessário aumenta a potencial

\* Diferenciação é processo em que células especializadas se tornam mais especializadas e esporulação é o processo de formação de esporos - células características da reprodução assexuada que estão adaptadas para se dispersarem e sobreviverem, por longos períodos de tempo, em condições adversas.

viabilidade económica do processo. Para este caso em particular é muito importante a eliminação de todos os custos desnecessários, visto que a matéria-prima utilizada (hidrolisados de lamas primárias) apresenta um baixo teor em glucose, quando comparada com matérias-primas cultivadas para o efeito (como a cana-de-açúcar), que dará origem a uma baixa concentração em produto. Como tal há certas operações que ao serem eliminadas do processo podem fazer a diferença entre a viabilidade e a inviabilidade do mesmo.

Na literatura (McMillan, 1993; Baptista, *et al.*, 2005; Olsson, 2007; Basso, *et al.*, 2011; Lima & Natalense, 2012) é possível encontrar referências do controlo de pH como forma de reduzir a probabilidade de contaminação, especialmente a bacteriana (destacando-se as bactérias produtoras de ácido láctico), em fermentações alcoólicas. Esse controlo deve manter o meio de cultura ácido, uma vez que as bactérias crescem preferencialmente em meios ligeiramente alcalinos. O ácido cítrico a 1% (v/v) é um dos mais adequados na acidificação do meio, em detrimento do ácido sulfúrico, do ácido fosfórico ou do ácido clorídrico, por não reduzir a taxa de crescimento da levedura ou a produção de etanol, como os mencionados (Baptista, *et al.*, 2005). Além dessa estratégia também se referem outras formas de evitar a contaminação por bactérias, nomeadamente: (i) o tratamento das leveduras (que em alguns processos são recirculadas) com ácido sulfúrico, o que pode ser desaconselhável, visto causar alguns distúrbios fisiológicos nas mesmas (Basso, *et al.*, 2011); (ii) o uso de antibióticos como a penicilina G, a estreptomicina ou a tetraciclina (Lima & Natalense, 2012); (iii) a utilização de uma elevada concentração em açúcares juntamente com a diluição de sulfato de amónio em água (Baptista, *et al.*, 2005); (iv) ou a adição de etanol a 8% (v/v), com recirculação durante 3-4 horas, antes de dar início ao ensaio (Baptista, *et al.*, 2005).

Neste trabalho, estudou-se o efeito do controlo de pH no crescimento das leveduras e consequentemente na obtenção de produtos da fermentação, como se pode ler no capítulo 4.

## 2.4 PRODUÇÃO DE ETANOL: VIA QUÍMICA VS. VIA BIOLÓGICA

Até cerca de 1950 a maioria do etanol (para usos que não o alimentar) era produzido por fermentação, embora este também possa ser produzido por via química através da hidrogenação do etileno equação (2.2), que é barato e com fornecimento abundante, uma vez que provém do processo de *cracking* do petróleo. Embora o etanol seja predominantemente produzido desta forma, existem considerações políticas e económicas que levaram à expansão da produção por via fermentativa (Carlile, *et al.*, 2001), uma vez que esta é independente da utilização de matérias-primas de origem fóssil.



O etanol é produzido por síntese química em muitas empresas, das quais se destacam a Sasol, a SADAF, a British Petroleum ou a Equistar, tendo capacidades entre as 100 e 400 mil toneladas/ano. Contudo, a produção de etanol por esta via, a nível mundial, desceu 3 pontos percentuais entre os anos 1990 e 2006, uma vez que o aumento no preço do petróleo ou a diminuição do preço do etanol terão prejudicado o negócio do etanol obtido por síntese química, em comparação com o obtido por via fermentativa (Nag, 2008).

A obtenção de etanol por fermentação (designado por bioetanol) baseia-se, essencialmente, na transformação metabólica de glucose em etanol e CO<sub>2</sub>, como representado na equação (2.3), a qual permite obter 0,51g de etanol e 0,49g de CO<sub>2</sub> pela conversão de 1g de glucose (Walker, 2010).

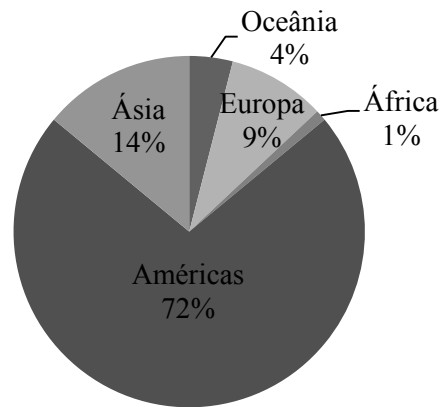


A via fermentativa tem imensas vantagens quando comparada com a via química, das quais se destacam: (i) a independência de recursos fósseis; (ii) a utilização de matérias-primas renováveis (que se produzem a uma velocidade compatível com a velocidade de consumo); (iii) a possibilidade de utilizar como matérias-primas resíduos de certas atividades industriais, como o caso da indústria de pasta para papel (Mendes, *et al.*, 2012); (iv) os custos das matérias-primas poderem ser baixos ou nenhuns, quando se trata da utilização de resíduos; e (v) a diminuição das emissões de gases com efeito de estufa (GEE), que pode chegar a 80%, quando comparada a utilização de etanol proveniente da fermentação de resíduos celulósicos com a gasolina, ou 20-30%, quando comparado com o etanol obtido por fermentação de milho (Demain, 2009).

## 2.5 PANORAMA MUNDIAL RELATIVAMENTE À PRODUÇÃO DE BIOETANOL

A produção mundial de bioetanol, em 2006, foi  $49,8 \times 10^6$  litros (39 megatoneladas), dos quais 77% foram utilizados em combustível, 8% em bebidas e 15% em aplicações industriais. Sabe-se que a produção industrial de etanol teve um aumento de cerca de 75% desde 1975, enquanto a produção de etanol para combustível aumentou de  $1 \times 10^6$  litros para  $38 \times 10^6$  litros desde 1975 até 2006 (Nag, 2008).

O Brasil e os EUA competem pelo maior produtor de bioetanol no mundo. Embora o Brasil já tenha sido o maior produtor, os EUA ultrapassaram-no, segundo estatísticas de 2006, com produções de  $19,1 \times 10^6$  litros e  $16,7 \times 10^6$  litros, nos EUA e no Brasil, respetivamente. A produção de etanol divide-se do seguinte modo: as Américas produzem 72% da produção mundial, seguidas da Ásia, da Europa, da Oceânia e do continente Africano (Figura 2.7). As matérias-primas utilizadas são maioritariamente milho nos EUA (que usam 13% da sua produção total na produção de combustível) e cana-de-açúcar e melaços no Brasil. Mais de 60% das culturas de açúcar foram usadas em produção de combustíveis no início dos anos 2000, decrescendo para 47% em 2006 e as culturas de amido (proveniente essencialmente de milho) foram usadas para 53% da produção de etanol no mesmo ano, prevendo-se que essa tendência se mantenha até ao ano de 2015. Para além disso, espera-se um aumento da produção de etanol pelo Brasil e pelos EUA na ordem de 102% e 93%, respetivamente. Prevê-se contudo um aumento da produção mundial na ordem dos 585%, devido fundamentalmente: (i) ao aumento do preço do petróleo; (ii) à maior procura de combustíveis líquidos; (iii) à diminuição do fornecimento de petróleo no futuro; à legislação, que irá incentivar o uso de biocombustíveis e (iv) à produção de bioplásticos a partir do etanol (Nag, 2008).



**Figura 2.7** – Distribuição da produção mundial de etanol pelos diversos continentes, no ano de 2006 (adaptado de Nag, 2008).

## 2.6 UTILIZAÇÃO DE ETANOL COMO COMBUSTÍVEL E LEGISLAÇÃO ASSOCIADA

Considerando que a fermentação, por leveduras, dos resíduos celulósicos, provenientes do processo de pasta para papel, produz maioritariamente etanol, entre outros subprodutos em menores concentrações, uma das possíveis aplicações poderia ser como biocombustível. Nesse caso entrar-se-á num campo, ainda hoje controlado pelos produtos derivados de recursos fósseis, como é o caso da gasolina, apesar de, a pouco e pouco, os biocombustíveis se virem afirmando como uma das alternativas a esse tipo de recursos. A busca de alternativas aos combustíveis fósseis é um aspeto muito importante na medida em que, como se sabe, essas fontes de energia são não renováveis e contribuem de forma significativa para o aumento das emissões de GEE, como os óxidos de nitrogénio,  $\text{NO}_x$  e os compostos orgânicos voláteis, COV's, para além do  $\text{CO}_2$ , promovendo não só a poluição ambiental como o aquecimento global (EPA, 2013).

De modo a mitigar esses problemas os Estados-Membros da UE comprometeram-se, através do Protocolo de Quioto e de diretivas europeias, a reduzir as suas emissões de GEE e a utilizar fontes de energia renováveis, em especial no setor dos transportes. O objetivo, estabelecido para Portugal, para a quota de energia, proveniente de fontes renováveis, no consumo final bruto para 2020 é de 31% e a medida tomada para o setor dos transportes foi a aplicação de uma taxa de 10% em volume de biocombustíveis líquidos. A máxima redução típica de emissões de GEE obtida pelo uso de bioetanol é a conseguida pelo etanol de cana-de-açúcar (71%) e a mínima pelo etanol de trigo (32%) (Directiva 2009/28/CE do parlamento Europeu e do conselho, 2009). Contudo, a utilização destes recursos entra em conflito com a alimentação humana e animal (etanol de primeira geração), aspeto que levou à evolução no sentido da obtenção de etanol de segunda geração, que usa recursos que não interferem com a alimentação, como alguns dos resíduos celulósicos já mencionados (Lima & Natalense, 2012).

Segundo dados de 2009 (Avillez, *et al.*, 2009) já existem estudos para a produção, em Portugal, de 200 milhões de litros/ano de bioetanol, que dizem respeito ao bioetanol

necessário para substituir os 10% (v/v) da gasolina que é prevista vir a ser consumida nos anos que se avizinham.

No que se refere aos biocombustíveis em Portugal apenas existem fábricas de produção de biodiesel, o que se deve a certas limitações, que serão abordadas em seguida.

O principal objetivo a atingir, na década que se segue, é o da criação de condições que permitam a produção de etanol de 2ª geração, contudo esse objetivo só será possível mediante a passagem por três fases distintas: (i) a instalação de duas unidades de produção de etanol de 1ª geração (utilizando o milho grão como matéria-prima) com capacidade para 100 milhões de litros/ano cada uma; (ii) a realização de investimentos com vista à extração de óleo de milho, o que permitirá estabelecer parcerias com empresas produtoras de biodiesel e consequentemente gerar um aproveitamento integrado dos produtos e subprodutos de ambas, originando a formação das futuras biorrefinarias e (iii) a reconversão das unidades de 1ª em 2ª geração, após assegurada a nível mundial a viabilidade tecnológica e económica da produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos. As razões pelas quais é necessário passar pelas três fases descritas são: a viabilidade tecnológica e económica da produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos só poder vir a ser assegurada daqui a pelo menos seis anos; a dificuldade dos investidores, que não se encontram no ramo da produção de bioetanol a partir de cereais, em ocupar um lugar no âmbito da produção de etanol de 2ª geração e os montantes necessários para a reconversão de uma fábrica de 1ª geração para uma de 2ª geração serem relativamente reduzidos (Avillez, *et al.*, 2009).

No entanto, sendo premente a passagem pelas fases enunciadas, surgem questões relacionadas à produção de etanol de 1ª geração que se prendem com a ocupação de 23 milhares de hectares, em território nacional, para a produção do milho grão, que entrarão em conflito com a segurança alimentar, pela ocupação de áreas de produção de bens alimentares, e/ou com a redução dos GEE, pela ocupação de áreas de vegetação arbórea ou herbácea com um elevado *stock* de carbono e/ou com a biodiversidade, pela ocupação de terras com elevada biodiversidade (Avillez, *et al.*, 2009). Como tal, a instalação de uma fábrica de produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos, em Portugal, é algo, à partida, pouco provável de acontecer num futuro imediato, apesar da investigação na área poder contribuir para que essa perspetiva se inverta.

Outra questão importante é o preço final do produto. A Tabela 2.3 apresenta os custos de produção de etanol, com base em diferentes matérias-primas, comparativamente ao custo de produção da gasolina.

Estima-se que o custo das matérias-primas utilizadas na produção de bioetanol de 1ª geração representem cerca de 50 a 80% dos custos totais, enquanto nos processos com materiais lenhocelulósicos essa percentagem baixe para 40% (Walker, 2010).

Tendo em conta estes dados, aparentemente o bioethanol de 1ª geração com menores custos de produção é o obtido a partir da cana-de-açúcar brasileira. Para o bioetanol de 2ª geração destaca-se o proveniente de materiais lenhocelulósicos. Contudo, para que o bioetanol possa ser economicamente competitivo com os combustíveis fósseis os custos de produção não deveriam ir além dos 0,2€/L, por comparação com a gasolina (Walker, 2010).



**Tabela 2.3** – Custos de produção da gasolina e de etanol produzido a partir de diferentes matérias-primas (Walker, 2010).

Fonte de biomassa	Custos de produção (€/L)
Gasolina	0,25
Milho dos EUA	0,42
Palha de milho	0,45-0,58
Trigo dos EUA	0,27-0,43
Beterraba sacarina dos EUA	0,32-0,54
Cana-de-açúcar brasileira	0,16-0,28
Molossos (China)	0,24
Sorgo sacarino (China)	0,22
Fibra de milho (EUA)	0,41
Palha de trigo (EUA)	0,44
<i>Spruce (softwood)</i>	0,44-0,63
<i>Salix (hardwood)</i>	0,48-0,71
Material lenhocoelulósico (resíduos)	0,11-0,32

## 2.7 MUDANÇA DE ESCALA EM FERMENTADORES

O aumento de escala em processos fermentativos foi reconhecido como um problema importante desde a sua primeira aplicação na produção de penicilina, em 1940 (Cascaval, 2011).

Essa problemática impõe-se, porque quando se pretende aumentar a escala de um fermentador têm que se ter em conta diversos aspetos, dos quais se destacam a geometria do recipiente, o tipo e velocidade de agitação, o arejamento, no caso de processos aeróbios, entre outros aspetos.

Para o caso de processos aeróbios, como os que envolvem o crescimento de microrganismos, um dos aspetos mais importantes é a manutenção do arejamento, o qual pode ser controlado através do coeficiente de transferência de massa volumétrico do oxigénio ( $k_L a$ ). Para manter o  $k_L a$  constante é necessário controlar o caudal de fornecimento de oxigénio (ou de ar), a agitação e a temperatura, que se relacionam da seguinte forma: (i) quanto maior o caudal de oxigénio maior a concentração de oxigénio dissolvido por unidade de tempo ( $dC_L/dt$ ); (ii) quanto maior a agitação maior  $dC_L/dt$ ; (iii) quanto maior a temperatura menor  $dC_L/dt$ ; (iv) quanto maior  $k_L a$  maior  $dC_L/dt$ , como se observa na equação (2.4). As dependências de  $k_L a$  com a agitação e com o caudal de oxigénio são dadas por  $b$  e  $c$ , respetivamente (equação (2.5)), os quais podem variar significativamente com a geometria e as condições de operação, como se pode observar pela Tabela 2.4 (Alam & Razali, 2005).

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C_L) \quad (2.4)$$

$$k_L a = a' \left( \frac{P_g}{V_L} \right)^b (v_g)^c \quad (2.5)$$

**Tabela 2.4** – Constantes b e c de diversos trabalhos (compilados por Alam & Razali, 2005).

b	c	Tipo de agitador	Modelo líquido	Volume de líquido (L)
0,95	0,67	N.D.	Sistema ar-água	66
0,68	0,58	Turbina de disco e turbina de pá inclinada	Sistema ar-água	5
0,73	0,89	Turbina de disco e turbina de pá inclinada	Meio fermentativo (para leveduras)	5
0,47	0,39	Turbina de pá-vertical (tipo Rushton)	Meio fermentativo (para <i>Aspergillus</i> 's)	10
0,84	0,40	Pá do tipo Narcissus	Solução CMC (2% m/v)	50
0,82	0,40	Pá do tipo Narcissus	Solução de xantana (0,5% m/v)	50
0,68	0,40	Turbina de disco e turbina de pá inclinada	Solução CMC (0,7% m/v)	5

N.D. – não disponível, CMC – Carboximetilcelulose

Segundo a literatura (Cascaval, *et al.*, 2011) a grandeza dos parâmetros físicos depende fortemente da escala de operação, nomeadamente se a semelhança geométrica não for respeitada aquando do aumento de escala. Idealmente, o aumento de escala não deve pôr em causa a eficiência da fermentação ou a qualidade do produto, mantendo-os pelo menos iguais aos obtidos na menor escala; no entanto, as características geométricas para escalas maiores afetam a consistência e a reprodutibilidade a par da qualidade do produto, levando à diminuição do rendimento da fermentação e à acumulação de subprodutos indesejados. Para o caso de fermentadores à escala industrial os problemas agravam-se com a presença de zonas mortas, originadas pelo aumento das dimensões. A redução da eficiência na mistura leva a distribuições não uniformes de oxigénio e de substrato, favorecendo a insuficiência de substrato na base do fermentador e a limitação de oxigénio em simultâneo com o excesso de substrato no topo. Tais diferenças induzem a formação de subprodutos e a passagem intermitente das células em zonas com diferentes condições pode levar a alterações na fisiologia celular e, conseqüentemente, à diminuição do seu crescimento e produtividade (Schmidt, 2005).

Para produtos obtidos em processos descontínuos e em anaerobiose, como o etanol, no caso deste trabalho, há que ter em conta dois estágios: o estágio do crescimento celular (favorecido pela aerobiose) e o da obtenção do produto (favorecida pela anaerobiose). Neste caso existe um compromisso entre o oxigénio fornecido (para o crescimento celular) e a produção do etanol. Como tal é um aspeto que carece de alguma otimização, de modo a alcançar-se a máxima produtividade possível.

Neste trabalho trata-se especificamente a passagem da escala laboratorial, realizada em Erlenmeyers de 250mL, para um fermentador de bancada com volume útil de 5L, na qual não se mantém a semelhança geométrica, o modo de fornecimento de ar e o tipo de agitação. Como tal, a hidrodinâmica do sistema e o fornecimento de oxigénio alteram-se significativamente, surgindo problemas adicionais no alcance da concentração de produtos, do rendimento e da produtividade previamente atingidos à menor escala. Um dos aspetos alterados que pareceu ter efeito nesses valores foi o caudal de ar fornecido à mistura, cujo valor mais adequado só seria possível de obter mediante um exercício de otimização experimental.

Outro aspeto de grande relevância é a esterilização de equipamentos e caldos de cultura em escalas maiores, a qual representa custos significativos quando se trata de processos industriais. No presente trabalho foi possível adequar uma estratégia de atenuação do problema de contaminação, sem a necessidade de autoclavagem ou outro processo de esterilização, apenas por controlo de pH, como referido anteriormente.

## 2.8 PRODUTIVIDADES, RENDIMENTOS E CONCENTRAÇÕES DE ETANOL JÁ ALCANÇADAS NOUTROS TRABALHOS

De modo a conseguir comparar diferentes ensaios e perceber a eficiência dos mesmos é necessário, além da determinação da concentração máxima de etanol, o cálculo do rendimento e da produtividade dos ensaios, os quais se podem determinar segundo as equações (2.6) e (2.7), sendo que 0,51 é a conversão de glucose em etanol, baseada na estequiometria bioquímica da levedura (Dowe & McMillan, 2001).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{[\text{Etanol}]_f - [\text{Etanol}]_i}{[\text{Glucose}]_i \times 0,51} \times 100 \quad (2.6)$$

$$\text{Produtividade (g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h)} = \frac{[\text{Etanol}]_f - [\text{Etanol}]_i}{\text{Tempo}} \quad (2.7)$$

De modo a ter uma noção dos rendimentos e produtividades em etanol obtidos por outros autores compilaram-se resultados provenientes de diversas referências e construiu-se a Tabela 2.5. Nesses trabalhos utilizaram-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus* e como matérias-primas foram usados resíduos do processo de pasta para papel e lamas de papel reciclado, entre outros materiais celulósicos. Além dos rendimentos e das produtividades são também apresentados o regime em que os ensaios foram operados e as concentrações máximas em etanol obtidas, as quais dependem da concentração inicial de glucose, que pode ser calculada tendo em consideração a equação (2.6).

A concentração máxima em etanol é um fator muito importante, uma vez que está intimamente relacionada com a viabilidade do processo e com a qualidade do produto final a ser utilizado, por exemplo, em veículos como biocombustível. Para que o etanol possa ser recuperado, por exemplo, através de uma operação de destilação a jusante do fermentador, é necessário que se encontre acima da concentração para a qual a operação é económica e energeticamente inviável. Para o caso da operação de destilação esse limite ronda os 3% (m/m) (Vane, 2008). A concentração de etanol obtida após a fermentação será maior quanto mais elevada for a concentração de glucose. Por outro lado é expectável que matérias-primas mais ricas em açúcares, como é o caso da cana-de-açúcar e de outras espécies vegetais cultivadas especificamente para a produção de etanol, deem origem a concentrações de etanol superiores às obtidas com resíduos celulósicos, como os provenientes do processo de pasta e papel, tipicamente com menores concentrações em hidratos de carbono.

Além disso, existem outras limitações, relacionadas com a operação de destilação do etanol, que o impedem de ser recuperado a 100%. À pressão atmosférica o etanol forma um azeótropo com a água quando a fração mássica de etanol é igual a 0,956 (m/m), o que impede a obtenção de etanol, por destilação, em concentrações acima desse valor (Vane, 2008), dando origem a etanol hidratado, que só pode ser utilizado como combustível em veículos adaptados. O que requer uma operação adicional de desidratação para a obtenção de etanol anidro.

**Tabela 2.5** – Compilação de resultados apresentados em diversas referências.

Levedura	Matéria-prima	Regime	[EtOH] <sub>máx</sub> (g/L)	η <sub>EtOH</sub> (%)	Prod. <sub>EtOH</sub> (g <sub>EtOH</sub> /L.h)	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	RPPP	SHF	-	56,3	0,59	(Peng & Chen, 2011)
<i>P. stipitis</i>	HLP	SHF	11	96	0,24	(Mendes, <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	HLP	SHF	8	94	0,18	(Mendes, <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	RPPP	SSF	13,6-25,5	80	-	(Kang, <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. stipitis</i>	Hidrolisados provenientes da espécie vegetal <i>Prosopis juliflora</i> (algarobeira)	SHF	7,13	39	0,25	(Gupta, <i>et al.</i> , 2009)
<i>S. cerevisiae</i>	Hidrolisados provenientes da espécie vegetal <i>Prosopis juliflora</i> (algarobeira)	SHF	18,52	49	1,16	(Gupta, <i>et al.</i> , 2009)
<i>S. cerevisiae</i>	LPB	SSF	50	-	-	(Fan, <i>et al.</i> , 2003)
<i>S. cerevisiae</i>	LPB	SSF	42	46,6	-	(Fan, <i>et al.</i> , 2003)
<i>K. marxianus</i>	LPR	SSF	32	35	0,44	(Lark, <i>et al.</i> , 1997)
<i>K. marxianus</i>	LPR	SSF	35	36	0,49	(Lark, <i>et al.</i> , 1997)
<i>K. marxianus</i>	Matérias-primas linhocelulósicas de choupo	SSF	16	50	0,20-0,22	(Ballesteros, <i>et al.</i> , 2004)
<i>K. marxianus</i>	Matérias-primas linhocelulósicas de eucalipto	SSF	19	72	0,23-0,26	(Ballesteros, <i>et al.</i> , 2004)
SHY07-1 (com capacidade para converter xilose)	RPPP	SHF	14,18	97,68	-	(Zhu, <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. stipitis</i>	LPR	SHF	19,6	0,21	0,11	(Marques, <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. stipitis</i>	LPR	SSF	18,6	0,20	0,39	(Marques, <i>et al.</i> , 2008)

RPPP – Resíduos do processo de pasta para papel

HLP – Hidrolisado de lamas primárias

LPB – Lamas obtidas de pasta branqueada

LPR – Lamas de papel reciclado

SHF – *Separate hydrolysis and fermentation*

SSF – *Simultaneous saccharification and fermentation*

# 3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

## 3.1 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Nos primeiros ensaios realizados à escala laboratorial, em Erlenmeyers de 250mL, foi utilizado meio geral para leveduras (DSMZ, 2007), apresentado na Tabela 3.1. Adiante foram utilizadas variações desse meio de cultura, nas quais se aumentou a concentração de glucose ou se eliminou completamente, de modo a estudar a influência da fonte de carbono e das fontes de azoto e de outros nutrientes no crescimento celular.

**Tabela 3.1** – Composição do meio geral para leveduras (DSMZ, 2007).

Composição	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona de soja	5
Glucose	10
Agar*	15
Água destilada	Até perfazer o volume desejado

\* Apenas utilizado em meio sólido

## 3.2 ENSAIOS EM ERLENMEYER – CULTURAS CELULARES

A maioria dos ensaios realizados em Erlenmeyer foram efetuados com Erlenmeyers de 250mL, normalmente com um volume de 100mL de meio geral para leveduras (Tabela 3.1) ou de um meio composto por extratos e peptona dissolvidos num dos hidrolisados, nas mesmas concentrações que as indicadas no meio geral para leveduras.

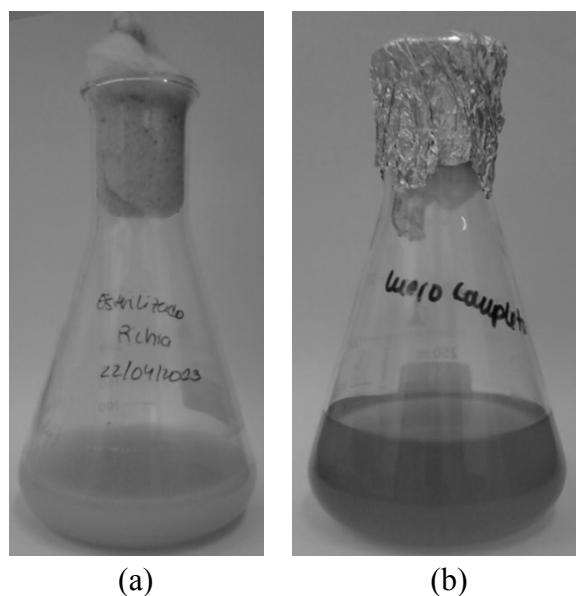
Alguns dos ensaios deram início com a esterilização de cada um dos compostos, necessários ao meio de cultura, em separado, para evitar reações de acastanhamento e consequente perda do valor nutritivo. Em outros ensaios não houve qualquer esterilização.

Por exemplo, para um ensaio com meio geral para leveduras em que se tenha utilizado 100mL de meio de cultura pesou-se 0,3g de extrato de malte (Fluka), 0,3g de extrato de

levedura (Fluka) e 0,5g de peptona (Fluka) que se dissolveram p.e. em 50mL de água destilada. De seguida pesou-se 1g de glucose (Riedel de-Haën) que se dissolveu nos restantes 50mL de água destilada (o volume que perfaz os 100mL), num frasco diferente do usado para os extratos e a peptona. Os dois frascos de tampa roscada, com as rolhas aliviadas, o Erlenmeyer (tapado com rolha de algodão e papel) e as pipetas necessárias (tapadas numa das extremidades por rolhas de algodão e inseridas em recipientes apropriados), foram levados à autoclave durante 20 minutos, a 120°C e  $\approx 1$ atm, de modo a que o vapor de água, livre de ar, penetrasse no interior dos mesmos e permitisse a esterilização.

Finda a etapa de esterilização o líquido de ambos os frascos foi transferido à chama do bico de Bunsen para o Erlenmeyer (obtendo-se as concentrações indicadas para cada composto no meio geral para leveduras) e um inóculo de alguns mililitros foi adicionado ao meio de cultura. O inóculo adicionado foi previamente preparado do mesmo modo. É muito importante que o inóculo adicionado tenha sido incubado nas mesmas condições de temperatura, agitação, meio de cultura, etc. que as do ensaio a que foi adicionado, de modo a diminuir a fase de adaptação e a garantir que todos os ensaios seguiram a mesma metodologia, aspeto importante quando se trata da reprodutibilidade de ensaios. Ainda à chama do bico de Bunsen o Erlenmeyer foi tapado com rolha de algodão e caso necessário também com folha de alumínio, as quais foram esterilizadas juntamente com o Erlenmeyer (Figura 3.1). A cultura foi assim posta a incubar com agitação orbital a 150rpm, a 30°C, numa incubadora do tipo Stuart.

Foram tiradas amostras de tempo em tempo, conforme necessário para o ensaio em curso, as quais, de entre outros aspetos, permitiram controlar o crescimento celular, o consumo de açúcares redutores e a evolução do produto e dos subprodutos.



**Figura 3.1** – Ensaio realizados em Erlenmeyer: (a) tapados apenas com rolha de algodão; (b) tapados com rolha de algodão e papel de alumínio.

### 3.3 ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO CELULAR – MÉTODO ESPETROFOTOMÉTRICO

O acompanhamento do crescimento celular foi levado a cabo mediante uma técnica espectrofotométrica, na qual se mediu a densidade ótica, num espectrofotómetro UV/visível (Beckman DU 650) a 540nm, tal como mencionado em diferentes trabalhos (Mobini-Dehkordi, *et al.*, 2007; Mendes, *et al.*; 2012, Menezes, 2013).

Começou-se por retirar uma amostra, à chama do bico de Bunsen com uma pipeta previamente esterilizada, a qual foi dividida por dois tubos de ensaio. Um dos tubos foi colocado numa centrífuga (Hettich) a 3000rpm, durante 5 minutos, de modo a separar as células do meio de cultura. Em seguida retirou-se o sobrenadante, que serviu de branco; leu-se o pH da solução não centrifugada e verificou-se a necessidade de a diluir antes da leitura da absorvância. Caso fosse necessário diluir a amostra, a diluição teria que ser feita na amostra e no branco. A diluição torna-se necessária quando a leitura da absorvância não se encontra entre os limites de 0,1 a 0,9U.A. É de notar que para cada amostra recolhida é sempre necessário centrifugar parte dela, uma vez que para cada amostra tem que haver um branco. Como o meio de cultura se altera com o passar do tempo, utilizou-se o meio de cultura como branco, em cada instante.

Calculou-se o erro associado às análises de espectrofotometria UV/Vis com um grau de confiança de 95%, ou seja, a probabilidade de cada resultado se encontrar dentro dos intervalos apresentados na Tabela 3.2 é de 95%. A fórmula utilizada no cálculo foi a da equação (3.1), com  $N=4$  e  $t_3(\alpha/2)=3,182$ , tal como apresentado na literatura (Guimarães & Cabral, 1997). Optou-se por utilizar este conceito por ser aplicado a amostras de pequena dimensão, provenientes de uma população com distribuição normal, uma vez que se sabe que a distribuição t de Student (assim denominada em homenagem ao estatístico inglês, W. S. Gosset de pseudónimo Student, que a desenvolveu), com  $N-1$  graus de liberdade, se aproxima da distribuição normal padronizada à medida que o número de graus de liberdade aumenta (Guimarães & Cabral, 1997).

$$IC = \bar{X} \pm t_{N-1}(\alpha/2) \frac{S}{\sqrt{N}} \quad (3.1)$$

Foram usadas duas abordagens, uma em que se mediu a D.O. da mesma amostra colocada em diferentes cuvets e outra em que a D.O. da mesma amostra foi determinada na mesma cuvete. A primeira permite obter o erro associado ao método em si, uma vez que em cada medição se usa uma cuvete diferente e a segunda está associada ao erro do próprio equipamento, como tal o erro do primeiro ( $\bar{X} \pm 0,0110$ ) é superior ao do segundo ( $\bar{X} \pm 0,0001$ ), tal como seria de esperar, uma vez que a inclusão de mais etapas leva a uma acumulação de erros, originando um erro global superior.

**Tabela 3.2** – Resultados obtidos pela medição da absorvância de uma mesma amostra em cuvets diferentes (2ª coluna), na mesma cuvete (3ª coluna) e respectivos intervalos de confiança com 95% de certeza.

Ensaio	D.O.-diferentes cuvets (U.A.)	D.O.-mesmas cuvets (U.A.)
1	0,3520	0,3758
2	0,3514	0,3759
3	0,3376	0,3758
4	0,3508	0,3757
Média, $\bar{X}$	0,3480	0,3758
Desvio padrão, S	0,0069	$8 \times 10^{-5}$
IC (95%)	[0,3369; 0,3590]	[0,3757; 0,3759]

## 3.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES E PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO

### 3.4.1 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES

Para a determinação quantitativa dos açúcares redutores foi utilizado um método espectrofotométrico baseado na formação de um composto de cor castanha por redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico por ação dos açúcares redutores.

Começou por preparar-se a solução que contém o ácido 3,5-dinitrosalicílico, como descrito no ANEXO I. Em seguida foi necessário construir uma curva de calibração que permitisse relacionar a absorvância medida no espectrofotómetro com a concentração dos açúcares redutores, expressa em concentração equivalente de glucose. Para tal, fizeram-se várias soluções padrão com concentrações conhecidas de glucose e aplicou-se o método dos açúcares redutores (Método do DNS), tal como descrito no ANEXO I, o qual permitiu ajustar uma curva de calibração como a apresentada no ANEXO II. Após relacionada a absorvância com a concentração equivalente de glucose torna-se possível a determinação quantitativa dos açúcares redutores presentes nas amostras em estudo. Contudo, há que ter atenção ao método a utilizar, uma vez que existe o método do DNS e o método do DNS modificado que variam na preparação do reagente e no procedimento (ANEXO I). O primeiro aplica-se a amostras preparadas com água destilada e o segundo aplica-se a amostras que contêm solução tampão, como os hidrolisados de lamas primárias e pasta branqueada provenientes do RAIZ.

A amostra utilizada será parte do sobrenadante obtido após a centrifugação a 3000rpm, durante 5 minutos, como mencionado atrás. Caso necessário, tal como no acompanhamento do crescimento celular, terá que se diluir a amostra, visto que uma elevada concentração de açúcares redutores resulta num composto de tom muito escuro, que ultrapassa os limites de absorvância dentro dos quais a leitura é considerada fiável (0,1 e 0,9U.A.).

### 3.4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

As análises por HPLC foram realizadas num equipamento de modelo Knauer K-301, com detetor de índice de refração (RI) e uma coluna do tipo PL Hi-Plex Ca  $8\mu\text{m}$ ,  $300 \times 7,7\text{mm}$  (1170-6810) (Varian), mantida a  $85^\circ\text{C}$ . O eluente utilizado foi água ultrapura, obtida após a



filtração de água desionizada num filtro de membrana de 0,2 $\mu$ m (Whatman) e a submissão a ultrassons durante 15min, para desgaseificação. O caudal de eluente foi de 0,6mL/min e o volume mínimo de injeção foi de 20 $\mu$ l, tal como descrito na literatura (Polymer Laboratories, 2004-2005), onde se menciona a adequabilidade desta coluna para a determinação de açúcares.

As amostras recolhidas antes de serem injetadas no equipamento foram centrifugadas a 3000rpm, durante 5 minutos, e filtradas com filtros de membrana de nylon com 0,2 $\mu$ m, de modo a remover os sólidos presentes, como as células de levedura.

As análises por HPLC permitiram determinar e quantificar, essencialmente, o consumo de açúcares ao longo do tempo, assim como a formação de produtos e subprodutos da fermentação. Relativamente aos açúcares foi possível confrontar os resultados obtidos por HPLC com os obtidos pelos métodos do DNS e do DNS modificado, que apenas permitem saber a quantidade de açúcares redutores, sem os individualizar, ao contrário do que acontece com esta técnica. Obteve-se também a evolução de etanol ao longo dos ensaios, que de outro modo não seria possível determinar/quantificar.

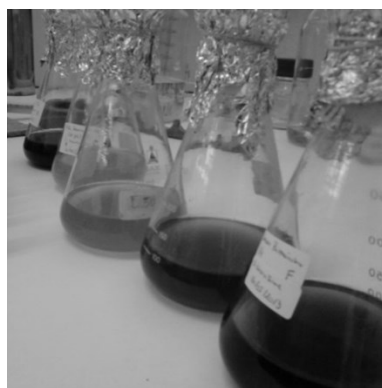
Calculou-se o erro associado às análises por HPLC, do mesmo modo que o calculado para as análises espectrofotométricas, com  $N=3$ ,  $t_2(\alpha/2)=4,303$  e um grau de confiança de 95%. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Resultados obtidos pela injeção da mesma amostra no HPLC e respetivos intervalos de confiança com 95% de certeza.

Ensaio	[Glucose] (g/L)	[Xilose] (g/L)	[Glicerol] (g/L)	[Etanol] (g/L)
T1_E2_LP(1)	1,040	10,875	1,322	28,753
T1_E2_LP(2)	0,689	10,529	1,244	29,018
T1_E2_LP(3)	0,666	10,558	1,226	29,037
Média, $\bar{X}$	0,798	10,654	1,264	28,936
Desvio padrão, S	0,210	0,192	0,051	0,159
IC (95%)	[0,278; 1,319]	[10,177; 11,131]	[1,137; 1,391]	[28,542; 29,330]

### 3.4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS

Como já referido, as matérias-primas utilizadas neste trabalho, hidrolisados de lamas primárias e de pasta branqueada (matéria-prima de referência), foram gentilmente fornecidas pelo RAIZ, sob a forma liquefeita (Figura 3.2).



**Figura 3.2** – Representação das matérias-primas recebidas, hidrolisados de lamas primárias e de pasta branqueada.

Após a sua receção os hidrolisados foram caracterizados. A Tabela 3.4 apresenta os registos de caracterização dos diversos hidrolisados de lamas primárias e de pasta branqueada utilizados. A caracterização foi feita pela aplicação de dois métodos distintos: o método de determinação dos açúcares redutores, o método do DNS modificado (por os meios terem sido tamponados) e o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este último foi utilizado na identificação e quantificação dos açúcares e de alguns dos produtos da fermentação que possam eventualmente ter-se formado, durante o armazenamento até à utilização dos hidrolisados nos ensaios deste trabalho. Como se pode verificar, os hidrolisados estudados são ricos em glucose e apresentam uma concentração significativa de xilose. Alguns ainda possuem pequenos teores em etanol, provavelmente sintetizados durante o tempo de conservação dos hidrolisados, apesar destes se encontrarem armazenados em câmara frigorífica e terem sido previamente filtrados com papel de filtro.

As análises realizadas pelo método do DNS modificado foram feitas em duplicado ou triplicado, pelo que em seguida se calculou a média dos resultados obtidos.

Além da caracterização foi feito um breve estudo acerca da proximidade dos resultados obtidos, nas análises aos açúcares, por HPLC e pelos métodos de determinação de açúcares redutores que se encontra expresso no ANEXO III.

**Tabela 3.4** – Caracterização dos hidrolisados pelo método do DNS modificado e por HPLC. A determinação dos açúcares redutores foi feita em duplicado ou triplicado.

Hidrolisado		Açúcares redutores			HPLC			
		[Equivalentes de glucose] (g/L)		Média (g/L)	[Glucose] (g/L)	[Xilose] (g/L)	[Etanol] (g/L)	
Lamas primárias	HLP1	76,18	64,15	71,10	<b>70,48</b>	<b>57,23</b>	<b>15,38</b>	<b>1,63</b>
	HLP2	103,22	95,96	-	<b>99,59</b>	<b>106,45</b>	<b>30,96</b>	<b>5,10</b>
	HLP3	171,28	162,10	167,79	<b>167,06</b>	<b>114,48</b>	<b>35,44</b>	<b>0,00</b>
	HLP4	156,51	161,94	-	<b>159,23</b>	<b>121,44</b>	<b>29,05</b>	<b>0,00</b>
	HLP5	65,09	-	-	<b>65,09</b>	<b>57,75</b>	<b>15,14</b>	<b>0,74</b>
Pasta branqueada	HPB1	158,14	135,07	149,90	<b>147,70</b>	<b>111,60(*)</b>	<b>23,22(*)</b>	<b>0(*)</b>
	HPB2	-	-	-	-	<b>88,06</b>	<b>24,49</b>	<b>6,58</b>

(\*) Resultados obtidos por uma coluna de HPLC diferente da utilizada em todas as outras determinações.

### 3.5 ENSAIOS NO FERMENTADOR DE BANCADA

Os ensaios realizados em maior escala, no fermentador de bancada BIostat<sup>®</sup> Bplus (Sartorius) (Figura 3.3), com volume útil de 5L, foram efetuados sem qualquer esterilização dos materiais e dos reagentes, mantendo-se, contudo, a velocidade de agitação, a temperatura e o pH, que foram controlados por agitação mecânica (com pás do tipo Rushton), por uma camisa de aquecimento e por soluções de ácido e de base, respetivamente. A solução de ácido utilizada foi ácido sulfúrico (Fisher Chemical) a 1M e de base foi hidróxido de sódio (Fisher Chemical) a 1M. As concentrações do extrato de malte, do extrato de levedura e de peptona foram as mesmas que as apresentadas no meio geral para leveduras, variando apenas a concentração de glucose, proveniente dos hidrolisados de lamas primárias e de pasta branqueada utilizados como matérias-primas. A quantidade de oxigénio fornecida foi um

aspecto que não foi possível manter, aquando do aumento de escala, tendo em conta a impossibilidade de determinar a quantidade de oxigénio fornecida aos ensaios realizados em Erlenmeyer. Como tal, optou-se por selecionar diversos caudais de fornecimento de ar e comparar os resultados obtidos em cada um.



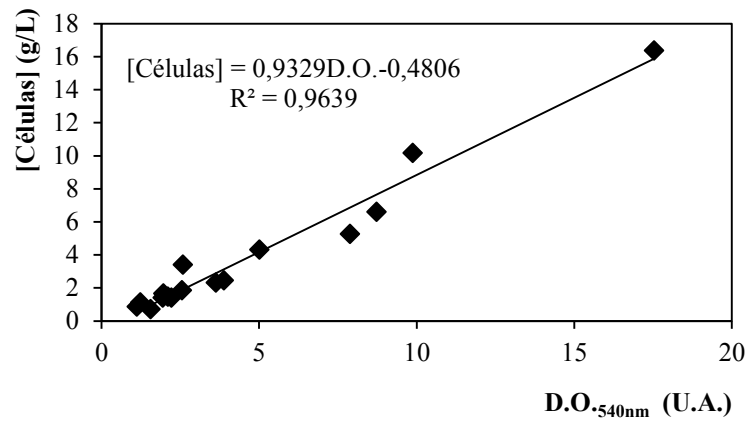
Figura 3.3 – Reator/fermentador de bancada BIOSTAT® Bplus (Sartorius).

### 3.6 RELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE ÓTICA E A CONCENTRAÇÃO CELULAR

Sabe-se que a densidade ótica é maior quanto maior for a concentração celular, contudo para cada levedura é necessário ajustar a curva de calibração que melhor as relacione. Neste caso preparou-se uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, composta por  $\approx 100\text{mL}$  de meio geral para leveduras, incubado a  $30^\circ\text{C}$ , sob agitação orbital de  $150\text{rpm}$ , por aproximadamente  $24\text{h}$ . Em seguida retirou-se uma porção de  $25\text{mL}$ , que foi centrifugada a  $5000\text{rpm}$ , durante  $5$  minutos e lavada duas vezes com  $30\text{mL}$  de uma solução salina de  $\text{NaCl}$  ( $0,85\%$  m/v). Posteriormente as células foram ressuspensas em  $5\text{mL}$  de solução salina e procedeu-se à diluição seriada, sendo que para cada diluição foi medida a respetiva D.O. a  $540\text{nm}$  (de Souza, 2011).

Adicionou-se um volume de  $2\text{mL}$  de cada diluição a um cadinho previamente pesado e procedeu-se à secagem em estufa, a  $100^\circ\text{C}$ . Os cadinhos foram pesados em balança analítica (Dias de Sousa) até atingirem peso constante. O resultado foi expresso em massa celular seca (g/L), permitindo relacioná-la com a D.O. a  $540\text{nm}$ , através do ajuste por regressão linear. Esse procedimento foi realizado por três vezes, obtendo-se o resultado da Figura 3.4, na qual se juntaram os pontos de cada um dos ensaios e se ajustou uma única reta. Optou-se por esta representação, por se terem realizado diferentes diluições em cada conjunto de amostras, de modo a obter uma maior gama de concentrações, como tal não seria correto considerar o

segundo e o terceiro ensaios como duplicado ou triplicado, por não serem utilizadas as mesmas diluições.



**Figura 3.4** – Curva que permite relacionar a concentração celular com a densidade ótica a 540nm.

Esta relação foi necessária para a realização do balanço mássico aos reagentes e aos produtos gerados no fermentador de bancada, onde se fica com uma ideia da massa de inicial e final de cada componente. Por outro lado foi também através do balanço mássico que se determinou com maior certeza a fração mássica de etanol alcançada, a qual é de grande importância quando se trata da viabilidade do processo.

# 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Antes de focar a produção de quaisquer produtos provenientes da fermentação foi necessário estudar o comportamento e a influência de diversos fatores no crescimento de leveduras adequadas a esse processo, tais como, a quantidade de oxigênio fornecido ou a necessidade de esterilização do meio.

Admitindo que quanto maior o número leveduras num dado instante maior a quantidade de produto total obtido, será vantajoso conjugar as condições que permitam obter uma maior velocidade de crescimento celular e, conseqüentemente, uma maior concentração de células para um determinado tempo.

Assim, estudaram-se diferentes cenários de modo a conseguir perceber as condições que melhor favorecem o crescimento celular das leveduras em estudo e a conseqüente obtenção de produto, à escala laboratorial. De seguida tentaram-se transportar os resultados conseguidos para uma escala de reator de bancada, embora os sistemas usados às diferentes escalas não fossem geometricamente semelhantes nem possuíssem o mesmo tipo de agitação.

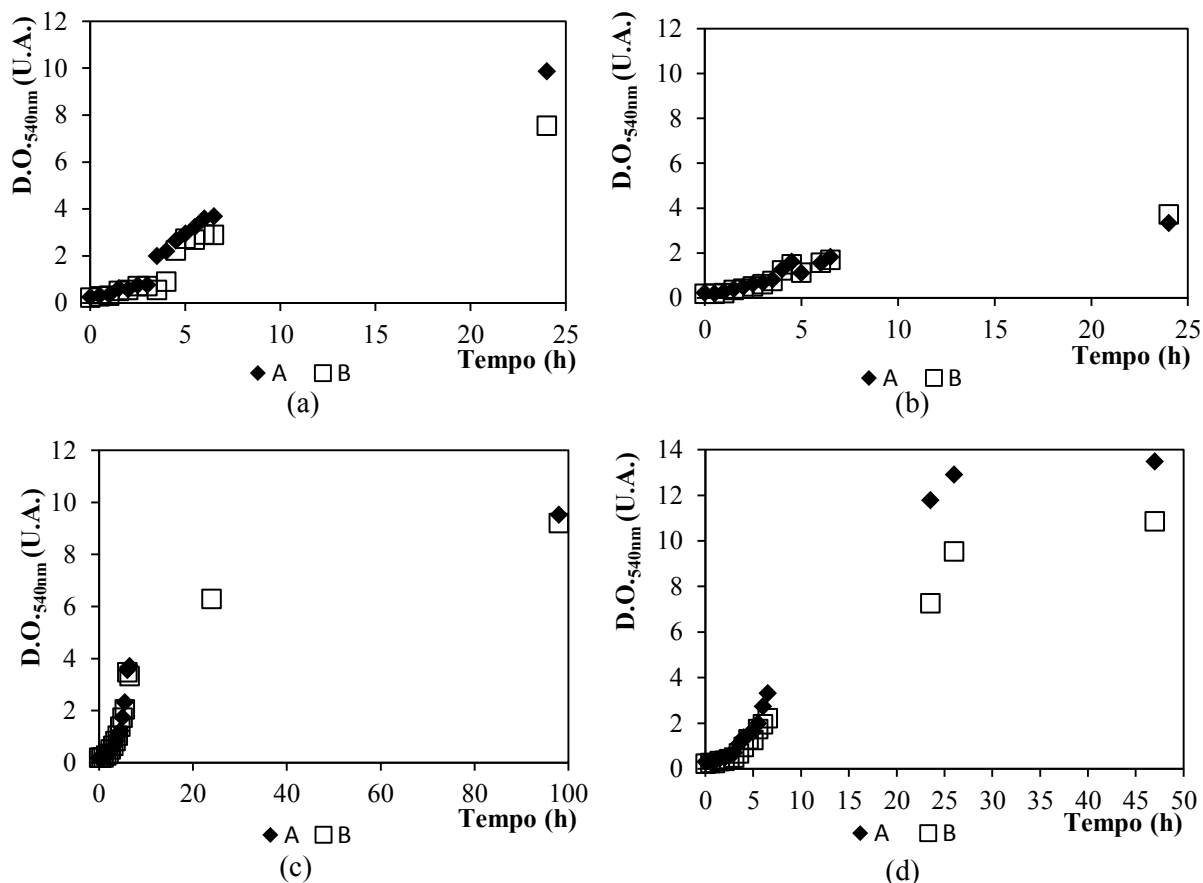
## 4.1 ENSAIOS À ESCALA LABORATORIAL

### 4.1.1 CURVAS DE CRESCIMENTO DE DIVERSAS LEVEDURAS

Os primeiros ensaios envolvidos neste trabalho tiveram como objetivo a análise do crescimento de quatro tipos de leveduras: a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, uma estirpe comercial (conservada na forma desidratada) de *Saccharomyces cerevisiae*, gentilmente oferecida por uma empresa vitivinícola da região, a *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 e a *Pichia stipitis* DSM 3651. Para tal fizeram-se ensaios (em duplicado, A e B) em Erlenmeyers de 250mL tapados com rolha de algodão, com 100mL de meio geral para leveduras, a 30°C e com agitação orbital a 150rpm, os quais originaram as curvas de crescimento da Figura 4.1. Nestes ensaios esterilizou-se previamente todo o material, bem como o meio de cultura utilizado. O volume de inóculo adicionado em cada um dos ensaios variou consoante a densidade ótica a ele associada. Assim, adicionaram-se 7, 4,7, 4 e 2mL a cada um dos ensaios, respetivamente. Os volumes de inóculo adicionados foram determinados de maneira a obter-se uma densidade ótica inicial de 0,20 unidades de absorvância (U.A.). Os inóculos foram preparados da mesma forma que os ensaios e deixados de um dia para o outro,

de modo a que a inoculação fosse feita aquando da fase exponencial de crescimento, tentando diminuir ao máximo a fase de adaptação em cada um dos ensaios.

A densidade óptica média obtida ao final de 24h variou de levedura para levedura. A *S. cerevisiae* comercial foi a que apresentou o menor valor (3,5U.A.) e a *P. stipitis* DSM 3651 a que obteve a maior concentração celular (9,5 U.A.), sendo que as restantes leveduras registaram 8,7U.A. (*S. cerevisiae* ATCC 26602) e 6,3U.A. (*K. marxianus* NCYC 1426).



**Figura 4.1** – Curvas de crescimento de cada uma das leveduras (obtidas a 540nm): (a) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602; (b) estirpe comercial de *Saccharomyces cerevisiae*; (c) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426; (d) *Pichia stipitis* DSM 3651.

Para efeitos de comparação entre leveduras foi averiguar-se a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de cada uma (ANEXO IV). A *K. marxianus* NCYC 1426 foi a que apresentou o maior valor de  $\mu$ , com  $0,54h^{-1}$ , seguida da *S. cerevisiae* ATCC 26602 ( $0,44h^{-1}$ ), da *P. stipitis* DSM 3651 ( $0,42h^{-1}$ ) e por fim da estirpe comercial de *S. cerevisiae* ( $0,37h^{-1}$ ).

Ao comparar os valores obtidos com os da Tabela 4.1, verifica-se que estão concordantes com a literatura.

Sabendo que o etanol é um produto importante da fermentação de açúcares por leveduras e que se trata de um metabolito primário, é de esperar que seja produzido à medida que as leveduras crescem, com um ligeiro desfasamento, por isso ele será mais rapidamente produzido quanto maior a taxa específica de crescimento (Van Hoek, *et al.*, 1998). Contudo a sua concentração ao final de um certo período de tempo será maior quanto maior for a concentração da fonte de carbono, neste caso glucose. Desse ponto de vista, segundo os resultados obtidos, prevê-se que a *K. marxianus* NCYC 1426 e a *S. cerevisiae* ATCC 26602

atinjam maiores velocidades de produção. Por outro lado a *S. cerevisiae* é frequentemente reportada como sendo uma das leveduras mais tolerantes ao etanol (Rosa e Sá-Correia 1992; Chi e Arneborg 2000), aspecto importante caso a perda de atividade ponha em causa a longevidade da produção e a obtenção de um produto mais concentrado.

**Tabela 4.1** – Taxas específicas máximas de crescimento, encontradas na literatura, para cada uma das leveduras.

Levedura	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Referência
<i>S. cerevisiae</i> VIN13	0,50	(Snoep, <i>et al.</i> 2009)
<i>S. cerevisiae</i> ITV-01	0,39-0,41 (consoante as proporções de glucose/xilose presentes no meio)	(Gutiérrez-Rivera, <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	0,37	(Lane & Morrissey, 2010)
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	0,44	(Este trabalho)
<i>S. cerevisiae</i> (estirpe comercial)	0,37	(Este trabalho)
<i>P. stipitis</i> NRRL Y-7124	0,25-0,38 (consoante as proporções de glucose/xilose presentes no meio)	(Gutiérrez-Rivera, <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. stipitis</i> DSM 3651	0,42	(Este trabalho)
<i>K. marxianus</i>	0,60	(Lane & Morrissey, 2010)
<i>K. marxianus</i> NCYC 1426	0,54	(Este trabalho)

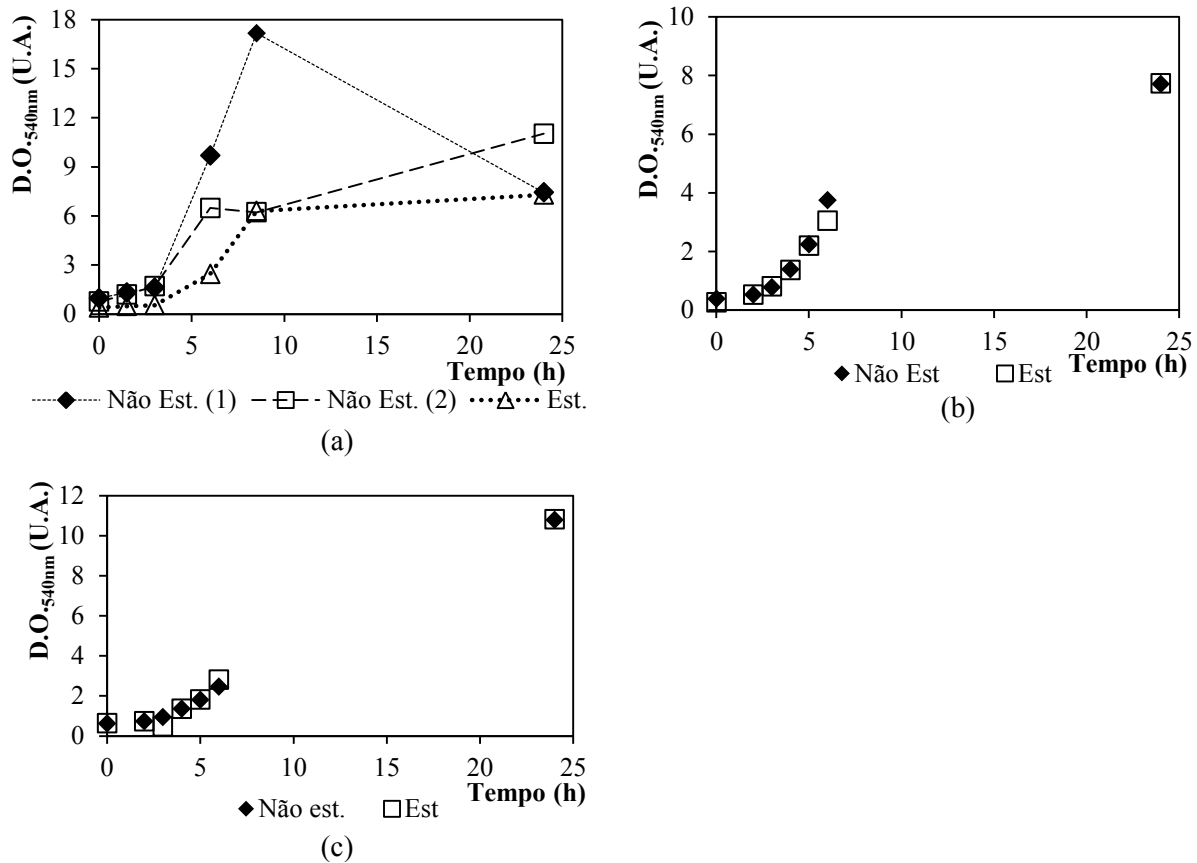
Uma vez determinada a dinâmica de crescimento para cada levedura foi em seguida estudar-se a influência de outros fatores, como por exemplo a necessidade de esterilização, o efeito do etanol e do oxigénio ou ainda a contribuição dos extratos (extrato de malte, extrato de levedura e peptona) para o crescimento.

Optou-se por utilizar meio geral para leveduras, preparado em laboratório, nestes e nos ensaios seguintes, de maneira a saber-se o mais possível acerca da composição do mesmo e do modo como as leveduras reagem aos compostos aí presentes. Só depois de verificar a influência de alguns fatores no crescimento celular é que se avançou para o uso de resíduos provenientes do processo de pasta e papel.

#### 4.1.2 INFLUÊNCIA DA ESTERILIZAÇÃO NA CURVA DE CRESCIMENTO

A esterilização é um fator muito importante, uma vez que contribui para a perda de valor nutritivo da matéria-prima, além de constituir um custo significativo, nomeadamente a nível energético. Como tal, é algo que, não sendo necessário, permite aumentar o potencial lucro do processo. Nesse sentido realizaram-se ensaios com a *S. cerevisiae* ATCC 26602, a *K. marxianus* NCYC 1426 e a *P. stipitis* DSM 3651 (Figura 4.2), de modo a perceber a influência da esterilização na curva de crescimento destas leveduras.

Estes ensaios foram realizados nas seguintes condições: em Erlenmeyers de 250mL tapados com rolha de algodão; a 30°C com agitação orbital a 150rpm; em 100mL de meio geral para leveduras (líquido) mais 5mL de inóculo, registando-se um pH inicial entre 6 e 6,5. Nos ensaios com esterilização levou-se todo o material utilizado a esterilizar em autoclave a 1atm e 120°C, durante 20min; nos ensaios sem esterilização apenas se esterilizaram as pipetas utilizadas para a recolha de amostras, realizadas à chama do bico de Bunsen.



**Figura 4.2** – Curvas de crescimento (obtidas a 540nm) para culturas esterilizadas e não esterilizadas: (a) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602; (b) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426; (c) *Pichia stipitis* DSM 3651.

A Figura 4.2 sugere que a esterilização é dispensável quando se tratam de ensaios realizados com a *K. marxianus* NCYC 1426 ou a *P. stipitis* DSM 3651. Para a *S. cerevisiae* ATCC 26602 o resultado obtido não mostrou de forma tão clara a não necessidade de esterilização, como para as outras leveduras.

Embora o ensaio “Não Est. (1)” mostre um valor, ao fim de 24h da inoculação, próximo do obtido no ensaio “Est.” o perfil obtido entre as 3 e as 8,5h contradi-lo. Por outras palavras, tendo em conta esse perfil seria de esperar que a densidade ótica às 24h fosse muito superior ao que realmente se registou, contudo em nenhum outro ensaio, relativo à *S. cerevisiae* ATCC 26602, se registou um perfil de crescimento tão abrupto. Como tal, põe-se a hipótese de algo estar errado: ou o perfil entre as 3 e as 8,5h ou o valor das 24h.

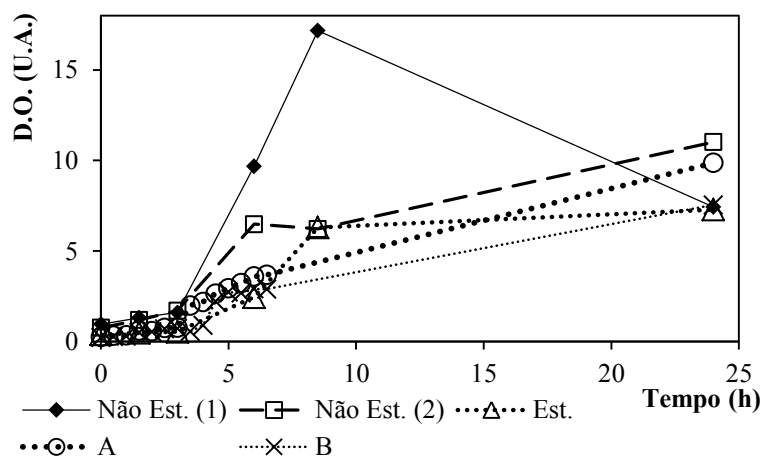
Supondo que o correto é o perfil entre as 3 e as 8,5h poder-se-á estar perante uma contaminação por bactérias, aquilo que se pretende evitar, e estas terem dado origem a concentrações celulares superiores às obtidas anteriormente, contudo essa hipótese é contrariada pelo facto de haver uma descida nos valores de D.O., o que leva a crer que é no perfil entre as 3 e as 8,5 que está o erro. No caso desse perfil estar errado, e o valor das 24h ser o real, admitir-se-á que a ter ocorrido contaminação esta foi desprezável e é possível manter culturas durante pelo menos 24h sem a necessidade de esterilização. Por outro lado, o ensaio não esterilizado “Não Est. (2)” apresenta um valor de D.O. às 24h ligeiramente superior aos restantes e contrariamente ao seu duplicado (“Não Est. (1)”) apresenta um perfil



de crescimento concordante com os dos ensaios esterilizados. Tal facto poderá significar que o passo de esterilização é desnecessário.

Para uma análise mais detalhada juntaram-se as curvas da Figura 4.1 (a) e da Figura 4.2 (a), que originaram o gráfico da Figura 4.3 e sumariaram-se na Tabela 4.2 os valores de D.O. em cada um dos ensaios para o tempo de 24h e a diferença das D.O. entre as 24h e as 0h, assim como as respetivas taxas específicas de crescimento, determinadas no ANEXO V.

Esta análise veio a acrescentar que: (i) em todos os ensaios,  $\mu$  está entre  $0,4h^{-1}$  e  $0,5h^{-1}$ , o que se encontra de acordo com a bibliografia consultada (Tabela 4.1); (ii) o perfil de crescimento é semelhante para todos os ensaios, à exceção do ensaio “Não Est. (1)”, o que revela uma boa reprodutibilidade dos ensaios; (iii) as diferenças entre a D.O. das 24h e das 0h para os ensaios esterilizados encontram-se entre 6,89 e 9,62U.A. e para os não esterilizados foram 6,47 e 10,25U.A., podendo-se admitir que uma eventual contaminação poderá ter um efeito pouco significativo no crescimento da levedura, a averiguar pelos intervalos de D.O. obtidos em ensaios esterilizados e não esterilizados.



**Figura 4.3** – Perfis de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 para ensaios não esterilizados (“Não Est. (1)” e “Não Est. (2)”) e ensaios esterilizados (“Est.”, “A” e “B”).

**Tabela 4.2** – Comparação dos valores de densidade ótica (D.O.) obtidos para a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 ao fim de 24h, da diferença entre a D.O. às 24h e às 0h e das taxas específicas de crescimento em todos os ensaios (esterilizados e não esterilizados) mencionados acima, para uma concentração de glucose inicial de aproximadamente 10g/L.

Ensaio	D.O. <sub>.540nm</sub> (U.A.)	(D.O. <sub>f</sub> -D.O. <sub>i</sub> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
Não Est. (1)	7,43	6,47	0,44
Não Est. (2)	11,02	10,25	0,44
Est.	7,29	6,89	0,45
A	9,87	9,61	0,43
B	7,55	7,32	0,47

### 4.1.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL DO MEIO NA CURVA DE CRESCIMENTO

Sabe-se que as células das leveduras sofrem inibição a partir de uma determinada concentração de etanol. Por esse motivo foi averiguar-se a influência de diferentes concentrações de etanol no crescimento de leveduras. Selecionou-se para esses testes a *S. cerevisiae* (estirpe ATCC 26602), por ser uma espécie mencionada em diversas fontes como tendo maior tolerância ao etanol, comparativamente a outras espécies de leveduras, como é o caso da *K. marxianus* e da *P. stipitis* (Rosa e Sá-Correia 1992; Gutiérrez-Rivera, *et al.* 2012), o que também é evidenciado pela Tabela 4.3. Esse aspeto aliado ao facto da *S. cerevisiae* ATCC 26602 ter apresentado o 2º valor mais alto de  $\mu$  ( $0,44h^{-1}$ ), nos estudos prévios de crescimento, e ter uma temperatura ótima entre os 25 e os 35°C (coincidente com as temperaturas típicas de fermentação, contrariamente à temperatura ótima de atuação da levedura com maior valor de  $\mu$  - a levedura termotolerante *K. marxianus* NCYC 1426 (Lane & Morrissey, 2010) ), fez com que fosse a escolhida para dar seguimento aos estudos de fermentação realizados ao longo deste trabalho. Como tal, daqui em diante apenas se terá em conta a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602, caso não se mencione nada em contrário.

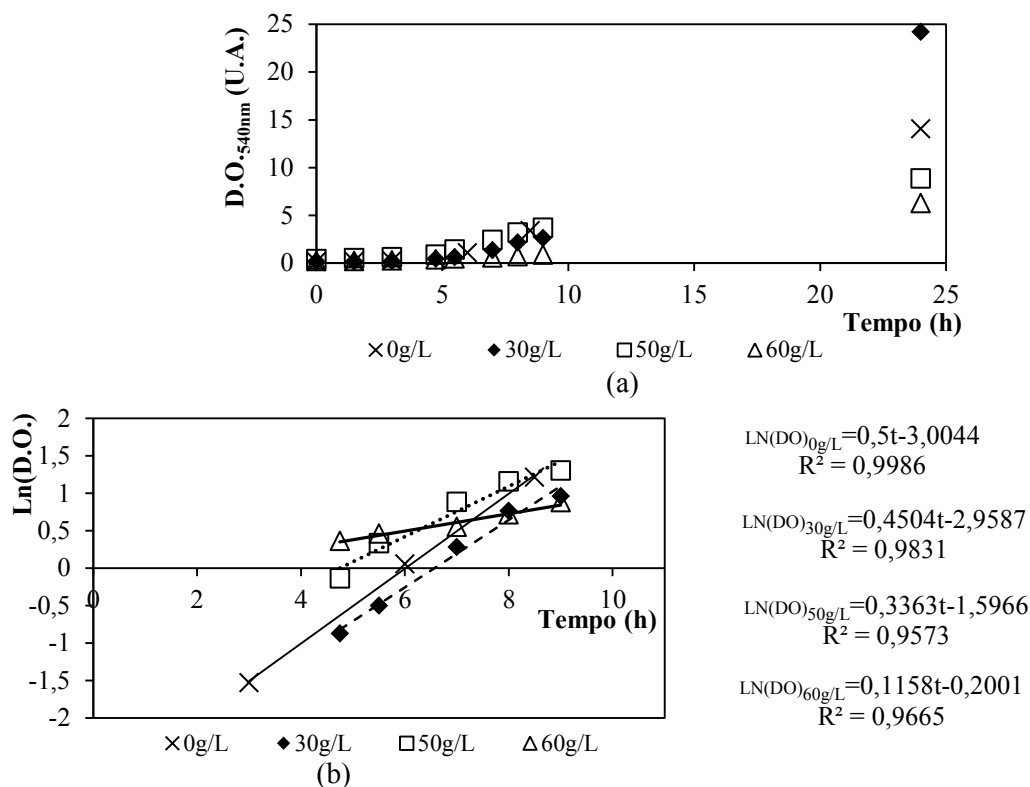
**Tabela 4.3** – Tolerância de cada uma das leveduras ao etanol.

Levedura	[Etanol] <sub>máx</sub> (g/L)	Referência
<i>S. cerevisiae</i> AS 3800	≈197,6	(Wang, <i>et al.</i> , 2007)
<i>S. cerevisiae</i>	≈63,2-79,1	(Rosa & Sá-Correia, 1992)
<i>K. marxianus</i> IGC 2671	≈39,5-55,3	(Rosa & Sá-Correia, 1992)
<i>P. stipitis</i> NRRL Y-7124	30-35	(Gutiérrez-Rivera, <i>et al.</i> , 2012)

Os testes de averiguação da influência do etanol no crescimento desta levedura foram levados a cabo em Erlenmeyers de 250mL tapados com rolha de algodão e com 100mL de meio geral para leveduras com concentração inicial de glucose de 20g/L. Após os materiais e o meio de cultura esterilizados, adicionaram-se 5mL de inóculo, mantendo a cultura a 30°C, com agitação orbital a 150rpm e um pH inicial de aproximadamente 6. A adição do etanol foi feita após 3h da inoculação de modo a obter-se 0, 30, 50 e 60g/L de etanol em cada Erlenmeyer, respetivamente. Em seguida traçou-se a curva de crescimento de cada um dos ensaios e calculou-se a respetiva taxa específica de crescimento, para efeitos de comparação (Figura 4.4).

A Figura 4.4 (a) e a Figura 4.5 evidenciam que 24h após a inoculação a concentração celular é menor quanto maior a concentração de etanol presente no meio, à exceção do ensaio sem adição de etanol, o que à partida se poderia justificar devido ao facto de haver alguma diferença nas D.O.'s iniciais, embora todos os ensaios tenham partido do mesmo inóculo. Contudo, outro aspeto que é ressaltado é o de D.O.'s iniciais relativamente próximas, como as dos ensaios com 0 e 30g/L, originarem D.O.'s ao final de 24h tão díspares. Seria de esperar que o resultado do ensaio com 30g/L ao fim de 24h se situasse entre 14 e 8U.A., tendo em conta não só o histórico desse ensaio como os valores dos ensaios adjacentes (com 0 e 50g/L de etanol) para o mesmo tempo. Repare-se que ao fim de 8,5h de crescimento no ensaio com

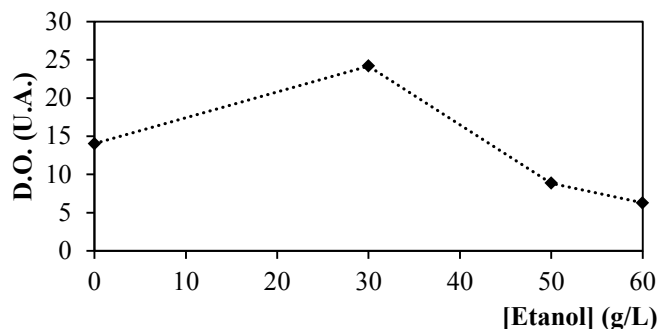
0g/L de etanol se registava uma D.O. de  $\approx 3,4$ U.A., enquanto no ensaio com 30g/L apenas se obtivera  $\approx 2,6$ U.A. ao fim de 9h, fazendo prever que o primeiro culminasse num valor superior ao segundo. Deste modo não será descabido sugerir a presença de um *outlier* no ensaio com 30g/L para o instante das 24h. O que, a ser verdade, pode excluir a hipótese do ensaio com 0g/L não ser concordante com o perfil decrescente das concentrações celulares às 24h para concentrações crescentes de etanol (Figura 4.5), como se mencionou acima.



**Figura 4.4** – Efeito do etanol no crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602: (a) Curvas de crescimento com adição de diferentes quantidades de etanol após 3h da inoculação; (b) linearização da fase exponencial de crescimento para a obtenção da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ).

Por outro lado, como se pode observar a partir da Figura 4.4 (b) quanto maior a concentração de etanol presente no meio menor é o  $\mu$ , resultado expectável tendo em conta que existe um limite de tolerância a esse composto. Ora se existe um limite acima do qual o microrganismo é inibido de se multiplicar e, conseqüentemente de produzir o que quer que seja, é compreensível que a sua capacidade de crescimento (e aqui crescimento é sinónimo de multiplicação) seja diminuída gradualmente até se atingir esse limite, como reportado por outros autores (Bajpai e Margaritis 1982; Mobini-Dehkordi, *et al.* 2007), o que tem como consequência o perfil decrescente de D.O.'s ao fim das 24h.

As concentrações de etanol utilizadas tiveram em conta as concentrações máximas teóricas de etanol que se podem atingir com os hidrolisados de lamas primárias, caracterizados na secção 3.4.3 assim como o histórico de ensaios já efetuados nos laboratórios onde se desenvolveu esta Tese.



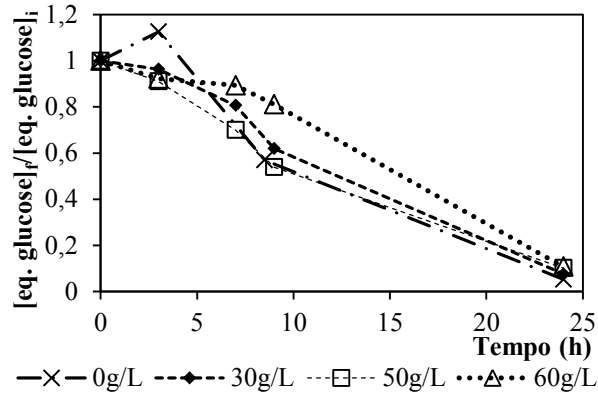
**Figura 4.5** – Perfil de D.O.'s, obtidas 24h após a inoculação, tendo em conta concentrações crescentes de etanol.

Apesar de nos diferentes ensaios a D.O. tender para valores bastante distintos, se se tiver em conta a presença de açúcares redutores no meio de cultura, ao longo tempo, (Figura 4.6) verifica-se que esta vai diminuindo, mas tende para um valor relativamente próximo em cada um dos ensaios. Esta observação faz crer que os açúcares redutores (fontes de carbono) estão a ser utilizados em mais do que uma via, por exemplo, a do crescimento celular e a do fabrico de determinados produtos. O instante em que isso é mais visível é precisamente às 24h, em que todas as culturas registam cerca de 10% da concentração equivalente de glucose ( $Eq_{Glu}$ ) no início. Por outras palavras, supondo que a quantidade de açúcares redutores utilizada para a formação de uma célula é igual em todos os ensaios, então, se não houvesse produção de mais nada, as 18g/L de glucose consumidas (os  $\approx 90\%$  dos açúcares redutores consumidos) que deram origem a  $\approx 14U.A.$  no ensaio com 0g/L (de etanol) não poderiam dar origem a apenas 6U.A. no ensaio com 60g/L!

Na verdade, já outros autores (Stanley, *et al.*, 2010) registaram o facto de as leveduras mais tolerantes ao etanol consumirem mais rapidamente a glucose que as menos tolerantes, o que pode estar relacionado com os resultados obtidos.

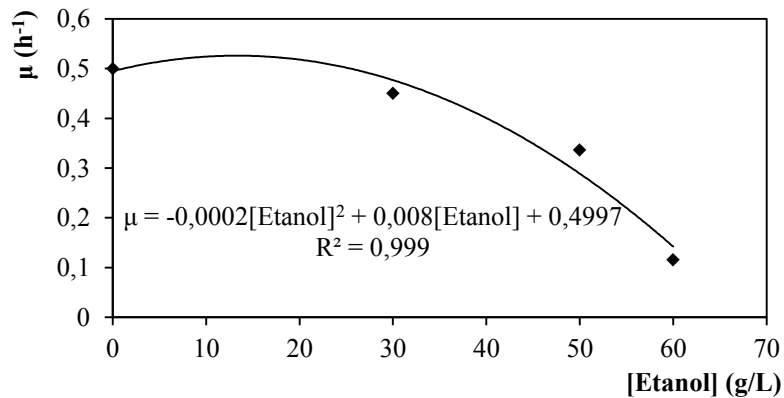
A literatura (Banat, *et al.*, 1998; Basso, *et al.*, 2011) mostra que o etanol altera profundamente a membrana celular das leveduras, provocando, entre outros aspetos, a alteração do grau de polaridade da membrana celular e do citoplasma, a diminuição do crescimento celular, a inativação de enzimas e o aumento da fluidez da membrana celular, relacionada com a sua composição lipídica, que conseqüentemente altera a sua permeabilidade a certos iões. Além disso, existe referência (Sharma, 1997) à formação de trealose, um dissacarídeo não redutor composto por duas unidades de glucose, associada à tolerância das leveduras ao etanol. Esse dissacarídeo é utilizado não só como uma reserva intracelular, mas também como agente protetor contra condições adversas, das quais se destaca a alta concentração em etanol.

Como tal, é possível que parte do consumo de glucose, nos ensaios com maior concentração de etanol, esteja a ser direcionado para a síntese de trealose, sendo essa a maneira que as leveduras encontraram para se tentarem adaptar à adversidade aí presente.



**Figura 4.6** – Fração de açúcares redutores ao longo do tempo, expressa em concentração  $Eq_{Glu}$  em cada instante relativamente à concentração  $Eq_{Glu}$  no início ( $[eq. glucose]_f/[eq. glucose]_i$ ). Dados obtidos para os ensaios com 0, 30, 50 e 60g/L de etanol. A curva de calibração utilizada para o cálculo das concentrações equivalentes de glucose encontra-se expressa no ANEXO II.

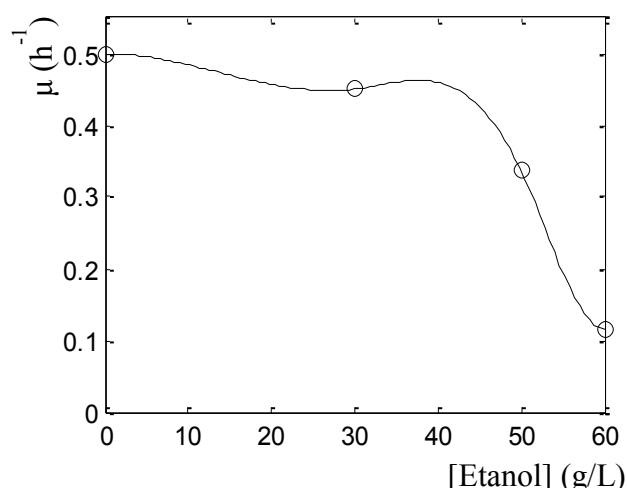
Outro aspeto importante a considerar é que, embora as concentrações celulares ao final de 24h tenham sido decrescentes para quantidades crescentes de etanol, não foi possível mostrar experimentalmente a partir de que concentração de etanol é que se promove a inibição completa do crescimento celular. Os dados obtidos apenas permitem saber que para uma concentração de 60g/L  $\mu$  é cerca de 23% do obtido sem qualquer adição de etanol e que a concentração celular final (ao fim de 24h) é cerca de 45% da obtida no ensaio com 0g/L de etanol.



**Figura 4.7** – Perfil de  $\mu$ 's tendo em conta a variação da concentração de etanol.

Ajustando um polinómio de segundo grau aos dados obtidos alcança-se a expressão da Figura 4.7, a qual tem como zeros -33,8 e 73,8. Sabendo que não faz sentido concentrações de etanol negativas conclui-se que, para esses dados, a taxa específica de crescimento igual a zero, ou seja, a inibição de crescimento, dar-se-ia quando  $[etanol]=73,8g/L$ . Todavia, a crer nos dados da Tabela 4.3 a inibição do crescimento só seria completa para concentrações de etanol muito acima dos 100g/L, concluindo-se que o ajuste da Figura 4.7 não está de acordo com o que realmente acontece, o que de resto é visível pela concavidade que se observa entre as 0 e as 30g/L de etanol. Como tal, optou-se pelo ajuste de interpolações cúbicas através da função intrínseca do MATLAB *spline*, que ajusta um polinómio de 3º grau a cada intervalo, não sendo possível obter uma expressão geral para a curva representada na Figura 4.8. No entanto, tendo em conta os dados experimentais e os dados da Tabela 4.3, prevê-se que a

partir dos 60g/L de etanol a variação do  $\mu$  seja muito ligeira até  $\approx 198\text{g/L}$  de etanol, concentração a partir da qual há a total inibição do crescimento, o que está de acordo com os perfis apresentados na literatura (Held, 2010). Apesar do ajuste da Figura 4.8 também não traduzir o que acontece na realidade, devido ao ligeiro aumento entre as 30 e as 50g/L de etanol, já sugere a existência de uma zona com menor variação de  $\mu$  a partir das 60g/L. Mediante este método não é possível adiantar valores de  $\mu$  para concentrações de etanol acima dos 60g/L, uma vez que não existem pontos para o ajuste do polinómio, sendo necessário recorrer a uma estratégia de extrapolação que, provavelmente, não traria informações adicionais fiáveis.



**Figura 4.8** – Representação da interpolação cúbica obtida pela função *spline* do MATLAB, para a taxa específica de crescimento em função da concentração de etanol.

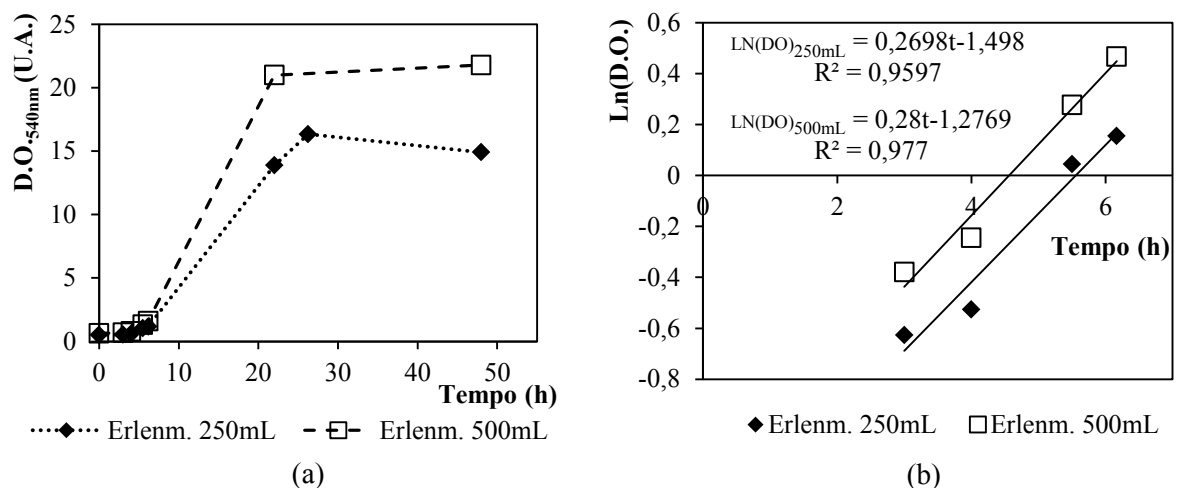
#### 4.1.4 INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE OXIGÉNIO FORNECIDO NA CURVA DE CRESCIMENTO E NOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO

A concentração de oxigénio dissolvida no meio de cultura é normalmente um fator crítico quando se trata do crescimento celular, uma vez que este é realizado em aerobiose (na presença de  $\text{O}_2$ ) e a solubilidade do oxigénio em meios aquosos é baixa (Daramola & Zampraka, 2008; Garcia-Ochoa & Gomez, 2009). Além disso, para que possa ser utilizado pelas células o oxigénio terá que ultrapassar várias resistências até chegar ao seu interior, local onde será usado para o crescimento celular, para a manutenção das células e consequente produção de metabolitos. A concentração de oxigénio dissolvido no meio de cultura depende não só da velocidade a que é consumido por parte das células, como da velocidade a que é transportado desde o meio líquido até ao interior das células e da velocidade de transferência da fase gasosa para a fase líquida (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009). Se se fizer variar a área interfacial por onde o  $\text{O}_2$  tem acesso à cultura, variar-se-á a quantidade de oxigénio transferido da fase gasosa para a fase líquida por unidade de tempo. Nesse caso, ao aumentar-se a área interfacial aumenta-se a quantidade de oxigénio dissolvido no meio, estando este mais facilmente disponível para ser consumido pelas células. Contudo, a produção de um dos principais metabolitos da *S. cerevisiae* – o etanol – é favorecida pela anaerobiose (a ausência de oxigénio) (Daramola & Zampraka, 2008), o que sugere a

existência de um compromisso entre a quantidade de oxigénio que deverá ser fornecida, para que o crescimento seja o adequado, e a máxima geração possível de produtos da fermentação.

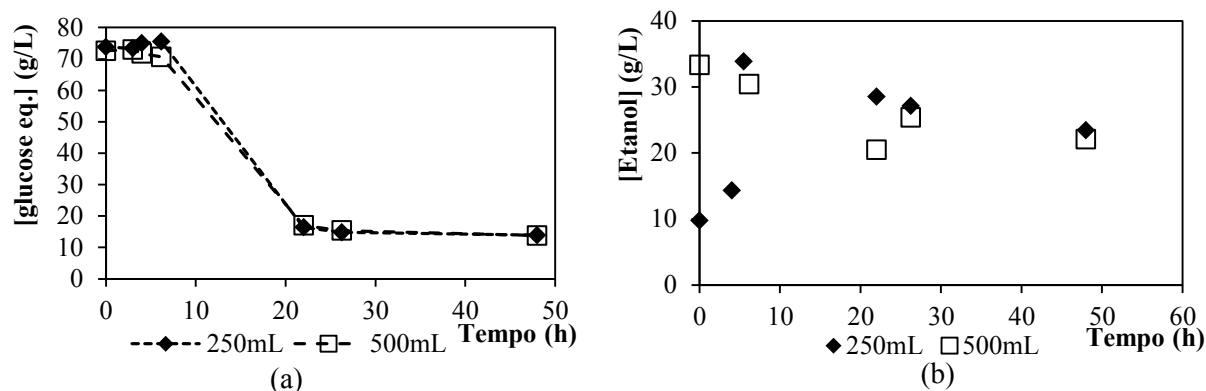
Os ensaios seguintes (Figura 4.9) pretendem estudar a influência que uma maior disponibilidade de oxigénio, conseqüente de uma maior área interfacial, tem sobre o crescimento. Para tal utilizaram-se dois tipos de Erlenmeyers, um de 250mL e outro de 500mL e prepararam-se volumes de 100mL de meio de cultura composto por um hidrolisado de lamas primárias gentilmente cedido pelo RAIZ com  $\approx 71\text{g/L}$  de equivalentes de glucose ( $\text{Eq}_{\text{Glu}}$ ) (calculado pelo método do DNS modificado, descrito no ANEXO I), no qual se dissolveram 3g/L de extrato de levedura, 3g/L de extrato de malte e 5g/L de peptona, sem qualquer esterilização prévia. O volume de inóculo adicionado, de *S. cerevisiae* ATCC 26602, foi 10mL e as condições de incubação foram: 30°C e agitação orbital a 150rpm, sendo que o pH se manteve entre os 4,9 e os 4,7 ao longo dos ensaios, devido à solução tampão (de pH 5) adicionada no RAIZ aquando da hidrólise enzimática, para o hidrolisado de lamas primárias “HLP1”.

A área interfacial obtida no Erlenmeyer de 250mL para este ensaio foi de  $\approx 50\text{cm}^2$  e no Erlenmeyer de 500mL foi de  $\approx 87\text{cm}^2$ .



**Figura 4.9** – (a) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 ( $\lambda=540\text{nm}$ ) obtida para um mesmo volume de meio de cultura, mas diferentes áreas superficiais ( $\approx 50\text{cm}^2$  no Erlenmeyer de 250mL e  $\approx 87\text{cm}^2$  no Erlenmeyer de 500mL), através das quais o  $\text{O}_2$  é fornecido à mistura; (b) respetivas linearizações das fases exponenciais de crescimento para obtenção de  $\mu$ .

As curvas de crescimento e os  $\mu$ 's obtidos são os apresentados na Figura 4.9, a partir da qual é possível confirmar a hipótese de que quanto maior a área interfacial maior o crescimento celular. A taxa específica de crescimento obtida com o Erlenmeyer de 500mL também foi ligeiramente superior à alcançada com o de 250mL, embora seja da mesma ordem de grandeza. Pode afirmar-se que um aumento na área interfacial em cerca de 74% (de 50 para  $87\text{cm}^2$ ) permitiu aumentar o crescimento celular em  $\approx 46\%$ , após 48h.



**Figura 4.10** – (a) Concentração de açúcares redutores ao longo do tempo expressa em concentração Eq<sub>Glu</sub>; (b) concentração de etanol ao longo do tempo.

Tal como se pode observar pela Figura 4.10 (a) a variação da concentração de açúcares redutores ao longo do tempo foi aproximadamente igual para os dois ensaios, embora a concentração celular tenha variado em cada ensaio. A justificação para esses resultados prende-se com o que já foi mencionado atrás acerca da utilização de açúcares redutores por diferentes vias. Como tal, foi averiguar-se a concentração de etanol ao longo do tempo (Figura 4.10 (b)), contudo verifica-se que os dados registados não fazem qualquer sentido, o que pode ser explicado pelo prolongado tempo de espera que antecedeu a injeção das amostras no HPLC. Apesar destas terem sido filtradas e guardadas no frigorífico até à sua injeção, os reagentes não consumidos e os produtos de reação podem ter sofrido alterações com a eventual presença de microrganismos ativos, ainda que a baixas temperaturas. Esta foi uma das maiores limitações identificadas ao longo deste trabalho. Deste modo, as elevadas concentrações em etanol apresentadas para os instantes iniciais não têm qualquer significado.

#### 4.1.5 INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE GLUCOSE FORNECIDA (FONTE DE CARBONO) NA CURVA DE CRESCIMENTO E NOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO

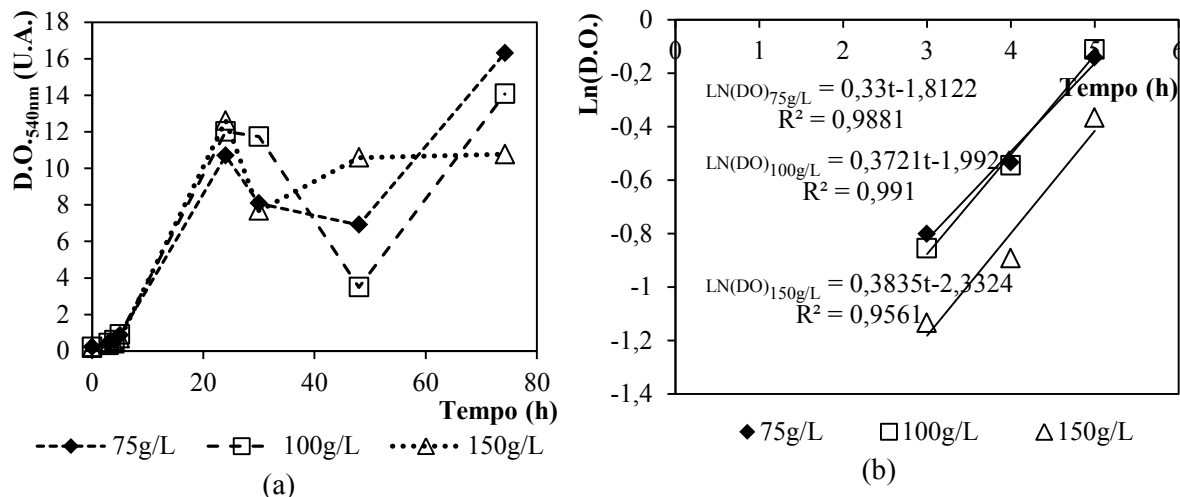
De maneira a perceber a influência da concentração da fonte de carbono no crescimento das leveduras, prepararam-se ensaios com três concentrações diferentes de glucose – 75, 100 e 150g/L – às quais se juntaram extrato de levedura, extrato de malte e peptona nas concentrações indicadas no meio geral para leveduras. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250mL, tapados com rolha de alumínio, de modo a limitar muito a entrada de oxigénio, nas seguintes condições: 100mL de meio cultura mais 7mL de inóculo de *S. cerevisiae* ATCC 26602; a 30°C; com agitação orbital a 150rpm e um pH inicial de ≈6. Os resultados alcançados são os da Figura 4.11.

Os inóculos, tal como nas experiências anteriores, foram preparados de acordo com as concentrações dos meios de cultura aos quais seriam adicionados e nas mesmas condições de temperatura e agitação.

Os resultados da Figura 4.11 (a) apresentam altos e baixos relativamente à D.O. ao longo do tempo, o que não parece fazer muito sentido, uma vez que se espera que a D.O. se mantenha aproximadamente constante ou eventualmente decrescente após a fase estacionária. Constante devido ao facto das células, mesmo que inviáveis, permaneçam na cultura e



contribuam de igual modo para os fenómenos de absorção, refração e reflexão da luz que lhes incide na análise espectrofotométrica, ou decrescente, caso haja deterioração das células após se tornarem inviáveis e/ou a sua maior capacidade de sedimentação à medida que envelhecem não permita que absorvam/refratem/reflitam a luz da mesma forma.

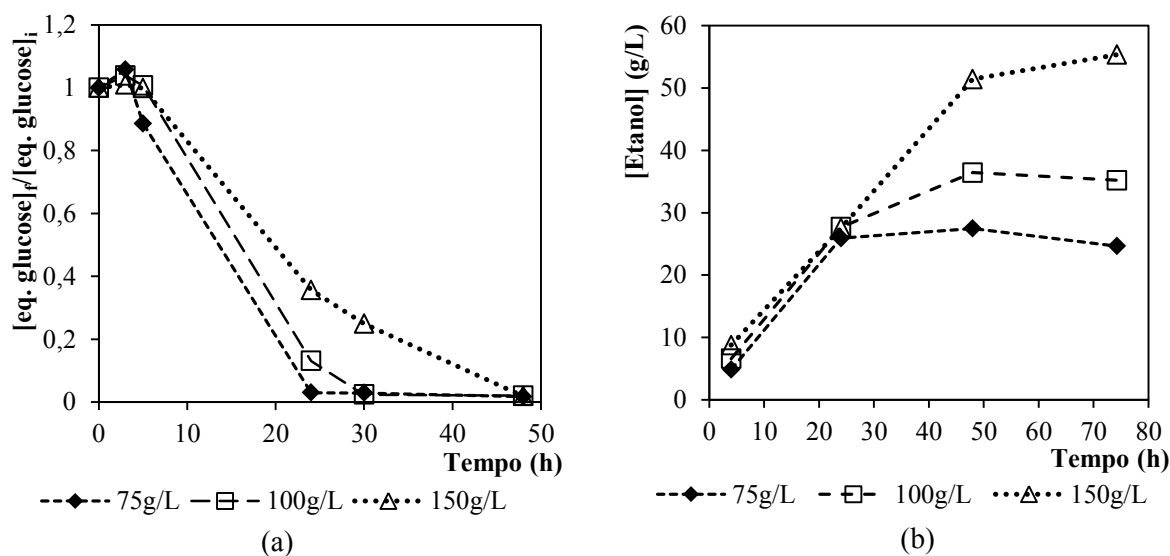


**Figura 4.11** – (a) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 para diferentes concentrações de glucose (75, 100 e 150g/L) e (b) respectivas linearizações da fase exponencial de crescimento para determinação de  $\mu$ .

Estes resultados podem ter sido originados precisamente pelo facto das células à medida que envelhecem terem tendência a formar agregados facilmente sedimentáveis, dificultando a mistura homogénea aquando da recolha das amostras. Este aspeto faz com que não seja possível garantir a homogeneidade da mistura, o que pode ter conduzido a falsos registos de D.O. para tempos de cultura mais prolongados.

Mesmo assim foi possível estabelecer uma relação entre o aumento da concentração da fonte de carbono e o comportamento celular. No ensaio com 75g/L de glucose inicial ( $Glu_i$ ) registou-se ao fim de 24h uma D.O. de 10,7U.A. enquanto nos ensaios com 100 e 150g/L de  $Glu_i$  se obtiveram 12,0 e 12,6U.A., respetivamente. Estes resultados mostram que quanto maior a concentração de glucose inicial no meio de cultura maior a concentração celular obtida, contudo não se pode descuidar o facto dos Erlenmeyers terem sido tapados com rolha de alumínio, o que pode ter condicionado o crescimento celular a partir das 100g/L de glucose. Por outras palavras pode-se ter dado o facto das células não terem crescido mais, com concentrações superiores de glucose, por lhes faltar oxigénio. Poder-se-ia ainda pôr o caso de concentrações acima de 100g/L de glucose começarem a contribuir para a inibição por substrato, contudo a Figura 4.11 (b) e os dados da literatura (que mostram uma tolerância até 200 a 300g/L de glucose (Lin & Tanaka, 2006)) parecem contrariar essa hipótese, visto terem-se obtido valores de  $\mu$  crescentes para concentrações crescentes de  $Glu_i$ . Por outro lado a Figura 4.12 (a) apresenta o consumo de açúcares redutores (maioritariamente glucose) ao longo do tempo, onde se verifica que para o ensaio com 75g/L de  $Glu_i$  estes se esgotam próximo das 24h, para o ensaio das 100g/L de  $Glu_i$  o esgotamento dá-se aproximadamente às 30h e para o de 150g/L de  $Glu_i$  às 48h, podendo-se concluir que quanto maior a concentração inicial de fonte de carbono mais tarde ela irá ser totalmente consumida pelas células. Estes

resultados sugerem que as leveduras tenham parado de se multiplicar no máximo às 24, 30 e 48h, respetivamente para os ensaios com 75, 100 e 150g/L de  $Glu_i$ . Outro fator que corrobora essa hipótese é a produção de etanol expressa na Figura 4.12 (b). Ora, se as células para além de se multiplicarem ainda utilizaram a glucose fornecida para a produção de etanol e outros metabolitos, nomeadamente glicerol com concentrações não além dos 3g/L, até que esta fosse totalmente esgotada, que outro substrato seria utilizado para o eventual crescimento celular representado na Figura 4.11 (a), após as 48h? Poder-se-ia ainda dar a hipótese das leveduras ou de uma eventual contaminação por bactérias estar a utilizar certos compostos não quantificados, presentes nos extratos, e vir a dar origem ao crescimento abrupto apresentado entre as 48 e as 74h, nos ensaios com 75 e 100g/L de  $Glu_i$ . Ou ainda as próprias células que entretanto já morreram estarem a servir de alimento às que ainda se encontram ativas.



**Figura 4.12** – (a) Fração de açúcares redutores ao longo do tempo, expressos em concentração  $Eq_{Glu}$  final sobre a concentração  $Eq_{Glu}$  inicial, para os ensaios com 75, 100 e 150g/L de glucose inicial; (b) concentração de etanol ao longo do tempo para os mesmos ensaios.

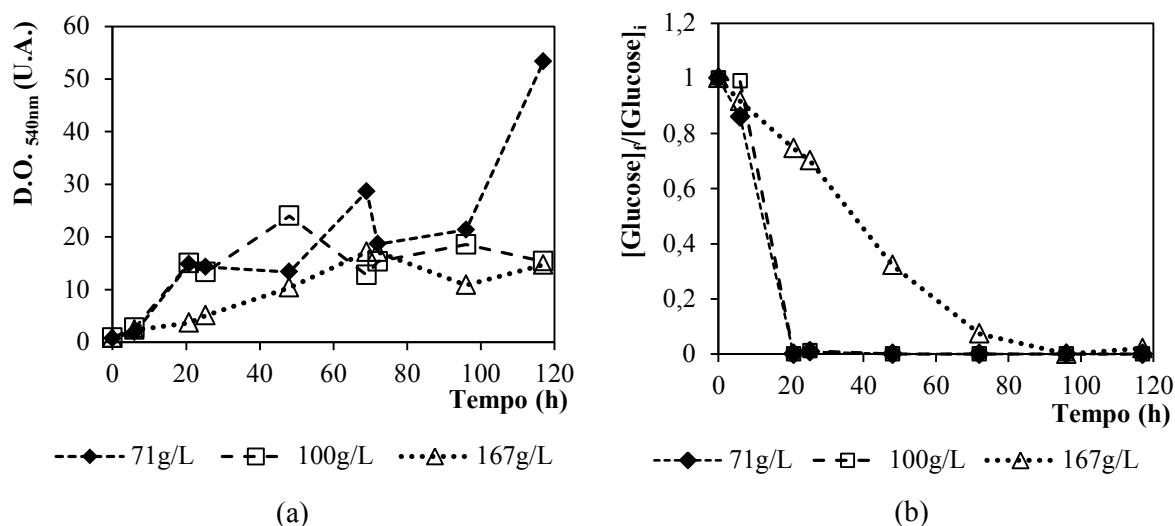
Conclui-se destes ensaios que quanto maior a concentração de glucose inicial maior a concentração de etanol obtida (Figura 4.12 (b)). As máximas concentrações de etanol, os rendimentos, as produtividades e o tempo para o qual foram atingidas encontram-se descritos na Tabela 4.4, mais adiante, sendo que o substrato deste conjunto de ensaios foi denominado de “substrato ‘sintético’ ”. Destaca-se ainda o facto das produtividades apresentadas não serem as máximas alcançadas. Nesse caso teriam que se parar as fermentações com 75 e 100g/L de  $Glu_i$  às 24h, obtendo-se produtividades de  $0,88g_{EtOH}/L.h$  em cada, e a fermentação com 150g/L de  $Glu_i$  às 48h com uma produtividade de  $0,89g_{EtOH}/L.h$ .

#### 4.1.6 UTILIZAÇÃO DE HIDROLISADOS DE LAMAS PRIMÁRIAS COMO FONTE DE CARBONO

Nos ensaios realizados com hidrolisados de lamas primárias não houve esterilização do meio nem dos Erlenmeyers, apenas se esterilizaram as pipetas utilizadas para a recolha das amostras, uma vez que a esterilização dos hidrolisados iria degradar os compostos aí presentes

e diminuir o valor nutritivo do meio de cultura. As fontes de azoto e de outros nutrientes foram dissolvidas no hidrolisado antes da inoculação.

De modo a estudar o efeito dos hidrolisados de lamas primárias no crescimento das leveduras, prepararam-se ensaios com três concentrações em açúcares redutores – ~71, ~100 e ~167g/L Eq<sub>Glu</sub> – às quais se juntaram extrato de levedura, extrato de malte e peptona com as mesmas concentrações do meio geral para leveduras, sendo que as concentrações de glucose apresentadas foram dependentes das concentrações obtidas após as hidrólises, feitas no RAIZ. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250mL, tapados com folha de alumínio, nas seguintes condições: 100mL de meio cultura mais 7mL de inóculo de *S. cerevisiae* ATCC 26602; a 30°C; com agitação orbital a 150rpm e um pH inicial de ~6. Obtiveram-se assim os resultados da Figura 4.13. Há que frisar que as concentrações de açúcares redutores apresentadas não distinguem os diferentes açúcares presentes nos hidrolisados, como tal foi necessário proceder a uma análise por HPLC para identificar e quantificar cada um em particular, uma vez que a *S. cerevisiae* é conhecida por não fermentar nem assimilar xilose (Van Maris, *et al.*, 2006), um dos açúcares redutores que contribui para as concentrações apresentadas. A caracterização mais detalhada pode ser encontrada na secção 3.4.3.



**Figura 4.13** – (a) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 para hidrolisados de lamas primárias com diferentes concentrações de açúcares; (b) fração de glucose ao longo do tempo, para cada ensaio, determinada a partir dos dados obtidos por HPLC.

Mais uma vez, através da Figura 4.13 (a), assiste-se a uma crescente D.O. após as 48h, muito acentuada no ensaio das 71g/L, enquanto nos ensaios com 100 e 167g/L Eq<sub>Glu</sub> se observa um perfil oscilatório. É possível, tal como já foi considerado atrás, que uma eventual contaminação por bactérias possa ter originado registos significativos de D.O. para tempos prolongados, agravada pelo facto destes ensaios não serem esterilizados. No entanto, sabe-se que grande parte das bactérias não extremófilas consegue crescer em pH's entre os 5,5 e os 9, embora mantenha o pH citoplasmático entre 7,4 e 7,8 (Padan, *et al.*, 2005), o que em alguns casos permite manter culturas de leveduras a crescer e a produzir metabolitos sem interferências significativas de bactérias, usando simplesmente pH's inferiores a 5, sem esterilização dos meios de cultura e dos materiais utilizados (Basso, *et al.*, 2011).

Visto que o pH pode ser um fator de importância para o controlo de contaminações, fizeram-se medições de pH ao longo do tempo com o intuito de conhecer a sua evolução, a

qual se apresenta na Figura 4.14. Como se pode observar o pH tem tendência a decrescer com o passar do tempo, resultado dos metabolitos produzidos pelas células, tais como o ácido acético, frequentemente mencionado na literatura (Torija, *et al.*, 2003; Van Maris, *et al.*, 2006).

Estes resultados estão em concordância com os perfis da Figura 4.13 (a), uma vez que o ensaio onde o pH menos decresceu foi precisamente aquele onde houve o aumento abrupto de D.O. após as 48h (o ensaio com 71g/L Eq<sub>Glu</sub>). Contudo, o aumento e as oscilações na D.O. podem dever-se a outros fatores que não a contaminação (visto o pH estar abaixo de 5), dos quais se destacam os erros associados ao método, desde a recolha da amostra até ao resultado da sua análise.

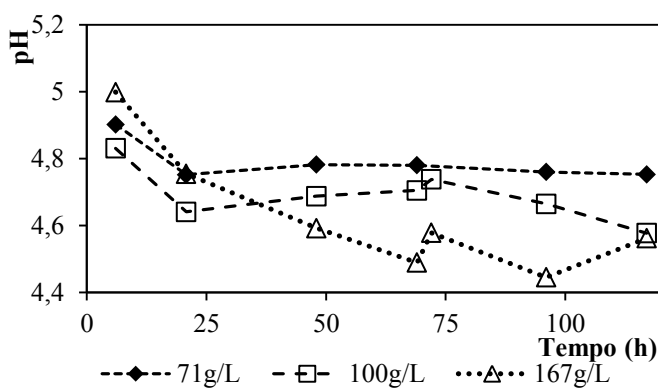


Figura 4.14 – Evolução do pH das culturas.

Além disso foram averiguados os produtos de reação obtidos, sendo que aquele que se destacou foi o etanol, tal como já se verificara anteriormente nos ensaios com adição de glucose. O segundo produto com maior concentração foi o glicerol (um subproduto), que não ultrapassou os 4,3g/L.

Como se verifica através da Figura 4.15 o ensaio com maior concentração de açúcares fermentáveis foi aquele que originou a maior concentração de etanol, como seria de esperar. A maior concentração obtida foi de  $\approx 44,5$ g/L às 72h para o ensaio com 167g/L de Eq<sub>Glu</sub> inicial. A Tabela 4.4 apresenta as concentrações máximas de etanol alcançadas, os rendimentos e as produtividades, bem como o tempo para o qual foram atingidas, sendo que o tipo de substrato utilizado nos ensaios com hidrolisados de lamas primárias foi denominado de “substrato ‘natural’ ”.

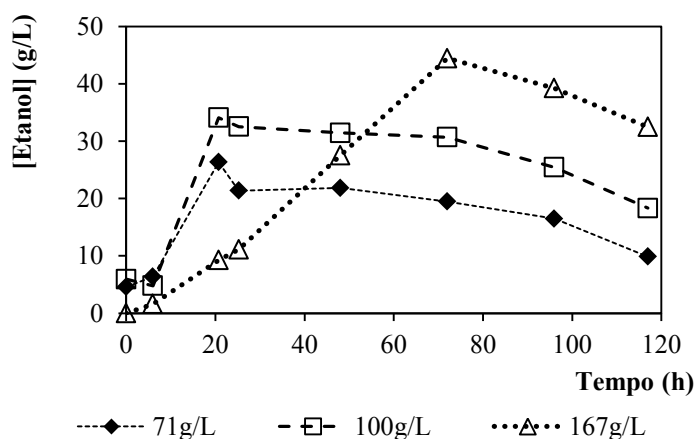


Figura 4.15 – Concentração de etanol ao longo do tempo para cada um dos ensaios.

**Tabela 4.4** – Concentração máxima de etanol alcançada, rendimentos e produtividades em etanol (obtidas para o instante de máxima concentração em etanol) e tempo para o qual foram calculados, em ensaios com adição de glucose (substrato ‘sintético’) e com hidrolisado de lamas primárias (substrato ‘natural’). A concentração de glucose inicial apresentada no ‘substrato sintético’ foi a adicionada aquando da preparação do meio de cultura e a do ‘substrato natural’ a determinada pelo método do DNS modificado (secção 3.4.3).

Tipo de substrato	[Glucose] <sub>i</sub> (g/L)	[Etanol] <sub>máx</sub> (g/L)	$\eta_{\text{EtOH}}$ (%)	Prod. <sub>EtOH</sub>	
				$\left(\frac{\text{g}_{\text{EtOH}}}{\text{L.h}}\right)$	t (h)
Substrato ‘sintético’	75	27,5	99,0	0,40	48
	100	36,4	80,0	0,62	48
	150	55,3	96,8	0,63	74
Substrato ‘natural’	71	26,3	109,3	1,05	21
	100	34,1	98,9	1,36	21
	167	44,5	79,6	0,62	72

Uma das limitações no cálculo dos valores da Tabela 4.4 foi o tempo de espera das amostras para a injeção no HPLC, resultando em valores de glucose abaixo do que seria esperado em alguns pontos, nomeadamente nos instantes iniciais, razão pela qual se obteve um valor de rendimento acima de 100%, assim como valores máximos de etanol longe dos máximos teóricos, mas correspondentes a rendimentos acima dos 90%.

Comparando os resultados obtidos com substrato ‘sintético’ e com substrato ‘natural’ conclui-se que as concentrações máximas de etanol atingidas foram da mesma ordem de grandeza para os ensaios com concentrações iniciais de glucose próximas, embora no ensaio com 167g/L de Glu<sub>i</sub> se esperasse obter uma concentração de etanol superior à registada, o que também se refletiu no rendimento alcançado. De modo geral observou-se uma produtividade superior em ensaios com substrato ‘natural’, resultado da diminuição do tempo necessário para atingir o pico na concentração de etanol, que melhorou consideravelmente. Esse facto permite afirmar que a eventual presença de compostos inibidores do crescimento nos hidrolisados de lamas primárias não é significativa, uma vez que os rendimentos obtidos foram muito próximos ou até superiores aos alcançados nos ensaios com substrato ‘sintético’, o que pode dever-se à sua complexidade, conseqüente da presença de compostos em pequenas concentrações, com eventual importância para o crescimento celular.

#### 4.1.7 INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS DE LEVEDURA, DE MALTE E DA PEPTONA NO CRESCIMENTO CELULAR

Sabe-se que os compostos utilizados normalmente no meio geral para leveduras como fonte de azoto e de outros nutrientes são bastante complexos, por isso fizeram-se ensaios com o objetivo de perceber qual a sua influência no crescimento das leveduras. Realizaram-se dois ensaios, um em que se utilizou meio geral para leveduras e outro com apenas extrato de levedura, extrato de malte e peptona, nas mesmas concentrações que o anterior. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250mL, tapados com rolha de algodão, com um volume de 100mL de meio de cultura. Todos os materiais e os meios de cultura foram previamente esterilizados. Em seguida adicionaram-se 10mL de inóculo, de *S. cerevisiae* ATCC 26602, mantendo a cultura a 30°C, com agitação orbital a 150rpm.

As curvas de crescimento obtidas estão apresentadas na Figura 4.16 (a), onde se observa que até às 52h o ensaio com o meio completo foi o que obteve a maior D.O., contudo às 93h registou-se um aumento significativo no ensaio apenas com extratos, que ultrapassou a D.O. obtida no ensaio com meio completo, o que poderá ter surgido devido a alguma contaminação ou pela simples razão das células que cresceram apenas nos extratos terem desenvolvido alguma capacidade para metabolizar compostos aí presentes, que num meio completo não metabolizariam ou apenas o fariam passado muito mais tempo. Pode ainda dar-se o caso de se estar perante um exemplo de crescimento diáuxico, ou seja, o composto que estava inicialmente a ser metabolizado ter-se esgotado e as células terem-se adaptado a uma nova fonte nutricional. Este ensaio não foi o único em que, a certo ponto, o meio apenas com extratos ultrapassou a D.O. de um ensaio com meio completo, nas mesmas condições. O ANEXO VI apresenta vários ensaios em que tal aconteceu, os quais se encontram sumariados na Tabela 4.5.

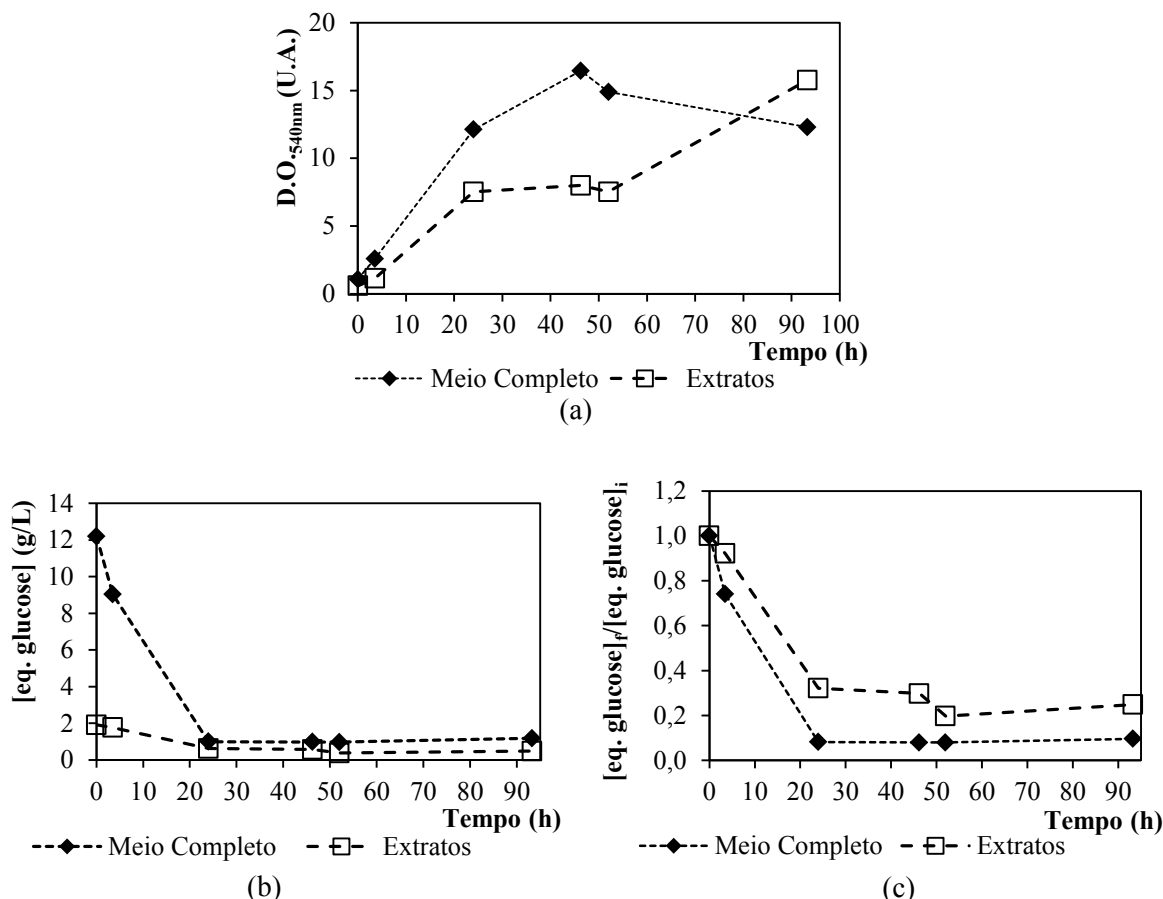
A Figura 4.16 (b) mostra de forma evidente a quantidade de açúcares redutores em cada um dos ensaios e a Figura 4.16 (c) mostra a sua fração ao longo do tempo. Como se pode observar, os açúcares redutores do meio completo decaíram mais rapidamente que os dos extratos, sendo a velocidade de consumo do primeiro, nas primeiras 24h,  $\approx 46,7\text{mg (h)}$  e no segundo  $\approx 5,4\text{mg (h)}$ . Para o ensaio com meio completo os açúcares redutores mantiveram-se aproximadamente constantes numa fração entre 0,08 e 0,10, valor que pode dizer respeito à maltose presente no extrato de malte, visto esta representar  $\geq 60\%$  do seu conteúdo (Sigma Aldrich, Malt extract, 2013). Segundo as equações (4.1) e (4.2) a maltose representa no mínimo 15% dos açúcares redutores totais (em meio completo), como tal a *S. cerevisiae*, que tem capacidade para metabolizar maltose, embora por um mecanismo mais complexo que o usado no consumo de glucose (Weusthuis, *et al.*, 1993), pode ter consumido os cerca de 5% em falta ( $\approx 60\text{mg}$  equivalentes de glucose). Para o caso do ensaio só com extratos verificou-se um teor de açúcares redutores residual na ordem dos 25%. Se se considerar que a totalidade dos açúcares redutores determinados nesse ensaio provém da maltose, a *S. cerevisiae* consumiu cerca de 144mg equivalentes de glucose dos 192mg equivalentes de glucose disponíveis.

Concentração de maltose mais a concentração de glucose:

$$3 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0,6 + 10 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 1,8 + 10 = 11,8 \frac{\text{g}}{\text{L}} \text{ de açúcares redutores} \quad (4.1)$$

Fração mínima de maltose em relação à totalidade de açúcares redutores:

$$\frac{1,8}{11,8} \times 100 = 15\% \quad (4.2)$$



**Figura 4.16** – (a) Curvas de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 para os ensaios com meio de cultura completo e apenas extratos; (b) evolução da concentração de açúcares redutores nos ensaios com meio completo e apenas com extratos; (c) fração da glucose presente no meio.

Através dos ensaios realizados apenas com extratos pode concluir-se que a *S. cerevisiae* teve capacidade para metabolizar maltose, contudo nos resultados obtidos por HPLC não se registou qualquer produção de etanol, embora a quantidade de maltose presente no meio tenha sido baixa. Por outro lado levantou-se a questão de poder haver crescimento diáxico e/ou a maltose levar mais tempo a ser metabolizada que a glucose, o que pode justificar os elevados valores de D.O. e a menor velocidade de consumo de açúcares redutores nesses ensaios. A Tabela 4.5 mostra comportamentos semelhantes para a estirpe comercial de *S. cerevisiae* e para a *P. stipitis*, embora nesta última não seja tão evidente.

**Tabela 4.5** – Registos da densidade ótica e da taxa específica de crescimento dos diferentes ensaios apenas com extratos e com meio completo ao final de 24h.

Nº	Tipo de Ensaio	Figura	Levedura	D.O. (às 24h) (U.A.)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
1	MC	Figura 4.16	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	12,1	-
2	Ext	Figura 4.16	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	7,5	-
3	Ext(1)	Figura VI.1	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	7,0	0,408
4	Ext(2)	Figura VI.1	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	5,7	0,460
5	MC	Figura VI.2	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	4,3	0,550
6	Ext(1)	Figura VI.2	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	8,2	0,334
7	Ext(2)	Figura VI.2	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	7,9	0,314
8	MC(1)	Figura VI.3	<i>S. cerevisiae</i> (estirpe comercial)	3,3	0,363
9	MC(2)	Figura VI.3	<i>S. cerevisiae</i> (estirpe comercial)	3,7	0,369
10	Ext	Figura VI.3	<i>S. cerevisiae</i> (estirpe comercial)	7,4	0,394
11	Ext(1)	Figura VI.4	<i>P. stipitis</i> DMS 3651	7,2	0,471
12	Ext(2)	Figura VI.4	<i>P. stipitis</i> DMS 3651	6,4	0,309
13	MC(1)	Figura 4.1	<i>P. stipitis</i> DMS 3651	11,8	0,419
14	MC(2)	Figura 4.1	<i>P. stipitis</i> DMS 3651	7,3	0,422

MC – meio completo, Ext – meio só com extratos, (1) (2) – ensaios em duplicado.

#### 4.1.8 UTILIZAÇÃO DE UM MEIO ALTERNATIVO AOS EXTRATOS COMO FONTES DE AZOTO E DE OUTROS NUTRIENTES

Uma vez que os extratos utilizados (extrato de levedura, extrato de malte e peptona) iriam representar um custo elevado aquando do aumento de escala, optaram por testar-se compostos alternativos (CA) que pudessem servir como fontes de azoto e de outros nutrientes, indispensáveis ao crescimento das células.

Vários autores descrevem meios de cultura para leveduras constituídos por compostos inorgânicos, tais como: sulfato de amónio, hidrogenofosfato de amónio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto de sódio, fosfato de potássio, etc. (Atkinson, 1983; George, *et al.* 1998; Stenberg, *et al.* 2000; Saghbini, *et al.* 2001). No sentido de substituir os compostos orgânicos usados anteriormente selecionou-se um dos meios de cultura descritos na literatura, com pequenas alterações (Tabela 4.6), e observaram-se os efeitos obtidos no crescimento da *S. cerevisiae* ATCC 26602.

**Tabela 4.6** – Descrição dos compostos alternativos (CA) utilizados no meio de cultura para leveduras (adaptado de Saghbini, *et al.* 2001).

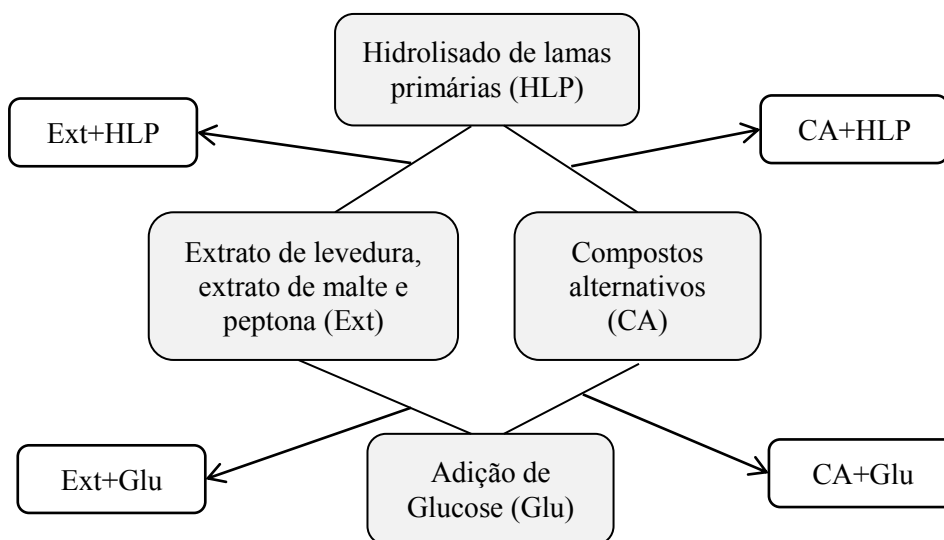
Nutrientes	Concentração (g/L)
<i>Fonte de azoto</i>	
Sulfato de amónio (Riedel-de Haën)	5
<i>Sais</i>	
Hidrogenofosfato de potássio anidro (Panreac)	1
Sulfato de magnésio heptahidratado (Fluka)	0,5
Cloreto de sódio (Panreac)	0,1
Cloreto de cálcio dihidratado (Sigma-Aldrich)	0,1

A Figura 4.18 representa as curvas de crescimento e as respetivas linearizações da fase exponencial de crescimento de quatro ensaios distintos: dois com compostos alternativos e dois com extrato de malte, extrato de levedura e peptona. O ensaio “CA+HLP” e o ensaio “CA+Glu” são constituídos pelos compostos alternativos (CA) da Tabela 4.6 dissolvidos em



100mL de hidrolisados de lamas primárias (HLP) com  $\approx 57\text{g/L}$  de glucose\* e em 100mL de tampão citrato (0,05M) com adição de 10g/L de glucose (Glu), respetivamente. O “Ext+HLP” e o “Ext+Glu” são compostos por extrato de levedura, extrato de malte e peptona (Ext) dissolvidos em 100mL dos mesmos hidrolisados de lamas primárias (HLP) mencionados acima e em 100mL de água destilada com adição de 10g/L de glucose (Glu), respetivamente. Note-se que este último é o meio geral para leveduras, anteriormente descrito.

A Figura 4.17 representa as combinações de compostos feitas em cada um dos ensaios.



**Figura 4.17** – Esquema representativo das combinações de compostos feitas nos ensaios descritos acima.

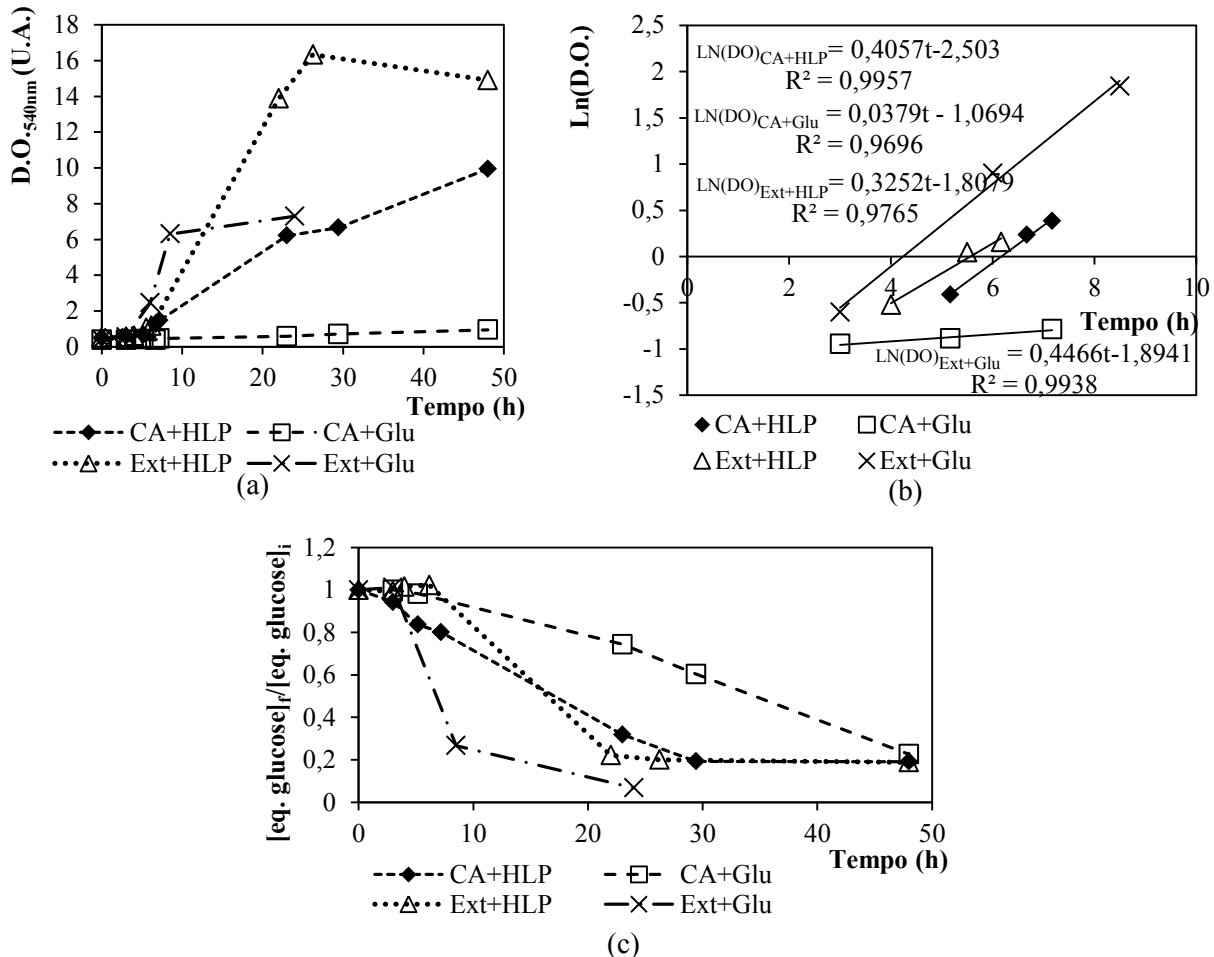
Adicionaram-se 10mL de inóculo (5mL no ensaio “Ext+Glu”), de *S. cerevisiae* ATCC 26602 a cada ensaio, nas respetivas condições do ensaio, e a incubação foi feita em Erlenmeyers de 250mL, tapados com rolha de algodão, a 30°C, com velocidade orbital a 150rpm. Não houve esterilização em nenhum dos ensaios, à exceção do ensaio “Ext+Glu”.

Assim, existem dois ensaios constituídos por compostos alternativos e dois ensaios constituídos pelos extratos habitualmente utilizados em laboratório. Dos ensaios com compostos alternativos um tem hidrolisado de lamas primárias e o outro tem adição de glucose. Nos ensaios com extratos (extrato de levedura, extrato de malte e peptona), acontece o mesmo, um deles tem hidrolisado de lamas primárias e o outro glucose adicionada. A concentração de glucose nos ensaios com hidrolisados de lamas primárias é a mesma, uma vez que o hidrolisado utilizado é o mesmo. Nos ensaios com glucose adicionada a concentração também é idêntica, 10g/L. Em suma, nos quatro ensaios referidos existem dois ensaios compostos pelo hidrolisado de lamas primárias com  $\approx 57\text{g/L}$  de glucose e dois ensaios com 10g/L de glucose adicionada. Deste modo, torna-se possível comparar os resultados obtidos tendo em conta a mesma fonte de carbono, mas diferentes fontes de azoto e de outros nutrientes. Para o caso de ensaios com hidrolisado de lamas primárias a comparação será entre o “CA+HLP” e o “Ext+HLP” e para o caso de ensaios com glucose adicionada será entre o “CA+Glu” e o “Ext+Glu”.

Comparando os ensaios “CA+HLP” e “Ext+HLP”, que apenas diferem nas fontes de azoto e de outros nutrientes, nota-se que o ensaio “Ext+HLP”, constituído por compostos

\* Concentração determinada por HPLC

orgânicos, apresentou um crescimento bastante superior. Uma das razões para este acontecimento poderá ser precisamente a natureza dos nutrientes fornecidos e a riqueza em aminoácidos e outros compostos, precursores de moléculas fisiologicamente importantes. Segundo a literatura o extrato de levedura é uma importante fonte de azoto com efeitos protetores no crescimento, na fermentação e na viabilidade celular, estimulando a fermentação e a produção de etanol (Khongsay, *et al.*, 2012).



**Figura 4.18** – (a) Curvas de crescimento da *S. cerevisiae* ATCC 26602 para os ensaios “CA+HLP”, “CA+Glu”, “Ext+HLP” e “Ext+Glu”; (b) linearização da fase exponencial de cada ensaio, para obtenção dos  $\mu$ 's e (c) evolução da concentração de açúcares redutores para cada ensaio.

Embora o crescimento em “Ext+HLP” tenha sido maior que em “CA+HLP”, o ensaio “CA+HLP” apresentou um  $\mu$  superior ao do “Ext+HLP” (Figura 4.18 (b)), o que poderá querer dizer que, numa fase inicial, é mais rápido metabolizar estes compostos inorgânicos que os compostos orgânicos. Por outras palavras, a adaptação a estes compostos pode ser mais rápida que aos outros, visto aqueles serem mais complexos. Contudo, para tempos mais avançados o meio com extratos consegue aumentar a velocidade de crescimento e ultrapassar a do ensaio “CA+HLP”, o que se reflete no consumo de açúcares redutores, tal como se observa pela Figura 4.18 (a) e (c).

Pela comparação dos ensaios “CA+Glu” e “Ext+Glu”, os quais também diferem nas fontes de azoto e de outros nutrientes, nota-se uma diferença ainda maior. Além da natureza dos compostos utilizados, pode ainda estar em causa o rácio Carbono/Azoto (C/N), o qual

pode desempenhar um papel importante para meios com compostos inorgânicos. A diferença abrupta entre os ensaios “CA+HLP” e “CA+Glu” pode ser a prova disso mesmo, uma vez que estes ensaios apenas variam na concentração de glucose presente no meio ( $\approx 57\text{g/L}$  para o “CA+HLP” e  $10\text{g/L}$  para o “CA+Glu”), embora no “CA+HLP” a glucose provenha de um hidrolisado de lamas primárias e no “CA+Glu” ela seja adicionada na forma sólida. Apesar de no ensaio “Ext+Glu” se ter adicionado apenas 5mL de inóculo em vez dos 10mL adicionados nos outros ensaios pensa-se que a diferença no resultado não seja significativa.

De modo a perceber-se melhor o efeito do rácio C/N é feita uma análise mais profunda na secção 4.1.9.

Além dos ensaios anteriores efetuaram-se os ensaios da Figura 4.19 (a) e (b). Os ensaios com índice D (‘destapados’) foram realizados apenas com rolha de algodão e os ensaios com índice T além da rolha de algodão foram ‘tapados’ com rolha de papel de alumínio, de forma a limitar a entrada de oxigénio. Os ensaios “CA+HLP<sub>D/T</sub>” e os ensaios “Ext+HLP<sub>D/T</sub>” foram realizados com hidrolisados de lamas primárias constituídos por  $\approx 106\text{g/L}$  de glucose\* e os “Ext+HPB<sub>D/T</sub>” foram efetuados com hidrolisados de pasta branqueada compostos por  $114\text{g/L}$  de glucose\*. Os primeiros foram obtidos dissolvendo os compostos alternativos da Tabela 4.6 no hidrolisado de lamas primárias, os segundos e os terceiros foram obtidos dissolvendo os extratos e a peptona no hidrolisado de lamas primárias e de pasta branqueada, respetivamente, de modo a terem as mesmas concentrações do meio geral para leveduras. O volume de inóculo foi 10mL para todos os ensaios, o volume de meio 100mL e as condições de incubação foram  $30^\circ\text{C}$ , com agitação orbital a 150rpm. Os ensaios da Figura 4.19 (a) são os ‘destapados’ e os da Figura 4.19 (b) os ‘tapados’.

Das matérias-primas aqui utilizadas a pasta branqueada (previamente hidrolisada antes da fermentação) é aquela que sai mais a montante no processo de produção de pasta e a que não representa propriamente um resíduo, ao contrário da lama primária, estando mais livre de compostos potencialmente inibidores do crescimento. Como tal, daqui em diante, o hidrolisado de pasta branqueada será tido como referência nos ensaios em que se utilizarem hidrolisados, considerando também a possibilidade de se poder comparar o resultado dos dois tipos de ensaios (com hidrolisados de lamas primárias e pasta branqueada) por estes terem uma concentração inicial de glucose muito próxima (diferindo apenas em  $8\text{g/L}$ ).

Os resultados obtidos não estão de acordo com o que seria esperado, uma vez que o crescimento celular, como se mostrou atrás, é favorecido pela presença de oxigénio, no entanto se se analisar os dados da Figura 4.20, percebe-se que o etanol produzido no ensaio “Ext+HPB<sub>T</sub>” foi superior ao obtido no outro ensaio (“Ext+HPB<sub>D</sub>”), o que corrobora a afirmação de que a ausência de oxigénio promove a formação de etanol. Por outro lado a Figura 4.19 (a) mostra que para o ensaio “Ext+HLP<sub>D</sub>” se observou um crescimento superior ao obtido no ensaio de referência e o contrário se verificou para o “CA+HLP<sub>D</sub>”, fazendo crer que o primeiro representa um maior potencial no crescimento celular do que o realizado com a matéria-prima mais livre de resíduos e que no segundo (“CA+HLP<sub>D</sub>”), eventualmente por ser constituído por nutrientes de natureza inorgânica, pode ter-se dificultado o metabolismo celular.

---

\* Concentração determinada por HPLC

Na Figura 4.19 (b) já se assistiu a uma maior proximidade nos resultados do “Ext+HLP<sub>T</sub>” e do “Ext+HPB<sub>T</sub>”, o que faz sentido, visto partilharem da utilização de extratos e peptona como fontes de azoto e de outros nutrientes.

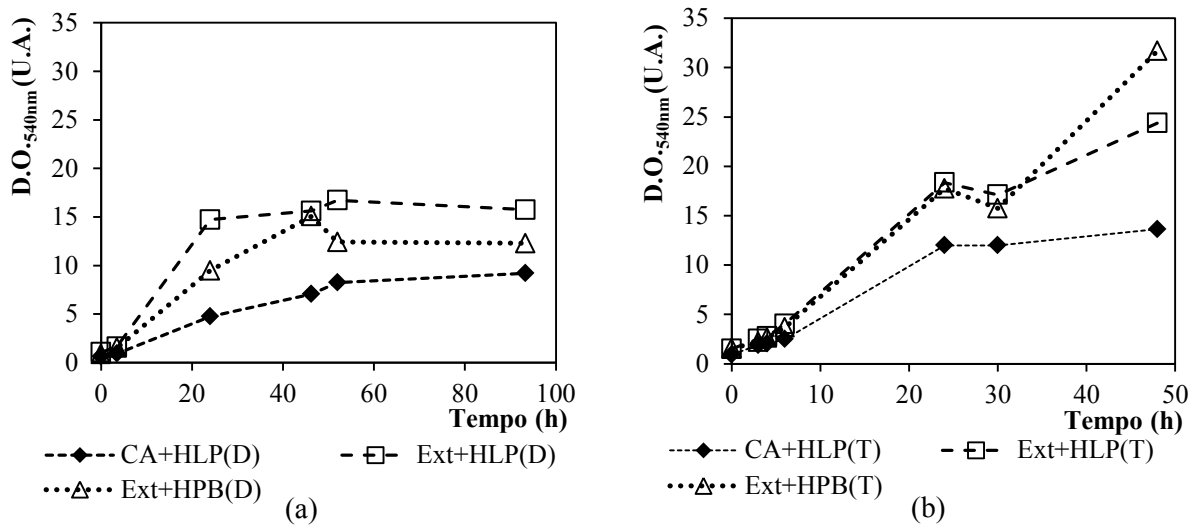


Figura 4.19 – (a) Curvas de crescimento obtidas com Erlenmeyers tapados apenas com rolha de algodão e (b) tapados com rolha de algodão e papel de alumínio.

Relativamente à Figura 4.20 observam-se resultados surpreendentes, uma vez que se conseguiram obter concentrações de etanol muito próximas nos ensaios “CA+HLP<sub>D/T</sub>” e “Ext+HLP<sub>D/T</sub>”, especialmente em (b), o que prova que independentemente da natureza das fontes de azoto, igual concentração da fonte de carbono permite obter concentrações próximas de etanol. Neste caso a concentração de etanol em “Ext+HPB<sub>T</sub>” foi muito superior, o que pode dever-se precisamente ao facto de ser uma matéria-prima mais livre de substâncias potencialmente inibidoras do crescimento. Esse tipo de matéria-prima aliada às condições de incubação (com mais limitação de oxigénio) pode ter sido a causa do aumento na concentração de produto, quando comparados os ensaios com e sem rolha de papel de alumínio.

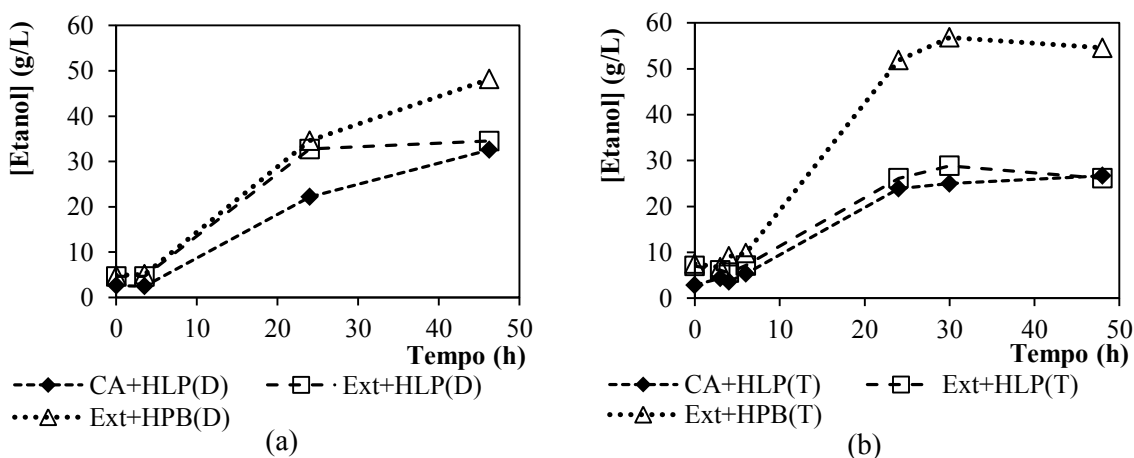
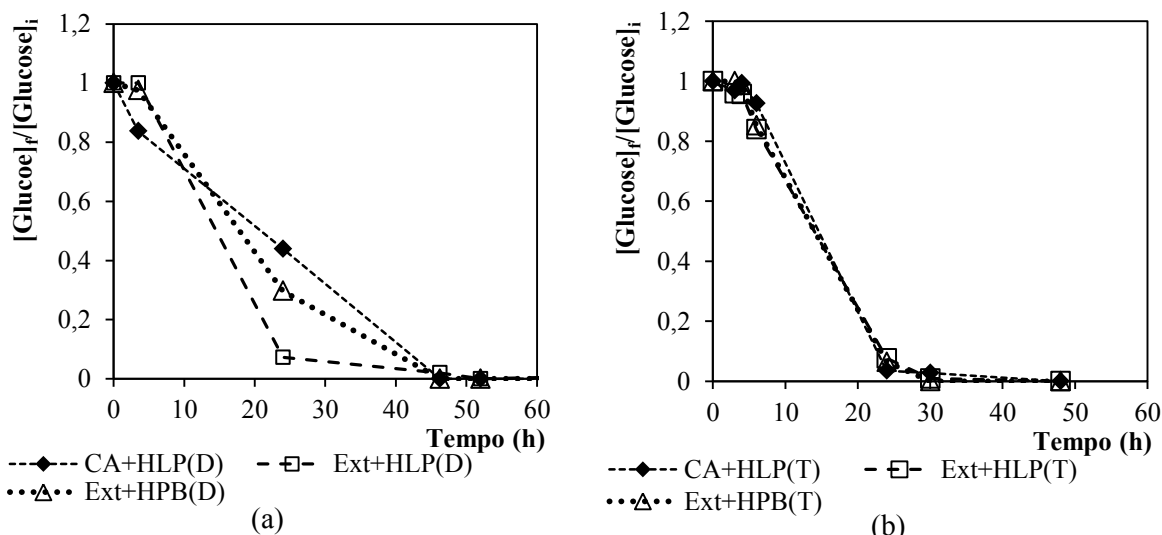


Figura 4.20 – Concentração de etanol ao longo do tempo nos ensaios (a) apenas tapados com rolha de algodão e (b) tapados com rolha de algodão e com folha de alumínio.

Outro aspecto interessante nestes ensaios é que, quando os Erlenmeyers estão apenas com rolha de algodão, o consumo de glucose é, de modo geral, mais lento do que quando têm a folha de alumínio por cima (Figura 4.21), o que pode significar que usar glucose tanto para a via da multiplicação celular como para a da produção de etanol (Figura 4.21 (b)) a faz esgotar-se mais rapidamente do que quando é usada maioritariamente para o crescimento celular (Figura 4.21 (a)).



**Figura 4.21** – Concentração de glucose (determinada por HPLC) ao longo do tempo: (a) para ensaios apenas com rolha de algodão e (b) com rolha de algodão e tampa de papel de alumínio por cima.

Em seguida Tabela 4.7 apresenta as máximas concentrações em etanol alcançadas, os rendimentos e as produtividades de cada um dos ensaios, tendo em conta o instante em que a concentração de etanol atingiu o seu máximo. Porém, tal não significa que a produtividade máxima tivesse sido atingida nessa altura, por isso determinou-se, para cada ensaio, o instante correspondente à máxima produtividade. O que se concluiu foi que em todos os ensaios o máximo foi atingido às 24h, com os valores representados na última coluna da Tabela 4.7. Neste caso, é muito importante maximizar a concentração de etanol, visto que os hidrolisados das lamas primárias apresentam um teor de glucose não muito elevado. No caso de essa concentração ser alta e alcançar-se uma elevada eficiência, poderia tornar-se preferível terminar os ensaios no instante de máxima produtividade, a não ser que a concentração a mais obtida fosse determinante, por exemplo, para uma operação de separação entre o etanol e os restantes componentes a jusante do fermentador. Nesse caso teria que fazer-se uma análise mais profunda a fim de perceber o cenário mais vantajoso.

**Tabela 4.7** – Máxima concentração de etanol obtida, rendimentos e produtividades em etanol (obtidos no instante de máxima concentração de produto) e tempo para o qual foram calculados e ainda a máxima produtividade em etanol obtida, para os ensaios com e sem tampa de papel de alumínio.

Ensaio		$[\text{Etanol}]_{\text{máx}}$ (g/L)	$\eta_{\text{EtOH}}$ (%)	$\text{Prod.}_{\text{EtOH}}$ $\left(\frac{\text{g}_{\text{EtOH}}}{\text{L.h}}\right)$	t (h)	$\text{Prod.}_{\text{EtOH máx.}}$ $\left(\frac{\text{g}_{\text{EtOH}}}{\text{L.h}}\right)$
Destapados	CA+HLP <sub>D</sub>	33,1	79,7	0,59	52	0,81
	Ext+HLP <sub>D</sub>	34,5	89,4	0,65	46	1,17
	Ext+HPB <sub>D</sub>	48,2	84,8	0,94	46	1,24
Tapados	CA+HLP <sub>T</sub>	26,7	91,9	0,50	48	0,88
	Ext+HLP <sub>T</sub>	28,8	91,1	0,78	30	0,86
	Ext+HPB <sub>T</sub>	56,8	104,8	1,67	30	1,88

Tal como já fora referido os registos da Tabela 4.7 podem ter sofrido algumas alterações durante a espera para a injeção no HPLC, resultando em valores ligeiramente diferentes dos obtidos caso a injeção tivesse sido feita imediatamente após a amostragem. Só assim se explica que o valor de  $\eta_{\text{EtOH}}$  para o “Ext+HPB<sub>T</sub>” tenha excedido os 100%, porém é natural que o rendimento em etanol se situe na ordem dos 80-90%, uma vez que a determinação de açúcares redutores foi concordante com os dados da Figura 4.21, obtidos por HPLC.

#### 4.1.9 RÁCIO CARBONO/AZOTO (C/N)

Nos primeiros ensaios realizados com compostos alternativos utilizou-se uma concentração de glucose de 10g/L, não permitindo obter valores de D.O. além de 1U.A., como tal colocou-se a hipótese do rácio carbono/azoto (C/N) ser um parâmetro importante.

De forma geral, há uma proporção definida de azoto que é exigida pelos microrganismos para a degradação da fonte de carbono, que é maior para os fungos do que para as bactérias. Para os primeiros a razão C/N ronda os 30:1 e para os segundos 10:1, fazendo com que os fungos tenham maior capacidade para degradar material de natureza lenhocelulósica, por terem menor dependência de azoto que as bactérias (Kumar, *et al.*, 2009). Contudo, é possível encontrar na literatura diversas proporções, como as apresentadas na Tabela 4.8.

Põe-se hipótese dos resultados obtidos, para o crescimento celular, dos ensaios “CA+HLP<sub>D/T</sub>” e “Ext+HLP<sub>D/T</sub>” não estarem de acordo com o que seria esperado, devido ao rácio C/N não ser o mais adequado, precisamente por não ter sido considerado aquando da preparação dos respetivos meios de cultura. Porém, a partir dos registos efetuados não foi possível relacionar em pleno a influência do rácio C/N no crescimento celular, para este caso em concreto, embora os dados de cada ensaio tenham sido calculados (Tabela 4.10), tendo em conta os dados da Tabela 4.9.

**Tabela 4.8** – Rácios carbono/azoto encontrados em diversas referências para diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes fontes de carbono.

Levedura	Fonte de C	Rácio C/N	Autor
<i>S. cerevisiae</i>	Farinha de tapioca	35,2	(Manikandan & Viruthagiri, 2010)
<i>S. cerevisiae</i> YKU 131 (recombinante)	Amido de sagu	7,9	(Abd-Aziz, et al., 2001)
<i>S. cerevisiae</i> (recombinante)	Melaço de cana	10	(Danesi, et al., 2006)

**Tabela 4.9** – Contribuições de alguns compostos para o carbono e o azoto presentes no meio.

Composto	Contribuição em C (%)	Contribuição em N (%)
Glucose	40	N.A.
Peptona	N.D.	~9 (*)
Extrato de levedura	N.D.	~11 (*)
Sulfato de amónio	N.A.	21

N.A. – não aplicável, N.D. – não disponível, (\*) (Sigma Aldrich, 2013)

**Tabela 4.10** – Rácios C/N para os diferentes ensaios desta secção.

Ensaio	Figura	C/N	Ensaio	Figura	C/N
CA+HLP	Figura 4.18	21,52	CA+HLP <sub>D/T</sub>	Figura 4.19/Figura 4.20	40,00
CA+Glu	Figura 4.18	3,78	Ext+HLP <sub>D/T</sub>	Figura 4.19/Figura 4.20	54,36
Ext+HLP	Figura 4.18	29,23	Ext+HPB <sub>D/T</sub>	Figura 4.19/Figura 4.20	58,46
Ext+Glu	Figura 4.18	4,96			

Mediante os rácios apresentados seria de esperar p.e. que os resultados dos ensaios “CA+HLP<sub>D/T</sub>” fossem ligeiramente superiores aos dos ensaios “Ext+HPB<sub>D/T</sub>”, o que na verdade não aconteceu, contrariamente ao sucedido nos ensaios “CA+HLP” e “CA+Glu”. Não é possível retirar conclusões a partir destas comparações, porque não foi possível separar o efeito do rácio C/N do efeito de uma matéria-prima mais “limpa” (na 1ª comparação) ou de uma variação na concentração de glucose (na 2ª comparação).

Realizam-se ensaios com o objetivo de estudar o efeito de diferentes rácios C/N no crescimento de leveduras, no entanto por motivos que se desconhecem o hidrolisado de lamas primárias utilizado (“HLP4”, caracterizado na secção 3.4.3) não permitiu o crescimento das leveduras da forma habitual. Ao passo que nos ensaios da Figura 4.19 se observa um crescimento logo nas primeiras horas com estabilização ao fim de cerca de 48h, nos ensaios do ANEXO VII (onde se averigua o efeito do rácio C/N) verifica-se que a fase estacionária de crescimento só se começa a vislumbrar próximo das 117h. Além disso ensaios com o mesmo rácio C/N tiveram resultados um pouco diferentes, enquanto o ensaio com C/N=46 e o ensaio com C/N=30, obtido por diluição do hidrolisado, tiveram resultados muito próximos, não sendo possível, mais uma vez, concluir nada acerca do efeito do rácio C/N no crescimento celular, a partir dos dados obtidos. Posto isto, não foi possível corroborar a hipótese de que o menor crescimento obtido nos ensaios “CA+HLP<sub>D/T</sub>” (com e sem rolha de papel de alumínio) se deveu a um rácio C/N inadequado.

## 4.2 ENSAIOS À ESCALA DE REATOR DE BANCADA

Para além dos ensaios à escala laboratorial, também se realizaram ensaios à escala de reator de bancada, não fosse a valorização de resíduos celulósicos um processo com interesse para uma implementação à escala industrial. A produção em larga escala, de qualquer produto, é normalmente antecedida de estudos em escalas mais pequenas, através das quais se analisam a sua exequibilidade, a sua viabilidade económica e se ajustam determinados parâmetros.

Neste caso, para se tentarem reproduzir o rendimento e a produtividade em etanol, tiveram que ter-se também em conta os aspetos que diferiram dos ensaios em Erlenmeyer, que foram: a dissemelhança geométrica dos equipamentos utilizados, o tipo de agitação e o fornecimento de oxigénio. Por outro lado, em nenhum dos ensaios à escala de reator de bancada se esterilizou o meio de cultura ou os materiais utilizados, optando-se por controlar o pH como forma de evitar a contaminação bacteriana.

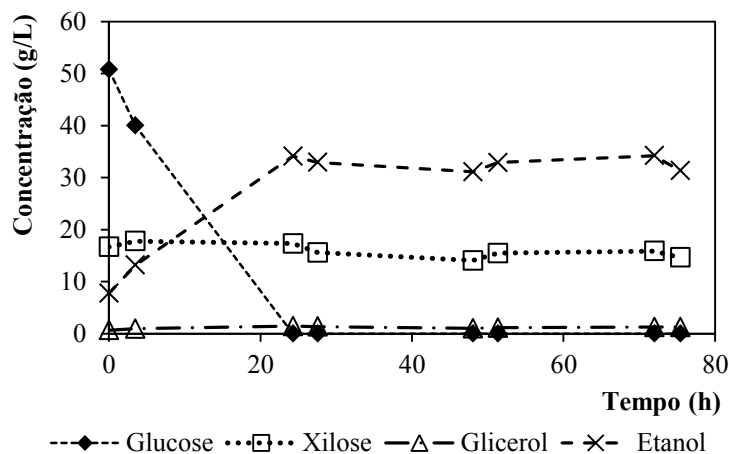
### 4.2.1 ENSAIO 1

O primeiro ensaio foi realizado com 2,5L de hidrolisado de lamas primárias, com  $\approx 106\text{g/L}$  de glucose (determinada por HPLC), nas quais se dissolveram extrato de malte, extrato de levedura e peptona, de modo a ficarem com as mesmas concentrações do meio geral para leveduras. Em seguida adicionaram-se 250mL de inóculo de *S. cerevisiae* ATCC 26602, em fase exponencial de crescimento. O ensaio foi mantido a  $30^{\circ}\text{C}$ , com agitação mecânica a 150rpm, a um pH de 4,5 e com um caudal de ar de  $500\text{cm}^3/\text{min}$  (0,2vvm) durante as primeiras 24h, após as quais se cessou completamente o fornecimento de ar. O pH foi controlado com soluções de ácido sulfúrico (1M) e de hidróxido de sódio (1M).

A decisão de fornecer um grande caudal de ar e em seguida desligá-lo completamente baseou-se na tese de que as células precisam de um grande fornecimento de  $\text{O}_2$  (devido à sua baixa solubilidade em meios aquosos), para se multiplicarem o mais depressa possível e, a certa altura, condições de anaerobiose, para promover a formação de etanol em quantidades significativas.

NOTA: Houve um lapso neste ensaio e os extratos (extrato de malte, extrato de levedura e peptona) apenas foram adicionados cerca de 24h após a inoculação, quando a densidade ótica já registava cerca de 4U.A., como tal os dados apresentados contabilizam o instante zero no momento em que houve a adição dos extratos.



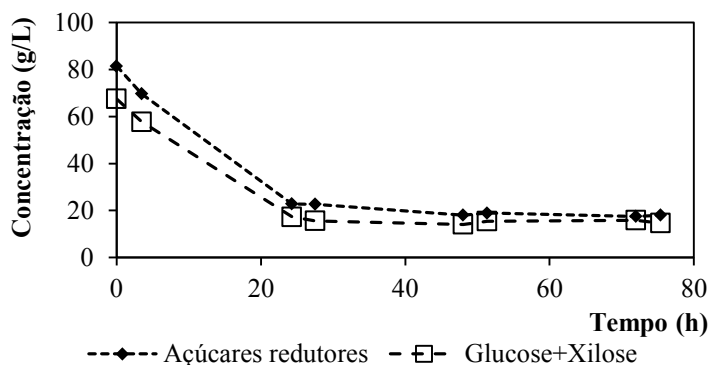


**Figura 4.22** – Evolução da concentração dos reagentes e dos produtos formados ao longo do ensaio.

A Figura 4.22 permite visualizar um consumo de glucose concordante com a formação de etanol, o qual atinge a concentração máxima de 34,1g/L às 24h, com uma produtividade de  $1,09g_{EtOH}/L.h$  e um rendimento de aproximadamente 100%. Se se estivesse a contabilizar desde o início (a contar com o tempo em que a cultura esteve sem extratos) o rendimento seria 94,5% e a produtividade  $0,70g_{EtOH}/L.h$ .

Um subproduto da fermentação alcoólica, apresentado na Figura 4.22, é o glicerol, contudo neste ensaio não foi além dos  $\approx 1,3g/L$ .

A xilose é um dos compostos presentes no meio que não é utilizado pela *S. cerevisiae* ATCC 26602, por esta não ter capacidade para o metabolizar, desse modo a sua concentração mantém-se aproximadamente constante ao longo de todo o ensaio. Embora a concentração de açúcares redutores vá diminuindo ao longo do tempo e se saiba que a xilose tem capacidade para reduzir o DNS, verificou-se que essa diminuição foi essencialmente devida ao consumo de glucose, como se observa pela Figura 4.23. A diferença existente entre as duas curvas diz respeito, provavelmente, à maltose, proveniente do extrato de malte, que como já foi mencionado também é um açúcar redutor.



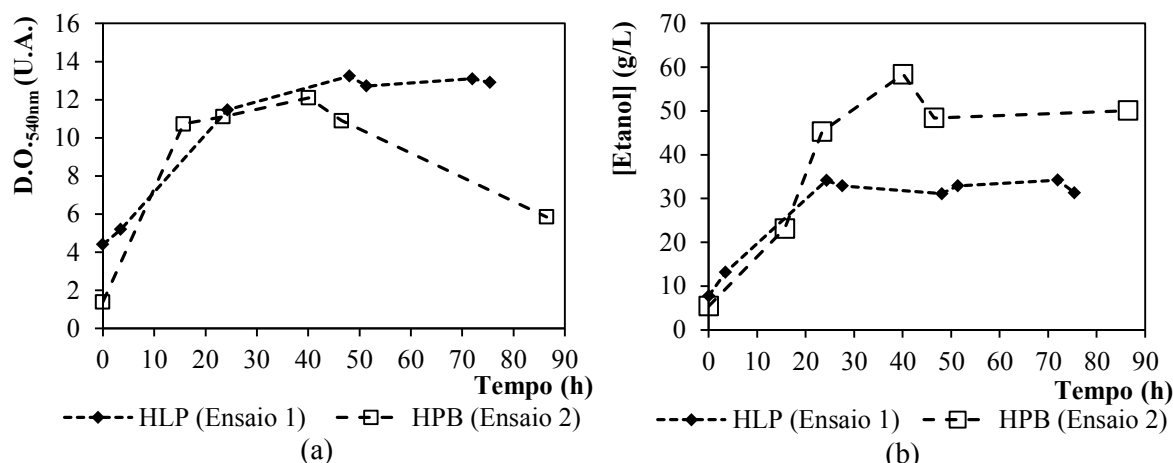
**Figura 4.23** – Comparação entre a concentração de açúcares redutores, determinada pelo método do DNS modificado, e a soma das concentrações de glucose e de xilose, determinadas por HPLC.

### 4.2.2 ENSAIO 2

O Ensaio 2 foi efetuado nas mesmas condições que o ensaio 1 diferindo apenas na utilização do hidrolisado de pasta branqueada em vez do hidrolisado de lamas primárias, com  $\approx 114\text{g/L}$  de glucose (determinado por HPLC).

Tal como os ensaios “Ext+HLP<sub>D/T</sub>” e “Ext+HPB<sub>D/T</sub>” da Figura 4.19 (a), o ensaio 2, constituído por hidrolisado de pasta branqueada com uma concentração inicial de glucose superior ao de lamas primárias do ensaio 1, apresentou um crescimento celular abaixo do obtido no ensaio 1, mas permitiu alcançar concentrações de etanol superiores (Figura 4.24), sendo que a máxima concentração de etanol registada foi  $58,4\text{g/L}$ . Observou-se uma descida na D.O. deste ensaio para a qual não existe uma explicação evidente, podendo, entre outros fatores, estar relacionada com a deterioração das células inviáveis e consequente alteração dos fenómenos óticos de absorção, refração ou reflexão aquando da análise espectrofotométrica.

O rendimento atingido foi próximo dos 100% e a produtividade foi de  $\approx 1,32\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h}$ , às 40h, apesar da máxima produtividade obtida ter sido  $\approx 1,71\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h}$ , às 23h.



**Figura 4.24** – (a) Curvas de crescimento para os ensaios 1 e 2; (b) Evolução da concentração de etanol para os ensaios 1 e 2.

### 4.2.3 ENSAIO 3

Este ensaio foi realizado nas mesmas condições de temperatura, agitação e pH que os anteriores, com um volume de 2,5L do hidrolisado de lamas primárias, composto por  $\approx 57\text{g/L}$  de glucose\*, 250mL de inóculo de *S. cerevisiae* ATCC 26602, em crescimento exponencial, e um caudal de ar entre 30 e 40cm<sup>3</sup>/min (0,011-0,015vvm) durante todo o ensaio. Este caudal foi selecionado tendo por base a produção de etanol em anaerobiose e a grande variabilidade de valores encontrados na literatura (Tabela 4.11).

Neste caso usou-se um caudal de ar constante ao longo de todo o ensaio, de modo a minimizar choques por diferenças abruptas nas condições de incubação. Sabe-se que o excesso de glucose promove a sobreprodução de acetato e que em simultâneo com a limitação de oxigénio induz a formação de etanol, hidrogénio, formiato, lactato e succinato, levando à

\* Concentração obtida por HPLC

acidificação do microambiente. Do mesmo modo a exposição a temperaturas demasiado altas promove a ativação de genes do *stress* ao calor que originam alterações metabólicas e danos, tais como a translocação de proteínas e membranas. Crê-se que a contínua ativação e desativação de tais genes pode levar a uma total alteração da fisiologia celular, diminuindo o crescimento e a produtividade e fazendo aumentar a geração de subprodutos (Schmidt, 2005). Em suma as condições de operação devem manter-se aproximadamente constantes ao longo de todo o ensaio, de modo a não induzir alterações no metabolismo e na fisiologia das células.

**Tabela 4.11** – Caudais de ar utilizados na produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae*, organizados por ordem decrescente.

Tipo de ensaio	Caudal de ar/vvm	Referência
Fermentação em quimiostato	1-3	(Nienow, <i>et al.</i> 2011)
Fermentação em <i>batch</i>	2,5 por 4 horas	(Khongsay, <i>et al.</i> , 2012)
Fermentação em <i>batch</i>	1	(Hickert, 2010)
Fermentação em <i>batch</i>	1 nas primeiras 8 horas 0,25 nas 20 horas seguintes	(Shah, <i>et al.</i> , 2011)
Fermentação em <i>batch</i>	0,28	(Estela-Escalante, <i>et al.</i> , 2012)
Fermentação em <i>batch</i> (com células imobilizadas)	0,3-0,9	(Galvão, <i>et al.</i> , 2009)
Fermentação em <i>batch</i>	0,6	(Gutiérrez-Rivera, <i>et al.</i> , 2012)
Fermentação em <i>fed-batch</i>	0,13	(Seo, <i>et al.</i> , 2009)
Fermentação em <i>batch</i>	0,075	(Ahmad, <i>et al.</i> , 2011)
Fermentação em <i>batch</i>	0,2	(Este trabalho)
Fermentação em <i>batch</i>	0,011-0,015	(Este trabalho)

Os resultados respeitantes ao crescimento e à produção de etanol encontram-se adiante na Figura 4.25, onde se regista uma concentração máxima de etanol de 30,4g/L. Resultado que à partida pode parecer descabido, visto o máximo teórico para a concentração em etanol ser 29,2g/L, contudo é frequente o inóculo adicionado conter uma pequena concentração em etanol ou o próprio hidrolisado também já conter vestígios de atividade microbiana que possa ter ocorrido durante a sua conservação, a qual pode ter feito a diferença entre a concentração de etanol estar abaixo ou acima do máximo esperado. Para este ensaio a concentração de etanol registada no instante imediatamente após a inoculação foi de  $\approx 3,6$ g/L, o que se traduz numa concentração final, originada no ensaio, de 26,8g/L. Este ensaio permitiu alcançar um rendimento de  $\approx 100\%$  e uma produtividade de  $0,56 \text{g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h}$ , às 47,5h, embora a máxima produtividade registada tenha sido de  $1,17 \text{g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h}$ , às 21,5h.

#### 4.2.4 ENSAIO 4

O ensaio 4 trata-se de um ensaio com hidrolisado de pasta branqueada, a qual é composta por substâncias potencialmente menos inibidoras do crescimento celular que as dos hidrolisados de lamas primárias. As condições operatórias foram idênticas às anteriores, variando apenas o volume de meio e de inóculo adicionado, por lapso no controlo da quantidade de matéria-prima disponível, sendo usados 1,67L de meio e 160mL de inóculo. O hidrolisado de pasta branqueada utilizado foi caracterizado por HPLC, onde se obteve uma concentração de glucose igual a 88,1g/L.

Os dados de crescimento e de obtenção de produto são os apresentados na Figura 4.25.

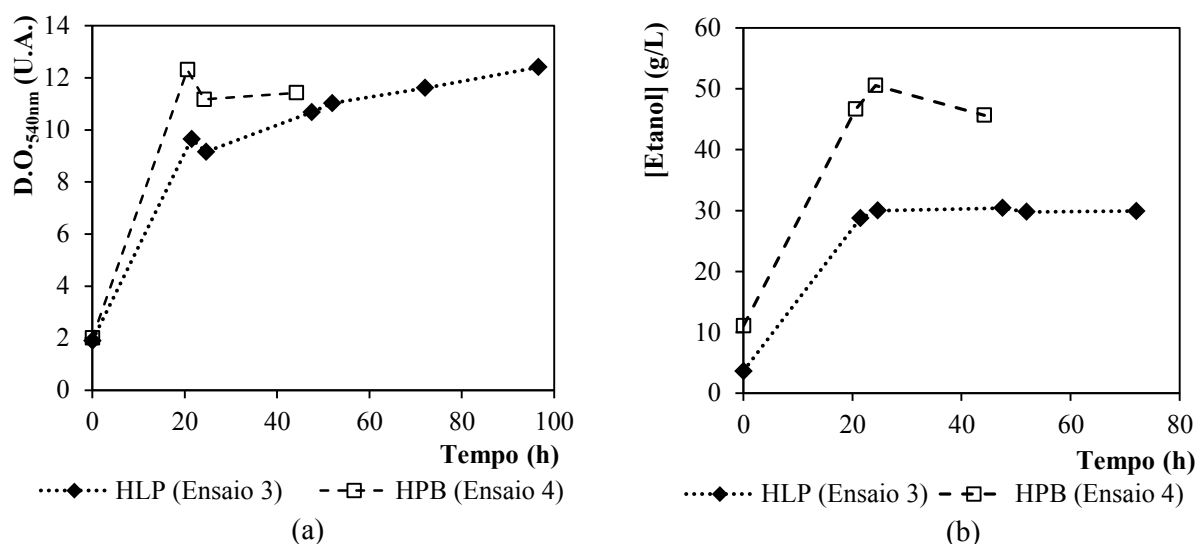


Figura 4.25 – (a) Curvas de crescimento dos ensaios 3 e 4; (b) Concentração de etanol ao longo do tempo.

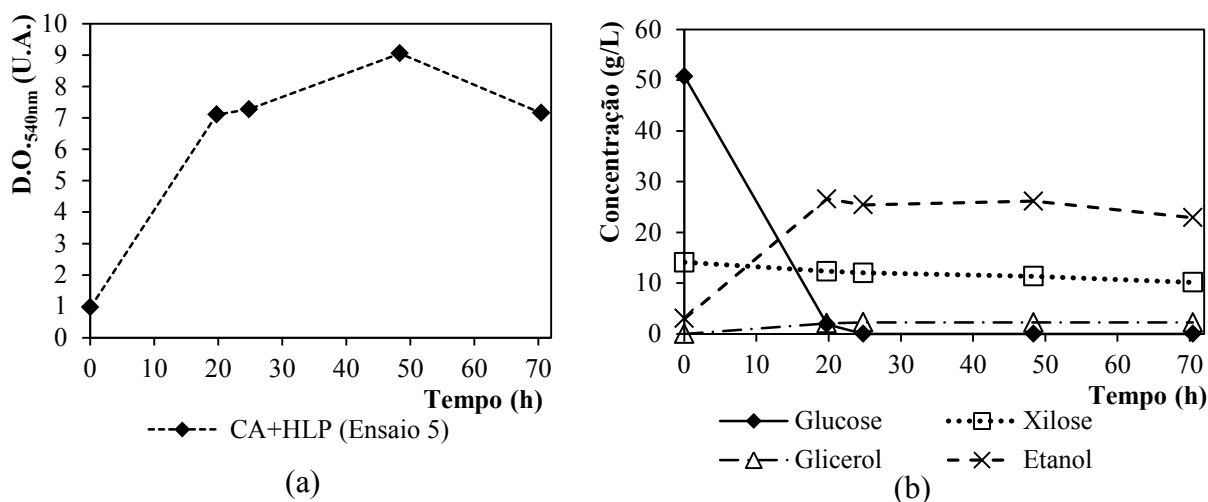
Neste ensaio atingiu-se um rendimento de 99,95% e uma produtividade igual a  $1,63 \text{g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h}$ , às 24h, embora a máxima produtividade registada tenha sido  $1,73 \text{g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h}$ , às 20,5h.

#### 4.2.5 ENSAIO 5

Após a reprodução dos ensaios com hidrolisados de lamas primárias e extratos (extrato de malte, extrato de levedura e peptona) à escala de reator de bancada, ficaria somente a faltar a reprodução dos ensaios com hidrolisados de lamas primárias e compostos alternativos. Nesse sentido, realizou-se o ensaio 5, composto por 2L de hidrolisados de lamas primárias, com cerca de  $58 \text{g/L}$  de glucose (determinada por HPLC), nos quais foram dissolvidos os compostos da Tabela 4.6, nas concentrações indicadas. O inóculo adicionado contou com um volume de 200mL, de *S. cerevisiae* ATCC 26602, em crescimento exponencial.

Este ensaio foi efetuado sem qualquer esterilização e nas seguintes condições:  $30^\circ\text{C}$ , agitação mecânica a 150rpm, pH igual a 4,5 e um caudal de ar entre  $30$  e  $40 \text{cm}^3/\text{min}$  ( $0,014$ - $0,018 \text{vvm}$ ), durante todo o ensaio.

Os resultados do crescimento celular e do consumo de açúcares e obtenção de produtos encontram-se apresentados na Figura 4.26, na qual se observa uma concentração máxima de etanol de  $26,6 \text{g/L}$ , após 19,8h da inoculação. O rendimento e a produtividade alcançados nesse instante foram de 91% e de  $1,19 \text{g}_{\text{EtOH}}/\text{L.h}$ , respetivamente. Como tal, este ensaio permitiu demonstrar a exequibilidade prática da utilização dos compostos alternativos na produção de etanol, para uma escala superior à testada anteriormente.



**Figura 4.26** – (a) Crescimento celular e (b) concentração de reagentes e produtos da fermentação (obtidos por HPLC), para o ensaio 5.

### 4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS ESCALAS (LABORATORIAL E DE REATOR DE BANCADA)

Antes de passar à comparação de resultados entre as duas escalas é importante relembrar as principais diferenças existentes entre elas, as quais se encontram sumariadas na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12** – Principais diferenças entre a escala laboratorial e a escala de reator de bancada.

Características	Erlenmeyer	Reator de bancada
Agitação	Orbital	Mecânica (pás do tipo Rushton)
Arejamento	'Destapado'/'Tapado' com papel de alumínio	(0,2vvm)/(0,011-0,019vvm)
Geometria	Cônica	Cilíndrica
Chicanas	Não	Sim
Volume reacional	110mL	1,67-2,75L
Volume de inóculo	10mL	160-250mL
Controlo de pH	Meio tamponado (sem controlador)	Controlo ácido/base
Controlo de temperatura	Na incubadora	Por camisa de aquecimento
Amostragem	Com quebra das condições operacionais	Sem quebra das condições operacionais

Decidiu-se comparar os ensaios à escala de reator de bancada com os ensaios em escala laboratorial da Figura 4.19/Figura 4.20, que foram obtidos com os mesmos hidrolisados do ensaio 1 e 2, para lamas primárias e pasta branqueada, respetivamente.

Verifica-se, de modo geral, no crescimento celular, que a fase estacionária se inicia entre as 20 e as 24h e que as D.O.'s para essa fase se situam entre as 12 e as 17U.A., para os ensaios com extratos e com maior fornecimento de ar. Ou seja, nos ensaios com Erlenmeyers destapados (Figura 4.19 (a)) e nos ensaios com 0,2vvm (Figura 4.24 (a)); à exceção do ensaio 2, onde a D.O. registada decaiu bastante após as 40h (possivelmente pela dificuldade em manter as células suspensas durante o processo de amostragem e preparação para a leitura da

D.O. ou por alteração dos fenómenos óticos, causada pela deterioração das células inviáveis, como mencionado anteriormente). Porém, os ensaios à escala de reator de bancada apresentaram D.O.'s inferiores às obtidas em Erlenmeyer.

Relativamente à produção de etanol, nesses ensaios, o máximo foi obtido entre as 40 e as 48h em ambas as escalas, apesar de no ensaio 1 o pico ter sido atingido às 24h, o que pode dever-se ao lapso mencionado atrás. As concentrações máximas obtidas rondam os 34g/L em ensaios com hidrolisados de lamas primárias, em ambas as escalas, e os 48 e 58g/L com hidrolisados de pasta branqueada, para a escala laboratorial e de reator de bancada, respetivamente, sendo que o ensaio em maior escala superou os resultados alcançados em Erlenmeyer.

Nos ensaios com extratos e menor caudal de ar (Erlenmeyers tapados com rolha de papel de alumínio e caudais de ar no reator de 0,011-0,015vvm), as D.O.'s na fase estacionária, à escala de reator de bancada, continuaram a ser menores que as da escala laboratorial. As produtividades foram ligeiramente inferiores na escala de reator de bancada, embora os rendimentos em etanol se situem entre os 90 e os 100%. O tempo despendido para alcançar o pico de concentração em etanol situou-se entre as 24 e as 48h em ambas as escalas.

Para o caso dos ensaios com compostos alternativos verificaram-se resultados muito próximos entre o ensaio CA+HLP<sub>T</sub> (à escala laboratorial) e o ensaio 5 (em reator de bancada), constituídos por concentrações iniciais de glucose bastante próximas. Esse tipo de ensaios também foi bem-sucedido, na medida em que a eficiência alcançada ultrapassou os 90% e a produtividade foi superior a 1g<sub>EtOH</sub>/L.h, ultrapassando a obtida em Erlenmeyer.

Em suma os resultados na mudança de escala foram positivos e bastante próximos dos obtidos na menor escala, ultrapassando-a em alguns aspetos, tal como se encontra sumariado na Tabela 4.13.

**Tabela 4.13** – Ensaios à escala laboratorial e à escala de reator de bancada, comparação entre as concentrações iniciais de glucose, as concentrações máximas de etanol, os rendimentos, as produtividades e respetivo instante em que foram alcançadas, bem como as produtividades máximas em etanol e os respetivos instantes. Note-se que as concentrações iniciais de glucose apresentadas foram obtidas no instante inicial de cada ensaio por HPLC, embora os hidrolisados de lamas primárias e de pasta branqueada estejam caracterizados na secção 3.4.3.

Ensaio	[Glu] <sub>i</sub> (g/L)	[EtOH] <sub>máx</sub> (g/L)	η <sub>EtOH</sub> (%)	Prod. <sub>EtOH</sub> $\left(\frac{\text{mg}_{\text{EtOH}}}{\text{mL.h}}\right)$	t (h)	Prod. <sub>EtOH</sub> máx. $\left(\frac{\text{mg}_{\text{EtOH}}}{\text{mL.h}}\right)$	t(Prod. <sub>EtOH</sub> máx.) (h)
<i>Sem limitação de O<sub>2</sub> (sem rolha de papel de alumínio em EL e caudais de 0,2vvm em RB)</i>							
EL Ext+HLP <sub>D</sub>	65,5	34,5	89,4	0,65	46	1,17	24
EL Ext+HPB <sub>D</sub>	100,1	48,2	84,8	0,94	46	1,24	24
EL CA+HLP <sub>D</sub>	74,8	33,1	79,7	0,59	52	0,81	24
RB 1 (Ext+HLP)	65,6	34,1	100	1,09	24	1,09	24
RB 2 (Ext+HPB)	103,3	58,4	100,6	1,32	40	1,71	23
<i>Com limitação de O<sub>2</sub> (com rolha de papel de alumínio em EL e caudais de ar entre 0,011 e 0,019vvm em RB)</i>							
EL Ext+HLP <sub>T</sub>	50,1	28,8	91,1	0,78	30	0,86	24
EL Ext+HPB <sub>T</sub>	93,8	56,8	104,8	1,67	30	1,88	24
EL CA+HLP <sub>T</sub>	50,9	26,7	91,9	0,50	48	0,88	24
RB 3 (Ext+HLP)	52,1	30,4	100,9	0,56	48	1,17	21
RB 4 (Ext+HPB)	77,5	50,6	99,95	1,63	24	1,73	21
RB 5 (CA+HLP)	50,7	26,6	91,1	1,19	20	1,19	20

EL – Escala laboratorial, RB – Escala de reator de bancada

### **4.3.1 COMO AUMENTAR A CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO, A EFICIÊNCIA E A PRODUTIVIDADE**

Como visto anteriormente a quantidade de oxigénio fornecida é um dos fatores que tem influência na concentração de produto obtida e na eficiência da operação, como tal a otimização do O<sub>2</sub> fornecido, como referido atrás, é uma das formas de melhorar a produção de etanol. Além disso a utilização de matérias-primas mais concentradas é outro aspeto, senão o mais importante, para a melhoria do processo, visto que permite gerar produto em concentrações superiores, fator determinante para a viabilidade de uma operação de separação a jusante do fermentador. Após a hidrólise a glucose pode ser concentrada por uma de várias alternativas, como a liofilização, a destilação, a secagem, etc., apesar de adicionar mais um custo ao processo.

## **4.4 BALANÇO MÁSSICO AOS COMPOSTOS INTERVENIENTES NA FERMENTAÇÃO**

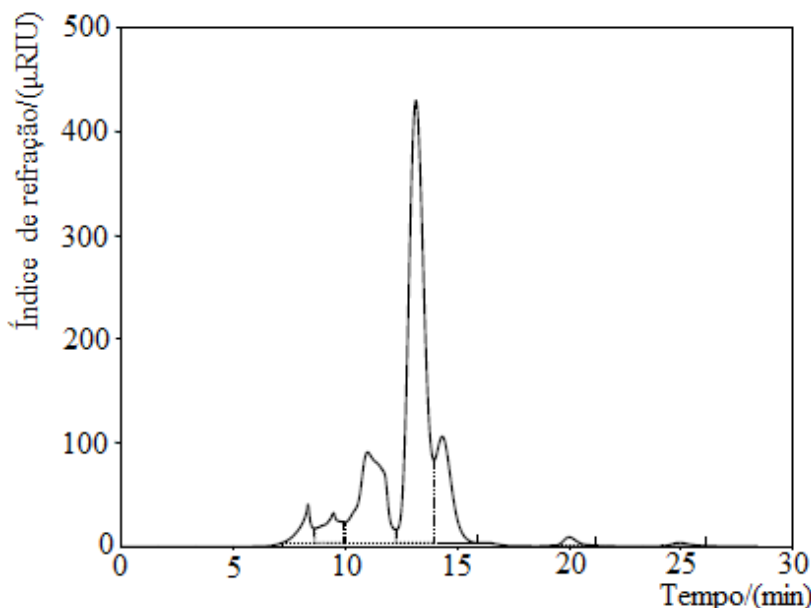
De modo a perceber-se melhor as quantidades que entram e saem do fermentador, assim como as frações mássica e volumétrica de etanol em causa resolveu-se realizar o balanço mássico aos reagentes e aos produtos formados nos Ensaios 1, 3 e 5, ou seja, os que têm hidrolisados de lamas primárias na sua composição. Este exercício tem também como objetivo perceber um pouco melhor acerca da viabilidade do processo, uma vez que existem frações mínimas de produto para que as operações a jusante do fermentador sejam económica e energeticamente viáveis.

Segundo dados da literatura (Vane, 2008) é recomendável que a fração mássica de etanol, por exemplo numa mistura etanol-água, seja acima dos 3%, para que possa ser separado por destilação. É mencionado como valor de referência o calor de combustão do etanol (30MJ/kg), sendo que para alimentações com frações mássicas acima de 3% a energia despendida na recuperação de etanol é menos de um terço do seu calor de combustão. Para valores abaixo a energia necessária aumenta de forma abrupta, concluindo-se que a recuperação de etanol com teores abaixo de 3% (m/m), por destilação, é energeticamente inviável.

A Figura 4.27 e a Figura 4.28 mostram os espectros do ensaio 1, obtidos por HPLC, no início e no fim (no instante de maior concentração de etanol) da fermentação, respetivamente. Através desses dados foi possível realizar o balanço mássico aos compostos presentes no início e no fim da operação de fermentação (ANEXO VIII), assim como determinar a fração mássica de etanol à saída, que resultou em 3,45%. O valor obtido situa-se muito próximo do limite abaixo do qual a separação por destilação se torna energeticamente inviável, contudo este resultado não exclui a recuperação do etanol por meio de destilação.

Aplicando o mesmo raciocínio para o Ensaio 3 e para o Ensaio 5 obteve-se a Tabela VIII.2 e a Tabela VIII.3, de onde se retiram as frações mássicas à saída de 3,07% e de 2,66%, respetivamente. Concluindo-se que para o ensaio com compostos alternativos (Ensaio 5) a

destilação seria energeticamente inviável, resultado da baixa concentração inicial de glucose nesse ensaio.



**Tempos de retenção:**

- Até aos 11min tem-se a solução de extratos;
- Aos 13,2min surge a glucose;
- Nos 14,3min encontra-se a xilose;
- Seguida do etanol aos 20,0min;
- Por fim tem-se um pequeno pico aos 24,9min que se pensa ser xilitol ou sorbitol, tendo em conta os dados do ANEXO IX, com maior possibilidade de ser sorbitol.

Figura 4.27 – Cromatograma da mistura inicial do ensaio 1.

Como se pode observar na Figura 4.28 o pico correspondente à glucose diminuiu significativamente, assim como parte do que compunha os extratos. Por sua vez deu-se um aumento expressivo no pico do etanol, surgindo com ele um pequeno pico aos 19,2min correspondente ao glicerol. Verifica-se também o aumento do pico dos 24,9min o qual corresponde a um subproduto: possivelmente xilitol ou sorbitol. Por fim há a registar o pico da xilose que se mantém aproximadamente igual ao da Figura 4.27.

**Tempos de retenção adicionais:**

- Glicerol aos 19,2min.

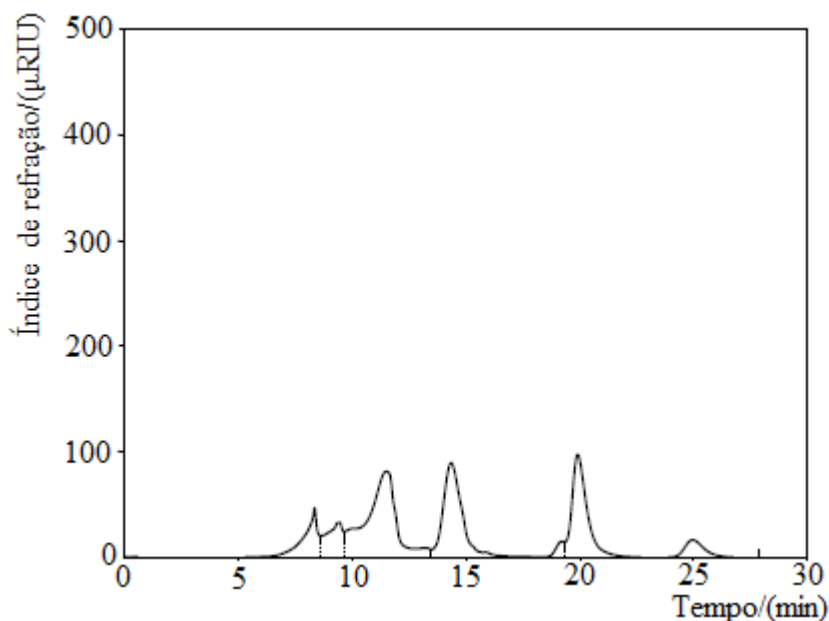


Figura 4.28 – Cromatograma da mistura final (no instante de maior concentração de etanol) do ensaio 1.



## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

Este trabalho teve como principais objetivos estudar a capacidade de obtenção de produtos da fermentação a partir de hidrolisados de lamas primárias, provenientes do processo de pasta para papel, e reproduzir os resultados mais favoráveis numa escala de reator/fermentador de bancada.

Para tal, foi necessário identificar as características que um microrganismo fermentativo deve ter para conseguir valorizar da melhor forma as matérias-primas disponíveis, tendo em conta uma fermentação alcoólica. As características que se destacaram foram a tolerância ao etanol, a fermentação rápida e eficiente e a tolerância a meios ácidos, sendo que o tipo de microrganismo que melhor se encaixa nesse perfil é o das leveduras. Das leveduras disponíveis, a *Saccharomyces cerevisiae* foi a que deu evidências de um melhor desempenho, destacando-se das demais pela sua tolerância ao etanol (Rosa e Sá-Correia 1992; Gutiérrez-Rivera, *et al.* 2012); por ter apresentado o segundo valor mais elevado de taxa específica de crescimento,  $\mu$ , ( $0,44h^{-1}$ ), quando comparado com os da *Pichia stipitis* e da *Kluyveromyces marxianus*, e ter uma temperatura ótima de crescimento entre os 25 e os 35°C, coincidente com as temperaturas típicas de fermentação. Como tal a *S. cerevisiae* foi a levedura selecionada para dar continuidade ao trabalho.

As primeiras fermentações realizadas, em pequena escala, permitiram identificar o etanol como composto predominante, com uma enorme diferença do subproduto mais concentrado (o glicerol). Sendo de todo o interesse perceber os aspetos que promovem a sua obtenção de forma mais concentrada e com elevada eficiência e produtividade, foram estudados, em Erlenmeyer, diversos fatores com influência no crescimento microbiano e na produção de etanol, nomeadamente a concentração de etanol no meio, a concentração de oxigénio, a esterilização, a concentração inicial de glucose, a contribuição das fontes de azoto e de outros nutrientes e o uso de um meio alternativo ao usado habitualmente em laboratório.

Os resultados alcançados mostraram que a concentração e a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) celulares têm tendência a ser menores com o aumento da concentração de etanol no meio e que leveduras expostas a maiores concentrações de etanol consomem mais glucose. Esse consumo adicional de glucose é, provavelmente, direcionado para a síntese de trealose, que protege as leveduras de ambientes adversos, neste caso o alto teor em etanol

(Sharma, 1997). Embora não tenha sido possível mostrar experimentalmente a partir de que concentração de etanol é que ocorre a inibição total do crescimento celular, sabe-se que, a partir dos resultados obtidos, para uma concentração de 60g/L o valor de  $\mu$  é cerca de 23% do obtido sem qualquer adição de etanol e que a concentração celular final (ao fim de 24h) é cerca de 45% da obtida num ensaio sem etanol. Todavia, dados apresentados na literatura apontam para uma tolerância que vai até um máximo de 197,6g/L, sugerindo que a variação de  $\mu$  para concentrações elevadas de etanol é muito menor que a observada para concentrações entre 0 e 60g/L, tal como os perfis apresentados da literatura (Held, 2010).

Por outro lado, quanto maior a concentração de O<sub>2</sub> disponível, maior o crescimento celular e o valor de  $\mu$ , sendo que um aumento de cerca de 74% na área interfacial entre o meio de cultura (fase líquida) e a fase gasosa permite aumentar o crescimento celular em  $\approx$ 46%, após 48h.

Relativamente à esterilização conclui-se que uma eventual contaminação poderá ter um efeito pouco significativo no crescimento da levedura e na consequente produção de etanol, pelo que é desnecessária se se tiver em conta um controlo de pH que mantenha a cultura ligeiramente ácida (abaixo de 5).

Quanto maior a concentração inicial de glucose mais tarde ela é totalmente consumida pelas células e maior a concentração de etanol obtida, sendo que a concentração máxima registada, à escala laboratorial, com hidrolisados de lamas primárias, foi 44,5g/L, com um rendimento de 79,6% e uma produtividade de 0,62g<sub>EIOH</sub>/L.h (Tabela 4.4), embora se tivessem alcançado rendimentos superiores (entre 90 e 100%) em ensaios cuja concentração de glucose inicial foi menor. Para ensaios com hidrolisados de pasta branqueada, uma matéria-prima mais 'limpa' em substâncias potencialmente inibidoras do crescimento, alcançou-se uma concentração máxima em etanol de 56,8g/L,  $\approx$ 100% de rendimento e 1,67g<sub>EIOH</sub>/L.h em produtividade (Tabela 4.7).

Foram várias as experiências em que se registou um aumento significativo da D.O. em ensaios apenas com extratos, ultrapassando mesmo a obtida em ensaios com adição de glucose nas mesmas condições, não se encontrando uma explicação evidente para tal facto. Puseram-se as hipóteses de contaminação ou de crescimento diáuxico por adaptação a uma nova fonte nutricional, que num meio completo não seria metabolizada ou apenas o seria passado muito mais tempo. Além disso, os açúcares redutores do meio de cultura com adição de glucose foram mais rapidamente consumidos que os do meio só com extratos, concluindo-se que a *S. cerevisiae* tem capacidade para metabolizar maltose, embora por um mecanismo mais complexo que o usado no consumo de glucose, como mencionado por outros autores (Weusthuis, *et al.*, 1993), no entanto não se registou produção de etanol, embora a quantidade de maltose presente no meio tenha sido baixa.

Quanto à utilização de compostos alternativos, como fonte de azoto e de outros nutrientes, em simultâneo com o hidrolisado de lamas primárias, como fonte de carbono, há a destacar um crescimento favorável da levedura e a obtenção de uma concentração máxima de etanol de 33,1g/L, com 79,7% de rendimento e 0,59g<sub>EIOH</sub>/L.h de produtividade, em Erlenmeyer.

A reprodução dos resultados à escala de reator de bancada foi bem-sucedida, uma vez que as concentrações máximas de etanol obtidas foram muito próximas e em alguns casos até superiores às obtidas à escala laboratorial. A concentração máxima obtida rondou os 34g/L

em ensaios com hidrolisados de lamas primárias e os 58g/L com hidrolisados de pasta branqueada, sendo que o pico de concentração em etanol se situou entre as 24 e as 48h, com rendimentos acima dos 90%, produtividades entre 0,56 e 1,09g<sub>EtOH</sub>/L.h com hidrolisados de lamas primárias e entre 1,32 e 1,63g<sub>EtOH</sub>/L.h com hidrolisados de pasta branqueada. Para o ensaio com compostos alternativos, à escala de reator de bancada, a máxima concentração de etanol alcançada foi de 26,6g/L, com uma eficiência de 91% e uma produtividade de 1,19g<sub>EtOH</sub>/L.h, ao fim de 19,8h. Este resultado além de ser muito próximo do obtido em Erlenmeyer, permitiu ainda superar a produtividade aí registada, no instante da máxima concentração de produto. O facto de se conseguir, em certos aspetos, melhorar os resultados obtidos em Erlenmeyer, nomeadamente a produtividade, pode dever-se essencialmente à melhor homogeneização da mistura reacional, consequente da agitação mecânica e do tipo de agitador.

Do balanço mássico aos reagentes e aos produtos da fermentação, para os dois ensaios de hidrolisados de lamas primárias com extratos, retirou-se que a fração mássica de etanol calculada permite realizar a sua separação de forma energeticamente viável, contrariamente ao que se obteve no balanço aos componentes do ensaio com compostos alternativos, cuja fração mássica em etanol (2,66%) ficou aquém do limite (3%) acima do qual a operação de destilação é energeticamente viável.

Como este trabalho é limitado no tempo, ficaram algumas questões por responder, as quais se seguem como sugestões para trabalho futuro: (i) a realização de ensaios com uma concentração significativa de maltose, de modo a averiguar melhor a sua influência no crescimento de leveduras e na eventual obtenção de produtos; (ii) trabalho experimental em que se utilize duas ou mais leveduras em simultâneo, que permitam metabolizar não só a glucose como também a xilose para formação de etanol, com vista à obtenção de maiores concentrações; (iii) o estudo das técnicas possíveis para a concentração de glucose, de modo a aumentar a concentração de produto obtido; (iv) o estudo da possibilidade de separação do etanol em simultâneo com a operação de fermentação; (v) a utilização de um fermentador de diferente configuração, de maneira a estudar a influência da configuração geométrica no crescimento e na obtenção de produto; (vi) a otimização do caudal de ar a fornecer à mistura de modo a maximizar a concentração de etanol, o rendimento e a produtividade; (vii) experimentar a produção de etanol, nas mesmas condições, em regime contínuo; e (viii) averiguar a produção de sorbitol por *Saccharomyces cerevisiae*, bem como o seu favorecimento.



## BIBLIOGRAFIA

- Abd-Aziz, S., Ang, D. C., Yousof, H. M., Karim, M. I., Ariff, A. B., Uchiyama, K., et al. (2001). Effect of C/N ratio and starch concentration on ethanol production from sago starch using recombinant yeast. *Word Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 713-719.
- Adney, B., & Baker, J. (1996). *Measurement of Cellulase Activities, Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. National Renewable Energy Laboratory.
- Ahmad, F., Jameel, A. T., Kamarudin, M. H., & Mel, M. (2011). Study of growth kinetic and modeling of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology*, 16(81), 18842-18846.
- Alam, M. N., & Razali, F. (2005). Scale-up of stirred and aerated bioengineering bioreactor based on constant mass transfer coefficient. *Jurnal Teknologi*, 43(F), pp. 95-110.
- Alba-Lois, L., & Segal-Kischinevsky, C. (2010). Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine. *Nature Education*, 3(9), p. 17.
- Atkinson, B. (1983). In B. Atkinson, *Biochemical Engineering and biotechnology Handbook* (pp. 397-407). New York: Nature Press.
- Avillez, F., Jorge, M. N., Montes, D., Brandão, A. P., & Campilho, P. (2009). *Sustentabilidade da produção de bioetanol em Portugal*. Agro.ges - Sociedade de Estudos e Projectos. Obtido em 10 de Agosto de 2013, de [http://www.agroges.pt/artigos/Relatorio\\_Sustentabilidade\\_Marco2009.pdf](http://www.agroges.pt/artigos/Relatorio_Sustentabilidade_Marco2009.pdf)
- Bajpai, P., & Margaritis, A. (1982). Ethanol Inhibition Kinetics of *Kluyveromyces marxianus* Grown on Jerusalem Artichoke Juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(6), pp. 1325-1329.
- Ballesteros, M., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P., & Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39, p. 1843.
- Banat, I., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R., & McHale, A. (1998). Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, pp. 809-821.
- Baptista, C. M., Córias, J. M., Oliveira, A. C., & Rocha, J. M. (2005). The effects of yeasts immobilisation, on-line feeding and contamination risk, on continuous fermentation for bioethanol production. *9th International Chemical Engineering (ChemPor)* (pp. 422-423). Coimbra, Portugal: FCTUC, Coimbra.
- Barnett, J. A. (1998). A History of Research on Yeasts 1: Work by Chemists and Biologists 1789-1850. *Yeast*, 14, pp. 1439-1451.
- Basso, L. C., Basso, T. O., & Rocha, S. N. (2011). Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In M. A. Bernardes, *Biofuel Production – Recent Developments and Prospects* (pp. 85-100). Rijeka, Croatia: InTech .
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The Fungi*. Academic Press.

- Carvalho, M. G. (1999). *Efeito das variáveis de cozimento nas características químicas de pastas Kraft de Eucalyptus Globulus*. Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra.
- Cascaval, D., Galaction, A. I., & Camarut, S. (2011). Scale-up of Aerobic Stirred Bioreactors Using the Mixing Time Criteria 1. Simulated Broths. *Chemical & Biochemical Engineering*, 25(1), pp. 43-54.
- Celipa. (2009). *Boletim estatístico - Indústria Papeleira Portuguesa*. Obtido em 7 de Agosto de 2013, de <http://www.celipa.pt/FileGet.aspx?FileId=4345>
- Chi, Z., & Arneborg, N. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24, pp. 75-78.
- Danesi, E. D., de Oliveira, C., Rangel-Yagui, de Carvalho, J. C., & Pessoa Jr., A. (2006). Effect of carbon:nitrogen ratio (C:N) and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Engineering*, 75, 96-103.
- Daramola, M., & Zampraka, L. (2008). Experimental study of the production of biomass by *Sacharomyces cerevisiae* in a fed batch fermentor. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), pp. 1107-1114.
- Das, H., & Singh, S. K. (2004). Useful Byproducts from Cellulosic Wastes of Agriculture and Food Industry—A Critical Appraisal. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, pp. 77-89.
- de Souza, C. J. (2011). *Produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras termotolerantes*. Dissertação de pós-graduação, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Demain, A. L. (2009). Biosolutions to the energy problem. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, pp. 319-332.
- Diário Digital, & Lusa. (5 de 11 de 2010). *Indústria papeleira é a 3.ª maior exportadora de Portugal*. Obtido em 9 de Agosto de 2013, de [http://dinheirodigital.sapo.pt/news.asp?id\\_news=146663](http://dinheirodigital.sapo.pt/news.asp?id_news=146663)
- Dien, B. S., Cotta, M. A., & Jeffries, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, pp. 258-266.
- Directiva 2009/28/CE do parlamento Europeu e do conselho. (2009). *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Dowe, N., & McMillan, J. (2001). *SSF Experimental Protocols — Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation, Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. National Renewable Energy Laboratory.
- DSMZ. (2007). *Meio Geral Para Leveduras*. Obtido em 11 de Agosto de 2013, de Coleção alemã de microrganismos e culturas celulares: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium186.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium186.pdf)
- Duvnjak, Z., Turcotte, G., & Duan, Z. D. (1991). Production of sorbitol and ethanol from Jerusalem artichokes by *Saccaromyces cerevisiae* ATCC 36859. (Springer, Ed.) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, pp. 711-715.
- EPA. (21 de Junho de 2013). *Agência de proteção ambiental*. Obtido em 9 de Agosto de 2013, de <http://epa.gov/climatestudents/basics/today/carbon-dioxide.html>

- Estela-Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., & Hatta-Sakoda, B. (2012). Effect of aeration on the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* cultured in apple juice. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(2), 211-226.
- Fan, Z., South, C., Lyford, K., Munsie, J., van Walsum, P., & Lynd, L. (2003). Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(2), pp. 93-101.
- Galvão, C. M., Almeida, P. I., Badino Junior, A. C., & Filho, R. R. (2009). *Patente N.º 012,553*. Brasil.
- Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27, pp. 153-176.
- George, H., & Herber, W. K. (1998). *Patente N.º 5795771*. USA.
- Gonçalves, H., Carapina, P., Silva, R., & Freitas, S. (2007). *Estudo preliminar de uma unidade de produção de pasta branca para papel - Processo kraft*. Anteprojeto, Universidade de Aveiro.
- Guimarães, R. C., & Cabral, J. A. (1997). *Estatística* (Edição Revista ed.). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto: McGraw-Hill.
- Gupta, R., Sharma, K., & Kuhad, R. (2009). Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* NCIM 3498. *Bioresource Technology*, 100(3), pp. 1214-1220.
- Gutiérrez-Rivera, B., Waliszewski-Kubiak, K., Carvajal-Zarrabalc, O., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2012). Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87, pp. 263-270.
- Held, P. (2010). *Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of Saccharomyces Cerevisiae - The Utility of Synergy H1 for Providing High Quality Kinetic Data for Yeast Growth Applications*. Obtido em 3 de Setembro de 2013, de Biotek: [http://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/SynergyH1\\_Yeast\\_Growth\\_App\\_Note.pdf](http://www.biotek.com/assets/tech_resources/SynergyH1_Yeast_Growth_App_Note.pdf)
- Hickert, L. R. (2010). *Otimização da hidrólise da casca de arroz (Oryza sativa) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras*. Dissertação de pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Hoek, P. V., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1998). Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker's Yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), pp. 4226-4233.
- Kang, L., Wang, W., & Lee, Y. Y. (2010). Bioconversion of Kraft Paper Mill Sludges to Ethanol by SSF and SSCF. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, pp. 53-66.
- Khongsay, N., Laopaiboon, L., Jaisil, P., & Laopaiboon, P. (2012). Optimization of Agitation and Aeration for Very High Gravity Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* Using an Orthogonal Array Design. *Energies*, 5, 561-576.

- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729.
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's. *Fungal Biology Reviews*, 24, pp. 17-26.
- Lark, N., Xia, Y., Qin, C. G., Gong, C. S., & Tsao, G. T. (1997). Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluyveromyces Marxianus*. *Biomass Bioenergy*, 12, pp. 135-143.
- Lima, M. A., & Natalense, A. P. (2012). *Bioethanol*. InTech.
- Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*(69), pp. 627-642.
- Manikandan, K., & Viruthagiri, T. (2010). Optimization of C/N ratio of the medium and Fermentation conditions of Ethanol Production from Tapioca Starch using Co – Culture of *Aspergillus niger* and *Sachormyces cerevisiae*. *International Journal of ChemTech Research*, 2(2), 947-955.
- Marques, S., Alves, L., Roseiro, J., & Gírio, F. (2008). Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Bioenergy*, 32, pp. 400 - 406.
- McMillan, J. D. (1993). *Xylose fermentation to ethanol: A review*. National Renewable Energy Laboratory, EUA.
- Mendes, C. V., Rocha, J. M., & Carvalho, M. G. (2012). Primary sludge from pulp and paper mills as a potential raw-material to produce value-added products. *The 45th ABTCP International Pulp and Paper Congress and VII IberoAmerican Congress on Pulp and Paper Research*. São Paulo, Brasil.
- Menezes, F. F. (2013). *Sacarificação e fermentação simultâneas de resíduos lignocelulósicos da indústria da pasta e papel para a produção de bioetanol*. Coimbra.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426-428.
- Mobini-Dehkordi, M., Nahvi, I., Ghaedi, K., & Tavassoli, M. (2007). Isolation of high ethanol resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 85-91.
- Nag, A. (2008). *Biofuels Refining and Performance*. McGraw-Hill.
- Nienow, A. W., Nordkvist, M., & Boulton, C. A. (2011). Scale down/scale-up studies leading to improved commercial beer fermentation. *Journal of Biotechnology*, 6, pp. 911-925.
- Oh, E. J., Ha, S. J., S., R. K., Lee, W. H., Galazka, J. M., Cate, J. H., et al. (2013). Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 15, pp. 226-234.
- Olsson, L. (2007). *Biofuels* (Vol. 108). Springer.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., & Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH Homeostasis in Bacteria: New Insights. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1717(2), pp. 67-88.
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M., & J., N. (2012). *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 11, p. 136.



- Peng, L., & Chen, Y. (2011). Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 35(4), pp. 1600-1606.
- Piotto, Z. C. (2003). *Eco-eficiência na Indústria de Celulose e Papel - Estudo de Caso*. Tese de Doutorado, São Paulo.
- Polymer Laboratories. (2004-2005). Chromatography Products from Polymer Laboratories. (3), 1-138.
- Rosa, F., & Sá-Correia, I. (1992). Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, pp. 23-27.
- Saghbini, M., Hoekstra, D., & Gautsch, J. (2001). Media Formulations for Various Two-Hybrid Systems. In P. N. MacDonald, *Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols* (Vol. 177, pp. 15-39). Springer.
- Schmidt, F. R. (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, pp. 425-435.
- Seo, H.-B., Kim, S. S., Lee, H.-Y., & Jung, K.-H. (2009). High-level Production of Ethanol during Fed-batch Ethanol Fermentation with a Controlled Aeration Rate and Non-sterile Glucose Powder Feeding of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, pp. 591-598.
- Shah, F. A., Aziz, S., Memon, H. U., Ali, Z. M., & Rajoka, M. (2011). Effect of Agitational Intensity on Ethanol Production by Eco-molasses an Industrial Waste Through Yeast *Saccharomyces cerevisiae* at Digitally Controlled Pilot Scale Bioreactor. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 1-6.
- Sharma, S. C. (1997). A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 152, pp. 11-15.
- Sigma Aldrich. (2013). *Malt extract*. Obtido em 27 de Julho de 2013, de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/70167?lang=pt&region=PT>
- Sigma Aldrich. (2013). *Peptone from soybean, enzymatic digest*. Obtido em 28 de Julho de 2013, de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/87972?lang=pt&region=PT>
- Sigma Aldrich. (2013). *Yeast Extract*. Obtido em 28 de Julho de 2013, de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/70161?lang=pt&region=PT>
- Snoep, J. L., Mrwebi, M., & Schuurmans, J. M. (2009). Control of specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 155, pp. 1699-1707.
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P., & Stanley, G. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 109, pp. 13-24.
- Stenberg, K., Galbe, M., & Zacchi, G. (2000). The influence of lactic acid formation on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, pp. 71-79.
- Toivari, M. H., Ruohonen, L., Miasnikov, A. N., Richard, P., & Penttilä, M. (2007). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Conversion of d-Glucose to Xylitol and Other Five-Carbon Sugars and Sugar Alcohols. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), pp. 5471-5476.

## BIBLIOGRAFIA

- Toriya, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rosès, N., Mas, A., et al. (2003). Effect of Organic Acids and Nitrogen Source on Alcoholic Fermentation: Study of Their Buffering Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 916-922.
- Van Hoek, P., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1998). Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker's Yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), pp. 4226-4233.
- Van Maris, A. J., Abbott, D. A., Bellissimi, E., Van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A., et al. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, pp. 391-418.
- Vane, L. M. (2008). Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 2, pp. 553-588.
- Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E., & Calabrò, V. (2012). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. In M. A. Lima, *Bioethanol* (pp. 95-122). InTech.
- Walker, G. M. (2010). *Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol*. Scotland.
- Wang, M., Zhao, J., Yang, Z., Dud, Z., & Yang, Z. (2007). Electrochemical insights into the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, 71, pp. 107-112.
- Weusthuis, R. A., Adams, H., Scheffers, W. A., & Johannes, P. v. (1993). Energetics and Kinetics of Maltose Transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a Continuous Culture Study. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), pp. 3102-3109.
- Zhu, M. J., Zhu, Z. S., & Li, X. H. (2011). Bioconversion of paper sludge with low cellulosic content to ethanol by separate hydrolysis and fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 10(66), pp. 15072-15083.

# ANEXOS

A grayscale photograph of a laboratory setup. In the center, a piece of equipment with a motor and various tubes is connected to several glass bottles on a tray. The word "ANEXOS" is overlaid in white serif font. The background shows a tiled wall and a power outlet.







## ANEXO I – MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES (MÉTODO DO DNS E MÉTODO DO DNS MODIFICADO)

### Método do DNS

Começou-se por preparar uma solução A dissolvendo, a quente, 5g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Acros Organics) em 100mL de solução de hidróxido de sódio (Fisher Chemical) 2M, num copo, em banho-maria. De seguida preparou-se uma solução B dissolvendo 150g de tartarato duplo de sódio e potássio (Fisher Chemical) em água destilada e perfazendo com água até ao volume de 250mL. Por fim, obteve-se a solução C adicionando-se, a quente, 100mL da solução A e 250mL da solução B e perfazendo-se o volume com água até 500mL.

Para a realização do método do DNS procedeu-se da seguinte forma: (i) mediu-se para um tubo de ensaio 1mL de solução a ser analisada (padrão ou amostra), adicionou-se 1mL de solução C e agitou-se; (ii) fechou-se o tubo com rolha de alumínio e colocou-se num banho de água a ferver durante 5 minutos; (iii) arrefeceu-se o tubo num banho de gelo; (iv) adicionou-se 10mL de água destilada; (v) agitou-se e, após 15 minutos, leu-se a absorvância a 540nm contra um branco de água destilada que sofreu o mesmo tratamento.

### Método do DNS modificado

Ao tratar-se da solução para o método do DNS modificado a preparação do reagente C' foi feita dissolvendo 10,6g de ácido 3,5 dinitrosalicílico e 19,8g de hidróxido de sódio em 1416mL de água destilada, acrescentando-se, de seguida, 306g de tartarato de potássio (Fisher Chemical), 8,3g de metabissulfito de sódio (Panreac) e 7,6mL de fenol (Panreac) (fundido a 50°C) (Adney & Baker, 1996).

No caso do método do DNS modificado, as soluções padrão de glucose foram preparadas com uma solução tampão citrato de sódio realizada como se segue.

Para a obtenção de uma solução tampão citrato de sódio com 0,05M preparou-se previamente uma solução de 1M dissolvendo-se 210g de ácido cítrico monohidratado (Fisher Chemical) em 750mL de água destilada. Em seguida adicionou-se entre 50 e 60g de hidróxido de sódio (Fisher Chemical) até obter um pH de ~4,3 e acrescentou-se água destilada até perfazer o volume de 1000mL. A solução tampão citrato de sódio de 0,05M é obtida pela adição de 50mL da solução de 1M em 950mL de água destilada. Para que o pH atinja os 4,5 ajusta-se o mesmo com uma solução de hidróxido de sódio, tal como referido na literatura (Adney & Baker, 1996).

No método do DNS modificado o procedimento foi ligeiramente diferente decorrendo da seguinte forma: (i) mediu-se para um tubo de ensaio 0,5mL de solução a ser analisada (padrão ou amostra); (ii) adicionou-se 1mL de solução tampão; (iii) adicionou-se 3mL da solução C'; (iv) fechou-se o tubo com rolha de alumínio e colocou-se num banho de água a

ferver durante 5 minutos; (v) arrefeceu-se o tubo num banho de gelo; (vi) agitou-se e, após 5 minutos, colocou-se 0,2mL da solução do tubo numa cuvete, adicionou-se 2,5mL de água destilada e leu-se a absorvância a 540nm contra um branco da solução tampão citrato de sódio, de 0,05M, que sofreu o mesmo tratamento (Miller, 1959; Adney & Baker, 1996).



## ANEXO II – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO DNS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES EM CONCENTRAÇÃO DE EQUIVALENTE DE GLUCOSE

A curva de calibração da Figura II.1 foi construída mediante a preparação, em duplicado, de soluções padrão de glucose com concentrações conhecidas e a aplicação do método do DNS, descrito no ANEXO I. Seguiu-se o cálculo da média dos valores obtidos e o ajuste, neste caso de uma reta, por regressão linear.

Esta curva tem como finalidade permitir relacionar a densidade ótica (D.O.) com a respetiva concentração de glucose. Desta forma torna-se possível converter a D.O. registada no método do DNS, aplicado a uma certa amostra, em concentração equivalente de glucose, uma vez que nem todos os açúcares redutores, assim determinados, correspondem a glucose. Têm-se amostras compostas por glucose, xilose e maltose. As curvas de calibração para o método do DNS modificado foram obtidas de forma semelhante, diferindo apenas no método utilizado.

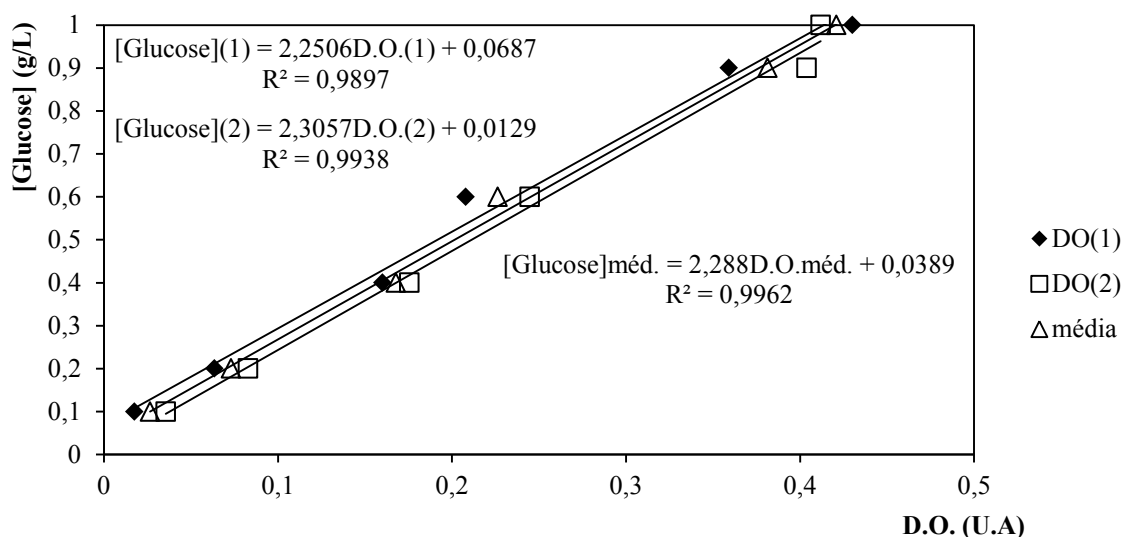


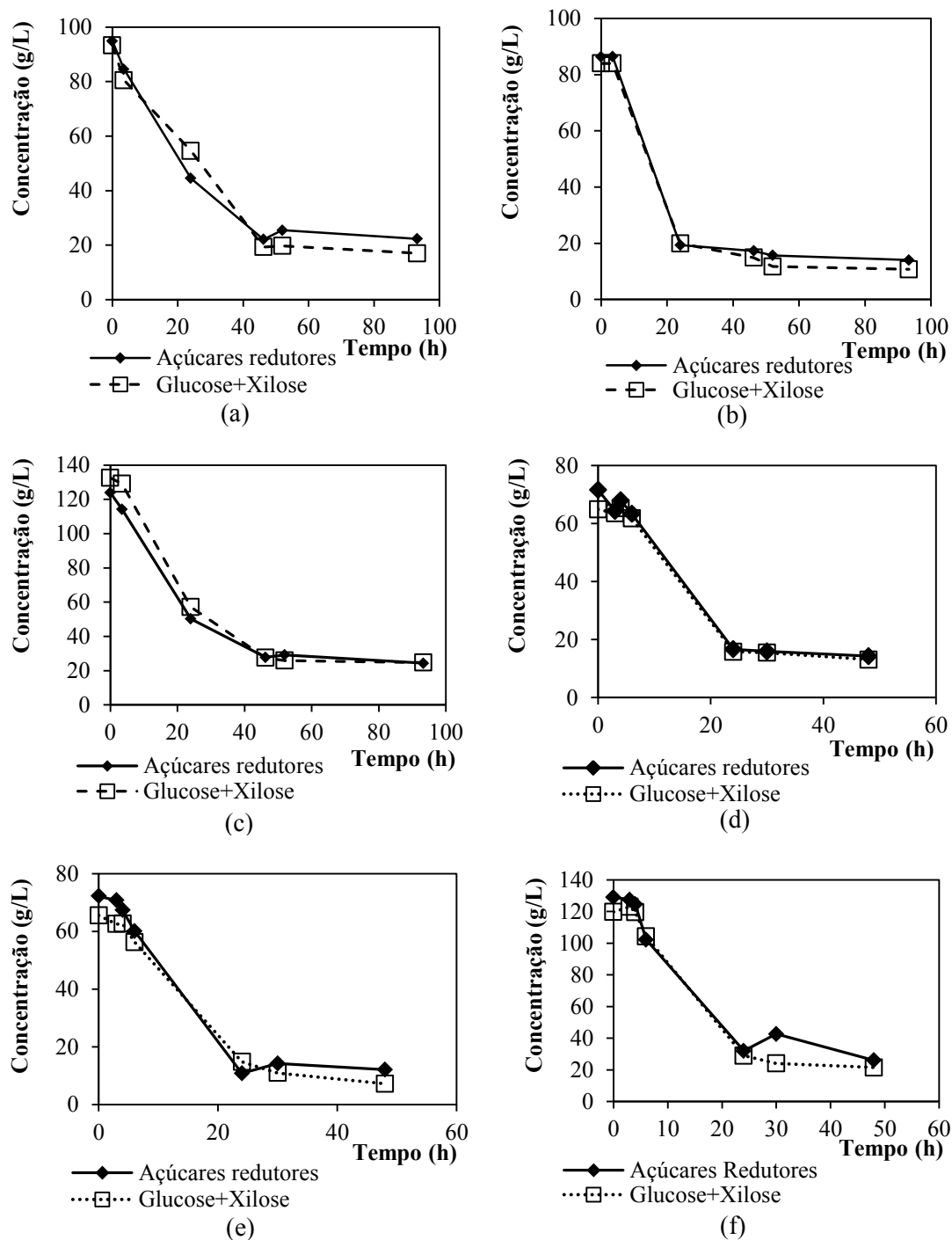
Figura II.1 – Exemplo de curva de calibração do método do DNS.



## ANEXO III – COMPARAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES PELO MÉTODO DO DNS E PELO MÉTODO DE HPLC

A Figura III.1 tem como finalidade a comparação da soma das concentrações de glucose e xilose, determinadas por HPLC, com a concentração dos açúcares redutores (em equivalentes de glucose), obtida pelo método do DNS modificado, para diferentes ensaios. Como se pode verificar a concentração de açúcares redutores ao longo do tempo é muito próxima da soma das concentrações de glucose e xilose, como tal é possível afirmar que os açúcares redutores presentes nestes ensaios dizem maioritariamente respeito à glucose e à xilose.

É de frisar que em alguns desses ensaios (Figura III.1) a concentração de glucose inicial variou um pouco da determinada aquando da caracterização dos hidrolisados, o que se deveu ao tempo mediado entre a caracterização e a realização do ensaio. Embora a caracterização de alguns hidrolisados tenha sido feita pouco tempo antes dos respetivos ensaios, em alguns casos isso não aconteceu. Esta foi outra das limitações encontradas ao longo deste trabalho. A composição deste tipo de matérias-primas não é estática, devido à sua não esterilidade, que a ser atingida implica a perda do valor nutritivo, por exemplo, por reações de acastanhamento, no caso de uma esterilização térmica. Como tal é recomendável uma frequente caracterização, de modo a saber-se, de forma mais rigorosa, a composição da matéria-prima utilizada antes de cada ensaio. No entanto, a não realização da caracterização dos hidrolisados antes de cada ensaio pode ser ultrapassada pela análise das amostras no tempo zero, tal como foi feito em todos os ensaios.



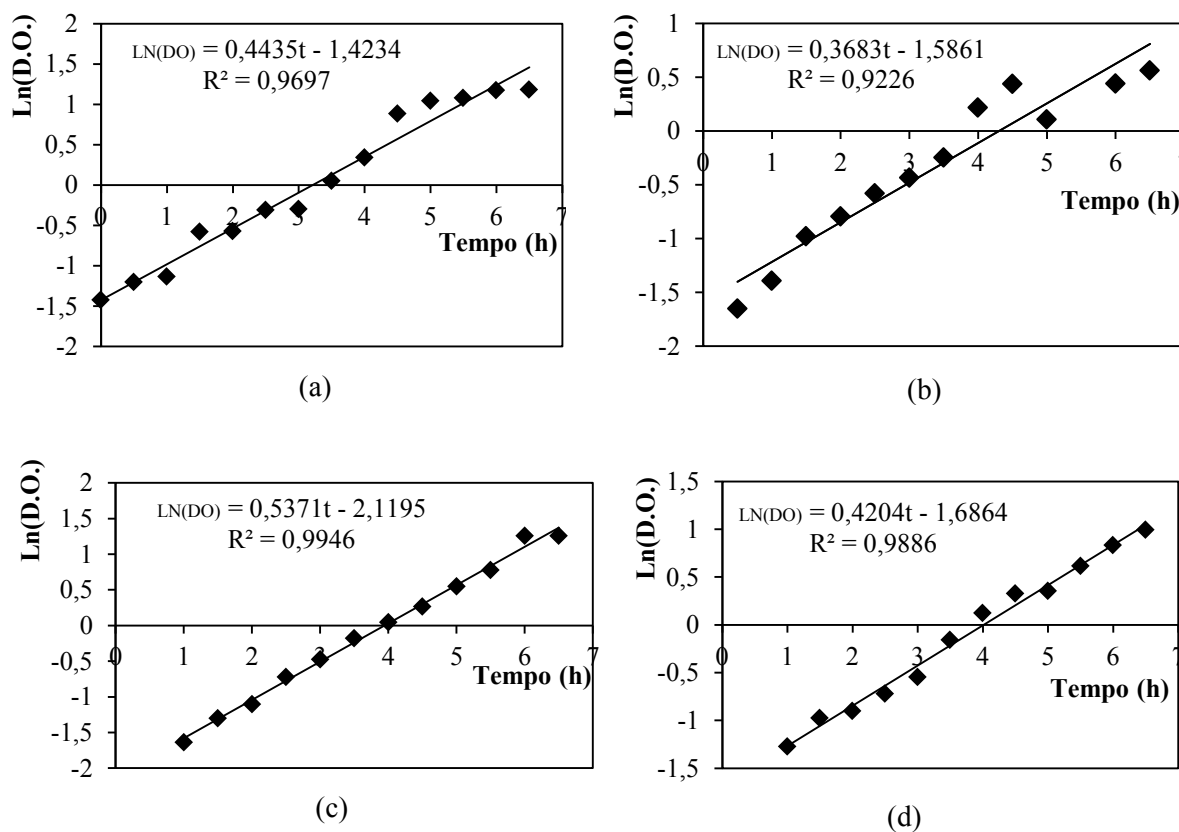
**Figura III.1** – Comparação entre os açúcares redutores, expressos em concentração  $E_{Glu}$ , e a soma entre a concentração de glucose e de xilose determinada por HPLC para: (a) um ensaio de hidrolisado de lamas primárias ( $\approx 106\text{g/L}$  de glucose\*) com compostos alternativos; (b) um ensaio de hidrolisado de lamas primárias ( $\approx 106\text{g/L}$  de glucose\*) com extratos; (c) um ensaio de hidrolisado de pasta branqueada ( $\approx 114\text{g/L}$  de glucose\*) com extratos, sendo os ensaios de (a), (b) e (c) tapados apenas com rolha de algodão e os de (d), (e) e (f) idênticos aos anteriores, mas tapados com mais uma tampa de alumínio. Dados correspondentes aos ensaios da Figura 4.19.

\* Concentração determinada por HPLC

## ANEXO IV – LINEARIZAÇÃO DA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO DE CULTURAS EM MEIO GERAL PARA LEVEDURAS

Os primeiros ensaios realizados com cada uma das leveduras estudadas (Figura 4.1) foram efetuados em duplicado e em cada um deles registou-se a densidade ótica (D.O.) para períodos de tempo de 30 minutos, durante 6,5h. Em seguida identificou-se a respetiva zona de crescimento exponencial e fez-se a sua linearização pela aplicação do logaritmo da D.O. e pelo ajuste de uma regressão linear.

Da linearização da fase exponencial de crescimento resultou a taxa específica de crescimento,  $\mu$ , que é dada pelo declive de cada uma das retas representadas na Figura IV.1 (a), (b), (c) e (d), para cada levedura, respetivamente.



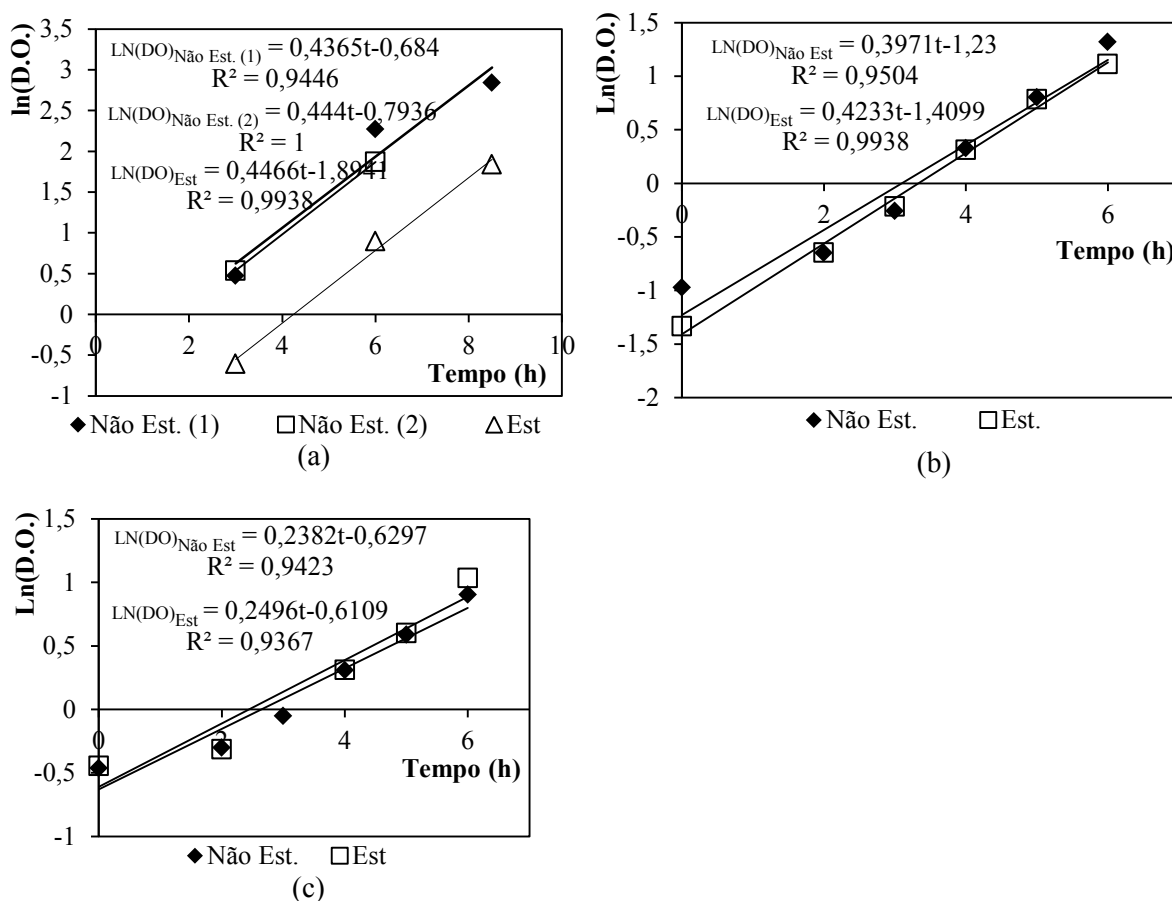
**Figura IV.1** – Média da linearização da fase exponencial de crescimento para cada uma das leveduras: (a) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, (b) estirpe comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, (c) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 e (d) *Pichia stipitis* DSM 3651.



## ANEXO V – LINEARIZAÇÃO DA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO DE CULTURAS ESTERILIZADAS E NÃO ESTERILIZADAS

Tal como no ANEXO IV, teve a necessidade de calcular-se a taxa específica de crescimento,  $\mu$ , neste caso para a comparação de ensaios esterilizados e não esterilizados com a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, a *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 e a *Pichia stipitis* DSM 3651 (Figura V.1). Este anexo serve de complemento à secção 4.1.2 em que se discute a necessidade de esterilizar meios de cultura, que têm como finalidade servir de substrato em processos fermentativos.

Para a determinação de  $\mu$  teve que identificar-se a zona de crescimento exponencial e efetuar-se a sua linearização, pela aplicação do logaritmo da densidade ótica e pelo ajuste de uma regressão linear, sendo que  $\mu$  é dada pelo declive de cada uma das retas representadas.



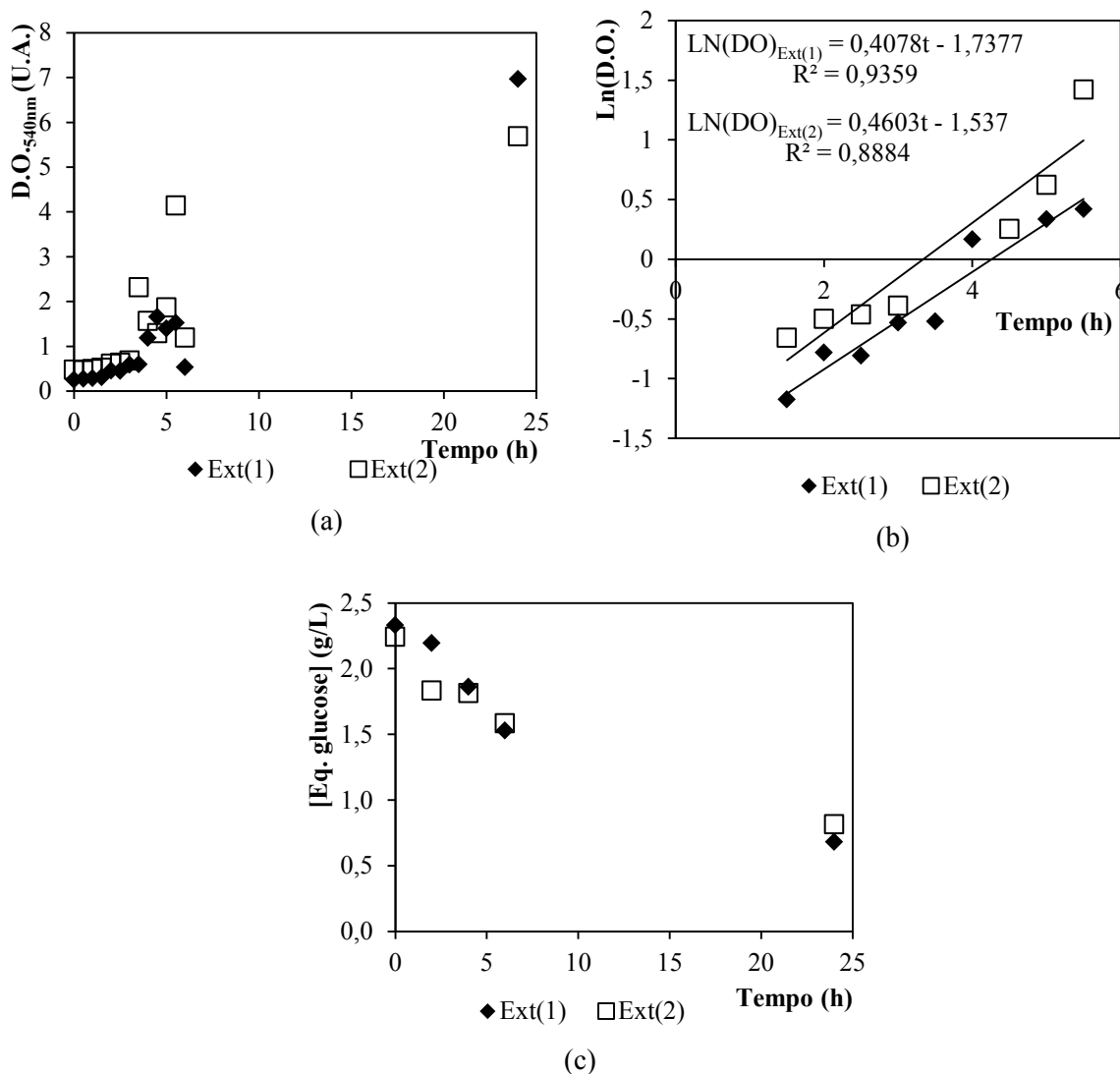
**Figura V.1** – Linearização da fase exponencial de crescimento para cada uma das leveduras: (a) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602; (b) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426; (c) *Pichia stipitis* DSM 3651.





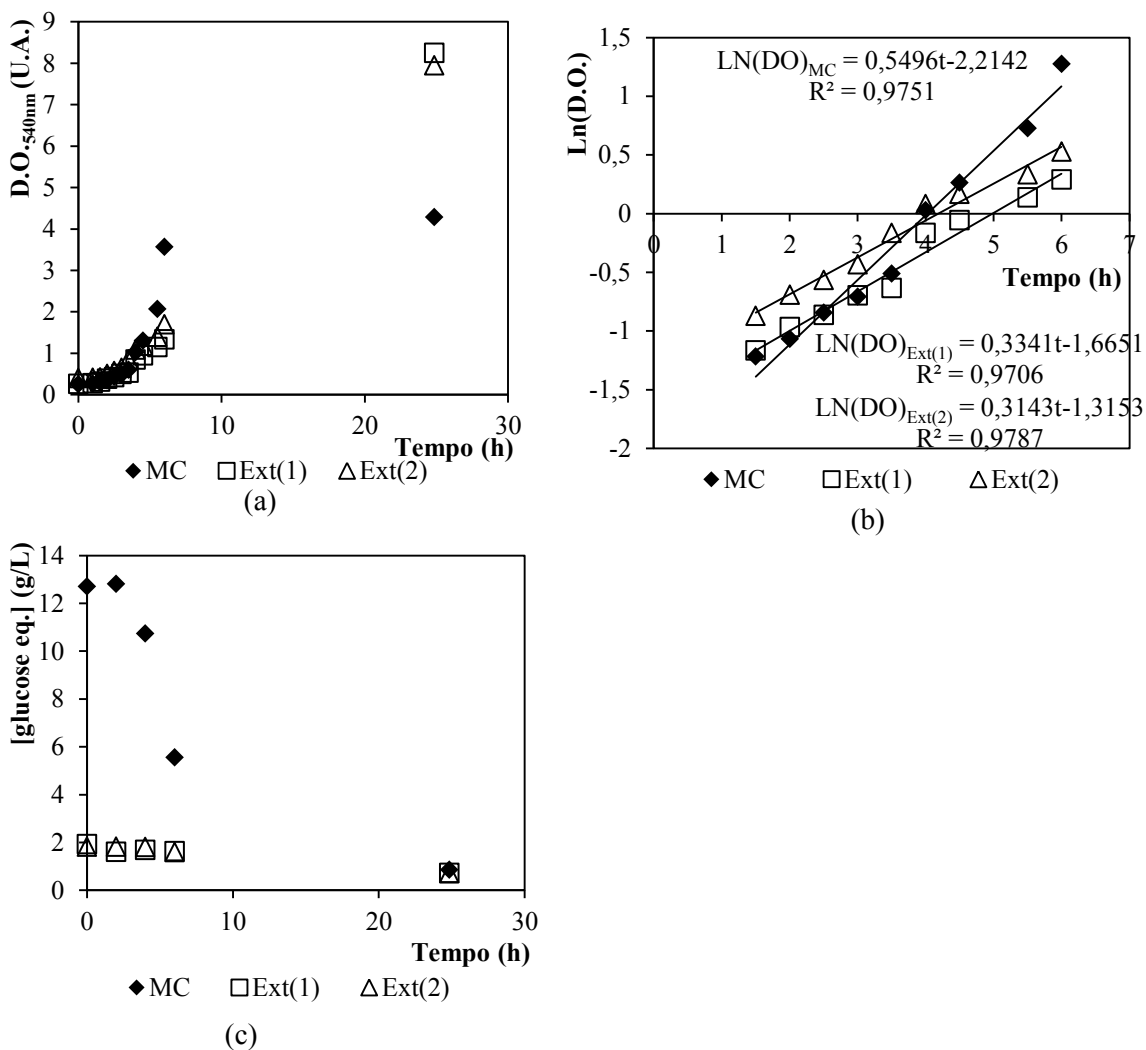
## ANEXO VI – APRESENTAÇÃO DE ENSAIOS APENAS COM EXTRATOS EM CUJA DENSIDADE ÓTICA (D.O.) FOI SUPERIOR À DE ENSAIOS COM MEIO GERAL PARA LEVEDURAS

Os ensaios da Figura VI.1 foram realizados, em duplicado, em Erlenmeyers de 250mL, tapados com rolha de algodão, com um volume de 100mL de meio de cultura composto por 3g/L de extrato de malte, 3g/L de extrato de levedura e 5g/L de peptona dissolvidos em água destilada, ao qual foram adicionados 10mL de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 em fase exponencial de crescimento. A incubação foi efetuada a 30°C, com agitação orbital a 150rpm e um pH inicial de 6.



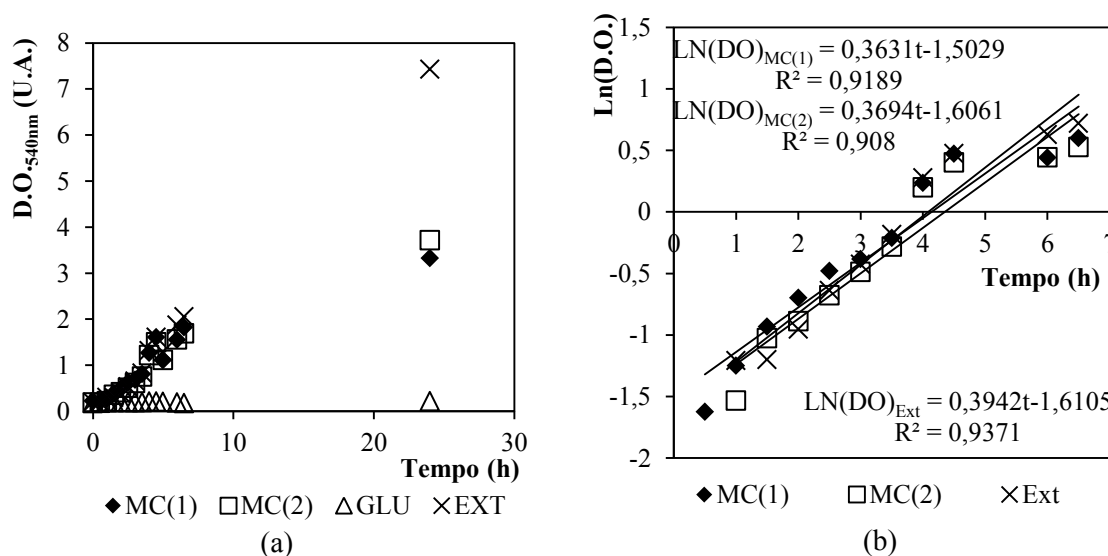
**Figura VI.1** – (a) Curvas de crescimento da *S. cerevisiae* ATCC 26602 para o ensaio com extratos “Ext(1)” e o seu duplicado “Ext(2)”; (b) linearização da fase exponencial de crescimento e (c) concentração dos açúcares redutores ao longo do tempo.

Os ensaios da Figura VI.2 foram realizados em Erlenmeyers de 250mL, tapados com rolha de algodão e rolha de papel de alumínio. O volume de meio de cultura utilizado foi 100mL, sendo que o ensaio “MC” foi efetuado com meio geral para leveduras (Tabela 3.1) e os ensaios “Ext(1)” e “Ext(2)” (duplicado) foram compostos por 3g/L de extrato de malte, 3g/L de extrato de levedura e 5g/L de peptona dissolvidos em água destilada. A todos os ensaios foram adicionados 10mL de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 em fase exponencial de crescimento. A incubação ocorreu a 30°C, com agitação orbital a 150rpm e um pH inicial de 6.



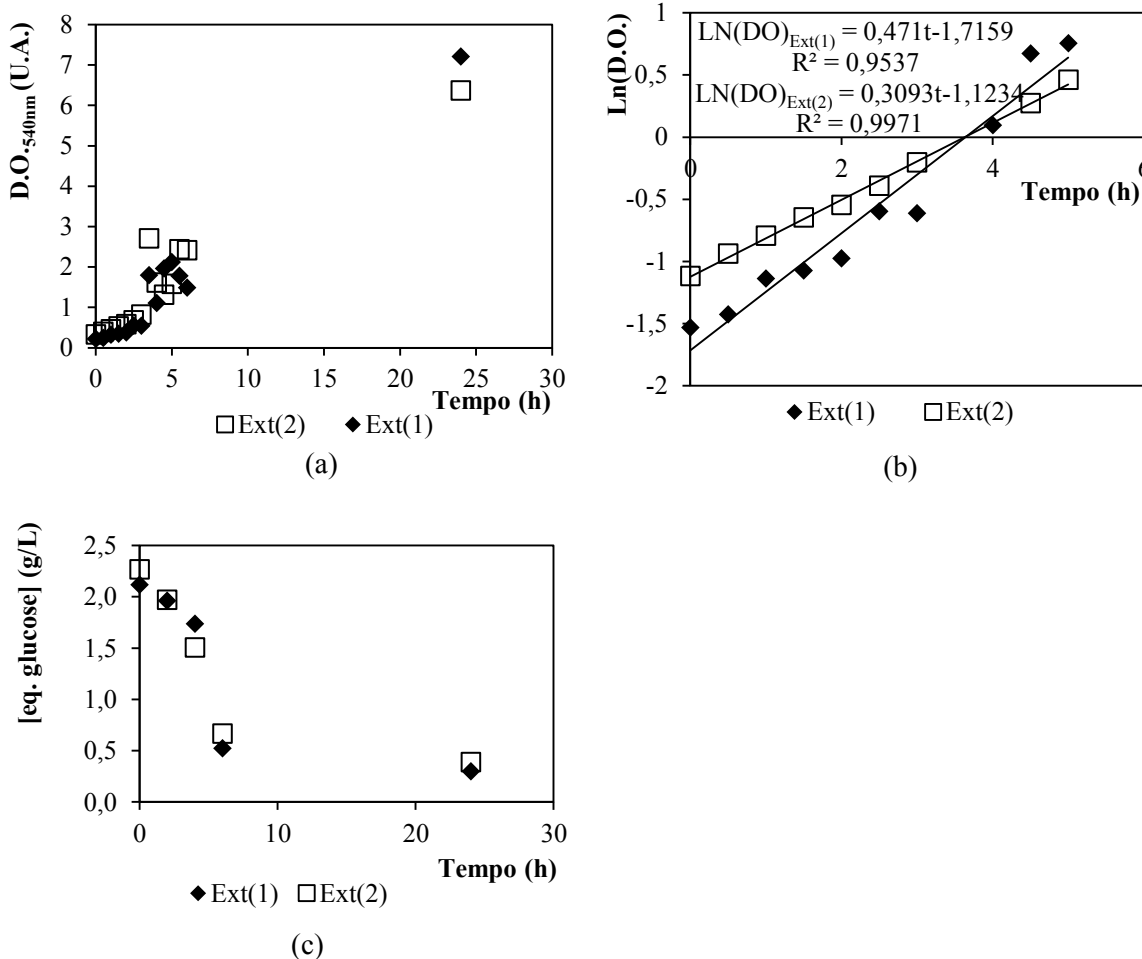
**Figura VI.2** – (a) Curvas de crescimento da *S. cerevisiae* ATCC 26602 para um ensaio com meio completo “MC”, um ensaio com extratos “Ext(1)” e o seu duplicado “Ext(2)”; (b) linearização da fase exponencial de crescimento para cada um dos ensaios e (c) a evolução dos açúcares redutores.

Os ensaios da Figura VI.3 foram realizados em Erlenmeyers de 250mL, tapados com rolha de algodão e com um volume de meio de cultura de 100mL. Os ensaios “MC(1)” e “MC(2)” (duplicado) foram efetuados com meio geral para leveduras (Tabela 3.1). O ensaio “GLU” continha 10g/L de glucose dissolvida em água destilada e o ensaio “Ext” foi composto por 3g/L de extrato de malte, 3g/L de extrato de levedura e 5g/L de peptona também dissolvidos em água destilada. A todos os ensaios foram adicionados 4,7mL de inóculo de uma estirpe comercial de *Saccharomyces cerevisiae* em fase exponencial de crescimento. A incubação ocorreu a 30°C, com agitação orbital a 150rpm e um pH inicial de 6, com exceção para o ensaio “GLU” no qual o pH inicial foi de aproximadamente 4.



**Figura VI.3** – (a) Curvas de crescimento da *S. cerevisiae* (estirpe comercial) para um ensaio com meio completo “MC(1)” e o seu duplicado “MC(2)”, um ensaio apenas com glucose “GLU” e um ensaio com extratos “EXT”; (b) linearização da fase exponencial de crescimento e (c) concentração dos açúcares redutores ao longo do tempo.

Os ensaios da Figura VI.4 foram realizados, em duplicado, em Erlenmeyers de 250mL, tapados com rolha de algodão, com um volume de 100mL de meio de cultura composto por 3g/L de extrato de malte, 3g/L de extrato de levedura e 5g/L de peptona dissolvidos em água destilada, ao qual foram adicionados 3,8mL de inóculo de *Pichia stipitis* DSM 3651 em fase exponencial de crescimento. A incubação foi efetuada a 30°C, com agitação orbital a 150rpm e um pH inicial de 6,5.



**Figura VI.4** – (a) Curvas de crescimento da *P. stipitis* DSM 3651 para um ensaio com extratos “Ext(1)” e seu duplicado “Ext(2)”; (b) linearização da fase exponencial de crescimento e (c) concentração dos açúcares redutores ao longo do tempo.

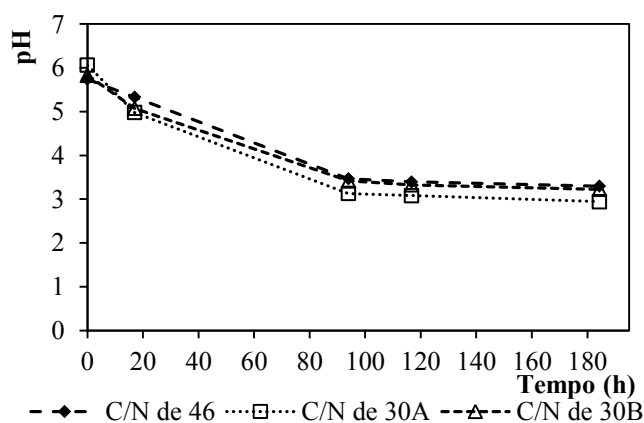
## ANEXO VII – EFEITO DO RÁCIO C/N NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS

Antes de mais torna-se necessário explicar como foram calculados os rácios C/N. Sabe-se pela Tabela 4.9 quais as respetivas contribuições em carbono e azoto dos componentes utilizados nos meios de cultura, como tal obtêm-se as expressões (VII.1) e (VII.2), para os meios com compostos alternativos e extratos, respetivamente.

$$\frac{C}{N} = \frac{0,4 \times [\text{Glucose}]}{0,2119 \times [\text{Sulfato de amónia}]} \quad (\text{VII.1})$$

$$\frac{C}{N} = \frac{0,4 \times [\text{Glucose}]}{0,11 \times [\text{Extrato de levedura}] + 0,09 \times [\text{Peptona}]} \quad (\text{VII.2})$$

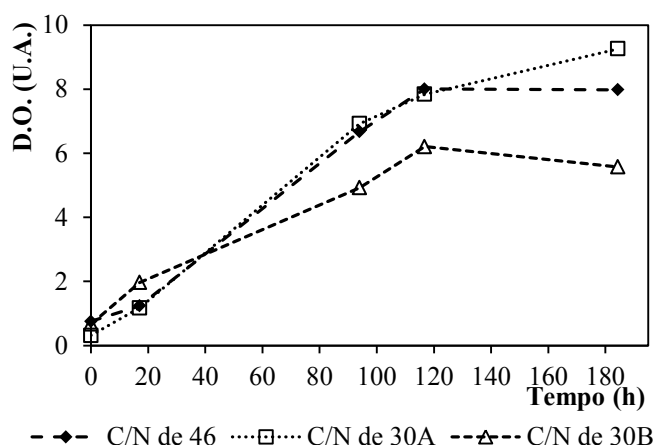
Os ensaios seguintes foram realizados dissolvendo os compostos da Tabela 4.6 num hidrolisado de lamas primárias com  $\approx 121\text{g/L}$  de glucose (determinada por HPLC). O rácio de 46 obteve-se diluindo os compostos alternativos no hidrolisado, nas concentrações indicadas na Tabela 4.6. O ensaio com rácio 30A foi obtido diluindo o hidrolisado de lamas primárias de modo a atingir-se  $79,5\text{g/L}$  de glucose e adicionando sulfato de amónio, bem como os restantes compostos, nas concentrações indicadas na Tabela 4.6. Por fim, o rácio 30B foi obtido adicionando o hidrolisado tal e qual e aumentando o teor em sulfato de amónio para  $\sim 7,6\text{g/L}$ , sendo que os restantes compostos se mantiveram nas mesmas concentrações (apresentadas na Tabela 4.6). O inóculo foi adicionado a partir de uma placa de Petri, com a ajuda de uma ansa à chama do bico de Bunsen e a incubação foi feita em Erlenmeyers de  $250\text{mL}$ , tapados com rolha de algodão, a  $30^\circ\text{C}$ , com agitação orbital a  $150\text{rpm}$ . A variação de pH foi a apresentada na Figura VII.1. O facto do inóculo ter sido obtido de uma placa de Petri poderia ser um fator a considerar no sentido de invalidar estes ensaios, porém a experiência de laboratório mostra que habitualmente o crescimento celular obtido dessa forma é muito significativo cerca de  $24\text{h}$  depois.



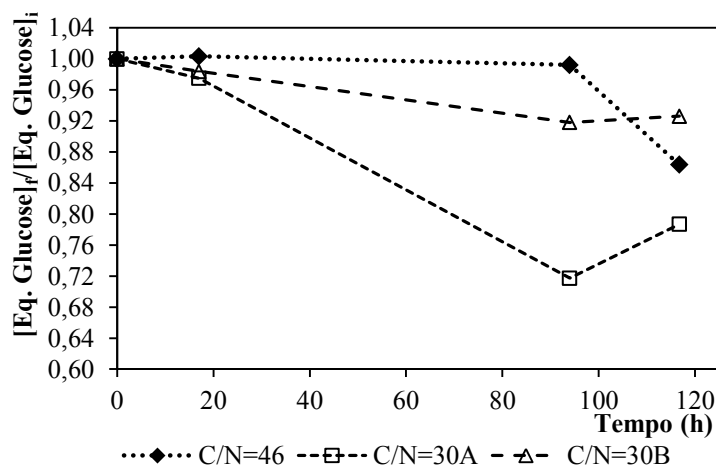
**Figura VII.1** – Evolução do pH ao longo dos ensaios com diferentes rácios C/N.

Seria esperado que os resultados dos ensaios com C/N igual a 30 obtivessem resultados próximos, contudo o que se verificou foi que o resultado do ensaio de C/N=46 foi

mais próximo do de 30A que os de 30 entre si. Outro aspeto a considerar foi que as D.O.'s registadas ficaram aquém do esperado, uma vez que já se obtiveram D.O.'s, para ensaios com hidrolisados de lammas primárias e compostos alternativos aí dissolvidos, entre 8 e 14U.A. (Figura 4.18 e Figura 4.19). Estes resultados sugerem que o hidrolisado utilizado nestes ensaios (que não foi utilizado em nenhuns outros) poderia conter algo que estivesse a inibir o crescimento celular (Figura VII.2). A Figura VII.3, onde se encontra representado o consumo de açúcares redutores, corrobora as conclusões obtidas.



**Figura VII.2** – Curvas de crescimento obtidas com diferentes rácios C/N, sendo que o rácio 30A foi obtido diluindo o hidrolisado de lammas primárias e adicionando sulfato de amónio na mesma concentração indicada na Tabela 4.6, e o rácio 30B foi obtido adicionando o hidrolisado tal e qual e aumentando o teor em sulfato de amónio para ~7,6g/L.



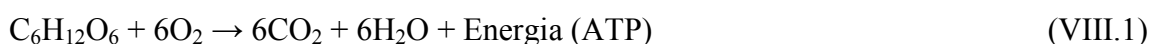
**Figura VII.3** – Fração de açúcares redutores ao longo do tempo para os ensaios com diferentes rácios C/N.

## ANEXO VIII – BALANÇO MÁSSICO AOS REAGENTES E AOS PRODUTOS OBTIDOS NOS ENSAIOS COM O FERMENTADOR DE BANCADA

Este anexo pretende mostrar os balanços mássicos realizados no instante inicial e no instante de maior concentração de etanol, para os ensaios 1, 3 e 5. A finalidade destes balanços é a obtenção da fração mássica de etanol à saída, necessária na avaliação da viabilidade de uma operação de destilação a jusante do fermentador. O ensaio 1 foi realizado com extratos e um hidrolisado de lamas primárias, o ensaio 3 com extratos e um hidrolisado de pasta branqueada e o ensaio 5 com os compostos alternativos aos extratos e com um hidrolisado de lamas primárias.

A metodologia utilizada na realização destes balanços foi a seguinte:

- (i) As concentrações iniciais do extrato de malte, do extrato de levedura, da peptona, do sulfato de amónio, do hidrogenofosfato de potássio, do sulfato de magnésio heptahidratado, do cloreto de sódio e do cloreto de cálcio dihidratado são conhecidas, podendo-se calcular a respetiva massa inicial, sabendo o volume total;
- (ii) Tendo em conta a massa específica,  $\rho$ , pode calcular-se o respetivo volume;
- (iii) As concentrações iniciais e finais da glucose, da xilose, do etanol, do ácido acético, do glicerol e do sorbitol foram determinadas por HPLC, permitindo obter as respetivas massas e volumes, como mencionado atrás;
- (iv) A concentração de sorbitol foi obtida por uma proporção, visto não ter sido determinada a respetiva curva de calibração para o HPLC. Sabendo a concentração de sorbitol injetada na sua identificação (ANEXO IX) e a área do pico correspondente no cromatograma, foi possível determinar a sua concentração, a partir das áreas dos picos obtidas nos ensaios 1, 3 e 5;
- (v) As concentrações iniciais e finais da biomassa foram obtidas mediante a conversão da D.O. ( $\lambda=540\text{nm}$ ) em concentração (em g/L), recorrendo à curva de calibração da Figura 3.4. A massa foi calculada multiplicando a concentração pelo volume total da mistura e o volume foi determinado tendo em conta uma massa específica aproximada à da água;
- (vi) O volume de água foi obtido pela subtração do volume total da mistura ao volume de cada um dos componentes anteriormente mencionados, que conseqüentemente permitiu obter a sua massa;
- (vii) A massa de oxigénio necessária ( $m(\text{O}_2)_i$ ) foi calculada, tendo em conta a estequiometria da reação de respiração (VIII.1), pela expressão (VIII.2) e pressupondo que de toda a glucose disponível apenas 1% (m/m) é utilizada na respiração;



$$m(\text{O}_2)_i = \left( \frac{0,01 \times m(\text{Glucose})_i}{M(\text{Glucose})} \times 6 \right) \times M(\text{O}_2) \quad (\text{VIII.2})$$

- (viii) A massa de  $\text{CO}_2$  libertada foi determinada, tendo em conta a respiração (VIII.1) e a fermentação (VIII.3), pela expressão (VIII.4), que traduz a massa de  $\text{CO}_2$  obtida na respiração mais a massa de  $\text{CO}_2$  obtida na fermentação;



$$m(\text{CO}_2)_f = \left( \frac{m(\text{O}_2)_i}{M(\text{O}_2)} \times M(\text{CO}_2) \right) + \left( \frac{m(\text{Etanol})_f - m(\text{Etanol})_i}{M(\text{Etanol})} \times M(\text{CO}_2) \right) \quad (\text{VIII.4})$$

(ix) Para a determinação da concentração final dos extratos pressupôs-se que todo o azoto da peptona (cerca de 9% da massa inicial de peptona) foi consumido, que 75% (m/m) da maltose presente no extrato de malte (cerca de 60% (m/m) do extrato de malte) foi consumida e que todo o azoto do extrato de levedura (cerca de 11% da massa inicial do extrato de levedura) também foi consumido. Contudo, além destes pressupostos o balanço global dos ensaios 1 e 2 continuava a não fechar por excesso de massa no final, comparativamente ao que estava no início, como tal subtraiu-se 94% e 65% à massa restante de cada componente (peptona, extrato de levedura e extrato de malte) ao ensaio 1 e ao ensaio 2, respetivamente, de modo a que a massa global à entrada fosse idêntica à saída, tendo em conta o princípio de conservação da massa;

(x) Para a determinação da concentração final dos compostos alternativos utilizou-se uma estratégia semelhante. Para o sulfato de amónio pressupôs-se o consumo da totalidade de azoto e enxofre (21 e 24% (m/m) de todo o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), para o hidrogenofosfato de potássio pressupôs-se o consumo de todo o potássio, fósforo e oxigénio (29, 23 e 47% (m/m) do  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , respetivamente), para o sulfato de magnésio heptahidratado considerou-se o consumo da totalidade de magnésio, enxofre e oxigénio (que representam 10, 13 e 71% (m/m) do mesmo, respetivamente), para o cloreto de sódio teve-se em conta o consumo total do sódio (39% (m/m) do  $\text{NaCl}$ ) e para o cloreto de cálcio dihidratado o consumo total do cálcio e do oxigénio (27 e 22% (m/m) do  $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , respetivamente). Como mesmo assim a massa calculada no final continuava superior à calculada no início, optou-se por subtrair mais cerca de 14% da massa inicial de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , que pode representar um consumo de oxigénio, visto este constituir 48% da massa total de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Dessa forma obtiveram-se a Tabela VIII.1, a Tabela VIII.2 e a Tabela VIII.3, respeitantes aos balanços do Ensaio 1, do Ensaio 3 e do Ensaio 5, respetivamente.



**Tabela VIII.1** – Balanço mássico aos reagentes e aos produtos formados na operação de fermentação para o Ensaio 1, tendo em conta os dados da Figura 4.27 e Figura 4.28.

	$\rho$ (g/L)	Início			Fim		
		Conc. (g/L)	Massa (g)	Volume (L)	Conc. (g/L)	Massa (g)	Volume (L)
Peptona	570	5,00	13,75	$2,41 \times 10^{-2}$	-	0,75	$1,32 \times 10^{-3}$
Ext. malte	1540	3,00	8,25	$5,36 \times 10^{-3}$	-	0,27	$1,77 \times 10^{-4}$
Ext. levedura	500	3,00	8,25	$1,65 \times 10^{-2}$	-	0,46	$9,10 \times 10^{-4}$
Glucose	1540	65,64	180,52	$1,17 \times 10^{-1}$	0,00	0,00	$0,00 \times 10^0$
Xilose	1530	16,62	45,71	$2,99 \times 10^{-2}$	17,33	47,66	$3,11 \times 10^{-2}$
Biomassa	998	1,28	3,52	$3,53 \times 10^{-3}$	10,22	28,11	$2,82 \times 10^{-2}$
Água	998	-	2538,84	$2,54 \times 10^0$	-	2539,92	$2,56 \times 10^0$
Etanol	790	2,49	6,83	$8,65 \times 10^{-3}$	34,14	93,88	$1,19 \times 10^{-1}$
Ác. acético	1050	0,00	0,00	$0,00 \times 10^0$	0,00	0,00	$0,00 \times 10^0$
Glicerol	1260	0,00	0,00	$0,00 \times 10^0$	1,44	3,96	$3,14 \times 10^{-3}$
Sorbitol	1490	0,44	1,22	$8,18 \times 10^{-4}$	2,88	7,91	$5,31 \times 10^{-3}$
O <sub>2</sub>	1,331	-	1,92	$1,45 \times 10^0$	-	-	-
CO <sub>2</sub>	1,98	-	-	-	-	85,90	$4,34 \times 10^1$
<b>Totais</b>		(em solução)	<b>2806,89</b>	<b>2,75</b>	(em solução)	<b>2722,91</b>	<b>2,75</b>
		global	<b>2808,82</b>		global	<b>2808,82</b>	

Fração mássica de etanol no instante final = **3,45** %  
 Fração volumétrica de etanol no instante final = **4,32** %

**Tabela VIII.2** – Balanço mássico aos reagentes e aos produtos formados na operação de fermentação para o Ensaio 3.

Composto	$\rho$ (g/L)	Início			Fim		
		Conc. (g/L)	Massa (g)	Volume (L)	Conc. (g/L)	Massa (g)	Volume (L)
Peptona	570	5,00	13,75	$2,41 \times 10^{-2}$	-	4,34	$7,62 \times 10^{-3}$
Ext. malte	1540	3,00	8,25	$5,36 \times 10^{-3}$	-	1,57	$1,02 \times 10^{-3}$
Ext. levedura	500	3,00	8,25	$1,65 \times 10^{-2}$	-	2,56	$5,11 \times 10^{-3}$
Glucose	1540	52,12	143,32	$9,31 \times 10^{-2}$	0,78	2,13	$1,39 \times 10^{-3}$
Xilose	1530	14,63	40,22	$2,63 \times 10^{-2}$	9,20	25,30	$1,65 \times 10^{-2}$
Biomassa	998	1,29	3,55	$3,55 \times 10^{-3}$	9,49	26,10	$2,61 \times 10^{-2}$
Água	998	-	2562,46	$2,57 \times 10^0$	-	2563,31	$2,58 \times 10^0$
Etanol	790	3,59	9,88	$1,25 \times 10^{-2}$	30,41	83,63	$1,06 \times 10^{-1}$
Ác. acético	1050	0,00	0,00	$0,00 \times 10^0$	0,00	0,00	$0,00 \times 10^0$
Glicerol	1260	0,00	0,00	$0,00 \times 10^0$	1,30	3,58	$2,84 \times 10^{-3}$
Sorbitol	1490	0,55	1,51	$1,02 \times 10^{-3}$	2,74	7,54	$5,06 \times 10^{-3}$
O <sub>2</sub>	1,331	-	1,53	$1,15 \times 10^0$	-	-	-
CO <sub>2</sub>	1,98	-	-	-	-	72,65	$3,67 \times 10^1$
<b>Totais</b>		(em solução)	<b>2791,19</b>	<b>2,75</b>	(em solução)	<b>2720,06</b>	<b>2,75</b>
		global	<b>2792,71</b>		global	<b>2792,71</b>	

Fração mássica de etanol no instante final = **3,07** %

Fração volumétrica de etanol no instante final = **3,85** %

**Tabela VIII.3** – Balanço mássico aos reagentes e aos produtos formados na operação de fermentação para o Ensaio 5.

Composto	$\rho$ (g/L)	Início			Fim		
		Conc. (g/L)	Massa (g)	Volume (L)	Conc. (g/L)	Massa (g)	Volume (L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1770	5,00	11,00	6,21×10 <sup>-3</sup>	-	4,49	2,54×10 <sup>-3</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1200	1,00	2,20	1,83×10 <sup>-3</sup>	-	0,03	2,84×10 <sup>-5</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	900	0,50	1,10	1,22×10 <sup>-3</sup>	-	0,06	7,03×10 <sup>-5</sup>
NaCl	2160	0,10	0,22	1,02×10 <sup>-4</sup>	-	0,13	6,18×10 <sup>-5</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1850	0,10	0,22	1,19×10 <sup>-4</sup>	-	0,11	6,06×10 <sup>-5</sup>
Glucose	1540	50,72	111,59	7,25×10 <sup>-2</sup>	1,90	4,18	2,72×10 <sup>-3</sup>
Xilose	1530	14,09	31,01	2,03×10 <sup>-2</sup>	12,34	27,14	1,77×10 <sup>-2</sup>
Biomassa	998	0,42	0,93	9,32×10 <sup>-4</sup>	6,15	13,53	1,36×10 <sup>-2</sup>
Água	998	-	2084,23	2,09×10 <sup>0</sup>	-	2084,90	2,08×10 <sup>0</sup>
Etanol	790	3,03	6,67	8,44×10 <sup>-3</sup>	26,59	58,49	7,40×10 <sup>-2</sup>
Ác. acético	1050	0,00	0,00	0,00×10 <sup>0</sup>	0,00	0,00	0,00×10 <sup>0</sup>
Glicerol	1260	0,00	0,00	0,00×10 <sup>0</sup>	2,09	4,59	3,64×10 <sup>-3</sup>
Sorbitol	1490	0,00	0,00	0,00×10 <sup>0</sup>	0,67	1,47	9,89×10 <sup>-4</sup>
O <sub>2</sub>	1,331	-	1,19	8,93×10 <sup>-1</sup>	-	-	-
CO <sub>2</sub>	1,98	-	-	-	-	51,21	2,59×10 <sup>1</sup>
<b>Totais</b>		(em solução)	<b>2249,17</b>	<b>2,20</b>	(em solução)	<b>2199,15</b>	<b>2,20</b>
		global	<b>2250,358</b>		global	<b>2250,357</b>	

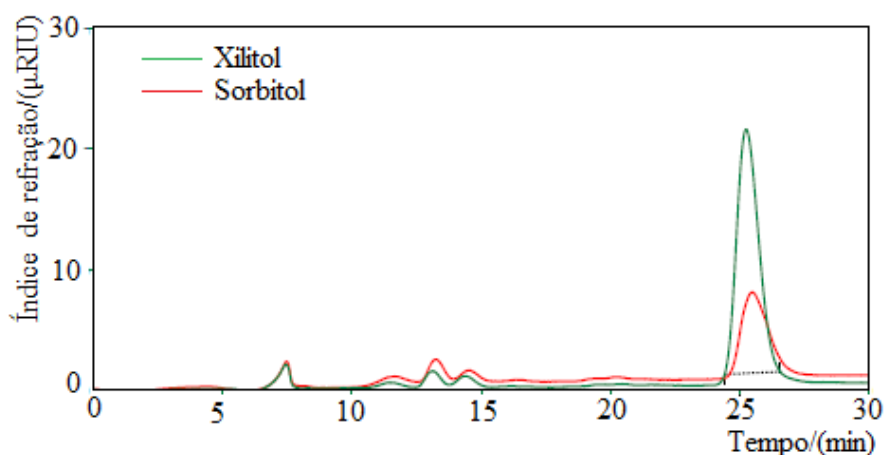
Fração mássica de etanol no instante final = **2,66** %

Fração volumétrica de etanol no instante final = **3,37** %



## ANEXO IX – IDENTIFICAÇÃO DO PICO COM TEMPO DE RETENÇÃO $\approx 25$ MIN.

Ao longo deste trabalho, foram muitas as análises por HPLC em que se detetou um subproduto com tempo de retenção de  $\approx 25$  minutos. Na tentativa de o identificar fizeram-se pesquisas em algumas bibliotecas de compostos. Dessas pesquisas destacou-se uma referência (Polymer Laboratories, 2004-2005), na qual se mencionam diversos compostos para os quais a coluna e o método utilizados neste trabalho são os mais adequados na detecção e quantificação.



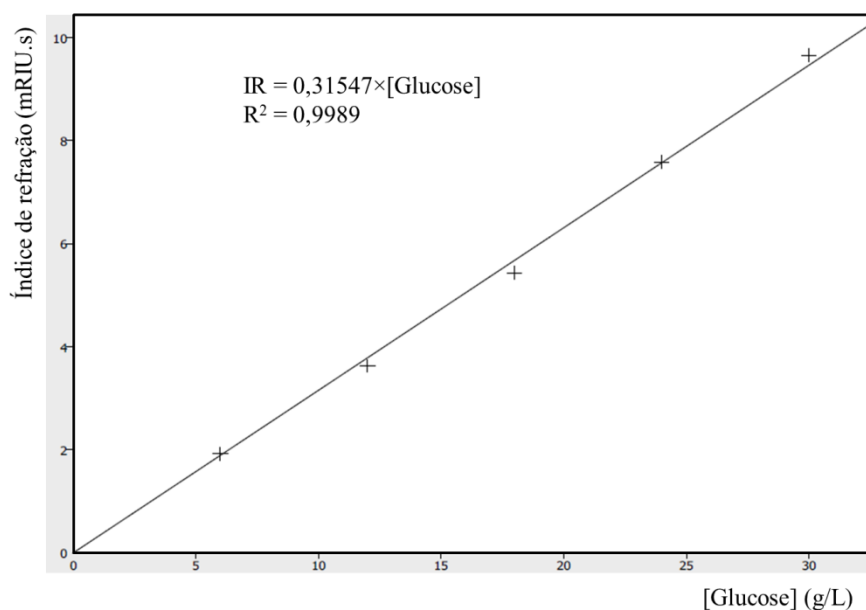
**Figura IX.1** – Ambos os compostos, xilitol e sorbitol, têm um tempo de retenção próximo dos 25min, não sendo possível identificar com toda a certeza qual deles é o composto presente nas amostras analisadas por HPLC.

O sorbitol e o xilitol foram os compostos, da biblioteca consultada, que mais se aproximavam do tempo de retenção referido, como tal injetaram-se esses compostos no equipamento de HPLC (Figura IX.1) e averiguou-se a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* em os sintetizar. A informação obtida foi a de que ela seria capaz de sintetizar sorbitol a partir de misturas de frutose/glucose na fase em que a glucose já se estará a esgotar, utilizando somente a frutose na produção do sorbitol (Duvnjak, *et al.*, 1991). Além disso, foram reportadas estirpes recombinantes de *S. cerevisiae* que conseguem sintetizar xilitol a partir de glucose (Toivari, *et al.*, 2007) e de xilose, embora a *Pichia stipitis* já o consiga fazer naturalmente (Oh, *et al.*, 2013). Porém, não se encontrou informação acerca da produção de xilitol por *S. cerevisiae* sem recorrer à sua modificação, tornando essa possibilidade muito reduzida.

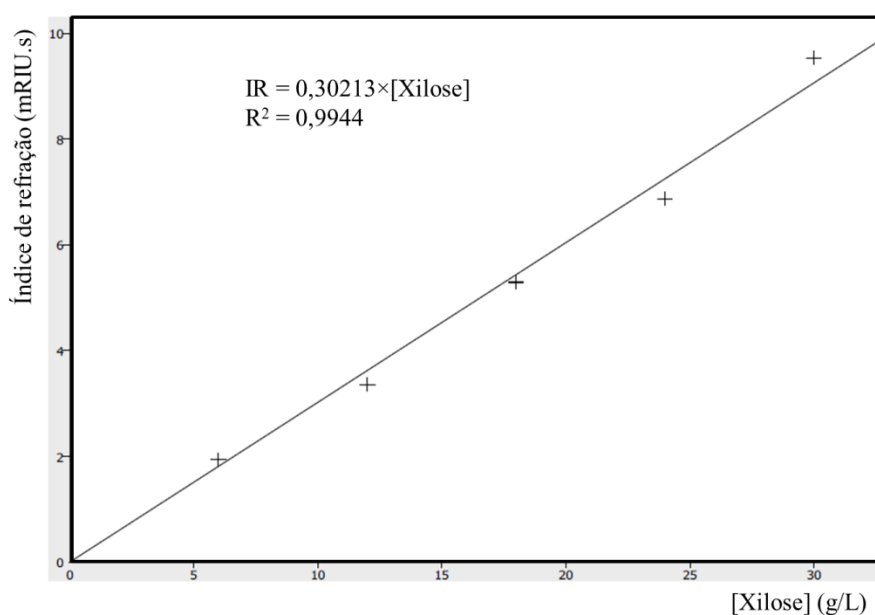


## ANEXO X – CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZADAS NO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) E TEMPOS DE RETENÇÃO DOS DIFERENTES COMPOSTOS

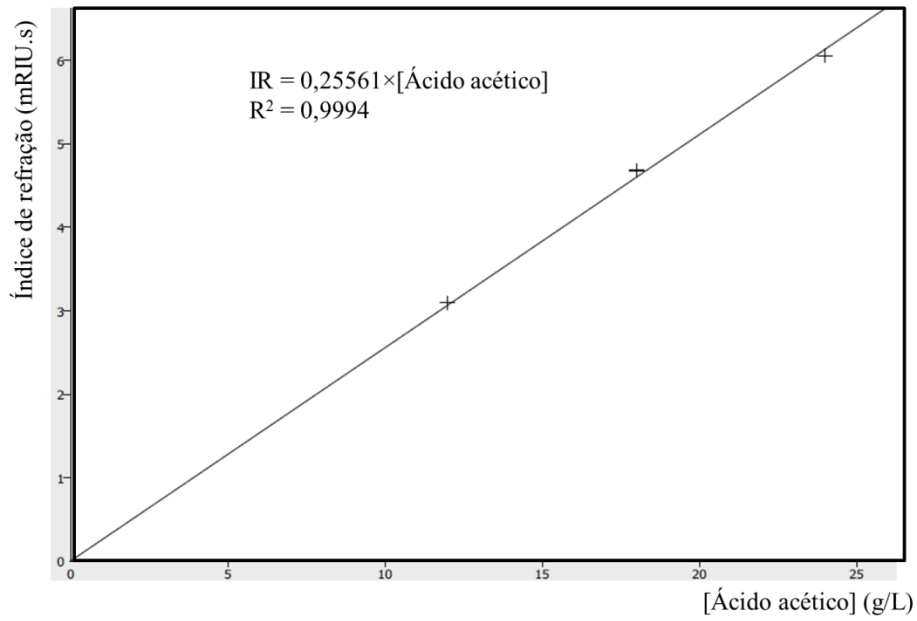
Neste anexo apresentam-se as curvas de calibração usadas na quantificação de glucose, xilose, ácido acético, glicerol e etanol, bem como os respectivos tempos de retenção. Não foram realizadas curvas de calibração para o sorbitol e o xilitol, visto não se ter chegado a uma certeza acerca do composto formado ao longo dos ensaios, além de se encontrar em concentrações pouco significativas.



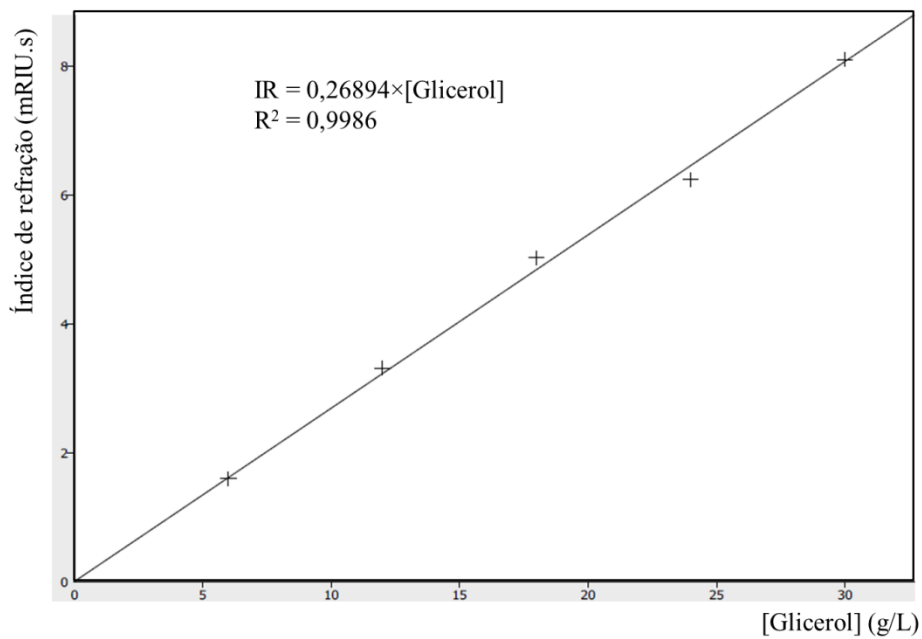
**Figura X.1** – Curva de calibração da glucose que relaciona o índice de refração com a concentração de glucose.



**Figura X.2** – Curva de calibração da xilose que relaciona o índice de refração com a concentração de xilose.

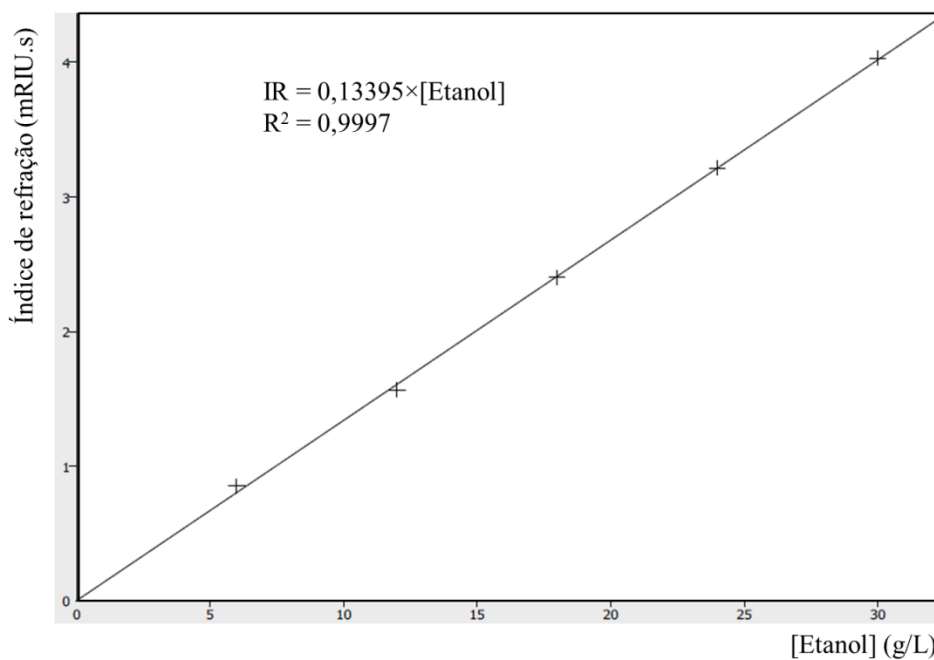


**Figura X.3** – Curva de calibração do ácido acético que relaciona o índice de refração com a concentração de ácido acético.



**Figura X.4** – Curva de calibração do glicerol que relaciona o índice de refração com a concentração de glicerol.





**Figura X.5** – Curva de calibração do etanol que relaciona o índice de refração com a concentração de etanol.

**Tabela X.1** – Tabela que apresenta os tempos de retenção obtidos para cada composto, tendo em conta a coluna e o método utilizado.

Composto	Tempo de retenção (min)
Glucose	13,0
Xilose	14,4
Ácido Acético	15,9
Glicerol	19,3
Etanol	20,0
Xilitol	25,3
Sorbitol	25,5

