UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Bacillus subtilis* E
Saccharomyces cerevisiae NO PROCESSO SIMULTÂNEO DE
SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTÍNUA

ANGELO MAURÍCIO LOTHER
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Dr^a. Marília Oetterer.

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de
concentração : Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 1995

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Lothar, Angelo Mauricio

L882u Utilização de células imobilizadas de *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* no processo simultâneo de sacarificação e fermentação alcoólica contínua. Piracicaba, 1995.

131p.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Amido - Bioconversão 2. Fermentação alcoólica contínua 3. Microbiologia industrial I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba

CDD 660.62
663.13

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Bacillus subtilis* E
Saccharomyces cerevisiae NO PROCESSO SIMULTÂNEO DE
SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA CONTÍNUA

ANGELO MAURÍCIO LOTHER

Aprovada em: 26/06/95.

Comissão julgadora:

Dr^a. Marília Oetterer
Dr^a. Marney Pascoli Cereda
Dr. Murilo de Melo

ESALQ/USP
UNESP/Botucatu
CBTEC/ESALQ/USP

Prof^a. Dr^a. Marília Oetterer
Orientadora

Aos meus pais, Günter e Dilene
à Marilza, ao Peter e à Nicole
dedico.

À Professora e Orientadora

Dr^a. Marília Oetterer

Todo meu carinho, respeito
e homenagem.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e ao Centro de Desenvolvimento Biotecnológico - CDB, de Joinville - SC pela concessão da cota institucional CNPq/RHAE da bolsa de estudos.

A FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio-pesquisa concedido na aprovação do projeto "Desenvolvimento do Processo de Imobilização de Células para Bioconversão de Substrato Amiláceo".

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ/USP, assim como aos professores deste departamento pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao Prof.Dr. Walter Borzani, pelo inestimável incentivo e exemplo de dedicação para com os que se iniciam na pesquisa.

Ao Prof.Dr. M.K. Hamdy, da University of Georgia, pela colaboração, concessão da levedura ATYH (Alcohol Tolerant Yeast Hamdy) utilizada nos experimentos e sugestões para a escolha do suporte.

Ao Prof.Dr. Antônio Joaquim de Oliveira, pelo apoio, amizade, colaboração e pela concessão da cultura do *Bacillus subtilis* utilizado nos experimentos.

Ao Prof.Dr. Flávio Tavares, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelo apoio e confiança no sucesso deste trabalho.

Ao Prof.Dr. Hércio Falanghe, pelos equipamentos cedidos.

Ao Prof.Dr. Cláudio Rosa Gallo, pelos esclarecimentos sempre que solicitados.

À Dr^a. Angela Lucena, da EMBRARAD - Empresa Brasileira de Radiações Ltda., pela irradiação do amido.

A Prof^a. Dr^a. Carmina da Cruz Landin, da UNESP de Rio Claro, pela realização das fotografias em microscópio eletrônico de varredura.

Ao Prof.Dr. Flávio Alterthum do Instituto de Ciências Biomédicas - ICB da USP, pelo apoio e confiança no sucesso deste trabalho.

Ao técnico em computação Hilcias Arruda Nicolau pelo auxílio na arte final.

Ao desenhista do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial Luiz Carlos Rodrigues pelo auxílio na elaboração dos gráficos.

Aos colegas: Ivani, Carlota, Carlos, Cecília e Silvino (técnicos dos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ/USP), Carlos, Flor e Valmir (pós-graduandos), Beatriz, Eliana, Kátia, Mídian e Silvana (bibliotecárias da ESALQ/USP) pela amizade, convivência e incentivo em todos os momentos,

Muito obrigado.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	ix
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVO	05
3. REVISÃO DE LITERATURA	06
3.1. Vantagens da imobilização de células	07
3.2. Principais categorias para a imobilização de células	11
3.3. Metodologias empregadas na imobilização de células	13
3.4. Sacarificação do amido e fermentação alcoólica simultâneas	23
3.5. Hidrólise enzimática do amido	29
3.6. Características dos microrganismos <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Materiais	37
4.1.1. Microrganismos	37
4.1.2. Suporte para a imobilização das células ..	37
4.1.3. Reatores e acessórios	40
4.1.4. Meios de cultura	42
4.1.4.1. Meio para crescimento do <i>Bacillus subtilis</i>	42

4.1.4.2.	Meio para a contagem das unidades formadoras de colônias-UFC	42
4.1.4.3.	Meio para crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
4.1.4.4.	Meio para a alimentação do sistema semi-contínuo - estágio 1	43
4.1.4.5.	Meio para a alimentação do sistema semi-contínuo - estágio 2	43
4.1.4.6.	Meio para a alimentação do sistema contínuo - período 1	44
4.1.4.7.	Meio para a alimentação do sistema contínuo - período 2	44
4.1.5.	Amido solúvel irradiado	44
4.2.	Métodos	45
4.2.1.	Curvas de crescimento para a bactéria e a levedura	45
4.2.2.	Isolamento das colônias e contagem de células	45
4.2.3.	Teste da hidrólise do amido	45
4.2.4.	Caracterização microscópica do amido	46
4.2.5.	Preparo do suporte	46
4.2.6.	Imobilização das células	46
4.2.7.	Determinação do amido	47
4.2.7.1.	Curva padrão para a reação colorimétrica do amido	47
4.2.8.	Determinação de açúcares redutores (AR) ..	47
4.2.8.1.	Curva padrão para a reação colorimétrica de AR	48
4.2.9.	Determinação da glicose	48
4.2.10.	Determinação do teor alcoólico	48

4.2.11. Condução do experimento semi-contínuo ...	49
4.2.12. Condução do experimento contínuo	49
4.2.13. Cálculo da vazão de alimentação	51
4.2.14. Cálculo do tempo de residência	51
4.2.15. Cálculo da taxa de diluição	52
4.2.16. Cálculo do rendimento em álcool	52
4.2.17. Cálculo da produtividade em álcool	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. Curvas de crescimento dos microrganismos	54
5.2. Imobilização das células	57
5.3. Reatores e acessórios	64
5.3.1. Controle da temperatura	65
5.3.2. Eliminação do CO ₂	66
5.3.3. Dimensões dos reatores	67
5.4. Meios de alimentação	67
5.5. Experimento semi-contínuo	70
5.6. Experimento contínuo	88
6. CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
APÊNDICE 1	129
APÊNDICE 2	130
APÊNDICE 3	131

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Curvas de crescimento dos microrganismos	55
Figura 2 - Teores de amido (g/l) em função do tempo (h) no estágio 1 do experimento semi-contínuo com células imobilizadas de <i>Bacillus subtilis</i>	74
Figura 3 - Teores de açúcares redutores - AR (g/l) em função do tempo (h) no estágio 1 do experimento semi-contínuo com células imobilizadas de <i>Bacillus subtilis</i>	77
Figura 4 - Teores de açúcares redutores - AR (g/l) em função do tempo (h) no estágio 2 do experimento semi-contínuo com células imobilizadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
Figura 5 - Teor alcoólico (g/l) em função do tempo (h) no estágio 2 do experimento semi-contínuo com células imobilizadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
Figura 6 - Teores de amido e de glicose (g/l) em função do tempo (h) no reator 1 do experimento contínuo com células imobilizadas de <i>Bacillus subtilis</i> no período 1 (meio MMAI 1%)	92
Figura 7 - Teores de amido e de glicose (g/l) em função do tempo (h) no reator 1 do experimento contínuo com células imobilizadas de <i>Bacillus subtilis</i> no período 2 (meio MMAI 3%)	98
Figura 8 - Teor alcoólico e glicose (g/l) em função do tempo (h) no reator 2 do experimento contínuo com células imobilizadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no período 1	103
Figura 9 - Teor alcoólico e glicose (g/l) em função do tempo (h) no reator 2 do experimento contínuo com células imobilizadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no período 2	108

LISTA DE FOTOGRAFIAS

	Pág.
Fotografia 01a - Suporte para a imobilização, microscópio eletrônico de varredura - MEV em aumento de 75 vezes	38
Fotografia 01b - Suporte para a imobilização, MEV em aumento de 500 vezes	39
Fotografia 02 - Sistema da fermentação contínua utilizado no experimento	41
Fotografia 03a - Células de <i>B. subtilis</i> imobilizadas. MEV em aumento de 90 vezes	58
Fotografia 03b - Células de <i>B. subtilis</i> imobilizadas. MEV em aumento de 2500 vezes	59
Fotografia 03c - Células de <i>B. subtilis</i> imobilizadas. MEV em aumento de 12500 vezes	60
Fotografia 04a - Células de <i>S. cerevisiae</i> imobilizadas. MEV em aumento de 125 vezes	61
Fotografia 04b - Células de <i>S. cerevisiae</i> imobilizadas. MEV em aumento de 750 vezes	62
Fotografia 04c - Células de <i>S. cerevisiae</i> imobilizadas. MEV em aumento de 1250 vezes	63

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Teores de amido em %, g/volume de meio (ml), g/l e % de conversão, em função do tempo (h), no estágio 1 do experimento semi-contínuo	71
Tabela 2 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 1 do experimento semi-contínuo	75
Tabela 3 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 2 do experimento semi-contínuo	81
Tabela 4 - Teor alcoólico em % p/v, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 2 do experimento semi-contínuo	84
Tabela 5 - Teores de amido em %, g/volume de meio (ml), g/l e % de conversão, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 1	89
Tabela 6 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 1	90
Tabela 7 - Teores de glicose em g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 1	91
Tabela 8 - Teores de amido em %, g/volume de meio (ml), g/l e % de conversão, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo-período 2.	95
Tabela 9 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 2	96
Tabela 10 - Teores de glicose em g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 2	97

Tabela 11 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 2 do experimento contínuo - período 1	100
Tabela 12 - Teores de glicose em g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 2 do experimento contínuo - período 1	101
Tabela 13 - Teor alcoólico em % p/v, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no período 1 do experimento contínuo	102
Tabela 14 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 2 do experimento contínuo - período 2	105
Tabela 15 - Teores de glicose em g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 2 do experimento contínuo - período 2	106
Tabela 16 - Teor alcoólico em % p/v, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no período 2 do experimento contínuo	107

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Bacillus subtilis* E
Saccharomyces cerevisiae NO PROCESSO SIMULTÂNEO DE
SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA CONTÍNUA.

Autor: Angelo Maurício Lother

Orientadora: Prof. Dr^a. Marília Oetterer

RESUMO

O trabalho inquirido acerca da utilização de células imobilizadas de *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* no processo simultâneo de sacarificação e fermentação alcoólica contínua foi conduzido através da escolha de um suporte alternativo, para a fixação das células microbianas, por adsorção e pelo emprego de reatores cilíndricos dispostos horizontalmente.

A verificação da potencialidade do suporte e o estabelecimento de parâmetros para o processo contínuo, foram feitos através do experimento semi-contínuo.

O suporte, carvão mineral poroso com densidade de 1600g/l, foi imerso em água por 24h, seco a 105⁰C por 6h e fragmentado em unidades com 10mm de diâmetro. A seguir, foi lavado com solução tampão fosfato 0,2M, pH 7,8, tratado a 500⁰C por 6h e esterilizado a 121⁰C por 15min antes do contato com as células dos microrganismos. Observado através de microscopia eletrônica de varredura, permitiu 90% de eficiência de imobilização, apresentando as características de ser resistente e reutilizável.

A imobilização das células do *B. subtilis*, foi feita após crescimento por 17h e com uma população da ordem de 3×10^6 UFC/ml; após centrifugação (550G por 30min) as células foram recolhidas em tampão fosfato 0,2M, pH 7,0. Nova centrifugação foi realizada na mesmas condições e as células

recolhidas em tampão fosfato foram colocadas em contato com o suporte por 3h em agitador a 35°C. A quantidade de células imobilizadas foi de $2,7 \times 10^6$ UFC/ml.

A imobilização das células da *S. cerevisiae*, foi feita após crescimento por 24h e com uma população da ordem de 9×10^7 células/ml; após centrifugação (550G por 15min) as células foram recolhidas em tampão citrato-fosfato (CPB) 0,05M, pH 3,5. Nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e as células recolhidas em CPB foram colocadas em contato com o suporte por 3h em agitador a 35°C. A quantidade de células imobilizadas foi de $8,1 \times 10^7$ células/ml.

Os reatores cilíndricos construídos em vidro e acrílico, com dimensões de 86,0 x 8,0cm e volume de 4,32 l foram projetados com orifícios a cada 12cm, para permitir o escape do CO₂. A temperatura foi controlada por banho termostático regulado a 35°C. Os reatores foram acoplados e dispostos horizontalmente, ligeiramente inclinados, com vazão de alimentação controlada por meio de bomba peristáltica. O efluente foi recolhido por gravidade, na saída do reator 2, em frasco erlenmeyer.

Os meios de alimentação denominados meio modificado com amido irradiado - MMAI 1% e 3%, foram compostos de peptona, triptona, extrato de levedura, amido solúvel irradiado (25 kGy) e sais minerais ajustado a pH 6,8. O acompanhamento das fermentações foi feito através das análises de amido, açúcares redutores, glicose e teor alcoólico.

O experimento semi-contínuo utilizando meio com 1% de amido, operou por 238h, Q_{a1} 16,37ml/h, θ 48,8h e D $0,02h^{-1}$, com efetiva conversão do amido de 87,51% e produção média de 2,0g/l de AR. Com meio a 9% de glicose e utilizando meio bioconvertido, operou por 214h, a Q_{a1} 16,6ml/h, θ 54,2h

e $D\ 0,02h^{-1}$, com produção média de 8,82g/l de álcool.

O processo contínuo operou satisfatoriamente por 550h, a $Q_{a1}\ 62,5ml/h$, $\theta\ 35,2h$ e $D\ 0,03h^{-1}$. Em meio com 1% de amido, a conversão média do amido foi de 86,0%, em AR de 8,72% e em glicose de 2,44%. Em meio com 3% de amido, a conversão média do amido foi de 81,6%, em AR de 10,62% e em glicose de 3%.

O rendimento em álcool foi de 93,9% às 84h e 74,4% nas 134h subsequentes; chegando a 100% até as 442h, período este referente a fermentação do meio bioconvertido a partir de 3% de amido. As produções médias de álcool, considerando os períodos acima, foram de 2,30g/l, 1,80g/l e 2,90g/l e as produtividades médias de 0,20, 0,13 e 0,27g/l.h⁻¹.

Pode-se ressaltar como pontos favoráveis desta pesquisa (1) a condução do processo a temperaturas baixas, da ordem de 35⁰C, (2) utilização de suporte de alta eficiência para a imobilização, resistente e reutilizável, (3) reatores acoplados permitindo a ação independente das enzimas em cada substrato e (4) reatores dispostos de forma a facilitar a remoção de produtos inibitórios finais.

THE USE OF IMMOBILIZED *Bacillus subtilis* AND *Saccharomyces cerevisiae* CELLS FOR STARCH SACCHARIFICATION AND SIMULTANEOUS CONTINUOUS ALCOHOLIC FERMENTATION

Author: Angelo Maurício Lother

Advisor: Dr. Marília Oetterer

SUMMARY

This work deals with the use of immobilized *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae* cells for starch saccharification and simultaneous continuous alcoholic fermentation process. It was carried out choosing an alternative support for fixing the microbial cells by adsorption and by the use of cylindrical reactors set horizontally.

The support as potential checking and parameters setting for the continuous process were carried out in a semi-continuous experiment.

The support, a porous mineral coal showing a density of 1,600 grams per liter, was immersed for 24 hours in tap water, dried for 24 hours at 105°C, and fragmented to pieces of 10mm diameter. Then, the pieces were washed in phosphate buffer 0.2M, pH 7.8 for 6 hours at 500°C and sterilized for 15 minutes at 121°C before contact with microorganism cells. It was observed by scanning electron microscopy to show 90% of immobilization in efficiency, presenting resilience characteristics for the reutilization.

The *Bacillus subtilis* cells immobilization were carried out after growing them for 17 hours with a population of about 3×10^6 CFU/mL; after the centrifugation (550G for 30 min) the cells were placed in phosphate buffer 0.2M, pH 7.0. Another centrifugation was carried out at the

same conditions and the cells put in phosphate buffer contacting the support for 3 hours in a agitador at 35°C. The amount of immobilized cells were 2.7×10^6 CFU/mL.

The *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization were carried out after growing them for 24 hours with a population of about 9×10^7 cells/mL; after the centrifugation (550G for 15 min) the cells were placed in citrate phosphate buffer - CPB 0.05M, pH 3.5. Another centrifugation was carried out at the same condition and the cells put in CPB contacting the support for 3 hours in a agitador at 35°C. The amount of immobilized cells were 8.1×10^7 cells/mL.

The cylinder reactors, built in glass and acrylic, size 86.0 x 8.0cm and volume 4.32 L were designed with holes each 12cm apart to allow CO₂ release. The temperature was controlled by a thermostatic bath remaining at 35°C. The reactors were coupled horizontally, slightly inclined, with a flow rate controlled by a peristaltic pump. The effluent was collected by gravity at the way out of reactor 2 in erlenmeyer flasks.

The feedstocks called modified irradiated starch medium - MISM 1% and 3% were prepared using peptone, tryptone, yeast extract, irradiated soluble starch (25kGy) and mineral salts and adjusted to pH 6.8. The fermentation monitoring was carried out by starch, reducing sugars, glucose and alcohol analyses.

The semi-continuous experiment using the feedstock with 1% starch, worked for 238h, with a flow rate 16.37ml per hour, 48.8h residence time and 0.02h^{-1} dilution rate, had an effective starch conversion of 87.51% and an average of reducing sugars of 2g/L. Having a medium of 9% of glucose and using a bioconverted medium, it worked for 214h, with a flow rate of 16.6mL/h, 54.2h residence time and 0.02h^{-1}

dilution rate, with an average alcohol production rate of 8.82g/L.

The continuous process worked satisfactorially for 550h, 62.5mL/h flow rate, 35.2h residence time and 0.03h^{-1} dilution rate. In a 1% starch medium, the average total conversion of starch was 86%; being 8.72% to reducing sugars 8.72% and 2.44% to glucose. In a 3% starch medium, the average total conversion of starch was 81.6%; being 10.72% to reducing sugars and 3% to glucose.

The alcohol yield at 84h was 93.9% and in the following 134 hours was 74.4%, reaching 100% at 442h. These times refer to the bioconverted medium starting from 3% starch. The average alcohol production considering the timing above was 2.30, 1.80 and 2.90g/L and the average productivity was 0.20, 0.13 and 0.27g/L.h^{-1} .

Favorable points can be enhanced in this research (1) to carry out the process at low temperatures, around 35°C ; (2) the use of high efficiency support for the immobilization, resilient and reusable; (3) coupled reactors allowing an independent enzyme action in each substrate and (4) reactors setting in a way to make easier the final removal of inhibitory by-products.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos mais eficientes para a produção de etanol é esperado no que tange aos aspectos produtivos e econômicos, uma vez que a maior parte do etanol produzido hoje por fermentação está relacionada com os tradicionais processos em batelada cujas desvantagens são o longo tempo de fermentação, o contínuo "start up" do processo com a interrupção da operação, os altos custos laboratoriais e o requerimento de reatores de grandes volumes.

As tecnologias utilizadas em batelada, ou em reatores contínuos, empregam células livres. Porém, alta produtividade, altas concentrações de etanol e alto rendimento não são facilmente obtidos com estes reatores (JAIN et al., 1985).

Há evidências de que novos processos biotecnológicos advindos dos avanços ocorridos na engenharia genética, juntamente com a imobilização de células, serão ferramentas importante para um maior desenvolvimento tecnológico e comercial. Diversas indústrias, dos mais variados setores como sucroalcooleira, farmacêutica, química e de alimentos e bebidas poderão, futuramente, absorver esta tecnologia.

LINKO & LINKO (1981), relatam que processos contínuos para a produção de etanol empregando leveduras imobilizadas oferecem uma alternativa viável para a produção econômica de etanol, pelo menor tempo de residência do substrato no reator e pela facilidade do controle na adição

de nutrientes ao meio. Desta forma, o processo poderia ser utilizado em maior escala para a produção de etanol e de bebidas alcoólicas.

Com a ação de microrganismos específicos, diversas fontes de amido podem ser utilizadas para serem bioconvertidas em açúcares diretamente fermentescíveis, e transformados em etanol, posteriormente, em processo contínuo.

Este aspecto torna-se atraente pelo fato de se poder dar uma nova utilização aos resíduos amiláceos agroindustriais, bem como de se poder progredir em pesquisas a respeito dos melhores microrganismos e processos para a implantação deste sistema.

De acordo com CHIBATA et al. (1983 e 1985), entre os processos mais eficientes, as técnicas de fermentação contínua têm sido muito pesquisadas, mas ocorreram alguns problemas com relação a estabilidade e a eficiência do processo. Por outro lado, os processos desenvolvidos recentemente utilizando biomassa celular imobilizada, mostram-se atraentes para a produção mais econômica de etanol, sendo a produção contínua por este sistema superior aos processos convencionais.

Segundo GIORDANO (1987), a fermentação contínua com células imobilizadas é uma tecnologia prominente, uma vez que permite a manutenção de altas cargas de microrganismos no reator, com conseqüente aumento na produção, eliminando os custos com separação e reciclo das leveduras. Na produção de etanol, a partir de amiláceos, o tempo de hidrólise, a energia gasta para a reação e o preço da enzima representam um custo adicional em relação ao uso da matéria-prima diretamente fermentescível.

O processo de sacarificação do amido e fermentação alcoólica simultânea reduz os custos energéticos

pois a sacarificação a 60°C passa a ser efetuada a 30°C. A velocidade de hidrólise é menor, mas há redução do efeito inibidor da glicose formada, uma vez que esta é utilizada pelo microrganismo assim que se forma, não se acumulando no meio (GIORDANO, 1987).

Segundo PAREKH & WAYMAN (1987), a otimização do desempenho de um reator requer o desenvolvimento de um processo mais eficaz, com redução dos custos, o que essencialmente significa: a) operação contínua, b) alta população de células no reator, c) menor tempo de residência, d) alta concentração de etanol no produto e, e) contínua e rápida remoção dos produtos inibitórios finais, especialmente o CO₂.

Segundo TYAGI et al. (1992), um sistema de imobilização de células microbianas pode ser utilizado para melhorar o desempenho de uma fermentação contínua clássica ou um processo convencional em batelada para a produção de etanol, pelo aumento da população de células por unidade de volume do reator. A operação contínua utilizando uma velocidade específica de alimentação maior que a velocidade específica de crescimento altera a fisiologia do microrganismo, devido às mudanças físico-químicas que ocorrem no microambiente ao redor das células, reduzindo os efeitos inibitórios do substrato, do produto ou ambos. Deste modo, os efeitos combinados destes fatores podem levar a uma melhoria na eficiência do sistema, resultando em aumento da produtividade.

JONES et al. (1981), estudando o efeito do ambiente e outras variáveis na fermentação alcoólica de leveduras, concluíram que: a) a otimização dos processos é afetada em função da necessidade de ajustes para os vários parâmetros, a saber pH, temperatura, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes, formação do etanol e formação de

CO₂; b) a inibição pelo etanol formado no processo fermentativo é um sério obstáculo para uma elevada produtividade em processos contínuos, devendo haver esquemas definidos de remoção do etanol assim que este seja formado; c) a interação entre os vários parâmetros de controle ainda não está bem entendida, prevalecendo a necessidade de um maior número de trabalhos com este enfoque.

2. OBJETIVO

No presente trabalho procurou-se obter a sacarificação do amido e a fermentação alcoólica simultâneas com o emprego de células imobilizadas de *Bacillus subtilis* e de *Saccharomyces cerevisiae*, em suporte inorgânico poroso e em processo contínuo, conduzido em reatores cilíndricos, construídos em vidro e dispostos horizontalmente.

Para alcançar o objetivo proposto, o desempenho dos microrganismos imobilizados foi verificado em experimento semi-contínuo e processo contínuo de fermentação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo CHIBATA & TOSA (1983), ROSEVEAR et al. (1987) e PHILLIPS & POON (1988) a imobilização é um termo genérico utilizado para descrever a retenção de uma atividade biológica dentro de um reator ou sistema analítico. A atividade biocatalítica, seja ela uma simples enzima, uma mistura de enzimas ou as enzimas contidas dentro de uma célula, é confinada em um suporte. O complexo imobilizado toma a característica física do suporte, enquanto retém a atividade bioquímica básica, melhorando as propriedades catalíticas e aumentando a eficiência com a qual é utilizada em bioconversões.

Segundo os mesmos autores, a imobilização proporciona um complexo insolúvel em um módulo especializado através do qual os fluídos podem passar facilmente, transformando o substrato em produto através de uma reação enzimática controlada, facilitando a remoção do produto no reator.

De acordo com TAMPION & TAMPION (1988), a imobilização de células é definida como uma célula que, de modo natural ou artificial, é impossibilitada de se mover independentemente pelo seu meio, no sistema em estudo.

MESSING (1980) e CHIBATA & TOSA (1983), relataram que reações enzimáticas contínuas utilizando células microbianas imobilizadas, são primeiramente catalizadas por uma enzima simples, sendo que as células imobilizadas podem estar mortas, embora as enzimas estejam ativas. Entretanto, muitos compostos úteis, especialmente os

produzidos por processos fermentativos são usualmente formados por várias reações catalizadas por várias enzimas presentes dentro da célula. Se as células imobilizadas estiverem vivas, elas podem ser aplicadas para estas reações multienzimáticas.

3.1. Vantagens da imobilização de células

Segundo ROSEVEAR et al. (1987), os aspectos relacionados aos benefícios e limitações da imobilização diferem somente em magnitude entre as várias áreas de aplicação; a seleção de um método particular de imobilização para uma situação específica refletirá a importância relativa destes aspectos. Os benefícios serão considerados sob cinco pontos (1) a retenção da atividade catalítica dentro do reator; (2) a alta concentração desta atividade; (3) o controle do microambiente catalítico; (4) a rápida remoção das células; (5) a separação e uso do produto. As limitações resultam de: (1) perda da atividade catalítica durante a imobilização; (2) problemas com transferência de massa; (3) antagonismo físico entre o catalizador e o fluido.

Segundo CHIBATA & TOSA (1969), JACK & ZAJIC (1977), CHIBATA et al. (1986) e KENNEDY & MELO (1990), as vantagens do uso de células imobilizadas são as seguintes: não há necessidade de extração e purificação das enzimas das células; sua estabilidade ao calor e estabilidade operacional em reações enzimáticas contínuas são as mesmas ou superiores quando comparadas com sistemas que utilizam enzimas imobilizadas. Por outro lado, pode-se citar a desvantagem de que muitos tipos de enzimas nas células podem causar reações paralelas ou degradação do produto da reação principal. Entretanto, estas reações desfavoráveis podem, muitas vezes, ser evitadas por tratamentos térmicos ou químicos, antes ou

depois da imobilização das células.

Segundo DURAND & NAVARRO (1978), WILLIAMS & MUNNECKE (1981) e FURUSAKI & SEKI (1992), a velocidade das reações é acelerada devido ao aumento da população de células no reator, possibilitando a obtenção de rendimentos maiores, levando a melhorias no controle do processo fermentativo. A perda da atividade enzimática é reduzida, tornando a preparação e a utilização de células microbianas imobilizadas mais promissoras do que com relação as enzimas imobilizadas. A manutenção de uma velocidade específica de crescimento e uma vazão de alimentação, como ocorre em sistemas utilizando células livres não é necessária, podendo a vazão de alimentação ser otimizada para o melhor desempenho do sistema. Tais sistemas, são até mesmo melhores quando comparados com os mais recentes processos de imobilização de enzimas, pois a extração e a purificação das enzimas da célula microbiana não são necessárias. Finalmente, o risco de contaminação é reduzido devido a alta população de células no reator e ao controle da vazão de alimentação.

De acordo com CHIBATA & TOSA (1983) e FURUSAKI & SEKI (1992), as enzimas de fontes microbianas são as mais adequadas para fins industriais, pois seu custo de produção é baixo e as exigências para sua produção são pequenas. Segundo estes autores, as enzimas microbianas podem ser extracelulares, excretadas das células para o caldo e intracelulares, retidas na célula durante o desenvolvimento. Para utilizar as enzimas intracelulares, é necessário extraí-las da célula, sendo o extrato geralmente instável e muitas vezes indesejável para o uso prático como enzima imobilizada. Assim, a imobilização direta das células pode solucionar parcialmente este problema.

VIETH & VENKATASUBRAMANIAN (1978), KOLOT (1980) e FURUSAKI & SEKI (1992), afirmaram também que quando

cofatores são requeridos, o uso de células inteiras torna-se preferencial às enzimas, pois as células podem regenerar os cofatores. As células podem ser imobilizadas sem a perda de sua atividade catalítica sendo que sua operacionalidade e capacidade de estocagem são altas.

De acordo com WADA et al. (1980), CHIBATA & TOSA (1983), CHIBATA et al. (1986), PHILLIPS & POON (1978), KENNEDY & MELO (1990) e DERVAKOS & WEBB (1991), o uso de células imobilizadas evita a instabilidade enzimática, pois a enzima é mantida na sua forma original e em seu ambiente natural, a atividade enzimática é alta e há a ocorrência de múltiplas reações. Em geral, a preparação e utilização de células imobilizadas são mais fáceis do que as das enzimas imobilizadas. A imobilização de células pode ser mais recomendável para catalisar uma sequência de reações e para regenerar os cofatores necessários para algumas reações. Algumas limitações são também discutidas: a) as células podem conter enzimas que catalizam outras reações, ou enzimas que podem alterar o produto; b) a ação da protease, se presente, pode desnaturar outras enzimas. Mas, comparadas com células livres, a imobilização de células tem aspectos vantajosos em processos contínuos. Os volumes dos reatores são menores e a população de células é maior do que em reatores utilizando células livres. As vazões de alimentação podem ser maiores, sendo os custos de investimento geralmente menores.

KIERSTAN & BUCKE (1977), relataram que células inteiras imobilizadas têm sido utilizadas para a catálise de reações simples, em particular para a isomerização da glicose, e pesquisas têm sido feitas para o uso de células imobilizadas em reações múltiplas. O uso de células imobilizadas, para promover uma série de reações que requerem cofatores, oferece vantagens no tocante ao isolamento, purificação e eficiência.

Segundo KENNEDY & CABRAL (1983) e VITOLO (1989), os aspectos relativos à transferência de massa podem ser resumidos com relação ao fator de efetividade (f), que ocorre quando a velocidade de difusão do substrato é menor que a velocidade de transformação pela enzima. A velocidade observada é menor que a velocidade esperada, visto que nem todas as moléculas da enzima estarão em contato com o substrato, isto é, não se atinge a saturação.

Segundo estes autores, esta transferência de massa implica em dois tipos de resistências difusionais: externas e internas. Na resistência difusional externa o substrato deve ser transportado do seio da solução até a superfície da catálise, devendo, por conseguinte atravessar uma camada líquida. Estes efeitos podem ser minimizados aumentando-se a agitação da suspensão ou a vazão de alimentação. Já na resistência difusional interna, a difusão ocorre simultaneamente com a reação, surgindo devido à movimentação do substrato no interior do meio catalítico poroso. Assim, ocorre um comportamento não-linear da concentração do substrato no sistema imobilizado.

Segundo VIETH & VENKATASUBRAMANIAN (1978), as vantagens potenciais de células imobilizadas, sobre o controle da fermentação são: (1) realização da fermentação tendo como referência a catálise heterogênea; (2) alta produtividade; (3) capacidade para conduzir operações contínuas em oposição aos métodos tradicionais de fermentação; (4) operações com altas vazões de alimentação; (5) capacidade para otimizar o sistema pela indução do crescimento e reprodução das células restantes; (6) diminuição das fases lag e exponencial e o acúmulo de produtos associados com a fase "steady state" da fermentação; (7) a possibilidade de acelerar as reações devido ao aumento da população de células.

3.2. Principais categorias para a imobilização de células

Segundo CHIBATA & TOSA (1969), JACK & ZAJIC (1977), CHIBATA & TOSA (1983) e CHIBATA et al. (1986), as técnicas para imobilização podem ser classificadas em três categorias: adsorção, ligações cruzadas e encapsulamento ou "entrapment". O método de adsorção é baseado na união das células em suportes insolúveis em água por física, ligações iônicas ou ligações covalentes. Como suportes, são usados polissacarídeos insolúveis em água (celulose e derivados de agarose), proteínas (gelatina e albumina), polímeros sintéticos (resinas de troca iônica e cloreto de polivinil PVC) e materiais inorgânicos (cerâmica, areia e vidro poroso).

Segundo os autores, as células também podem ser imobilizadas por ligações cruzadas com reagentes multifuncionais como glutaraldeído, di-isocianato de tolueno e outros. O método de encapsulamento direto das células em matrizes de polímeros tem sido intensamente pesquisados. As matrizes são: colágeno, gelatina, ágar, alginato, carragena, celulose, triacetato, poliacrilamida, resina epóxi, poliéster, poliestireno e poliuretano.

Segundo LINKO & LINKO (1983), podem ser utilizados como suportes inertes: vidro poroso, silicato, PVC, cerâmica porosa, envolvimento ou encapsulamento em polietileno, celofane, géis de alginato de cálcio, carragena, e outros.

Segundo KLEIN & WAGNER (1983), os métodos de imobilização são: ligações físicas de entrelaçamento (floculação), adsorção em matrizes insolúveis, envolvimento físico em materiais porosos ou encapsulação. Estas categorias podem ser definidas baseadas no tipo da imobilização, a

saber, a) imobilização de biomassa sobre um suporte, b) imobilização de biomassa em suportes preparados e c) imobilização com o crescimento das células. Nesta última categoria, altas populações de células podem ser obtidas, mas a estabilidade mecânica é baixa sob compressão e agitação.

Segundo os mesmos autores, os principais métodos para a imobilização de células são o entrelaçamento e o encapsulamento. Nestes, a preparação de redes de porosidade que garantam a completa retenção das células é assegurada, e os processos de transporte de substratos e produtos são bastante rápidos para obter alta eficiência da atividade catalítica. O principal problema a ser resolvido está em se igualar as condições da preparação do suporte para as necessidades fisiológicas da retenção da atividade enzimática e da viabilidade celular. As imobilizações por entrelaçamento e encapsulamento, devido à simplicidade e estabilidade mostram-se como os mais extensivos métodos de imobilização utilizados.

MESSING (1980), relatou que a imobilização sobre suportes pré-formados, tem a vantagem de que os suportes podem ser produzidos sem limitações físicas e químicas, por serem de alta flexibilidade. As matrizes deverão conter poros maiores do que o diâmetro da célula, permitindo uma penetração desta para o interior dos poros, o que contribui para a capacidade de fixação da célula e sua estabilidade mecânica. Na adsorção, ocorrem geralmente delicadas ligações das células com o suporte, as quais podem facilmente ser revertidas. Posteriormente, podem ocorrer ligações mais fortes e múltiplas ligações. O autor relata que a adsorção de células sobre superfícies sólidas é, provavelmente, a técnica mais simples de imobilização. Este é um dos métodos menos onerosos e, por conseguinte, de uso particular em processos industriais. A escolha do suporte é

um aspecto fundamental em estudos utilizando células imobilizadas. O ideal é que este seja recuperável, não deteriore, tenha estabilidade e rigidez mecânica.

Segundo WADA et al. (1980) e TAMPION & TAMPION (1988), o encapsulamento em gel facilita a operação de imobilização e a sua aplicabilidade tem sido muito pesquisada. Os suportes utilizados podem ser desde polissacarídeos e proteínas naturais a polímeros sintéticos tais como a poliacrilamida.

Estes autores afirmaram que muitas vezes o material extracelular produzido pelas células é importante na fixação das células para a adsorção dos substratos, o que pode ser conseguido pelo entrelaçamento natural das células em um biopolímero. A forma física do suporte tem recebido considerável atenção, particularmente com respeito a porosidade e forma do material.

A combinação de microrganismos para a bioconversão do amido a etanol foi pesquisada em suportes como esferas de alumina por OETTERER & HAMDY (1992) e vem sendo pesquisada com carvão mineral poroso por LOTHER et al. (1995).

3.3. Metodologias empregadas na imobilização de células

Compilados bibliográficos realizados por LINKO & LINKO (1983); DERVAKOS & WEBB (1991) e LOTHER & OETTERER (1995), mostram que vários trabalhos foram feitos utilizando células de *S. cerevisiae* e outros microrganismos imobilizados em diversas matrizes, bem como em diversos tipos de reatores, para a produção de etanol e de outros componentes como ácidos orgânicos, aminoácidos, antibióticos e cerveja.

NAVARRO & DURAND (1977), estudaram a modificação no metabolismo de *Saccharomyces carlsbergensis*

imobilizada por adsorção em esferas de sílica porosa. As células foram imobilizadas com 15 min. de contato com o suporte e, quando este foi ativado com glutaraldeído, uma maior capacidade de retenção das células foi obtida. Os autores concluíram que houve modificação no metabolismo das células imobilizadas; a conversão de glicose a etanol aumentou enquanto que a produção de CO_2 diminuiu quando comparadas com as células livres.

DURAND & NAVARRO (1978), relataram que a produção de etanol por células de *S. cerevisiae* livres e imobilizadas por entrelaçamento, foi menor para as células livres (388mM/l contra 472mM/l) e a produtividade foi cinco vezes maior no sistema utilizando as células imobilizadas. Com células de *S. carlsbergensis* adsorvidas em vidro poroso, observaram que o mesmo fenômeno ocorreu e encontraram um maior rendimento na conversão de glicose a etanol. Quando as células foram covalentemente ligadas ao suporte, os autores determinaram uma diminuição na atividade mas, por outro lado, os rendimentos em álcool foram sempre maiores do que em comparação as células livres.

WADA et al. (1979), estudaram um método de imobilização de células baseado no crescimento das células dentro da matriz. Utilizaram gel de carragena como matriz e células de *Escherichia coli* para a produção contínua do ácido L-aspartico, *Serratia marcescens* para a produção de isoleucina e *S. cerevisiae* para a produção de etanol. Para o último, os autores utilizaram um meio com 10% de glicose e concluíram que utilizando um reator com volume de trabalho de 150ml e uma vazão de alimentação de 50 ml/h e a 30°C, as células se reproduzem satisfatoriamente. Para os autores, o sistema utilizando células imobilizadas em crescimento foi mais produtivo, uma vez que um maior número de células dentro de gel pôde constantemente ser mantido por longos períodos.

SITTON & GADDY (1980), realizaram um estudo visando a produção de etanol utilizando um reator de coluna, com volume total de 1,8 l e utilizando células de *S. cerevisiae* imobilizadas em anéis de cerâmica esterilizados, mergulhados em gelatina e borrifados com glutaraldeído. Concluíram que a produção foi de 15,3g/l de etanol, que ocorreu a uma taxa diluição de $0,483h^{-1}$, com um tempo de residência de 2,07h e uma vazão de alimentação de 250ml/h.

Os autores destacaram que a produtividade máxima de etanol obrigatoriamente ocorria perto da velocidade máxima de alimentação e que a máxima produtividade não correspondia a uma completa utilização do substrato. Quando aumentaram a vazão de alimentação no reator, ocorreu uma diluição da população de células até um ponto em que a lavagem da cultura no reator se processou. Neste mesmo aspecto, tanto a instabilidade na vazão de alimentação ou mudanças ambientais (como pH, temperatura ou presença de materiais tóxicos) podem afetar o crescimento do microrganismo e levar à situação de lavagem ou "washout" no reator. Destacaram que a adsorção tem a vantagem de reduzir ou eliminar os problemas de transferência de massa associados ao envolvimento em géis.

WADA et al. (1981), estudaram a produção contínua de etanol utilizando células de *S. cerevisiae* em crescimento à fase estacionária por 18h imobilizadas em gel de carragena e mantidas em coluna pela qual, o meio de cultura contendo 10% de glicose, foi introduzido a uma vazão de alimentação de 25ml/h, para permitir o crescimento das células no gel. Os autores concluíram que, quando o meio com 25% de glicose foi fornecido, o crescimento das células de levedura no gel foi inibido. O efeito inibitório foi reduzido por um aumento gradual da concentração de glicose no meio de alimentação; esta operação resultou em um constante

crescimento das células no gel até em meio contendo 25% de glicose. Através deste sistema de alimentação, uma produção contínua de etanol de 114mg/ml foi mantida por mais de dois meses, com um tempo de residência de 2,6h e 96% de rendimento em etanol.

HOLCBERG & MARGALITH (1981), estudaram a fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* imobilizadas em agar, alginato de cálcio, carragena e géis de poliacrilamida, mantidas em erlenmeyers de 150ml contendo glicose a concentrações de 10 a 50%. Os autores concluíram que a produtividade em etanol pelas células imobilizadas foi 20 a 25% maior do que a apresentada pelas células livres. Com concentrações de 30% de glicose, os autores obtiveram concentrações maiores que 14,5%, em peso, de etanol. Outro aspecto destacado foi que o gel promove uma resistência maior às células no que se refere ao efeito inibitório pelo etanol formado. Este sistema mostra-se particularmente interessante para a obtenção de altas concentrações de etanol utilizando substratos com altas concentrações de glicose.

WILLIAMS & MUNNECKE (1981), estudaram a produção contínua de etanol pela imobilização de células de *S. cerevisiae* em esferas de alginato de cálcio em reatores de 1,0 l utilizando meio de glicose a 12,7%. As leveduras utilizadas na imobilização cresceram em meio suplementado com etanol, visando a obtenção de células que apresentassem uma maior tolerância à inibição pelo etanol formado.

Os autores concluíram que o pH ideal para as células livres é de 4,5 e, no sistema utilizando células imobilizadas, o pH pôde variar de 3,0 a 7,5. Esta variação na faixa de pH é devida ao efeito tampão existente no sistema imobilizado que aumenta a faixa de pH viável do processo.

Os autores determinaram que, para células livres a temperatura ideal foi de 37°C e para células

imobilizadas foi de 30°C, sendo que temperaturas mais baixas no sistema utilizando células imobilizadas minimizam os efeitos da inibição pelo etanol.

Ainda, segundo os autores, com uma taxa de diluição de 0,5h⁻¹ e uma concentração inicial de glicose de 12,7%, houve uma conversão de 100% do substrato com uma concentração final no efluente de 6% em etanol. Quando a taxa de diluição aumentou para 1,20h⁻¹ houve uma diminuição na conversão de glicose a etanol para 85%. O experimento foi realizado continuamente por 44 dias.

LINKO & LINKO (1981), estudaram a produção contínua de etanol em um reator de coluna com volume de 500ml e utilizaram glicose e melaço de cana-de-açúcar para a produção contínua de etanol, e malte de cevada para a produção contínua de cerveja, com células de *S. cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, com pH 5,0 e a temperatura do reator mantida a 25°C.

Os autores concluíram que, com o conteúdo de nutrientes balanceados ou com uma regeneração periódica das células pela adição de nutrientes e aeração, a produção de etanol poderia ser mantida por vários meses. De acordo com os autores, aproximadamente 7% (p/v) de etanol, podem ser produzidos utilizando melaço de cana diluído, contendo 17,5% (p/v) de açúcares redutores totais com 4 a 5h de tempo de residência no reator. A cerveja, com um percentual de 4,5% (p/v) de etanol, pôde ser produzida com 2h de tempo de residência no reator e sem nenhuma adição de nutrientes.

DAUGULIS et al. (1981), estudaram a produção contínua de etanol utilizando células de *S. cerevisiae* imobilizadas por adsorção em suportes de resinas de troca iônica. Os autores trabalharam com um reator de coluna com volume total de 1,47 l, sendo que o volume de trabalho foi de 390ml. Utilizaram meio de glicose a 12% (p/v) e taxas de

diluições de 1,1 e $1,44\text{h}^{-1}$ e obtiveram alta produtividade em etanol, da ordem de 53,1 e $62,0\text{g}/1.\text{h}^{-1}$, respectivamente, por mais de 200h.

Segundo estes autores, a adsorção das células em resinas tem a vantagem de proporcionar uma alta concentração de células no reator, uma estabilidade maior e uma resistência ao "washout", mesmo com elevadas taxas de diluição.

TYAGI & GHOSE (1982), analisaram a fermentação contínua para a produção de etanol utilizando células imobilizadas em reatores verticais de coluna, com volume de trabalho de 6,6 l.

Os autores concluíram que, utilizando melaço de cana-de-açúcar, com $150\text{g}/\text{l}$ de açúcares redutores e devidamente suplementado com uréia, sulfato de magnésio e ácido fosfórico, a pH 5,0 e temperatura de 30°C , a produtividade máxima obtida foi de $28,6\text{g}$ de etanol/ $1.\text{h}^{-1}$. Relataram que o tempo de residência das células imobilizadas no reator foi de 2,6h e que o sistema foi operado continuamente por 35 dias, porém, houve dificuldades no controle da fermentação em função da não remoção do CO_2 , que ocupou um volume de 19% do total do reator.

BANDYOPADHYAY & GHOSE (1982), estudaram a fisiologia do crescimento e metabolismo da *S. cerevisiae* imobilizadas em três suportes inertes, sendo um deles vidro poroso. Os autores mediram o tempo de geração, a produção de CO_2 e a utilização de O_2 e concluíram que a produção de CO_2 , o consumo de O_2 e o tempo de geração, com todos os suportes, foram menores nos sistemas imobilizados que nos sistemas que utilizaram células livres e que nenhuma mudança no tamanho das células foi observada.

PAREKH & WAYMAN (1987), estudaram a fermentação alcoólica contínua utilizando células de *S.*

cerevisiae imobilizadas sobre discos fibrosos de alginato de cálcio e empregaram como substratos, glicose, sacarose, melaço de cana-de-açúcar e resíduos de moagem de milho. Os autores utilizaram um reator com capacidade de 3,4 l sendo que a produtividade em etanol, com aqueles substratos, foi melhorada pela criação de mais espaços entre as fibras dos discos para facilitar a remoção do CO₂ existente.

De acordo com os autores, glicose a uma concentração de 55g/l foi fermentada em 1,6h com aproximadamente 90% de utilização. Já o resíduo de moagem de milho com concentração de açúcares de 115g/l foi fermentado completamente em 2,5h, com uma massa de 56g/l de células no reator. A fermentação do melaço de cana-de-açúcar contendo 195g/l de açúcares redutores totais foi concluída em 3,6h com um rendimento de 83g/l em etanol (10,6% em volume) e uma produtividade de 23g/l.h⁻¹. O reator foi continuamente alimentado com o melaço a uma vazão de alimentação de 550ml/h com uma taxa de diluição de 0,27h⁻¹ por 15 dias, durante os quais houve uma perda de 8% de seu desempenho original.

Os autores estimaram que a atividade do reator poderia ser mantida por aproximadamente 98 dias e concluíram que o reator apresentou potencialidade industrial e que poderia ser adotado para a produção econômica de etanol em processo contínuo.

BUZÁS et al. (1989), concluíram que a capacidade fermentativa de células de *S. cerevisiae* imobilizadas em géis de alginato de cálcio mostrou-se praticamente independente da variação de pH do meio na faixa de 2,5 a 6,2. Essa relativa insensibilidade das células imobilizadas poderá ser aproveitada na sua utilização em reatores desprovidos de um controle rígido de pH, diminuindo desta forma os custos para o controle do processo. Também, vários substratos como melaço e sucos de frutas poderão ser

utilizados sem o ajuste prévio do pH, otimizando o processo.

HAMDY et al. (1990), pesquisaram a fermentação contínua para a produção de etanol utilizando *S. cerevisiae* imobilizada em esferas de alumina com diferentes tamanhos e diâmetros de poros em um reator cilíndrico horizontal e estudaram vários parâmetros relativos à fermentação. Os autores determinaram que, ao se utilizar substrato constituído de caldo de malte-glicose e extrato de levedura, o experimento contendo 16,7% de glicose, conduzido a temperatura de 35°C e com um tempo de residência de 4h, atingiu a produtividade em etanol de 40,0g/l.h⁻¹ e o rendimento de 88%.

De acordo com os autores, a vazão de alimentação e outros fatores como temperatura, pH, nutrientes e diferentes concentrações de glicose no substrato afetaram a produtividade, sendo que o sistema com células imobilizadas manteve-se em estabilidade operacional por um período superior a três meses.

NGUYEN & SHIEH (1992), estudaram a fermentação contínua utilizando *S. cerevisiae* imobilizada em suporte esférico poroso, em um reator de coluna, com o objetivo de determinar a produtividade em etanol, a partir de meio com 25% de glicose a várias taxas de diluição.

Segundo os autores, quando as taxas de diluição foram aumentadas convenientemente de 0,04 para 0,14h⁻¹, a produção de etanol permaneceu alta, com média de 0,36g de etanol por g de glicose utilizada (71% do rendimento teórico). Todavia, os autores discutem que o rendimento não foi maior em função do elevado tempo de residência das células no reator, o que contribuiu para que o efeito inibitório do CO₂ dissolvido no meio e os baixos níveis de pH se manifestassem. Os autores concluíram que o desempenho geral do sistema foi estável por 226 dias.

RUGGERI et al. (1991), verificaram a potencialidade de células de *S. cerevisiae*, imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e revestidas com uma resina de poliacrilamida, em produzir etanol a partir de meios sintéticos mantidos em erlenmeyers de 250ml a pH 4,5 e temperatura de 30°C. Estudaram, também, a resistência mecânica da matriz e a atividade biocatalítica das células nas esferas produzidas.

Os autores concluíram que, após 72h de experimento e com meio constituído de 10% de glicose, foram produzidos 2,64g de etanol/l e que a resistência mecânica das esferas foi melhorada em função do revestimento bem como a atividade biocatalítica das células.

SHABTAI et al. (1991) estudaram a produção contínua de etanol por *S. cerevisiae* imobilizada por ligações cruzadas, em esferas de poliacrilamida hidrazina, revestidas com alginato de cálcio. Utilizaram um reator acoplado a uma unidade de pré-evaporação com capacidade de 2,0 l. Trabalhando continuamente por 50 dias, com uma vazão de alimentação de 1,2 l/h e um tempo de residência de 1,25h, os autores obtiveram uma produtividade em etanol de 29g/l.h⁻¹. Os autores concluíram que houve um aumento de cinco vezes na produtividade em etanol, em relação aos valores obtidos com a fermentação convencional, devido a não inibição pelo produto formado.

TYAGI et al. (1992), estudaram a produção contínua de etanol utilizando células de *S. cerevisiae* imobilizadas em três suportes a saber: alginato de cálcio, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço ativado com diamino-hexametileno, utilizando um reator com capacidade de 500ml, à temperatura de 30°C controlada por fluxo de água em serpentina. Foi utilizado como substrato melaço suplementado, aquecido a 60°C e diluído convenientemente, com uma

concentração de 120 a 200g/l de açúcares redutores e pH 4,0.

Os autores concluíram que o alginato de cálcio utilizado como suporte apresentou problemas relativos à transferência de massa entre substrato e produto e que os melhores suportes foram o bagaço e o bagaço ativado, que apresentaram uma alta retenção de células e alta produtividade em etanol, da ordem de $31,8\text{g/l.h}^{-1}$ a uma taxa de diluição de $0,53\text{h}^{-1}$. De acordo com os autores, o reator utilizando o sistema imobilizado operou com estabilidade por 76 dias.

PRADELLA (1987), estudou a imobilização de células de *S. cerevisiae*, fornecida na forma de fermento comercial (Fleischmann), por encapsulamento em partículas de gel de carragena e utilizou como substrato o melaço, obtendo uma produtividade em etanol de $20,0\text{g/l.h}^{-1}$. Observou, também, que o desempenho do processo melhorava com o aumento da relação área/volume no reator, o que estava relacionado com a facilidade de escape do CO_2 formado.

CHANG et al. (1993), estudaram um modelo de fermentação contínua para a produção de etanol utilizando *S. cerevisiae* retidas em um filtro interno com tamanho de poros definidos, e acoplado ao reator, com um volume de trabalho de 1,0 l e utilizaram meio com glicose e melaço de cana-se-açúcar como substratos.

De acordo com os autores, o sistema permaneceu operando continuamente por 10 dias, utilizando meio com 100g/l de glicose e alta população de células, mostrando que este sistema poderia ser utilizado em fermentação contínua, evitando o sistema de reciclo de células, com economia no processo. A concentração de açúcares redutores no melaço foi de 110g/l e com uma taxa de diluição de $0,26\text{h}^{-1}$, a produção média final de etanol foi 47,4g/l, correspondente a 92,7% do rendimento teórico.

DAS et al. (1993) determinaram que, empregando materiais lignocelulósicos como suportes sólidos para a imobilização de células, a palha de arroz foi o melhor suporte para a produção de etanol. A uma taxa de diluição de $0,39\text{h}^{-1}$, a produtividade máxima foi de $17,84\text{g/l.h}^{-1}$ e a concentração final de etanol correspondeu a $45,80\text{g/l}$, partindo de uma concentração de açúcares redutores de 120g/l . O tempo de residência foi de $2,56\text{h}$. No estudo, foi utilizado um biorreator cilíndrico, sendo que, aumentos nas produtividades da ordem de $12,55\%$ e $3,6\%$, respectivamente, foram obtidos quando este reator foi substituído por um reator romboidal e um reator cônico.

3.4. Sacarificação do amido e fermentação alcoólica simultâneas

YAMADE & FUKUSCHIMA (1989), desenvolveram um sistema de biorreatores para trabalhar em processo simultâneo tipo SSSF ("starch saccharification and simultaneous ethanol fermentation"), utilizando a imobilização da glicoamilase adsorvida em γ -alumina, envolvida em gel de alginato de alumínio e a imobilização simultânea de duas linhagens de *S. cerevisiae*. O processo contínuo foi conduzido a pH 2,8-3,2 pela adição de H_2SO_4 a temperatura de 30°C e produziu de 60 a 95 Kg/m^3 de álcool, durante mais de 30 dias, utilizando-se amido de batata e amido de milho.

De acordo com os autores, 250Kg/m^3 de amido foi liquefeito com $0,6\text{Kg/m}^3$ de α -amilase por 30min a $85-90^\circ\text{C}$ e a solução foi, posteriormente, aquecida a 120°C por 5min. A seguir, foi efetuada a centrifugação e a alimentação do reator. A avaliação do processo foi feita pela análise da produção de glicose a partir das dextrinas, estequiometricamente, da medida do consumo de glicose e

aparecimento do CO₂, das análises de açúcar e álcool por cromatografia líquida de coluna e análises do amido e dextrinas por HPLC. O biorreator de três estágios foi disposto verticalmente, mantido em condições anaeróbias e carregado simultaneamente com os dois biocatalizadores e alimentação contínua de amido liquefeito.

Uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante capaz de conter α -amilase foi desenvolvida e testada por KUMAGAI et al. (1993). Assim, isolaram uma nova enzima produtora de álcool oxidase a partir da *Pichia pastoris* e seu uso como controladora da expressão heteróloga da α -amilase na *S. cerevisiae* recombinante.

Os autores discutem que essa α -amilase tem um papel importante na etapa inicial da hidrólise do amido nas ligações α -1,4 internas. Desde que a *S. cerevisiae* utilizada industrialmente não tem atividade amilolítica, são necessárias enzimas durante a maltagem para a conversão do amido em açúcares fermentescíveis. O processo de produção de cerveja, por exemplo, pode ser melhorado com a transferência de genes amilolíticos para a *S. cerevisiae*. Também, estes genes podem servir para abaixar o teor calórico da cerveja, reduzindo os custos de produção e aumentando a eficiência da conversão do amido em etanol durante a fermentação.

A hidrólise enzimática do amido foi realizada por CHUA et al. (1984), pela ação combinada da pectina depolimerase e glicoamilase como processo de maceração e sacarificação. Segundo os autores, os métodos convencionais preconizam a cocção do material amiláceo a 120⁰C por 2h, o que requer 30% do total da energia necessária no sistema. A enzima proveniente do *Aspergillus niger*, glicoamilase, reduz a viscosidade do amido mais do que as enzimas provenientes de outros microrganismos como a do *A. awamori*. O processo de maceração sem aquecimento foi conduzido a pH 4,5 a 45⁰C por

2h, com 0,05% de pectina depolimerase; o processo a quente trabalhou com 0,01% de pectina depolimerase a 75-85⁰C por 5min. e 0,05% de glicoamilase para promover a sacarificação. Após 48h de fermentação foi produzido 12% (p/v) de etanol. As fermentações foram conduzidas a 30⁰C utilizando as leveduras crescidas à fase estacionária por 24h.

HOSHINO et al. (1989), estudaram a conversão de amido a etanol utilizando amilase sintética imobilizada em suporte celulósico (hidroxipropil metilcelulose acetato succinato) utilizando células de *S. cerevisiae*. Os autores realizaram o experimento com 10% de amido e concluíram que 96% da enzima ativa pôde ser recuperada após 5 bateladas e que, a quantidade total de etanol produzido a partir de 150g de amido foi 61g, o que correspondeu a uma produtividade média de 0,85g/l.h⁻¹.

CZARNECKI & GRAJEK (1991), estudaram a gomificação e hidrólise de amidos provenientes de grãos de cereais, a saber, trigo, centeio e milho. A gomificação e hidrólise dos amidos foram feitas após maceração dos grãos a 70⁰C e 80⁰C por 10 a 70min. Extrato de malte contendo as enzimas amilolíticas na proporção de 12% (p/p) em relação ao amido presente na mistura foi adicionado e a reação foi mantida por 1h, sob agitação. As fermentações subsequentes foram conduzidas em um reator com volume de trabalho de 10,0 l a 30⁰C por 72h com o emprego da *S. cerevisiae*. A maior conversão do amido em açúcar chegou a 89,6% para o amido de trigo, a temperatura de 60⁰C, com 20h de incubação e o maior rendimento em etanol (65%) ocorreu com o amido de centeio. O acompanhamento do processo de conversão do amido a açúcares redutores foi realizado pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, e o conteúdo de etanol no destilado foi determinado por densimetria.

KIM & RHEE (1993), estudaram a sacarificação

do amido com a fermentação etanólica simultâneas (SSSF). Os autores utilizaram duas linhagens de *Zymomonas mobilis* e amido de sagu como substrato. Ao processo, foram adicionadas as enzimas α -amilase do *Bacillus licheniformis* para a liquefação do amido a pH 6,0-6,5 e 95°C e glicoamilase do *A. niger*. As imobilizações das células foram feitas em alginato de cálcio e gel de carragena.

Os autores determinaram a temperatura ótima de 35°C e a quantidade de 0,5% da enzima amiloglicosidase em relação ao substrato, para a maior produção de etanol. A melhor concentração de amido foi de 200g/l; a um aumento para 250g/l, uma porção significativa de açúcares redutores permaneceu no meio sem utilização. A *Z. mobilis* teve a sua viabilidade diminuída a altas concentrações de etanol (por exemplo, acima de 70g/l) provenientes da alta concentração de substrato. A fermentação se completou após 18h, a concentração final de etanol foi de 69,2g/l, e o rendimento de 0,50g/g (97% do teórico). Os autores compararam o processo simultâneo com o de pré-sacarificação e verificaram que o etanol produzido é maior no processo SSSF. A produção de etanol foi analisada por cromatografia gasosa, os açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico e a glicose por cromatografia líquida.

Em relação ao processo contínuo, os autores concluíram que o melhor sistema foi o que empregou a coimobilização da amiloglicosidase e das células em alginato de cálcio. A uma taxa de diluição correspondente a 0,84h⁻¹, o reator operou por 40 dias. A concentração de etanol no "steady state" foi 44g/l (93% do rendimento teórico), com produtividade de 37g/l.h⁻¹. Finalizando, os autores estabeleceram um modelo cinético que pode ser utilizado para otimizar o processo simultâneo, uma vez que as equações integradas fornecem as variáveis mais importantes do processo

como população de células, concentração de etanol e de glicose, partindo de concentração inicial do amido pré-estabelecida.

O processo SSSF foi testado por OHTA et al. (1993) para a produção de etanol a partir de inulina empregando *A. niger* e *S. cerevisiae*. O *A. niger* mutante produtor de inulase foi cultivado a 30°C por 5 dias em cultura submersa. O material foi suplementado e recebeu o inóculo de *S. cerevisiae* que utilizou 99% da inulina durante a fermentação e produziu 21% (p/v) de etanol após 3 dias de fermentação. A eficiência de conversão da inulina a etanol foi de 83% com relação a eficiência teórica.

GIORDANO (1987) estudou o processo SSSF utilizando amiloglicosidase e *S. cerevisiae* coimobilizada em gel de pectina. A autora utilizou xarope de farinha de mandioca e 3 reatores em série com capacidades de 110, 104 e 100ml, obtendo estabilidade até 86,6g/l de etanol no meio atingindo a produtividade de 56,8g de etanol/l.h⁻¹.

LEE et al. (1993b), estudaram a co-imobilização de três microrganismos (*A. awamori*, *Z. mobilis* e *Rhizopus japonicus*) e sua aplicação na produção de etanol a partir de amido solúvel e de amido bruto de arroz, irradiado com doses de 36-42 KGy por 6h. Os autores utilizaram um meio para a produção de etanol constituído de 0,5% de peptona, 0,2% de extrato de levedura, sais minerais e 5, 10, e 20% de amido de arroz. A concentração final em etanol, o tempo de fermentação e a produtividade foram 19, 34 e 61g/l; 7, 13 e 21 dias e 0,43, 0,40 e 0,37g/l.h⁻¹, respectivamente.

Os autores determinaram que a quantidade de glicose remanescente no meio com 5% de amido foi próxima a zero, porém, com 10 e 20% de amido houve acúmulo de glicose no meio de 5,3 e 10g/l respectivamente. Com quantidades

elevadas de amido no meio, ocorreu, no sistema em estudo, uma inibição da bactéria produtora de etanol, em função da diminuição do pH para valores abaixo de 4,0 ocasionado pela elevada produção de ácidos orgânicos, pelo fungo, que utilizou o substrato amiláceo para seu crescimento.

Com o objetivo de reduzir os custos com energia para esterilizar o meio de cultura e o reator, os autores utilizaram um antibiótico (Vantocil IB) para evitar o crescimento de possíveis contaminantes. Concluíram que, com o uso de 0,2% de Vantocil IB, o sistema se manteve livre de contaminações por 120 horas, sem diminuição na produção de etanol.

Em outro trabalho, LEE et al. (1993a), estudaram o uso de um aditivo alimentar (Neupectin L), na prevenção da contaminação bacteriana em um sistema de fermentação visando a produção de etanol a partir de amido de arroz, utilizando um sistema de três linhagens de microrganismos coimobilizados. O uso do aditivo alimentar para esta finalidade, está na estimativa de que uma percentagem significativa (de 30 a 40%) da energia total requerida para a esterilização dos meios, reatores e processos de pré-tratamento do amido (gelatinização, liquefação e sacarificação), está envolvida. Desta forma, o desenvolvimento de um processo que utilize os meios e os equipamentos sem a esterilização poderá refletir em uma substancial economia de energia no processo fermentativo.

Os autores concluíram que, utilizando um meio com 10% de amido irradiado, não esterilizado e com 0,1% de Neupectin L, mesmo após 240 horas de fermentação não houve contaminação e a concentração de etanol foi de 37,2g/l com um rendimento em etanol de 0,41g/g de amido.

De acordo com JOSEPHSON et al. (1978), KRAYBILL (1984) e ESTADOS UNIDOS (1987), quando os

carbohidratos, particularmente os polissacarídeos como o amido, são tratados com energia ionizante, ocorre uma despolimerização levando a formação de moléculas menores como maltose e glicose, principalmente, se o amido estiver na forma cristalina. Assim, com doses acima de 100Mrad, as ligações glicosídicas do amido e das dextrinas são rompidas.

3.5. Hidrólise enzimática do amido

Segundo ZOBEL (1988), o termo amido é aplicado a um conjunto de dois tipos de moléculas: amilose e amilopectina. A glicose é o bloco constitutivo de ambas as moléculas, que diferem apenas na composição das ligações glicosídicas.

De acordo com BULÉON et al. (1990), o amido é essencialmente um homopolímero formado por moléculas de D-glicose, na conformação mais estável, com as hidroxilas dos carbonos 2, 3, 4 e 6 em posições equatoriais. Os monômeros D-glicose estão unidos por ligações α -1,4 em sua maior parte (95 a 96%) e por ligações α -1,6 em menor proporção (4 a 5%).

PASCHALL & ARONS (1973) afirmam que a proporção entre amilose e amilopectina é uma das principais responsáveis pelas diferentes características dos amidos. A fração linear, amilose, que tem arranjo helicoidal, quando em suspensão aquosa, associa-se rapidamente, originando regiões cristalinas, caracterizando o fenômeno designado retrogradação. A amilopectina não se associa, mas forma uma suspensão relativamente estável e translúcida. A proporção destes dois polímeros nos amidos varia bastante, mas geralmente o conteúdo de amilose é de 17 a 27%.

Segundo DELPEUCH & FAVIER (1979), o teor de amilose de um amido tem correlação negativa com a susceptibilidade enzimática e a capacidade de hidratação dos

grânulos. Os autores explicam este fato, alegando que a água tem dificuldade em entrar nos espaços entre as cadeias que são muito menores em amidos com alto teor de cadeias lineares.

BULÉON et al. (1990) relatam que a amilose é um polímero linear de D-glicose com ligações α -1,4 e poucas ligações α -1,6 diretamente proporcionais ao comprimento da molécula. É composta de 200 a 2000 unidades de α -D glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Cada unidade monomérica contém uma hidroxila primária e duas secundárias, exceto as unidades terminais, porém, no final da molécula de amilose a glicose possui três hidroxilas secundárias e uma primária; este é o chamado terminal não redutor. Na outra extremidade da molécula a glicose possui uma hidroxila primária e duas secundárias bem como um grupo aldeídico redutor na forma hemiacetal, sendo designado terminal redutor.

WURZBURG (1983), relata que a presença de grupamentos hidroxilas resulta em alta higroscopicidade do amido. As moléculas sendo lineares e contendo hidroxilas têm tendência à orientação paralela, havendo associação molecular por pontes de hidrogênio. Quando isto ocorre, a afinidade por água é reduzida e formam-se grandes agregados, até o ponto em que ocorre precipitação, em baixas concentrações, fenômeno denominado retrogradação. Se em altas concentrações, ocorre o fenômeno da gomificação.

A molécula linear do amido apresenta conformação helicoidal e afinidade por moléculas hidrofóbicas tais como iodo e ácidos graxos. A reação desta fração linear com o iodo leva a formação de coloração azul. Assim, uma solução contendo amido deve ser aquecida para permitir a gomificação e consequente hidrólise enzimática; a intensidade desta é observada conforme a coloração formada após a reação

com o iodo: azul representa a presença de 30 unidades de glicose, ou mais, vermelho púrpura de 8 a 12 unidades e sem coloração de 4 a 6 unidades, segundo BATES et al. (1943), SMITH & ROE (1949) e WILLIAMS et al. (1970).

Segundo WARZBURG (1983) e BULÉON et al. (1990), a amilopectina é o principal componente glicídico do amido (70 a 80%). Estruturalmente, é uma molécula ramificada, onde as D-glicoses estão unidas por ligações α -1,4 e α -1,6. A amilopectina é caracterizada por seu elevado peso molecular (10^7 a 10^8). A predominância de pequenos graus de polimerização e a presença de ligações α -1,6 nas cadeias longas, resulta em algumas propriedades da amilopectina como baixa afinidade por iodo e β -amilólise restrita.

Segundo os mesmos autores, o alto peso molecular e a natureza ramificada da amilopectina interfere na mobilidade e tendência à orientação paralela (pontes de hidrogênio), o que resulta em suspensões aquosas (pastas) claras e estáveis não havendo a gomificação.

De acordo com SALVA & MORAES (1992), a condução satisfatória de um processo fermentativo somente é viável quando são conhecidos os efeitos da composição do meio de cultura e de algumas outras variáveis, como aeração, agitação e pH do meio, por exemplo, sobre a formação de produtos e biomassa. Quando o objetivo da fermentação é a obtenção de uma enzima, é importante ainda que se conheça em que fase do crescimento do microrganismo ela se forma. Há enzimas que perdem sua atividade logo após terem atingido um pico de produção. Nesses casos, o conhecimento do perfil de sua síntese auxilia na definição das condições mais favoráveis para a sua produção ou para a utilização do próprio microrganismo e, conseqüentemente, na definição das condições de um processo mais econômico.

Segundo SCHENBERG et al. (1993), as alfa-

amilases (α -1,4 glucan 4-glucanohidrolase, E.C.3.2.1.1.) são endoenzimas produzidas por bactérias, fungos, leveduras, animais e vegetais. Estas enzimas hidrolizam ligações α -1,4 de polímeros de glicose, como amido e glicogênio, produzindo invariavelmente dextrinas e açúcares de menor peso molecular.

De acordo com FOGARTY & KELLY (1980) e REILLY (1985), na hidrólise do amido pela α -amilase, ocorre inicialmente formação de maltose (G_2), maltotriose (G_3), além de α -dextrinas limite como maltohexoses (G_6) e maltoheptoses (G_7). Com o prosseguimento da reação há formação da glicose (G), a partir de G_7 . A α -amilase não hidrolisa as três ligações α -1,4 em torno da ligação α -1,6 no ponto de ramificação.

Segundo Bernfeld, citado por COLOWICK & KAPLAN (1955), as α e β -amilases podem ser analisadas conforme os fenômenos de digestão que podem provocar, como aumento da força redutora da solução de amilopectina ou amido solúvel, mudanças nas propriedades de ligação com o iodo do substrato e decréscimo da viscosidade da pasta de amido.

As α -amilases, são usadas nas indústrias têxteis, de papel e de couro, têm grande aplicação nas indústrias de alimentos, onde se destacam na panificação, na produção de xaropes de glicose e de chocolate e na produção de alimentos infantis e de sucos de frutas (SALVA & MORAES, 1992).

Além das α -amilases, exercem um papel importante na hidrólise do amido as β -amilases que são exoenzimas capazes de hidrolisar cadeias lineares a partir de seus terminais redutores, liberando exclusivamente maltoses e as amiloglicosidases que são exoenzimas, capazes de hidrolizar as ligações α -1,4 e α -1,6, liberando glicoses pela hidrólise sequencial de ligações glicosídicas a partir das extremidades redutoras (BULÉON et al., 1990).

De acordo com KOKUBU et al. (1978), a produção de α -amilases bacterianas tradicionalmente é feita por processos fermentativos em batelada, mas elas também podem ser obtidas por processos de fermentação contínua, onde podem ser empregadas células livres ou imobilizadas.

Os autores estudaram a produção de α -amilase pela imobilização de células de *B. subtilis* em gel de poliacrilamida e concluíram que a α -amilase produzida pelas células imobilizadas foi, aproximadamente, três vezes maior do que a produção por células livres. A reutilização das células imobilizadas e livres também foi estudada. A atividade da α -amilase das células livres diminuiu com o aumento dos ciclos de uso. Por outro lado, a atividade da enzima das células imobilizadas aumentou gradualmente, sendo determinado um estado estacionário após sete ciclos.

SALVA & MORAES (1991b), estudando o efeito da temperatura de fermentação e do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de α -amilase de *B. subtilis* ATCC 601B, concluíram que a temperatura de fermentação mais adequada para a produção de α -amilase foi 37°C e o pH inicial mais adequado do meio de cultura para a produção da enzima foi 7,0 sendo que, tanto a temperatura de fermentação quanto o pH inicial do meio de cultura afetaram a síntese de α -amilase, e não apenas o crescimento do microrganismo.

SALVA & MORAES (1991a e 1992), estudaram o perfil da síntese de α -amilase de *B. subtilis* ATCC 601 e *B. subtilis* ATCC 601B, com o objetivo de determinar em que fase do desenvolvimento microbiano essa síntese ocorre. Os autores concluíram que, no meio de cultura empregado, utilizando sais de amônio, magnésio, potássio e cálcio, peptona, extrato de levedura e glicose, a α -amilase foi sintetizada desde o início da fase exponencial de crescimento, com um grande aumento de velocidade de síntese na fase estacionária, sendo

que as maiores velocidades de síntese da enzima ocorreram durante a esporulação do microrganismo.

De acordo com CASTRO et al. (1992), a produção simultânea de α e β amilases em fermentações contínuas e em batelada utilizando o amido como substrato e o *B. subtilis* como inóculo foram avaliadas. Os resultados obtidos na fermentação tradicional para a produção de enzimas foram: a α -amilase apresentou para a sua produção máxima atividade de 8.400 U/l na fase final de crescimento exponencial. Entretanto, somente 19% foi extracelular e a concentração permaneceu constante; a produção máxima de β -amilase ocorreu mais cedo, na fase exponencial de crescimento com atividade de 522 U/l, sendo 87% extracelular. Na fermentação contínua, a taxa de diluição variou de 0,10 a 0,45h⁻¹. A produtividade máxima de α -amilase total foi encontrada a D de 0,25h⁻¹, atingindo um valor de 2200 U/l.h⁻¹; a esta taxa de diluição, a enzima extracelular chega a 74% da atividade total.

PATEL et al. (1993), estudaram a produção de α -amilase de *Halobacterium halobium*, uma bactéria halofílica, em meio de cultura com várias concentrações de NaCl e 1% de amido, em agitação e em repouso. Os autores determinaram que a maior atividade enzimática ocorreu a concentração de 25% de NaCl (p/v) e a uma temperatura de 40°C. Após 10 dias de cultivo, a atividade enzimática, medidas em unidades/ml, e o crescimento celular, medido através de leituras em espectrofotômetro na faixa de 580nm, foram maiores no sistema agitado. O amido solúvel foi determinado como sendo a melhor fonte de carboidrato à bactéria quando comparado com os amidos de milho, arroz e batata.

Segundo os autores, o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade da enzima e o crescimento do microrganismo também foram estudados. Após 10 dias de cultivo, os autores concluíram que a atividade

enzimática e o crescimento do microrganismo foram maiores no sistema agitado, utilizando meio com peptona, 1% de amido solúvel e 25% de NaCl a temperatura de 40°C.

LEE et al. (1993b) concluíram que a origem da α -amilase determina a taxa de hidrólise do amido e que se diferentes microrganismos produtores de α -amilase puderem ser coimobilizados em proporções adequadas, a taxa de hidrólise do amido, o tempo de fermentação e o rendimento na produção de etanol, a partir de materiais amiláceos, poderão ser otimizados.

3.6. Características dos microrganismos *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*

Segundo JACOBS & GERSTEIN (1960), *Bacillus subtilis* é uma bactéria da Ordem *Eubacteriales*, Família *Bacillaceae*, Gênero *Bacillus* e Espécie *subtilis*.

PELCZAR et al. (1981), caracterizam o microrganismo como células em forma de bastonete, 0,3 a 2,2µm de diâmetro e 1,27 a 7,0µm de comprimento. A maior parte é móvel, com flagelos tipicamente laterais. Ocorre a presença de endosporos, não mais do que um em cada célula esporangial. São gram-positivos, quimiorganotróficos, com metabolismo estritamente respiratório, estritamente fermentativo ou respiratório e fermentativo. São microrganismos aeróbios estritos ou anaeróbios facultativos e comumente encontrados no solo.

De acordo com JACOBS & GERSTEIN (1960), *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo pertencente à Classe *Ascomycetes*, Subclasse *Plectomycetes*, Ordem *Endomycetales*, Família *Endomycetaceae*, Tribo *Saccharomycetaceae*, Gênero *Saccharomyces*, Espécie *cerevisiae*, do grupo das leveduras.

PELCZAR et al. (1981), caracterizam as células de *S. cerevisiae* como sendo redondas, ovais, alongadas ou filiformes, produzindo pseudomicélios. A reprodução vegetativa se efetua por gemulação multilateral, podendo ocorrer uma conjugação iso ou heterogâmica antes da formação do asco. É possível haver a formação de protuberâncias, com os ascos apresentando de um a quatro esporos de variadas formas. O metabolismo varia de preferentemente oxidativo para predominantemente fermentativo. Em meios líquidos, usualmente ocorre um crescimento de sedimento, podendo haver o desenvolvimento, com o tempo, de anel e película. Os açúcares comuns são geralmente fermentados com vigor e os nitratos não são utilizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Microrganismos

Saccharomyces cerevisiae ATYH (alcohol tolerant yeast Hamdy), proveniente da coleção do Food Science Department da University of Georgia;

- *Bacillus subtilis* FT 014-B, da coleção do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo.

4.1.2. Suporte para a imobilização das células

Para a imobilização das células dos microrganismos utilizados nos experimentos, foi utilizado um suporte inerte, comercializado em forma de pedras com tamanho irregular e produzido pela Colorado Aggregate Company, Alamosa, Colorado, E.U.A.

O material, que se constitui em um carvão mineral poroso, com densidade de 1600g/l, foi inicialmente imerso em água por 24h, seco em estufa a 105⁰C por 24h e fragmentado manualmente, utilizando-se um martelo, de forma a se obter fragmentos arredondados de aproximadamente 10mm. Tratamentos posteriores foram conduzidos conforme descrito no item 4.2.5. O material utilizado como suporte pode ser visto nas fotografias 1a e 1b.

Fotografia 1a - Suporte empregado para a imobilização das células dos microrganismos. Fotografia realizada em microscópio eletrônico de varredura - MEV em aumento de 75 vezes.

Fotografia 1b - Suporte empregado para a imobilização das células dos microrganismos. Fotografia realizada em MEV em aumento de 500 vezes.

4.1.3. Reatores e acessórios

Os reatores cilíndricos utilizados no experimento com a fermentação contínua foram construídos em vidro (parte interna) e acrílico (parte externa), tendo dimensões de 86,0 x 8,0cm, com volume total de 4,32 l e volume útil de 2,2 l. Os reatores foram projetados com orifícios a cada 12cm, na parte superior dos cilindros, para permitir o escape do CO₂.

O sistema constituído de dois reatores acoplados, dispostos horizontalmente e ligeiramente inclinados, trabalhou a temperatura controlada por banho termostático regulado a 35⁰C através de circulação de água entre as partes externa e interna.

As entradas dos meios de alimentação para o reator 1, a partir de frasco erlenmeyer, e do reator 1 para o reator 2, foram feitas com vazão de alimentação controlada por meio de bomba peristáltica Milan modelo p-200. O efluente foi recolhido por gravidade, na saída do reator 2, em frasco erlenmeyer, conforme fotografia 2.

Tubulações de silicone foram empregadas para circulação de água e interligações entre os reatores e os frascos de alimentação e recepção.

Fotografia 2 - Sistema de reatores acoplados utilizados no experimento de sacarificação e fermentação contínua.

4.1.4. Meios de cultura

4.1.4.1. Meio para crescimento do *Bacillus subtilis*

O meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo à fase específica foi o NB (nutrient broth) da Difco. Após dissolvido em água destilada, foi esterilizado em autoclave a 121⁰C por 15min. e inoculado com 5% (v/v) da cultura.

4.1.4.2. Meio para a contagem das unidades formadoras de colônias - UFC

O meio utilizado para a contagem das UFC foi o "plate count agar" - PCA da Difco. Após dissolvido em água destilada, foi esterilizado em autoclave a 121⁰C por 15min e vertido nas placas de petri. Foram feitas diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁹ a partir do meio NB com as células crescidas e 1,0ml de cada diluição foi distribuído uniformemente sobre as placas utilizando espátula de Drigalsky.

4.1.4.3. Meio para crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*

O meio de cultura utilizado para o crescimento da levedura à fase específica foi o MGYE (malt growth yeast extract) com a seguinte composição em g/l: extrato de malte 20,0g; extrato de levedura 5,0g; glicose 10,0g; sacarose 5,0g; triptona 1,5g; peptona 1,5g; K₂HPO₄ 1,0g; NH₄Cl 1,0g; NaCl 1,0g e ajustado a pH 3,6 sendo então esterilizado em autoclave a 121⁰C por 15min (HAMDY et al., 1990).

4.1.4.4. Meio para a alimentação do sistema semi-contínuo - estágio 1

O meio utilizado como "feedstock" para o sistema semi-contínuo foi denominado de MMAI 1% - meio modificado com amido irradiado a 1% - com a seguinte composição em g/l: peptona 10,0g; triptona 10,0g; extrato de levedura 10,0g; amido irradiado 10,0g; K_2HPO_4 1,0g; NH_4Cl 1,0g; NaCl 1,0g; $CaCl_2$ 28,0mg; $MgSO_4$ 10,0mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10,0mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 9,0mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 8,0mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 6,0mg (CASTRO et al., 1992).

O meio foi esterilizado em autoclave a $121^{\circ}C$ por 15min. O amido irradiado foi esterilizado separadamente e então incorporado ao meio sob aquecimento em agitação até completa dispersão, seguido de resfriamento. O pH deste meio apresentou o valor de 6,8.

4.1.4.5. Meios para a alimentação do sistema semi-contínuo - estágio 2

Um dos meios empregados como "feedstock" para o sistema semi-contínuo foi o mesmo utilizado para o crescimento da levedura, conforme descrito em 4.1.4.3., porém, modificado com 9,0% (p/v) de glicose.

Após 24h de fermentação deste meio, foi incorporado 500ml do mosto proveniente do estágio 1 conforme descrito em 4.1.4.4., bioconvertido pela bactéria após 48h de bioconversão.

4.1.4.6. Meio para a alimentação do sistema contínuo - período 1

O meio de alimentação utilizado no experimento contínuo para o primeiro reator com a bactéria imobilizada, foi denominado meio modificado com amido irradiado - MMAI 1%, com a seguinte composição em g/l: peptona 10,0g; triptona 10,0g; extrato de levedura 10,0g; amido irradiado 10,0g; K_2HPO_4 1,0g; NH_4Cl 1,0g; $NaCl$ 1,0g; $CaCl_2$ 28,0mg; $MgSO_4$ 10,0mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10,0mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 9,0mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 8,0mg e $MnSO_4 \cdot H_2O$ 6,0mg (CASTRO et al., 1992).

O meio foi esterilizado em autoclave a $121^{\circ}C$ por 15min. O amido irradiado foi esterilizado separadamente e então incorporado ao meio sob aquecimento e agitação até completa dissolução, seguido de resfriamento. O pH deste meio apresentou o valor de 6,8.

4.1.4.7. Meio para a alimentação do sistema contínuo - período 2

O meio foi denominado meio modificado com amido irradiado - MMAI 3%, conforme descrito em 4.1.4.6. porém com 30,0g/l de amido irradiado.

4.1.5. Amido solúvel irradiado

O amido solúvel utilizado, de grau analítico, marca Synth, foi irradiado empregando-se a dose de 25kGy, utilizando-se como equipamento um Irradiador JS 7500 - Nordion e como fonte radioativa o Co^{60} .

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Curvas de crescimento para a bactéria e a levedura

As curvas de crescimento para os microrganismos foram compostas a partir das leituras das concentrações celulares pelo valor da absorbância lida a 620nm, em espectrofotômetro digital Femto modelo 432-C, a intervalos de 1 hora. A suspensão de células foi formada após a inoculação em meio apropriado de 5% (v/v) da cultura de cada microrganismo, em agitador a 30⁰C (DAUGULIS et al., 1981 e SHABTAI et al., 1991).

4.2.2. Isolamento das colônias e contagem de células

O isolamento das colônias da bactéria foi feito através de diluições sucessivas com plaqueamento conforme descrito em 4.1.4.2. e incubação a 35⁰C por 48h para a contagem das UFC. A contagem direta ao microscópio das células da levedura crescidas em meio MGYE, conforme descrito em 4.1.4.3. foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer utilizando como corante a solução de eritrosina.

4.2.3. Teste da hidrólise do amido

A observação da atividade amilolítica do *B. subtilis* foi feita por plaqueamento em nutriente agar - NA, com 1% de amido, incubado a 35⁰C por 24h. Após a incubação cobriu-se a placa com solução de lugol. A zona clara ao redor das colônias representou a hidrólise do amido (FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

4.2.4. Caracterização microscópica do amido

Foram feitas observações microscópicas para a análise das características dos grânulos do amido irradiado, em lâminas preparadas com o amido e água destilada, em aumento de 100 vezes, de acordo com MOSS (1976).

4.2.5. Preparo do suporte

O suporte foi lavado com solução tampão fosfato 0,2M, pH 7,8, segundo GOMORI (1976), tratado termicamente em mufla a 500°C por 6h e esterilizado em autoclave a 121°C por 15min. antes do contato com as células dos microrganismos.

4.2.6. Imobilização das células

A imobilização das células foi feita no suporte preparado conforme descrito no item 4.2.5., segundo técnica descrita por HAMDY et al. (1990).

O *B. subtilis*, após crescimento à fase estacionária e com uma população de 3×10^6 UFC/ml, foi centrifugado (550G por 30min) e as células recolhidas em tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, segundo GOMORI (1976). Nova centrifugação foi realizada e as células recolhidas em tampão fosfato foram colocadas em contato com o suporte por 3h em agitador com 85 rpm a 35°C.

A quantidade de células imobilizadas foi determinada por diferença, em relação as existentes no início, após a contagem das células presentes no sobrenadante que foi de 3×10^5 UFC/ml.

A *S. cerevisiae* após crescimento à fase estacionária e com uma população de 9×10^7 células/ml, foi

centrifugada (550G por 15min) e as células recolhidas em tampão citrato-fosfato (CPB) 0,05M, pH 3,5, segundo GOMORI (1976). Nova centrifugação foi realizada e as células recolhidas em CPB foram colocadas em contato com o suporte por 3h em agitador com 85 rpm a 35°C.

A quantidade de células imobilizadas foi determinada por diferença, em relação as existentes no início, após a contagem das células presentes no sobrenadante que foi de 9×10^6 células/ml.

4.2.7. Determinação do amido

Foi feita colorimetricamente através da reação entre a amostra e a solução de iodo (ASSUMPÇÃO & MORITA, 1968). A leitura foi feita em espectrofotômetro e densidade ótica a 620nm e comparada com as leituras da curva padrão, de acordo com metodologia proposta por De MOT et al. (1984).

4.2.7.1. Curva padrão para a reação colorimétrica do amido

Para a elaboração da curva padrão de amido, foi utilizada uma solução de concentração conhecida, preparada com reagente de grau analítico, situada na faixa de 0,06 a 1,0% de amido. A curva padrão correlacionou os teores de amido com os valores da densidade ótica a 620nm lidos em espectrofotômetro. Os valores e a curva padrão são apresentados no Apêndice 2.

4.2.8. Determinação de açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores foram analisados segundo BERNFELD (1955) modificado por MILLER

(1959), em espectrofotômetro a densidade ótica a 540nm após reação colorida com a amostra, baseada na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico para o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, e comparação com os valores da curva padrão.

4.2.8.1. Curva padrão para a reação colorimétrica de açúcares redutores

Através de uma série de diluições de uma solução padrão de glicose, de concentração conhecida, situada na faixa de 0,18 a 1,8g/l preparada com reagente de grau analítico, estabeleceu-se uma curva padrão que correlacionou a concentração de açúcares redutores totais com os valores da densidade ótica a 540nm lidos em espectrofotômetro. Os valores e a curva padrão são apresentados no Apêndice 3.

4.2.9. Determinação da glicose

A glicose foi analisada colorimetricamente de acordo com BARHAM & TRINDER (1972), pelo método enzimático (GOD-PAP), em espectrofotômetro e densidade ótica a 546nm, baseado na oxidação da glicose pela glicose-oxidase, utilizando o "kit" analítico dos laboratórios Merck.

4.2.10. Determinação do teor alcoólico

O teor alcoólico das amostras (% p/v) foi determinado em densímetro digital Paar DM-45 após a passagem de 25ml da amostra recolhida na saída do sistema e destilada por arraste de vapor em destilador Tecnal modelo TE 036E.

4.2.11. Condução do experimento semi-contínuo

Com o objetivo de verificar a efetividade do suporte escolhido e o desempenho dos microrganismos imobilizados fornecendo, desta forma, subsídios para a implantação do sistema contínuo nos reatores acoplados, foi desenvolvido um experimento de forma semi-contínua.

O estágio 1 deste experimento, foi caracterizado pela imobilização do *B. subtilis* em 120g de suporte descrito conforme os itens 4.2.5. e 4.2.6. A fermentação foi conduzida em erlenmeyer mantido em agitador com o meio descrito em 4.1.4.4. por 48h. Decorrido este período de fermentação, foram realizadas transferências periódicas do mosto para o estágio 2 e adições de meio para o estágio 1.

O estágio 2 foi caracterizado pela imobilização da *S. cerevisiae* da mesma forma conforme descrito acima. A fermentação foi conduzida inicialmente com o primeiro meio descrito em 4.1.4.5. por um período de 24h. Decorrido este período de fermentação, foram feitas, periodicamente, retiradas de produto e adições de mosto proveniente da bioconversão do estágio 1.

O sistema semi-contínuo foi conduzido por 238h no estágio 1 e 214h no estágio 2 e o acompanhamento das fermentações foi feito através das análises de amido e açúcares redutores no estágio 1 e açúcares redutores e teor alcoólico no estágio 2, conforme descrito em 4.2.7., 4.2.8. e 4.2.10.

4.2.12. Condução do experimento contínuo

O experimento contínuo foi conduzido nos reatores descritos no item 4.1.3.. A assepsia dos reatores e

das tubulações foi feita com álcool 96^oGL por 72h, antes de se proceder ao carregamento do sistema com as células imobilizadas e os meios.

O reator 1 recebeu o *B. subtilis* imobilizado em 245g de suporte e o meio conforme descrito em 4.1.4.6., com volume útil de 2,35 l (volume de meio de 2,2 l), permanecendo em fermentação por 83h. Em seguida, iniciou-se a alimentação do reator com vazão de alimentação média de 62,5ml/h.

O reator 2 recebeu a *S. cerevisiae* imobilizada em 245g de suporte e o meio conforme descrito em 4.1.4.3. (0,5% de glicose) com volume útil de 2,35 l (volume de meio de 2,2 l), permanecendo em fermentação por 33h. Em seguida, iniciou-se a alimentação deste com o meio proveniente do reator 1.

A fermentação contínua com a bactéria imobilizada e com o MMAI 1% foi conduzida por 218h, considerado o "período 1". A seguir, a fermentação contínua foi conduzida com o MMAI 3%, por mais 332h, considerado o "período 2". O período total de fermentação contínua do reator 1 foi de 550h.

Da mesma forma, a fermentação contínua com a levedura imobilizada no reator 2 foi conduzida por 218h no período 1 recebendo meio proveniente do reator 1. No período 2, foi conduzida por mais 332h. O período total de fermentação contínua do reator 2 foi de 550h.

De forma a manter um nível adequado de glicose e de nutrientes no mosto, permitindo a manutenção da viabilidade das células imobilizadas da levedura, foram feitas adições diárias de 100ml de meio de extrato de malte com 10,4% de glicose.

O acompanhamento das fermentações foi feito periodicamente, no reator 1, através das análises de amido,

açúcares redutores e glicose e, no reator 2, pelas análises de açúcares redutores, glicose e teor alcoólico, sendo as tomadas das amostras feitas na extremidade final dos reatores, no ponto de saída dos efluentes, desconectando-se os tubos de silicone.

4.2.13. Cálculo da vazão de alimentação

A vazão de alimentação (Q_{a1}) para o experimento semi-contínuo foi determinada para cada condição operacional como se segue:

- determinava-se o volume de meio incorporado no erlenmeyer,
- media-se o tempo de fermentação até transferência para o estágio 2 e nova adição de volume de meio,
- a vazão, então, foi calculada como:

$$Q_{a1} \text{ (ml/h)} = \text{volume do meio (ml)} / \text{tempo (h)} \quad (1)$$

A Q_{a1} para o sistema contínuo foi determinada com base nos resultados obtidos no experimento semi-contínuo, utilizando-se uma bomba dosadora peristáltica acoplada aos reatores para a entrada do meio de alimentação para o reator 1 e para a passagem do mosto para o reator 2, em fluxo contínuo.

4.2.14. Cálculo do tempo de residência

O tempo de residência (θ) para o experimento semi-contínuo foi calculado como:

$$\theta \text{ (h)} = \text{volume de meio no erlenmeyer (ml)} / Q_{a1} \text{ (ml/h)} \quad (2)$$

O θ para o experimento contínuo foi calculado como:

$$\theta \text{ (h)} = \text{volume de meio no reator (ml)} / Q_{a1} \text{ (ml/h)} \quad (3)$$

4.2.15. Cálculo da taxa de diluição

A taxa de diluição (D), expressa em h^{-1} , foi calculada de acordo com a fórmula:

$$D (h^{-1}) = Q_{al} / \text{Volume de meio no erlenmeyer (ml)} \quad (4)$$

$$D (h^{-1}) = Q_{al} / \text{Volume de meio no reator (ml)} \quad (5)$$

4.2.16. Cálculo do rendimento em álcool

O rendimento em álcool (η_{al} %), tanto para o experimento semi-contínuo como para o contínuo, foi calculado como:

$$\eta_{al} (\%) = Et / AR.0,511 \times 100 \quad (6)$$

sendo:

0,511 = rendimento teórico na conversão de glicose a etanol
2 moles de etanol (92g) / 1 mol de glicose (180g);

Et considerado como o teor alcoólico lido em densímetro e AR o teor de açúcares redutores utilizados no experimento semi-contínuo e glicose utilizada no experimento contínuo.

4.2.17. Cálculo da produtividade em álcool

A produtividade em álcool (P_{al}), tanto para o experimento semi-contínuo como para o contínuo, foi calculada como:

$$\begin{aligned} P_{al} (g/l.h^{-1}) &= \text{concentração de álcool na saída do} \\ &\text{sistema (g/l) / tempo de residência (h) =} \\ &= Et (g/l) / \theta (h) \end{aligned} \quad (7)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sacarificação e a fermentação alcoólica simultâneas com o emprego de células imobilizadas de *Bacillus subtilis* e de *Saccharomyces cerevisiae*, estudadas nesta pesquisa, fundamentaram-se na escolha de um suporte inorgânico poroso alternativo aos citados na literatura e de um conjunto de reatores construídos e dispostos de forma a facilitar o controle do processo.

Além disso, o meio de alimentação da etapa de sacarificação, ao receber o amido irradiado, caracterizou-se em uma fonte amilácea modificada para a fermentação bacteriana. Quanto à etapa da fermentação alcoólica, o desempenho da levedura ATYH álcool tolerante, concedida para o uso exclusivo desta pesquisa, pôde ser avaliado.

Embora os processos simultâneos de sacarificação e fermentação contínua com o emprego de células imobilizadas sejam considerados mais eficientes e produtivos do que os processos tradicionalmente empregados na indústria, ainda existe a necessidade de se determinar e solucionar os pontos críticos da tecnologia proposta, com o objetivo de se alcançar resultados que possam ser extrapolados aos vários setores industriais que utilizam processos fermentativos, com conseqüente diminuição dos custos, aumento da produtividade e melhoria da qualidade total.

Desta forma, pode-se observar através da literatura científica existente que autores como VIETH & VENKATSUBRAMANIAN (1978), KLEIN & WAGNER (1983); KENNEDY & CABRAL (1983); JONES et al. (1981), CHIBATA et al. (1983 e

1985), PAREKH & WAYMAN (1987), TYAGI et al. (1992) e LOTHER & OETTERER (1995), têm colaborado para o esclarecimento dos processos que empregam células imobilizadas, porém, ao mesmo tempo que enaltecem as vantagens desta tecnologia, enfatizam a necessidade de um maior número de pesquisas que esclareçam as várias etapas envolvidas afim de se tornarem aplicáveis industrialmente.

A proposta desta pesquisa está, portanto, na contribuição ao estudo e esclarecimento de parâmetros importantes como composição dos meios de alimentação, desempenho dos microrganismos imobilizados nas bioconversões, características do suporte, dimensionamento e disposição dos reatores, entre outros, que possam ser agrupados ordenadamente de forma a se tornarem viáveis para a utilização por parte do setor produtivo.

5.1. Curvas de crescimento dos microrganismos

As curvas de crescimento dos microrganismos foram determinadas conforme descrito em 4.2.1. e os valores obtidos estão apresentados no Apêndice 1 e Figura 1.

Figura 1 - Curvas de crescimento dos microrganismos.

Como pode ser observado na Figura 1, a fase estacionária de crescimento do *B. subtilis* foi atingida após 10h de cultivo a 30°C.

O conhecimento do tempo necessário para que o microrganismo atinja a fase estacionária de crescimento está relacionado ao fato de que a produção da enzima α -amilase ocorre desde o início da fase exponencial de crescimento, porém, a maior produção da enzima ocorre ao final da fase estacionária, de acordo com SALVA & MORAES, (1991b e 1992) e

CASTRO et al. (1992).

A imobilização das células do *B. subtilis* foi feita após crescimento por 17h, ao final da fase estacionária de crescimento, portanto, com a máxima produção da enzima.

KOKUBU et al. (1978), enfatizaram que, na fermentação contínua com células imobilizadas, a produção de α -amilase foi superior a ocorrida em processos tradicionais em batelada.

As α -amilases são endoenzimas que hidrolisam as ligações α -1,4 do amido, produzindo dextrinas e açúcares de menor peso molecular. Na hidrólise, inicialmente, há a formação de maltoses, maltotrioses, maltohexoses e maltoheptoses sendo que, as glicoses são formadas a partir das maltoheptoses (FOGARTY & KELLY, 1980; REILLY, 1985 e SCHENBERG et al., 1993).

A produção da α -amilase pelo *B. subtilis* empregado nesta pesquisa foi observada através do aparecimento de um halo claro ao redor das colônias, após plaqueamento em meio apropriado, como um procedimento inicial para a verificação da atividade amilolítica.

De acordo com a Figura 1, a levedura *S. cerevisiae* atingiu a fase estacionária de crescimento após 18h de cultivo. Para a imobilização dos microrganismos, utilizou-se as células crescidas por 24h a 30°C. CHUA et al. (1984), HAMDY et al. (1990) e CZARNECKI & GRAJEK (1991) empregaram leveduras crescidas por 24h e WADA et al. (1980) as utilizaram após 18h de cultivo.

A utilização dos microrganismos plenamente ativos, traz a vantagem de se eliminar o tempo gasto com as fases lag e exponencial, potencializando-se a ação destes no processo fermentativo, conforme discutido por VIETH & VENKATSUBRAMANIAN (1978).

5.2. Imobilização das células

Para a imobilização das células, optou-se pelo método de adsorção física, baseado na união direta das células sobre os suportes pré-formados, de forma a se estabelecer um procedimento simples, de baixo custo e de possibilidade para o uso em processos industriais, conforme citado por WADA et al. (1980) e MESSING (1980).

O material utilizado como matriz para a imobilização - carvão mineral poroso, apresentou a característica de conter poros maiores que o diâmetro das células, conforme pode ser visto nas Fotografias 1a e 1b, permitindo assim a penetração e a fixação das células no interior dos poros, o que pode ser observado nas Fotografias 3a, 3b e 3c para o *B. subtilis* e 4a, 4b e 4c para a *S. cerevisiae*.

Após o procedimento da imobilização descrito em 4.2.6. encontrou-se 90% de eficiência de imobilização das células ao suporte, sendo de $2,7 \times 10^6$ UFC/ml para a bactéria e $8,1 \times 10^7$ células/ml para a levedura.

Fotografia 3a - Células de *B. subtilis* imobilizadas.
Fotografia realizada em MEV em aumento de 90
vezes.

Fotografia 3b - Células de *B. subtilis* imobilizadas.
Fotografia realizada em MEV em aumento de
2500 vezes.

Fotografia 3c - Células de *B. subtilis* imobilizadas.
Fotografia realizada em MEV em aumento de
12500 vezes.

Fotografia 4a - Células de *S. cerevisiae* immobilizadas.
Fotografia realizada em MEV em aumento de 125
vezes.

Fotografia 4b - Células de *S. cerevisiae* immobilizadas.
Fotografia realizada em MEV em aumento de 750
vezes.

Fotografia 4c - Células de *S. cerevisiae* imobilizadas.
Fotografia realizada em MEV em aumento de
1250 vezes.

O suporte utilizado para a imobilização das células neste trabalho, caracterizou-se por ser um material alternativo aos utilizados nos trabalhos citados na literatura como vidro, cerâmica, alumina porosa, PVC, resinas, areia e outros, conforme descritos por JACK & ZAJIC (1977), LINKO & LINKO (1983) e CHIBATA & TOSA (1983). Assim, a matriz preencheu as principais características previstas para a exequibilidade do sistema contínuo, discutidas por TAMPION & TAMPION (1988) como baixo custo, rigidez mecânica, resistência a deterioração, diâmetro de poros adequado à penetração e fixação dos microrganismos, além da possibilidade de reutilização.

5.3. Reatores e acessórios

Para a realização do experimento, foram utilizados reatores cilíndricos, contruídos em vidro e acrílico e dispostos horizontalmente, mantendo um pequeno ângulo de inclinação. A escolha deste tipo particular de reator fundamentou-se, principalmente, nos experimentos realizados por HAMDY et al. (1990) e OETTERER & HAMDY (1992), e após análises de trabalhos que utilizaram diferentes tipos de reatores como reatores de leito fixo ou "packed-bed reactors" e reatores contínuos com agitação ou "continuous-flow stirred-tank reactors".

Segundo VENKATASUBRAMANIAN et al. (1983), os reatores do experimento em questão podem ser classificados como sendo do tipo leito fluidizado, apresentando características vantajosas no que se refere ao controle da temperatura, possibilidade de acoplamento entre as unidades, facilidade de remoção do CO₂ formado na etapa da fermentação alcoólica, além da otimização da vazão de alimentação em função do uso de bomba dosadora peristáltica.

5.3.1. Controle da temperatura

Pelo fato de se utilizar no experimento reatores equipados com um cilindro externo de acrílico para a circulação de água, por meio de um banho termostático, foi possível controlar a temperatura e conduzir as fermentações simultâneas a 35⁰C, permitindo a estabilidade enzimática durante o processo (KENNEDY & MELO, 1990, e DERVAKOS & WEBB, 1991), e evitando desta forma, o uso de acessórios como serpentina, que foi empregada por TYAGI et al. (1992).

A faixa de temperatura encontrada na literatura científica variou de 30 a 40⁰C, dependendo do microrganismo, do substrato e da matriz empregados.

Assim, SALVA & MORAES (1992) preconizam a temperatura de 37⁰C para o *B. subtilis*. Já PATEL et al. (1993) determinaram a temperatura de 40⁰C para a produção da α -amilase de *H. halobium*. KIM & RHEE (1993), em processo SSSF utilizando *Z. mobilis* para a produção de etanol, trabalharam a 35⁰C. OHTA et al. (1993) empregando inulina como substrato e utilizando *A. niger* e *S. cerevisiae* trabalharam a 30⁰C e YAMADE & FUKUSCHIMA (1989) conduziram a fermentação a 30⁰C em processo SSSF. HAMDY et al. (1990) e OETTERER & HAMDY (1992), utilizaram *S. cerevisiae* imobilizada por adsorção em esferas de alumina porosa e trabalharam a temperatura de 35⁰C em reatores cilíndricos contruídos em vidro e dispostos horizontalmente.

Os trabalhos que utilizaram temperaturas mais baixas (25-30⁰C) como os desenvolvidos por WADA et al. (1979), WILLIAMS & MUNNECKE (1981), LINKO & LINKO (1981), TYAGI & GHOSE (1982), RUGGERI et al. (1991) e TYAGI et al. (1992), foram assim conduzidos em função do uso de géis de alginato e carragena, o que implica na limitação em empregar-se temperaturas maiores, as quais podem alterar a estrutura da

matriz. Por outro lado, o carvão mineral poroso empregado neste experimento permitiu a utilização de temperatura mais elevada.

5.3.2. Eliminação do CO₂

O sistema de reatores empregado apresenta orifícios de escape de CO₂ distribuídos uniformemente, conforme pode ser observado na Fotografia 2. A disposição horizontal dos reatores acoplados em série permitiu, desta forma, o escape do gás carbônico formado na etapa da fermentação alcoólica, contribuindo assim para a eliminação deste produto inibitório.

Com a mesma abordagem, GIORDANO (1992) alerta para o fato de que a retenção do CO₂ formado na fermentação, no leito de células imobilizadas, provoca efeitos negativos no desempenho do reator, através de desvios de idealidade no fluxo e alteração na atividade metabólica do microrganismo, devendo, portanto, ser evitada.

Também, JONES et al. (1981) e PAREKH & WAYMAN (1987) afirmam que, para que haja a otimização do desempenho de um reator, é necessária a contínua e rápida remoção dos produtos inibitórios finais, especialmente o CO₂. A disposição horizontal dos reatores facilitou a remoção natural do CO₂ através dos orifícios de escape, fato este positivo para o controle desta etapa do processo, ao passo que, em reatores cilíndricos verticais como os utilizados por TYAGI & GHOSE (1982) e DAS et al. (1993), houve acúmulo do CO₂ formado, dificultando o controle da fermentação e houve necessidade da instalação de dispositivos de exaustão para a completa remoção do CO₂.

5.3.3. Dimensões dos reatores

No tocante aos aspectos dimensionais e de volume de trabalho dos reatores, observou-se após a análise da literatura pertinente que, a maioria dos trabalhos, como os realizados por SITTON & GADDY (1980), WADA et al. (1981), HOLCBERG & MARGALITH (1981), WILLIAMS & MUNNECKE (1981), LINKO & LINKO (1981), TYAGI et al. (1992) e GIORDANO (1992), utilizou reatores com volumes situados na faixa de 40ml a 1,0 l.

O conjunto de reatores empregado nesta pesquisa, por sua vez, apresentou a possibilidade de se trabalhar com volumes maiores do que os citados, ou seja, com volume total e volume de trabalho de 4,32 l e 2,35 l, respectivamente, e dimensões de 86,0 X 8,0cm. DAUGULIS et al. (1981), trabalharam com volume de 1,47 l, PAREKH & WAYMAN (1987) com 3,40 l, TYAGI & GHOSE (1982) empregaram um reator com as dimensões de 130,0 X 14,0cm e HAMDY et al. (1990) com 45,0 X 7,0cm. Estes reatores foram considerados, pelos autores citados, como sendo de potencialidade industrial.

5.4. Meios de alimentação

O meio de alimentação empregado nesta pesquisa como substrato para o *B. subtilis* imobilizado, tanto no experimento semi-contínuo como no experimento contínuo conforme citado em 4.1.4.4. e 4.1.4.6., foi constituído de amido solúvel irradiado e adicionado ao meio modificado e enriquecido com sais minerais, como proposto por CASTRO et al. (1992) e SALVA & MORAES (1992). Estes autores utilizaram os meios a pH 7,0 e preconizaram que este valor de pH é o mais adequado para a maior produção da enzima α -amilase pelo *B. subtilis*. Após o preparo, o meio apresentou pH de 6,8,

valor considerado, portanto, adequado para o prosseguimento da fermentação.

O emprego do amido irradiado como substrato para a fermentação por parte do *B. subtilis* nesta pesquisa, pode ser considerado um aspecto inovador.

Sabe-se que a irradiação com doses acima de 100 Mrad, modifica a molécula do amido ocorrendo sua despolimerização e levando ao aparecimento de maltose e glicose, segundo JOSEPHSON et al. (1978), KRAYBILL (1984) e ESTADOS UNIDOS (1987). Este fato, permite a possibilidade de se fornecer à bactéria um substrato modificado; o amido irradiado ao ser examinado ao microscópio, mostrou alterações físicas nos grânulos diferentes das encontradas normalmente nos grânulos do amido não irradiado.

A irradiação, provavelmente, amplia a ação da α -amilase bacteriana, pois atua como um agente de pré-hidrólise do amido. Outro aspecto a ressaltar é o referente à possibilidade de se fornecer à bactéria o amido sem cocção prévia pois, após a irradiação, o amido está esterilizado podendo ser incorporado aos demais componentes do meio de alimentação e levado ao reator.

O fato de se poder evitar o uso de calor é considerado relevante do ponto vista de economia energética, pois processos de pré-tratamento, como liquefação e esterilização, são necessários antes que o amido possa ser utilizado industrialmente como substrato para a fermentação. Estes processos implicam em gastos da ordem de 30 a 40% do total da energia na fermentação alcoólica a partir de fontes amiláceas, segundo CHUA et al. (1984), SCHEMBERG et al. (1993) e LEE et al. (1993b).

Nos processos simultâneos de sacarificação e fermentação alcoólica pesquisados por CHUA et al. (1984), YAMADE & FUKUSCHIMA (1989), CZARNEKI & GRAJEK (1991) e KIM &

RHEE (1993), a etapa de sacarificação foi conduzida a temperaturas na faixa de 70 a 120⁰C por períodos variáveis; no presente estudo, a sacarificação foi conduzida a 35⁰C. GIORDANO (1992), afirma que, além da redução dos custos energéticos que ocorrem devido a utilização da temperatura de 30⁰C ao invés de, no mínimo, 60⁰C, a velocidade da hidrólise é menor, com consequente redução do efeito inibidor da glicose formada, uma vez que esta é utilizada pelo microrganismo assim que se forma, não se acumulando no meio.

Em toda a literatura pesquisada, apenas o trabalho de LEE et al. (1993a e 1993b) empregou o amido bruto de arroz irradiado, visando compará-lo ao amido solúvel em processos de coimobilização de microrganismos para a produção de etanol.

A discussão sobre o desempenho da bactéria imobilizada na conversão dos meios MMAI 1% e MMAI 3% está apresentada nos itens 5.5. e 5.6.

O meio empregado para a fermentação com a *S. cerevisiae* imobilizada no experimento semi-contínuo conforme citado em 4.1.4.5., apresentou pH 3,5 e a característica de conter 9% (p/v) de glicose. O emprego desta concentração de glicose foi preconizado como meio de se avaliar o desempenho desta levedura álcool tolerante mantida em fermentação neste meio por 24h. A discussão sobre o desempenho da ATYH imobilizada está apresentada no item 5.5.

HAMDY et al. (1990), estudaram o efeito de diferentes pHs a saber 3,5, 5,0 e 6,5 trabalhando com a levedura ATYH imobilizada em esferas porosas de alumina, concluindo que o pH ótimo para a fermentação alcoólica foi de 3,5, devido, provavelmente, à estabilidade das células imobilizadas dentro dos poros da matriz.

O pH inicial de 3,5 dos meios utilizados nas fermentações com a levedura imobilizada, nos sistemas semi-

contínuo e contínuo, foi se alterando com a entrada do meio proveniente da bioconversão pela bactéria imobilizada. No entanto, a faixa viável de trabalho com células de levedura imobilizadas pode variar de 3,0 a 7,5, de acordo com WILLIAMS & MUNNECKE (1981), sendo esta variação devida ao efeito tampão existente no sistema imobilizado.

BUZÁS et al. (1989) afirmam que a capacidade fermentativa de células de *S. cerevisiae* imobilizadas em géis mostrou-se praticamente independente da variação de pH do meio na faixa de 2,5 a 6,2, sendo esta relativa insensibilidade um aspecto favorável ao uso deste sistema em processos desprovidos de um controle de pH, diminuindo, assim, os custos operacionais.

O meio empregado para a fermentação com a *S. cerevisiae* imobilizada, no experimento contínuo, conforme citado em 4.1.4.5., apresentou pH 3,5 e a característica de conter 0,5% (p/v) de glicose. Esta concentração foi utilizada para permitir o "start up" do processo, uma vez que a levedura imobilizada permaneceu neste meio por 33h antes de receber o meio bioconvertido proveniente do primeiro reator. Os resultados estão descritos no item 5.6.

5.5. Experimento semi-contínuo

O objetivo do experimento foi fornecer subsídios para a implantação do sistema contínuo, demonstrando a viabilidade do uso do suporte inorgânico e a eficiência dos microrganismos imobilizados permitindo o ajuste de parâmetros como a Q_{a1} e θ . Este experimento foi conduzido conforme item 4.2.11., com amostras para análise de amido e AR no estágio 1 e AR e teor alcoólico no estágio 2, totalizando 114 amostras, e os resultados encontram-se nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 e Figuras 2, 3, 4 e 5.

Tabela 1 - Teores de amido em %, g/volume de meio (ml), g/l e % de conversão, em função do tempo (h), no estágio 1 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	Amido			Conversão
	%	g/vol.de meio	g/l	%
Volume inicial de meio MMAI 1% = 500ml.				
Início	1,00	5,00	10,00	
13	0,62	3,10	6,20	38,0
17	0,38	1,90	3,80	62,0
21	0,19	0,95	1,90	81,0
24	0,11	0,55	1,10	89,0
Adição de 300ml de meio MMAI 1%.				
24	0,48	3,84	4,80	
37	0,11	0,88	1,10	77,0
41	0,04	0,32	0,40	91,7
Adição de 200ml de meio MMAI 1%.				
41	0,23	2,30	2,30	
48	0,11	1,00	1,00	56,5
Transferência de 500ml de mosto para o estágio 2 e adição de 300ml de meio MMAI 1% para o estágio 1.				
48	0,46	3,68	4,60	
61	0,17	1,36	1,70	63,0
66	0,07	0,56	0,70	84,8
72	0,04	0,32	0,40	91,3
(*) Transferência de 200ml de mosto para o estágio 2 e adição de 200ml de meio MMAI 1% para o estágio 1.				
72	0,31	2,48	3,10	
86	0,04	0,32	0,40	87,1
(*)				
86	0,31	2,48	3,10	
95	0,04	0,32	0,40	87,1
(*)				

Tabela 1 - Teores de amido em %, g/volume de meio (ml), g/l e % de conversão, em função do tempo (h), no estágio 1 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	Amido			Conversão
	%	g/vol.de meio	g/l	%
95	0,32	2,56	3,20	93,7
110	0,02	0,16	0,20	
(*)				
110	0,30	2,40	3,00	90,0
122	0,03	0,24	0,30	
(*)				
122	0,30	2,40	3,00	90,0
137	0,03	0,24	0,30	
(*)				
137	0,33	2,64	3,30	81,8
148	0,06	0,48	0,60	
(*)				
148	0,36	2,88	3,60	83,3
160	0,06	0,48	0,60	
(*)				
160	0,45	3,60	4,50	60,0
172	0,18	1,44	1,80	
(*)				
172	0,51	4,08	5,10	58,9
184	0,21	1,68	2,10	
(*)				
184	0,54	4,32	5,40	46,3
196	0,29	2,32	2,90	
(*)				

Tabela 1 - Teores de amido em %, g/volume de meio (ml), g/l e % de conversão, em função do tempo (h), no estágio 1 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	Amido			Conversão
	%	g/vol.de meio	g/l	%
196	0,56	4,48	5,60	46,4
208	0,30	2,40	3,00	
(*)				
208	0,59	4,72	5,90	28,9
220	0,42	3,36	4,20	
(*)				
220	0,63	5,04	6,30	34,9
238	0,41	3,28	4,10

Figura 2 – Teores de amido (g/l) em função do tempo (h) no estágio 1 do experimento semi-contínuo com células imobilizadas de *Bacillus subtilis*.

Tabela 2 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 1 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	AR		
	%	g/vol.de meio	g/l
13	9,9	0,49	0,99
17	12,7	0,63	1,27
21	17,1	0,85	1,71
24	20,0	1,00	2,00
Adição de 300ml de meio MMAI 1%.			
37	23,8	1,90	2,38
41	24,0	1,92	2,40
Adição de 200ml de meio MMAI 1%.			
48	23,0	2,30	2,30
Transferência de 500ml de mosto para o estágio 2 e adição de 300ml de meio MMAI 1% para o estágio 1.			
61	22,6	1,81	2,26
66	23,6	1,89	2,36
72	25,4	2,03	2,54
(*) Transferência de 200ml de mosto para o estágio 2 e adição de 200ml de meio MMAI 1% para o estágio 1.			
86	24,2	1,94	2,42
(*)			
95	23,0	1,84	2,30
(*)			
110	21,6	1,73	2,16
(*)			
122	16,8	1,34	1,68
(*)			

Tabela 2 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 1 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	AR		
	%	g/vol.de meio	g/l
137	16,1	1,29	1,61
(*)			
148	16,4	1,31	1,64
(*)			
160	12,5	1,00	1,25
(*)			
172	8,5	0,68	0,85
(*)			
184	10,4	0,83	1,04
(*)			
196	10,4	0,83	1,04
(*)			
208	9,1	0,73	0,91
(*)			
220	8,7	0,70	0,87
(*)			
238	7,8	0,62	0,78

Figura 3 – Teores de açúcares redutores-AR (g/l) em função do tempo (h) no estágio 1 do experimento semi-contínuo com células imobilizadas de *Bacillus subtilis*

De acordo com a Tabela 1 e Figura 2, pode-se observar que o experimento foi inicialmente conduzido com o propósito de se verificar o desempenho da bactéria imobilizada durante as primeiras 48h. De acordo com os dados apresentados, observamos que neste tempo de fermentação o desempenho foi satisfatório, com relação a conversão do amido que, a partir de uma concentração inicial de 10,0g/l passou a 1,10g/l nas primeiras 24h, portanto, com 89,0% de conversão em dextrinas, maltose e glicose.

CZARNECKI & GRAJEK (1981) obtiveram 89,6% de conversão do amido de trigo após 20 minutos em processo conduzido a 60°C utilizando meio com amido e enzima α -amilase.

LEE et al. (1993b), utilizando dois sistemas de microrganismos coimobilizados, encontraram baixa taxa de conversão do amido, da ordem de 30 e 39% em função do uso de α -amilases provenientes dos dois diferentes microrganismos. Porém, quando os sistemas foram reunidos na proporção de 1:1 a hidrólise do amido foi de 61%.

Após 24 e 41h, foram feitas adições do meio MMAI 1% ao sistema, com o objetivo de acompanhar a atividade amilolítica do microrganismo imobilizado e, assim, estabelecer a Q_{a1} e o θ do sistema semi-contínuo. Assim, as taxas de conversão nestes períodos subsequentes foram de 5,40%/h e 8,07%/h, respectivamente.

Após a análise destes dados, decidiu-se pelo início da transferência do mosto ao estágio 2 e adição de MMAI 1% ao estágio 1, mantendo, desta forma, um volume de trabalho de 800ml, caracterizando o sistema semi-contínuo. Assim, a Q_{a1} de 12,5ml/h calculada conforme a eq. (1), a conversão do amido foi da ordem de 91,3%.

LEE et al. (1993b), no experimento semi-contínuo, utilizando um sistema com três microrganismos coimobilizados e 2% de amido bruto de arroz irradiado,

encontraram uma conversão de 95,5% do amido, com um θ de 48,2h.

Conforme pode-se observar pela Tabela 1, a partir de 72h do experimento, fez-se transferências de mosto e adições de meio MMAI 1% periódicas, sendo que até 160h de fermentação a conversão do amido foi satisfatória, apresentando a média de 87,51% com a Q_{a1} média de 16,37ml/h, θ de 48,8h e D de $0,02h^{-1}$, calculados conformes as eq. (1), (2) e (4).

Mantendo-se o experimento à mesma Q_{a1} , a conversão do amido continuou a ocorrer. No entanto, a queda nos valores da conversão vista na Tabela 1 e Figura 2, se deve ao fato de se ter feito as adições e transferências de mosto em intervalos de 12h, afim de facilitar a condução do experimento, no que tange as tomadas das amostras.

Conforme observa-se na Figura 2, a conversão do amido manteve-se efetiva até 238h, quando decidiu-se encerrar o experimento semi-contínuo.

Paralelamente às análises de amido foram feitas as análises de açúcares redutores.

Analisando os dados apresentados na Tabela 2 e Figura 3 observa-se que após 24h o meio MMAI 1% apresentou 2,0g/l de AR resultantes da ação da α -amilase bacteriana, sendo a quantidade de AR em relação a conversão do amido de 22,47%.

Os teores de AR nos períodos subsequentes foram aumentando em função da adição de aliquotas de meio MMAI 1%. O açúcar redutor continuou a ser produzido sucessivamente conforme as adições e transferências de meio subsequentes chegando-se a um valor máximo de 2,54g/l de AR após 72h de fermentação.

Da mesma forma como foi discutido para a Tabela 1, embora tendo sido observada uma diminuição nos

valores de AR, de 2,42 para 1,64g/l no período de 86 para 148h, a conversão em AR foi considerada satisfatória, mantendo a média de 2,0g/l.

Até o fim do experimento às 238h, acredita-se que a queda nos valores de AR tenha sido devida ao manejo das tomadas das amostras; para o experimento em questão, a decisão de conduzi-lo desta forma não implicou em um prejuízo nos dados levantados, os quais demonstraram a tendência do desempenho do sistema.

De acordo com as Figuras 2 e 3, pode-se verificar a atividade da α -amilase bacteriana na conversão do amido e na liberação de AR.

HOSHINO et al. (1989), utilizando α -amilase sintética em meio com 10% de amido bruto de milho em processo semi-contínuo obtiveram, após cinco ciclos, 101g de glicose partindo de quantidades de 30g de amido a cada ciclo, com um θ de 48h. No quinto ciclo, a quantidade de glicose produzida foi de 66% em relação ao primeiro.

Discutidos os parâmetros relativos à fermentação bacteriana no estágio 1 do experimento semi-contínuo, pode-se a seguir discutir o estágio 2, com a levedura ATYH imobilizada, pelas Tabelas 3 e 4 e as Figuras 4 e 5.

Tabela 3 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 2 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	AR		
	%	g/vol.de meio	g/l
Volume inicial de meio = 300ml			
Início	9,00	27,00	90,00
13	2,75	8,25	27,50
17	1,54	4,62	15,40
24	1,14	3,42	11,40
Adição de 500ml do mosto do estágio 1 com 48h de fermentação.			
24 (48)	0,30	2,46	3,08
37 (61)	0,28	2,22	2,80
42 (66)	0,27	2,16	2,70
48 (72)	0,28	2,22	2,80
Descarte de 200ml do mosto e adição de 200ml do mosto do estágio 1. Adição de 100ml de meio 9%(p/v) de glicose.			
62 (86)	0,26	2,39	2,66
(*) Descarte de 200ml do mosto e adição de 200ml do mosto do estágio 1.			
62	0,26	2,39	2,66
71 (95)	0,25	2,25	2,50
(*)			
71	0,25	2,25	2,50
86 (110)	0,19	1,71	1,90
(*)			
86	0,21	1,94	2,16
98 (122)	0,11	0,99	1,11
(*)			
98	0,15	1,40	1,56
113 (137)	0,10	0,97	1,08

Tabela 3 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 2 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	AR		
	%	g/vol.de meio	g/l
113	0,14	1,28	1,43
124 (148)	0,11	0,99	1,10
(*)			
124	0,14	1,30	1,45
136 (160)	0,10	0,94	1,05
(*)			
136	0,17	1,56	1,74
148 (172)	0,08	0,75	0,84
(*)			
148	0,14	1,28	1,43
160 (184)	0,09	0,81	0,90
(*)			
160	0,17	1,54	1,72
172 (196)	0,08	0,79	0,88
(*)			
172	0,15	1,40	1,56
184 (208)	0,07	0,66	0,74
(*)			
184	0,16	1,48	1,65
196 (220)	0,07	0,68	0,76
(*)			
196	0,18	1,62	1,80
214 (238)	0,07	0,65	0,73

Os números entre parêntesis representam o tempo total da fermentação no estágio 1 do experimento semi-contínuo.

Figura 4 – Teores de açúcares redutores-AR (g/l) em função do tempo (h) no estágio 2 do experimento semi-contínuo com células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 4. Teor alcoólico % p/v, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 2 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	Teor alcoólico		
	% p/v	g/vol.de meio	g/l
Volume inicial de meio com 9% de glicose = 300ml.			
13	2,47	7,41	24,70
24	3,55	10,65	35,50
Adição de 500ml do mosto do estágio 1 com 48h de fermentação.			
37	1,69	13,52	16,90
42	1,93	15,44	19,30
48	1,93	15,44	19,30
Descarte de 200ml do mosto e adição de 200ml do mosto do estágio 1. Adição de 100ml de meio 9% (p/v) de glicose.			
62	1,93	17,37	19,30
(*) Descarte de 200ml do mosto e adição de 200ml do mosto do estágio 1.			
71	1,41	12,69	14,10
(*)			
86	1,14	10,26	11,40
(*)			
98	0,87	7,83	8,70
(*)			
113	0,87	7,83	8,70
(*)			
124	0,63	5,67	6,30
(*)			

Tabela 4. Teor alcoólico % p/v, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no estágio 2 do experimento semi-contínuo.

Tempo (h)	Teor alcoólico		
	% p/v	g/vol.de meio	g/l
136	0,63	5,67	6,30
(*)			
148	0,28	2,52	2,80
(*)			
160	0,18	1,62	1,80
(*)			
172	0,12	1,08	1,20
(*)			
184	0,12	1,08	1,20
(*)			
196	0,07	0,63	0,70
(*)			
214	0,07	0,63	0,70

Figura 5 -- Teor alcoólico (g/l) em função do tempo (h) no estágio 2 do experimento semi-contínuo com células imobilizadas de Saccharomyces cerevisiae.

De acordo com a Tabela 3, neste estágio do experimento, iniciou-se a avaliação do desempenho da levedura álcool tolerante no meio com 9% de glicose, conforme descrito nos itens 4.1.4.5. e 4.2.11.

Nas primeiras 24h de fermentação o AR remanescente foi de 11,40g/l que correspondeu a uma utilização de 87,4% da glicose.

Pela Tabela 4 e Figura 5, observa-se que, neste período considerado, houve a produção de 35,50g/l de álcool, sendo o η_{a1} , calculado conforme a eq. (6) de 77,20%. e a P_{a1} , calculada conforme a eq. (7) de 1,48g/l.h⁻¹.

Nas 24h subsequentes de fermentação, a produção de álcool foi de 19,30g/l uma vez que ao se adicionar 500ml de meio proveniente do estágio 1 houve uma diluição deste meio e a oferta de açúcar presente foi menor do que a existente no início do experimento.

Com o objetivo de manter níveis de glicose maiores para o melhor desempenho do microrganismo, fez-se uma adição de 100ml de meio a 9% (p/v) de glicose. Assim, observa-se que, após 62h do experimento, a produção de álcool se manteve em 19,30g/l.

Os descartes do mosto do estágio 2 e as adições do mosto do estágio 1 prosseguiram até o final do experimento às 214h de fermentação, com uma Q_{a1} de 16,6ml/h, θ de 54,2h e D igual a 0,02h⁻¹, levando à introdução de meio com quantidades cada vez menores de açúcares fermentescíveis, o que acarretou uma queda nos teores alcoólicos. Porém, observa-se, em cada período considerado, quedas do açúcar residual remanescente, caracterizando a utilização deste pela levedura. Estes comportamentos de queda nos valores de açúcares redutores e, conseqüentemente, dos teores alcoólicos podem ser vistos nas Figuras 4 e 5.

HOSHINO et al. (1989) em experimento semi-contínuo mantendo um θ de 48h, após 240h de fermentação, obteve 61g de etanol provenientes de 101g de glicose formada na sacarificação de 150g de amido. Os autores também observaram que ocorreram quedas nos rendimentos em glicose e álcool ao final do quinto ciclo.

Assim, uma vez analisados os comportamentos dos estágios 1 e 2, passou-se à fermentação contínua nos reatores acoplados em série, discutida a seguir.

5.6. Experimento contínuo

O experimento contínuo foi conduzido conforme descrito em 4.2.12. As amostras obtidas para as análises de amido, açúcar redutor e glicose no reator 1 e as amostras obtidas para as análises de açúcar redutor, glicose e teor alcoólico no reator 2, em um total de 215, estão apresentadas nas Tabelas 5 a 16 e nas Figuras 6 a 9.

Com o objetivo de discutir inicialmente os resultados do reator 1 (com a bactéria *B. subtilis* imobilizada), a abordagem será feita com base nas Tabelas 5 a 7 e Figura 6, para o período de fermentação com o meio MMAI 1%, e com base nas Tabelas 8 a 10 e Figura 7 para o período subsequente de fermentação com o meio MMAI 3%.

Os resultados do reator 2 (com a levedura imobilizada), serão discutidos com base nas Tabelas 11 a 13 e Figura 8 para o período de fermentação utilizando como substrato o meio MMAI 1% bioconvertido e proveniente do reator 1. As Tabelas 14 a 16 e a Figura 9 serão utilizadas para a discussão do período subsequente da fermentação utilizando como substrato o meio MMAI 3% bioconvertido.

Tabela 5 - Teores de amido em %, g/volume de meio (ml), g/l e % de conversão, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 1.

Tempo (h)	Amido			Conversão
	%	g/vol.de meio	g/l	%
Início	1,00	22,00	10,00	
24	0,16	3,52	1,60	84,0
42	0,05	1,10	0,50	95,0
48	0,05	1,10	0,50	95,0
60	0,05	1,10	0,50	95,0
70	0,07	1,11	0,70	93,0
83	0,07	1,65	0,75	93,0
91	0,08	1,76	0,80	92,0
107	0,13	2,86	1,30	87,0
118	0,15	3,41	1,55	84,5
132	0,18	3,96	1,80	82,0
143	0,20	4,40	2,00	80,0
156	0,16	3,63	1,65	83,5
167	0,13	2,86	1,30	87,0
181	0,14	3,08	1,40	86,0
192	0,14	3,19	1,45	85,5
206	0,15	3,30	1,50	85,0
214	0,16	3,52	1,60	84,0
228	0,15	3,41	1,55	84,5
236	0,15	3,30	1,50	85,0
256	0,12	2,64	1,20	88,0
277	0,10	2,20	1,00	90,0
301	0,08	1,76	0,80	92,0
% média de conversão calculada a partir de 83h = 86,0				

Tabela 6 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 1.

Tempo (h)	AR		
	%	g/vol.de meio	g/l
24	0,11	2,48	1,13
42	0,08	1,93	0,88
48	0,04	0,92	0,42
60	0,06	1,49	0,68
70	0,04	1,03	0,47
83	0,07	1,58	0,72
91	0,06	1,43	0,65
107	0,09	2,09	0,95
118	0,10	2,28	1,04
132	0,10	2,33	1,06
143	0,12	2,70	1,23
156	0,08	1,87	0,85
167	0,05	1,25	0,57
181	0,03	0,86	0,39
192	0,03	0,86	0,39
206	0,03	0,86	0,39
214	0,06	1,36	0,62
228	0,05	1,21	0,55
238	0,05	1,25	0,57
256	0,05	1,30	0,59
277	0,04	0,92	0,42
301	0,06	1,47	0,67

Tabela 7 - Teores de glicose em g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 1.

Tempo (h)	Glicose	
	g/vol.de meio	g/l
24	0,14	0,06
42	0,40	0,18
48	0,24	0,11
60	0,42	0,19
70	0,72	0,33
83	1,05	0,48
91	0,18	0,08
107	0,14	0,06
118	0,40	0,18
132	0,57	0,26
143	0,75	0,34
156	0,66	0,28
167	0,57	0,26
181	0,55	0,25
192	0,55	0,25
206	0,26	0,12
214	0,62	0,28
228	0,55	0,25
236	0,51	0,23
256	0,40	0,18
277	0,60	0,27
301	0,20	0,09

Figura 6— Teores de amido e de glicose (g/l) em função do tempo (h) no reator 1 do experimento contínuo com células imobilizadas de *Bacillus subtilis* no período 1 (meio MMAI 1%).

Nas primeiras 48h do experimento, período determinado para o "start up" do processo, a conversão do substrato foi de 95%.

A conexão dos reatores foi efetuada às 83h de fermentação no reator 1 quando a conversão do amido era da ordem de 93% e após 33h de fermentação no reator 2, tempo considerado para o "start up" neste reator.

De acordo com a Tabela 5, durante o primeiro período da fermentação contínua, a taxa de conversão média do amido foi de 86,0%, considerada satisfatória com relação ao valor de 87,51% referente ao experimento semi-contínuo.

Sabe-se que, devido a ação da α -amilase ser limitada pela quebra somente das ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina, diferentes dextrinas e sacarídeos são formados tais como maltoheptoses, maltohexoses, maltopentoses, maltotrioses, maltose e glicose (SCHEMBERG et al., 1993). Essa ação da α -amilase também é dependente do tempo de fermentação para que haja a formação de glicoses a partir das maltoheptoses (FOGARTY & KELLY, 1980 e REILLY, 1985).

De acordo com a Tabela 6, com relação aos teores de açúcares redutores, observa-se que houve uma média de 0,72g/l nas primeiras 83h e, no período subsequente, uma média de 0,75g/l foi observada. Com relação aos teores de glicose, de acordo com a Tabela 7, observa-se que, nas primeiras 83h de fermentação, os valores aumentaram de 0,06 para 0,48g/l correspondendo a média de 0,23g/l e, no período subsequente, a média de 0,21g/l foi observada. A percentagem de glicose em relação ao AR foi de 32% e de 28%, respectivamente.

A Figura 6 representa a conversão do amido em glicose durante este período da fermentação bacteriana. A conversão do amido em AR foi de 8,72% e em glicose foi de

2,44%. Às 143h houve o máximo de glicose no reator (0,34g/l) e às 301h houve o mínimo de amido no reator (0,80g/l).

Desta forma, observando que o amido remanescente após 301h de fermentação apresentou o mesmo valor encontrado após 8h da fermentação contínua, às 91h do experimento, decidiu-se pela introdução ao sistema do meio MMAI 3%.

A Q_{al} neste período de fermentação foi de 62,5ml/h, θ de 35,2h e D de $0,03h^{-1}$, sendo os dois últimos valores calculados conforme as eq. (3) e (5).

As Tabelas 8 a 10 e a Figura 7 apresentam os resultados do período 2, no reator 1.

Tabela 8 - Teores de amido em %, g/volume de meio (ml), g/l e % de conversão, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 2.

Tempo (h)	Amido			Conversão
	%	g/vol.de meio	g/l	%
309	0,31	6,82	3,10	69,0
325	0,55	12,10	5,50	45,0
350	0,80	17,60	8,00	(*) 73,3
374	0,80	17,60	8,00	73,3
396	0,68	14,96	6,80	77,3
420	0,52	11,44	5,20	82,6
444	0,41	9,02	4,10	86,3
468	0,30	6,60	3,00	90,0
492	0,38	8,54	3,88	87,3
516	0,34	7,57	3,44	88,6
540	0,35	7,76	3,53	88,3
564	0,66	14,45	6,57	78,0
585	0,70	15,33	6,97	76,6
609	0,66	14,45	6,57	78,0
633	1,19	26,20	11,91	60,3

% média de conversão (de 350 a 609h) = 81,6

(*) Cálculo baseado no meio com 3% de amido.

Tabela 9 - Teores de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 2.

Tempo (h)	AR		
	%	g/vol.de meio	g/l
309	0,03	0,85	0,39
325	0,05	1,18	0,54
350	0,12	2,75	1,25
374	0,19	4,31	1,96
396	0,13	3,03	1,38
420	0,13	3,03	1,38
444	0,16	3,67	1,67
468	0,31	7,01	3,19
492	0,35	7,78	3,54
516	0,34	7,67	3,49
540	0,34	7,50	3,41
564	0,33	7,34	3,34
585	0,33	7,34	3,34
609	0,33	7,34	3,34
633	0,32	7,23	3,29

Tabela 10 - Teores de glicose em g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 1 do experimento contínuo - período 2.

Tempo (h)	D.O. 546nm	Glicose	
		g/vol.de meio	g/l
309	0,034	0,21	0,09
325	0,027	0,16	0,07
350	0,027	1,67	0,76
374	0,025	1,56	0,71
396	0,013	0,81	0,37
420	0,040	2,50	1,14
444	0,018	1,05	0,48
468	0,028	1,65	0,75
492	0,037	2,15	0,98
516	0,045	2,62	1,19
540	0,030	1,69	0,77
564	0,015	0,79	0,36
585	0,022	1,16	0,53
609	0,029	1,54	0,70
633	0,015	0,79	0,36

Figura 7 – Teores de amido e de glicose (g/l) em função do tempo (h) no reator 1 do experimento contínuo com células imobilizadas de *Bacillus subtilis* no período 2 (meio MMAI 3%).

De acordo com a Tabela 8 e Figura 7, observa-se que ocorreu uma diminuição na conversão do amido durante o tempo compreendido entre 301 e 350h, período este considerado de estabilização do sistema, após a adição do meio MMAI 3%. Às 516h houve o máximo de glicose no reator (1,19g/l) e às 468h houve o mínimo de amido no reator (0,80g/l). A conversão do amido se manteve satisfatória com a média de 81,6% até o final do experimento. A conversão média do amido em AR foi de 10,62% e em glicose foi de 3%, e, a relação entre AR e glicose foi de 28%, conforme pode ser deduzido a partir dos valores encontrados nas Tabelas 9 e 10.

Uma tendência à diminuição da conversão do amido foi observada às 564h de fermentação e quando a conversão caiu para 60,3% às 633h da fermentação, pôde-se constatar que a estabilidade do sistema foi afetada nas condições de trabalho pré-fixadas como, por exemplo, a Q_{a1} , o θ e a D.

A seguir, as Tabelas 11 a 13 e Figura 8 e as Tabelas 14 a 16 e Figura 9 serão discutidas com relação ao comportamento da levedura imobilizada nos períodos 1 e 2, respectivamente.

Tabela 11 - Teores residuais de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 2 do experimento contínuo - período 1.

Tempo (h)	AR residuais		
	%	g/vol.de meio	g/l
16	0,33	7,30	3,32
20	0,33	7,30	3,32
33 (83)	0,26	5,83	2,65
41 (91)	0,19	4,36	1,98
57 (107)	0,08	1,91	0,87
68 (118)	0,08	1,91	0,87
82 (132)	0,07	1,63	0,74
93 (143)	0,10	2,31	1,05
106 (156)	0,05	1,10	0,50
117 (167)	0,03	0,86	0,39
131 (181)	0,07	1,69	0,77
142 (192)	0,03	0,86	0,39
156 (206)	0,03	0,77	0,33
164 (214)	0,06	1,52	0,69
178 (228)	0,06	1,36	0,62
188 (236)	0,04	1,01	0,46
206 (256)	0,05	1,10	0,50
227 (277)	0,09	2,13	0,97
251 (301)	0,10	2,27	1,03

Os números entre parêntesis representam o tempo total de fermentação no reator 1 do experimento contínuo.

Tabela 12 - Teores residuais de glicose em g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 2 do experimento contínuo - período 1.

Tempo (h)	Glicose residual	
	g/vol.de meio	g/l
Início	11,00	5,00
16	0,29	0,13
20	0,15	0,07
33	0,12	0,06
41	0,09	0,04
57	0,20	0,09
68	0,11	0,05
82	0,37	0,17
93	0,42	0,19
106	0,81	0,37
117	1,07	0,49
131	1,34	0,61
142	0,42	0,19
156	0,70	0,32
164	0,64	0,29
178	0,59	0,27
188	0,51	0,23
206	0,37	0,17
227	0,33	0,15
251	0,33	0,15

Tabela 13 - Teor alcoólico % p/v, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no período 1 do experimento contínuo.

Tempo (h)	Teor alcoólico		
	% p/v	g/vol.de meio	g/l
16	0,23	5,06	2,30
20	0,23	5,06	2,30
33	0,23	5,06	2,30
41	0,23	5,06	2,30
57	0,23	5,06	2,30
68	0,23	5,06	2,30
82	0,23	5,06	2,30
93	0,23	5,06	2,30
106	0,23	5,06	2,30
117	0,23	5,06	2,30
131	0,18	3,96	1,80
142	0,18	3,96	1,80
156	0,18	3,96	1,80
164	0,18	3,96	1,80
178	0,18	3,96	1,80
188	0,18	3,96	1,80
206	0,18	3,96	1,80
227	0,18	3,96	1,80
251	0,18	3,96	1,80

Figura 8— Teor alcoólico e glicose (g/l) em função do tempo (h) no reator 2 do experimento contínuo com células imobilizadas de Saccharomyces cerevisiae no período 1.

De acordo com os valores obtidos nas análises de AR, glicose e teor alcoólico durante o período inicial de fermentação, até o acoplamento dos reatores, às 33h, observa-se pelas Tabelas 11, 12 e 13 e Figura 8 que o AR remanescente foi de 2,65g/l que, em termos de glicose, correspondeu a um consumo de 4,94g/l (98,8% de utilização) e produção de 2,30g/l, ou seja, um η_{al} de 91,1% em relação ao valor teórico esperado, calculado de acordo com a eq. (6). A P_{al} foi de 0,57g/l.h⁻¹, de acordo com a equação (7), após 20h de fermentação.

Após o acoplamento dos reatores, até as 117h de fermentação, a média de AR remanescentes no mosto foi de 0,91g/l que, em termos de glicose residual, correspondeu a média de 0,2g/l, produção média de 2,30g/l de álcool e η_{al} de 93,9%. Neste período, a P_{al} média foi de 0,20g/l.h⁻¹. No período subsequente de fermentação, até 251h, os valores obtidos para AR remanescente, glicose residual e produção média de álcool, η_{al} e P_{al} foram de 0,64g/l, 0,26g/l, 1,80g/l, 74,4% e 0,13g/l.h⁻¹, respectivamente. Observou-se uma queda de 20,8% no η_{al} e de 35% na P_{al} , que pode ser observada na figura 8.

A fermentação neste período de 218h foi conduzida com uma Q_{al} , um θ e uma D de 62,5ml/h, 35,2h e 0,03h⁻¹, respectivamente.

Tabela 14 - Teores residuais de açúcares redutores - AR em %, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 2 do experimento contínuo - período 2.

Tempo (h)	AR residuais		
	%	g/vol.de meio	g/l
259 (309)	0,07	4,86	2,21
275 (325)	0,06	4,53	2,06
300 (350)	0,05	3,63	1,65
324 (374)	0,04	2,70	1,23
346 (396)	0,04	3,23	1,47
370 (420)	0,05	3,45	1,57
394 (444)	0,17	3,89	1,77
418 (468)	0,18	4,11	1,87
442 (492)	0,25	5,52	2,51
466 (516)	0,38	8,49	3,84
490 (540)	0,46	10,16	4,62
514 (564)	0,54	11,90	5,41
535 (585)	0,51	11,24	5,11
559 (609)	0,56	12,32	5,60
583 (633)	0,57	12,65	5,75

Os números entre parêntesis representam o tempo total de fermentação no período 1 do experimento contínuo.

Tabela 15 - Teores residuais de glicose em g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no reator 2 do experimento contínuo - período 2.

Tempo (h)	Glicose residual	
	g/vol.de meio	g/l
259	0,33	0,15
275	0,33	0,15
300	0,33	0,15
324	0,33	0,15
346	0,33	0,15
370	1,56	0,71
394	1,34	0,61
418	1,27	0,58
442	1,62	0,74
466	1,98	0,90
490	1,87	0,85
514	1,23	0,56
535	0,79	0,36
559	0,79	0,36
583	0,90	0,41

Tabela 16 - Teor alcoólico % p/v, g/volume de meio (ml) e g/l, em função do tempo (h), no período 2 do experimento contínuo.

Tempo (h)	Teor alcoólico		
	% p/v	g/vol.de meio	g/l
259	0,28	6,16	2,80
275	0,31	6,82	3,10
300	0,31	6,82	3,10
324	0,31	6,82	3,10
346	0,31	6,82	3,10
370	0,28	6,16	2,80
394	0,28	6,16	2,80
418	0,28	6,16	2,80
442	0,28	6,16	2,80
466	0,18	3,96	1,80
490	0,18	3,96	1,80
514	0,18	3,96	1,80
535	0,18	3,96	1,80
559	0,18	3,96	1,80
583	0,07	1,54	0,70

Figura 9 – Teor. alcoólico e glicose (g/l) em função do tempo (h) no reator 2 do experimento contínuo com células imobilizadas de Saccharomyces cerevisiae no período 2.

Pode-se observar pelos dados das Tabelas 14, 15 e 16 e Figura 9 que a média de AR remanescente nas amostragens feitas em 259 e 275h, foi de 2,13g/l que, em termos de glicose, correspondeu a um consumo de 5,75g/l (97,4% de utilização) e produção alcoólica média de 2,90g/l, ou seja, um η_{al} de 100% em relação ao valor teórico esperado, calculado de acordo com a eq. (6) e P_{al} média de 0,27g/l.h⁻¹, de acordo com a equação (7).

Conforme observa-se na Figura 9, os maiores teores alcoólicos encontrados foram 3,10g/l e os menores teores de glicose residual foram 0,15g/l, entre 275 e 346h. A manutenção do η_{al} de 100% observado no período subsequente até 442h pode ser considerado como uma resposta da levedura à entrada do meio MMAI 3% bioconvertido.

Mantidos os parâmetros para Q_{al} , η e D , a P_{al} média foi de 0,12g/l.h⁻¹, que diminuiu até o final do experimento, ocorrendo, da mesma forma, uma queda de 34% no η_{al} às 559h.

Todavia, para otimizar a atividade da levedura, seria conveniente que fossem estabelecidos novos valores para os parâmetros envolvidos, fixando-se cada um deles experimentalmente, após, por exemplo, um aumento no valor da D , que refletiria em um aumento da Q_{al} com consequente diminuição do θ , aumentando-se, assim, a produtividade do sistema.

No entanto, segundo DAS et al. (1993), é evidente que, com um aumento na taxa de diluição a produtividade aumenta; ao mesmo tempo, a concentração de etanol no efluente diminui, resultando em sub utilização da glicose, com consequente perda no efluente. Os autores determinaram que existe um ponto crítico para o valor D , acima do qual ocorre uma acentuada queda na eficiência de utilização do substrato.

Com o mesmo enfoque, NGUYEN & SHIEH (1992), estudaram diferentes valores de D visando relacionar este parâmetro com o η_{al} e P_{al} . Os autores iniciaram com D $0,04h^{-1}$, Q_{al} de $18,4ml/h$ e encontraram a maior concentração em etanol no efluente de $97,14g/l$, partindo de $250g/l$ de glicose. A seguir, os autores ensaiaram valores de D maiores, chegando a $0,14h^{-1}$ e verificaram que o η_{al} foi de 71%. Na presente pesquisa, foi possível obter um η_{al} de 100% utilizando uma D de $0,03h^{-1}$.

Embora na literatura citada na revisão bibliográfica seja possível obter vários valores para os parâmetros D , θ e Q_{al} que levaram a resultados satisfatórios para η_{al} e P_{al} , todos estes parâmetros foram fixados nas condições exclusivas de cada trabalho sempre com altas concentrações de açúcares no substrato.

Assim, por exemplo, PAREKH & WAYMAN (1987) obtiveram um P_{al} de $23g/l.h^{-1}$ a partir de substrato contendo $195g/l$ de AR e Q_{al} de $550ml/h$ e D de $0,27h^{-1}$. HAMDY et al. (1990) obtiveram um P_{al} de $40g/l.h^{-1}$ a partir de substrato contendo $167g/l$ de glicose e Q_{al} de $1,0 l/h$ e D de $3,1h^{-1}$. TYAGI et al. (1992) obtiveram uma P_{al} de $31,8g/l.h^{-1}$ a partir de substrato contendo $200g/l$ de AR, Q_{al} de $265ml/h$ e D de $0,53h^{-1}$.

Todavia, na pesquisa em questão, os resultados alcançados para os parâmetros de η_{al} e P_{al} estiveram diretamente dependentes do substrato bioconvertido no reator 1, que apresentou valores baixos de glicose. A manutenção da viabilidade da levedura imobilizada para a fermentação deste substrato foi devida ao suprimento periódico de nutrientes.

Este procedimento resulta na manutenção do crescimento e viabilidade, prolongando a atividade catalítica das células imobilizadas no reator, segundo PAREKH & WAYMAN (1987) que, de modo a evitar este declínio, introduziram ao

sistema contínuo meio contendo fatores de crescimento. Da mesma forma, LINKO & LINKO (1981) preconizam a adição periódica de nutrientes com o objetivo de regenerar as células imobilizadas e manter a produção alcoólica por vários meses.

O presente experimento em processo simultâneo de sacarificação e fermentação contínua foi conduzido satisfatoriamente por 25 dias e 9h e mantendo um θ de 35,2h. Autores como YAMADE & FUKUSHIMA (1989) mantiveram por 30 dias a condução do processo, utilizando enzimas purificadas e um θ de 20 a 30h.

KIM & RHEE (1993) operaram o reator por 40 dias, utilizando *Z. mobilis* e enzimas α -amilase e glicoamilase, coimobilizadas, extraídas de *B. licheniformis* e *A. niger*, respectivamente e trabalharam com D de $0,84\text{h}^{-1}$ e θ de 18h; assim, foi possível trabalhar com quantidade elevada de amido (200g/l) obtendo P_{al} de 37g/l.h^{-1} .

LEE et al. (1993b), conduziram satisfatoriamente o processo de sacarificação e fermentação contínua por 7 dias, utilizando a coimobilização de três microrganismos e com 5% de amido bruto de arroz irradiado, com uma P_{al} de 19g/l e um η_{al} de $0,43\text{g/l.h}^{-1}$. A medida que foram aumentadas as concentrações iniciais de amido para 10 e 20%, a produção de etanol foi de 34 e 61 g/l, mas o η_{al} diminuiu para 0,40 e $0,37\text{g/l.h}^{-1}$, respectivamente, uma vez que houve acúmulo de glicose nos meios de 5,3 e 10g/l, em função da inibição da bactéria produtora de etanol ocorrida pelo abaixamento do pH do meio, devido à produção de ácidos orgânicos pelo fungo coimobilizado no sistema.

Nas condições pelas quais o experimento em questão foi conduzido, pode-se admitir a viabilidade do processo SSSF embora prevaleça a necessidade de otimização do sistema.

Em toda a literatura científica pertinente ao assunto em questão foi observado uma constante preocupação dos pesquisadores na otimização dos processos pois, as dificuldades inerentes à complexidade destas reações multienzimáticas, são maiores do que as soluções já propostas para a condução satisfatória a nível industrial.

Ao se utilizar uma fonte amilácea para a bioconversão, deve-se prever a necessidade do uso de microrganismos e/ou enzimas coimobilizadas, para a completa sacarificação do substrato fornecendo níveis adequados de açúcares fermentescíveis para a produção econômica de etanol.

Assim pode-se ressaltar, na pesquisa em questão, pontos favoráveis que deverão colaborar para a otimização do processo (1) condução a temperaturas baixas, da ordem de 35°C; (2) utilização de suporte de alta eficiência para a imobilização, resistente e reutilizável; (3) reatores acoplados permitindo a ação independente das enzimas em cada substrato; (4) reatores dispostos de forma a facilitar a remoção de produtos inibitórios finais.

Em contrapartida, os pontos a serem ajustados são (1) utilização de microrganismos mais eficazes quanto a conversão do amido, portadores de enzimas que permitam a diminuição do peso molecular das dextrinas; (2) utilização de maiores concentrações de amido no substrato e/ou uso de subprodutos enriquecidos como substrato; (3) condução experimental visando aumentar a P_{a1} em função de se poder trabalhar com maior Q_{a1} e, conseqüentemente menor θ e maior D .

6. CONCLUSÕES

- 1) É viável o processo SSSF utilizando culturas de *Bacillus subtilis* FT 014-B e de *Saccharomyces cerevisiae* ATYH imobilizadas e mantidas em reatores cilíndricos com volume de 4,2 l e com controle de temperatura a 35°C;
- 2) O suporte empregado para a imobilização das células microbianas, carvão mineral poroso, permitiu 90% de eficiência de imobilização, retendo $2,7 \times 10^6$ UFC/ml para o *B. subtilis* e $8,1 \times 10^7$ células/ml para a *S. cerevisiae*, apresentando as características de ser resistente e reutilizável;
- 3) O experimento semi-contínuo com células imobilizadas de *B. subtilis*, utilizando meio com 1% de amido, operou por 238h, a Q_{al} 16,37ml/h, θ 48,8h e D $0,02h^{-1}$, com efetiva conversão do amido de 87,51% e produção média de 2,0g/l de AR;
- 4) O experimento semi-contínuo com células imobilizadas de *S. cerevisiae*, a partir de meio com 9% de glicose e utilizando meio bioconvertido, operou por 214h, a Q_{al} 16,6ml/h, θ 54,2h e D $0,02h^{-1}$, com produção média de 8,82g/l de álcool;
- 5) O processo contínuo com células imobilizadas de *B. subtilis* e *S. cerevisiae*, operou satisfatoriamente por 550h, a Q_{al} 62,5ml/h, θ 35,2h e D $0,03h^{-1}$.

6) No processo contínuo com o *B. subtilis* imobilizado, em meio com 1% de amido, a conversão média do amido foi de 86,0%, em AR de 8,72% e em glicose de 2,44%;

7) No processo contínuo com o *B. subtilis* imobilizado, em meio com 3% de amido, a conversão média do amido foi de 81,6%, em AR de 10,62% e em glicose de 3%;

8) No processo contínuo com a *S. cerevisiae* imobilizada, utilizando o meio bioconvertido por 84h, o rendimento em álcool foi de 93,9% e 74,4% nas 134h subsequentes; o rendimento chegou a 100% até as 442h, período este referente a fermentação do meio bioconvertido a partir de 3% de amido;

9) No processo contínuo com a *S. cerevisiae* imobilizada, as produções médias de álcool foram de 2,30g/l, 1,80g/l e 2,90g/l e as produtividades médias de 0,20, 0,13 e 0,27g/l.h⁻¹, considerando os períodos discriminados acima;

10) Face à complexidade do estudo submetido a apreciação, firma-se definitivamente a proposição de dar prosseguimento a esta investigação, minudente e sistemática, com o fim de descobrir ou estabelecer fatos ou princípios relativos a este campo do conhecimento científico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSUMPÇÃO, R. M. V. & MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes; padronização, preparação, purificação.** São Paulo, Edgard Blücher, 1968. p.84.
- BANDYOPADHYAY, K. K. & GHOSE, T. K. Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. III. Physiology of growth and metabolism on various supports. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 24:805-15, 1982.
- BATES, L. F.; FRENCH, D.; RUNDLE, R. E. Amylose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation. **The Journal of the American Chemical Society**, Easton, 65:142-8, 1943.
- BARHAM, D. & TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst**, London, 97:142-5, 1972.
- BERNFELD, P. Amylases α and β . In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. **Methods in enzymology**, New York, Academic Press, 1:149-50, 1955.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; LELOUP, V. Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. **Industries Alimentaires et Agro-Industrielles**, Paris, 107 (6):512-32, Juin 1990.

- BUZÁS, Z.; DALLMANN, K.; SZAJÁNI, B. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 34:882-4, 1989.
- CASTRO, R. G.; FERRERO, M. A.; ABATE, C. M.; MENDEZ, B. S.; SINERIZ, F. Simultaneous production of alpha and beta amylases by *Bacillus subtilis* MIR-5 in batch and continuous culture. **Biotechnology Letters**, Kew, 14(1):49-54, 1992.
- CHANG, H.N.; LEE, W.G.; KIM, B.S. Cell retention culture with an internal filter module: continuous ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 41:677-81, 1993.
- CHIBATA, I, & TOSA, T. Transformations of organic compounds by immobilized microbial cells. **Advances in Applied Microbiology**, New York, 11:1-25, 1969.
- CHIBATA, I. & TOSA, T. Immobilized cells: historical background. In: CHIBATA, I. & WINGARD Jr., L.B., ed. **Immobilized microbial cells**. New York, Academic Press, 1983. p.1-10. (Applied Biochemistry and Bioengineering, 4).
- CHIBATA, I.; TOSA, T.; FUJIMURA, M. Immobilized living microbial cells. **Annual Reports on Fermentation Processes**, San Diego, 6:1-22, 1983.

- CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Immobilized biocatalysts to produce aminoacids and other organic compounds. In: LASKIN, A.I. Enzyme and immobilized cells in biotechnology. Menton Parks, The Benjamin/Cummings, 1985. p.37-70.
- CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Methods of cell immobilization. In: DEMAIN, A.L. & SOLOMON, N.A., ed. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Washington, American Society for Microbiology, 1986. p. 217-29.
- CHUA, J. W.; FUKUI, N.; WAKABAYASHI, Y.; TOSHIOMI, Y.; TAGUCHI, H. Enzymatic hydrolysis of sweet potato for energy - saving production of ethanol. *Journal of Fermentation Technology*, Osaka, 62(2):123-30, 1984.
- CZARNECKI, Z. & GRAJEK, W. Starch hydrolisis and its effect on product yield and microbial contamination in yeast ethanol fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, 7:355-8, 1991.
- DAS, D.; GAIDHANI, N. R.; MURARI, K.; GUPTA, P.S. Ethanol production by whole cell immobilization using lignocellulosic materials as solid matrix. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Tokyo, 75(2):132-7, 1993.
- DAUGULIS, A. J.; BROWN, N. M.; CLUETT, W. R.; DUNLOP, D. B. Production of ethanol by adsorbed yeast cells. *Biotechnology Letters*, Kew, 3(11):651-6, 1981.

- De MOT, R.; ANDRIES, K.; VERACHTERT, H. Comparative study of starch degradation and amylase production by ascomycetous yeast species. **Systematic Applied Microbiology**, London, 5:106-18, 1984.
- DELPEUCH, F. & FAVIER, J. C. Etude de quelques proprietes physico-chimiques de l'amidon de diverses plantes alimentaires de Cameroun. **Cahiers de l'ONAREST**, Paris, 2(3):53-82, Août 1979.
- DERVAKOS, G.A. & WEBB, C. On the merits of viable cell immobilization. **Biotechnology Advances**, Oxford, 9:559-612, 1991.
- DURAND, G. & NAVARRO, J. M. Immobilized microbial cells. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, 13(9):14-23, 1978.
- ESTADOS UNIDOS. CAST - Council for Agricultural Science and Technology. Ionizing energy in food processing and pest control: I. Wholesomeness of food treated with ionizing energy. Ames, 1987. 50p. (Report n° 109)
- FOGARTY, W.M. & KELLY, C.T. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: ROSE, A. H., ed. **Economic microbiology - microbial enzymes and bioconversions**. London, Academic Press, 1980, v.5, p.116-58.
- FRAZIER, W. C. & WESTHOFF, D. C. **Food microbiology**. 3.ed., New York, McGraw Hill, 1978. 540p.

FURUSAKI, S. & SEKI, M. Use and engineering aspects of immobilized cells in biotechnology. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, Berlin, 46:162-82, 1992.

GIORDANO, R. L. C. Estudo da coimobilização de glicoamilase e levedura para a fermentação alcoólica contínua de matéria-prima amilácea. São Paulo, 1992. 232p. (Doutoramento - Escola Politécnica/USP).

GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: FASMAN, G.D., ed. **Handbook of biochemistry and molecular biology**. 3.ed., Boca Raton, CRC Press, 1976. v.1., p.370-7.

HAMDY, M. K.; KIM, K.; RUDTKE, C. A. Continuous ethanol production by yeast immobilized onto channeled alumina beads. **Biomass**, Essex, 21:189-206, 1990.

HOLCBERG, I. B. & MARGALITH, P. Alcoholic Fermentation by immobilized yeast at high sugar concentrations. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, 13:133-40, 1981.

HOSHINO, K.; TANIGUCHI, M.; MARUMOTO, H.; FUJII, M. Repeated batch conversion of raw starch to ethanol using amylase immobilized on a reversible soluble-autoprecipitating carrier and flocculating yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, 53(7):1961-7, 1989.

JACOBS, M. B. & GERSTEIN, M. J. **Handbook of microbiology**, Princeton, D. Van Nostrand, 1960. p.28-9, 119-20.

- JACK, T. R. & ZAJIC, J. E. The immobilization of whole cells. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, Berlin, 5:126-44, 1977.
- JAIN, W. K.; TORAN-DIAZ, I.; BARATTI, J. Continuous production of ethanol from fructose by immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 27:613-20, 1985.
- JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts - the effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, 16:42-9, Apr./May 1981.
- JOSEPHSON, E. S.; THOMAS, M. H.; CALHOUN, W. K. Nutritional aspects of food irradiation: an overview. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, 2:299-313, 1978.
- KENNEDY, J. F. & MELO, E. H. M. Immobilized enzymes and cells. **Chemical Engineering Progress**, New York, 86:81-9, Jul., 1990.
- KENNEDY, J. F. & CABRAL, J. M. S. Immobilized living cells and their applications. In: CHIBATA, I. & WINGARD Jr., L. B., ed. **Immobilized microbial cells**. New York, Academic Press, 1983. p.189-280. (Applied Biochemistry and Bioengineering, 4).
- KIERSTAN, M. & BUCKE, C. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 19:387-97, 1977.

- KIM, C. H. & RHEE, S. K. Process development for simultaneous starch saccharification and ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, 28:331-9, 1993.
- KLEIN, J. & WAGNER, F. Methods for the immobilization of microbial cells. In: CHIBATA, I. & WINGARD Jr., L. B. **Immobilized microbial cells**. New York, Academic Press, 1983. p.11-51. (Applied Biochemistry and Bioengineering, 4).
- KOKUBU, T.; KARUBE, I.; SUZUKI, S. α -Amylase production by immobilized whole cells of *Bacillus subtilis*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, 5:233-40, 1978.
- KOLOT, F. B. New Trends in yeast technology-immobilized cells. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, 15:2-8, 1980.
- KRAYBILL, H. F. Effect of processing on nutritive value of food: irradiation. In: RECHCIGL, M. Jr., ed. **Handbook of nutritive value of processed food**. Boca Raton, CRC Press, 1984. v.1. 679p.
- KUMAGAI, M. H.; SVERLOW, G. G.; CIOPPA, G.; GRILL, L. K. Conversion of starch to ethanol in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing rice α - amylase from a novel *Pichia pastoris* alcohol oxidase promoter. **Bio/Technology**, New York, 11:606-10, 1993.

- LEE, S. W.; YAGIMA, M.; TANAKA, H. Use of food additives to prevent contamination during fermentation using a co-immobilized mixed culture system. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tokyo, 75(5):389-91, 1993a.
- LEE, S. W.; EBATA, T.; LIU, Y. C.; TANAKA, H. Co-immobilization of three strains of microorganisms and its application in ethanol production from raw starch under unsterile conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tokyo, 75(1):36-42, 1993b.
- LINKO, P. & LINKO, Y. Y. Applications of immobilized microbial cells. In: CHIBATA, I. & WINGARD Jr., L. B. **Immobilized microbial cells**. New York, Academic Press, 1983. p. 53-151. (Applied Biochemistry and Bioengineering, 4).
- LINKO, Y. Y. & LINKO, P. Continuous ethanol production by immobilized yeast reactor. **Biotechnology Letters**, Kew, 3(1):21-6, 1981.
- LOTHER, A. M.; OETTERER, M.; HAMDY, M. K.. Development of cells immobilization process for starch bioconversion. In: IFT - ANNUAL MEETING BOOK OF ABSTRACTS, Anaheim, 1995. Chicago, IFT, 1995. p.117.
- LOTHER, A.M. & OETTERER, M. Microbial cell immobilization applied to alcohol production. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, 1995. (No prelo).

- MESSING, R. A. Immobilized microbes. **Annual Reports on Fermentation Processes**, San Diego, 4:105-21, 1980.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, Washington, 31(3):426-8, 1959.
- MOSS, G. E. The microscopy of starch. In: RADLEY, J. A. ed. **Examination and analysis of starch and starch products**, London, Applied Science Publishers, 1976. p. 33-60.
- NAVARRO, J. M. & DURAND, G. Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. **European Journal of Applied Microbiology**, Berlin, 4:243-54, 1977.
- NGUYEN, V.T. & SHIEH, W.K. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast in a fluidized bed reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, 55: 339-46, 1992.
- OHTA, K.; HAMADA, S.; NAKAMURA, T. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 59(3):729-33, 1993.
- OETTERER, M. & HAMDY, M. K. Desenvolvimento do processo de imobilização de células para bioconversão de substrato amiláceo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. 13., São Paulo, 1992. **Programa e Resumos**. São Paulo, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1992. p. 139.

- PAREKH, S.R. & WAYMAN, M. Performance of a novel continuous dynamic immobilized cell biorreactor in ethanolic fermentation. *Enzyme Microbiology Technology*, Surrey, 9:406-10, 1987.
- PASCHALL, E. F. & ARONS, H. L. Functional behavior of carbohydrates in foods. In: **SYMPOSIUM ON FATS AND CARBOHYDRATES IN PROCESSED FOODS**. Chicago, October 1973.
- PATEL, S.; JAIN, N.; MADAMWAR, D. Production of α -amylase from *Halobacterium halobium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, 9:25-8, 1993.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. McGraw-Hill, São Paulo, 1981. v.2., p.1026, 1036.
- PHILLIPS, C. R. & POON, Y. C. *Immobilization of cells*. Berlin, Springer-Verlag, 1988. 167p.
- PRADELLA, J. G. da C. Estudo da fermentação alcoólica contínua de melaço de cana-de-açúcar com células imobilizadas. São Paulo, 1987. 234p. (Doutoramento - Escola Politécnica/USP).
- REILLY, P. J. Enzymic degradation of starch. In: VAN BEYNUM, G. M. A. & ROELS, J. A., ed. *Starch conversion technology*, New York, Marcel Dekker, 1985. p.101-42
- ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. *Immobilized enzymes and cells*, Horncchurch, I.O.P. Publ., 1987. 248p.

- RUGGERI, B.; SASI, G.; SPECCHIA, V.; BOSCO, F.; MARZONA, M. Alginate beads coated with polyacrylamide resin: potential as a biocatalyst. *Process Biochemistry*, Rickmansworth, 26:331-5, 1991.
- SALVA, T. J. G. & MORAES, I. O. Perfil da síntese de α -amilase de *Bacillus subtilis* ATCC 601B. *Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25(2):68, 1991a.
- SALVA, T. J. G. & MORAES, I. O. Efeito da temperatura de fermentação e do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de α -amilase. *Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25(2):75, 1991b.
- SALVA, T. J. G. & MORAES, I. O. Perfil da síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 12(2):140-4, 1992.
- SCHEMBERG, A. C. G.; VICENTE, E. J.; ASTOLFI-FILHO, A. Expression of heterologous amylases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 45(3/4):181-91, 1993.
- SHABTAI, Y.; CHAIMOVITZ, S. FREEMAN, A.; KATCHALSKI-KATZIR, E.; LINDER, C.; NEMAS, M.; PERRY, M.; KEDEM, O. Continuous ethanol production by immobilized yeast reactor coupled with membrane pervaporation unity. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 38:869-76, 1991.

- SITTON, O. C. & GADDY, J. L. Ethanol production in an immobilized-cell reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 22:1735-48, 1980.
- SMITH, B. W. & ROE, J. H. A photometric method for the determination of α -amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, 179:53-9, 1949.
- TAMPION, J. & TAMPION, M. D. **Immobilized cells: principles and applications**. London, Cambridge University Press, 1988. 257p.
- TYAGI, R. D. & GHOSE, T. K. Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. I. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 24:781-95, 1982.
- TYAGI, R.D.; GUPTA, S.K.; CHAND, S. Process engineering studies on continuous ethanol production by immobilized *S. cerevisiae*. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, 27:23-32, 1992.
- VENKATASUBRAMANIAN, K.; KARKARE, S. B.; VIETH, W. R. Chemical engineering analysis of immobilized-cell systems. In: CHIBATA, I. & WINGARD Jr., L. B., ed. **Immobilized microbial cells**. New York, Academic Press, 1983. p.311-49. (Applied Biochemistry and Bioengineering, 4).

- VIETH, W. R. & VENKATASUBRAMANIAN, K. Immobilized microbial cells in complex biocatalysis. In: VENKATSUBRAMANIAN, K. **Immobilized microbial cells**. Washington, American Chemistry Society, 1978. p.1-11. (ACS Symposium Ser., 106).
- VITOLO, M. & MINAMI, P. S. **Leveduras em biotecnologia**. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, 1989. 98p.
- WADA, M.; KATO, J.; CHIBATA, I. A new immobilization of microbial cells. Immobilized growing cells using carrageenan gel and their properties. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, 8:241-7, 1979.
- WADA, M.; KATO, J.; CHIBATA, I. Continuous production of ethanol in high concentration using immobilized growing yeast cells. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, 11:67-71, 1981.
- WADA, M.; KATO, J.; CHIBATA, I. Electron microscopic observation on immobilized growing yeast cells. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, 58(4):327-31, 1980.
- WILLIAMS, D. & MUNNECKE, D. M. The production of ethanol by immobilized yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, 23:1813-25, 1981.
- WILLIAMS, P. C.; KUZINA, F. D.; HLYNKA, I. A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flours. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 47, 4:411-20, 1970.

- WURZBURG, O. B. Starch in the food industry. In: FURIA, T. E. ed. **Handbook of Food Additives**. 2.ed., Boca Ranton, CRC Press, 1983. v.1. p. 361-95.
- YAMADE, K. & FUKUSHIMA, S. Continuous alcohol production from starch materials with a novel immobilized cell/enzyme bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, 67(2):97-101, 1989.
- ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch/Stärke**, Weinheim, 40(2):44-50, 1988.

APÊNDICE 1

Valores observados entre o tempo (em horas) e a densidade ótica ($\lambda = 620\text{nm}$) durante o crescimento do *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* ATYH.

Tempo (h)	D.O. (620nm)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i> ATYH
1	0,101	0,060
2	0,195	0,066
3	0,290	0,123
4	0,421	0,172
5	0,560	0,251
6	0,733	0,361
7	0,821	0,501
8	0,886	0,673
9	0,921	0,855
10	0,930	1,020
11	0,920	1,115
12	0,914	1,232
13	0,903	1,302
14	0,902	1,366
15	0,900	1,386
16	0,900	1,395
17	0,901	1,420
18	0,898	1,422
19	0,898	1,422
20	0,897	1,422

APÊNDICE 2

Valores observados entre a % de amido e a densidade ótica ($\lambda = 620\text{nm}$).

Amido (%)	D.O (620nm)
0,06	0,029
0,12	0,102
0,25	0,165
0,50	0,321
1,00	0,695

Curva padrão do amido.

APÊNDICE 3

Valores observados entre a concentração de açúcares redutores (em g/l) e a densidade ótica ($\lambda = 540\text{nm}$).

Amido (%)	D.O (540nm)
1,80	1,120
1,00	0,597
0,50	0,302
0,40	0,241
0,30	0,180
0,20	0,120
0,10	0,060

Curva padrão de açúcares redutores.