SUNAO SATO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA
COM O APROVEITAMENTO DE SACARÍDEOS OBTIDOS
A PARTIR DE CANA-DE-ACÚCAR.

Texto apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da USP para o Concurso de
Livre-Docência, junto ao Departamento de
Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

SÃO PAULO

1992

A meus pais

A minha esposa, Midory

A meus filhos, Simone e Sergey

A meus amigos

Pela compreensão e paciência

Ao

Prof. Dr. Eugênio Aquarone, pelo apoio,
incentivo e pelos vários anos de traba-
lho em colaboração que resultaram em
grande parte deste texto.

AGRADECIMENTOS

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos meus amigos João Carlos Monteiro de Carvalho e Orlando Zancanaro Junior, da disciplina de Tecnologia das Fermentações e Tecnologia das Fermentações para Alimentos pelo apoio, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Milton Leôncio Brazzach pela força e apoio que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Walter Borzani, pela amizade e estímulo.

Aos colegas docentes do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela amizade e apoio prestado.

Ao Dante Augusto Moraes, pelo importante auxílio no uso do microcomputador na elaboração do texto e amizade.

Às Sras. Maria do Rosario Pinto Pedrazzi Chamon, Rosemary Colombo Lima e ao Sr. Juarez Vieira de Souza, da Secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP, pela eficiente colaboração.

Aos pós-graduandos: Carlos Augusto Montenegro Ferraz, Margareth Krauter, João Carlos Monteiro de Carvalho, Bluma Linkowski Faintuch.

Ao pessoal técnico e auxiliar: Dante Augusto Moraes, Kleber Albuquerque Almeida, Nilton Moraes Bloisi, Candida da Costa Maciel e Magno Marmo Teodoro de Assis, pela colaboração nos trabalhos desenvolvidos.

ERRATA

Página 14: Eliminar o último parágrafo “Microrganismos fotossintetizantes.....ou fototróficos”, pois repete no início da página 15

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1 Processos Fermentativos.....	7
1.1.1 Descontínuo.....	7
1.1.2 Contínuo.....	13
2. Fermentação Alcoólica.....	16
2.1 Ação de desinfetantes em mosto de fermentação.....	16
2.2 Processo descontínuo alimentado.....	21
2.3 Processo contínuo.....	25
3. Microrganismos Fotossintetizantes.....	26
3.1 Introdução.....	26
3.2 Tipos de processos.....	28
3.3 Condições gerais de crescimento.....	29
3.3.1 Requisitos luminosos.....	30
3.3.2 Efeito da densidade populacional.....	30
3.3.3 Temperatura.....	31
3.3.4 Efeito da luz e nutrientes na flutuação.....	31
3.3.5 Concentração de oxigênio.....	32
3.3.6 Efeito de turbulência.....	33
3.3.7 Sistema de cultivo.....	33
3.4 Fixação fotossintética do anidrido carbônico.....	34
4. Anexo 1.....	38
5. Anexo 2.....	50
6. Anexo 3.....	61
7. Anexo 4.....	75
8. Anexo 5.....	84
9. Anexo 6.....	88
10. Anexo 7.....	91
11. Anexo 8.....	97
12. Anexo 9.....	103
13. Anexo 10.....	110
14. Anexo 11.....	115

1. INTRODUÇÃO

No presente "texto" procuramos descrever os resultados de alguns trabalhos realizados por nós ao longo da nossa dedicação à pesquisa e ao ensino.

Serão discutidas as duas principais linhas de pesquisa que estamos desenvolvendo: fermentação alcoólica e microrganismos fotossintetizantes; a faremos de uma maneira sucinta, uma vez que já foram objeto de dissertação de mestrado e na maioria já publicados ou enviados para publicação.

O objetivo deste "texto", é portanto, oferecer uma visão geral de nossas principais atividades de pesquisa.

O Brasil tem tradição no uso de etanol como combustível desde a década de 20, quando o melaço e os excedentes da produção de cana eram convertidos para etanol anidro pelas próprias usinas produtoras de açúcar, em destilarias anexas, e vendidas ao governo para serem adicionados à gasolina. Porém esta adição sempre foi irregular, pois quanto maior o excedente, maior a proporção de etanol na gasolina e quando não havia excedente, ou ainda nas épocas de entre-safra, o teor de etanol era nulo.

A porcentagem da mistura foi sendo aumentada progressivamente, acompanhada por modificações tecnológicas na indústria automobilística. Atualmente parte dos automóveis novos comercializados no Brasil, utiliza exclusivamente etanol como combustível.

A crise do petróleo, na década de 70, levou o governo brasileiro à criação em 14 de novembro de 1975 do Programa Nacional do Álcool (PRO-ÁLCOOL) com o objetivo de produzir 12,5 bilhões de litros de álcool em 1990, para substituir a maior parte possível dos combustíveis derivados do petróleo por etanol obtido de cana-de-açúcar. Foram criadas inúmeras destilarias autônomas e passou-se assim a ter uma maior constância na proporção de etanol na gasolina, além de ser introduzido no mercado de etanol hidratado como combustível.

Na Tabela 1, mostramos a produção a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar, em destilarias autônoma e anexa.

TABELA 1. Produção de álcool a partir de 1 tonelada de cana-de-açúcar.

	Destilaria	
	autônoma	anexa
Álcool (Litros)	70	12
Açúcar (Kg)	--	90
Melaço (Kg)	--	45
Vinhaça (Kg)	870	156
Bagaço (Kg)	300	300

Em 1990, segundo fontes do Ministério da Economia, Fazenda e Planejamento estão em funcionamento no Brasil, 190 usinas para moagem de cana-de-açúcar e 335 destilarias de álcool.

Com a implantação do PROÁLCOOL, o Brasil se destacou no cenário internacional como maior produtor de etanol. A tabela 2 (Boletim Estatístico do IAA e Anuário Estatístico do Brasil) mostra a evolução da produção de álcool no Brasil desde 1970.

TABELA 2 - Evolução da produção de etanol no Brasil.

Safra	Produção Total (anidro + hidratado) (em metros cúbicos)
1970/71	637238
1972/73	680972
1974/75	624985
1976/77	664022
1878/79	2490603
1980/81	3706375
1982/83	5823339
1984/85	9251552
1986/87	10506712
1988/89	11713271
1989/90	11916387
1990/91	11782928

Fonte: Anuário Estatístico do Brasil/M.E.F.P. (1991)

Em 1986, no mercado mundial houve uma queda substancial do preço do barril de petróleo o que levou a generalizados questionamentos dos programas energéticos alternativos. O Proálcool deparou-se com uma fase crítica em que o etanol passou a ser mais caro que a gasolina. Mas certamente é errônea a utilização de referencial imediato e comparação direta. Deve-se dar um tratamento adequado aos custos e benefícios do Programa Nacional de Álcool. À despeito das particularidades de cada país, deve-se considerar:

- a) custo social de substituição de importação e/ou incremento de exportações;
- b) custo social de poluição ambiental;
- c) benefício regulador do mercado internacional do açúcar.

O etanol na forma anidra substitui com vantagens os aditivos do tipo "chumbo-tetraetila" no tocante ao rendimento, sem os inconvenientes da poluição ambiental e na forma hidratada, utilizado como combustível, é comprovadamente menos tóxico que a gasolina.

Além de ser menos poluente, o etanol é uma fonte de energia proveniente de matéria-prima renovável, o que contribui positivamente para o escolhermos como combustível.

Seria difícil manter a utilização do etanol hidratado como combustível se não houvesse perspectivas de que a obtenção de etanol por processo fermentativo venha a se tornar auto-suficiente. Mas sabemos que o custo da produção de etanol tem diminuído seja pelo aumento do rendimento e produtividade da fermentação, seja pelo melhor aproveitamento da matéria-prima e separação do etanol. Neste sentido, há alguns trabalhos avaliando a questão da evolução da produção de etanol no Brasil.

A produção de etanol no Brasil concentra-se basicamente na utilização de matérias-primas açucaradas, como o melaço e a cana-de-açúcar.

Como até poucos anos, a produção de etanol era encarada como uma atividade secundária da indústria açucareira, estando condicionada ao aproveitamento do melaço ou ao excedente de cana-de-açúcar, os processos industriais de fermentação alcoólica pouco evoluíram do ponto de vista técnico. No entanto há a possibilidade de utilização de matérias-primas tradicionalmente não utilizadas para produção de etanol, como culturas complementares à cana-de-açúcar ou sua substituição em determinadas regiões. Apesar da preocupação crescente no emprego de diversas matérias primas celulósicas e amiláceas, a produção atual de etanol no País ainda se dá, basicamente à partir de cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar apresenta altos teores de sacarose, desta forma, o caldo de cana-de-açúcar ou melaço (sub-produto da fabricação de açúcar) constituem as principais matérias-primas para a atividade de microrganismos que a utilizam como fonte de carbono.

A tabela 3 mostra a produção atual de etanol a partir das principais matérias-primas.

TABELA 3 - Produção atual de etanol a partir das principais matérias-primas.

Matéria-prima	Rendimentos		
	(t/ha)	(l/t)	(l/ha)
Melaço	—	350,0	—
Cana-de-açúcar	50,0	70,0	3500,0
Mandioca	2,0	180,0	3600,0
Sorgo sacarino	35,0	485,0	3000,0
Madeira	20,0	160,0	3200,0
Babaçú	2,5	80,0	200,0

Fonte: MIC/STI - (1991)

Há trabalhos que procuram dar subsídios para adoção de processos que utilizem matérias-primas alternativas tais como a mandioca, batata doce, sorgo sacarino, milho, enquanto que outros tem abordado de forma geral essa questão.

SERRA, G.E. (Rev. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 87(3): 44-51, 1976) apresenta uma tabela com as matérias-primas cana-de-açúcar, sorgo sacarino, batata doce, mandioca e milho, mostrando a composição, produtividade e rendimento (de fermentação) em etanol de cada uma delas e conclui que quando se observa o rendimento em etanol por hectare por mês, verifica-se que o sorgo sacarino apresenta um elevado índice e que a batata doce e a cana-de-açúcar se sobressaem. A mandioca apresenta um índice mais baixo em relação a outras culturas. Diz-se que "o sorgo sacarino se mostra como uma planta que precisa ser pesquisada no Brasil, devido às promissoras características tecnológicas que apresenta sua industrialização. Por outro lado, embora a mandioca não apresente índices de rendimentos tão elevados, deve-se lembrar que sua potencialidade quanto a produtividade (toneladas/hectare) e utilização integral da planta são problemas ainda pouco estudados e difundidos no Brasil". Acrescenta que a utilização de mandioca se justifica pelo fato de ser uma cultura que poderá atuar no sentido de melhorar a alimentação e facilitar a fixação do homem em determinadas áreas do território nacional.

ARAUJO, N.Q. e col. (Rev. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 90(2): 23-41, 1977) comentam que o trabalho com sorgo apresenta como vantagem ponderável o aproveitamento do equipamento das usinas de açúcar no período de entre-safra da cana-de-açúcar, estendendo-se a produção de álcool aos doze meses do ano, com manutenção da equipe de operação.

Os presentes trabalhos foram realizados com melaço de cana-de-açúcar por ser um dos substratos mais comuns utilizados e por facilidade de conservação no laboratório.

Em fermentação alcoólica comumente utiliza-se leveduras da espécie Saccharomyces cerevisiae, capaz de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose e,

ao metabolizar estes açúcares, produz principalmente, etanol e gás carbônico, embora haja estudos procurando utilizar bactérias e fungos. Tem-se a intenção de utilizar tanto bactérias termófilas como mesófilas, embora estas e especificamente Zimomonas mobilis tenha sido a mais estudada até o momento.

Nos trabalhos desenvolvidos por nós, utilizou-se levedura proveniente de fermento prensado, por ter aplicação bastante difundida em usinas de álcool, devido à sua resistência à contaminações e condições adversas, possuir boa atividade fermentativa, possibilidade de se trabalhar com concentrações elevadas, facilidade de separação, possibilitar tratamento ácido para diminuir o número de contaminantes.

1.1 Processos Fermentativos

1.1.1 Descontínuo

Dentro da evolução dos processos utilizados nas fermentações alcoólicas, destacamos inicialmente, o processo descontínuo.

O processo fermentativo descontínuo pode ser classificado em três grandes grupos:

- a) processo em que cada dorna recebe um inóculo.
- b) processo com recirculação de microrganismo.
- c) processo por meio de cortes.

No primeiro caso cada fermentador recebe um inóculo recentemente preparado. Desde que a técnica de preparo de pé-de-cuba (inóculo) tenha sido adequadamente obedecida, esse sistema de trabalho é o que oferece melhores condições para uma boa fermentação, uma vez que cada fermentador recebe uma suspensão de microrganismos de elevada atividade e praticamente isenta de células contaminantes.

Na fermentação com recirculação ou reaproveitamento do microrganismo, procede-se da seguinte maneira: no início do funcionamento da

instalação, algumas das dornas são inoculadas com pé-de-cuba; o meio (mosto), uma vez completamente fermentado é centrifugado, obtendo-se assim uma suspensão de microrganismo de elevada concentração, esta suspensão é quase sempre submetida a um tratamento com vistas à eliminação de células inativas e de microrganismos contaminantes, e é então , utilizada como inóculo de outro fermentador. Quando bem conduzida, essa técnica pode ser desenvolvida durante meses consecutivos, sem necessidade de preparo de novo pé-de-cuba.

Quanto ao terceiro grupo, o processo por meio de cortes, é assim descrito por Borzani,W. (no capítulo "Fermentação Descontínua" - Biotecnologia: Engenharia Bioquímica. São Paulo, EDUSP, 1975, v.3, p.105): "Inicia-se o trabalho inoculando-se uma dorna (que será chamada dorna A) com o pé-de-cuba; quando a fermentação atinge um estado apropriado passa-se parte do conteúdo do fermentador A para um fermentador vazio (que será chamado de dorna B) e, em seguida enchem-se as duas dornas com o meio a fermentar. Essa operação recebe o nome de corte". Devemos lembrar que um sucessão de cortes pode acarretar sérias quedas de rendimento, principalmente quando se trabalha com meio não-esterilizado. O número máximo de cortes sucessivos não pode ser previsto, pois somente o controle do rendimento do processo poderá estabelecer o momento conveniente para suspender este tipo de processo, deve-se então iniciar nova fermentação com inóculo novo.

Essas quedas de rendimento nos proporcionou a possibilidade de desenvolver trabalhos utilizando desinfetantes do tipo químico ou antibiótico nos mostos para combater ou reduzir a queda de rendimento ao longo dos processos de cortes.

A partir do final da década de 60, praticamente todo etanol produzido no Brasil passou a ser obtido por processo descontínuo de fermentação, com reaproveitamento da levedura. Começou-se assim a utilizar mais intensamente o processo conhecido por método de "Melle-Boinot", que então passou a ser a principal técnica difundida na grande maioria das destilarias nacionais e adotada

em escala industrial. Nesse processo, como descrito anteriormente, uma vez terminada a fermentação do conteúdo da dorna , o "vinho" resultante é centrifugado, obtendo-se uma suspensão de células altamente concentrada (leite de lêvedo). A suspensão é então enviada para tanques de tratamento onde é diluída com água e tratada com ácido sulfúrico até pH próximo de 2,5 e após 2 a 3 horas, sob agitação, é reutilizada com inóculo.

A seguir, mostramos um fluxograma de produção de álcool a partir de cana-de-açúcar.

FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE CANA-DE-AÇÚCAR

Hoje, muitas usinas adotam o processo descontínuo alimentado para a produção de etanol. A principal característica operacional do processo descontínuo alimentado é o aumento contínuo do volume de meio fermentativo durante a alimentação da dorna, uma vez que existe um fluxo de entrada para o fermentador e não existe um fluxo de descarga correspondente.

Inicialmente, o processo descontínuo alimentado começou a ser empregado em escala industrial para a produção de fermento de panificação, mostrando-se vantajoso em relação ao processo descontínuo clássico. Neste sentido, WHITE, J. (Yeast Technology. London, Chapman & Hall, 1954) mostrou a vantagem da adição exponencial de nutrientes na produção de leveduras.

A partir da década de 60, esta técnica de produção passou a ser uma alternativa para aumentar a produtividade em cultivos de microrganismos.

A grande maioria dos trabalhos estão voltados quase que exclusivamente, para o crescimento de microrganismos sendo este processo apresentado como o mais adequado para se atingir altas velocidades de crescimento celular e altos valores de conversão de substrato em células.

TRILLI, A. e col. (J. Appl. Chem. Biotechnol. London, 27:219-24, 1977) mostraram que em muitos dos sistemas fermentativos industriais desconhece-se o comportamento cinético do sistema em relação à formação de produtos, principalmente naqueles processos onde estes surgem como metabólitos secundários. Estes autores citam alguns estudos cinéticos relacionados com as velocidades específicas de crescimento celular e de formação de produtos nos casos de penicilina, melanina e ciclodextrinas.

PERINGER, P. e col. (Biotechnol. Bioeng. Symp., New York, 9:205-13, 1979) mostraram a importância do controle da vazão de alimentação, no processo descontínuo alimentado, para atenuar possíveis mecanismos de inibição do produto e do substrato, favorecendo a reprodução celular. Para estes autores, a técnica do processo descontínuo alimentado, com controle apropriado da velocidade de alimentação do substrato, constitui um meio para superar o fenômeno de repressão catabólica; assim utilizam o quociente respiratório e a

velocidade de assimilação de oxigênio da cultura como meios de melhorar a produtividade da levedura de panificação. De fato, HOLZBERG, J. e col. (Biotechnol. Bioeng., New York, 9(3) 413-27, 1987), e GHOSE, T.K. (Biotechnol. Bioeng., New York, 21(8): 1387-1400) observaram que concentrações elevadas de açúcares inibem as leveduras, isto é, ocorria uma diminuição da velocidade de crescimento quando se aumentava a concentração de glicose.

A otimização da operação do sistema descontínuo alimentado para o cultivo de Saccharomyces cerevisiae é proposta por AIBA, S. e col. (Biotechnol. Bioeng., New York, 18:1001-16, 1976). Estes autores evidenciam a necessidade de controle de vazão de alimentação a fim de evitar o efeito glicose ("glucose effect"). Este fenômeno é caracterizado por um desvio do metabolismo da glicose para a produção de etanol e gás carbônico, quando a concentração de glicose no meio atinge valores próximos a 70 mg/L.

Outros processos para fermentação alcoólica têm sido estudados principalmente em escala laboratorial e ou piloto:

- a) processo contínuo
- b) processo semi-contínuo
- c) processo utilizando leveduras floculantes
- d) processo sob pressão reduzida
- e) processo por extração com solventes
- f) processo com fermentação direta da cana

Atualmente, há algumas instalações industriais produzindo etanol por processo contínuo. Entretanto, como vimos o processo conhecido por "Melle-Boinot", é utilizado na grande maioria das destilarias nacionais.

1.1.2 Contínuo.

Os processos contínuos constituem uma das tecnologias mais promissoras no campo da biotecnologia, pois, apesar da escassez das instalações industriais existentes e de pouca diversificação dos produtos fabricados, muitos pesquisadores tem mostrado em escala piloto ou semi-industrial, a possibilidade de fabricação de diversos produtos através de cultivo contínuo e também vantagens deste sobre as fermentações descontínuas.

Em um processo contínuo, a matéria-prima é adicionada com uma vazão constante e o mosto fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação. É considerado em regime estacionário quando as propriedades do meio em cada ponto, permanecem constantes com o tempo.

Uma das principais vantagens diz respeito à redução dos tempos não produtivos o que pode levar a instalações de menor capacidade, em relação ao descontínuo, para uma mesma produção horária. Como consequência de ser o processo normalmente levado a efeito em regime estacionário, pode-se conseguir trabalhar nas condições ótimas para o microrganismo durante todo o processo; ainda em consequência do estado estacionário, conseguem-se produtos cuja uniformidade pode ser maior, se comparada à obtida nos processos descontínuos.

Uma fermentação contínua permite maior facilidade de controles automáticos e pode ser associada a outras operações da linha de fabricação, por exemplo, nos processos de esterilização contínua do meio e de extração contínua do produto obtido, associados aos de fermentação contínua.

Outra vantagem que o processo contínuo apresenta está voltada para estudos de fisiologia de microrganismos, visto que as condições ambientes permanecem constantes com o tempo, o que, evidentemente, não acontece com os processos descontínuos.

No processo de fermentação alcoólica, a glicose é metabolizada, produzindo, principalmente, álcool e gás carbônico. A obtenção do álcool poderia ser resumida pela equação de Gay-Lussac:

Teoricamente, de 180 gramas de glicose produz-se 92 gramas de álcool e 88 gramas de gás carbônico, assim podemos imaginar a quantidade de gás carbônico que é desprendida na natureza.

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de álcool etílico, oriundo de cana-de-açúcar. Com a implantação do Proálcool, o álcool produzido começou a ser utilizado em automóveis como combustível e hoje parte dos veículos novos comercializados são feitos para utilizar álcool. Naturalmente este tipo de projeto poderá apresentar dimensões gigantescas.

A safra de cana-de-açúcar em 1990/91 foi de 222.163.141 toneladas o que forneceu 7.365.341 toneladas de açúcar e 11.728.928.000 litros de álcool etílico.

No processo fermentativo dessa safra ocorreu produção de $8,9 \times 10^9$ Kg de anidrido carbônico e $14,1 \times 10^{10}$ litros de vinhaça - o resíduo da destilação do mosto fermentado. Este material é altamente poluente, mostrando elevados valores de DQO (demanda química de oxigênio) e DBO (demanda bioquímica de oxigênio) se comparado aos valores obtidos à partir de materiais amiláceos.

O anidrido carbônico é liberado na atmosfera, não sendo recuperado pela indústria por razões econômicas.

O anidrido carbônico, como fonte de carbono simples, seria utilizado por microrganismos fotossintetizantes e representaria a recuperação de um subproduto e a obtenção de biomassa de elevado valor nutritivo tanto para ração animal quanto para ração humano.

Microrganismos fotossintetizantes são aqueles que sejam capazes de utilizar a luz como fonte principal de energia. São também denominados como foto-autotróficos ou fototróficos.

Microrganismos fotossintetizantes são aqueles que sejam capazes de utilizar a luz como fonte principal de energia. São também denominados como foto-autotróficos ou fototróficos.

A maior parte das cianobactérias é capaz de usar o anidrido carbônico e o íon bicarbonato como fonte única de carbono. O íon bicarbonato, além disto, é interessante devido ao efeito tampão, estabilizando o pH do meio de cultura a valores convenientes para o desenvolvimento desses microrganismos.

A capacidade de fotoassimilar compostos orgânicos parece ser comum à maioria das espécies de cianobactérias. Entre os compostos utilizados encontram-se os açúcares (glicose, frutose e sacarose), ácidos orgânicos (acetato, piruvato e glicolato) e alguns aminoácidos.

Na presença de tais compostos orgânicos não existe aumento de velocidade de crescimento fotoautotrófico. Entretanto, em condições de baixa luminosidade, a presença de compostos orgânicos induz um aumento na velocidade de crescimento.

Cada grama de biomassa fotossintética necessita de 1,8 g de anidrido carbônico.

Fazendo uma previsão hipotética, caso 1% do anidrido carbônico produzido na safra de 1990/91, ou seja 89000 toneladas fosse transformada em biomassa fotossintetizante, poderíamos ter cerca de 49500 toneladas de Spirulina, representando de 24750 a 34650 toneladas de proteína de boa qualidade.

A escolha de Spirulina maxima foi baseada, além das vantagens nutricionais e tecnológicas, no fato de seu crescimento se dar em meio nitidamente alcalino, o qual favorece a solubilização do anidrido carbônico.

O anidrido carbônico utilizado em culturas de cianobactérias do gênero Spirulina, apresentam as seguintes vantagens:

a) o teor proteico é alto e de boa qualidade, apresentando elevado valor nutritivo e boa digestibilidade;

b) as espécies de Spirulina, empregadas em cultivos de larga escala (S.maxima e S.platensis), originárias, respectivamente da África Central e do México, apresentam um ótimo de temperatura de 25 °C a 35 °C, encontrado em diversas regiões brasileiras durante praticamente o ano inteiro, o que propicia a possibilidade de cultivo em grande escala;

c) crescimento em elevada alcalinidade, facilitando a solubilização do anidrido carbônico;

d) dimensões elevadas (10 micrometros) e forma espiralada do microrganismo, simplificando o cultivo e a separação.

Para atingir estes objetivos desenvolvemos alguns planos e projetos de pesquisa, em colaboração com instituições nacionais e internacionais, que resultaram em trabalhos anexos a este texto.

Para facilitar a análise, os trabalhos estão organizados de acordo com a evolução dos processos utilizados e não em ordem cronológica.

2. Fermentação Alcoólica

2.1. Ação de desinfetantes em mosto de fermentação

Na produção de álcool etílico no Brasil antes da implantação do Proálcool em 1975, o mosto utilizado na fermentação alcoólica era basicamente o melaço de cana, um sub-produto da indústria de açúcar, e o processo era o descontínuo por meio de cortes.

Após a criação do Proálcool, em virtude da crise energética mundial devido a elevação do custo do petróleo permitiu às grandes indústrias alcooleiras à fabricar um substituto da gasolina, de alta qualidade, o álcool.

O álcool etílico está entre os produtos químicos de maior importância, situando-se sua obtenção entre as indústrias de maior projeção e interesse.

Começou-se a instalação de destilarias autônomas utilizando como matéria-prima o caldo de cana-de-açúcar.

Inúmeros são os problemas econômicos e técnicos da produção de etanol, diferindo porém bastante daqueles que afligem outras indústrias similares, como a de vinho e da cerveja.

O emprêgo de desinfetantes em mosto de fermentação industrial não previamente esterilizados têm o objetivo de impedir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes e conseqüentemente o aparecimento de processos fermentativos paralelos, onde esses contaminantes estariam competindo no consumo de substrato com o agente principal da fermentação e interferindo no rendimento final do processo. Na produção de álcool, o custo da matéria-prima é preponderante, procurando o industrial a fonte mais barata de material carbohidratado fermentescível.

A utilização de desinfetantes na fermentação alcoólica do melaço de cana e por generalização de outros mostos, visa principalmente a consecução de fermentações mais puras:

- a) em decorrência da criação de condições incompatíveis à sobrevivência e desenvolvimento de microrganismos infectantes;
- b) em consequência de estabelecimento de condições propícias ao bom e normal desenvolvimento das leveduras alcoólicas.

O melaço é um produto obtido no processo de produção do açúcar a partir da cana-de-açúcar, isento de muitos produtos indesejáveis para a fermentação que se separam em forma de lodo na clarificação de açúcar, apresentando alta viscosidade e elevada densidade.

Devemos distinguir no Brasil o melaço fresco, fornecido logo após a produção e o melaço armazenado.

As temperaturas de 35 °C ou superior, comumente observadas no norte-nordeste do Brasil, frequentemente decompõem o melaço. Assim, após alguns meses de armazenamento, o melaço frequentemente, já se acha alterado,

especialmente quando é conservado em reservatórios de cimento semi-abertos, o que é bastante comum.

Encontram-se então em tais reservatórios culturas de fungos, bactérias e leveduras selvagens, que se desenvolvem, se estes não estiverem herméticamente fechados, impedindo a entrada de chuvas, que provocará a diluição do melão, possibilitando o desenvolvimento de microrganismos, que eventualmente poderiam prejudicar futuras fermentações.

A microflora do melão desempenha uma função importante no processo de fermentação. São inúmeros os microrganismos (fungos, bactérias, leveduras, etc.) que interferem no processo fermentativo nas indústrias, criando reações secundárias com perdas de rendimento. Por exemplo, o Acetobacter acetii que transforma, por oxidação, o álcool em ácido acético, em contato com o ar. O fermento láctico (Lactobacillus) que transforma glicose em ácido láctico e trabalha ativamente entre 33-45 °C . Outros microrganismos produzem a acetona, os alcoois superiores (amílico, propílico, entre outros), a glicerina, os aldeídos, etc.

Podemos citar uma relação de microrganismos normalmente encontrados em melão das regiões tropicais:

fungos: Aspergillus niger, A. flavum, A. nidulans,

Penicillium luteum, P. Roseum,

Monilia nigra

bactérias: Bacillus subtilis, B. mesentericus,

Lactobacillus lindneri,

L. delbrueckii

Clostridium butyricum

leveduras: Sacharomyces zopfi, S.cerevisiae,

S.willianus, S. rosei

Torula communis e Torula sp.

O desenvolvimento das pesquisas e da tecnologia dos processos visa melhorar técnicas, produtos e rendimento dentro de um custo operacional ótimo.

Dentre as substâncias empregadas nas fermentações de melaço como tendo a função de desinfetantes, do tipo químico podemos citar os seguintes: ácido sulfúrico, formol, fluoretos, policlorofenóis (pentaclorofenol, hexaclorofeno , etc.), e do tipo antibiótico: penicilina, cloranfenicol, tetraciclina, etc.

O primeiro trabalho no Brasil sobre a utilização de pentaclorofenól apareceu em 1942, de autoria de BARRETO, A. (Chem. Abstr., Easton, 43: 6782, 1949), que obteve mais tarde, patente (USA patent 2473630, 6.21.1949) nos Estados Unidos, sobre o emprego de "Polychlorophenols in fermentation of carbohydrates".

Muitas pesquisas foram realizadas e publicadas nos anos que se seguiram, principalmente por Rocha de Almeida, J. (Bol. Inst. Zimotec., Piracicaba, 6:1-24, 1953) sobre a ação do pentaclorofenol ou produtos que o contém sobre fermentações de melaço, caldo de cana e grãos em condições industriais.

Os desinfetantes do tipo antibiótico, que desde a sua descoberta e industrialização eram usados na terapêutica com sucesso incontestado, são também empregados na indústria, crescendo de tal modo as aplicações não terapêuticas dos antibióticos.

Em 1954, DAY, W.H. e col. (J. Agric. Food. Chem., Washington, 2: 252-8, 1954) observou ação desinfetante dos antibióticos sobre os mostos de cereais em fermentação para a produção de bebidas alcoólicas destiladas.

Os bons resultados obtidos nos Estados Unidos com estes mostos, propiciaram aos pesquisadores brasileiros BORZANI,W. & AQUARONE,E. (An. Farm. e Química. S.Paulo,8(2):5-11,1957), prever a possibilidade de efeitos semelhantes aqui entre nós onde a matéria-prima mais usada, o melaço de cana, está em geral bem contaminada e a própria indústria do álcool, em grande porcentagem, não segue os padrões elevados de higiene que seria de se desejar.

Em 1957 foi publicado nos Estados Unidos o primeiro trabalho brasileiro de autoria de Borzani,W e Aquarone,E. (J. Agric. Food. Chem., Washington, 5(8): 612-6, 1957) sobre o assunto, trabalho esse que confirmou com vantagens a previsão.

Essa publicação proporcionou a obtenção de uma das primeiras patentes no Brasil sobre o uso de antibióticos na desinfecção de mostos de fermentação alcoólica, conseguida pelos professores: Eugênio Aquarone, Walter Borzani e Renato Fonseca Ribeiro em 1960 trabalhando com benzil-penicilina.

Com o objetivo de contribuir ao estudo da ação de desinfetantes em mosto de fermentação alcoólica em processo descontínuo por meio de cortes e na desinfecção de matérias-primas, desenvolveram-se alguns trabalhos cujos resultados podem ser verificados abaixo.

Para avaliação de desinfetantes foram realizados ensaios comparativos a fim de testar a ação de diversos desinfetantes em função do tempo e ao rendimento da fermentação alcoólica em processo descontínuo por meio de cortes. O uso de penicilina G potássica, hexaclorofeno e cloranfenicol nas concentrações de 1000 U, 4mg e 3mg por litro respectivamente apresentaram rendimento alcoólico de 10 a 12 % superior aos mostos não tratados.

Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. Rev. Farm. Bioquim., Univ. S.Paulo, 16(1/2), p.133-44, 1980 (**Anexo 1**)

A fim de se ampliar a gama de desinfetantes de uso em desinfecção de mosto de fermentação alcoólica, foram testados outros produtos. Utilizou-se sais de uso terapêutico humano tais como: lucensomicina e sulfato de aminosidina.

Esses sais não apresentaram resultados satisfatórios nas concentrações testadas em relação ao padrão: benzil- penicilina.

Estudo comparativo entre vários desinfetantes para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. Rev. Farm. Bioquim., Univ. S.Paulo, 16(1/2), p.122-32, 1980 (**Anexo 2**)

Com a finalidade de verificar a ação desinfetante dos antibióticos em melaço armazenado, com vistas às futuras fermentações, ensaiaram-se alguns desinfetantes em concentrações e tempos de armazenamento definidos. Os resultados podem ser vistos no trabalho:

Conservação de melaço por desinfetante.

Rev. Farm. Bioquim., Univ. S.Paulo, 18(2), p.113-26, 1982. (**Anexo 3**)

2.2 Processo Descontínuo Alimentado.

A necessidade de aumento de produção de etanol levou a um aumento da capacidade das dornas de fermentação. Durante a operação destas unidades maiores, verificou-se que a utilização de vazões excessivamente elevadas de mosto poderia levar à formação intensa de espuma, devido a liberação de gás carbônico, podendo levar a perda por transbordamento, de grandes quantidades de mosto.

Portanto, houve uma restrição da vazão de alimentação de mosto (vazão de enchimento) às dornas, levando ao aparecimento de uma nova variável, o tempo de enchimento da dorna. Este passou a ser importante, pois boa parte da fermentação ocorre durante a alimentação da dorna e como

conseqüência disto o processo não mais se comporta como descontínuo clássico, mas como descontínuo alimentado.

Devido às limitações de enchimento da dorna, esta é alimentada principalmente por meios de regras empíricas, sem fundamentos teóricos, sendo que as principais são:

a) regular a vazão de alimentação, de forma a manter na dorna, a concentração de açúcares redutores totais próxima à metade da concentração do mosto de alimentação ou,

b) regular as vazões de "leite de lêvedo" e mosto para manter uma concentração de açúcares de 5-6 °Brix no mosto de fermentação.

Desta forma, a utilização destas regras na grande maioria das destilarias brasileiras, nos coloca diante de um processo de fermentação alcoólica conhecido por descontínuo alimentado (fed-batch) , o qual não pode ser abordado, sob o ponto de vista cinético, segundo os modelos desenvolvidos para a fermentação descontínua.

ENDO, J. e col. (Top. Biochem. Eng. (New York), 2: 282-88, 1977) são os pioneiros na realização do estudo do processo descontínuo alimentado para a produção de etanol. Embora o trabalho tenha sido realizado em meio sintético, no qual a glicose era o substrato limitante, em concentração de 10 g/l no mosto de alimentação, condição essa bastante diferente das adotadas industrialmente, concluem que as maiores velocidades específicas de consumo de glicose, de consumo de oxigênio, de crescimento celular e de produção de etanol são atingidas quando a concentração de glicose no meio atinge, aproximadamente, metade da concentração de glicose no mosto de alimentação.

Trabalhos mais recentes procuram relacionar a influência de concentração inicial de leveduras e o tempo de alimentação da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar. Em tais trabalhos, a vazão de alimentação da dorna é

constante. Foi observada uma correlação semelhante à curva de Monod entre a máxima produtividade de etanol e a velocidade de adição de açúcar.

VASCONCELOS, J.N. e col. (Rev. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 106(2):38-48, 1988.) trabalhando com melaço de cana em escala piloto utilizando vários perfis de vazão de alimentação de mosto à dorna, verificaram que nos perfis decrescentes mostraram-se mais vantajosas tanto no aspecto operacional limitando a formação de espuma quando as dornas estão praticamente cheias, como no aspecto de metabolismo microbiano, diminuindo o efeito sinérgico de inibição por açúcar e etanol, obtendo-se maiores produtividades em etanol tanto no final da fase de enchimento como nas produtividades finais do processo.

BORZANI, W. (Biotechnol. Bioeng., New York, 29(7):844-49, 1987) relacionando velocidade de produção de etanol (g/h) e velocidade de adição de açúcar (g/h) em processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica com vazão constante, mostra que é possível avaliar o máximo valor de vazão de alimentação que deve ser usado de forma a obter um meio completamente fermentado no final da fase de enchimento.

Assim, realizaram-se estudos do processo descontínuo alimentado para produção de etanol, com o objetivo de contribuir no desenvolvimento da tecnologia deste processo.

Estudos preliminares realizados evidenciaram a utilização de diversos tipos de alimentação na produção de etanol:

a) Vazão constante

b) Vazão variável: linearmente crescente e decrescente e exponencialmente crescente e decrescente.

A resposta do sistema aos diversos tipos de alimentação podem ser verificados nos trabalhos abaixo relacionados:

Non-constant fed-batch ethanol fermentation of molasses (preliminary tests). Arq. Biol. Tecnol., Curitiba, 29(2):327-35, 1986 (**Anexo 4**)

A resposta do sistema em relação à vazão linearmente decrescente mostrou resultados bastante favoráveis.

Observou-se que o rendimento não era afetado e houve um aumento da produtividade em etanol quando se utilizou uma vazão linearmente decrescente com o tempo. Aumentou-se a produtividade em etanol aproximadamente em 10% quando se utilizou vazões de alimentação linearmente decrescente ao invés de vazões de alimentação constante em processo descontínuo alimentado.

Os resultados podem ser verificados no trabalho:

Influence of linearly decreasing feeding rates on fed-batch ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molasses. Biotechnol. Letters, Surrey, 9(9):647-50, 1987. (**Anexo 5**)

Na análise comparativa de resultados obtidos em fermentação descontínua alimentada com mosto adicionado periodicamente em intervalos de 15 minutos e vazão de alimentação constante mostraram uma produtividade similar, conforme pode ser verificado no trabalho:

Comparison of results obtained in fed-batch ethanol fermentation tests carried out with feeding rates and with periodic additions of the feeding mash. Arq. Biol. Tecnol., Curitiba, 34(4):571-73, 1986. (**Anexo 6**)

Com o objetivo de aumentar a produtividade em etanol foram desenvolvidos ensaios verificando a influência de vazão de alimentação exponencialmente decrescente com o tempo em processo descontínuo

alimentado. Constatou-se que o rendimento de etanol não foi afetado e a produtividade de etanol era aumentada nessas condições.

Os resultados podem ser verificados no trabalho:

Influence of exponentially decreasing feeding rates on fed-batch ethanol fermentation of sugar-cane blackstraps molasses. Biotechnol. Letters, Surrey, 12(10):777-82, 1990. (**Anexo 7**)

2.3 Processo contínuo

Em função da vantagem do processo contínuo nos estudos de fisiologia de microrganismos, em que as condições ambientais permanecem sempre constantes ao longo do tempo quando em regime estacionário, realizaram-se trabalhos com o objetivo de verificar a influência dos componentes do meio na multiplicação de Saccharomyces cerevisiae em processo contínuo. Esse microrganismo é o mesmo utilizado na fermentação alcoólica e como fermento prensado comercial.

Determinou-se a quantidade de fosfato no meio de alimentação, em condições de glicose limitante visando a ampliação do valor da vazão específica de alimentação.

Os resultados desses estudos podem ser vistos nos trabalhos:

Phosphate mediation of the aerobic fermentation in baker's yeast. Biotechnol. Letters, 2(4), 89-94, 1990 (**Anexo 8**)

Fosfato na fermentação contínua de levedura de panificação. I- Efeito do fosfato na vazão específica de alimentação em multiplicação de Saccharomyces cerevisiae.

Rev. Farm. Bioquim., Univ. São Paulo, 20(2): 184-90, 1984. (**Anexo 9**)

3. Microrganismos fotossintetizantes

3.1 Introdução

A utilização das microalgas como fonte de proteína e vitaminas pela espécie humana data provavelmente de antes dos tempos da escrita, perdendo-se a sua origem em épocas muito remotas.

Recentes descobertas na África do Sul da mais antiga rocha sedimentária, levaram à identificação de uma alga microfóssil azul de 3,5 bilhões de anos. Assim, a história da biosfera é confundida com a da litosfera, desde que há somente a diferença de um bilhão de anos.

O início da vida, portanto, teria ocorrido há 3,5 bilhões de anos com as algas verde-azuladas, as quais teriam sido junto com as bactérias, os únicos seres vivos do planeta por pelo menos 2 bilhões de anos. Antes, foi a era dos minerais, da água, do hidrogênio, do gás carbônico, do metano e do amoníaco. Estas "espécies primitivas" teriam permitido o nascimento das moléculas, tão necessárias à vida.

De maneira semelhante, após a erupção do vulcão de Krakatoa na Indonésia, em 1883, quando a vida nos arredores do vulcão desapareceu completamente, ela reapareceu na lava pela primeira vez em forma de algas azuis filamentosas.

Estas algas azuis, ou cianofitas, são procarióticas. Como as bactérias, elas contêm clorofila a, carotenóides e bileproteínas vermelhas ou azuis. Graças a esta clorofila a, estes organismos autotróficos podem sintetizar a matéria orgânica de suas células a partir da água, sais inorgânicos e luz. Algumas cianofitas ainda subsistem hoje nos oceanos, na água fresca e salgada e no solo; cerca de 1200 espécies são conhecidas.

Entre estas algas azuis, três são objeto do nosso estudo, a Spirulina maxima, a Oscillatoria limnetica e a Oscillatoria agardhii.

O interesse prático da Spirulina data de quando os conquistadores espanhóis chegaram ao México durante o século XVI, e encontraram vários alimentos novos e atraentes tais como o cacau, o tomate, a batata, e muitos outros. Dentre os alimentos mais bizarros incluía-se o tecuitlatl, uma substância verde colhida no Lago Texcoco e vendido nas feiras em todo o México.

O tecuitlatl era comumente comido com milho e outros cereais nativos em um molho denominado Chimolli, que era feito de tomates, pimentas e várias especiarias. Os espanhóis nunca tomaram gosto pelo tecuitlatl, mas ficaram sabendo que os índios o consideravam delicioso, e evidentemente o comiam e comercializavam em grandes quantidades.

De acordo com arquivos recentes, o tecuitlatl foi consumido e comido após a conquista espanhola, mas um século após desapareceu dos registros de vendas na Cidade do México, embora não desaparecesse da dieta dos índios residentes ao redor do Lago Texcoco. O retorno deste produto ao cenário mundial, em nossos dias, se fez não mais a partir do México, mas sim na África. Os nativos africanos coletavam a Spirulina na superfície do lago Chad , secavam-na ao sol e a utilizavam no preparo de um alimento denominado dihé, confeccionado com molho constituído de tomates, pimenta chili e outras especiarias moídas.

Durante a década de 1950, um interesse por novas fontes de proteína para acompanhar o crescimento populacional da terra, levou muitos pesquisadores a investigar as possibilidades de cultura de alga em grande escala.

OSWALD, W.J. e col. (Algae Biomass, Biomedical Press, Amsterdam, 1980) na Universidade da Califórnia, em Berkeley, introduziram um novo conceito na produção de massa de microalgas. Eles demonstraram que grandes culturas de microalgas podem ser utilizadas simultaneamente para produção de proteína e tratamento de águas residuais.

3.2 Tipos de processos

Segundo os interesses específicos de cada grupo, nota-se dois tipos de processos:

a) Um tipo denominado "clean-method", que visa a obtenção da biomassa para o uso alimentar, utilizando meios de cultura quimicamente definidos;

b) Outro tipo denominado "waste-method", que além da produção de biomassa pretende a depuração de cargas orgânicas contidas em resíduos, tanto urbanos quanto industriais. Neste caso a biomassa obtida terá destinação de ração ou substrato para biodigestão metanogênica.

Outra aplicação potencial das microalgas ocorreu no início da década de 60. Os Estados Unidos pesquisaram a possibilidade de utilização de culturas de microalgas como renovadoras de oxigênio para voos espaciais. Trabalhos similares demonstraram que 60 litros de uma cultura altamente eficiente de Chlorella, poderiam ser suficientes para sustentar o metabolismo aeróbico de um homem adulto (OSWALD, W.J. e col. (Algae Biomass, Amsterdam, 1980).

Os estudos com Scenedesmus foram iniciados por Gummert e seus colaboradores na Alemanha. A idéia deles foi utilizar o anidrido carbônico produzido na zona industrial do Reno para o crescimento da Chlorella e Scenedesmus acutus. Para o crescimento das duas culturas eles desenvolveram uma linha de montagem com um canal sem fim, no qual o misturador do meio era feito por rodas de pás.

Este trabalho foi transferido para Dortmund, onde um grupo encabeçado por C.J. SOEDER desenvolveu vários aprimoramentos importantes, os quais são utilizados até hoje para a cultura de biomassa de algas.

Na década de 50, o grupo italiano de Florenzano, G. (Nuovo Giornale Botanico Italiano, Firenze, 1958) iniciava atividades de pesquisa na mesma área, no Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del Consiglio Nazionale di Ricerca-Firenze, utilizando uma cianobactéria do gênero Spirulina.

As cianobactérias (bactérias verde-azuladas) constituem o maior e mais abrangente grupo de procarióticos fotossintéticos. Elas podem ser sucintamente definidas como organismos que possuem dentro da célula procariótica, um aparelho fotossintético bastante similar ao cloroplasto eucariótico quanto a funcionalidade, estrutura e molecularidade. A esta definição, uma qualificação precisa ser adicionada: o conjunto de pigmentos coletores de luz das cianobactérias clorofila a e ficobiliproteína - é homólogo ao do cloroplasto das rodofitas (algas vermelhas).

Diferenças entre os gêneros Spirulina e Oscillatoria foram observadas por TOMASELLI, F.L. e col. (Atti XVII Congr.Nac.Soc.Ital.Microbiol. Padova, 26-8, 1975) quanto a alguns aspectos: efeito da lisoзима nas paredes celulares, aspecto ultraestrutural, e em particular quanto à composição de ácidos graxos insaturados. Por exemplo, o ácido gama-linoleico está presente apenas na Spirulina, enquanto que o alfa-linoleico se apresenta na Oscillatoria.

A Spirulina não fixa o nitrogênio atmosférico, com exceção da S. labyrinthiformis que é uma espécie termofílica, capaz de realizar fotossíntese anoxigênica facultativa.

3.3 Condições gerais de crescimento

O crescimento das cianobactérias depende de algumas condições gerais:

3.3.1. Requisitos luminosos

Atendidas as necessidades de nutrientes e temperatura, de forma a que estas não limitem o crescimento, a intensidade e a duração da irradiação luminosa passa a determinar a taxa de crescimento e o rendimento da produção.

A luz difere de outros fatores ambientais pelas suas características instantâneas, podendo ser suprimida abaixo da superfície da cultura.

A foto-respiração e a respiração na ausência de luz são processos mutuamente exclusivos na microalga.

Em baixas intensidades luminosas a respiração de tipo noturno é relativamente mais importante do que a foto-respiração, mas com o aumento da luminosidade e da concentração de oxigênio, e a diminuição da concentração de anidrido carbônico, a fotorespiração aumenta e torna-se mais importante do que a respiração independente da luz.

3.3.2. Efeito da densidade populacional sobre a produtividade.

A densidade de população constitui um fator importante na produção de biomassa, exercendo efeitos de longo alcance no desempenho geral da cultura.

À densidade de 400 a 500 mg/L (peso seco), as quais tem-se comprovado ótimas para uma produção máxima de biomassa, a irradiação solar é quase completamente absorvida nos 2-3 cm superiores do meio de cultura, deixando 80% das células do tanque na escuridão completa em qualquer instante.

Um fator importante, que influencia a taxa de crescimento e a eficiência fotossintética, é o ciclo claridade/escuridão ao qual a célula do tanque é exposta durante o dia. O ciclo pode ser completado em poucos segundos. O regime claridade/escuridão é afetado pela intensidade da irradiação solar, e

depende da profundidade do tanque, da turbulência e da densidade populacional.

3.3.3. Temperatura

A temperatura afeta a concentração celular, a natureza do metabolismo, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa. Ela é mais limitante do que a luz para o crescimento.

Os efeitos da temperatura no crescimento e atividade da biomassa é explicado principalmente em termos de dois fatores: um é a ação da temperatura na estrutura dos componentes celulares (especialmente proteínas e lipídeos), e o outro relaciona os coeficientes de temperatura com a taxa de reação, os quais por sua vez dependem das energias de ativação das reações.

Além destes efeitos primários haverá provavelmente vários efeitos secundários no mecanismo regulatório do metabolismo, especificidade das reações enzimáticas, permeabilidade e composição celular.

Um aumento exponencial do rendimento no crescimento algal é observado até que a temperatura ótima seja alcançada.

3.3.4 O efeito da luz e de nutrientes na flutuação

As cianobactérias podem formar populações densas tanto nas superfícies como nas profundezas de lagos devido ao fato de suas células possuírem vacúolos de gás. Vacúolos gasosos são agregados de vesículas permeáveis ao gás com paredes proteináceas.

A flutuação deve ser levada em consideração na cultura da microalga. Quando a flutuação é negativa ou ausente, as células apresentam uma forte tendência de submergir. Este fenômeno, está relacionado com dois aspectos principais da produção de biomassa, isto é, a colocação da energia necessária para agitação e a energia necessária para colheita.

Para a produção comercial da Spirulina, tipos flutuantes parecem ser os preferidos. Eles necessitam menos energia de agitação e há certa indicação que eles podem ser mais resistentes à fotooxidação.

VAN RIJN, J. e col. (Limnol. Oceanogr. 28 (5):1034-7, 1983) estudaram o controle da flutuação numa população natural da Oscillatoria spp. em tanques de peixes, e concluíram que a flutuação da Oscillatoria é regulada por pelo menos três fatores diferentes: regime luminoso, anidrido carbônico e disponibilidade nutricional. As mesmas conclusões foram obtidas por KLEMER, A.R. e col. (Am.Assoc.Adv.Sci. 215:1629-39, 1982) que encontraram em condições quimiostáticas que o carbono e o nitrogênio tinham efeitos opostos na flutuação da O. rubescens; a limitação de anidrido carbônico aumentou a flutuação enquanto a limitação de nitrogênio diminuiu a mesma.

A conclusão é que a grande flutuação da cianobactéria é o resultado da redução de anidrido carbônico na água e da limitação luminosa devido ao sombreamento mútuo.

3.3.5 Concentração de oxigênio

A concentração de oxigênio no tanque representa o parâmetro mais útil para avaliar a atividade fotossintética na cultura. Quando a fotossíntese ocorre com altos rendimentos, o oxigênio no tanque aumenta rapidamente, a valores que representam um aumento de 200 a 300 % acima do ponto de saturação de oxigênio. A agitação vigorosa do meio diminui o nível de oxigênio supersaturado, sendo esta uma vantagem.

A concentração de oxigênio do tanque está relacionada a dois aspectos contrastantes: quando ela aumenta rapidamente durante o dia, a cultura é boa e ativa, mas por outro lado, o aumento da concentração de oxigênio para valores extremos torna-se potencialmente perigoso, pois inibe o processo de fotossíntese e torna-se uma condição favorecedora da fotooxidação.

A fotoxidação causa deterioração da célula e pode levar a perda completa da cultura. Note-se que os aumentos relativamente pequenos de oxigênio dissolvido, também acompanhados de um declínio na concentração máxima de oxigênio do tanque, são inofensivos mas podem causar alarme, pois podem sugerir o início da deteriorização na cultura. Realmente, qualquer declínio inexplicado na concentração de oxigênio pode indicar uma fraqueza do meio de cultura, e sua perda iminente.

3.3.6 Efeito da turbulência

A tese de que a turbulência é necessária, principalmente para eliminar as camadas limite que interferem no fluxo de nutrientes e na troca gasosa, não corresponde inteiramente à realidade. Não obstante esta prática é comumente utilizada.

O fluxo turbulento se comporta como fator chave para a obtenção de um rendimento alto através de uma melhor utilização da irradiação solar na superfície do tanque.

A melhor maneira de se obter uma turbulência ótima nos tanques, é um problema tecnológico e econômico o qual ainda está longe de ter solução satisfatória.

O sucesso da manutenção da Spirulina, assim como de outras microalgas, em crescimento na cultura em meio externo, requer estudos adicionais nesta área além de vigilância constante.

3.3.7 Sistema de cultivo

A biomassa de microalgas pode crescer no que PIRT, J. (Principles of microbe and cell cultivation, John Wiley & Sons, New York, 1975) classificou em sistemas abertos e fechados.

Em um sistema fechado (cultura descontínua), a velocidade de crescimento da biomassa tende a zero, seja devido a um acúmulo do produto, ou ainda devido à falta de algum nutriente ou de luminosidade.

O cultivo comercial da microalga em cultura intermitente em termos práticos, significa que o crescimento ocorre até o término da fase exponencial, quando a biomassa é então completamente removida e um novo lote de cultura é iniciado.

Num sistema aberto, todas as substâncias que compõem o sistema podem entrar ou sair dele.

A produção comercial da microalga fototrófica, sob condições ótimas de crescimento, envolve a manutenção da limitação luminosa, a qual é obtida deixando a densidade populacional em tal concentração, que facilite o rendimento máximo da produção de biomassa.

Segundo RICHMOND, A. (Phototrophic microalgae, In: Biotechnology, vol.3, Rehn, H.J. & Reed, G., eds. Verlag Chemie, Weinheim, 1983), o nível de nitrogênio no tanque serve como guia para o grau de consumo global do meio de cultura. Sempre que o nitrogênio se reduz, acrescenta-se meio de crescimento - exceto carbono e fósforo - pois é admitido que o completo esgotamento do nitrogênio, ocorre paralelamente à utilização do resto dos elementos nutrientes do meio de crescimento. O fósforo é adicionado separadamente, assim, como o carbono, porque a sensibilidade da curva de crescimento a reduções críticas destes elementos, justifica uma vigilância e um plano de suplementações individualizado.

3.4 Fixação fotossintética do anidrido carbônico

A natureza do processo pelo qual o anidrido carbônico é incorporado a compostos orgânicos, reduzindo-se para produção de carboidratos, começou a ser elucidado em fins da década de 40, com a introdução de técnicas cromatográficas e com o uso do isótopo ¹⁴ do carbono. CALVIN, BENSON e

col., mediante estudos realizados inicialmente com microalgas do tipo Chlorella e Scenedesmus, e estendidos a outras células fotossintetizadoras, eucarióticas e procarióticas, chegaram a conclusão que o produto primário da fixação de anidrido carbônico, durante a fotossíntese é o 3-fosfoglicerato, composto conhecido como intermediário da glicólise.

Demonstrou-se que o acceptor primário de anidrido carbônico é a ribose-1,5-difosfato, sendo a enzima responsável pela fixação de anidrido carbônico, a ribose- difosfato-carboxilase (ou carboxidismutase). A via de fixação de anidrido carbônico, ou ciclo de Calvin e Benson, apresenta duas reações que lhe são privativas: a da carboxidismutase e da ribose-5-fosfatoquinase; as demais reações envolvem parte da via gluconeogenica e do ciclo das pentoses, presentes inclusive em animais superiores.

Os produtos das reações luminosas (ATP e NADPH) são utilizados primeiramente na fosforilação da ribose-5-fosfato e da 3-fosfoglicerato. A gliceraldeído-3-fosfodesidrogenase que catalisa esta reação nas plantas verdes é dependente de NADP^+ e não de NAD^+ como no caso da enzima glicolítica.

A enzima que efetivamente fixa o anidrido carbônico é a carboxidismutase. A reação catalisada envolve a carboxilação de uma forma enediólica do substrato, com formação de um intermediário instável que por hidrólise, fornece duas moléculas de 3-fosfoglicerato.

A carboxidismutase constitui cerca de 15% da proteína total do cloroplasto. É um enzima influenciada por efeitos reguladores de natureza alostérica, sendo ativada por diferentes condições experimentais por MgCl_2 , ATP e Mg^{2+} , íon bicarbonato, NADPH, 6-fosfogluconato e frutose difosfato.

"In vitro", a ativação requer uma incubação da enzima com os ativadores. A parte do efeito indireto, determinado por alterações nas concentrações de ATP, Mg^{2+} , NADPH e pH interno do cloroplasto, a luz ativa diretamente inúmeras enzimas. A interferência direta da luz vem provavelmente pela ação da ferredoxina, tornando-a redutora, que por sua vez ativaria a ribose-5-fosfatoquinase, a gliceraldeído-3-fosfodesidrogenase dependente de NADP e

a frutose-difosfatofosfatase. Ao mesmo tempo que a luz ativa tais enzimas, inativa outras envolvidas com o consumo de glicose, a saber, a glicose-6-fosfatodesidrogenase e a fosfofrutoquinase.

A maioria das cianobactérias é capaz de usar dióxido de carbono e íon bicarbonato como fonte única de carbono. O íon bicarbonato, além disto, é interessante devido ao efeito tampão, estabilizando o pH do meio a valores convenientes para o desenvolvimento destes microrganismos.

As pesquisas efetuadas até o momento indicam que todas as cianobactérias assimilam o carbono inorgânico através da via da ribose-1,5 difosfato (ciclo de Calvin), sendo portanto, fotossintetizantes do tipo C_3 .

Na linha de pesquisa em microrganismos fotossintetizantes realizaram-se experimentos para verificar a influência de diversas fontes de nitrogênio na produção de biomassa microbiana, procurando encontrar uma fonte mais econômica para o seu desenvolvimento, pois o nitrato de potássio comumente utilizado em meios de cultivo (Paoletti e col. Atti Congr. Naz. Soc Ital. Microbiol., 17a., Padova, 1975) além do seu maior custo, a sua aquisição no Brasil tem alguns problemas como a necessidade de autorização especial do Ministério do Exército.

Durante o crescimento fotossintético, a maior parte da proteína sintetizada pela célula da cianobactéria é incorporada ao aparelho fotossintetizante. Somente as ficobilinas, que estão especificamente localizadas nos ficobilissomas, podem constituir quase 50% da proteína total em algumas cianobactérias.

Em condições fotoautotróficas de crescimento, tanto a intensidade luminosa quanto a qualidade da luz podem afetar a composição dos pigmentos. O crescimento com altas intensidades de luz branca reduz o conteúdo celular da clorofila e da ficocianina.

Segundo ALLEN, M.M. e col. (Arch. Mikrobiol., 69:114-20, 1969), sob condições favoráveis de crescimento fotoautotróficas, a carência de nitrogênio

causa uma seletiva e relativamente rápida destruição das ficobiliproteínas. Após 24-30 horas na luz ou na ausência da fonte de nitrogênio, o conteúdo de ficobiliproteínas celular pode cair a 10% de seu nível inicial, porém o conteúdo de clorofila se modifica apenas ligeiramente. A maior parte das células permanecem viáveis e sintetizam novamente as ficobiliproteínas quando novamente é fornecida uma fonte de nitrogênio, retornando o crescimento fotossintético quando o conteúdo de ficobiliproteínas atinge o nível normal.

O rendimento em biomassa e de proteínas totais de cianobactérias em meios sintéticos com diferentes fontes de nitrogênio de uso industrial foram estudados, como também a velocidade de crescimento dessas cianobactérias nessas condições.

Os resultados desses estudos podem ser vistos nos trabalhos que se seguem:

Emprego de algumas fontes nitrogenadas na obtenção de biomassa de Oscillatoria limnetica . Rev. Microbiol., São Paulo, 23(1):32-36, 1992. (**Anexo 10**)

Efeitos dos meios de cultura sobre as velocidades de crescimento de cianobactérias.

Arq. Biol. Tecnol. Curitiba, 34(1):13-30, 1991. (**Anexo 11**)

Estão em andamento em nossos laboratórios, trabalhos onde se estuda a variação de ciclos de luz (claro/escuro), alteração na formulação inicial do meio de Paoletti, adaptando-as às matérias-primas brasileiras.

A par dos ensaios laboratoriais também estão sendo realizados estudos em escala-piloto de 5000 litros em uma área de exposição à luz de 18,56 metros quadrados, obedecendo as características geométricas do tanque.

No caso específico as variações são aquelas que a própria natureza apresenta em nosso meio.

ANEXO 1

Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo
16 (1/2): 133-144, jan./dez., 1980

**ESTUDO COMPARATIVO DE DIVERSOS DESINFETANTES
USADOS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA
DE MOSTOS DE MELAÇO DE CANA***

SUNAO SATO - Professor Assistente

MILTON LEÔNCIO BRAZZACH - Prof. Assistente Doutor

EUGÊNIO AQUARONE - Professor Catedrático

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

O presente trabalho tem a finalidade de comparar a ação de diversos desinfetantes em função do tempo e ao rendimento da fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana.

Os "vinhos" de mostos tratados com penicilina G potássica, hexaclorofeno e cloranfenicol nas concentrações de 1000 U, 4 mg e 3 mg por litro respectivamente apresentaram rendimentos alcoólicos de 10 a 12% superiores ao não tratados.

Com o uso de hexaclorofeno e cloranfenicol nas concentrações de 4 mg e 3 mg/l obtiveram-se maiores rendimentos em álcool e com acidez mais baixa.

O hexaclorofeno na concentração de 4 mg/l mostrou-se eficaz na recuperação de mostos contaminados.

* Este artigo constitui parte do trabalho experimental apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia das Fermentações. Orientador: Prof. Dr. Eugênio Aquarone.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, F. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de desinfetantes em mostos de fermentações industriais previamente não esterilizados, com objetivo de impedir o desenvolvimento de microorganismos contaminantes e conseqüentemente o aparecimento de processos fermentativos paralelos, tem aumentado consideravelmente ^{6, 7, 11, 20}.

No Brasil, destaca-se sobremaneira a indústria de produção de álcool etílico onde a matéria-prima é o melaço de cana, um sub-produto no processo da fabricação do açúcar.

A utilização de desinfetantes na fermentação alcoólica do melaço de cana visa principalmente a consecução de fermentações mais puras:

- a) em decorrência da criação de condições incompatíveis à sobrevivência e desenvolvimento de microorganismos infectantes;
- b) em conseqüência do estabelecimento de condições propícias ao bom e normal desenvolvimento das leveduras alcoólicas.

O melaço, principal matéria-prima na fabricação do álcool, cuja importância torna-se vultosa, nos dias de hoje, em vista da atual crise energética mundial, pelo crescente custo do petróleo, possibilita que as grandes indústrias de álcool fabriquem um substituto da gasolina de alta qualidade.

Dentre as substâncias empregadas nas fermentações do melaço, com a função de desinfetantes, do tipo químico, podemos citar os seguintes: ácido sulfúrico, policlorofenóis (pentaclorofenol, hexaclorofeno^{15,16}, etc.) e do tipo antibiótico: penicilina¹², cloranfenicol⁸, tetraciclina^{1,2}, etc.

Os desinfetantes do tipo antibiótico, que desde a sua descoberta e industrialização eram usados na terapêutica com sucesso incontestado, também são empregados na indústria, crescendo de tal modo as aplicações

SATO, S.; BRAZZACHI, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980.

não terapêuticas, que segundo estimativa feita nos Estados Unidos, nos próximos anos, apenas 10% dos antibióticos produzidos terão finalidades médicas ^{3,4,5}

O presente trabalho tem a finalidade de comparar a ação de desinfetantes dos dois tipos acima mencionados, quanto ao tempo e ao rendimento da fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

A matéria-prima empregada no trabalho foi a seguinte:

- Melaço: proveniente da Usina São José do Rio das Pedras, Estado de São Paulo, com 59,3 por cento de açúcares redutores totais (A.R.T.) (calculado em glicose), diluído com água potável em proporções para obter um mosto com a concentração de A.R.T. desejada (150 g/l).

- Microorganismos: para a inoculação, usou-se o fermento .Fleishmann prensado (Standard Brands do Brasil), contendo cerca de $1,1 \times 10^{10}$ células por grama ⁹, proveniente do comércio; a concentração empregada foi de 10 gramas de fermento por litro de mosto ¹⁴.

- Desinfetantes: penicilina G potássica cristalina com 1579 Unidades por mg (Squibb Indústria Química S/A); cloranfenicol levôgiro cristalino (Laboratório Lepetit - São Paulo); hexaclorofeno cristalino puro (Givaudan Corp.).

MÉTODOS

A fermentação foi efetuada em cilindros graduados de 500 ml, colocados em estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$.

As concentrações de A.R.T. no melaço, expressas em glicose, foram determinadas pelo método de EYNON-LANE ¹⁷ modificado ¹⁸

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980.

A riqueza alcoólica dos "vinhos" foi determinada por destilação lenta ^{10, 13} de 250 ml dos mesmos, acrescidos de 50 ml de água de lavagem do recipiente. Recolheu-se mais de 50% ¹³ do volume inicial em destilado, e completou-se o volume até 250 ml com água destilada, e fez-se leitura com alcoômetro de Gay-Lussac graduado a dois décimos e correção de temperatura da mistura hidroalcoólica para 15°C.

A acidez total dos mostos, "vinhos" e destilados foi determinada por titulometria, usando solução decinormal de hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador ¹⁹

Os valores de pH do mosto, "vinho" e destilado foram determinados em potenciômetro Methron, modelo E-350B, sem nenhum tratamento prévio das amostras de material.

3. RESULTADOS

A riqueza alcoólica, acidez e os valores de pH dos "vinhos" estão apresentados respectivamente nas tabelas 1, 2 e 3.

Os valores da acidez e pH dos destilados poderão ser vistos nas tabelas 4 e 5.

As legendas das tabelas acima mencionadas são as seguintes:

- + Recuperação do "vinho" com 4 mg de hexaclorofeno por litro.
- ++ Média de duas experiências.
- 1. Sem tratamento (branco)
- 2. Associação de 125 U de penicilina G potássica e 0,125 mg de cloranfenicol por litro.
- 3. Com 1000 U de penicilina G potássica por litro.
- 4. Com 4 mg de hexaclorofeno por litro.
- 5. Com 3 mg de cloranfenicol por litro.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980.

TABELA 1. Riqueza alcoólica dos "vinhos" de mostos tratados com concentrações de diversos desinfetantes em graus GL

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	7,0	7,0	7,0	7,2	7,2
1º corte	6,8	6,8	7,0	7,1	7,1
2º corte	6,4	6,5	6,7	7,0	6,8
3º corte	6,3	6,2	6,5	7,0	7,0
4º corte	6,0	6,0	6,5	6,2	6,5
5º corte	5,8	6,2	7,0	6,5	6,5
6º corte	6,0	6,5	6,8	6,8	6,5
7º corte	6,3	7,0	6,8	6,5	7,0
8º corte	6,0	6,7	6,9	7,0	7,3
9º corte	6,5	6,5	7,3	7,2	7,3
10º corte	6,2	6,5	6,8	7,0	7,2
11º corte	5,8	6,5	6,8	7,0	7,3
12º corte	5,5	6,6	6,8	7,1	7,3
13º corte	5,5	7,0*	6,5	6,8	7,2
14º corte	5,2	7,0*	6,5	6,8	7,2
15º corte	5,2	7,2*	6,5	7,0	7,2

TABELA 2. Acidez dos "vinhos" de mostos tratados com concentrações de diversos desinfetantes, em gramas de ácido láctico por litro de "vinho"

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
1º corte	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
2º corte	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9
3º corte	9,9	9,9	8,5	8,5	8,5
4º corte	10,8	10,8	9,9	9,9	9,9
5º corte	11,7	11,7	10,8	9,9	9,9
6º corte	14,8	13,5	13,5	9,9	9,9
7º corte	15,7	17,1	15,7	10,8	10,8
8º corte	20,2	19,3	18,4	14,8	14,8
9º corte	20,2	19,3	18,4	14,8	14,8
10º corte	20,2	19,3	17,1	13,5	14,8
11º corte	20,2	19,3	17,1	13,5	15,7
12º corte	20,2	13,5*	20,2	17,1	13,5
13º corte	20,2	13,5*	20,2	15,7	13,5

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980.

TABELA 3. Valores de pH dos "vinhos" de mostos tratados com concentrações de diversos desinfetantes

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
1º corte	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
2º corte	5,2	5,2	5,2	5,2	5,3
3º corte	5,2	5,2	5,3	5,3	5,3
4º corte	5,1	5,1	5,2	5,2	5,2
5º corte	5,0	5,0	5,1	5,2	5,2
6º corte	4,8	4,9	4,9	5,2	5,2
7º corte	4,6	4,6	4,7	5,1	5,1
8º corte	4,3	4,4	4,5	4,8	4,8
9º corte	4,3	4,4	4,5	4,8	4,8
10º corte	4,3	4,4	4,6	4,9	4,8
11º corte	4,3	4,4	4,6	4,9	4,7
12º corte	4,3	4,9*	4,4	4,6	4,7
13º corte	4,3	4,9*	4,4	4,6	4,7

TABELA 4. Acidez dos destilados de "vinhos" de mostos tratados com concentrações de diversos desinfetantes, em miligramas de ácido lático por litro

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	120	120	108	108	120
1º corte	288	276	300	300	288
2º corte	204	204	180	180	144
3º corte	228	240	204	180	156
4º corte	300	288	204	192	144
5º corte	348	264	240	180	144
6º corte	420	300	276	180	180
7º corte	420	312	480	204	204
8º corte	420	348	480	204	204
9º corte	588	456	480	300	300
10º corte	600	576	588	312	300
11º corte	624	564	588	324	312
12º corte	612	336*	528	312	300
13º corte	576	300*	540	300	324

SATO, S.; BRAZZACHI, M. L.; AQUARONE, F. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980.

TABELA 5. Valores de pH dos destilados de "vinhos" de mostos tratados com concentrações de diversos desinfetantes

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**	
1º vinho	4,0	3,9	4,0	4,0	3,9	
1º corte	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	
2º corte	3,7	3,7	3,9	3,8	3,9	
3º corte	3,7	3,7	3,8	3,8	3,9	
4º corte	3,5	3,7	3,8	3,8	3,9	
5º corte	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	
6º corte	3,5	3,6	3,6	3,8	3,8	
7º corte	3,5	3,6	3,6	3,8	3,8	
8º corte	3,4	3,5	3,5	3,7	3,6	
9º corte	3,4	3,5	3,5	3,7	3,6	
10º corte	3,2	3,3	3,3	3,5	3,4	
11º corte	3,2	3,3	3,3	3,5	3,4	
12º corte	3,2	3,5*	3,3	3,3	3,5	3,4
13º corte	3,2	3,7*	3,3	3,3	3,6	3,4

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, F. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melão de cana. *Rev. Farm. Biolum. Unib. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos mostos tratados com 1000 Unidades de penicilina G potássica, 4 miligramas de hexaclorofeno, 3 miligramas de cloranfenicol por litro, observou-se o seguinte:

A partir do 9º corte, os vinhos tratados com penicilina G potássica, hexaclorofeno e cloranfenicol apresentaram rendimento em álcool de 10 a 12% em média, superior ao branco e ao vinho tratado com associação.

Os brancos recuperados com 4 mg de hexaclorofeno por litro apresentaram no 13º corte um aumento de 27% no teor alcoólico, quando comparados com o branco sem recuperação. Os mostos tratados com desinfetante isoladamente apresentaram um teor alcoólico mais ou menos constante durante os 15 cortes da mesma, enquanto o tratado com a associação de antibiótico apresentou uma queda em riqueza alcoólica em torno de 8%.

A acidez dos vinhos aumentou 137,6% no branco e no tratado com associação, enquanto o aumento verificado no mosto tratado com cloranfenicol e penicilina G potássica foi de 84,7% e o tratado com hexaclorofeno subiu somente 58,8%. A recuperação de um dos brancos provocou uma queda acentuada de 33,1% na acidez.

Os valores de pH dos vinhos tratados com cloranfenicol e hexaclorofeno mantiveram valores dentro de uma faixa boa para o desenvolvimento de fermentação alcoólica enquanto que o tratado com a penicilina G potássica teve uma queda maior e a associação não se diferenciou do branco.

Os destilados dos "vinhos", por outro lado, mostraram uma acidez elevada no branco no tratado com associação e penicilina G potássica, enquanto a acidez foi bem mais reduzida no material tratado por hexaclorofeno e cloranfenicol.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, F. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980.

Os resultados desta experiência indicam que o hexaclorofeno e clor^o ranfenicol mostram ser bons desinfetantes, melhores que a penicilina G potássica, tendo havido somente pequena desinfecção com associação de antibióticos.

A maior estabilidade dos dois primeiros desinfetantes em relação à penicilina G potássica, além da concentração excessivamente baixa do antibiótico na associação, poderiam ser consideradas as causas desses resultados. Essa constatação é mais nítida quando se mede a acidez e o pH dos vinhos em que os valores respectivamente aumentados e diminuídos confirmam o desenvolvimento de fermentações paralelas por contaminações produtoras de ácidos.

A determinação da acidez dos destilados indica que a produção de ácidos voláteis por contaminação foi bastante reduzida quando se empregaram os desinfetantes mais estáveis, hexaclorofeno e cloranfenicol.

O uso de hexaclorofeno na concentração de 4 mg/l para a recuperação de um dos brancos altamente contaminados, a partir do 139 corte, mostrou-se eficaz.

Dos resultados obtidos podemos tirar as seguintes conclusões:

- O uso de desinfetantes no mosto de melaço de cana confirmam os resultados anteriores (maiores teores em álcool e álcool de menor acidez).

- O emprego de hexaclorofeno foi satisfatório na recuperação de mostos a partir de um determinado número de cortes, tendo sido mais ativo em mostos altamente contaminados.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 133-144, 1980.

SUMMARY

The purpose of this paper is to compare the action of different disinfectants in relation to time and to the alcoholic fermentation yield of sugar cane molasses.

Te wines obtained from mashes when treated with potassium penicillin G, hexachlorophene and chloramphenicol in concentrations of 1000U, 4 and 3 mg/l respectively have presented higher alcoholic yields from 10 to 12% than those non treated.

Using hexachlorophen and chloramphenicol in concentrations of 4 and 3 mg/l, higher alcoholic yields have been obtained with lower acidity.

Hexachlorophen in concentrations of 4 mg/l showed to be efficient in the recovery of contaminated mashes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AQUARONE, E. - Ação de tetraciclina em fermentação alcoólica de mosto de melaço. *Bol.Dep.Quim.Esc.Politéc. Univ.S.Paulo*, 11:49-52, 1958.
2. AQUARONE, E. - Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Appl. Microbiol.*, Baltimore, 8(5): 263-268, 1960.
3. AQUARONE, E. - Empregos não terapêuticos de antibióticos. IN: Simpósio de Fermentação, 19, S.Paulo, 1964. p. 245-263.
4. AQUARONE, E. - Empregos não terapêuticos de antibióticos. IN: LACAZ, C.S. et alii - *Antibióticos*. 3.ed., S.Paulo, Edgard Blücher e Ed. Univ. S.Paulo, 1975. p. 448-456
5. AQUARONE, E. - O antibiótico na desinfecção industrial. *Quim. e Deriv.*, S.Paulo, 120:32-37, 1976.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, 16: 133-144, 1980.

6. AQUARONE, E. & BARUFFALDI, R. - Emprego industrial de penicilina visando a qualidade de aguardente de caldo de cana. Tecnol. Aliment. e Bebidas, S. Paulo, 12:26-29, 1966.
7. AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R.; PASSOS, J.B.P. - Dados experimentais sobre emprêgo de penicilina na produção de álcool em escala industrial no Nordeste. Rev. Fac. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, 4(1): 103-118, 1966; Brasil Açucareiro Rio de Janeiro, 68(2): 18-25, 1966.
8. AQUARONE, E. & BRAZZACH, M.L. - O cloranfenicol como desinfetante em fermentação alcoólica de melaço de cana. An. Farm. Quim. S. Paulo, 11(2/3): 49-60, 1960.
9. BORZANI, W. - Concentração de leveduras no fermento prensado. Eng. e Quím., Rio de Janeiro, 7(2): 5-7, 1955.
10. BORZANI, W. - Comparação entre os processos de dosagem de álcool etílico pela balança de Westphal e pelos alcoômetros. Bol. Dep. Quim. Esc. Politéc. Univ. S. Paulo, 4:1-8, 1956.
11. BORZANI, W. & AQUARONE, E. - Emprego de antibióticos como desinfetantes em fermentações industriais. An. Farm. Quim. S. Paulo, 8(2): 5-11, 1957.
12. BORZANI, W. & AQUARONE, E. - Molasses fermentation-Penicillin as contamination control agent. J. Agric. Food Chem., Washington, 5(8): 612-6, 1957. Trad. em Engenharia, S. Paulo, 183:311-314, 1958.
13. BORZANI, W. & FALCONE, M. - Estudo sobre os processos de dosagem de álcool em vinhos resultantes da fermentação de mosto de melaço. Bol. Assoc. Brasil. Quim., S. Paulo, 10(1):5, 1952.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 16: 133-144, 1980

14. BORZANI, W. & FALCONE, M. - Control of starter preparation in fermentation of molasses. J.Agric.Food Chem., Washington, 1:1070-1071, 1953.
15. BRAZZACH, M.L. - Emprego de desinfetantes químicos em fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana. S.Paulo, 1970. (Tese de doutoramento, Fac. Ciên. Farm. Univ.S.Paulo).
16. BRAZZACH, M.L. & AQUARONE, E. - Emprego de desinfetantes químicos em fermentação alcoólica de mosto de melaço. Rev.Bras.Quim., Rio de Janeiro, 68(406): 168, 1969.
17. BROWNE, C.A. & ZERRAN, F.W. - Physical and chemical methods of sugar analysis. 3.ed. New York, John Wiley & Sons, 1948. p.746-53.
18. FALCONE, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. - Processo simplificado para a dosagem de açúcares redutores totais em melaço de cana. An.Farm.Quim.S.Paulo, 10(5/6): 69-72, 1959.
19. ROCHA DE ALMEIDA, J. - Alcool e destilaria. Piracicaba, Livraria e Papelaria Brasil, 1940. p. 40 e 85.
20. TAGUCHI, H.; HOSOMI, M.; MINOSAKI, H. - Application of antibiotics to fermentation industry. I. Action of antibiotics on the bacteria grown in "Karashi-moto" of sake brewing. Hakko Kogaku Zasshi, Osaka, 37:138-142, 1959. Apud Chem. Abstr., Easton, 54: 6023e, 1960.

Recebido para publicação em 20/5/1980

ANEXO 2

Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo
 16 (1/2): 122-132, jan./dez., 1980

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE VÁRIOS DESINFETANTES,
 PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES NAS FERMENTAÇÕES
 ALCOÓLICAS DE MOSTOS DE MELAÇO DE CANA**

SUNAO SATO - Professor Assistente

MILTON LEÔNICIO BRAZZACH - Prof. Assistente Doutor

EUGÊNIO AQUARONE - Professor Catedrático

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de
 Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Os agentes de contaminação que se desenvolvem nos processos fermentativos são fatores que deverão ser eliminados para obtenção de um melhor rendimento alcoólico em processos de produção de alcool. Foram experimentados dois novos sais de uso na terapêutica humã na: lucensomicina e sulfato de aminosidina.

Os sais, na concentração de 0,4 mg/l, não apresentaram resultados favoráveis em relação ao padrão: penicilina G potássica. En saios em concentração superior poderão apresentar ação positiva, mas no aspecto econômico o seu custo estará acima dos desinfetantes tradicionais.

1. INTRODUÇÃO

Em diversos trabalhos, tem sido demonstrada a importância do combate aos agentes de contaminação que se desenvolvem nos processos fermentativos (1-9, 13, 14).

Particularmente, de longa data temos nos preocupado com a fermentação alcóolica, que agora toma uma importância incomum, dentro do processo de desenvolvimento nacional.

O presente trabalho tem por finalidade experimentar dois novos sais, de uso na terapêutica humana, e que, pelas suas características, devem ter ação semelhante a vários produtos utilizados até agora.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, F. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 122-132, 1980

Os sais propostos são:

- a) Lucensomicina
- b) Sulfato de aminosidina

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material

A matéria-prima empregada no trabalho foi a seguinte:

- melaço proveniente de Araraquara, Estado de São Paulo, com 59 por cento de açúcares redutores totais (calculados em glicose).
- Penicilina G Potássica cristalina com 1579 unidades por mg (Fontoura Wyeth).
- Sulfato de Aminosidina e Lucensomicina (Farmitalia).

Microorganismos:

Para a inoculação, usou-se o fermento Fleischmann prensado (Standard Brands do Brasil), contendo cerca de $1,1 \times 10^{10}$ células por grama, proveniente do comércio; a concentração empregada foi de 1 por cento (10).

Métodos

A fermentação foi efetuada em cilindros graduados de 500ml, colocados em estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$.

O corte foi feito após 24 horas e a fermentação dada por terminada após 48 horas, espaço de tempo este em que, através de inúmeras fermentações preliminares, verificamos que as mesmas normalmente se encontram no fim.

As concentrações de açúcares redutores totais do melaço, expressas em glicose, foram determinados pelo método de Eynon-lane (15) modificado. (16).

A riqueza alcoólica dos "vinhos" foi determinada por destilação

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 16: 122-132, 1980

lenta de 250 ml dos mesmos. (11, 12).

Recolheram-se mais de 50% do volume inicial, (12) em destilado, acrescido de água de lavagem do recipiente e completou-se o volume até 250 ml com água destilada e fez-se leitura com alcoômetro de Gay-Lussac graduado a dois décimos e correção de temperatura da mistura hidroalcoólica para 15°C.

A acidez total dos mostos, "vinhos" e destilados foi determinada por titulometria, usando-se solução decinormal de hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador. (16)

Os valores de pH dos mostos, "vinhos" e destilados foram determinados em potenciômetro Methron, modelo E-350-B, sem nenhum tratamento prévio das amostras de material.

As fermentações foram executadas da seguinte maneira: Dilui-se o melaço com água destilada em proporções necessárias para dar um mosto com a concentração de 150 g de açúcares redutores totais por litro, expressas em glicose.

Fez-se a inoculação com uma suspensão aquosa homogênea de fermento Fleischmann para atingir a concentração de 10 g do mesmo por litro de mosto.

Mantendo a homogeneidade da suspensão, distribuiu-se o mosto em cilindros de 500 ml. A ordem de distribuição do mosto por cilindros era feita por meio de sorteio.

Deixava-se um lote de cilindros sem tratamento e os outros lotes eram tratados respectivamente por:

- 1 - 0,4 mg de lucensomicina por litro
- 2 - 0,4 mg de sulfato de aminosidina por litro
- 3 - 1.000 U.I. de penicilina G potássica por litro (padrão)

Os cilindros foram colocados em estufa a 30°C $\pm$ 1.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 122-132, 1980.

Após 24 horas faziam-se os cortes, homogeneizando o líquido - parcialmente fermentado e transferindo 20 por cento deste para um novo cilindro e completava-se o volume a 500 ml com mosto recentemente preparado e mantido sob agitação.

Procedia-se por sorteio também com relação aos cortes, para eliminar as possíveis causas de erro.

Essas experiências foram repetidas três vezes e em cada vez foram feitas quatro fermentações simultâneas.

No 5º corte, tentou-se fazer a recuperação dos mostos não tratados usando-se 1000 U.I. de penicilina G potássica, em dois dos recipientes sem tratamento.

3. RESULTADOS

A riqueza alcoólica, acidez e os valores de pH dos "vinhos" estão respectivamente nas tabelas I, II, III.

Os valores da acidez e pH dos destilados podem ser vistos nas tabelas IV e V.

As legendas das tabelas são as seguintes:

1. Com 0,4 mg de lucensomicina por litro
 2. Com 0,4 mg de sulfato de aminosidina por litro
 3. Com 1.000 U.I. de Penicilina G Potássica por litro
 4. Sem tratamento
 5. Com recuperação (5º corte) 1.000 U.I. de penicilina G potásssica por litro
- + Recuperação do vinho

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 122-132, 1980.

TABELA I - RIQUEZA ALCOÓLICA DOS "VINHOS" DE MOSTOS TRATADOS EM GRAUS GAY LUSSAC

	1	2	3	4	5
1º vinho	9,8	9,8	9,9	9,8	9,8
1º corte	8,6	8,6	9,8	8,5	8,5
2º corte	7,0	7,2	9,9	7,1	7,1
3º corte	5,3	5,7	10,0	6,0	6,0
4º corte	5,3	5,5	9,9	5,3	5,2
5º corte	5,3	5,2	10,1	5,2	+5,6
6º corte	5,3	5,6	10,1	5,4	+5,8
7º corte	5,2	5,3	10,1	5,2	+6,3
8º corte	5,4	5,1	10,3	5,5	+7,6
9º corte	5,6	5,4	10,3	5,7	+9,3
10º corte	5,8	5,6	10,3	5,7	+10,1
11º corte	5,8	5,9	10,4	5,7	+10,0
12º corte	5,5	5,9	10,3	5,5	+10,3
13º corte	5,3	5,5	10,3	5,5	+10,3
14º corte	5,4	5,5	10,4	5,4	+10,5
15º corte	5,4	5,5	10,4	5,2	+10,4

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONI, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 122-132, 1980.

TABELA II- ACIDEZ DOS "VINHOS" DE MOSTOS TRATADOS (GRAMAS DE ÁCIDO LÁTICO/LITRO DE VINHO)

NOS MOSTOS DAS DIVERSAS EXPERIÊNCIAS																
11,0	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4
NÚMERO DE CORTES																
1º vinho	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	13º	14º	15º	
1	11,0	13,8	16,9	19,6	23,4	21,6	22,4	22,4	21,6	21,6	21,6	19,8	20,7	22,6	23,4	22,5
2	11,0	13,1	16,8	18,5	20,0	20,6	22,5	22,6	23,3	-	22,4	20,7	20,8	23,4	23,4	23,4
3	10,8	10,8	10,8	10,8	11,7	10,8	10,8	12,6	11,7	-	10,8	10,8	10,8	11,7	10,8	10,8
4	11,0	13,2	16,8	19,0	20,6	22,5	22,5	22,5	22,5	-	22,5	20,7	21,6	23,4	23,4	22,5
5	11,0	13,1	16,8	18,9	20,5	22,5	22,4	20,8	20,8	12,6	11,7	11,0	10,9	11,8	10,9	10,9

TABELA III - VALORES DE pH DOS "VINHOS" DE MOSTOS TRATADOS

NOS MOSTOS DAS DIVERSAS EXPERIÊNCIAS																
5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
NÚMERO DE CORTES																
1º vinho	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	13º	14º	15º	
1	5,1	4,9	4,7	4,5	4,4	4,2	4,2	4,2	4,3	-	4,3	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
2	5,1	5,0	4,7	4,5	4,4	4,2	4,2	4,2	4,3	-	4,3	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
3	5,1	5,1	5,0	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	-	5,0	5,1	5,0	5,1	5,1	5,1
4	5,1	5,1	5,0	4,8	4,6	4,4	4,3	4,2	4,2	-	4,3	4,3	4,3	4,2	4,2	4,2
5	5,1	5,1	5,0	4,8	4,6	4,3	4,2	4,2	4,3	-	4,9	5,0	5,1	5,1	5,1	5,1

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 16: 122-132, 1980

TABELA IV - ACIDEZ DOS DESTILADOS DE "VINHOS" DE MOSTOS TRATADOS, EM MILIGRAMAS DE ÁCIDO ACÉTICO POR LITRO

	1	2	3	4	5
1º vinho	-	-	-	-	-
1º corte	-	-	-	-	-
2º corte	36	38	35	38	38
3º corte	68	70	30	72	72
4º corte	92	100	30	96	96
5º corte	108	120	30	108	+108
6º corte	120	108	30	120	+ 96
7º corte	108	120	36	120	+ 96
8º corte	110	120	30	120	+ 82
9º corte	96	108	36	108	+ 50
10º corte	96	108	36	108	+ 36
11º corte	108	96	36	108	+ 36
12º corte	96	96	30	120	+ 36
13º corte	96	120	30	120	+ 32
14º corte	132	132	36	144	+ 32
15º corte	132	156	36	130	+ 36

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONI, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 122-132, 1980

TABELA V - VALORES DE pH DOS DESTILADOS DE "VINHOS" DE MOSTOS TRATADOS

	NÚMERO DE CORTES															
	1º vinho	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	13º	14º	15º
1	3,7	3,7	3,6	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	-	3,5	3,5	3,4	3,3	3,4	3,4
2	3,7	3,7	3,6	3,6	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	-	3,5	3,5	3,3	3,4	3,4	3,3
3	3,7	3,7	3,7	3,7	3,8	3,7	3,7	3,6	3,7	-	3,7	3,7	3,6	3,7	3,7	3,6
4	3,7	3,7	3,6	3,6	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	-	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	3,3
5	3,7	3,7	3,6	3,6	3,5	3,4	3,4	3,4	3,5	-	3,8	3,7	3,7	3,6	3,7	3,6

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pela análise da tabela I verificamos que o mosto tratado com 1.000 U.I. de penicilina G potássica por litro foi superior aos demais.

Os tratados com penicilina G potássica comportaram-se bem durante os 15 cortes realizados, melhorando inclusive em relação ao do início.

Os mostos tratados com lucensomicina e sulfato de aminosidina nas concentrações de 0,4 mg/l não reagiram à altura do nosso padrão.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, podemos tirar as seguintes conclusões:

- A ação da penicilina G potássica manteve-se superior em todos os ensaios realizados.

- Os sais de lucensomicina e sulfato de aminosidina, nas concentrações usadas, não apresentaram ação desinfetante desejada.

- Em concentrações superiores a 0,4 mg/l, que não foram experimentadas, poderão apresentar ação positiva, entretanto no aspecto econômico, o custo estará acima dos demais desinfetantes tradicionalmente usados.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 16: 133-144, 1980.

SUMMARY

The contaminant agents grown on the fermentation processes are the factors to be eliminated in the obtention of a better alcoholic yield in the processes of alcohol production.

Two new drugs used on human therapy have been experimented: lucensomycin and aminosydin sulfate.

The drugs, in concentration of 0,4 mg/l, do not present satisfactory results when compared with the standard: potassium penicilin G.

Experiments with higher concentration may present satisfactory results, but considering the economic aspect, its cost is higher than the disinfectants presently in use.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AQUARONE, E. - Ação da tetraciclina em fermentação alcoólica de mosto de melaço. Bol. Dep. Quím. Esc. Politéc. da Univ. S. Paulo, 11: 49-52, 1958.
2. AQUARONE, E. - Penicilin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. Appl. Microbiol., Baltimore, 8 (5): 236-68, 1960.
3. AQUARONE, E. - Influência do cloranfenicol na fermentação alcoólica de melaço de cana diluído. An. Farm. Quím. S. Paulo, 10 (3/4): 45-9, 1959.
4. AQUARONE, E. & BARUFFALDI, R. - Emprego industrial de penicilina visando a qualidade de aguardente de caldo de cana. Tecnol. Aliment. Bebidas, São Paulo, 12: 26-9, 1966.
5. AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R. & PASSOS, J.B.P. - Dados experimentais sobre emprego de penicilina na produção de álcool em escala industrial no Nordeste. Rev. Fac. Farm. Bioquím. S. Paulo, 4 (1): 103-18, 1966; Bras. Açuc., Rio de Janeiro, 68 (2): 18-25, 1966.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 16: 122-132, 1980

6. AQUARONE, E. & BRAZZACH, M.L. - O cloranfenicol como desinfetante em fermentação alcoólica de melaço de cana. An.Farm.Quím.S.Paulo, 11(3/4):49-60, 1960.
7. AQUARONE, E.; BRAZZACH, M.L.; ANGELINO, E. - Influência de alguns fatores na obtenção de aguardente de caldo de cana. Rev.Fac.Farm.Bioquím.S.Paulo, 1(2) : 141-60, 1963.
8. AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R.; NACCO, R. - Emprego de associação de antibióticos na fabricação de álcool por fermentação. Rev.Fac.Farm.Bioquím.S.Paulo, 6 (2): 257-308, 1968.
9. BERTOYE, A.; COURTIEU, A.L. ; Mlle. DURIN - The antibacterial spectrum of some modern antiseptics and tropical antibiotics. J.Méd.Lyon, 37: 147, 1956.
10. BORZANI, W. - Concentração de leveduras no fermento prensado. Eng.Quím., Rio de Janeiro, 7 (2): 5-7, 1955.
11. BORZANI, W. - Comparação entre os processos de dosagem de álcool etílico pela balança de Westphal e pelos alcoômetros. Bol.Dep.Quím.Esc.Politécn.Un.S.Paulo , 4: 1-8, 1956.
12. BORZANI, W. & FALCONE, M. - Estudo sobre os processos de dosagem de álcool em vinhos resultantes da fermentação de mosto de melaço. Bol.Assoc.Brasil.Quím., S. Paulo, 10 (1): 5, 1952.
13. BRAZZACH, M.L. & AQUARONE, E. - Estudo comparativo de antissépticos usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço. Bol.Dep.Quím.Esc.Politécn.U.S.Paulo, 16: 1-25, 1963.
14. BRAZZACH, M.L. & AQUARONE, E. - Emprego de desinfetantes químicos em fermentação alcoólica de mosto de melaço (Nota Prévia). Rev.Bras.Quím., Rio de Janeiro, 68 (406): 168, 1969.
15. BROWNE, C.A. & ZERBAN, F.W. - Physical and chemical methods of sugar analysis. 3. ed., New York, John Wiley, 1948, p. 746.

SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes, para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16: 122-132, 1980

16. DAY, W.H.; SERJAC, W.C.; STRATTON, J.R.; STONE, L. - Antibiotics as contamination control agents in grain alcohol fermentation. *J.Agr.Fd.Chem.*, Baltimore, 2 : 252-8, 1954.

Recebido para publicação em 20/5/1980

ANEXO 3

Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo
18 (2): 113-126, jul./dez., 1982

CONSERVAÇÃO DE MELAÇO POR DESINFETANTE

SUNAO SATO*; EUGÊNIO AQUARONE*; MILTON L. BRAZZACH*

* FBT - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Caixa Postal 30.786 - São Paulo, SP. Brasil

Estudou-se a desinfecção de melaço para melhorar o seu armazenamento e posterior exportação. Dos desinfetantes usados, o cloranfenicol, nas concentrações de 15 e 30 mg por litro, apresentou melhor ação. As concentrações elevadas não melhoram em muito o rendimento alcoólico, mas poderão conferir uma toxicidade à levedura.

UNITERMOS : *Desinfecção. Melaço de cana. Tecnologia bioquímica. Conservação de melaço.*

1 INTRODUÇÃO

Entre as indústrias fermentativas no Brasil, sobressai a indústria de produção de álcool etílico, em que a matéria-prima é o melaço de cana, subproduto no processo de fabricação do açúcar.

O melaço é uma das principais matérias-primas na fabricação do álcool e a sua importância torna-se notória nos dias de hoje, em vista da atual crise energética mundial, pelo custo elevado do petróleo.

A produção global de melaço para a safra 1976/1977 foi de 3.369.280 toneladas, destinando-se 2.547.860 toneladas para industrialização em álcool, 375.000 toneladas como excedentes para a exportação e 446.420 toneladas para consumo de diversas indústrias¹⁰.

No Brasil, distinguimos o melaço fresco, fornecido logo após a produção, e o melaço armazenado. No Norte-Nordeste do Brasil é comum o armazenamento em reservatórios de cimento semi-abertos ou mesmo em depósitos escavados na terra, onde, após alguns meses, o melaço está frequentemente alterado.

Em tais reservatórios é comum encontrar culturas de fungos, bactérias e leveduras selvagens que se desenvolvem criando reações secundárias com perdas de rendimento^{11, 12}.

A exportação de melaço de cana de açúcar para vários países do mundo representa fonte de divisas considerável^{4,5,6}.

O presente trabalho tem a finalidade de estudar a desinfecção de melaço para melhor armazenamento e sua posterior exportação, porque experiências com mosto de melaço de cana tratados com desinfetantes têm apresentado resultados favoráveis^{1, 2,3,13}.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Melaço : proveniente da Usina São José do Rio das Pedras, Estado de São Paulo com 69,3 por cento de açúcares redutores totais (calculado em glicose).

Microrganismo : para a inoculação usou-se o fermento Fleischmann prensado (Standard Brands do Brasil) contendo cerca de $1,1 \times 10^{10}$ células por grama⁷ proveniente do comércio.

Desinfetantes : benzilpenicilina potássica cristalina com 1.579 unidades por mg (Squibb), cloranfenicol levôgiro cristalino (Lepetit) e hexaclorofeno (Givaudan).

2.2 Métodos

O melaço foi tratado com desinfetantes em diversas concentrações, deixando uns lotes em contato durante 48 horas e outros lotes durante 15 dias. Após esse período de contato, eram preparados os mostos para a fermentação.

A fermentação foi efetuada em cilindros graduados de 500 ml, colocados em estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$.

As concentrações de açúcares redutores totais (ART) no melaço, expressos em glicose, foram determinadas pelo método de EYNON-LANE modificado^{8,9}.

A riqueza alcoólica dos "vinhos" foi determinada no destilado obtido por destilação lenta de 250 ml dos mesmos.

Recolheu-se mais de 50% do volume inicial em destilado, acrescido de água de lavagem do recipiente e completou-se o volume até 250 ml com água destilada e fez-se leitura com alcoômetro de Gay-Lussac graduado a dois décimos e correção de temperatura da mistura hidroalcoólica para 15°C.

A acidez total dos mostos, "vinhos" e destilados foi determinada por titulometria, usando-se solução decinormal de hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador.

Os valores de pH dos mostos, "vinhos" e destilados foram determinados em potenciômetro Methron E-350 B, sem nenhum tratamento prévio das amostras de material.

O melaço foi diluído com água destilada em proporções necessárias para dar um mosto com a concentração de 150 g de ART por litro.

Fez-se a inoculação com uma suspensão aquosa homogênea de fermento prensa do Fleischmann para atingir a concentração de 10 g do mesmo por litro de mosto.

Distribuiu-se o mosto homogeneizado em cilindros graduados de 500 ml, obedecendo uma ordem de distribuição obtida por meio de sorteio.

3 RESULTADOS

A riqueza alcoólica, acidez, valores de pH dos "vinhos" de mostos de melaço tratados com concentrações de diversos desinfetantes e os valores da acidez e pH dos destilados estão apresentados nas tabelas de 1 a 22.

4 DISCUSSÃO

O primeiro grupo de experiências feito para verificar a ação de desinfetantes em contato com melaço por 48 horas, na conservação do melaço, mostrou, conforme pode-se ver nas tabelas 1,2,3,4 e 5, pequena ação em relação ao mosto não desinfetado.

Importa ressaltar que o hexaclorofeno, nessa concentração, provocou boa recuperação a partir do 12º corte, somente no branco, confirmando que a ação dos desinfetantes costuma ser maior em meios em que um microrganismo (contaminante) não teve oportunidade de adquirir resistência aos desinfetantes.

No segundo grupo de experiências, com dobro das concentrações do experimento anterior, verificou-se melhoria dos diversos dados como riqueza alcoólica,

acidez e pH dos "vinhos" acidez e pH dos destilados, conforme pode ser visto nas tabelas 6,7,8,9 e 10.

Essa melhoria mostrou-se principalmente com hexaclorofeno, em seguida com cloranfenicol e em menor grau com a benzilpenicilina G potássica. A associação de antibióticos mesmo nesta concentração maior não proporcionou nenhum efeito.

A recuperação efetuada com 4 mg de hexaclorofeno, a partir do 12º corte, deu bons resultados nos mostos tratados com cloranfenicol e hexaclorofeno. Com benzilpenicilina potássica, o resultado, embora positivo, foi inferior ao das experiências anteriores. Isso poderia ser explicado por uma resistência maior dos contaminantes e essas concentrações maiores desse antibiótico. Com a associação, os resultados foram quase insignificantes.

No terceiro e quarto grupo de experiências usando concentrações bem mais elevadas de desinfetantes em contato com o melaço por 48 horas, conforme as tabelas nºs 11, 12, 13, 14, 15 e 16, notou-se o seguinte :

- a) o hexaclorofeno com 20 mg ou acima mostrou-se nitidamente tóxico para a levedura;
- b) a benzilpenicilina potássica isoladamente deu melhores resultados com 5.000 unidades por litro que com 10.000 unidades por litro;
- c) o cloranfenicol deu resultado satisfatório, quer com 15 quer com 30 mg por litro;
- d) em associação, esses dois antibióticos continuaram mostrando baixa ação com 600 unidades e 0,6 mg, respectivamente, bem como em concentrações mais elevadas.

As experiências mostradas nas tabelas 17, 18, 19, 20, 21 e 22 confirmam que o hexaclorofeno é tóxico para a levedura em elevadas concentrações, e também mostram que os antibióticos colocados em contato com melaço durante 15 dias não têm nenhuma ação desinfetante, provavelmente por degradação, visto serem substâncias bioquímicas sensíveis.

SATO, S., AQUARONE, F. & BRAZZACH, M. L. - Conservação de melão por desinfetante. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 18(2): 113-126, jul/dez., 1982

TABELA 1

Riqueza alcoólica dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações, em graus GL.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**	
1º vinho	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	
1º corte	6,8	6,9	7,1	7,0	7,0	
2º corte	6,2	6,0	6,0	6,1	6,0	
3º corte	6,5	6,5	6,8	6,3	6,3	
4º corte	6,3	6,0	6,3	6,4	6,0	
5º corte	5,6	6,0	6,4	6,4	5,7	
6º corte	6,0	5,5	5,3	5,6	6,1	
7º corte	6,3	6,2	5,8	6,2	6,5	
8º corte	6,0	6,4	6,1	6,5	7,0	
9º corte	6,0	6,5	6,2	6,3	6,7	
10º corte	6,0	5,7	6,2	6,3	6,3	
11º corte	6,0	5,7	6,1	6,2	6,5	
12º corte	5,5	7,0*	6,3*	6,8*	7,0*	6,5*
13º corte	5,3	7,0*	6,3*	7,2*	6,5*	6,8*
14º corte	5,3	7,2*	6,3*	7,2*	6,2*	6,5*
15º corte	5,2	7,0*	6,0*	6,5*	5,7*	6,4*

* Recuperação do "vinho" com 4 mg de hexaclorofeno por litro.

** Média de duas experiências.

1. Sem tratamento.
2. Associação de 125 U de benzilpenicilina potássica e 0,125 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.
3. Com 1000 U de benzilpenicilina potássica por litro, no melão por 48 horas.
4. Com 4 mg de hexaclorofeno por litro, no melão por 48 horas.
5. Com 3 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.

TABELA 2

Acidez dos "vinhos" (p ácido láctico/l) de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
1º corte	8,5	8,1	8,1	8,1	8,1
2º corte	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9
3º corte	9,9	9,9	9,9	8,5	8,5
4º corte	11,7	11,7	10,8	8,5	8,5
5º corte	14,8	13,5	13,5	9,9	9,9
6º corte	15,7	14,8	14,8	9,9	9,9
7º corte	20,2	17,1	17,1	10,8	10,8
8º corte	20,2	19,3	19,3	13,5	15,7
9º corte	20,2	21,6	21,6	14,8	18,4
10º corte	19,3	19,8	19,8	14,4	18,4
11º corte	20,2	20,2	20,2	13,5	18,4
12º corte	20,2 13,5*	20,2*	20,2*	20,2*	19,3*
13º corte	20,2 13,5*	20,2*	20,2*	13,4*	18,4*

TABELA 3

Valores de pH dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
1º corte	5,3	5,4	5,4	5,3	5,3
2º corte	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
3º corte	5,2	5,2	5,2	5,3	5,3
4º corte	5,1	5,1	5,1	5,3	5,3
5º corte	5,0	5,0	5,0	5,2	5,2
6º corte	4,8	4,8	4,8	5,2	5,2
7º corte	4,6	4,6	4,6	5,1	5,0
8º corte	4,3	4,4	4,4	4,9	4,7
9º corte	4,3	4,2	4,2	4,8	4,6
10º corte	4,3	4,3	4,3	4,9	4,5
11º corte	4,3	4,3	4,4	4,9	4,4
12º corte	4,3 4,9*	4,3*	4,4*	4,9*	4,5*
13º corte	4,3 4,9*	4,3*	4,5*	4,9*	4,5*

TABELA 4

Acidez dos destilados de "vinhos" (mg ácido acético/l) de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	120	120	96	120	108
1º corte	288	300	324	324	324
2º corte	204	204	300	168	144
3º corte	228	204	216	168	120
4º corte	300	216	288	156	120
5º corte	348	276	420	168	188
6º corte	420	420	420	156	204
7º corte	420	456	456	204	264
8º corte	420	576	540	216	276
9º corte	588	528	564	480	504
10º corte	600	612	600	540	612
11º corte	612	648	612	540	636
12º corte	624 348*	672*	624*	516*	564*
13º corte	624 312*	540*	552*	528*	576*

TABELA 5

Valores de pH dos destilados de "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	4,0	4,0	4,1	3,9	4,0
1º corte	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
2º corte	3,7	3,7	3,7	3,8	3,8
3º corte	3,7	3,7	3,7	3,8	3,9
4º corte	3,5	3,7	3,6	3,8	3,9
5º corte	3,5	3,6	3,5	3,8	3,8
6º corte	3,5	3,5	3,5	3,8	3,8
7º corte	3,5	3,5	3,5	3,7	3,6
8º corte	3,4	3,4	3,5	3,7	3,5
9º corte	3,4	3,4	3,4	3,6	3,4
10º corte	3,2	3,2	3,2	3,4	3,2
11º corte	3,2	3,2	3,2	3,4	3,2
12º corte	3,2 3,5*	3,2*	3,2*	3,5*	3,2*
13º corte	3,2 3,7*	3,3*	3,3*	3,5*	3,3*

*Recuperação do "vinho" com 4 mg de hexaclorofeno por litro.

**Média de duas experiências.

1. Sem tratamento.
2. Associação de 125U de benzilpenicilina potássica e 0,125 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.
3. Com 1000 U de benzilpenicilina potássica por litro, no melão por 48 horas.
4. Com 4 mg de hexaclorofeno por litro, no melão por 48 horas.
5. Com 3 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.

SATO, S., AQUARONE, F. & BRAZZACH, M. L. - Conservação de melaço por desinfetante. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 18(2): 113-126, jul./dez., 1982

TABELA 6

Riqueza alcoólica dos "vinhos" de mostos de melaço, tratado com desinfetantes em diversas concentrações, em graus GL.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	7,0	7,0	7,1	7,1	7,0
1º corte	6,8	7,0	7,1	7,1	7,0
2º corte	6,2	6,4	6,3	6,5	6,7
3º corte	6,5	6,1	6,0	6,2	6,5
4º corte	6,3	6,1	6,3	6,1	6,2
5º corte	5,6	6,0	6,5	6,1	6,1
6º corte	6,0	6,2	5,7	5,5	5,8
7º corte	6,3	6,0	6,0	6,5	6,7
8º corte	6,0	6,0	6,0	6,5	6,3
9º corte	6,0	6,5	6,5	7,0	7,0
10º corte	6,0	5,5	6,0	6,5	6,9
11º corte	6,0	5,5	5,5	6,5	6,5
12º corte	5,5	7,0*	5,7*	6,0*	7,1*
13º corte	5,3	7,0*	6,0*	6,2*	7,2*
14º corte	5,3	7,2*	6,2*	6,3*	7,0*
15º corte	5,2	7,0*	6,2*	6,5*	7,0*

*Recuperação do "vinho" com 4 mg de hexaclorofeno por litro.

**Média de duas experiências.

1. Sem tratamento.
2. Associação de 250 U de benzilpenicilina potássica e 0,250 mg de cloranfenicol por litro, no melaço por 48 horas.
3. Com 2000 U de benzilpenicilina potássica por litro, no melaço por 48 horas.
4. Com 8 mg de hexaclorofeno por litro, no melaço por 48 horas.
5. Com 6 mg de cloranfenicol por litro, no melaço por 48 horas.

TABELA 7

Acidez dos "vinhos" (g ácido láctico/l) de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1º*	2º*	3º*	4º*	5º*
1º vinho	8,5	8,1	8,1	8,1	8,1
1º corte	8,5	8,1	8,1	8,1	8,1
2º corte	9,9	8,1	8,1	8,1	8,1
3º corte	9,9	9,9	9,9	8,5	8,5
4º corte	10,8	10,8	10,8	8,5	8,5
5º corte	11,7	11,7	11,7	8,5	8,5
6º corte	14,8	14,8	14,8	9,9	9,9
7º corte	15,7	16,4	17,1	10,8	10,8
8º corte	20,2	21,6	18,4	11,7	11,7
9º corte	20,2	20,2	20,2	13,5	14,8
10º corte	20,2	20,2	20,2	13,5	14,8
11º corte	20,2	20,2	20,2	13,5	15,7
12º corte	20,2 13,5*	20,2*	20,2*	13,5*	15,7*
13º corte	20,2 13,5*	20,2*	19,3*	13,5*	15,7*

TABELA 8

Valores de pH dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1º*	2º*	3º*	4º*	5º*
1º vinho	5,3	5,4	5,4	5,4	5,4
1º corte	5,3	5,4	5,4	5,4	5,4
2º corte	5,2	5,4	5,4	5,4	5,4
3º corte	5,2	5,1	5,1	5,3	5,3
4º corte	5,1	5,0	5,0	5,3	5,3
5º corte	5,0	4,9	4,8	5,2	5,2
6º corte	4,8	4,6	4,6	5,1	5,1
7º corte	4,6	4,5	4,5	5,0	5,0
8º corte	4,3	4,3	4,3	4,9	4,8
9º corte	4,3	4,3	4,3	4,9	4,8
10º corte	4,3	4,3	4,3	4,9	4,7
11º corte	4,3	4,3	4,3	4,9	4,7
12º corte	4,3 4,9*	4,3*	4,4*	4,9*	4,7*
13º corte	4,3 4,9*	4,3*	4,4*	4,9*	4,7*

TABELA 9

Acidez dos "vinhos" (mg ácido acético/l) de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1º*	2º*	3º*	4º*	5º*
1º vinho	120	108	96	108	120
1º corte	288	84	120	156	144
2º corte	204	324	546	456	228
3º corte	228	300	204	216	168
4º corte	300	228	248	228	144
5º corte	348	264	300	168	180
6º corte	420	420	480	180	180
7º corte	420	456	492	204	156
8º corte	420	480	468	216	180
9º corte	588	564	480	456	204
10º corte	600	576	492	480	216
11º corte	612	600	636	300	480
12º corte	576 348*	600*	600*	312*	468*
13º corte	624 200*	586*	576*	324*	480*

TABELA 10

Valores de pH dos destilados de "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1º*	2º*	3º*	4º*	5º*
1º vinho	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
1º corte	3,6	4,0	4,0	3,8	3,9
2º corte	3,7	3,6	3,5	3,6	3,7
3º corte	3,7	3,6	3,7	3,7	3,8
4º corte	3,5	3,6	3,7	3,8	3,8
5º corte	3,5	3,6	3,6	3,8	3,8
6º corte	3,5	3,5	3,5	3,8	3,8
7º corte	3,5	3,5	3,5	3,7	3,7
8º corte	3,4	3,5	3,5	3,5	3,7
9º corte	3,4	3,4	3,4	3,7	3,7
10º corte	3,2	3,3	3,4	3,6	3,5
11º corte	3,2	3,2	3,3	3,6	3,3
12º corte	3,2 3,5*	3,2*	3,3*	3,6*	3,3*
13º corte	3,2 3,7*	3,2*	3,3*	3,6*	3,4*

*Recuperação do "vinho" com 4 mg de hexaclorofeno por litro.

**Média de duas experiências.

1. Sem tratamento.
2. Associação de 250 U de benzilpenicilina potássica e 0,250 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.
3. Com 2000U de benzilpenicilina potássica por litro, no melão por 48 horas.
4. Com 8 mg de hexaclorofeno por litro, no melão por 48 horas.
5. Com 6 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.

TABELA 11

Riqueza alcoólica dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações, em graus GL.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
1º corte	7,0	7,0	7,5	7,2	7,2
2º corte	5,3	5,8	5,6	5,6	5,8
3º corte	5,2	5,3	5,2	5,2	5,4
4º corte	5,1	6,2	5,8	5,8	6,2
5º corte	5,1	5,8	5,7	4,0	5,7
6º corte	4,9	5,5	5,5	4,0	5,5
7º corte	5,0	5,2	5,3	4,0	5,2
8º corte	4,7	4,2	5,2	4,6	5,2
9º corte	4,6	3,5	5,2	4,2	5,3
10º corte	4,3	3,8	5,2	4,5	5,2

TABELA 12

Valores de pH dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	5,1	5,0	5,0	5,0	5,0
1º corte	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
2º corte	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
3º corte	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
4º corte	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
5º corte	4,9	5,0	5,0	5,0	5,0
6º corte	5,1	5,1	5,1	5,2	5,2
7º corte	5,2	5,1	5,2	5,3	5,3
8º corte	5,1	5,0	5,2	5,2	5,2
9º corte	5,1	5,0	5,1	5,3	5,3

TABELA 13

Valores de pH dos destilados de "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
1º corte	3,3	3,3	3,2	3,2	3,2
2º corte	3,3	3,3	3,2	3,3	3,3
3º corte	2,9	3,0	3,0	3,0	3,0
4º corte	3,2	3,3	3,2	3,1	3,2
5º corte	3,2	3,2	3,1	3,2	3,2
6º corte	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2
7º corte	3,3	3,3	3,3	3,4	3,4
8º corte	3,2	3,3	3,3	3,3	3,3
9º corte	3,3	3,2	3,3	3,4	3,4

** Média de duas experiências.

- 1. Sem tratamento.
- 2. Associação de 600 U de benzilpenicilina potássica e 0,6 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.
- 3. Com 5000 U de benzilpenicilina potássica por litro, no melão por 48 horas.
- 4. Com 20 mg de hexaclorofeno por litro, no melão por 48 horas.
- 5. Com 15 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.

TABELA 14

Riqueza alcoólica dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações, em graus GL

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
1º corte	7,0	7,0	7,2	6,6	7,0
2º corte	5,3	5,6	5,8	5,6	5,8
3º corte	5,2	4,5	5,0	4,5	5,2
4º corte	5,0	4,8	5,6	4,8	5,2
5º corte	5,0	4,5	5,2	4,0	6,0
6º corte	4,9	4,2	5,5	3,5	5,5
7º corte	5,0	5,0	5,2	3,5	5,5
8º corte	4,7	5,2	5,6	3,8	5,4
9º corte	4,5	5,2	4,8	3,5	5,4
10º corte	4,2	5,2	4,5	3,3	5,4

TABELA 15

Valores de pH dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	5,1	5,0	5,0	4,9	5,0
1º corte	5,1	5,1	5,1	5,0	5,1
2º corte	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
3º corte	4,9	4,9	4,9	4,9	4,5
4º corte	5,1	5,1	5,0	5,1	5,0
5º corte	4,9	5,1	5,0	5,1	5,1
6º corte	5,1	5,2	5,1	5,2	5,2
7º corte	5,2	5,3	5,2	5,3	5,3
8º corte	5,1	5,2	5,0	5,3	5,3
9º corte	5,1	5,3	5,0	5,3	5,3

TABELA 16

Valores de pH dos destilados de "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
1º corte	3,3	3,3	3,2	3,2	3,2
2º corte	3,3	3,3	3,2	3,3	3,3
3º corte	2,9	2,9	3,0	3,0	3,0
4º corte	3,2	3,2	3,2	3,1	3,2
5º corte	3,2	3,3	3,2	3,2	3,0
6º corte	3,1	3,2	3,1	3,2	3,2
7º corte	3,3	3,4	3,3	3,3	3,3
8º corte	3,3	3,4	3,3	3,3	3,4
9º corte	3,3	3,4	3,3	3,3	3,4

- ** Média de duas experiências.
1. Sem tratamento.
 2. Associação de 1250 U de benzilpenicilina potássica e 1,25 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.
 3. Com 10000 U de benzilpenicilina potássica por litro, no melão por 48 horas.
 4. Com 40 mg de hexaclorofeno por litro, no melão por 48 horas.
 5. Com 30 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 48 horas.

TABELA 17

Reação alcoólica dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações, em graus GL

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	7,2	7,2	7,5	7,5	7,5
1º corte	5,7	5,8	5,8	6,0	6,0
2º corte	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
3º corte	3,1	3,0	4,0	4,0	4,5
4º corte	4,1	4,0	4,5	4,0	4,5
5º corte	5,0	4,2	5,0	3,5	4,5
6º corte	5,2	4,5	4,8	3,5	5,0
7º corte	5,0	4,0	4,0	3,0	5,0
8º corte	4,8	4,5	4,0	2,8	5,0
9º corte	5,2	5,2	5,0	4,0	5,2
10º corte	5,2	5,2	5,2	5,0	5,2

TABELA 18

Valores de pH dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
1º corte	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
2º corte	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
3º corte	4,9	4,9	4,5	4,9	4,9
4º corte	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8
5º corte	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8
6º corte	5,0	5,1	5,0	5,1	5,1
7º corte	5,1	5,1	5,1	5,2	5,1
8º corte	4,9	5,0	5,0	5,1	5,0
9º corte	4,9	4,9	4,9	5,0	4,9
10º corte	5,1	5,1	5,1	5,2	5,1

TABELA 19

Valores de pH dos destilados de "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
1º corte	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
2º corte	3,5	3,4	3,4	3,4	3,5
3º corte	3,3	3,2	3,3	3,3	3,3
4º corte	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
5º corte	3,0	3,1	3,1	3,1	3,0
6º corte	3,2	3,3	3,3	3,2	3,3
7º corte	3,2	3,1	3,1	3,3	3,0
8º corte	3,1	3,1	3,1	3,2	3,1
9º corte	2,9	2,9	3,0	2,9	3,0
10º corte	3,2	3,0	3,1	3,2	3,1

- ** Média de duas experiências.
1. Sem tratamento.
 2. Associação de 600 U de benzilpenicilina potássica e 0,6 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 15 dias.
 3. Com 5000 U de benzilpenicilina potássica por litro, no melão por 15 dias.
 4. Com 20 mg de hexaclorofeno por litro, no melão por 15 dias.
 5. Com 15 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 15 dias.

TABELA 20

Riqueza alcoólica dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações, em graus GL

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	7,2	7,2	7,5	7,5	7,5
1º corte	5,7	5,8	6,0	6,2	6,0
2º corte	4,2	4,2	4,2	3,5	4,2
3º corte	3,1	3,5	3,5	2,8	3,6
4º corte	4,1	4,5	4,0	2,4	4,2
5º corte	5,0	5,2	4,2	3,0	5,0
6º corte	5,2	5,2	4,2	2,8	5,0
7º corte	5,0	4,2	4,0	2,2	4,5
8º corte	4,6	4,8	4,2	3,0	5,0
9º corte	5,2	5,0	4,8	3,2	5,5
10º corte	5,2	5,0	4,5	3,5	6,0

TABELA 21

Valores de pH dos "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	5,2	5,2	5,2	5,1	5,2
1º corte	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
2º corte	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
3º corte	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
4º corte	4,8	4,9	4,8	4,8	4,6
5º corte	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8
6º corte	5,0	5,0	5,0	5,1	5,1
7º corte	5,0	5,1	5,1	5,2	5,1
8º corte	4,9	5,0	4,9	5,0	5,0
9º corte	4,9	4,9	4,8	5,0	4,9
10º corte	5,1	5,1	4,9	5,2	5,1

TABELA 22

Valores de pH dos destilados de "vinhos" de mostos de melão, tratados com desinfetantes em diversas concentrações.

Nº do corte	1**	2**	3**	4**	5**
1º vinho	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
1º corte	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
2º corte	3,5	3,5	3,4	3,4	3,4
3º corte	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
4º corte	3,1	3,1	3,0	3,0	3,0
5º corte	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
6º corte	3,3	3,0	3,3	3,3	3,3
7º corte	3,2	3,2	3,1	3,2	3,2
8º corte	3,0	3,2	3,1	3,1	3,1
9º corte	2,9	2,9	3,0	2,9	2,9
10º corte	3,2	3,2	3,1	3,1	3,2

- ** Média de duas experiências.
1. Sem tratamento.
 2. Associação de 1250 U de benzilpenicilina potássica e 1,25 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 15 dias.
 3. Cnr 10000U de benzilpenicilina potássica por litro, no melão por 15 dias.
 4. Cnr 40 mg de hexaclorofeno por litro, no melão por 15 dias.
 5. Cnr 30 mg de cloranfenicol por litro, no melão por 15 dias.

SATO, S., AQUARONE, E. & BRAZZACH, M. L. - Conservação de melaço por desinfetante. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 18(2): 113-126, jul./dez., 1982

O cloranfenicol, por ser mais resistente que a benzilpenicilina potássica, mostra na experiência em que foi usado na concentração de 30 mg/l que ainda retém uma pequena ação residual.

5 CONCLUSÕES

5.1 - o cloranfenicol no melaço de cana agiu melhor do que os outros experimentados durante a fermentação.

5.2 - o hexaclorofeno em pequenas concentrações pode ser utilizado para controlar a contaminação em mosto de melaço de cana para a fermentação alcoólica, enquanto que em concentrações maiores atua negativamente, provavelmente atacando as leveduras.

SUMMARY

CONSERVATION OF MOLASSES BY DISINFECTANTS

The disinfection of molasses to improve the conditions for storage and for further exports is studied. Among the disinfectants used on molasses, chloramphenicol in concentrations of 15 and 30 mg/l presented better disinfectant action. High concentrations do not increase the alcoholic yield; instead they can present toxicity against the yeast.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AQUARONE, E. - Influência de antibióticos na fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana. S.Paulo, Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP, 1959. [Tese - livre-docência]
02. AQUARONE, E. - Influência do cloranfenicol na fermentação alcoólica de melaço de cana diluído. An.Farm.Quím.S.Paulo, 10 (3/4) : 45-9, 1959.
03. AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R.; NACCO, R. - Emprego de associações de antibióticos na fabricação de álcool por fermentação. Rev.Fac.Farm.Bioquím.Univ.S.Paulo, 6 (2) : 257-308, 1968.

SATO, S., AQUARONE, F. & BRAZZACH, M. L. - Conservação de melaço por desinfetante. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 18(2): 113-126, jul./dez., 1982

04. BANCO DO BRASIL - Carteira do Comércio Exterior (Cacex). Divisão de Estatística e Nomenclatura. Cacex-Sepex, 1973. v.2, p. 51.
05. BANCO DO BRASIL - Carteira do Comércio Exterior (Cacex). Divisão de Estatística e Nomenclatura. Cacex-Sepex, 1974. v.2, p. 455.
06. BANCO DO BRASIL - Carteira do Comércio Exterior (Cacex). Divisão de Estatística e Nomenclatura. Cacex-Sepex, 1975. p.79.
07. BORZANI, W. - Concentração de leveduras no fermento prensado. Eng. e Quím., Rio de Janeiro, 7 (2) : 5-7, 1955.
08. BROWNE, C.A. & ZERBAN, F.W. - Physical and chemical methods of sugar analysis. 3. ed. New York, John Wiley, 1948. p.746-53.
09. FALCONE, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. - Processo simplificado para a dosagem de açúcares redutores totais em melaço de cana. An.Farm.Quím.S.Paulo, 10 (5/6) : 69-72, 1959.
10. MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E DO COMÉRCIO - Instituto do Açúcar e do Alcool. Resolução nº 2096 de 28/5/1976.
11. OWEN, W.L. - Blackstrap molasses as raw material for biochemical industries. New York, Russel Palmar, 1939. Apud ROCHA DE ALMEIDA, J. (ed.) et al. In: Semana de Fermentação Alcoólica, 2, Piracicaba, 1966. Fermentação do mel final das usinas de açúcar. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, 1966. v.2, p.167.
12. OWEN, W.L. - The microbiology of sugar, syrups and molasses. Barr-Owen Research Enterprises Publishers, 1949. Apud ROCHA DE ALMEIDA, J. (ed.) et al. In: Semana de Fermentação Alcoólica, 2, Piracicaba, 1966. Fermentação do mel final das usinas de açúcar. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, 1966. v.2, p.168.
13. SATO, S.; BRAZZACH, M.L.; AQUARONE, E. - Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. Rev. Farm. Bioquím.Univ.S.Paulo, 16 (1/2) : 133-44, 1980.

Recebido para publicação em 30/08/1982

ANEXO 4

Arq. Biol. Tecnol. 29(2):327-335,abr.1986

NON-CONSTANT FED-BATCH ETHANOL FERMENTATION OF MOLASSES

(PRELIMINARY TESTS)

Eugênio Aquarone*, Sunao Sato* and Walter Borzani**

*Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas ,
Universidade de São Paulo, C.P. 30786, São Paulo, SP, Brasil,

**Instituto Mauá de Tecnologia, Centro de Pesquisas, Estrada das Lágrimas, 2035
09500 - São Caetano do Sul, SP, Brasil

Recebido para publicação em 28 de novembro de 1.985

ABSTRACT

The ethanol productivity in fed-batch fermentation of molasses was improved when the fermentor filling phase was carried out using a linearly decreasing feeding rate.

INTRODUCTION

The study of fed-batch fermentation for the production of microorganisms and/or substances have led to the publication of several papers and to some important industrial applications (1 - 42). In the particular case of fed-batch ethanol fermentation only a few papers were published (7, 34, 37) presenting results obtained in tests carried out using constant feeding rates during the reactor filling phase.

No information were found on fed-batch ethanol fermentations using non-constant feeding rates. With this main purpose in mind, a research program was started by the Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas (University of São Paulo) and the Centro de Pesquisas of the Instituto Mauá de Tecnologia. The results obtained in typical preliminary tests are presented in this note.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum. *Saccharomyces cerevisiae*, prepared as pressed yeast by Usina Itaiquara de Açúcar e Alcool S.A., was used in all the experiments. The inocula were prepared by suspending known masses of pressed yeast in tap water. The volume of the inoculum, always equal to 3 L, was sufficient to cover the flat blade turbine of the 14 - L New Brunswick fermentor used in the tests.

Fermentation medium. The mashes, prepared by diluting sugar-cane blackstrap mo-

lasses in tap water, were not clarified nor sterilized. Urea (0.5 g/L) was used as nitrogen source. As the mashes were not sterilized, potassium salt of penicillin G (0.6 mg/L) was added to prevent contamination.

Experimental conditions. The fermentation tests were carried out under the following experimental conditions: temperature = 30.0°C, impeller speed = 200 min⁻¹; initial pH = 5.0 - 5.2; fermentor filling-up time = 5 h. The other experimental conditions are presented later (see RESULTS).

Description of a typical test. After the addition of the inoculum to the empty fermentor, the impeller speed and the temperature were adjusted. The mash was then controllably fed into the fermentor until a total volume of 10 L.

Analytical methods. TRS and ethanol concentrations were measured in the supernatant of centrifuged samples by the Somogyi (43) and by the dichromate (44) methods respectively.

RESULTS

Figure 1 shows the results obtained in tests carried out under the following experimental conditions:

a) Test nº 1 (Curve 1)

$$S_0 = 221 \text{ g/L}$$

$$m = 555 \text{ g}$$

$$F = 1.4 \text{ L/h (constant)}$$

b) Test nº 2 (Curve 2)

$$S_0 = 221 \text{ g/L}$$

$$m = 555 \text{ g}$$

$$F = 0.556 e^{0.2 t} \text{ (t measured in h, and F in L/h)}$$

c) Test nº 3 (Curve 3)

$$S_0 = 235 \text{ g/L}$$

$$m = 433 \text{ g}$$

$$F = 1.4 \text{ L/h (constant)}$$

d) Test nº 4 (Curve 4)

$$S_0 = 235 \text{ g/L}$$

$$m = 433 \text{ g}$$

$$F = 2.8 - 0.56 t \text{ (t measured in h, and F in L/h)}$$

Figure 1 also shows that the values of T were 6 h in tests nº 1 and 2, 7 h in test

Figure 1. Ethanol production curves in tests nº 1, 2, 3 and 4. The filling phase was started at $t = 0$ and was completed at $t = 5$ h.

Figure 2. Sugars addition curves.

nº 3, and 5 h in test nº 4.

Figure 2 presents the sugars feeding curves.

DISCUSSION

The difference between the values of T observed in tests nº 1 and nº 3 can be explained considering that in test nº 1 the mass of pressed yeast in the inoculum was 1.28 times the mass of yeast used in test nº 3. It seems improbable, in this case, that the relatively small difference between the masses of sugars added to the reactor (-1.55 kg in test nº 1, and -1.65 kg in test nº 3) affected the value of T .

Figure 1 shows that the values of R_E obtained during the filling phase of test nº 1 (curve 1) were higher than the correspondent values of R_E of test nº 2 (curve 2). The durations of both fermentations, however, were equal to 6 h, leading to the same average ethanol productivity.

When test nº 2 was programmed, it was expected, based on the known fact that during the fermentor feeding phase the mass of yeast cells increases about 25% (45), that the use of an increasing mash feeding rate could improve the ethanol productivity. The above fact was not observed very probably because when the high sugars feeding rates were attained (near to the end of the reactor filling phase; see Figure 2), the ethanol present in the fermenting medium inhibited the yeast cells. The use of increasing mash feeding rates, otherwise, will very probably aggravate the foam control, specially in industrial-scale fermentors, because the highest sugars feeding rate is attained when the reactor is almost completely filled.

Test nº 4, carried out using a linearly decreasing feeding rate, led to the highest ethanol productivity: 1.40 times the value obtained in test nº 3, and 1.20 times the productivity of tests nº 1 and 2, in spite of the fact that, in each of these last two experiments, the mass of pressed yeast used to inoculate the fermentor was 28% higher than that used in test nº 4.

The above results can be explained as follows: when a decreasing feeding rate is used, the sugars addition rate is maximum at the beginning and is equal to zero at the end of the filling phase; the sugars addition rate then decreases as the ethanol and the yeast concentrations increase, leading to a reduction of T and, consequently, to an improvement of the ethanol productivity.

It must be pointed out, finally, that the use of decreasing mash feeding rates will probably make less critical the foam control, because the lowest sugars addition rate is attained when the fermentor is almost completely filled.

NOMENCLATURE

- F - Fermentor feeding rate.
- m - Mass of pressed yeast in the inoculum.
- R_E - Relative mass of ethanol produced at a given moment t, defined as the ratio between the mass of ethanol in the medium at the moment t, and the mass of ethanol in the medium at the end of the fermentation.
- R_S - Relative mass of TRS added to the fermentor at a given moment t, defined as the ratio between the mass of TRS added to the reactor at the moment t, and the mass of TRS added until the end of the filling phase.
- S_0 - TRS concentration of the feeding mash.
- t - Time.
- T - Time measured from the beginning of the feeding phase until to the end of the fermentation.
- TRS - Total reducing sugars (calculated as glucose).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the assistance of Carlos Augusto M. Ferraz, Kleber A. Almeida, Dante A. de Moraes and Marina L.R. Vairo. They are also indebted to TECNAL for the supply of the ethanol distillation apparatus. This work was supported, in part, by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. J. WHITE (1954). Yeast Technology. Chapman & Hall, London.
2. F. YOSHIDA, T. YAMANE and K. NAKAMOTO (1973). Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. Biotechnol. Bioeng., 15, 257-270.
3. S.J. PIRT (1974). The theory of fed-batch culture with reference to the penicillin fermentation. J. Appl. Chem. Biotechnol., 24, 415-424.
4. I.J. DUNN and J.R. MOR (1975). Variable volume continuous cultivation. Biotechnol. Bioeng., 17, 1805-1822.
5. S. AIBA, S. NAGAI and Y. NISHIZAWA (1976). Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: a perspective of computer control to enhance the productivity in bakers' yeast cultivation. Biotechnol. Bioeng., 18, 1001-1016.

Arq. Biol. Tecnol. 29(2):327-335,abr.1986

6. R.C. JONES and R.M. ANTHONY (1977). The relationship between nutrient feed rate and the specific growth rate in fed-batch culture. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 4 , 87-92.
7. J. ENDO and I. INOUE (1977). A fundamental research of fed-batch fermentation. Top. Biochem. Eng., 2, 583-588.
8. A. TRILLI, V. MICHELINI, V. MANTOVANI and S.J. PIRT (1977). Estimation of productivities in repeated fed-batch cephalosporin fermentation. J. Appl. Chem. Biotechnol., 27, 219-224.
9. R. KELLER and I.J. DUNN (1978). Computer simulation of the biomass production rate of cyclic fed-batch continuous culture. J. Appl. Chem. Biotechnol., 28, 784-790.
10. P. PERINGER and H.T. BLACHERE (1979). Modelling and optimal control of bakers' yeast production in repeated fed-batch culture. Biotechnol. Bioeng. Symp., 9, 205-213.
11. S. SHIOYA and I.J. DUNN (1979). Analysis of fed-batch fermentation processes by graphical methods. J. Chem. Technol. Biotechnol., 29, 180-192.
12. C.M. WATTEEUW, W.B. ARMIGER, D.L. RISTROPH and A.E. HUMPHREY (1979). Production of single cell protein from ethanol by fed-batch process. Biotechnol. Bioeng., 21, 1221-1237.
13. K. TODA, I. YABE and T. YAMAGATA (1980). Kinetics of biphasic growth of yeast in continuous and fed-batch cultures. Biotechnol. Bioeng., 22, 1221-1237.
14. W.A. WEIGAND (1981). Maximum cell productivity by repeated fed-batch culture for constant yield case. Biotechnol. Bioeng., 23, 249-266.
15. S.Y. HUANG and W.B. CHU (1981). Automatic control for fed-batch culture of single cell protein. Biotechnol. Bioeng., 23, 1491-1499.
16. E. HEGEWALD, B. WOLLESCHENSKY, R. GUTHKE, M. NEUBERT and W.A. KNORRE (1981). Instabilities of product formation in a fed-batch culture of *Penicillium chrysogenum*. Biotechnol. Bioeng., 23, 1563-1572.
17. A.A. ESENER, J.A. ROELS and N.W. KOSSEN (1981). Fed-batch culture: modelling and applications in the study of microbial energetics. Biotechnol. Bioeng., 23, 1851-1871.

18. K. DAIRAKU, Y. YAMASAKI, K. KUKI, S. SHIOYA and T. TAKAMATSU (1981). Maximum production of bakers' yeast fed-batch culture by a tubing method. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2069-2081.
19. A.L. ALLEN and R.E. MORTENSEN (1981). Production of cellulase from *Trichoderma reesei* in fed-batch fermentation from soluble carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2641-2645.
20. A. RAMIREZ, A. DURAND and H.T. BLACHERE (1981). Optimal bakers' yeast production in extended fed-batch culture by using a computer coupled pilot fermenter. *Biotechnol. Letters*, 3, 555-560.
21. J.R. COURT and S.J. PIRT (1981). Carbon and nitrogen limited growth of *Penicillium chrysogenum* in fed-batch culture. The optimal ammonium ion concentration for penicillin production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 31, 235-240.
22. K. DAIRAKU, E. IZUMOTO, H. MORIKAWA and S. SHIOYA (1982). Optimal quality control of bakers' yeast fed-batch culture using population dynamics. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2661-2674.
23. M. GOTTWALDOVÁ, J. KUCERA and V. PODRAZKY (1982). Enhancement of cellulase production by *Trichoderma viride* using carbon-nitrogen double-fed-batch. *Biotechnol. Letters*, 4, 229-232.
24. M. GOTTWALDOVÁ, J. KUCERA and V. PODRAZKY (1982). Fed-batch cultivation of *Trichoderma viride*: effect of pH and nitrogen source supplementation on cellulase production. *Biotechnol. Letters*, 4, 645-646.
25. K. VU-TRONG and P.P. GRAY (1982). Stimulation of tylosin productivity resulting from cyclic feeding profiles in fed-batch cultures. *Biotechnol. Letters*, 4, 725-728.
26. N. HENDY, C. WILKE and H. BLANCH (1982). Enhanced cellulase production using SOLKA FLOC in a fed-batch fermentation. *Biotechnol. Letters*, 4, 785-788.
27. D.G. MOU and C.L. COONEY (1983). Growth monitoring and control through computer-aided on-line mass balancing in a fed-batch penicillin fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 225-255.
28. D.G. MOU and C.L. COONEY (1983). Growth monitoring and control in complex medium: a case study employing fed-batch penicillin fermentation and computer-aided on-line mass balancing. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 257-269.

29. I.A. WEBSTER (1983). The continuously fed-batch reactor for measuring microbial growth rates. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2981-2990.
30. K. DAIRAKU, E. IZUMOTO, H. MORIKAWA, S. SHIOYA and T. TAKAMATSU (1983). An advanced micro computer coupled control system in a bakers' yeast fed-batch culture using a tubing method. *J. Ferment. Technol.*, 61, 189-196.
31. H. MORI, T. KOBAYASHI and S. SHIMIZU (1983). Effect of carbon dioxide on growth of microorganisms in fed-batch cultures. *J. Ferment. Technol.*, 61, 211-213.
32. H. YAMAUCHI, H. MORI, T. KOBAYASHI and S. SHIMIZU (1983). Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in micro computer-aided fed-batch culture. *J. Ferment. Technol.*, 61, 275-280.
33. H. MORI, T. YAMANE, T. KOBAYASHI and S. SHIMIZU (1983). Comparison of cell productivities among fed-batch, repeated fed-batch and continuous cultures at high cell concentration. *J. Ferment. Technol.*, 61, 391-401.
34. R.W. SILMAN (1984). Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 247-251.
35. J. STANISKIS and D. LEVISAUSKAS (1984). An adaptive control algorithm for fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 419-425.
36. K.Y. SAN and G. STEPHANOPOULOS (1984). A note on the optimality criteria for maximum biomass production in a fed-batch fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1261-1264.
37. L.H. KOSHIMIZU, E.I. VALDEOLIVAS GÓMEZ, C.L. BUENO NETTO, M.R. de M. CRUZ, M.L.R. VAIRO and W. BORZANI (1984). Constant fed-batch ethanol fermentation of molasses. *J. Ferment. Technol.*, 62, 205-210.
38. O. FOND, E. PETITDEMANGE, H. PETITDEMANGE and R. GAY (1984). Effect of glucose flow on the acetone butanol fermentation in fed-batch culture. *Biotechnol. Letters*, 6, 13-18.
39. J.M. RENARD, A. MANSOURI and C.L. COONEY (1984). Computer controlled fed-batch fermentation of the methylotroph *Pseudomonas* AM1. *Biotechnol. Letters*, 6, 577-580.
40. T.G. WATSON, I. NELLIGAN and L. LESSING (1984). Cellulase production by *Trichoderma reesei* (RUT-C30) in fed-batch culture. *Biotechnol. Letters*, 6, 667-672.

Arq. Biol. Tecnol. 29(2):327-335,abr.1986

41. M. ANDRIANTSSA, M. LAGET, A. CREMIEUX, and G. DUMENIL (1984). Constant fed-batch culture of methanol - utilizing *Corynebacterium* producing vitamin B12. Biotechnol. Letters, 6, 783-788.
42. M.M. KOLE, B.G. THOMPSON and D.F. GERSON (1985). Ammonium concentration control in fed-batch fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Technol., 63, 121-125.
43. M. SOMOGYI (1952). Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195, 19-23.
44. M.A. JOSLYN (1970). Methods in Food Analysis. Second Edition, p. 457. Academic Press, New York.
45. L.H. KOSHIMIZU (1984). Influência da concentração inicial de levedura e do tempo de alimentação da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ANEXO 5

Biotechnology Letters Vol 9 No 9 647-650 (1987)
Received as revised August 11

INFLUENCE OF LINEARLY DECREASING FEEDING RATES ON FED-BATCH ETHANOL FERMENTATION OF SUGAR-CANE BLACKSTRAP MOLASSES

Margareth Krauter (a), E. Aquarone^{*}(a), S. Sato (a), L. Perego Jr. (a)
and W. Borzani (b)

(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo,
C.P. 30.786, 01051 São Paulo, SP, Brazil.

(b) Instituto Mauá de Tecnologia, Estrada das Lágrimas 2035, 09580
São Caetano do Sul, SP, Brazil.

SUMMARY

The ethanol yield was not affected and the ethanol productivity increased (~ 10%) when linearly decreasing feeding rates were used instead of constant feeding rates in fed-batch ethanol fermentations.

INTRODUCTION

Several papers have described fed-batch ethanol fermentation using constant feeding rates during the reactor filling phase (Borzani, 1987; Endo and Inoue, 1977; Koshimizu et al, 1984 ; Silman, 1984). Only some preliminary results, however, were published on non-constant fed-batch ethanol fermentations (Aquarone et al, 1986) indicating that, at least in a particular case, linearly decreasing feeding rates improved the ethanol productivity. Moreover, decreasing feeding rates will lead to less problems of foam control, because the lowest sugar addition rates are attained when the fermentor is almost completely filled. The main purpose of the present paper is to show that linearly decreasing feeding rates over a filling time of 5-13 hours led to higher ethanol productivities when the initial substrate level $S_0 = 204.9-243.0 \text{ g.L}^{-1}$ and the initial yeast concentration $X_0 = 41.4-59.8 \text{ g.L}^{-1}$.

MATERIALS AND METHODS

The inocula were prepared by suspending known masses of pressed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in distilled water. The volume of the inoculum, always equal to 3 L, was sufficient to assure homogenization of the cell suspension by means of a 6-flat blade turbine (diameter 7.5 cm). The mashes, prepared by diluting blackstrap molasses in distilled water, were clarified (Borzani et al, 1977) but not sterilized. Penicillin V acid (0.3 mg.L^{-1}) was added to prevent contamination (Aquarone, 1960). Urea (0.5 g.L^{-1}) was also added and the mash pH was adjusted to 4.5-5.0. The fermentation tests were carried out in 14-L New Brunswick fermentors at 32°C; the impeller speed was 300 min^{-1} and no air was supplied. The medium pH was not

controlled since it practically did not vary during the experiments. After the addition of the inoculum to the empty fermentor, the impeller speed and the temperature were adjusted and the mash was fed into the fermentor at known feeding rates (Table 1) up to a total volume of 10 L. The volume of cells in the fermentor was evaluated by centrifugation (1,440xg; 15 min) of a 20 mL sample (Mallette, 1969). Sugars and ethanol concentrations were measured in the supernatant liquid by the Somogyi (1952) and by the dichromate (Joslyn, 1970) methods respectively. Dry matter cell concentrations were measured by filtering a 5.0 mL sample through a Millipore membrane (pore diameter = 1,2 μm); after washing with 50 mL of distilled water, the material was dried (105-110°C; 2h). The fermentation was considered finished when the ethanol concentration became constant.

RESULTS AND DISCUSSION

Feeding rates were tested at the constant and the variable rates listed in Table 1.

Table 1. Feeding rates used in the fermentation tests.

T (h)	F(L.h ⁻¹)	
	Constant	Decreasing
5	1.40	2.80-0.56 t
6	1.17	2.33-0.39 t
7	1.00	2.00-0.29 t
8	0.88	1.75-0.22 t
10	0.70	1.40-0.14 t
13	0.54	1.08-0.083 t

Figure 1 shows typical results calculated from the experimental concentration curves. Figure 2 shows that the ethanol yield was practically not affected by the experimental conditions; the following average values were obtained: a) constant feeding rates tests, $\eta = 83.4\%$ ($s = 3.1\%$); b) decreasing feeding rates tests, $\eta = 82.5\%$ ($s = 2.8\%$). Linear correlations were observed between the total ethanol content of the mash M_E and the filling-up time t during the reactor filling phase (see Fig. 1). It was thus possible to calculate the constant ethanol production rate during the filling phase leading to the results presented in Figure 3. The constant values of dM_E/dt are discussed elsewhere (Borzani, 1987). Figure 4 shows the influence of the experimental conditions on the ethanol productivity.

FIG. 1. Results obtained under the following experimental conditions:
 $S_0 = 243.0 \text{ g.L}^{-1}$;
 $X_0 = 48.4 \text{ g.L}^{-1}$;
 $T = 7\text{h}$; $F = 2.00-0.29t$

FIG. 2. Ethanol yields (η) and productivities (P) in fed-batch at constant feeding rates ($\bullet$) and at decreasing feeding rates ($\circ$)

FIG. 3. Influence of the fermentor filling-up time (T) on the constant ethanol production rate (dM_E/dt) during the filling phase. Constant feeding rates ($\bullet$). Decreasing feeding rates ($\circ$).

FIG. 4. Influence of the fermentor filling-up time (T) on the ethanol productivity (P). Constant feeding rates ($\bullet$). Decreasing feeding rates ($\circ$).

NOMENCLATURE

F	reactor feeding rate ($L.h^{-1}$)
M_E	mass of ethanol in the fermentor (g)
M_S	mass of TRS in the fermentor (g)
M_X	mass of yeast cells (dry matter) in the fermentor (g)
P	ethanol productivity ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
s	standard deviation
S_0	TRS concentration in the feeding mash ($g.L^{-1}$)
t	time (h)
T	fermentor filling-up time (h)
TRS	total reducing sugars calculated as glucose ($g.L^{-1}$)
X_0	yeast cells concentration (dry matter) in the inoculum ($g.L^{-1}$)
n	average ethanol yield (% of the theoretical value)

REFERENCES

- Aquarone, E. (1960). *Appl.Microbiol.* 8, 263-268.
- Aquarone, E.; Sato, S. and Borzani, W. (1986). *Arq.Biol.Tecnol.* 29, 327-335.
- Borzani, W. (1987). *Biotechnol.Bioeng.* 29, 844-849.
- Borzani, W.; Gregori, R.E., and Vairo, M.L.R. (1977). *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1363-1374.
- Endo, J. and Inoue, I. (1977). *Top.Biochem.Eng.* 2, 583-588.
- Joslyn, M.A. (1970). *Methods in Food Analysis*, 2nd.Ed., p.457, New York, Academic Press.
- Koshimizu, L.H., Valdeolivas Gómez, E.I., Bueno Netto, C.L., Cruz, M. R. de M., Vairo, M.L.R., and Borzani, W. (1984). *J.Ferment.Technol.* 62, 205-210.
- Mallette, M.F. (1969). Evaluation of Growth by Physical and Chemical Means. In: *Methods in Microbiology*, J.R. Norris and D.W. Ribbons, eds., vol. 1, p.542, London, Academic Press.
- Silman, R.W. (1984). *Biotechnol.Bioeng.* 26, 247-251.
- Somogyi, M. (1952). *J.Biol.Chem.* 195, 19-23.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the assistance of C.A.M. Ferraz, D.A. Moraes and N.M. Bloise. They are also indebted to TECNAL for the supply of the ethanol distillation apparatus. This work was supported, in part, by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brazil.

ANEXO 6

Arq. Biol. Tecnol. 31(4):571-573, nov., 1988

COMPARISON OF RESULTS OBTAINED IN FED-BATCH ETHANOL FERMENTATION TESTS
CARRIED OUT WITH CONSTANT FEEDING RATES AND WITH PERIODIC
ADDITIONS OF THE FEEDING MASH

W. Borzani^{1*}, M. Krauter², E. Aquarone², S. Sato², and L. Perego Jr.²

¹Instituto Mauá de Tecnologia, Estrada das Lágrimas 2035, 09580, São Caetano do Sul, SP, Brazil. ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, C. Postal 30.786, 01051, São Paulo, SP, Brazil

Recebido para publicação em 22 de novembro de 1988

ABSTRACT

Fed-batch ethanol fermentation of sugar-cane molasses carried out adding periodically (time interval = 15 min) the mash to the reactor led to ethanol productivities similar to those obtained when constant feeding rates were used.

INTRODUCTION

The industrial importance of fed-batch ethanol fermentation have led to the publication of several papers (1-6). When small-scale fermentors are used, it is frequently difficult to assure constant feeding rates during the reactor filling phase. The main purpose of the present paper is to show that periodic additions of the feeding mash to the fermentor lead to results similar to those obtained when constant feeding rates are used to fill the reactor.

MATERIALS AND METHODS

Materials and methods as previously described (5) were used. The periodic additions of suitable volumes of the mash to the fermentor were carried out at 15 min intervals. The following values were adopted: $S_0 = 204.9 - 234.3 \text{ g.L}^{-1}$; $X_0 = 42.5 - 59.8 \text{ g.L}^{-1}$; $T = 5 - 13 \text{ h}$ ($F_{av} = 1.40 - 0.54 \text{ L.h}^{-1}$).

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the results obtained in our tests, the correlation between P and $(F_{av} \cdot S_0)$ (Equation 1), and the correlation proposed elsewhere (4) when the fermentation tests were carried out using constant feeding rates (Equation 2).

* To whom correspondence should be addressed

$$P = 37.07 (F_{av}.S_0) / (770.56 + F_{av}.S_0) \quad (1)$$

$$P = 38.28 (F.S_0) / (837.04 + F.S_0) \quad (2)$$

Figure 1 clearly shows that the periodic additions of the mash to the reactor practically did not affect the ethanol productivity.

NOMENCLATURE

- F constant reactor feeding rate (L.h⁻¹)
- F_{av} average reactor feeding rate (L.h⁻¹)
- P ethanol productivity (g.L⁻¹.h⁻¹)
- S₀ total reducing sugar concentration (as glucose) in the feeding mash (g.L⁻¹)
- T fermentor filling-up time (h)
- X₀ yeast cells concentration (dry matter) in the inoculum (g.L⁻¹)

Fig. 1 - Correlations between the ethanol productivity and the sugar feeding rate (Eq. 1 and 2). The points represent the experimental values obtained in tests with periodic additions of the feeding mash.

REFERENCES

1. AQUARONE, E.; S. SATO & W. BORZANI (1986). Non-constant fed-batch ethanol fermentation of molasses (Preliminary tests). Arq. Biol. Tecnol., 29, 327-335.
2. BORZANI, W. (1987). Kinetics of ethanol production during the reactor feeding phase in constant fed-batch fermentation of molasses. Biotechnol. Bioeng., 29, 844-849.
3. ENDO, J. & I. INOUE (1977). A fundamental research of fed-batch fermentation. Top. Biochem. Eng., 2, 583-588.
4. KOSHIMIZU, L.H.; E. J. VALDEOLIVAS GÓMEZ; C.L. BUENO NETTO; M.R. de M. CRUZ; M.L.R. VAIRO & W. BORZANI (1984). Constant fed-batch ethanol fermentation of molasses. J. Ferment. Technol., 62, 205-210.
5. KRAUTER, M.; E. AQUARONE; S. SATO; L. PEREGO Jr. & W. BORZANI (1987). Influence of linearly decreasing feeding rates on fed-batch ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molasses. Biotechnol. Letters, 9, 647-650.
6. SILMAN, R.W. (1984). Ethanol production by Zymomonas mobilis in fed-batch fermentations. Biotechnol. Bioeng., 26, 247-251.

ANEXO 7

Biotechnology Letters Vol 12 No 10 777-782 (1990)
Received as revised 7th August

INFLUENCE OF EXPONENTIALLY DECREASING FEEDING RATES ON FED-BATCH ETHANOL FERMENTATION OF SUGAR CANE BLACKSTRAP MOLASSES

J.C.M. de Carvalho(a), E. Aquarone^{*}(a), S. Sato(a), M.L. Brazzach(a) ,
 K.A. Almeida(a), and W. Borzani(b)

(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. University of São Paulo, C.P.
 30.786 São Paulo, SP Brazil.

(b) Centro de Desenvolvimento Biotecnológico de Santa Catarina (Biotech-
 nological Development Center of Santa Catarina) R. Princesa Isabel 114,
 89200, Joinville, SC, Brazil.

SUMMARY. The ethanol yield was not affected and the ethanol productivity was increased when exponentially decreasing feeding rates were used instead of constant feeding rates in fed batch ethanol fermentations. The influences of the initial sugar feeding rate on the ethanol productivity, on the constant ethanol production rate during the feeding phase and on the initial ethanol production specific rate are represented by Monod-like equations.

INTRODUCTION

Few papers have described fed-batch ethanol fermentation using non-constant feeding rates during the reactor filling phase (Aquarone et al., 1986; Krauter et al., 1987; Vasconcelos and Valdman, 1988). Several experiments indicated that linearly decreasing feeding rates improved the ethanol productivity (Aquarone et al., 1986; Krauter et al., 1987), while other tests led to the conclusion that decreasing feeding rates improved the ethanol productivity only during the filling phase (Vasconcelos and Valdman, 1988). The main purpose of the present paper is to study the kinetics of ethanol production when exponentially decreasing feeding rates were used in fed-batch ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molasses.

MATERIALS AND METHODS

The inocula were prepared by suspending 550 g of pressed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in distilled water (total volume = 3 L). The volume of the inoculum was sufficient to assure homogenization of the cells suspension by means of a 6-flat blade turbine (diameter = 7.5 cm). The yeast concentration (dry matter) of the inoculum was 52 g.L^{-1} ($s = 2 \text{ g.L}^{-1}$). The mash, prepared by diluting blackstrap molasses in distilled water, was clarified (Borzani et al., 1977) but not sterilized. Penicillin V acid (0.3 mg.L^{-1}) was added to prevent contamination (Aquirone, 1960). Urea (0.5 g.L^{-1}) was also added and the mash was adjusted at 4.5-5.0. The TRS concentration of the clarified mash was 221 g.L^{-1} ($s = 12 \text{ g.L}^{-1}$). The fermentation tests were carried out in 14-L New Brunswick fermentors at 32°C ; the impeller speed was 200 min^{-1} and no air was supplied. The medium pH was not controlled since it practically did not vary during the tests. After the addition of the inoculum to the empty fermentor, the impeller speed and the temperature were adjusted and the mash was fed into the reactor at known feeding rates (see Table 1) from the initial volume of 3 L up to a total volume of 10 L. Five experiments were carried out for each feeding rate. The volume of cells in the fermentor was evaluated by centrifugation ($1,440 \times g$; 15 min) of a 12 mL sample (Malette, 1969). Sugars and ethanol concentrations were measured in the supernatant liquid by the Somogyi (1952) and by the dichromate (Joslyn, 1970) methods, respectively. Dry matter cell concentrations were measured by filtering a 5.0 mL sample through a Millipore membrane (pore diameter = $1.2 \mu\text{m}$); after washing with 50 mL of distilled water, the material was dried ($105 - 110^{\circ}\text{C}$; 2-3 h). The fermentation was considered finished when the ethanol concentration became constant.

RESULTS AND DISCUSSION

Feeding rates were tested at the constant and the variable rates listed in Table 1. The variable rates obeyed the following equation:

$$F = F_0 \cdot e^{-K \cdot t} \quad (1)$$

The ethanol yield was practically not affected by the experimental conditions; the following average values were obtained: a) constant feeding rates tests, $\eta = 76\%$ ($s = 4\%$); b) decreasing feeding rates tests, $\eta = 76\%$ ($s = 4\%$). Linear correlations were observed between the total ethanol content of the mash (M_E) and the filling-up time t during

Table 1. Feeding rates used in the fermentation tests.
(total volume of inocula = 3 L)

T (h)	F(L.h ⁻¹)		
	Constant (K = 0)	Decreasing	
		F ₀ (L.h ⁻¹)	K(h ⁻¹)
5	1.40	2.21	0.20
		3.24	0.40
		4.42	0.60
		5.70	0.80
7	1.00	1.86	0.20
		2.98	0.40
		4.26	0.60

the reactor filling phase (see Fig. 1). It was then possible to calculate the constant ethanol production rate (R) during the filling phase. The constancy of the R values was discussed elsewhere (Borzani, 1987). Table 2 shows the average results obtained in our experiments.

Table 2. Average results (and respective standard deviations) obtained in the fermentation tests.

T (h)	K (h ⁻¹)	10 ⁻³ .F ₀ .S ₀ (g.h ⁻¹)	T' (h)	P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	R (g.h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
5	0	0.31±0.02	7.0	8.5±0.4	93±4	0.57±0.05
	0.20	0.48±0.02	6.8	8.6±0.3	91±3	0.59±0.01
	0.40	0.72±0.04	6.5	9.1±0.4	96±5	0.61±0.01
	0.60	0.96±0.05	6.1	9.7±0.4	99±3	0.61±0.02
	0.80	1.20±0.01	6.3	9.3±0.6	93±2	0.61±0.03
7	0	0.23±0.01	7.9	7.8±0.2	79±4	0.51±0.02
	0.20	0.42±0.03	7.4	8.3±0.5	87±4	0.55±0.01
	0.40	0.66±0.05	7.0	8.7±0.3	93±5	0.59±0.01
	0.60	0.96±0.05	7.0	8.8±0.2	103±3	0.65±0.01

The influences of F₀.S₀ on P, R and μ are represented in Figure 2. The following Monod-like equations, similar to those proposed in

Fig. 1 - Results obtained under the following conditions: $S_0 = 212.2 \text{ g.L}^{-1}$; $X_0 = 49.4 \text{ g.L}^{-1}$; $F_0 = 5.70 \text{ L.h}^{-1}$; $K = 0.80 \text{ h}^{-1}$.

Fig. 2 - Influence of the initial rate of sugar addition to the reactor ($F_0 \cdot S_0$) on the constant rate of ethanol production during the feeding phase (R), on the ethanol productivity (P), and on the initial specific rate of ethanol production (μ).

a previous paper (Borzani, 1987), were obtained:

$$P = 9.6(F_0.S_0) / (54 + F_0.S_0) \quad (2)$$

$$R = 104(F_0.S_0) / (63 + F_0.S_0) \quad (3)$$

$$\mu = 0.66(F_0.S_0) / (63 + F_0.S_0) \quad (4)$$

The value of F_0 may be calculated from equation (1):

$$F_0 = K(V_f - V_0) / (1 - e^{-K.T}) \quad (5)$$

Remembering that in our tests $V_f - V_0 = 7$ L and $S_0 = 221$ g.L⁻¹, equations (2-4) and (5) permit to write:

$$P = 9.6K / [0.0349(1 - e^{-K.T}) + K] \quad (6)$$

$$R = 104K / [0.0407(1 - e^{-K.T}) + K] \quad (7)$$

$$\mu = 0.66K / [0.0407(1 - e^{-K.T}) + K] \quad (8)$$

The average differences between the values of P , R and μ evaluated by the above equations and the correspondent experimental values (calculated as per cent of the experimental values) are 2% for P , 3% for R , and 2% for μ .

The results presented in this paper show that while the linearly decreasing feeding rate increased the ethanol productivity up to about 10% (Krauter et al., 1987), the exponentially decreasing feeding rate led to an increase of the productivity of 14% ($T = 5$ h; $K = 0.60$ h⁻¹).

NOMENCLATURE

F : reactor feeding rate (L.h⁻¹).

F_0 : initial reactor feeding rate (L.h⁻¹).

K : time constant; see equation (1) (h⁻¹).

M_E : mass of ethanol in the fermentor (g).

M_S : mass of TRS in the fermentor (g).

M_x : mass of yeast cells (dry matter) in the fermentor (g).

P : ethanol productivity (g.L⁻¹.h⁻¹).

R : ethanol constant production rate during the feeding phase (g.h⁻¹).

s : standard deviation.

S_0 : TRS concentration in the feeding mash (g.L⁻¹).

t : time (h).

T : fermentor filling-up-time (h).

T' : time necessary to complete the fermentation (h).

TRS: total reducing sugars calculated as glucose (g.L^{-1}).

V_0 : volume of the inoculum (L).

V_f : final volume of medium in the fermentor (L).

X_0 : yeast concentration of the inoculum (dry matter) (g.L^{-1}).

η : ethanol yield (% of the theoretical value).

μ : initial specific rate of ethanol production (h^{-1}).

REFERENCES

- Aquarone, E. (1960) Appl. Microbiol., 8, 263-268.
- Aquarone, E.; Sato, S. and Borzani, W. (1986). Arq. Biol. Tecnol., 29, 327-335.
- Borzani, W. (1987). Biotechnol. Bioeng., 29, 844-849.
- Borzani, W.; Gregori, R.E. and Vairo, M.L.R. (1977). Biotechnol. Bioeng., 19, 1363-1374.
- Joslyn, M.A. (1970). Methods in Food Analysis, 2nd Ed., p.457, New York, Academic Press.
- Krauter, M.; Aquarone, E.; Sato, S.; Perego Jr, L. and Borzani, W. (1987). Biotechnol. Letters, 9, 647-650.
- Mallette, M.F. (1969). Evaluation of Growth by Physical and Chemical Means. In: Methods in Microbiology, J.R. Norris and D.W. Ribbons, eds., vol. 1, p.542, London, Academic Press.
- Somogyi, M. (1952). J. Biol. Chem., 195, 19-23.
- Vasconcelos, J.N. and Valdman, B. (1988). Brasil Açuc., 106, 38-48.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the assistance of O.H.R. Rende, D.A. Moraes and N.M. Bloisi. This work was supported, in part, by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brazil.

PHOSPHATE MEDIATION OF THE AEROBIC
FERMENTATION IN BAKER'S YEAST

Takahira Ogawa, Takafumi Inoue, Sunao Sato, Masahiko Shimoda
and Shuichi Aiba*

Department of Fermentation Technology,
Faculty of Engineering, Osaka Univ.,
Yamada-kami, Suita-shi, Osaka, Japan

Summary If the supply of phosphate were restricted in a glucose-limited chemostat culture of baker's yeast to an extent that residual phosphate in the medium could hardly be observed, the value of critical dilution rate was apparently enhanced. This observation suggests a possible mediation by phosphate between anaerobic and aerobic functions of the baker's yeast.

Introduction

A marked susceptibility of the respiration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) to glucose has been studied by many workers (Beck and von Meyenburg, 1968; von Meyenburg, 1969; Fiechter, 1975). It is evident from these studies that "aerobic fermentation" emerges from a glucose-limited chemostat culture when residual concentration of glucose in the medium exceeds a critical value of, for instance, about 50 mg/l. The value of critical dilution rate, beyond which the aerobic fermentation is observed, also depends on glucose concentration in a fresh medium (Fiechter, 1975). Though the factors that are responsible for the dual functioning ... anaerobic and aerobic ... of the yeast cells have not necessarily been clarified, the fed-batch culture to minimize the adverse effect of glucose has been put into practice of the industrial production of baker's yeast cells.

Despite the importance of phosphate metabolism by microorganisms, it is difficult to find out the data on a phosphate-limited chemostat culture of baker's yeast except for one publication (Markham and Byrne, 1969). According to the reference, the picture is in sharp contrast to that for glucose ; i.e. the wash-out is fairly low, aerobic fermentation predominating over the respiration almost throughout.

The two contrasting pictures in glucose- and phosphate-limited chemostat cultures have stimulated our interest in studying the region for the transfer of the growth-limiting substrate from phosphate to glucose. Indeed, the significant role of phosphate metabolism by the yeast cells need not be elaborated. The results reported here indicate a possibility of enhancing further the productivity of baker's yeast cells by phosphate.

Materials and Methods

Strain : The strain used throughout was baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), strain No. 18 solicited from Oriental Yeast Co., Tokyo.

Culture procedures : Cells were grown at 30 °C in a synthetic medium : Glucose 2 ~ 15 g ; KH_2PO_4 0.0375 ~ 2.25 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06 g ; K_2SO_4 0.4 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mg ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mg ; biotin 0.1 mg ; Ca-pantothenate 1.5 mg ; inositol 60 mg ; thiamine hydrochloride 14 mg ; pyridoxine hydrochloride 3.0 mg ; deionized water 1,000 ml. Glucose-vitamin and mineral salts solutions were sterilized separately at 120 °C for 25 min and mixed afterwards. The medium was also used for the preculture. Mini-jar fermentors (nominal volume = 2.5 l and working volume = 1.0 l) (Tokyo-Rika Co., Model M-100 and/or Marubishi Co., Model MO-250, Tokyo) were used, pH being adjusted at 5.0 by 2 N sodium hydroxide. Antifoam (Antifoam-AF-Emulsion, Nakarai Chem. Co., Kyoto) was added every 8 min by a timer. The air flow rate and agitation with an impeller were 2.0 vvm and 600 rpm. An effluent from the chemostat culture was collected (about 5 ml) at 0 °C, followed by centrifugation ($11,000 \times g$, 1 min) at 4 °C to secure the supernatant liquid. The liquid was subjected to the following analyses of glucose, ethanol and phosphate.

Analytical methods

Cell mass : Cell concentration (X) was monitored by an optical density at 660 nm (Hitachi Ltd., Model 100-20, Tokyo) until the steady state was realized and then, dry cell mass was measured by filtering the broth through a membrane filter (pore size = 1.2 μm , Millipore Corp., Bedford, Mass.), followed by drying at 95 °C overnight.

Glucose : Initial and residual glucose concentrations (S_0 and S , respectively) were measured by the Glucostat reagent (Worthington Biochemical Co., Freehold, New Jersey).

Ethanol : Ethanol concentration (E) was measured enzymatically, using alcohol dehydrogenase (Bernt and Gutmann, 1974).

Phosphate : Initial and residual phosphate concentrations in a medium

(P_0 and P , respectively) were measured by the method of Fiske and SubbaRow (Fiske and SubbaRow, 1929) and/or the mixed-reagents method (EPA, 1971). Intracellular phosphorus compounds were fractionated by the method of Schmidt and Thannhauser (1945).

Results and Discussion

The aerobic fermentation occurred apparently when the dilution rate exceeded nearly 0.25 hr^{-1} in a glucose-limited chemostat culture ($S_0 = 55.6 \text{ mM}$, $P_0 = 11.0 \text{ mM}$; see Fig. 2 C later). Here, keeping the dilution rate around 0.32 hr^{-1} unchanged, phosphate concentration (P_0) in a fresh medium was changed from 1.17 mM to 11.0 mM .

Figure 1 shows the effect of phosphate concentration on the yeast energy-metabolism. It is noted that the residual phosphate could not be detected when P_0 ranged from 1.17 mM to 3.0 mM (apparently, this culture was designated as phosphate-limiting and P-culture). However, the aerobic fermentation decreased with an increase of P_0 , and at $P_0 = 3 \text{ mM}$, the aerobic fermentation was virtually suspended (G-P culture). The residual

Fig. 1. Effect of phosphate concentration in a fresh medium on the yeast energy-metabolism.

$$S_0 = 55.6 \text{ mM}, P_0 = 1.17 \sim 11.0 \text{ mM}, \text{ and } D = 0.32 \text{ hr}^{-1}$$

phosphate in the medium was also scarcely detected in G-P culture. When P_0 exceeded a level of about 3 mM, the aerobic fermentation became appreciable again as could be seen from the figure (G-culture).

In fact, the residual glucose concentration in G-P culture tended to be less than that in G-culture, albeit the exact determination of the difference was hardly possible because of the experimental errors, inherent mostly in the sampling procedure (loc. cit.). This implies that G-P culture is imposed by a phosphate constraint in addition to the glucose-limiting. Keeping the ratio $P_0/S_0 = 0.051$ unchanged that was assessed experimentally from the data in Fig. 1, the absolute values of P_0 and S_0 were changed as shown in the tables inset (see dual circles for G-P culture) in Figure 2. It is interesting to note from Fig. 2 that the critical dilution rate decreased with an increase of S_0 without respect to G- (open circle) and G-P (dual circle) cultures. It is also interesting to see that the critical dilution rate in G-P culture extended beyond that in G-culture particularly when $S_0 = 33.4 \sim 83.4$ mM were concerned (see Fig. 2 B to D).

Fig. 2. Cell concentration (steady state) vs. D for G- and G-P cultures.
Open circle : G-culture
Dual circle : G-P culture

The reason to account for the existence of a specific phosphate concentration to minimize the aerobic fermentation was worthwhile studying. Firstly, we measured intracellular phosphate concentrations in terms of phosphorus. Figure 3 is a histogram of intracellular phosphorus compounds with P-, G- and G-P cultures. No difference in intracellular phosphorus compounds was seen between G-P and G-cultures, though each fraction of P-culture clearly decreased. Accordingly, the aerobic fermentation might not have been prevented because of the factor(s) associated with intracellular phosphate pools. Although Lynen (1941) and Johnson (1941) postulated independently the intracellular orthophosphate as an agent to control the rate of glycolysis, and recently, Baelos *et al.* (1977) claimed the activation of phosphofructokinase by orthophosphate in *S. cerevisiae*, the specific phenomenon could not be accounted for by the intracellular phosphate level.

Fig. 3. Histogram of intracellular phosphorus compounds with P-, G- and G-P cultures.

$P_0 = 0.59, 11.0$ and 2.88 mM for P-, G- and G-P cultures, respectively, while $S_0 = 55.6$ mM throughout.

Although ample room is left open for further experimental as well as theoretical considerations on the mechanism of the above-mentioned existence of the specific phosphate concentration in G-P culture, it must be remembered that the yeast cells of G-P culture are obviously subjected to a stress, compared to G-culture, by an increase in concentration gradient of phosphate across the cell membrane, because no phosphate was detectable in G-P culture, while residual phosphate in the medium was appreciable in G-culture (see Fig. 1). This particular environment might have altered the membrane structure *per se* to affect the transport of phosphate and glucose as well. Herein lies a possibility that residual concentration of glucose decreased eventually in G-P culture could have extended the critical dilution rate.

References

- Banuelos, M., Gancedo, C. and Gancedo, J.M. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 6394 - 6398.
- Beck, C. and von Meyenburg, H.K. (1968). *J. Bacteriol.* 96, 479 - 486.
- Bernt, E. and Gutmann, I. (1974). In: *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, ed. vol.3, pp. 1499 - 1502. New York and London : Academic Press.
- Environmental Protection Agency (1971). In: *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*, pp. 235 - 245. Ohio.
- Flechter, A. (1975). In: *Methods in Cell Biology*, D.M. Prescott, ed. vol. 11, pp. 97 - 130. New York and London : Academic Press.
- Fiske, C.H. and SubbaRow, Y. (1929). *J. Biol. Chem.* 81, 629 - 679.
- Johnson, M.J. (1941). *Science* 94, 200 - 202.
- Lynen, F. (1941). *Justus Liebigs Ann. Chem.* 546, 120 - 141.
- Markham, E. and Byrne, W. (1969). In: *Continuous Cultivation of Micro-organisms*. Proceedings of the 4th International Symposium on the Continuous Culture of Micro-organisms. I. Malek, K. Beran, Z. Fenc1, V. Munk, J. Ricica, H. Smrckova eds. pp. 117 - 128. Prague : Academia.
- Schmidt, G. and Thannhauser, J. (1945). *J. Biol. Chem.* 161, 83 - 89.
- von Meyenburg, H.K. (1969). *Arch. Mikrobiol.* 66, 289 - 303.

ANEXO 9

Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo
20(2):184-190, jul./dez., 1984

**FOSFATO NA FERMENTAÇÃO CONTÍNUA DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO.
I - EFEITO DO FOSFATO NA VAZÃO ESPECÍFICA DE ALIMENTAÇÃO, EM
MULTIPLICAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae***

SUNAO SATO*; SHUICHI AIBA**; EUGÊNIO AQUARONE*

*FBT - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Caixa Postal 30.786 - São Paulo - SP - Brasil.

**Faculdade de Engenharia da Universidade de Osaka - Yamada Kami, Suita-Shi, Osaka, Japão.

Estudou-se a influência do fosfato na multiplicação de Saccharomyces cerevisiae em processo contínuo de fermentação. Determinou-se a massa seca, a concentração dos substratos (glicose, fosfato) e a concentração de etanol formado em diversas vazões específicas de alimentação. Controlando-se a quantidade de fosfato no meio de alimentação, em cultivo contínuo em condições de glicose limitante, o valor da vazão específica de alimentação era aumentado de $0,23 \text{ h}^{-1}$ para $0,32 \text{ h}^{-1}$.

UNITERMOS: Fosfato. Fermentação contínua. Levedura. Vazão específica de alimentação.

1 INTRODUÇÃO

O estudo da fermentação contínua com leveduras alimentícias foi iniciado há cerca de 6 décadas. Entretanto, o processo contínuo tem sido usado principalmente para estudos de comportamentos fisiológicos de microrganismos, decorrentes de perturbações externas.

Esses estudos têm-se resumido principalmente à escala laboratorial, com pequena aplicação industrial, exceto na produção de cervejas, devido à falta de conhecimentos sobre os aspectos dinâmicos do comportamento de microrganismos.

Muitos trabalhos tem sido publicados^{1,5,8} mostrando a acentuada sensibilidade da respiração de leveduras de panificação à glicose. Quando a concentração de glicose residual no meio excede a concentração crítica, por exemplo, 50 mg/L e 70 mg/L^{5,9}, ocorre a "fermentação aeróbica", isto é, o aparecimento de etanol no

SATO, S., AIHA, S., AQL'ARONI, E. - Fosfato na fermentação contínua de levedura de panificação. I Efeito do fosfato na vazão específica de alimentação, em multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 20(2):184-190, jul/dez., 1984.

meio de fermentação, cuja presença interfere no rendimento da produção de massa celular.

A indústria de panificação, pelo processo descontínuo alimentado, procura minimizar o efeito adverso da glicose.

Apesar da grande importância do fosfato no metabolismo de microrganismos, poucas são as publicações sobre o cultivo contínuo de levedura de panificação em condição de fosfato limitante^{3,7}.

Neste trabalho estudou-se a possibilidade de favorecer a produção de células de levedura de panificação pelo fosfato.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Microrganismos - O microrganismo usado foi *Saccharomyces cerevisiae*, raça nº 18, biotipo 236, obtido da Orient Yeast Corporation Ltd. Japão¹⁰.

Manutenção da cultura - O microrganismo era conservado em meio sólido simples constituído de polipeptona 1%, glicose 1%, extrato de levedura 1% e agar 2% e mantido em refrigerador a 4°C. Era repicado mensalmente.

Preparo do inóculo e cultivo - O microrganismo era multiplicado a 30°C no meio sintético constituído de: glicose 10,0g; KH_2PO_4 0,075-1,5g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,0g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06g; K_2SO_4 0,4g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,0 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,0mg; biotina 0,1 mg; pantotenato de cálcio 1,5mg; inositol 60mg; tiamina 14mg; piridoxina 3,0mg e H_2O desionizada q.s.p. 1.000 ml. A glicose e vitaminas eram esterilizadas separadamente dos sais a 121°C por 25 minutos e misturadas posteriormente.

Equipamentos - Usaram-se minifermentadores Marubishi LEM MD-250 e Tokyo Rikakikai Co. M-10, de 2,5 litros de capacidade e 1,0 litro de volume de operação; o pH foi ajustado a 5,0 e mantido pela adição de NaOH 2N; o anti-espumante foi Antifoam AF-Emulsion, fornecido pela Nakarai Chemical Co.; a vazão específica de ar e agitação foram de 2 vvm e 600 rpm, respectivamente. A temperatura foi mantida a 30°C $\pm$ 0,5°C.

O efluente do cultivo contínuo foi coletado a 0°C e centrifugado a 1.000 x g, durante 5 minutos, obtendo-se o sobrenadante para as análises de glicose, fosfato e etanol.

2.2 Métodos

Massa celular - A concentração celular (X) foi determinada pela leitura de absorvância em 660 nm no espectrofotômetro Hitachi Ltd., Modelo 100-20, após atingido o estado estacionário, e a massa seca por filtração em membrana Millipore

SATO, S. AIBA, S.; AQUARONE, E. - Fosfato na fermentação contínua de levedura de panificação. I Efeito do fosfato na vazão específica de alimentação, em multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 20(2):184-190, jul/dez., 1984.

(1,2 μM) de uma alíquota de 5 ml do meio de cultivo, seguida de secagem a 95°C durante uma noite.

Glicose - A concentração de glicose inicial (S_0) e residual (S) era determinada pelo método enzimático do glucostato¹³.

Etanol - A concentração de etanol (E) era medida enzimaticamente usando álcool desidrogenase^{2,11,12}.

Fosfato - A concentração inicial (P_0) e residual (P) de fosfato no meio de cultivo era medida pelo método de FISKE & SUBBAROW e/ou método de Mistura Reagente^{4,6}.

3 RESULTADOS

O microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* apresentou crescimento padrão diauxico com velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) máxima igual a 0,44 h^{-1} . Os resultados do cultivo contínuo em condição de glicose limitante estão na Tabela I, e aqueles de fosfato como substrato limitante, na Tabela III.

Os resultados da Tabela III representam os valores em estado estacionário de cultivo contínuo em condições de fosfato e glicose limitante, em que a vazão específica de alimentação (D) foi igual a 0,32 h^{-1} e com alteração da concentração de fósforo do meio de alimentação.

TABELA I - Multiplicação aeróbica de *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo contínuo em condição de glicose limitante. ($S_0 = 55,6\text{mM}$ e $P_0 = 11,0\text{mM}$)

D (h^{-1})	X (g/L)	S (mM)	P (mM)	E (mM)	P_x (g/L.h)*
0,095	4,23	0,10	8,29	0,21	0,40
0,139	4,24	0,03	7,73	0,29	0,60
0,201	4,17	0,20	8,91	0,30	0,84
0,245	3,99	0,24	8,91	7,54	0,98
0,270	3,43	0,39	9,14	29,20	0,93
0,292	3,12	0,24	18,91	18,90	0,91
0,303	1,97	0,64	13,10	36,70	0,60
0,319	1,81	0,99	10,20	53,30	0,58
0,340	2,08	0,77	10,40	54,40	0,71
0,350	1,97	0,95	19,47	54,40	0,69
0,369	1,54	1,54	10,10	55,90	0,57
0,379	1,29	2,97	10,20	55,90	0,49

* P_x - Produtividade do processo em células (g/L.h).

SATO, S.; AIBA, S.; AQUARONE, E. - Fosfato na fermentação contínua de levedura de panificação. I Efeito do fosfato na vazão específica de alimentação, em multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 20(2):184-190, jul/dez., 1984.

TABELA II - Multiplicação aeróbica de *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo contínuo em condição de fosfato limitante. ($S_0 = 55,6\text{mM}$ e $P_0 = 0,55\text{mM}$)

D (h ⁻¹)	X (g/L)	S (mM)	P (mM)	E (mM)	P _x (g/L.h)*
0,055	4,05	0,46	0,00	0,47	0,22
0,094	3,64	0,68	0,00	11,00	0,34
0,143	2,96	0,51	0,01	13,60	0,42
0,157	2,79	0,63	0,00	31,00	0,44
0,205	2,06	0,91	0,00	45,80	0,42
0,235	1,78	0,98	0,01	47,30	0,32
0,269	1,37	2,38	0,01	59,80	0,37
0,294	1,39	3,65	0,01	60,70	0,41

TABELA III - Multiplicação aeróbica de *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo contínuo com vazão específica de alimentação igual a 0,32 h⁻¹.

D (h ⁻¹)	X (g/L)	S (mM)	P ₀ (mM)	P (mM)	E (mM)	P _x (g/L.h)*
0,32	1,04	3,83	1,17	0,01	63,10	0,34
0,32	3,37	0,32	2,21	0,01	16,10	1,08
0,32	4,33	0,12	2,87	0,00	0,26	1,39
0,32	4,28	0,10	3,46	0,25	0,18	1,38
0,32	3,15	0,24	4,16	1,63	22,10	1,02
0,32	1,22	2,26	4,54	3,57	45,00	0,39
0,32	1,81	0,99	10,70	10,20	53,30	0,58

*P_x - Produtividade do processo em células (g/L.h).

Na Tabela IV estão os valores de cultivo contínuo em condição de glicose e glicose-fosfato limitante, em que a concentração inicial de fosfato é em torno de 3,0 mM e com variação da vazão específica de alimentação.

SATO, S. AIBA, S. AQUARONI, E. - Fósforo na fermentação contínua de levedura de panificação. I Efeito do fósforo na vazão específica de alimentação, em multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 20(2):184-190, jul/dez., 1984.

TABELA IV - Cultivo contínuo em condição de glicose-fósforo limitante, mantendo a concentração de fósforo inicial em torno de 3,0 mM, com variação da vazão específica de alimentação.

D (h ⁻¹)	X (g/L)	P _x (g/L.h)
0,291	4,18	1,22
0,300	4,29	1,29
0,331	4,07	1,35
0,340	4,01	1,36
0,353	2,84	0,94
0,366	1,72	0,56

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A "fermentação aeróbica" ocorreu quando a vazão específica de alimentação excedeu de 0,24 h⁻¹ em cultivo contínuo em condições de glicose limitante ($S_0 = 55,6\text{mM}$ e $P_0 = 11,0\text{mM}$).

A "fermentação aeróbica" foi mais acentuada em cultivo contínuo em condição de fósforo limitante, ocorrendo em vazão específica de alimentação igual a 0,055 h⁻¹ ($S_0 = 55,6\text{mM}$ e $P_0 = 0,55\text{mM}$).

Mantendo a vazão específica de alimentação em torno de 0,32 h⁻¹ procurou-se variar a concentração de fósforo no meio de alimentação de 1,17mM a 10,7mM.

Nas concentrações de 1,17 a 2,87mM de fósforo no meio de alimentação, não foi possível detectar o mesmo no efluente. Entretanto, a "fermentação aeróbica" diminuiu com o aumento da concentração de fósforo inicial (P_0). Na concentração de P_0 em torno de 3,0mM a "fermentação aeróbica" foi virtualmente suspensa e o fósforo residual no meio foi mal detectado.

Quando o P_0 excedeu o nível de 3,0mM, a "fermentação aeróbica" tornou-se novamente apreciável. A concentração de glicose residual tornou-se menor do que em cultivo contínuo em glicose limitante. Isto implica que a condição de glicose-fósforo limitante é imposta por uma repressão do fósforo em adição de glicose limitante.

Em cultivo contínuo, mantendo-se a concentração de fósforo inicial em torno de 3,0mM e com variação da vazão de alimentação, verificou-se que a mesma foi estendida até 0,32h⁻¹, com bloqueio da "fermentação aeróbica".

A causa pela qual esta vazão específica de alimentação foi ampliada pelo controle da concentração de fósforo e com a minimização da "fermentação aeróbica" merece ser ainda exaustivamente estudada.

SATO, S. AIBA, S.; AQUARONE, E. - Fostato na fermentação contínua de levedura de panificação. I Efeito do fosfato na vazão específica de alimentação, em multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 20(2):184-190, jul/dez., 1984.

Considerando o aspecto da produtividade em diversas condições, verificou-se que houve aumento de produtividade (P_x) de 0,98 g/L.h para 1,39 g/L.h, que corresponde ao aumento de 41,8%.

SUMMARY

PHOSPHATE EFFECT IN THE DILUTION RATE ON THE *Saccharomyces cerevisiae* MULTIPLICATION

The influence of phosphate in a continuous culture on the Saccharomyces cerevisiae multiplication was studied. Dry matter, substrate concentration (glucose-phosphate) and ethanol concentration were measured in dependence on the dilution rate. By phosphate control in the medium, in continuous culture glucose-limited of baker's yeast, the value of critical dilution rate was enhanced from $0,23\ h^{-1}$ to $0,32\ h^{-1}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECK, C. & MEYENBURG, H.K. von - Enzyme pattern and aerobic growth of Saccharomyces under various degrees of glucose limitation. J. Bact., Baltimore, 96(2): 479-86, 1968.
2. BERNT, E. & GUTMANN, I. In: BERGMEYER, H.U. & GAWEHN, K., eds. - Methods of enzymatic analysis. 2 ed. New York, Academic Press, 1979. p.1499-1502.
3. DORRER, E. & TEUBER, M. - Induction of polymyxin resistance in Pseudomonas fluorescens by phosphate limitation. Arch. Mikrobiol., Berlin, 114:87-9, 1977.
4. Environmental Protection Agency (Estados Unidos) - Methods for chemical analysis of water and wastes. Ohio, 1971. p.235-45.
5. FIECHTER, A. - Continuous culture of yeasts. IV. Cultivation of glucose-sensitive yeast types. Meth. Cell. Biol., New York, 11:119-25, 1975.
6. FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. - Phosphocreatine. J. biol. Chem., Baltimore, 81: 629-79, 1929.
7. MARKHAM, E. & BYRNE, W.J. - The formation of polyphosphate during yeast growth. Proc., 4th. Int. Symp. on the continuous culture of microorganisms. Prague, Academic Press, 17-21, 1968.
8. MEYENBURG, H.K. von - Energetics of the budding cycle of Saccharomyces cerevisiae during glucose limited aerobic growth. Arch. Mikrobiol., Berlin, 66:289-303, 1969.

SATO, S. AIBA, S.; AQUARONE, E. - Fostato na fermentação contínua de levedura de panificação. I Efeito do fosfato na vazão específica de alimentação, em multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 20(2):184-190, jul/dez., 1984.

9. MOSS, F.J.; RICKARD, A.D.; BUSH, F.E. - The response by microorganisms to steady-state growth in controlled concentration of oxygen and glucose. II. *Saccharomyces carlsbergensis*. Biotechnol. Bioeng., New York, 13:63-75, 1971.
10. OHASHI, M. - Oriental yeast Co. Ltd. Tokyo, Japan. - Comunicação pessoal (1977).
11. SIGMA CHEMICAL COMPANY, (Estados Unidos) - Alcohol dehydrogenase. St. Louis, s.d. (Folheto).
12. SIGMA CHEMICAL COMPANY, (Estados Unidos) - β -Nicotinamide adenine dinucleotide. St. Louis, s.d. (Folheto).
13. WORTHINGTON BIOCHEMICAL COMPANY, Osaka. (New Glucostat). s.n.t. (Folheto em Japonês/Inglês).

Recebido para publicação em 29/08/84.

Rev. Microbiol., São Paulo, 23(1): 32-36, 1992

EMPREGO DE ALGUMAS FONTES NITROGENADAS NA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *OSCILLATORIA LIMNETICA*

Bluma Linkowski Faintuch¹
Sunao Sato
Eugenio Aquarone

RESUMO

Foi realizado um estudo do rendimento de biomassa e de proteínas totais da cianobactéria *Oscillatoria limnetica* em meios sintéticos com diferentes fontes de nitrogênio. Utilizaram-se nitrato de potássio, uréia e cloreto de amônio, em cinco diversas concentrações cada um. A melhor produção de biomassa da *O. limnetica* foi conseguida em meios contendo nitrato de potássio a 2,57 g/L, porém com uma oferta de 1,0g/L, obtiveram-se resultados bastante favoráveis, assim como com a uréia e o cloreto de amônio em baixas concentrações. As concentrações proteicas determinadas ficaram na faixa de 30,3 - 82,7%. Conclui-se que os valores satisfatórios de biomassa e proteína podem ser obtidos com concentrações econômicas de nitrato no meio de cultura, ou empregando-se baixas concentrações de uréia e amônio, a um custo ainda mais reduzido.

Palavras-chave: *Oscillatoria limnetica*; biomassa, cianobactéria.

INTRODUÇÃO

As cianobactérias representam uma das fontes alternativas de proteínas e sua utilização como complemento alimentar já foi ensaiada em condições experimentais e industriais.

A maior experiência disponível relaciona-se à *Spirulina maxima*, mas muitas investigações foram realizadas também com espécies do gênero *Oscillatoria* (5, 9, 10)

O gênero *Oscillatoria* ainda não é aproveitado em termos de suprimento alimentar, mesmo sabendo-se que contém alto teor proteico, em parte por apresentar teores de DNA/RNA extremamente elevados. Este gênero não possui um sabor atraente e algumas espécies, como a *Oscillatoria brevis* (4) excretam compostos de odor desagradável como a geosmina.

As "Oscillatorias" são cianobactérias formadas apenas de células vegetativas que possui tricomas livres, solitários, pluricelulares, retilíneos ou com inflexões.

As necessidades nutritivas e a tolerância ao oxigênio permitem às cianobactérias desenvolverem-se nas camadas ricas de O₂ dos ambientes aquáticos, próximos à interface ar-água. Porém algumas cianobactérias crescem junto com as bactérias vermelhas e verdes em ambientes aquáticos ricos em H₂S. É o caso da *O. limnetica* que exhibe tanto fotossíntese oxigênica quanto anoxigênica.

Uma das principais dificuldades para a ampla utilização dessas fontes de biomassa diz respeito aos custos de produção elevados, devidos em parte à necessidade de consumo de fontes nitrogenadas dispendiosas.

Neste trabalho, definiram-se fontes experimen-

1. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Caixa Postal 66355 - São Paulo, SP - Brasil.

tais de nitrogênio visando a diminuição de custos de produção, e o estabelecimento de novas opções para a produção de biomassa a partir da *O. limnetica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudou-se uma cepa de *O. limnetica* proveniente do "Centro di Studio dei Microorganismi Autotrofi" da Universidade de Florença, Itália.

A cepa foi ativada por repicagem em tubos contendo o meio de cultivo (6) em ágar, mantidos por uma semana em estufas a 30°C e 3 Klux de intensidade luminosa e, em seguida, conservados a temperatura ambiente e luz do dia.

TABELA 1 – Composição do meio de cultura utilizado

	g/L	Solução de microelementos	mg/L
NaCl	0,92	SnCl ₂ · 2H ₂ O	304
Na ₂ SO ₄	1,88	MnCl ₂ · 4H ₂ O	173
K ₂ HPO ₄	0,50	CoCl ₂ · 6H ₂ O	194
Na ₂ CO ₃	8,89	SeCl ₂ · 2H ₂ O	146
Na ₂ HCO ₃	15,15	BaCl ₂ · 2H ₂ O	2846
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05	LiCl	293
KNO ₃	2,57	CuSO ₄ · 5H ₂ O	186
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25	NiSO ₄ · 6H ₂ O	717
		Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	121

Sol. de Fe-EDTA - 1mL
Sol. de microelementos - 1mL

A composição do meio (6) básico utilizado é mostrada na Tabela 1, com exceção da fonte nitrogenada que variou com os experimentos e são mostrados na Tabela 2.

TABELA 2 – Fontes de nitrogênio e suas concentrações

Fontes de nitrogênio	Concentrações (g/L)
KNO ₃	0,5 – 1,0 – 2,57 – 5,0 – 10,0
(NH ₄) ₂ CO	0,1 – 0,3 – 0,5 – 0,75 – 1,0
NH ₄ Cl	0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,5 – 0,8

O pH inicial do meio era 9,5± 0,2. Para crescimento em nitrato utilizava-se este pH e para meios contendo uréia ou amônio o pH era ajustado para 8,4 ± 0,2 (11) com solução de ácido clorídrico diluído 1:3. Para a obtenção da concentração celular de inóculo desejada foram usados erlenmwyers de 500mL com 40% do meio, agitados a 100rpm, 30°C e 3,5 Klux.

Para a obtenção da biomassa usaram-se erlenmeyers de 500ml com 160 ml de meio a 40 ml de inóculo. Este inóculo, preparado como descrito no parágrafo anterior, correspondia a uma massa de 50mg/L.

Os erlenmeyers eram colocados em "shakers" por 10 dias com temperatura, agitação e intensidade luminosa iguais aos usados para o crescimento dos inóculos.

Valores de pH e biomassa foram determinados diariamente.

A concentração da biomassa era medida em espectrofotômetro Procyon SC 90 em comprimento de onda 625 nm. O teor proteico total determinado no final do ensaio, foi medido pelo método de Kjeldahl (2, 3) verificando-se o teor de nitrogênio total e convertendo-o em proteína por simples multiplicação fatorial.

RESULTADOS

KNO₃ como fonte nitrogenada – Na biomassa produzida no meio KNO₃, o rendimento mais vantajoso consubstanciou-se naquele contendo 2,57 g/L, porém é conveniente assinalar que também com ofertas consideravelmente mais baixas (0,5 e 1,0 g/L), os resultados foram apenas ligeiramente afetados, com menos de 20% de diferença na biomassa.

Não houve fase lag de crescimento e em todas as concentrações a fase estacionária foi atingida no oitavo dia (Figura 1).

O pH do meio de cultura durante o ensaio praticamente não se alterou. Variou de 9,8 no início

FIGURA 1 — Concentração de biomassa da *Oscillatoria limnetica* em função do tempo, para diferentes concentrações de KNO₃ (g/L).

FIGURA 2 — Concentração de biomassa da *Oscillatoria limnetica* em função do tempo, para diferentes concentrações de Uréia (g/L).

do experimento até 10,6, para todas as concentrações de KNO₃ utilizadas.

Uréia como fonte nitrogenada – Percebe-se uma resposta muito satisfatória com baixas concentrações de uréia.

A produção de biomassa em meio com 0,3 g/L foi o dobro da obtida em meios com 0,1 g/L. Não houve fase lag de crescimento, sendo que a fase estacionária foi atingida no sexto dia do experimento, com uma excelente concentração de biomassa (Figura 2).

No meio em que a concentração de uréia foi 0,1 g/L a fase estacionária se iniciou no segundo dia, prolongando-se por mais três dias, seguidos de declínio.

A variação de pH do meio de cultura contendo diferentes concentrações de uréia no crescimento da *O. limnetica* foi de 8,8 a 10,6, denotando uma elevação progressiva desta medida.

NH₄Cl como fonte de nitrogênio – Com a utilização de NH₄Cl no meio de crescimento observou-se que, mesmo em altas concentrações deste sal, não houve despigmentação da cultura podendo-se efetuar leituras no espectrofotômetro até o final do experimento.

A *O. limnetica* teve seu melhor desempenho na concentração de 0,5 g/L, na qual chegou ao fi-

nal do ensaio sem atingir a fase estacionária. Nota-se também uma fase lag de crescimento. A segunda melhor produção de biomassa ficou com o nível de 0,3 g/L (Figura 3). O comportamento do pH já mencionado reproduziu-se nestes meios acidificados sem modificações importantes, e sem influência apreciável das concentrações de nutrientes.

Teor proteico da biomassa – O conteúdo proteico de *O. limnetica* foi maior nos meios com KNO₃ a 0,5 g/L, uréia a 0,3 g/L e NH₄Cl a 0,5 g/L (Tabela 3).

TABELA 3 – Porcentagem proteica obtida nos vários ensaios

Fonte de N	Conc. (g/l)	% de Proteínas Totais
KNO ₃	0,5	78,5
	1,0	70,2
	2,57	63,8
	5,0	46,4
	10,0	30,3
Uréia	0,1	61,8
	0,3	79,8
NH ₄ Cl	0,3	52,6
	0,5	82,7

FIGURA 3 — Concentração de biomassa da *Oscillatoria limnetica* em função do tempo, para diferentes concentrações de NH_4CL (g/L).

DISCUSSÃO

O meio de cultura utilizado no crescimento da *O. limnetica* por outros autores (5, 8) difere do nosso, embora valendo-se de nitrato de amônio como fonte principal de nitrogênio, e de constituintes minerais comparáveis aos do meio Paoletti et al. (6). Temos adotado para o crescimento da *O. limnetica* o mesmo meio recomendado para *Spirulina*, uma vez que estas cianobactérias crescem juntas em lagos naturais(9).

Após o carbono, e também deixando-se de lado o hidrogênio e o oxigênio, que podem ser obtidos da água, o nitrogênio é quantitativamente o elemento mais importante da matéria seca das células das algas.

Quando o nitrogênio é fornecido na forma oxidada de nitrato ele precisa primeiramente ser reduzido para ser incorporado em moléculas orgânicas.

Em meios contendo diferentes concentrações de KNO_3 a *O. limnetica* desenvolveu-se bem, registrando-se a sua maior produção de biomassa no meio contendo 2,57 g/L.

A segunda fonte de nitrogênio investigada, a uréia, tem um custo bastante inferior ao do nitrato, além do que cada molécula de uréia fornece dois átomos de nitrogênio enquanto cada molécula de KNO_3 apenas um.

A uréia normalmente precisa ser hidrolisada antes que seu nitrogênio possa ser incorporado às

células das algas (1).

A *O. limnetica* teve seu melhor crescimento em meio contendo a uréia a 0,3 g/L. Com valores superiores a esta concentração de uréia no meio não obtivemos boa produção de biomassa, sugerindo um fenômeno de inibição.

A terceira fonte nitrogenada utilizada foi o cloreto de amônio, que pode ser eficientemente utilizado pela maioria das algas (7).

Quando em proporções adequadas, o nitrogênio é rapidamente assimilado pela alga carente do mesmo, até quatro a cinco vezes mais rapidamente do que por células normais. Entretanto, a concentração de cloreto de amônio a 0,8 g/L foi inibitória ao crescimento do microrganismo, sendo que a melhor produção ficou com a concentração de 0,5 g/L.

Em alguns dos nossos ensaios não observamos a fase lag (indução) de crescimento, por iniciarmos o experimento com uma pequena quantidade de inóculo, sendo que os microrganismos já vinham crescendo em meio completo.

Note-se que os inóculos, que estavam sendo cultivados em meio de KNO_3 , não passaram por exaustão do nitrogênio acumulado antes de serem testados com nutrientes ou concentrações diferentes.

Todavia, não é provável que este fato tenha interferido significativamente na análise e interpretação das curvas de crescimento estudadas nesta investigação, exceto no que se refere à redução

da fase lag em algumas culturas. Conforme já demonstrado todos os dados foram aqui examinados de forma comparativa, o que tende a anular variáveis comuns a todos eles. Outrossim, diante do pequeno inóculo utilizado e da rápida velocidade de crescimento obtida na maioria das curvas, o nitrogênio armazenado na fase pré-inoculação não poderia repercutir prolongadamente sobre o comportamento do microrganismo.

Uma análise dos valores de pH revela que graças aos tampões presentes no meio de cultura, as oscilações desta variável foram sempre modestas, ao longo dos ensaios, nunca alcançado níveis superiores a 11,0 que poderiam ser tóxicos para a cultura.

A *O. limnetica* apresentou o seu maior conteúdo proteico, de valor 82,73%, em meio com cloreto de amônio a 0,5 g/L. Este valor excede um pouco as médias disponíveis na literatura, mas vem ao encontro das proporções alcançadas com outros meios, a saber o de uréia a 0,3 g/l (79,75%), e analogamente o de KNO_3 na concentração de 0,5 g/L (78,5%).

A análise dos resultados expostos permite as seguintes conclusões:

O desenvolvimento deste organismo em meios utilizando uréia, teve sucesso na presença de até 0,3 g/L e com cloreto de amônio de 0,5 g/L, observando-se intolerância a estas fontes e inibição do crescimento com proporções mais elevadas.

Em todas as etapas analisadas a produção de biomassa mostrou-se mais expressiva no meio de KNO_3 a 2,57 g/L, mas com índices geralmente favoráveis, sobretudo nos primeiros dias do ensaio, para os meios à base de nitrato de potássio com 1,0 g/L, uréia com 0,1-0,3 g/L e amônio 0,3-0,5 g/L.

Observaram-se concentrações proteicas de *O. limnetica* na faixa de 30,3 - 82,7%. Os valores mais elevados de proteína associaram-se a culturas mais concentradas neste substrato, quando da introdução de uréia e amônio.

Como decorrência das considerações anteriores, ficou demonstrada a possibilidade de cultivo da *O. limnetica* em meios contendo fontes e concentrações nitrogenadas diversificadas e bastantes econômicas, sem prejuízo do rendimento de biomassa e proteína desta cianobactéria.

SUMMARY

Use of different nitrogen sources in the production of biomass of *Oscillatoria limnetica*.

Analysis of the production of biomass and of

the total protein concentration obtained with the cyanobacteria *Oscillatoria limnetica* was undertaken, employing synthetic media and three different nitrogen sources. The selected substances were potassium nitrate, urea and ammonium chloride, in five concentration for each nutrient. The best yield of biomass corresponded to the mixture containing 2.57 g/L of KNO_3 . Nevertheless, with a reduction of salt, to 1.0 g/L, almost as good results of biomass could be observed, as well as with urea and ammonium in low proportions. Protein concentrations were distributed in the range of 30.3 - 82.7%. It is concluded that satisfactory rates of biomass and protein can be reached with economical amounts of potassium nitrate, or with low concentrations of urea and ammonium salt, at more favorable cost.

Key Words: *Oscillatoria limnetica*; biomass; cyanobacteria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allison, R.K.; Skipper, H.L.; Short, W.A.; Hogan, G.L. - Studies on the photosynthetic reaction. II. Sodium formate and urea feeding experiments with *Nostoc muscorum*. *Plant Physiol.*, 29: 154, 1954.
2. American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 14 ed. New York, APHA, AWWA, WPCF, 1975.
3. Cetesh - Normalização técnica, São Paulo, Edição particular, 1978.
4. Naes, H.; Utiklen, H.C.; Post, A.F. - Geosmin production in the cyanobacterium *Oscillatoria Brevis*. *Arch Microbiol.*, 151: 407-410, 1989.
5. Oren, A. & Padan, E. - Induction of anaerobic, photoautotrophic growth in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *J. Bacteriol.* 133:558-563, 1978.
6. Paoletti, C.; Pushparaj, B.; Tomaselli, L. - Recherche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: *Atti Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol.*, 1^a, Padova, 1975.
7. Syrett, P.J. - Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences. 1981.
8. Van Liere, L. & Mur, L.R. - Light-limited cultures of the blue-green alga *Oscillatoria agardhii*. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 21:158-167, 1978.
9. Van Rijn, J & Shilo, M. - Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp.) and its effect on macromolecular synthesis. *Appl. and Env. Microbiol.* 52:340-344, 1986.
10. Yanagimoto, M. & Saitoh, H. - Evaluation tests of a large spiral blue green alga, *Oscillatoria* sp., for biomass production. *J. Ferment Technol.* 60:305-310, 1982.
11. Zarrouk, C. - Contribution a l' Etude d'une Cyanophyce. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*. Thesis, University of Paris, France, 1966.

Recebido para publicação em 01/10/90

ANEXO 11

Arq. Biol. Tecnol. 34(1):13-30, mar., 1991

EFEITOS DOS MEIOS DE CULTURA SOBRE AS VELOCIDADES DE CRESCIMENTO
DAS CIANOBACTÉRIASINFLUENCE OF THE NUTRITIONAL SOURCES ON THE GROWTH RATE OF
CYANOBACTERIA

Bluma Linkowski Faintuch; Sunao Sato; Eugenio Aquarone

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Caixa Postal
66355 - São Paulo, SP - Brasil

Recebido para publicação em 29 de outubro de 1.990

ABSTRACT

The comparative analysis of the growth rate of three cyanobacteria, in cultures containing various nitrogen sources, aimed to define the maximum achievable growth rates, as well as the concentrations of protein precursors most advantageous for this purpose. In this study Spirulina maxima, Oscillatoria agardhii and Oscillatoria limnetica were tested in nutritive mixtures containing defined proportions of KNO_3 , urea and ammonium. The most favorable findings for growth rate of O. agardhii and S. maxima occurred in the presence of KNO_3 2.57 g/L, and for O. limnetica in the medium with urea 0.3 g/L. Absolute values obtained with O. agardhii and O. limnetica with different nitrogen sources were in the range of 0.8 and 0.7 d^{-1} respectively. In the case of Spirulina the corresponding result was 0.3 - 0.4 d^{-1} . It is concluded that all studied nitrogen sources permitted satisfactory growth rates, according with the characteristics of each microorganism.

PALAVRAS-CHAVE: Spirulina maxima, Oscillatoria agardhii, Oscillatoria limnetica, cianobactéria, velocidade de crescimento.

INTRODUÇÃO

A alta produtividade de biomassa a partir de microalgas e de cianobactérias, e particularmente sua proteína, tem encontrado aplicações como alimento humano ou ração animal.

A evidência do valor nutricional de várias cianobactérias é convincente, todavia certos problemas técnicos assim como o alto custo de produção tem criado obstáculos para o uso das mesmas como alimento básico. Não obstante, o emprego de extratos como suplemento proteico encerra apreciáveis perspectivas, face à elevada concentração deste nutriente nos microrganismos.

Estuda-se ativamente também a utilização de cianobactérias para tratamento de resíduos industriais e a sua produção para obtenção de lipídeos, complexos vitamínicos, glicerol, metano e outros produtos.

A otimização da produção de cianobactérias depende da mensuração de diferentes parâmetros relacionados com o cultivo destes microrganismos de interesse econômico. Dentre as variáveis mais importantes para o acompanhamento das condições de crescimento, destacaram-se as velocidades de crescimento e a velocidade específica de crescimento.

Em pesquisa visando a resposta de Spirulina maxima, Oscillatoria limnetica e Oscillatoria agardhii, a meios utilizando três distintas fontes nitrogenadas, em concentrações variáveis, a velocidade de crescimento e a velocidade específica foram determinadas a partir de curvas de crescimento do organismo. Testaram-se soluções à base de nitrato de potássio, uréia e cloreto de amônio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os três microrganismos, Spirulina maxima, Oscillatoria limnetica e Oscillatoria agardhii, oriundos do "Centro di Studio dei Microorganismi Autotrofi" da Universidade de Florença, foram colocados para crescer em sistemas agitados shaker (100 rpm), com iluminação constante de 3,5 Klux e temperatura de 30°C, por períodos de 10 dias.

O meio de cultura utilizado para os três microrganismos foi o de Paoletti e col. (2), variando-se as fontes nitrogenadas e suas concentrações segundo a Tabela I. A concentração inicial da massa seca utilizada foi de 50 mg/L.

TABELA I - Investigação dos substratos nitrogenados

Fontes de nitrogênio	Concentrações (g/L)
KNO_3	0,5-1,0-2,57-5,0-10,0
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0,1-0,3-0,5-0,75-1,0
NH_4Cl	0,1-0,2-0,3-0,5-0,8

O cálculo da velocidade de crescimento (dx/dt) e da velocidade específica de crescimento (μ) foi efetuado utilizando o método proposto por Le Duy & Zajic (1), que estabelece a derivada através da reta tangente ao ponto considerado, utilizando arcos de círculo passando através de três pontos (pares ordenados), sendo o par intermediário considerado para a determinação da tangente.

A curva que serve de referencial para estas derivadas é a curva de crescimento do microrganismo, determinada a partir das doses diárias.

RESULTADOS

Determinações com a Spirulina maxima

A maior velocidade de crescimento de Spirulina em meio de nitrato ocorreu na concentração de 2,57 g/L com o valor de 93,3 mg/L.dia, para uma concentração celular $X = 310$ mg/L. Este pico de velocidade foi observado entre o quinto e o oitavo dia, e também a velocidade específica aumentou até o quarto dia aproximadamente antes de diminuir. O valor da velocidade específica máxima ficou na faixa de 0,3 a 0,4 d^{-1} (Tabela II). Achados favoráveis também foram observados em meios de KNO_3 a 1,0 g/L.

Em meios com uréia, a velocidade atingiu ótimos índices na concentração de 0,1 g/L seguida de perto pelos vistos no meio com 0,3 g/L (Tabela III).

Em experimentos com sal de amônio, deixaram-se de comprovar velocidades favoráveis de crescimento mesmo com baixas concentrações do cloreto, nas fases mais tardias do ensaio. A velocidade de cresci-

TABELA II - Concentração celular (X) (mg/L), velocidade de crescimento (dx/dt) (mg/L.d) e velocidade específica de crescimento (μ) (d^{-1}) de S. maxima, em função do tempo (t), para diferentes concentrações de KNO₃ (g/L)

t	0,5	1,0	2,57	5,0	10,0					
(d)	X	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ			
0	38	40	45	40	40					
1	42	52	14,4	0,3	52	8,4	0,2	45	6,0	0,1
2	55	77	28,2	0,4	74	24,0	0,3	62	20,1	0,3
3	81	111	37,7	0,3	101	32,4	0,3	91	34,5	0,3
4	123	155	48,8	0,3	155	59,4	0,4	143	56,1	0,2
5	171	212	59,3	0,3	223	75,2	0,3	205	65,5	0,2
6	233	274	66,3	0,2	310	93,3	0,3	275	74,0	0,2
7	300	346	63,5	0,2	412	87,6	0,2	354	64,5	0,2
8	344	404	54,0	0,1	491	74,6	0,1	411	29,0	0,1
9	377	455	39,2	-	562	50,5	-	435	9,6	0,1
10	385	489	-	-	605	-	-	443	-	-

(-) valores nulos ou negativos

TABEIA III - Concentração celular (X) (mg/L) , velocidade de crescimento (dx/dt) (mg/L.ñ) e velocidade específica de crescimento (μ) (d^{-1}) de S. maxima, em função do tempo (t) para diferentes concentrações de uréia (g/L)

t	0,1			0,3			0,5			0,75			1,0		
(d)	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ
0	40			40			40			40			40		
1	65	29,9	0,5	52	14,5	0,3	65	30,2	0,5	62	26,2	0,4	63	27,1	0,4
2	112	51,1	0,5	85	37,2	0,4	123	49,9	0,4	103	43,6	0,4	102	42,9	0,4
3	169	65,3	0,4	130	49,6	0,4	168	42,8	0,2	150	33,0	0,2	151	32,1	0,2
4	252	85,8	0,3	187	64,1	0,3	209	-	-	178	25,7	0,1	178	-	-
5	341	85,8	0,3	264	81,0	0,3	209	-	-	202	-	-	178	-	-
6	424	41,0	0,1	350	38,6	0,1	190	-	-	202	-	-	140	-	-
7	458	14,4	-	382	3,3	-	151	-	-	170	-	-	103	-	-
8	470	2,3	-	385	2,5	-	103	-	-	91	-	-	90	-	-
9	453	-	-	361	-	-									
10	385	-	-	270	-	-									

(-) valores nulos ou negativos

mento máxima em meios com 0,1 g/L atingiu o valor de 73 mg/L.dia para uma concentração celular $X = 214$ mg/L e $\mu_{\max.} = 0,3 \text{ d}^{-1}$. A velocidade máxima de crescimento de Spirulina em meios contendo 0,2 e 0,3 g/L de NH_4Cl foi semelhante, no valor de aproximadamente 70 mg/L.d para um $X_{\text{aprox.}} = 260$ mg/L (Tabela IV). Porém o $\mu_{\max.}$ para o meio com 0,2 g/L foi ligeiramente superior ($0,5 \text{ d}^{-1}$) ao de 0,3 g/L de NH_4Cl ($0,3 \text{ d}^{-1}$).

Em que pesem estes insucessos com o cloreto de amônio, registraram-se respostas bastante positivas entre o terceiro e quinto dia de cultivo, nos meios com 0,1 e 0,2 g/L, e entre o quarto e o oitavo dia com o meio de 0,3 g/L.

Avaliações com a Oscillatoria limnetica

Respostas adequadas foram documentadas nas três concentrações iniciais de KNO_3 , com valores máximos essencialmente iguais para os meios com 1,0 e 2,57 g/L, da ordem de 185 mg /L.dia. As velocidades específicas máximas para todas as concentrações de nitrato ficaram por volta de $0,7 \text{ d}^{-1}$ (Tabela V). Estas velocidades são substancialmente superiores às vistas com a Spirulina em iguais condições.

Os resultados com ofertas de uréia a 0,1 e sobretudo 0,3 g/L nos primeiros dias, foram quase tão encorajadores quanto os anotados para o nitrato. A $\mu_{\max.}$ obtida em meios com 0,1 g/L foi de $0,7 \text{ d}^{-1}$, valor este próximo ao meio com 0,3 g/L que ficou na faixa de $0,7 \text{ d}^{-1}$, igualmente (Tabela VI).

- As demais concentrações ensaiadas revelaram-se adversas e daí a impossibilidade de avaliação do crescimento e concentrações celulares.

As considerações feitas em relação à uréia são válidas também para o amônio, na medida em que após uma fase inicial de grande velocidade de crescimento, houve uma abrupta redução nesta variável. A exceção foi representada pelo meio com 0,5 g/L, onde a velocidade persistiu em níveis significativos durante quase toda a duração do ensaio. A velocidade de crescimento máxima no valor de 141,8 mg/L.d para $X = 251$ mg/L ficou para o meio com 0,2 de NH_4Cl por Litro assim como $\mu_{\max.} = 0,7 \text{ d}^{-1}$, no início do ensaio (Tabela VII).

TABELA IV - Concentração celular (X) (mg/L), velocidade de crescimento (dx/dt) (mg/L.d) e velocidade específica de crescimento (μ) (d^{-1}) de S. maxima, em função do tempo (t) para diferentes concentrações de NH_4Cl (g/L)

t	0,1		0,2		0,3		0,5		0,8	
(d)	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X
0	52			60			50			55
1	59	8,3	0,1	65	5,7	0,1	65	6,0	0,1	62
2	87	32,7	0,4	72	7,8	0,1	74	10,7	0,1	65
3	132	53,6	0,4	125	57,8	0,5	105	36,3	0,3	89
4	214	73,0	0,3	190	67,7	0,4	155	52,3	0,3	95
5	281	46,1	0,2	261	72,4	0,3	210	60,1	0,3	104
6	320	10,5	-	335	68,9	0,2	278	70,7	0,2	95
7	329	0,1	-	400	48,8	0,1	352	67,6	0,2	81
8	329	-	-	442	34,9	0,1	415	60,8	0,1	40
9	329	-	-	473	20,2	-	474	42,2	0,1	
10	329	-	-	490	-	-	510	-	-	

(-) velocidade nula ou negativa

TABELA V - Concentração celular (X) (mg/L), velocidade de crescimento (dx/dt) (mg/L.D) e velocidade específica de crescimento (μ) (d^{-1}) da Oscillatoria limnetica, em função do tempo (t) para diferentes concentrações de KNO_3 (g/L).

t	0,5		1,0		2,57		5,0		10,0						
(d)	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ			
0	45			50			45			45					
1	101	64,1	0,6	122	81,3	0,7	133	92,0	0,7	120	86,3	0,7	120	85,1	0,7
2	182	90,5	0,5	221	110,1	0,5	240	118,9	0,5	231	118,3	0,5	225	110,3	0,5
3	289	123,9	0,4	350	147,1	0,4	379	149,1	0,4	359	137,6	0,4	342	123,2	0,4
4	452	177,1	0,4	534	185,5	0,3	542	169,8	0,3	510	143,9	0,3	473	133,4	0,3
5	650	169,8	0,3	721	181,7	0,2	720	184,0	0,3	648	134,9	0,2	609	138,4	0,2
6	803	116,8	0,1	898	110,1	0,1	911	164,9	0,2	780	120,4	0,1	750	145,7	0,2
7	904	49,5	-	990	5,3	-	1060	86,6	-	892	79,8	-	901	118,2	0,1
8	945	6,7	-	995	-	-	1132	19,9	-	960	76,0	-	1004	-	-
9	951	-	-	995	-	-	1149	1,9	-	1050	-	-	992	-	-
10	951	-	-	894	-	-	1128	-	-	1050	-	-	915	-	-

(-) valores negativos ou nulos

TABEIA VI - Concentração celular (X) (mg/L), velocidade de crescimento (dx/dt) (mg/L.d) e velocidade específica de crescimento (μ) (d^{-1}) de Oscillatoria limnetica, em função do tempo (t) para diferentes concentrações de uréla (g/L)

t	0,1	0,3	0,5	0,75	1,0							
(d)	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ			
0	45		45		45		45					
1	202	152,8	0,7	110	74,4	0,7	110	69,6	0,6	102	39,0	0,4
2	351	71,2	0,2	204	105,7	0,5	186	56,0	0,3	141	-	-
3	410	22,8	-	331	145,4	0,4	234	-	-	132	-	-
4	429	-	-	515	197,8	0,4	230	-	-	89	-	-
5	423	-	-	732	82,6	0,1	195	-	-	30	-	-
6	385	-	-	801	-	-	134	-	-	-	-	-
7	326	-	-	745	-	-	100	-	-	-	-	-
8	300	-	-	730	-	-	65	-	-	-	-	-
9	300	-	-	730	-	-	-	-	-	-	-	-
10	300	-	-	730	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) valores nulos ou negativos

TABELA VII - Concentração celular (X) (mg/L), velocidade de crescimento (dx/dt) (mg/L.d) e velocidade específica de crescimento (μ) (d^{-1}) de Oscillatoria limnetica, em função do tempo (t) para diferentes concentrações de NH_4Cl (g/L)

t	0,1			0,2			0,3			0,5			0,8		
(d)	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ	X	dx/dt	μ
0	50			50			50			55			50		
1	125	88,3	0,7	125	88,3	0,7	121	79,6	0,7	70	18,1	0,3	62	14,0	0,2
2	251	49,1	0,2	251	141,8	0,6	216	100,7	0,5	103	34,8	0,3	115	43,1	0,4
3	292	6,3	-	422	3,1	-	324	113,8	0,3	140	42,4	0,3	153	-	-
4	238	-	-	425	2,8	-	445	66,3	0,1	194	59,4	0,3	140	-	-
5	210	-	-	380	-	-	500	37,8	-	262	70,7	0,3	110	-	-
6	210	-	-	339	-	-	532	9,4	-	336	76,3	0,2	92	-	-
7	210	-	-	315	-	-	540	3,9	-	415	85,9	0,2	79	-	-
8	205	-	-	315	-	-	521	-	-	511	93,9	0,2	70	-	-
9	200	-	-	315	-	-	490	-	-	603	96,5	0,2	70	-	-
10	200	-	-	315	-	-	425	-	-	705	-	-	70	-	-

(-) valores nulos ou negativos

Investigação da Oscillatoria agardhii

Este microrganismo atingiu velocidade extraordinária no meio contendo nitrato, sobretudo na concentração de 2,57 g/L, no valor de 457 mg/L.d para $X = 1551$ mg/L (Figura 1). A velocidade específica máxima ficou por volta de $0,7 \text{ d}^{-1}$ (Figura 2). O pico de proliferação celular geralmente posicionou-se entre o quarto e o sexto dia de inoculação.

O padrão geral de comportamento com a uréia reproduziu-se neste experimento, sendo favoráveis somente as respostas aos meios de 0,1 e 0,3 g/L, nos primeiros dias (Tabela VIII). Em meios com uréia a 0,1 g/L a velocidade de crescimento máxima foi de 270 mg /L.d para $X = 682$ mg/L e um $\mu_{\text{max.}}$ de $0,7 \text{ d}^{-1}$ no início do ensaio.

Em meios com NH_4Cl atingiram-se velocidades de crescimento consideráveis e por período prolongado, com a oferta de 0,3 g/L. A velocidade de crescimento máxima atingiu o valor de 289 mg/L.d para $X = 646$ mg/L (Figura 3). O $\mu_{\text{max.}}$ obtido em meio com NH_4Cl a 0,2 g/L foi de $0,8 \text{ d}^{-1}$. Para as demais proporções testadas esta velocidade regrediu rapidamente, evidenciando resultados pouco satisfatórios (Figura 4).

DISCUSSÃO

A pesquisa tanto da diversificação de fontes nitrogenadas quanto da variação de cada fonte, além de visar a otimização da produção de biomassa e a ampliação das alternativas técnicas disponíveis, possui um elemento inerente de busca de opções econômicas mais vantajosas.

Neste sentido, logramos sucesso ao demonstrar que não apenas concentrações pouco dispendiosas de KNO_3 (a 1,0 g/L), proporcionam respostas amplamente favoráveis em diferentes circunstâncias, como estes ganhos foram potencializados no tocante ao custo da fonte nitrogenada, quando suplementos de uréia ou amônio foram introduzidos.

A análise de duas espécies de Oscillatoria confirmou não apenas a viabilidade de sua produção nos meios convencionais e modificados já descritos para a Spirulina, como a possibilidade de rendimentos

FIGURA .1. - Velocidade de crescimento ($\frac{dx}{dt}$) em função da concentração celular (X) de Oscillatoria agardhii para diferentes concentrações de KNO_3 (g/ L)

FIGURA 2 - Velocidade específica de crescimento (μ) de Oscillatoria agardhii em função do tempo (t), para diferentes concentrações de KNO_3 (g/ L).

TABELA VIII - Concentração celular (X) (mg/L), velocidade de crescimento (dx/dt) (mg/L.d) e velocidade específica de crescimento (μ) (d^{-1}) de Oscillatoria agardhii, em função do tempo (t) para diferentes concentrações de uréia (g/L)

t	0,1			0,3			0,5			0,75			1,0		
№)	x	dx/dt	μ	x	dx/dt	μ	x	dx/dt	μ	x	dx/dt	μ	x	dx/dt	μ
0	45			45			45			50			60		
1	112	76,3	0,7	76	34,1	0,4	106	61,1	0,6	72	41,2	0,6	102	49,3	0,5
2	206	108,1	0,5	115	46,0	0,4	185	79,0	0,4	134	72,4	0,5	171	21,3	0,1
3	345	167,8	0,5	181	72,0	0,4	240	-	-	209	-	-	189	10,0	-
4	682	270,1	0,4	262	87,9	0,3	240	-	-	135	-	-	140	-	-
5	919	84,7	-	360	98,5	0,3	211	-	-						
6	990	13,6	-	459	39,6	-	132	-	-						
7	891	-	-	492	-	-	85	-	-						
8	740	-	-	485	-	-									
9	701	-	-	440	-	-									
10	670	-	-	441	-	-									

(-) valores negativos ou nulos

FIGURA .3. - Velocidade de crescimento (dx/dt) em função da concentração celular (X) de Oscillatoria agardhii para diferentes concentrações de NH_4Cl (g / L)

FIGURA 4 - Velocidade específica de crescimento celular (μ) de Oscillatoria agardhii em função do tempo (t), para diferentes concentrações de NH_4Cl (g / L).

substancialmente maiores, notadamente quando se leva em conta os excelentes achados de velocidade com a Oscillatoria agardhii, em quase todos os meios testados.

É forçoso reconhecer que nos meios pouco concentrados à base de uréia e amônio, a interrupção precoce do crescimento foi detectada em diversas oportunidades, fazendo supor o esgotamento das fontes nutritivas disponíveis, e a eventual necessidade de se adicionar substrato nitrogenado. O estudo da adição parcelada está em fase inicial de pesquisa. Em contrapartida, quando se lançou mão nestas circunstâncias de teores nitrogenados elevados, alterações tróficas da cultura também se fizeram sentir, evidenciando as limitações para o emprego destas fontes alternativas.

De todo modo, houve economia para a manutenção da velocidade de crescimento da Spirulina, proporcionada pelo meio de KNO_3 menos concentrado, e decididamente pelos meios de uréia e amônio. Ao lado das opções a serem melhor examinadas e avaliadas, exemplificadas com a obtenção de biomassa recorrendo ao gênero Oscillatoria, desenham-se horizontes mais promissores para a produção comercial de cianobactérias.

CONCLUSÕES

As maiores velocidades de crescimento foram decrescentemente obtidas com a Oscillatoria agardhii, O. limnetica, e Spirulina maxima.

A velocidade de crescimento dos microrganismos estudados tendeu a atingir níveis máximos nos meios empregando nitrato a 2,57 g/L, mas com valores quase equivalentes ou pouco reduzidos, nos primeiros dias de ensaio, para as culturas com uréia e amônio a 0,1-0,3 g/L; o pico de dx/dt da O. agardhii (457,8 mg/L.d) foi 2,5 vezes maior que o da O. limnetica (185 mg/l.d) e 4,9 vezes superior ao da S. maxima (93,3 mg/L.d).

As velocidades específicas máximas de crescimento para a O. limnetica e O. agardhii nas três diferentes fontes nitrogenadas ficaram na faixa de 0,7 a 0,8 d^{-1} , porém a velocidade específica máxima de crescimento da Spirulina nas mesmas condições restringiu-se à faixa de 0,3-0,4 dia^{-1} .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LE DUY,A. & ZAJIC,J.E. - A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. Biotechnol. Bioeng. 25: 805 - 810, 1973.
2. PAOLETTI,C.; PUSHPARAJ,B.; TOMASELLI,L. - Recherche sulla nutrizione minerale di Spirulina platensis. In: Atti Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol., 17ª, Padova, 1975.