

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Produção de etanol a partir de melão de soja**

**Rogério Pereira Machado**

**Porto Alegre - RS**

**1999**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Produção de etanol a partir de melão de soja

Rogério Pereira Machado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Biotecnologia

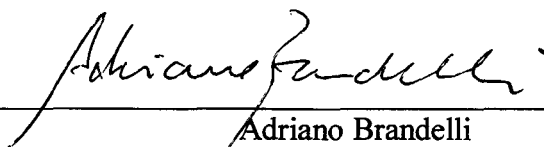
Orientador: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub

Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Porto Alegre, agosto de 1999

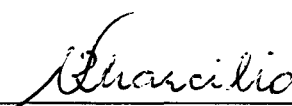
Dissertação defendida e aprovada em 13 de agosto de 1999, pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Banca examinadora



---

Adriano Brandelli



---

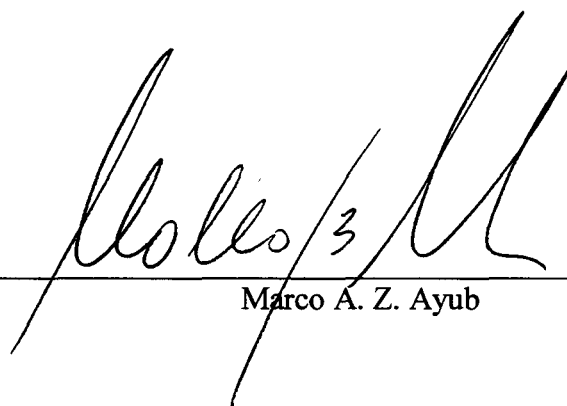
Nilson R. Marcílio



---

Rinaldo F. Hertz

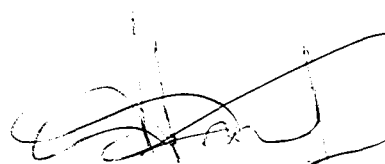
Professor orientador



---

Marco A. Z. Ayub

Coordenadora do PPGEQ



---

Talita F. Mendes

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Dirceu e Miraci, e ao meu irmão Dirceu Jr., por todo o incentivo e apoio, desde os primeiros anos até hoje. Por terem me ensinado o valor do conhecimento.

Ao orientador Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, pela oportunidade, pelo auxílio durante a realização deste e de outros trabalhos. Pela amizade, e pelo exemplo de perseverança em alcançar objetivos.

A bolsista Ana Fabricia M. de Oliveira, pela amizade e pelo auxílio na condução das análises e experimentos deste trabalho.

Ao Eng. Renê Rech que concebeu e sempre auxiliou este projeto.

Um agradecimento especial aos professores Roberto Fernando de Souza, Adriano Lisboa Monteiro, Catia Bernardo Gusmão, bolsistas, doutorandos e mestrandos do Laboratório K 123 do Instituto de Química, que sempre deram total apoio a este trabalho, cedendo o cromatógrafo gasoso.

Ao Sr. Roberval, Sra. Heloisa, Sra. Mariangela e bolsistas do laboratório de bromatologia do ICTA-UFRGS, que auxiliaram na determinação da composição química do melão de soja.

Ao colega e amigo Flavio Correa Bicca que sempre colaborou para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos, Rosane, Saionara, Sheila, Maria da Graça, Fernanda, Carla e seus bolsistas.

Aos professores e amigos, Adriano, Eduardo, Mercedes e Vitor.

Ao CNPQ e FAPERGS pelo apoio financeiro.

A minha Namorada Vivian, pela compreensão e carinho.

## Sumário

Resumo.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. A soja como matéria-prima industrial.....	3
2.1.1. Composição química do grão de soja.....	5
2.1.1.1. Compostos nitrogenados.....	5
2.1.1.2. Fração lipídica.....	9
2.1.1.3. Carboidratos.....	11
2.1.1.4. Constituintes inorgânicos.....	13
2.1.2. Produtos.....	14
2.1.3. Processamento.....	16
2.2. Produção de etanol.....	21
2.2.1. Biossíntese.....	22
2.2.2. Matérias-primas.....	24
2.2.2.1. Matérias de origem sacarínica.....	24
2.2.2.2. Matérias de origem amilácea.....	27
2.2.2.3. Matérias de origem celulósica.....	29
2.2.3. Microrganismos utilizados.....	31
2.2.4. Fatores que afetam a produção de etanol por leveduras.....	33
2.2.4.1. pH.....	33
2.2.4.2. Cepa utilizada.....	34
2.2.4.3. Concentração de açúcares.....	34
2.2.4.4. Temperatura.....	35
2.2.4.5. Concentração de etanol.....	35
2.2.4.6. Quantidade de inóculo.....	36
2.2.4.7. Oxigênio dissolvido.....	37
2.2.4.8. Presença de nutrientes.....	40
2.2.4.8.1. Fósforo.....	41
2.2.4.8.2. Enxofre.....	41

2.2.4.8.3. Potássio .....	42
2.2.4.8.4. Magnésio .....	42
2.2.4.8.5. Zinco .....	43
2.2.4.8.6. Outros íons .....	44
2.2.4.8.7. Vitaminas, esteróis, e outros .....	44
2.2.4.9. Presença de inibidores.....	45
2.2.4.10. Contaminantes .....	46
2.2.4.11. Agitação.....	46
2.2.5. Processo .....	46
2.2.5.1. Principais equipamentos.....	48
2.2.5.1.1. Propagador .....	48
2.2.5.1.2. Biorreator .....	49
2.2.5.1.2.1. Sistema de agitação .....	50
2.2.5.1.2.2. Sensor de temperatura .....	50
2.2.5.1.2.3. Janela de visita .....	51
2.2.5.1.2.4. Sensor de pH.....	51
2.2.5.1.2.5. Sensor de espuma.....	51
2.2.5.1.2.6. Chicanas.....	52
2.2.5.2. Condução da fermentação .....	52
2.2.5.2.1. Preservação das culturas .....	52
2.2.5.2.2. Crescimento do inóculo .....	53
2.2.5.2.3. Preparo e esterilização do meio.....	55
2.2.5.2.4. Inoculação .....	56
2.2.5.2.5. Produção .....	57
2.2.5.2.6. Purificação .....	57
2.2.6. Cinética do crescimento microbiano em regime descontínuo .....	58
2.2.6.1. Rendimento .....	59
2.2.6.2. Eficiência.....	60
2.2.6.3. Produtividade.....	61
3. Materiais e Métodos .....	62
3.1. Microrganismos .....	62
3.2. Esterilização de equipamentos e materiais.....	62

3.3. Meios de cultura .....	63
3.3.1. Meio de cultura complexo para leveduras .....	63
3.3.2. Meio de cultura ágar-melaço .....	63
3.4. Tampão fosfato .....	63
3.5. Preservação de culturas .....	63
3.6. Métodos de cultivo.....	64
3.6.1. Pré-inóculo .....	64
3.6.2. Cultivo em incubadora agitada .....	64
3.6.3. Cultivo em biorreator .....	65
3.7. Métodos Analíticos .....	66
3.7.1. Determinação de lipídios .....	66
3.7.2. Determinação de proteína total .....	67
3.7.3. Determinação de sólidos totais.....	67
3.7.4. Determinação de carboidratos totais .....	67
3.7.5. Determinação de fibras .....	67
3.7.6. Deteminação de cinzas .....	67
3.8. Cromatografia de camada delgada.....	67
3.9. Determinação de açúcares redutores.....	68
3.10. Determinação de carboidratos totais .....	69
3.11. Cromatografia líquida .....	70
3.12. Contagem em gota .....	71
3.13. Contagem em câmara de Neubauer .....	71
3.14. Determinação da quantidade de etanol .....	73
4. Resultados e Discussão.....	75
4.1. Análise do melaço de soja.....	75
4.2. Seleção de cepas .....	76
4.3. Condições ótimas de processo.....	80
4.3.1. Temperatura ótima .....	81
4.3.2. pH ótimo .....	84
4.3.2.1. pH inicial ótimo .....	84
4.3.2.2. pH constante .....	86
4.3.3. Aditivos.....	88



4.4. Microaeração .....	90
4.5. Análises de carboidratos .....	92
4.6. Melaços modificados .....	96
4.7. Misturas cana-melaço .....	99
5. Conclusões.....	107
6. Perspectivas .....	110
7. Referências Bibliográficas.....	111
Apêndices .....	117
Abstract .....	137

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1.</b> Comparação entre a quantidade de proteínas fornecidas por diferentes alimentos por acre por ano.....	6
<b>Tabela 2.2.</b> Quantidades relativas, componentes e pesos moleculares de frações protéicas obtidas de extratos de soja por ultracentrifugação.....	8
<b>Tabela 3.1.</b> Fluxos e pressões usadas no cromatógrafo a gás.....	74
<b>Tabela 4.1.</b> Composição do melaço de soja de diferentes bateladas.....	75
<b>Tabela 4.2.</b> Composição do melaço de soja em diferentes bateladas expressas em base seca.....	75
<b>Tabela 4.3.</b> Dados cinéticos da fermentação de melaço de soja por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a pH 5 e 6 constantes.....	88
<b>Tabela 4.4.</b> Quantidades de etanol e carboidratos totais finais de cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em melaço de soja com.....	89
<b>Tabela 4.5.</b> Cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em melaço de soja aditivados com MgSO <sub>4</sub> em diferentes concentrações.....	90
<b>Tabela 4.6.</b> Resultado da análise de carboidratos do melaço de soja por cromatografia líquida.....	95
<b>Tabela 4.7.</b> Quantidade de carboidratos totais e açúcares redutores presentes em melaço de soja bruto e hidrolisado.....	97
<b>Tabela 4.8.</b> Composição centesimal do melaço puro e das fases do melaço hidrolisado.....	97
<b>Tabela 4.9.</b> Tabela comparativa entre melaços de soja com diferentes níveis de concentrações, fermentados por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	99

## Lista de Figuras

<b>Figura 2.1.</b> Diferentes tipos de soja existentes.....	3
<b>Figura 2.2.</b> Desenho esquemático de um grão de soja.....	4
<b>Figura 2.3.</b> Curva de solubilidade (extratibilidade) de proteínas da soja em função do pH.....	7
<b>Figura 2.4.</b> Principais açúcares da soja.....	13
<b>Figura 2.5.</b> Fluxograma simplificado do processamento da soja.....	19
<b>Figura 2.6.</b> via glicolítica de Embden-Meyerhof.....	23
<b>Figura 2.7.</b> Desenho esquemático de um biorreator e seus acessórios.....	50
<b>Figura 2.8.</b> Esquema geral de um processo fermentativo.....	54
<b>Figura 2.9.</b> Curva típica de crescimento microbiano.....	58
<b>Figura 3.1.</b> Foto do reator Biostat B. – B. Braun Biotech International.....	65
<b>Figura 3.2.</b> Foto do reator BTS-27 – Applikon Dependable Instruments Inc.....	66
<b>Figura 3.3.</b> Desenho esquemático da câmara de Neubauer.....	72
<b>Figura 3.4.</b> Desenho esquemático das células da câmara de Neubauer.....	72
<b>Figura 4.1.</b> Consumo de carboidratos totais em função do tempo para diversas cepas cultivadas em melaço de soja.....	78
<b>Figura 4.2.</b> Produção de etanol em função tempo para diversas cepas cultivadas em melaço de soja.....	78
<b>Figura 4.3.</b> Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em função do tempo de cultivo de melaço de soja a diversas temperaturas.....	81
<b>Figura 4.4.</b> Produção de etanol em função do tempo de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em melaço de soja a diferentes temperaturas.....	82

<b>Figura 4.5.</b> Consumo de carboidratos totais em função do tempo de cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em melão de soja a diferentes temperaturas.....	83
<b>Figura 4.6.</b> Cromatogramas de melão de soja fermentado a 38 e 30 °C .....	84
<b>Figura 4.7.</b> Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em função do tempo de cultivo de melão de soja a diferentes pHs iniciais.....	85
<b>Figura 4.8.</b> Produção de etanol em função do tempo de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em melão de soja a pHs variáveis.....	85
<b>Figura 4.9.</b> Concentração de carboidratos totais em função do tempo de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em melão de soja a diferentes pHs.....	86
<b>Figura 4.10.</b> Fermentação de melão de soja a pH 6,0 constante.....	87
<b>Figura 4.11.</b> Fermentação de melão de soja a pH 5,0 constante.....	87
<b>Figura 4.12.</b> Comparativo entre cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em melão de soja com e sem microaeração.....	92
<b>Figura 4.13.</b> Placa de CCD com melão de soja com diferentes concentrações.....	94
<b>Figura 4.14.</b> Placa de CCD com melão de soja fermentado.....	95
<b>Figura 4.15.</b> Fermentação do sobrenadante do melão hidrolizado.....	98
<b>Figura 4.16.</b> Quantidade de etanol gerado pela fermentação em incubadora rotatória de misturas de melão de soja e caldo de cana.....	102
<b>Figura 4.17.</b> Quantidade de açúcares consumidos durante a fermentação em incubadora rotatória de misturas de melão de soja e caldo de cana.....	103
<b>Figura 4.18.</b> Quantidade de etanol produzido durante a fermentação em biorreator de misturas de melão de soja e caldo de cana.....	104
<b>Figura 4.19.</b> Quantidade de açúcares consumidos durante a fermentação em biorreator de misturas de melão de soja e caldo de cana.....	105

## Terminologia

**Unidades**

° C	Grau Celcius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
Å	Angstrom
atm	atmosfera
Cal	caloria
cm	centímetro
g	grama
GL	gigalitro
h	hora
ha	hectare
Kg	kilograma
Kpa	kiloPascal
L	litro
lb	libra
m	metro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
ML	megalitro
ml	mililitro
mM	milimolar
N	normal
nm	nanometro
ppm	parte por milhão
psi	pressure per square inch
s	segundos
S	Sverberg
ton	tonelada

**Notações**

ADP	adenina difosfato
ATP	adenina trifosfato
CBS	Centraal Bureau voor Schimmelcultures
Cél	células
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DNS	Ácido dinitrosalicílico
NAD	nicotinamida adenina dinucleotideo (forma oxidada)
NADH <sub>2</sub>	nicotinamida adenina dinucleotideo (forma reduzida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
pH	potencial hidrogênionico
RNA	ácido ribonucleico
RPM	rotações por minuto

**Variáveis**

A	coeficiente angular
ABS	absorbância
D1	diluição
Ef	eficiência de fermentação
Ei	eficiência de instalação
Ep	eficiência de processo
M1	média das células
NT	número total de células
P	produtividade
p/p	peso por peso
R1	rendimento por matéria-prima
R2	rendimento por substrato total
R3	rendimento por substrato
v/v	volume por volume

## Resumo

Neste trabalho estudou-se a utilização de melaço de soja como substrato para a produção de etanol, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (C94, Instituto Pasteur). O melaço de soja é um resíduo que contém 10,44 % de proteínas, 40,77 % carboidratos totais, 9,37 % de cinzas, 10,05 % de lipídios (média de 5 bateladas analisadas, expressas em % p/p), além de cerca de 0,1 g/L de fibras.

A otimização de parâmetros de processo foi realizada, tanto em incubadora rotatória, quanto em reator de bancada, obtendo-se melhor produtividade nas seguintes condições de processo: 30-34 °C, pH 6,0, aditivado com 0,1 g/L de MgSO<sub>4</sub>.

Uma análise detalhada dos carboidratos do melaço de soja indicou que o melaço é um resíduo complexo que contém 8,43 g/L de glicose, 8,26 g/L de frutose, 77,12 g/L de sacarose, 23,12 g/L de rafinose, 84,53 g/L de estaquiose, além de outros carboidratos não identificados.

Por fim, testou-se a fermentação conjunta de melaço de soja com caldo de cana. Os resultados obtidos indicaram que misturas de 10 a 50 % de carboidratos provenientes do melaço de soja com carboidratos da cana de açúcar apresentam maior rendimento que a fermentação separada destes substratos.

# 1. Introdução

Produtos como óleos vegetais, margarinas, extratos protéicos, embutidos, rações animais, fertilizantes, tintas e muitos outros, podem exemplificar o grande leque de produtos em que a soja e seus sub-produtos podem estar presentes.

A soja é constituída principalmente de lipídios e proteínas, e esta última fração tem recebido cada vez mais atenção nas últimas décadas. A literatura aponta que nenhum outro vegetal, e nem mesmo fontes animais, podem fornecer uma quantidade tão grande de proteínas por acre, por ano, quanto a soja. Não só a quantidade mas também a qualidade desta proteína deve ser ressaltada, já que a soja apresenta em sua composição quase todos os aminácidos essenciais.

A obtenção do extrato protéico é tradicionalmente feita com base no ponto isoelétrico das proteínas da soja que se situa na faixa de pH 4,0-5,0 e pode ser alcançado com o uso de ácidos ou bases. Outra maneira de se extrair as proteínas da soja é com o uso de uma mistura etanol e água. Esta mistura insolubiliza as proteínas e fibras da soja, que são retiradas, após secagem obtém-se um produto conhecido como proteína concentrada de soja. A fração líquida da mistura etanol e água contém na sua maior parte, os açúcares da soja que, após a recuperação do etanol por evaporação, acabam por gerar o melaço de soja.

O objetivo deste trabalho é o aproveitamento do melaço de soja como meio de cultura para a produção de etanol, a fim de suprir as perdas inerentes ao processo de obtenção de concentrados protéicos de soja. Além da economia gerada pela auto-suficiência de produção de solvente, a produção de etanol através do melaço de soja é muito mais economicamente vantajosa frente ao o etanol proveniente da cana, já que não

há etapas como transporte da cana, moagem, filtração do caldo e manuseio do bagaço. O etanol utilizado para as extrações deve estar no máximo a 70 %, o que reduz drasticamente os investimentos na planta de purificação de etanol quando comparada a uma planta que fornece etanol a 95 % de pureza. No processo tradicional de produção de concentrados protéicos com etanol, o melaço é concentrado até 50 % de sólidos totais e posteriormente adicionado a rações animais. Com a utilização do melaço de soja para a produção de etanol, este pode ser carregado no biorreator com 13-15 % , reduzindo os custos de concentração do melaço.

Para a realização destes objetivos, foi pesquisada a composição química do melaço de soja, e posteriormente simulada várias condições de processo visando a conversão racional do produto.

Outra alternativa tecnológica para a utilização do melaço de soja, é a mistura deste com o caldo de cana. A proposta visa utilizar as plantas já instaladas de processamento de caldo de cana no Brasil, explorando as vantagens e principais efeitos da mistura destas duas fontes de nutrientes para a produção de etanol.

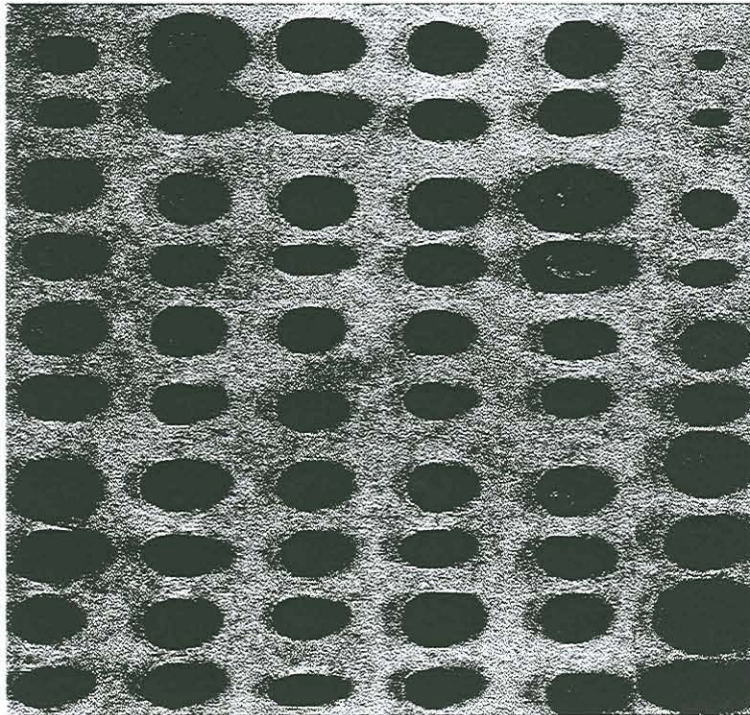
Este trabalho inova no sentido de ser o primeiro trabalho de nosso conhecimento, a testar o potencial do melaço de soja, como substrato para fermentação alcoólica.



## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. A soja como matéria-prima industrial

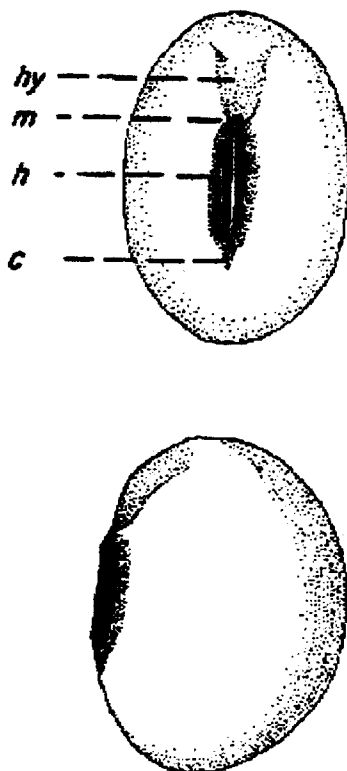
A soja é uma planta com grande diversidade genética e morfológica, existindo variedades de vários tamanhos, formatos, cores e composições químicas diferentes. A Figura 2.1. exemplifica esta variabilidade.



**Figura 2.1.** Diferentes tipos de soja existentes.  
Fonte: adaptado de MARKLEY, 1974.

Segundo MARKLEY (1974), a soja é conhecida por vários nomes: *Glycine soja*, *Soja japonica*, *Glycine ussuriensis* entre outros, mas o único aceito pelas regras internacionais de botânica é *Glycine max*. A soja selvagem foi encontrada no Japão, Manchúria, e Coreia. Era fina e baixa, com grãos muito pequenos, a esta planta foi dado o nome de *Glycine ussuriensi*. Muitos pesquisadores consideram que a soja cultivada hoje tenha derivado desta espécie selvagem e de outras espécies do gênero *Glycine*.

O grão de soja é uma típica semente leguminosa como se pode ver na Figura 2.2. O hilo (h) tem forma linear elíptica, no final deste hilo há um pequeno encaixe chamado chalaza (c), a outra extremidade do hilo é chamada micrópilo (m), e acima deste encontra-se o hipocotile (hy).



**Figura 2.2.** Desenho esquemático de um grão de soja.  
Fonte: WOLF & COWAN, 1975.

A parte principal da soja é sem dúvida sua semente. A composição química desta é muito complexa e é dependente de alguns fatores como variedade, condições de cultivo, condições climáticas, época do ano em que é plantada e condições de armazenamento (HOU & CHANG, 1998). A natureza e as características da maioria dos constituintes é pouco conhecida pela falta de pesquisas de isolamento, identificação e caracterização destes componentes. O grão é uma semente oleaginosa constituída principalmente de lipídios, proteínas, carboidratos, minerais, e água. Estes constituintes entram no grão pelo transporte de nutrientes solúveis, principalmente na forma de

carboidratos e aminoácidos provenientes da folha e da haste da planta. Diversas pesquisas mostram que o acúmulo de óleo no grão é acompanhado de um decréscimo de carboidratos. Sementes oleaginosas são geralmente ricas em proteínas que são acumuladas juntamente com o óleo, embora não existam ainda evidências da relação entre o acúmulo dos 2 componentes. Estes nutrientes são normalmente acumulados para prover o desenvolvimento das folhas e vagens.

### **2.1.1. Composição química do grão de soja**

A composição química é consideravelmente afetada pela genética das variedades e pelas condições climáticas onde as plantas crescem, em especial a quantidade de luz que atinge a flor. Para cada variedade de soja existe uma época e uma faixa de latitude ótima para o seu crescimento. De forma genérica, considera-se que a soja tem 20 % de lipídios, 40 % de compostos nitrogenados, 25 % de carboidratos, 5 % de fibras, 6 % de constituintes inorgânicos (valores em base seca). A soja apresenta umidade muito variável, sendo esta reduzida para o nível de 12 % para sua estocagem e posterior processamento.

#### **2.1.1.1. Compostos nitrogenados**

A soja apresenta uma fração muito grande de compostos nitrogenados, por isto é uma ótima fonte de proteínas para a alimentação humana e animal. Quando comparado a outros vegetais, e até a fontes animais de proteína, pode-se observar que a soja é o alimento que mais fornece proteínas por acre, por ano, como pode ser visto no Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Comparação entre a quantidade de proteínas fornecidas por diferentes alimentos por acre e por ano.

Produto	Kg/acre/ano	Kg de proteína/acre/ano
Soja	1.400	560
Leguminosas	1.000	280
Milho	2.500	250
Trigo	1.200	144
Leite	2.200	80
Carne	300	60

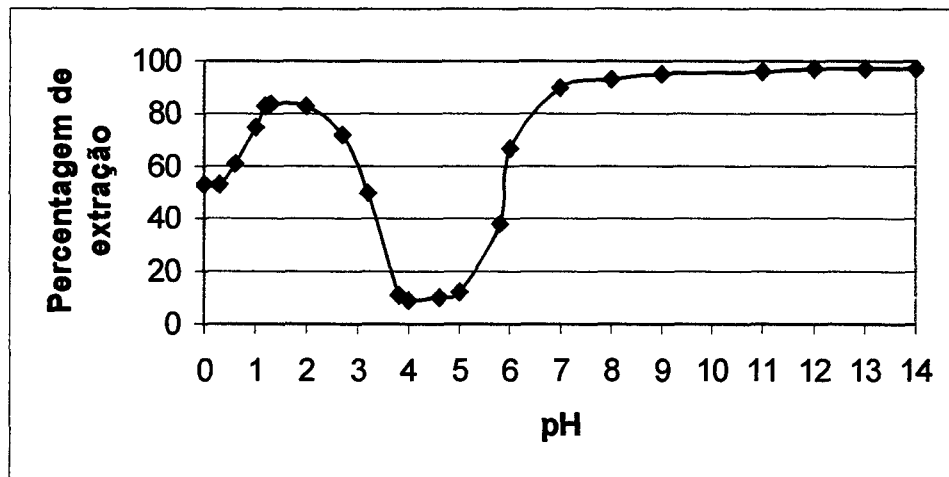
Fonte: MORETI, 1975.

Não só a quantidade mas também a qualidade da proteína da soja deve ser considerada. Este vegetal apresenta uma composição protéica muito rica quando comparado a maioria dos vegetais. No entanto, a soja apresenta um valor nutricional de suas proteínas menor quando comparada às fontes animais. Isto ocorre porque o grão apresenta baixas quantidades de aminoácidos como metionina e cistina. Quando combinado com outros vegetais, a soja pode suprir toda gama de aminoácidos necessários à alimentação, constituindo uma alimentação de valor nutricional ao nível do leite e da carne, embora já exista uma variedade de soja transgênica (U.S. patent 5,633,436, Du Pont de Nemours and Co.) que apresenta todos os aminoácidos essenciais (KATZ, 1998).

Segundo SGARBIERI (1996), as proteínas são armazenadas em corpúsculos de 2 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro, denominados grãos de aleurona ou corpúsculos protéicos. Os corpúsculos protéicos são envoltos por uma membrana fosfolipídica que é estável na presença de éter dietílico e hexano. Podem ser isolados por centrifugação em gradiente de densidade e, normalmente, apresentam elevado conteúdo protéico.

A maior parte das proteínas da soja são classificadas como globulinas. São insolúveis em água em seu ponto isoelétrico, mas dissolvem em água ou soluções salinas

diluídas em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico. A solubilidade das proteínas de soja em função do pH é mostrada na Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Curva de solubilidade (extratibilidade) de proteínas da soja em função do pH.

Fonte: BAZINET et al., 1997.

Quando farinha de soja desengordurada é dispersa em água destilada (pH=6,5), observa-se a solubilidade máxima das proteínas. Elevando-se o pH, pela adição de álcali, a solubilidade aumenta ainda mais. Mas, pela adição de ácido, a solubilidade decresce abruptamente atingindo um mínimo nas imediações do pH 4-5, região do ponto isoelétrico. A pHs muito mais baixos as proteínas se redissolvem. A elevada estabilidade das proteínas de soja em água indica que as membranas fosfolipídicas que envolvem os corpúsculos protéicos são facilmente rompidas, com liberação das proteínas.

Segundo SGARBIERI (1996), as proteínas da soja constituem uma mistura de macromoléculas de tamanhos, densidades de carga e estruturas diferentes. As diferenças de tamanho e pesos moleculares podem ser demonstradas por ultrafiltração a gel. A ultracentrifugação separa as proteínas em quatro frações com velocidades de sedimentação equivalentes 2, 7, 11, 15 S. As quantidades relativas e as faixas de pesos moleculares representadas pelas várias frações aparecem na Tabela 2.2.

O fracionamento dos componentes 2 S e 7 S revelou a existência de várias proteínas, descritas na Tabela 2.2. A fração 2 S é composta por vários inibidores de tripsina, citocromo C, alantoinase, mais duas globulinas isentas de atividade biológica. A fração 7 S que representa mais de um terço do total das proteínas da soja é formada de pelo menos quatro proteínas importantes: beta-amilase, lectina, lipoxigenase e globulina 7 S. Sabe-se que existem múltiplas formas de lectinas e de lipoxigenase. Embora desprovida de atividade biológica, a globulina 7 S, da mesma forma que as lectinas, são classificadas como glicoproteínas.

A globulina 11 S, também denominada glicinina representa cerca de um terço do total das proteínas da soja. A fração 15 S que tem sido pouco estudada apresenta peso molecular acima de meio milhão de Daltons com base na velocidade de sedimentação. Cerca de 80 % das proteínas de soja apresentam peso molecular acima de 100.000. As frações 7 S e 11 S perfazem 70 % da proteína total da soja. O restante sedimenta com as frações 2 S e 15 S.

**Tabela 2.2.** Quantidades relativas, componentes e pesos moleculares de frações protéicas obtidas de extratos de soja por ultracentrifugação.

Fração Protéica	Porcentagem do total	Componentes	Peso Molecular (Da)	
2S	22	Inibidores de tripsina	8.000	
			21.500	
			Citocromo C	12.000
			Globulina 2.3S	18.200
			Globulina 2.8S	32.000
7S	37	Alantoinase	50.000	
			Beta-amilase	61.700
			Lectina	110.000
			Lipoxigenase	108.000
			Globulina 7S	180.000
11S	31	Globulina 11S	210.000	
			350.000	
15S	11	Não identificadas	600.000	

Fonte: SGARBIERI, 1996.

Quando consideramos a porção nitrogenada da soja estamos incluindo não só as proteínas, mas também frações delas derivadas aminoácidos e peptídeos, que estão presentes no grão. Embora usualmente o termo proteína seja usado como sinônimo de porção nitrogenada. Para a determinação da quantidade de proteína, geralmente quantifica-se o nitrogênio total e converte-se este índice em proteína multiplicando-se pelo fator 5,71 (INDIAN SOYBEAN DEVELOPMENT COUNCIL, 1999). A soja apresenta pequenas quantidades de peptídeos, aminoácidos livres e outros compostos nitrogenados com variável peso molecular resultantes de sínteses incompletas de proteína e de eventuais degradações ocorridas, como: adenina, arginina, glicina, betaina, trigonelina, guanidina, triptofano, canavanina e outros (MARKLEY, 1974). Ainda, ocorre a presença de amins quaternárias, glutatona, e vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina, B6, folacina (SMITH & CIRCLE, 1975).

#### **2.1.1.2. Fração lipídica**

A fração lipídica do grão da soja é composta principalmente por glicerídeos, fosfatídeos, e uma pequena parcela de matéria não saponificável. Estes compostos são armazenados em corpúsculos de 0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$  localizados no grão, chamados de esferossomos (SGARBIERI, 1996).

Os glicerídeos, principais componentes da fração lipídica, são formados por uma molécula de glicerol ligada a três ácidos graxos. Os glicerídeos da soja estão presentes na forma de homoglicerídeos (quando 3 ácidos graxos iguais combinam-se com uma molécula de glicerol), e heteroglicerídeos ( quando 2 ou 3 ácidos graxos diferentes combinam-se com um glicerol) (SMITH & CIRCLE, 1975).

Segundo SMITH & CIRCLE (1975) Outra porção importante são os fosfatídeos, estes compostos são semelhantes aos glicéridos, mas apresentam em sua constituição ácidos graxos ligados ao nitrogênio, ou nitrogênio e fósforo. Os principais compostos deste grupo são as lecitinas, cefalinas e esfingomielinas. A lecitina e a cefalina contém nitrogênio e fósforo na proporção 1:1 e as esfingomielinas na proporção 2:1. O grão de soja contém cerca de 1,8 % de fosfatídeos, podendo chegar a quantidade de 3,2 %. Estas substâncias podem estar adsorvidas em outros complexos como carboidratos, proteínas e inositol. Lecitina e cefalina são similares, e contém uma molécula de glicerol esterificado com 2 moléculas de ácidos graxos e 1 molécula de ácido fosfórico, que é esterificado com alguma outra molécula como colina ou amino álcool etanoamina.

A fração de compostos não saponificáveis é uma fração muito pequena da porção total dos lipídios da soja (de 0,52 a 1,14 %), embora compreenda uma grande diversidade de compostos como pigmentos (carotenoides, isoflavonoides, antocianinas, clorofila), esteróis (ergosterol, sitosterol), tocoferóis, tocoquinonas, hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, vitaminas e outros. A quantidade de matéria não saponificável vai diminuindo a medida que o processo de extração de óleo de soja avança, de forma que o óleo já refinado, branqueado e desodorizado contém muito menos destes compostos que o óleo cru.

Os ácidos graxos são importantes componentes estruturais na formação da grande maioria dos compostos que formam a porção lipídica, sendo assim é importante conhecer sua composição na soja.

O óleo de soja é composto por uma grande gama de ácidos graxos saturados e insaturados. Os ácidos graxos saturados estão presentes em menor quantidade cerca de 15 %, enquanto os insaturados perfazem 85 % dos ácidos graxos presentes.



Os ácidos graxos saturados contidos no grão de soja e suas respectivas quantidades mínimas e máximas são: ácido láurico (0,0-0,2 %), ácido mirístico (0,1-0,4 %), ácido palmítico (6,5-9,8 %), ácido esteárico (2,4-5,5 %), ácido araquídico (0,2-0,9 %), ácido lignocérico (0,0-0,1 %). Os ácidos insaturados presentes na soja e suas respectivas quantidades são: ácido dodecanóico (traços), ácido araquidônico (traços), ácido tetradecanóico (0,05-0,64 %), ácido hexadecanóico (0,42-1,60 %), ácido oleico (10,9-60,0 %), ácido linoleico (25,0-64,8 %) e ácido linolênico (0,3-12,1 %) (MARKLEY,1974).

### **2.1.1.3. Carboidratos**

A soja apresenta carboidratos principalmente na forma de açúcares, amido, celulose e seus derivados (SMITH & CIRCLE,1975; MARKLEY, 1974). Os carboidratos da soja têm sido pouco explorados como fonte de alimentação, são usados principalmente em rações animais (predominantemente em rações para ruminantes) apenas para somar calorias às dietas destes animais. Apesar dos açúcares da soja serem complexos, as rações animais não sofrem nenhum processamento pois não há ganho de valor nutricional pela quebra de açúcares nestas rações animais (IRISH, 1998).

A celulose está presente na casca do grão de soja, representando 64 % desta, outros polímeros semelhantes a celulose como as pentosanas, galactanas, hemicelulose e dextrinas também podem ser encontradas na soja. O amido está presente na soja, porém em quantidades muito pequenas.

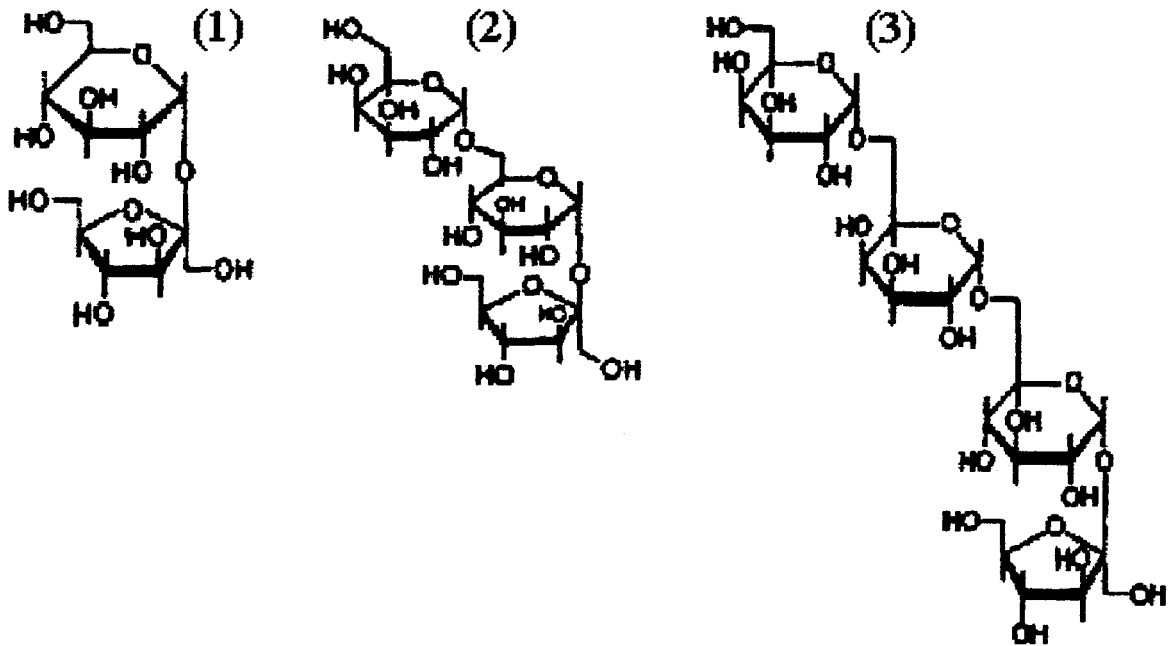
Os açúcares são sem dúvida os principais carboidratos da soja. É certo afirmar que a soja é composta de sacarose, estaquiose, rafinose, glicose, frutose, melibiose, galactose, ramnose e maltopentose. Os principais açúcares são a sacarose que compõe

cerca de 50 % do açúcar da soja, a rafinose e a estaquiase, que juntas perfazem quase os 50 % restantes. Os demais açúcares representam cerca de 0,5 a 1 % do total. A glicose por exemplo nem era detectada na soja antes do aparecimento de técnicas instrumentais precisas para sua análise, e ainda hoje é discutida a sua presença na soja madura (SILVA et al., 1990). Entretanto, a soja verde apresenta grandes quantidades de pentoses e hexoses que vão se combinando durante o amadurecimento, restando por fim apenas traços destes açúcares provenientes de sínteses incompletas e possíveis degradações de açúcares mais complexos.

A sacarose (Figura 2.4.) é um dissacarídeo não redutor, facilmente hidrolisado por soluções diluídas de ácidos minerais ou por enzimas (invertases) com a formação de glicose e frutose. Uma propriedade importante da sacarose é a sua capacidade de formar compostos com hidróxidos, ácidos inorgânicos, e mesmo com amônia.

Depois da sacarose, a rafinose (Figura 2.4.) é o oligossacarídeo mais freqüente em vegetais. É também conhecida como galactosilsacarose; é um trissacarídeo não redutor, sendo encontrado em grande quantidade no melão e no açúcar-de-cana não refinado. Por hidrólise total da rafinose, são obtidos galactose, frutose e glicose. Por invertases, este açúcar pode ser hidrolisado à frutose e O- $\alpha$ -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-D-glicopiranosose (melibiose). Este açúcar não é absorvido pelo corpo humano e, por este motivo, pode causar desconforto intestinal com produção de gases. A rafinose é hidrolisada por algumas cepas de fungos como o *Aspergillus fumigatus* (REZENDE & FELIX, 1997) e a *Morierella vinacea dixo* (THANANUNKUL et al., 1976). Por causa das suas propriedades, este açúcar vem sendo explorado para a formação de ácidos graxos esterificados, a fim de produzir óleos vegetais com menos calorías. A forma conjugada

de ácidos graxos com rafinose tem uma menor absorção no trato intestinal humano (AKOH & SWANSON, 1987).



**Figura 2.4.** Principais açúcares da soja. (1) sacarose, (2) rafinose, (3) estaquiose.

A estaquiose (Figura 2.4.) é um tetrassacarídeo não redutor pertencente a família da rafinose encontrado principalmente em leguminosas como a soja. Em geral, tetrassacarídeos são raros em alimentos.

#### 2.1.1.4. Constituintes inorgânicos

Segundo SMITH & CIRCLE(1975), a soja contém potássio, sódio, cálcio, magnésio, fósforo, enxofre, cloro, iodo, ferro, cobre, manganês, zinco e alumínio. Os metais encontrados em maior quantidade são o potássio (1,29-2,17 %), o fósforo (0,419-0,822 %) e o cálcio (0,163-0,470 %), sendo que apenas traços dos demais constituintes são detectados. Ainda, é importante ressaltar que 43 % do fósforo presente está na forma de fitato, e quase todo o fósforo restante apresenta-se na forma de fosfolípidios.

### 2.1.2. Produtos

A soja está presente diariamente em nossas vidas sob a forma dos mais diversos alimentos tais como: margarinas, tofu, óleos vegetais, proteínas (texturizada, concentrada, isolada, leite ), lecitinas, farinhas, farelos, entre outros.

O óleo de soja é o terceiro óleo vegetal mais consumido no mundo. Estima-se que sua produção seja de 12 bilhões de lb/ano (KATZ, 1998). O óleo de soja convencional contém 16 % de gorduras saturadas e um percentual alto de gorduras com 18 carbonos insaturados. Por causa do seu baixo custo é um óleo muito popular, embora óleos especiais (canola, oliva, etc.) tenham conquistado cada vez mais mercado nos últimos anos.

As margarinas são itens usados corriqueiramente, e são obtidas pela hidrogenação do óleo de soja. A margarina está entre os 5 itens alimentícios mais consumidos pela população brasileira.

A lecitina é largamente utilizada em produtos alimentícios, principalmente em instantâneos como emulsificante. Também é usada em pães, massas, biscoitos e tintas. Suas principais funções são: emulsificante, aglomerante, desmoldante, estabilizante, anti-espumante, antioxidante e dispersante (NUTRIMENTAL INDUSTRIA E COMÉRCIO DE ALIMENTOS, [199?]).

Atualmente a proteína de soja é o produto mais importante extraído da soja. Esta pode ser encontrada de 3 formas: texturizada (50 % proteína), concentrada (70 % proteína) e isolada (90 % proteína). A proteína de soja tem proporcionado significativos benefícios econômicos, nutricionais, e versatilidade à indústria alimentícia, sendo utilizada principalmente em produtos cárneos, avícolas, lácteos (e derivados), produtos nutricionais. Estas proteínas são uma opção alimentar devido ao excelente valor

nutricional e devido aos baixos níveis de colesterol, gordura e calorias. (PROTEIN TECHNOLOGIES INTERNACIONAL, [199?]).

É comum associar-se proteínas de soja à nutrição, e embora a associação seja correta, este não é o principal motivo pelo qual as proteínas da soja são adicionadas aos embutidos, e sim a redução de custos. Os principais componentes dos embutidos são a gordura e a carne. Estes produtos sofrem oscilação no preço ao longo do ano. A proteína de soja desempenha um fator estratégico na formação de embutidos absorvendo as oscilações nos custos destes componentes, fazendo com que o preço final dos embutidos permaneça estável. Neste caso, a substituição de gordura ou carne por proteínas de soja não significa perda de qualidade, além de poder absorver a oscilação dos componentes mantém o aspecto e o valor nutricional do produto devido as suas propriedades funcionais e nutricionais. O uso de proteínas de soja em embutidos melhora a textura e a fatiabilidade destes produtos, devido a sua propriedade de formar géis, e seu poder emulsificante (SAMBRA/SAMRIG, 1995)

As proteínas texturizadas são usadas mais pelo seu conteúdo protéico como extensores da carne, enquanto as proteínas isoladas são usadas por suas propriedades funcionais. As proteínas concentradas combinam um misto de extensor e ingrediente funcional.

São fabricados ainda outros produtos a partir da proteína do grão da soja como o tofu , o leite de soja e outros alimentos largamente utilizados na Ásia. O tofu é um alimento muito tradicional na Ásia. Para a formação do tofu propriedades funcionais da proteína da soja como gelificação, e emulsificação são fundamentais. O tofu é um produto de tecnologia bastante complexa, pois deve-se levar em conta para sua fabricação a utilização de variedades específicas de soja que sejam ricas em globulina (11

S) e fração 7 S para se obter dureza e tempo de endurecimento adequado (MURPHY et al., 1997), além da variedade, ainda muitas outras variáveis são ligadas aos níveis de proteínas no grão como o tempo de estocagem, níveis de secagem, etc. (HOU & CHANG,1998).

O leite de soja é um produto cada vez mais aceito pelo mercado mundial e sua venda tem subido nos EUA desde 1990 cerca de 10-15 % ao ano (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 1998), embora já seja consumido a séculos na Ásia. O leite de soja é uma excelente fonte de proteína e carboidratos, não contendo gorduras saturadas ou colesterol. Uma grande gama de produtos são fabricados a partir do leite de soja como: drinks, iogurte de soja, mousse de soja, sorvete de soja, e outros.

As farinhas de soja tem um grande número de aplicações na indústria de panificação (pães, bolachas), de massas (massas, pizzas), sorveteira (sorvetes, casquinhas), de produtos desidratados (sopas, mingaus), frigorífica ( embutidos em geral) e também é muito usada em rações animais. Suas principais funções são as de enriquecimento proteico, promover maior rendimento e maior vida de prateleira em pães, dar volume e textura às massas, emulsionante e estabilizante de gorduras, antioxidante, reduzir a quebra de biscoitos (NUTRIMENTAL INDUSTRIA E COMÉRCIO DE ALIMENTOS, [199?]).

### **2.1.3. Processamento**

Nas indústrias processadoras, a soja é recebida e classificada de acordo com sua umidade e impurezas. Logo após, a soja sofre uma limpeza para a retirada de materiais grosseiros e finos (galhos, meio grão, etc.) através de um sistema de peneiras. Após estar limpa, a soja sofre secagem a fim de reduzir sua umidade ao nível de 12 %. Feito isso, a

soja é armazenada em silos, que mantêm a soja com umidade adequada (BARTOLOMAI, 1987).

O grão armazenado segue para o processamento, onde acontece a quebra do grão, separação da casca, trituração, laminação e em alguns casos extrusão. Todas estas etapas são aplicadas a fim de aumentar a superfície de contato do grão para a próxima etapa, a extração.

A extração é a etapa onde se obtêm o óleo de soja. Este é obtido industrialmente por extração por solvente em contracorrente. Os solventes mais usados são os derivados de petróleo e, erroneamente, diz-se que o solvente mais adequado para a extração é o hexano. Embora possa se extrair óleo de soja com hexano, o que é usado na realidade é a hexana, uma mistura de solventes orgânicos composta de: n-hexano, ciclohexano, metilciclopentano, 2-metilpentano e outros (RECH et al., 1998). A extração consiste em colocar a matéria-prima em contato com um solvente que tem afinidade com o óleo. A mistura de solvente e óleo, chamada de micela, é separada por evaporação do farelo desengordurado, que será utilizado posteriormente na extração de proteína. O óleo bruto pode ser refinado e vendido como óleo vegetal, ou hidrogenado para a produção de margarina. O farelo resultante da extração é seco para remoção do solvente residual, sendo obtidos depois de algum processamento produtos como: farinha integral pré-cozida, farinha desengordurada, proteína concentrada, proteína isolada, proteína texturizada, extrato hidrossolúvel em pó e hidrolisados.

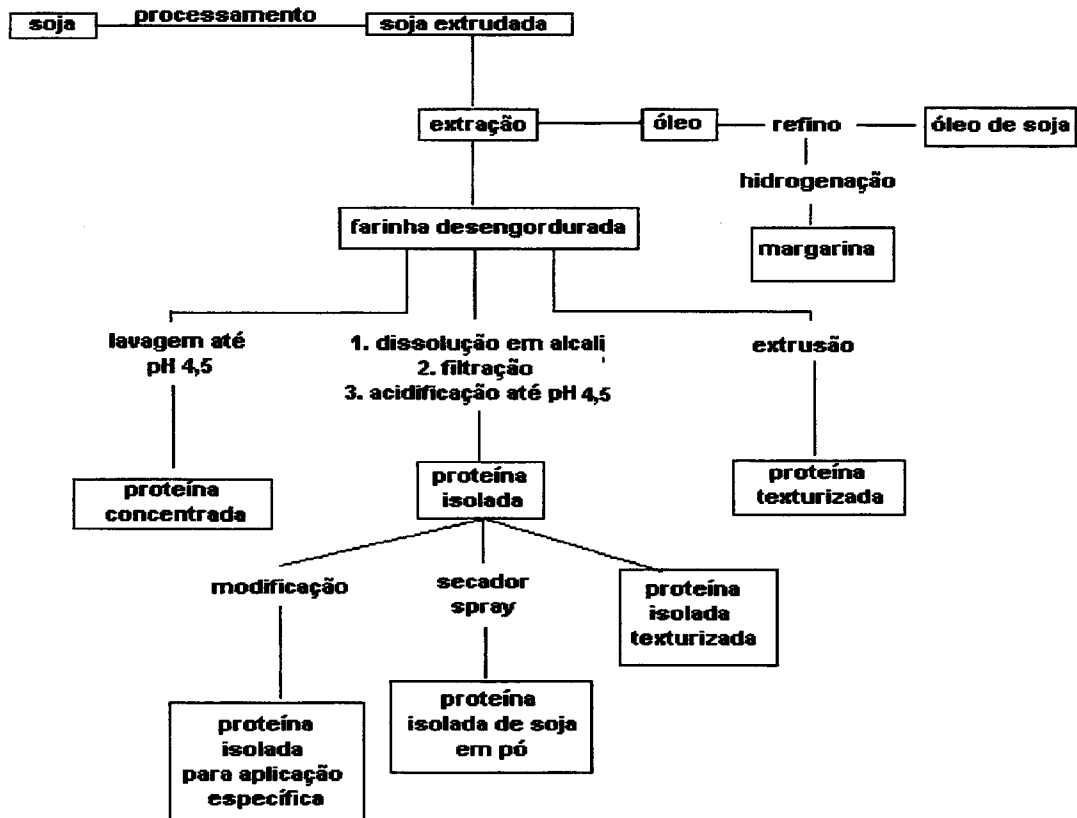
Uma etapa intermediária ainda é executada com a adição de água ao óleo para a remoção de fosfatídeos (lecitinas), ocorre a formação de uma goma, insolúvel na fase oleosa, que é separada com o uso de centrífugas. Embora se use no processo de extração

hidrocarbonetos, é importante ressaltar que a extração pode ser executada com outros solventes como etanol (SILVA & TURATTI, 1991).

A farinha desengordurada de soja é usada para a obtenção das proteínas de soja (texturizada, concentrada, isolada). A proteína texturizada é obtida fazendo-se a extrusão da farinha desengordurada, sendo que esta ainda pode ser modificada para atender os mais diversos fins. A proteína concentrada é obtida pela lavagem da farinha desengordurada com ácidos fracos em pH 4,5, contendo até 70 % de proteína. A fase insolúvel (proteínas e fibras) é separada do soro ácido por filtração ou centrifugação e secada, o soro ácido é tratado como efluente industrial. Para a obtenção da proteína isolada de soja, a farinha desengordurada é dissolvida em pH básico, filtrada ou centrifugada (retirando-se as fibras) e re-acidificada até o pH 4,5 ocorrendo a precipitação da proteína. Este coalho proteico pode ser seco por atomização (spray-drier), ou sofrer texturização (POTTER & HOTCHKISS, 1997). O soro ácido com açúcares da soja muito diluídos é tratado como efluente industrial. A principal diferença entre isolados e concentrados é que a proteína concentrada apresenta fibras, já que a farinha desengordurada é diretamente dissolvida em água e precipitada. Outra opção é a transformação das proteínas por enzimas como pancreatina (HETTIARACHCHY & KALAPATHY, 1997), por exemplo para a produção hidrolisados de proteínas, ou para a produção de isolados modificados com propriedades especiais (diferença de solubilidade, de retenção de ar, e outras propriedades) para a composição de outros alimentos. O processamento descrito para a soja é apresentado na Figura 2.5.



A extração da proteína concentrada e isolada de soja é feita tradicionalmente pela adição de ácidos e bases, embora existam outros métodos como a eletroacidificação e a extração com etanol.



**Figura 2.5.** Fluxograma simplificado do processamento da soja.  
Fonte: POTTER & HOTCHKISS, 1997.

A eletroacidificação também é usada para a obtenção de isolados. Esta técnica consiste em atingir o ponto isoelétrico da proteína da soja através dos íons  $H^+$  e  $OH^-$  provenientes da dissociação da água. Este método traz consigo a vantagem de não gerar resíduos de ácido e base (BAZINET et al., 1997). Além disso, não há desnaturação de proteínas como no método tradicional.

O processo de extração com etanol pode ser usado para obtenção de concentrados protéicos. O processo consiste na dissolução do farelo desengordurado em uma solução 60 % etanol mais 40 % água. Por extração são separadas duas frações, uma composta por

um concentrado alcoólico insolúvel contendo 66-70 % de proteína e outra líquida contendo principalmente açúcares. A fração líquida é destilada para a recuperação do solvente restando o chamado melado de soja, que é o único resíduo do processo de extração de proteína com etanol. O concentrado alcoólico é comercializado seco, obtendo-se proteína concentrada em pó.

## 2.2. Produção de etanol

O desenvolvimento de todo item 2.2. foi baseado nos livros clássicos de engenharia bioquímica, que são: BAILEY (1986), PIRT (1975), MCNEIL & HARVEY (1990) e DORAN (1995), DEMAINE et al. (1999).

O etanol é obtido há muito tempo para o consumo humano por via fermentativa, sob forma de bebidas destiladas e fermentadas. A preparação de etanol absoluto foi descrita pela primeira vez em 1796, quando foi destilado sobre carbonato de potássio. O uso extensivo de etanol iniciou depois de 1800 com o crescimento da indústria química (MAIORELLA, 1985).

Em 1941 o álcool industrial tinha uma série de aplicações como: solvente, germicida, combustível, anti-congelante e matéria-prima para sínteses químicas, e era obtido basicamente por fermentação. Durante a II Guerra Mundial houve grande carência de etanol, devido ao aumento do ritmo de produção em todas as áreas, em especial a produção de borracha sintética (MAIORELLA, 1985). Devido a esta carência, surgiu um novo processo para a produção de etanol, o qual era baseado na esterificação e hidrólise do etileno em solução aquosa de ácido sulfúrico concentrado (ANCIÃES, 1991).

Em meados de 1960, outro processo começou a ser usado: a hidratação catalítica do etileno em fase gasosa (SHERMAN & KAVASMANECK, 1978). Os métodos de obtenção de etanol por via sintética acabaram por dismantelar a indústria do etanol fermentativo. Isto ocorreu devido a constante evolução da indústria petroquímica desde a II Guerra Mundial, o que disponibilizou matérias-primas como o etileno. Outro fator determinante foi a evolução das tecnologias de síntese, com o desenvolvimento de

catalisadores de alta especificidade. A conversão obtida de etileno em etanol é muito mais alta que a de açúcar em etanol o que representa uma enorme economia.

Em 1973, o preço do barril de petróleo saltou de US\$ 2.59 para 11.65, devido a acontecimentos políticos mundiais (MAIORELLA, 1985). Este evento chamou a atenção do mundo para o fato de sermos extremamente dependentes do petróleo. Sendo assim, teve início uma busca global por fontes renováveis de combustível, o que despertou novamente o interesse na produção de etanol por fermentação.

O mais ambicioso programa de difusão de fontes alternativas de energia, teve início no Brasil em 1978, onde o governo brasileiro estruturou um plano para promover o consumo de etanol em parte significativa da frota automotiva do país. A meta era passar dos 4,14 ML/ano em 1978 para uma produção de 5 GL/ano em 1985. Para atingir esta meta foi estruturado um plano de incentivo ao cultivo da cana, subsídio ao álcool produzido, redução de impostos sobre os automóveis à álcool, além de uma série de outros incentivos e subsídios. Atualmente, o programa do álcool brasileiro encontra-se abandonado, tendo sido cortados quase todos os recursos que eram fornecidos em outras épocas.

### **2.2.1. Biossíntese**

A biossíntese do etanol, acontece depois de 12 etapas catalisadas por enzimas. Os produtos finais são etanol, dióxido de carbono, e calor. Uma parte deste calor é convertida em energia utilizável pela célula (ATP). A fonte clássica para produção de etanol é a glicose, embora outros açúcares possam também ser utilizados neste ciclo.

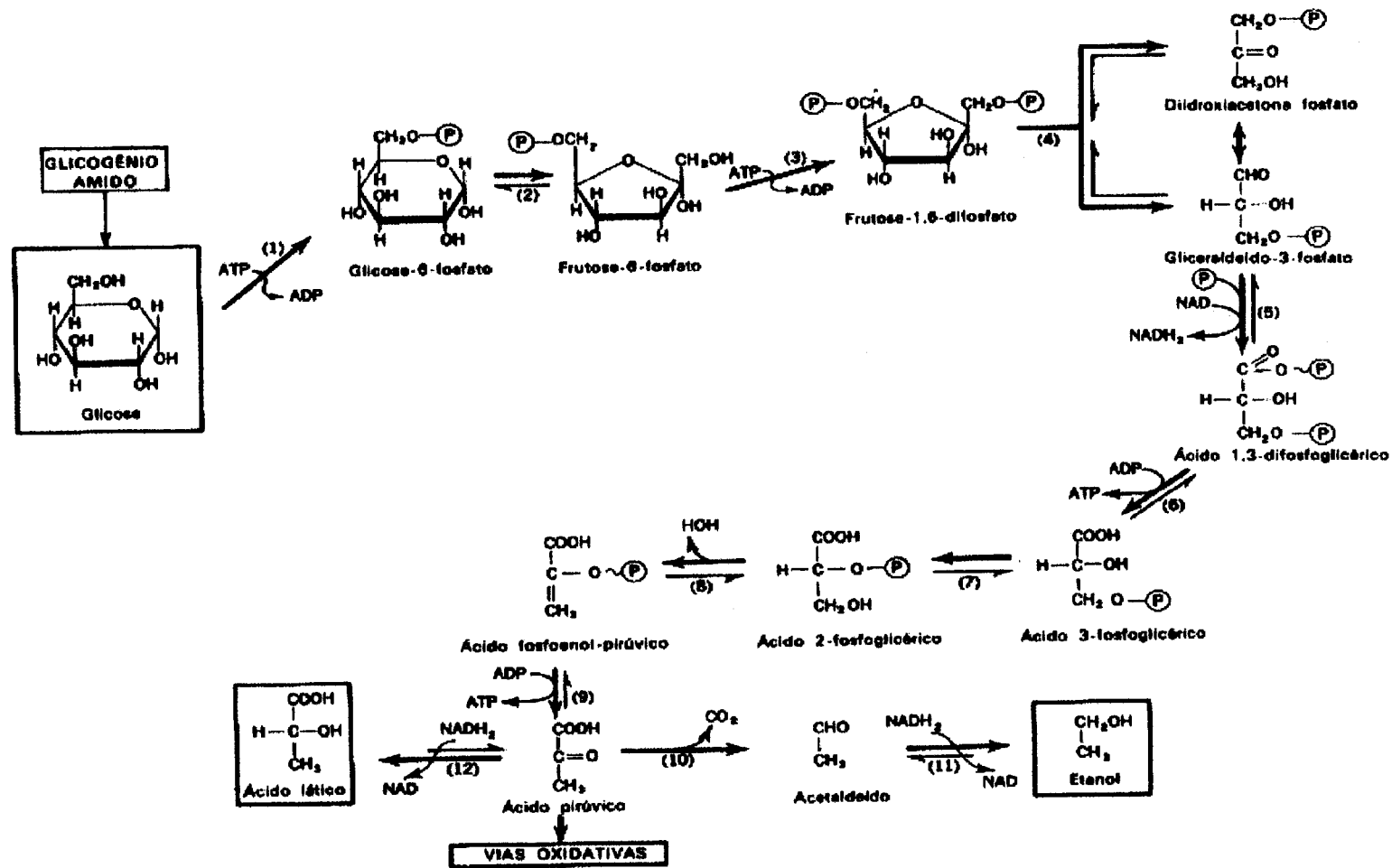


Figura 2.6. via glicolítica de Embden-Meyerhof  
 Fonte: BENNET & FRIEDEN, 1976

A seqüência de reações que acaba por resultar na formação de etanol é chamada de via glicolítica de Embden-Meyerhof (Figura 2.6.).

As enzimas envolvidas em cada reação são: (1) glicoquinase, (2) fosfoexoisomerase, (3) fosfofrutoquinase, (4) aldolase, (5) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, (6) fosfogliceratoquinase, (7) fosfogliceratomutase, (8) enolase, (9) piruvatoquinase, (10) carboxilase-pirúvica, (11) álcool desidrogenase, (12) desidrogenase láctica.

### **2.2.2. Matérias-primas**

Para a produção de etanol por fermentação são utilizadas matérias-primas de origem sacarínica, amilácea, celulósica, além de resíduos industriais que contenham um ou mais destes componentes. A escolha da matéria-prima é um fator importante no preço final do álcool produzido, pois determina o tipo de processo a ser empregado, e a localização da planta industrial.

#### **2.2.2.1. Matérias de origem sacarínica**

As matérias-primas de origem sacarínica são compostas por açúcares facilmente fermentecíveis (glicose, frutose, maltose, sacarose, etc.) não necessitando um pré-tratamento muito elaborado. O caldo de cana-de-açúcar, o caldo de beterraba, a polpa e o suco de frutas, o soro de queijo, e diversos tipos de melaços são comumente empregados na produção de etanol.

O preço destas matérias-primas varia muito pois a rigor podem compor outros produtos devido ao seu valor calórico. Estes materiais são, portanto, fontes bem mais caras do que as de origem celulósica e amilácea. Seus preços são regulados

principalmente pelo custo de transporte e por outros mercados, dependendo do produto, por exemplo no caso da cana pelo mercado do açúcar, no caso de frutas pelo mercado dos sucos, e em muitos outros casos pelo mercado de rações animais. No Brasil, o custo de transporte da cana-de-açúcar limita a implantação das fábricas de etanol a distritos agrícolas, e 43 % das plantas industriais processam a cana diretamente no local onde é feito o cultivo (MAIORELLA, 1985).

Segundo WEREKO-BROBBY & HAGAN (1997), o pré-tratamento aplicado as diferentes fontes sacarínicas é muito semelhante, empregando em geral água quente ou ácidos bastante diluídos para a extração dos açúcares. No caso da cana-de-açúcar, ela é primeiramente prensada por rolos, em seguida é adicionada água quente (85 °C) na proporção de 25 % do peso da cana, extraindo-se assim 85-90 % dos açúcares fermentecíveis. O resultado é um caldo com 12-16 % de sacarose.

O processo para a produção de etanol a partir do bagaço de frutas é bastante semelhante ao da cana. Frutas como laranja, maçã, e abacaxi, após terem seu suco extraído, ainda contém uma apreciável quantidade de açúcares no bagaço da sua polpa, que pode ser extraído com a adição de água quente. Estes processos são executados por alguns produtores de suco de frutas não só para produzir álcool, mas também para reduzir a DBO dos seus efluentes. O rendimento é de cerca de 1 L de etanol para 15-25 L de mosto utilizado.

O soro de queijo também pode ser usado para a produção de etanol, porque este resíduo possui cerca de 5,0 % de lactose. A lactose é um dissacarídeo composto de glicose e galactose, e é fermentado por poucos microrganismos como *Torula cremoris*, *Candida pseudotropicalis*, e *Kluyveromyces marxianus* por exemplo (CARVALHAL et al., 1996).

Melaços de várias origens são utilizados para a produção de etanol, sendo que os mais utilizados são os de beterraba, de milho e de cana. A Turquia e a França são os maiores produtores do mundo de melaço e a produção de cada um destes países chegou a 1 milhão de toneladas de melaço em 98, estimando-se que a produção de melaço na Europa foi de 7,8 milhões de toneladas em 98. Na sua grande maioria o melaço produzido na Europa é de beterraba, sendo um melaço mais caro, comercializado no ano de 98 a uma média de 82 ECU/ton contra os 66 ECU/ton cobrados pelo melaço de cana (F.O.LICHT, 1998). Os melaços comercializados têm um Brix mínimo de 79,5 e 43 % de açúcar; são usados não só para a produção de álcool mas também para a alimentação animal.

O melaço é uma solução com elevado teor de açúcares, o que facilita seu transporte e armazenamento. Como estas substâncias são geralmente concentradas por evaporação, ocorre decomposição térmica dos açúcares e a formação de inibidores da fermentação. Por esse motivo é possível converter apenas de 80 a 95 % dos açúcares em etanol, dependendo do tipo e procedência do melaço. A melhor opção para concentração do melaço é a evaporação a vácuo. No caso da evaporação convencional o resfriamento rápido (flash cooling) contribui para uma menor decomposição dos açúcares. Segundo MAIORELLA (1985), a decomposição dos açúcares ocorre principalmente pela desidratação e redução da frutose a 1,3 frutopiranosose, e pela combinação de glicose e frutose a aminoácidos, resultando em caramelos escuros que não são fermentecíveis. Açúcares também são decompostos pela volatilização de hidroximetilfurfural, ácido fórmico, ácido levulínico, e acetoina.

Além da decomposição dos açúcares outros fatores podem contribuir para reduzir a produção de etanol. A presença de sais de cálcio, a decomposição de componentes



orgânicos essenciais ao crescimento, bem como a eventual formação de substâncias tóxicas geradas durante a concentração do melão podem inibir o metabolismo microbiano.

Em muitos casos, antes da concentração, é adicionado CaO ao melão, e elevada a sua temperatura até 100 °C a fim de neutralizar ácidos orgânicos. Após o resfriamento ocorre a precipitação de sais, proteínas, gorduras e gomas. Este procedimento pode ser prejudicial pela formação de sais de cálcio. Feito o tratamento com cal é recolhido o sobrenadante, após o melão é concentrado e está pronto para ser comercializado.

O melão não pode ser prontamente utilizado como meio de cultura, necessitando ainda de algum tratamento antes de ser levado ao fermentador. Geralmente, baixa-se o pH até a faixa de 3 a 4 e eleva-se a temperatura até a faixa de 70 a 90 °C, ocorrendo a formação de precipitado, e também a hidrólise dos açúcares. Utiliza-se apenas o sobrenadante para a fermentação (melão clarificado). Este melão clarificado apresenta algumas vantagens, pois facilita a destilação do mosto. Além disso, a precipitação elimina os sais, embora ocorra a precipitação de fatores de crescimento e, por esse motivo, pode ser necessária a adição de nutrientes. Este tratamento quando realizado sob condições muito severas também pode causar degradação de açúcares.

#### **2.2.2.2. Matérias de origem amilácea**

Entre os substratos de origem amilácea podem-se incluir grão de cereais e raízes. O carboidrato presente na forma de amido não pode ser convertido diretamente em álcool necessitando de uma hidrólise prévia.

A matéria-prima é primeiramente descascada, classificada, hidratada, moída e cozida. O tratamento aplicado as matérias amiláceas faz com que o investimento em

novas plantas seja de 15 a 20 % maior que o de plantas para matérias de origem sacarínica.

Os cereais mais utilizados para a produção de etanol são o milho, arroz, trigo, cevada, e sorgo. Estes contêm de 50 a 65 % de amido, com exceção do arroz, que contém cerca de 80 %.

O cozimento é feito a fim de liberar o amido contido no grão para a posterior hidrólise. O cozimento pode ser feito a pressão atmosférica, ou a baixa pressão (até 3 atm), ambos com pH ácido (4-5) durante um tempo que varia de 10 a 30 minutos. O resfriamento deve ser rápido, e para isso deve-se abaixar a pressão, sendo que o calor proveniente deste resfriamento geralmente é utilizado em outros locais da planta.

À temperatura abaixo de 65 °C é feita a adição de enzimas, se o processo de hidrólise for enzimático. Outra opção seria o uso de microrganismos como o *Rhizopus delemar*, o *Mucor rouxii*, ou cepas de *Aspergillus*, que promovem a sacarificação do amido. A hidrólise química também pode ser empregada. Neste método usa-se altas temperatura (na faixa dos 180 °C), e pHs baixos (3-4), por tempos relativamente longos (10-30 minutos) (PARK & PASTORE,1986).

Apesar das dificuldades para seu processamento, matérias primas ricas em amido são bastante usadas para produção de etanol devido a sua atrativa produtividade e disponibilidade. Batatas são usadas já há muito tempo como substrato na produção de vodca. Durante a II guerra mundial foram usadas para produzir álcool obtendo-se um rendimento de 4700 L<sub>etanol</sub>/ha; batatas-doce podem produzir 7200 L<sub>etanol</sub>/ha, embora o custo final deste álcool seja proibitivo. Atualmente, o que são usados são os resíduos de plantas processadoras de batatas (MATIC,1997). No Brasil, 9 % do etanol é produzido a partir da mandioca, com um rendimento de 19000 L<sub>etanol</sub>/ha. O uso de amido para

produção de etanol é tão vantajoso e versátil que nos EUA o etanol já foi produzido a partir de cactus, o que configura uma grande vantagem pois pode-se cultivar estas plantas em solos ociosos como os desertos.

### **2.2.2.3. Matérias de origem celulósica**

As lignoceluloses (celulose, hemicelulose, lignina, etc) são as moléculas que conferem aos vegetais sua rigidez e estrutura, por este motivo estão presentes em todas as plantas. A celulose é um polímero extremamente grande formado por glicose e outros compostos. Quando hidrolisada, libera grande quantidade deste monômero. Para cada 1 Kg de sementes colhidas estima-se que 1 a 1,5 Kg de palhas, sabugos, cascas e outros resíduos ricos em celulose sejam gerados.

O processo de produção de etanol a partir da celulose é, sem dúvida, o que requer as condições mais severas, e maior gasto de energia. Pode ser feito uma hidrólise química rápida ou lenta, ou pode-se utilizar também uma hidrólise enzimática.

No caso da hidrólise química lenta utiliza-se reatores com injeção direta de vapor na ordem de 350 KPa e aumenta-se a pressão durante o processo até 1135 KPa, ácido sulfúrico diluído (0,5 %) é percolado continuamente através da matéria-prima. O processo todo dura de 2,5-3,0 horas. O volume final de líquido é grande e por este motivo contém apenas 5 a 6 % de açúcares, 80 % destes fermentecíveis e o grande volume torna a fermentação e a destilação extremamente caras. A conversão de celulose em açúcares é baixa, e um mau resfriamento do reator ao final do processo pode induzir a formação de furfural e ácido levulínico, que são poderosos inibidores do metabolismo microbiano.

A hidrólise química rápida é semelhante à lenta com a diferença que utiliza vapor superaquecido (240 °C) de alta pressão e seu rendimento em açúcares é menor (cerca de 60 %), embora o tempo de processamento seja da ordem de minutos.

O método enzimático de hidrólise da celulose evita vários dos problemas causados pela hidrólise ácida, pois é executado à temperatura e pressão ambiente o que reduz consideravelmente os custos em equipamentos e operação. A decomposição de açúcares é eliminada pela especificidade destes catalisadores, além da menor geração de resíduos já que não há a etapa de neutralização e purificação do meio antes da fermentação.

Embora o custo das enzimas seja razoável, este ainda é um método em desenvolvimento, e com certeza merece uma atenção maior para a sua otimização, pois apresenta grandes vantagens. Talvez a solução para estes problemas seja a sacarificação e fermentação simultânea, realizada por cepas específicas, método este que vem sendo desenvolvido apenas em escala piloto até o momento.

Apesar de todas estas dificuldades para a conversão da celulose em açúcares, existe um caso em especial que merece ser citado. O resíduo resultante do processo Kraft (processo sulfito) para produção de papel, gera um licor que contém uma diluída solução de açúcares que é gerada pela hidrólise indesejada da celulose durante a fabricação do papel (SMITH; CAMERON; DUFF,1997). Este licor, após ter suas toxinas neutralizadas, pode ser usado para produção de etanol. Apesar da baixa produtividade é um processo vantajoso já que a matéria-prima tem custo zero. Além disso, esta medida é extremamente vantajosa na redução da DBO deste efluente.

A rápida e eficiente conversão de pentoses, em especial a xilose (presente em hidrolisados de madeira), são a chave para o aumento da produção mundial de etanol. O

desenvolvimento de cepas capazes de desempenhar estas tarefas vem sendo perseguido (HIMMEL;BAKER;OVEREND,1994). Já cepas *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo modificadas geneticamente para fermentar os mais diversos substratos, entre eles a xilose (HO;CHEN;BRAINARD, 1998;WALFRIDSSON, 1996).

### **2.2.3. Microrganismos utilizados**

A fermentação alcóolica pode ser conduzida por leveduras, bactérias, e fungos, embora existam alguns parâmetros para a escolha do microrganismo mais adequado.

Quando o objetivo é a produção de altas concentrações de etanol (8 a 16 %) os microrganismos mais indicados são as leveduras, devido a sua resistência ao etanol e à alta concentração de açúcares. O processo realizado com leveduras ocorre de forma mais lenta, que o com bactérias, mas ,em compensação, está menos exposto a contaminações já que a operação pode ser feita a pHs baixos, que são intoleráveis para a maioria dos microrganismos contaminantes.

Quando o objetivo é a produção de etanol em um curto espaço de tempo, ou quando a concentração de açúcares é baixa, os microrganismos mais indicados são as bactérias. As bactérias, devido a sua constituição, tem menor tolerância ao etanol e à alta concentração de açúcares, porém seu crescimento vegetativo é muito mais rápido do que o das leveduras e fungos. Como o etanol é produto associado ao crescimento, o uso de bactérias é melhor com mostos diluídos, pois se obtêm mais produto em um menor espaço de tempo. O seu uso é muito difundido em processos contínuos e semi-contínuos por reunirem justamente estas características.

O uso de fungos é restrito a casos especiais. Geralmente são usados em processo em que há hidrólise e fermentação simultaneamente, pois estes produzem uma grande

variedade de enzimas, como no caso do uso de amido e celulose como substrato. Em processos tradicionais com mostos sacarínicos os fungos não são usados pois a medida que o processo se desenrola os fungos filamentam causando drásticas mudanças na reologia do meio, o que dificulta a fermentação e a posterior purificação.

Podem ser aplicadas combinações de microrganismos como por exemplo *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces* (ABATE et al., 1996) aproveitando o que há de melhor em cada microrganismo: a rápida produção de etanol das bactérias e a alta resistência a etanol das leveduras.

De um modo geral, os microrganismos utilizados para produção de etanol devem ter características como: pH ótimo de fermentação baixo, temperatura ótima de crescimento alta, resistência ao stress mecânico e químico, resistência ao etanol e açúcares, especificidade na produção do etanol (produzir o mínimo possível de produtos secundários).

Os microrganismos mais importantes industrialmente são as bactérias termofílicas como *Clostridium thermosaccharolytium*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Zymomonas mobilis*, *Pachsolon tannophilus* e outras, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (diversas variedades), *Saccharomyces ellypsoideus*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces fragilis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torula cremoris*, *Candida pseudotropicalis*, e outras, os fungos do gênero *Trichoderma*, *Fusarium*, *Phanerochaet*, além de outros microrganismos, incluindo microrganismos recombinantes (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 1999).

#### **2.2.4. Fatores que afetam a produção de etanol por leveduras**

A grande maioria das fermentações alcoólicas é realizada por leveduras em sistemas descontínuos. Alguns fatores como: quantidade de inóculo, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, cepa utilizada, concentração de etanol, presença de nutrientes, presença de inibidores, presença de contaminantes e agitação, são fundamentais no processo de obtenção de etanol. Embora existam tantas variáveis a serem observadas apenas algumas poucas são controladas e monitoradas na prática. A seguir, serão apresentadas estas variáveis e seus efeitos. Esta abordagem está direcionada ao processo com leveduras pois é o mais utilizado, embora muito do que é apresentado a seguir também valha para outros microrganismos.

##### **2.2.4.1. pH**

A concentração de íons hidrogênio tem grande influência na fermentação alcoólica, no sentido de evitar contaminações, promover rápida formação do produto, e evitar desvios de rota metabólica. Geralmente as fermentações alcoólicas são realizadas com pHs na faixa de 3,5 a 6, dependendo do tipo de levedura empregada. O valor de pH deve ser igual ao valor ótimo de crescimento da levedura, já que a produção de etanol é ligada ao crescimento. Na prática, o pH é sempre mantido ácido, por que isso retarda a ação de bactérias do ambiente. Valores muito altos de pH provocam desvio da rota metabólica, promovendo o surgimento de glicerol, acetato, ácidos orgânicos, além de etanol. Embora leveduras sobrevivam em pHs na faixa de 2 a 8,6, abaixo de 3,5 não há mais formação de etanol, por este motivo este parâmetro é controlado industrialmente.

#### 2.2.4.2. Cepa utilizada

A cepa utilizada deve ser específica ao tipo de carboidrato presente no mosto. As leveduras tem grande dificuldade em fermentar celobiose, xilose, arabinose, ramnose, melibiose, amido, e outros carboidratos de alto peso molecular. A levedura mais usada para a produção de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae* devido ao seu crescimento vigoroso, e sua versatilidade de fermentar vários tipos de açúcares.

Com exceção de poucas cepas, pode-se afirmar que as leveduras são capazes de metabolizar glicose, sacarose, lactose, melibiose, trealose e rafinose, embora os 3 últimos açúcares possam ser consumidos pela maioria das leveduras apenas em condições aeróbias, o chamado efeito Kluyver

Segundo WAYMAN & PAREKH (1990) é importante ressaltar algumas regras que podem ser observadas quando se utilizam leveduras, tais como:

- a) Se a levedura não fermenta glicose, não fermenta nenhum outro açúcar;
- b) Se a levedura fermenta glicose, fermenta manose;
- c) Se a levedura fermenta maltose, não fermenta lactose, e vice-versa (com algumas exceções como a levedura *Brettanomyces clausenii* que fermenta ambos);
- d) Se a levedura fermenta sacarose, fermenta rafinose;
- e) Todos os açúcares fermentados podem ser utilizados aerobiamente.

#### 2.2.4.3. Concentração de açúcares

Industrialmente, a quantidade de açúcares é mantida na faixa de 10 a 20 %. Valores abaixo de 10 % são inviáveis economicamente devido ao maior custo energético



requerido pelo processo, pois o volume a ser fermentado e purificado é grande. Quantidades entre 20 e 30% tem a cinética de formação de etanol desfavorável, por que concentrações nesta ordem de grandeza são inibitórias devido a alta pressão osmótica que encerram. Concentrações acima de 30% causam plasmólise das células.

O carboidrato presente inicialmente no mosto deve ser calculado de forma que todo o substrato seja consumido, atingindo um nível de formação de etanol próximo do máximo suportável pelo microrganismo.

#### **2.2.4.4. Temperatura**

A faixa de temperatura comumente usada em fermentações alcoólicas está entre 30 e 40 °C. Para a maioria das leveduras quando a fermentação atinge cerca de 8 % em volume de etanol antes da conclusão da fermentação, esta pode ser interrompida se não forem aplicadas temperaturas acima de 33 °C. Isto ocorre porque nestas condições o etanol é produzido com maior velocidade do que pode ser transportado através da membrana da célula, ocorrendo o acúmulo de etanol intracelular, o que causa a inibição de enzimas ligadas à fermentação. A temperatura ótima de crescimento para as leveduras é citado pela maioria dos autores como sendo na faixa dos 25 °C, mas este valor deve ser sempre maior quando a levedura encontra-se em meios muito ricos como no caso de fermentações alcoólicas.

#### **2.2.4.5. Concentração de etanol**

Uma das grandes limitações da fermentação alcoólica é a própria presença do etanol, já que em altas concentrações ele pode desnaturar enzimas e proteínas, afetar a

síntese de proteínas, afetar a assimilação de produtos e atacar a parede celular (RÉVILLION, 1994). Os níveis mais altos de produção de etanol registrados para leveduras são da ordem de 16 % em volume. Embora este valor nunca seja perseguido industrialmente, já que depois de se atingir cerca de 10 % em volume, a cinética de formação de etanol fica extremamente desfavorável, não valendo a pena suprir energia ao processo para se obter níveis mais altos de etanol. Sabe-se que a maior tolerância ao etanol está ligada a presença de ácidos graxos insaturados e grupos acil presentes na membrana da célula (WAYMAN & PAREKH, 1990), leveduras com baixa tolerância a etanol tem baixos índices de lipídios em suas membrana e baixa permeabilidade ao etanol, o que acaba causando acúmulo dentro da célula.

#### **2.2.4.6. Quantidade de inóculo**

A quantidade de inóculo determina o tempo de processo. O uso de inóculo grandes fazem com que a fermentação seja concluída mais rapidamente. Na produção comercial de álcool em batelada, as leveduras são adicionadas de forma que se tenha uma população da ordem de 7 a 10 milhões de células/mL, ou 0,2g/L de leveduras liofilizadas. Nestas quantidades a fermentação leva 1 ou 2 dias para estar completa dependendo da quantidade de açúcar no mosto. Inóculos muito maiores podem ser usados (10 g células/L ou mais), isto resulta em uma fermentação muito mais rápida, além de suprimir a ação de contaminantes.

#### **2.2.4.7. Oxigênio dissolvido**

A fermentação alcoólica não é um processo completamente anaeróbio. Oxigênio dissolvido em pequenas quantidades é importante neste processo, já que as leveduras não conseguem multiplicar-se mais que 4 ou 5 gerações sem pelo menos a presença de 1 ppm de oxigênio (WAYMAN & PAREKH, 1990). Em algumas plantas industriais, oxigênio é suprido em grandes quantidades na fase inicial de fermentação (ou na preparação do inóculo) para promover o rápido crescimento das leveduras.

Depois dos carboidratos, nitrogênio e vitaminas, o oxigênio é o fator mais importante em fermentações alcoólicas, pois quando o oxigênio é esgotado completamente a fermentação tem uma queda brusca de suas taxas. Por outro lado, quando o carboidrato é esgotado completamente, o etanol pode ser consumido como fonte de carbono em condições aeróbias. Por este motivo a quantidade de oxigênio deve ser monitorada para o suprimento adequado de oxigênio.

A influência que o oxigênio pode ter sobre os processos fermentativos são descritos pelos efeitos Pasteur, Custers, Kluyver e Crabtree.

Quando um organismo é capaz de metabolizar açúcares sob condições aeróbias ou anaeróbias, geralmente o processo fermentativo é menos ativo sob condições aeróbias do que anaeróbias. A decrescente eficiência da glicólise na presença de oxigênio é chamada de efeito Pasteur. Esta inibição somente ocorre de maneira significativa quando a taxa de respiração em condições aeróbias é alta comparada à taxa de fermentação (LAGUNAS, 1986). Em condições anaeróbias, os produtos reduzidos têm que ser reoxidados pela fermentação. Em condições aeróbias, a reoxidação ocorre principalmente pela respiração. Isso explica o estímulo anaeróbio da fermentação, pois em condições anaeróbias a competição entre a fermentação e a respiração não ocorre.

O efeito Custers é o oposto do efeito Pasteur e é encontrado especialmente em espécies de *Brettanomyces* e consiste na inibição da fermentação na ausência de oxigênio. Esse fenômeno pode ser explicado em termos de balanço de NADH. WIJSMAN et al. (1984) descobriram que a levedura *Brettanomyces intermedius* pára imediatamente a fermentação e o crescimento com a modificação das condições microaeróbias para anaeróbias. Contudo, quando a acetoína, um acceptor de hidrogênio, é adicionada a essas culturas anaeróbias, a habilidade de fermentar e crescer é prontamente restabelecida. Estes autores explicaram o efeito Custers em *B. intermedius* em termos da inabilidade dessa levedura de formar glicerol. Como *B. intermedius* têm a tendência de formar acetato em qualquer circunstância, o NADH produzido não pode ser reoxidado pela formação de glicerol. A adição de acetoína resulta no reequilíbrio do balanço de NADH.

Algumas leveduras só conseguem utilizar alguns tipos de açúcares sob condições aeróbias, esta observação é chamada efeito Kluyver. O mecanismo do transporte de açúcares dependente de oxigênio ainda é desconhecido. Contudo, o efeito Kluyver não pode ser explicado por uma única teoria geral, já que o oxigênio pode participar em diversas reações dentro da célula.

Um outro efeito fisiológico é o chamado efeito Crabtree, que consiste na "fermentação aeróbia" da glicose. O efeito Crabtree é explicado em termos da necessidade de reoxidação de NADH seja através da via respiratória ou fermentativa (FIECHTER et al., 1981). A fermentação alcoólica aeróbia em meio de glicose é energeticamente desfavorável e somente ocorre, segundo KÄPPELI(1986), porque a capacidade respiratória (de espécies de *Saccaromyces*) não é suficiente para competir efetivamente com a fermentação por NADH. Este efeito pode ser observado em plantas

de produção de leveduras para panificação. Neste processo, é essencial obter-se um alto rendimento celular sobre o substrato rico em fontes de carbono (açúcares). O processo moderno de produção de leveduras de panificação é conduzida em reatores de batelada alimentada (BARFORD, 1987). A taxa de crescimento durante a produção é mantida abaixo de  $0,2 \text{ h}^{-1}$  pela regulação do suprimento de açúcar. Essa taxa de crescimento é inferior à taxa de crescimento máxima desse organismo. A razão pela qual a taxa de crescimento é mantida em um valor sub-máximo é que em altas taxas de crescimento a fermentação alcoólica se torna dominante (POSTMA et al., 1989). Obviamente, esse é um caminho indesejável pois a produção de etanol representa perda de substrato e uma diminuição do rendimento celular.

Na prática, a fermentação alcoólica não pode ser completamente evitada na produção de leveduras em uma baixa taxa de crescimento. Isso é devido ao fato que a homogeneização de grandes fermentadores industriais ( $> 200 \text{ m}^3$ ) não é perfeita. A mistura imperfeita do meio leva a diferentes gradientes de concentração de açúcares. Em algumas zonas do reator, conseqüentemente, a concentração de açúcar é mais alta. Sabe-se que mesmo que as células cresçam numa taxa de crescimento moderada, altas concentrações de açúcar levam à produção de etanol. Durante o processo de produção as células de levedura são expostas a uma baixa concentração de açúcar mas, quando as células subitamente entram em uma região onde a concentração de açúcar é elevada, a via fermentativa é acionada rapidamente. Esse efeito passageiro é chamado de efeito Crabtree de curta duração, o qual é diferente da fermentação alcoólica que ocorre em condições estáveis em altas taxas de crescimento e que é chamado de efeito Crabtree de longa duração.

A imperfeita homogeneização durante a produção de leveduras de panificação também resulta na ocorrência de gradientes de oxigênio. Em algumas zonas do reator, a taxa de transferência de oxigênio pode limitar a taxa de respiração e, conseqüentemente, levar a fermentação alcoólica. Portanto, é importante diferenciar entre o efeito do oxigênio e do açúcar.

#### **2.2.4.8. Presença de nutrientes**

Vários nutrientes devem estar presentes a fim de suprir as necessidades fisiológicas das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica. Os principais são sem dúvida as fontes de carbono, já discutidas exaustivamente ao longo desta revisão, e as fontes de nitrogênio.

A maioria das leveduras cresce muito bem sobre uma grande variedade de fontes de nitrogênio. Aproximadamente 15 mg de nitrogênio (assimilável) por 100 mL de mosto é o suficiente para um bom crescimento celular. Geralmente um meio rico em diferentes aminoácidos é mais eficiente que um meio contendo apenas um tipo de aminoácido. Industrialmente o nitrogênio é fornecido na forma de sais de amônia, úrea, malte, ou resíduos vegetais.

Além destes constituintes fundamentais a qualquer cultivo, substâncias como fósforo, enxofre, potássio, magnésio, zinco, ácidos graxos insaturados, vitaminas, esteróis, e outros, devem estar presentes em mostos para fermentação alcoólica. Cada um destes compostos tem uma função definida na fisiologia das leveduras. A quantidade necessária varia para cada um destes compostos, embora todas as concentrações sejam da ordem de mM por grama de células, a presença a níveis ligeiramente maiores pode causar inibição.

#### 2.2.4.8.1. Fósforo

O fósforo só é absorvido na forma do íon ortofosfato,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . O principal papel do fósforo é como um componente de açúcar-fosfatos, ácidos nucleicos e nucleosídeos di ou trifosfatos. Ele também é encontrado como fosfatos inorgânicos condensados na forma de polímeros lineares, os polifosfatos, importantes na regulação do metabolismo celular e como reserva de fosfatos e energia. A concentração intracelular de  $\text{PO}_4^{3-}$  regula a síntese de lipídios e carboidratos.

Tanto  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  podem servir como fonte de fósforo. Sabe-se que o íon  $\text{K}^+$  estimula a absorção de fosfato pois ele é co-transportado com  $\text{PO}_4^{3-}$  para dentro da célula. Consequentemente,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  é uma fonte fosfatada superior à  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , particularmente na ausência de outra fonte de  $\text{K}^+$ .

#### 2.2.4.8.2. Enxofre

Sessenta por cento do enxofre celular é incorporado na forma de aminoácidos que contêm enxofre. Do restante, 5% é sulfato inorgânico osmoticamente livre e sulfato ligado ou aminoácidos livres. O enxofre também é encontrado em algumas vitaminas e outros compostos sulfídricos.

Enxofre inorgânico na forma de íon sulfato,  $\text{SO}_4^{2-}$  é o mais comumente utilizado em meios de cultura na forma de  $\text{K}_2\text{SO}_4^{2-}$  ou, mais freqüentemente,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A absorção ativa de sulfato está relacionada com a disponibilidade da homocisteína que provoca sua incorporação formando cisteína. Somente a metionina, entre os aminoácidos que contêm enxofre, pode ser usada como única fonte de enxofre, de fato ela proporciona um maior e mais rápido crescimento do que  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Alterações na fermentação alcoólica podem ocorrer com a adição de sulfito de sódio: o acetaldeído é imobilizado junto com o bisulfito formando um complexo, o glicerol é formado como produto principal

#### **2.2.4.8.3. Potássio**

A grande quantidade de potássio encontrada na análise dos compostos elementares das leveduras reflete a função fisiológica central deste íon. As importantes funções do potássio são as seguintes :

a) Atua como um cátion regulador interno bivalente; para cada íon metálico bivalente absorvido  $2K^+$  são excretados;

b) Em baixo pH ele estimula a fermentação e a respiração. Demonstrou-se que isto é devido aos elevados níveis de NADPH, ADP e fosfato inorgânico (PÊNA, 1981);

c) Age como um ativador de uma variedade de enzimas como a piruvatoquinase, aldolase, aldeído desidrogenase e ATPases membranares (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1984);

d) É um componente estrutural do RNA;

Fontes de potássio incluem KCl ,  $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$ . Somente metade da quantidade de potássio é absorvida pela respiração das leveduras comparada com a fermentação.

#### **2.2.4.8.4. Magnésio**

O magnésio está envolvido em muitas funções importantes para o metabolismo das leveduras (BERRY, D. R; STEWART, G.C, RUSSELL, I., 1987):



a) É necessário para o bom funcionamento de mais de 100 enzimas como um cofator ou ativador. Como tal, ele participa nas seguintes importantes áreas do metabolismo:

- a.1) ativação de enzimas glicolíticas;
- a.2) estimulação da síntese de ácidos graxos essenciais;
- a.3) regulação dos níveis iônicos celulares;
- a.4) ativação da ATPase de membrana;
- a.5) junto com  $K^+$  está envolvido na absorção de fosfato;

b) Tem uma função estrutural e é associado aos ribossomos, membranas celulares e ácidos nucleicos.  $MgCl_2$  e  $MgSO_4$  são as duas fontes de magnésio normalmente utilizadas. O efeito de sustentação do crescimento do magnésio é dependente da presença de  $Zn^{+2}$ , que também deve ser adicionado. A deficiência em magnésio resulta na síntese de acetato em detrimento de etanol;

#### **2.2.4.8.5. Zinco**

Segundo BERRY, D. R; STEWART, G.C, RUSSELL, I (1987), o zinco têm várias funções no metabolismo das leveduras:

- a) É um cofator essencial para várias enzimas, e é essencial para a glicólise;
- b) É necessário para a síntese de algumas vitaminas;
- c) Estimula a absorção de maltose e maltotriose.

#### 2.2.4.8.6. Outros íons

Cobre, cobalto, níquel, arsênico, chumbo, iodo, molibdênio, boro, alumínio, cromo e vanádio são encontrados na composição elementar da levedura. Contudo, o único efeito documentado do arsênico, chumbo, alumínio, cromo e vanádio é o de inibir o crescimento e a fermentação (BERRY, D. R; STEWART, G.C, RUSSELL, I., 1987). Alguns íons como o cobre podem ser adicionados no meio, mas somente em concentração na ordem de traços, apesar de comumente considerar-se sua presença como uma impureza nos reagentes microbiológicos.

#### 2.2.4.8.7. Vitaminas, esteróis, e outros

A síntese de ácidos graxos insaturados e ergosterol nas leveduras ocorre somente na presença de oxigênio. Contudo, células em crescimento anaeróbio estrito necessitam de ambos os fatores, logo devem ser supridos em fermentações alcoólicas.

A levedura requer para seu crescimento traços de biotina, tiamina, piridoxina, pantotenato de cálcio e inositol. Vitaminas são também coenzimas, e sua presença é fundamental para a completa atividade de enzimas. Embora a presença de vitaminas seja uma necessidade dependente da cepa em questão, *Candida utilis* e *Hansenula anomala* crescem independentemente da presença de vitaminas, enquanto as cepas do gênero *Saccharomyces* são dependentes de biotina e pantotenato.

O inositol têm um importante papel na composição lipídica da célula, que é um fator crítico na manutenção do estado fisiológico da membrana celular. Após sua absorção, o inositol é convertido em fosfatidilinositol, que serve como um precursor para a síntese de lipídios contendo inositol, como os trifosfoinositídeos. Somente a forma *meso* é absorvida e utilizada, tendo papel fundamental na regulação da taxa de

fermentação. As leveduras normalmente não apresentam uma necessidade absoluta de inositol visto que ocorre biossíntese deste composto no citoplasma da levedura, conseqüentemente as células são capazes de crescer em meios desprovidos do mesmo.

O desbalanço ou deficiência da tiamina (vitamina B1), tem grande influência na fisiologia das leveduras, a tiamina está ligada a:

- a) competência respiratória;
- b) formação de ácidos graxos, esteróis e lipídios;
- c) glicólise e produção de etanol.

#### **2.2.4.9. Presença de inibidores**

Traços de elementos como prata, arsênico, mercúrio, em concentrações na ordem de 10 a 100  $\mu\text{M}$ , são tóxicos às leveduras. Além destes, detergentes, ácido sórbico, DEP e antibióticos (ciclohexamida, antimicina e nistatina). Em fermentações de hidrolisados de lignocelulose, ácido acético, furfural e ligno derivados fenólicos (AQUARONE; BORZANI; LIMA,1975).

Durante a fermentação grandes quantidades de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) são liberadas. Esta quantidade de  $\text{CO}_2$  gerada deve ser expulsa do biorreator pois o seu acúmulo causa aumento da pressão. O aumento da pressão faz com que o  $\text{CO}_2$  se dissolva mais facilmente no mosto, o que baixa o pH e pode ocasionar parada precoce da fermentação. O  $\text{CO}_2$  em excesso também altera a ação de enzimas, influência a permeabilidade da membrana celular e também pode alterar sua estrutura. Nota-se inibição pela ação do  $\text{CO}_2$  a partir de níveis mais altos que 0,02 M no mosto.

#### **2.2.4.10. Contaminantes**

Os dois mais comuns contaminantes em fermentação alcoólica são as bactérias que produzem ácido acético (espécie *Acetobacter*) e as bactérias que produzem ácido láctico (espécies *Lactobacillus* e *Streptococcus*). As bactérias lácticas são um problema mais sério, pois multiplicam-se em pHs baixos e em anaerobiose (NETO & YOKOYA, 1997; NARENDRANATH, 1997). Já as bactérias que produzem ácido acético só crescem com a presença de oxigênio, são infecções mais grosseiras que aparecem durante a confecção do inóculo, ou quando o reator contém muito oxigênio dissolvido. Uma limpeza eficiente, esterilização do meio de cultura e a adição de inóculos grandes garantem um processo livre de sérias contaminações.

#### **2.2.4.11. Agitação**

Qualquer processo de cultivo de células é afetado pela agitação, pois quanto maior a agitação maior é a probabilidade do microrganismo encontrar-se com os nutrientes presentes no meio, respeitando é claro os limites de resistência mecânica do microrganismo. A agitação no caso da fermentação alcoólica tem a função de homogeneizar o meio de cultura, e de dissolver a micro-quantidade de oxigênio necessário ao processo.

#### **2.2.5. Processo**

A produção de etanol é um processo anaeróbio. A fermentação alcoólica é um processo associado, já que a formação de produto é associada ao crescimento celular.

Em relação ao metabolismo, a fermentação é classificada como desassimilativa, pois há degradação do substrato, e o produto tem peso molecular menor que o substrato.

O regime de produção de etanol pode ser batelada (descontínuo), contínuo ou batelada alimentada.

No processo descontínuo, o mosto é colocado de uma vez só junto com o inóculo. Ao atingir a produção máxima de etanol, o processo é finalizado e o biorreator é esvaziado e lavado. As velocidades de consumo de substrato e crescimento celular variam ao longo do processo. Este regime de operação é o mais utilizado na indústria devido a facilidade de operação e controle do processo, embora não seja o processo que apresente melhor rendimento.

No processo contínuo o substrato é adicionado continuamente de modo que sua concentração fique constante, ao mesmo tempo que retira-se o mosto fermentado de modo que o volume total permaneça constante. A velocidade de crescimento e de consumo de substrato são constantes e vão depender da concentração do substrato limitante. O processo contínuo por ser um processo que se prolonga por um tempo grande, favorece a ocorrência de mutações nos microrganismos facilitando a seleção destes microrganismos mutantes. A maior dificuldade é manter a esterilidade do fermentador. Este processo é pouco utilizado industrialmente pois o etanol é um produto de baixo valor agregado não justificando uma operação cara como esta.

Os processos contínuos possuem algumas vantagens sobre os processo em batelada: os fermentadores são menores em tamanho ou em número, a destilação pode ser feita de maneira contínua, a produtividade é maior, há menores gastos de energia. O processo batelada por sua vez também tem suas vantagens, que são: maior concentração do produto final, menor necessidade de controles automáticos e pessoal especializado, a planta é mais simples e barata de ser construída e mantida.

O processo de batelada alimentada é na verdade um processo descontínuo semelhante ao de batelada, onde em determinado momento, inicia-se uma alimentação controlada de substrato. Este tipo de condução de processo tem a vantagem de permitir um maior rendimento final, e de impedir a inibição da formação do produto por causa da concentrações iniciais elevadas de um substrato. É usado por poucas empresas pelo mesmo motivo do processo contínuo, ou seja complexidade e custo de operação.

A fermentação alcoólica é realizada na maioria das vezes em condições não-estéreis ou semi-estéreis, embora a condição ideal fosse a de esterilidade absoluta. Em um processo não-estéril as próprias condições de fermentação (pH ácido, temperaturas altas, pressão osmótica elevada) evitam a ocorrência de contaminações. No caso da fermentação semi-estéril é feito um tratamento térmico para diminuir a contaminação do meio, mas a fermentação não é conduzida de forma asséptica.

### **2.2.5.1. Principais equipamentos**

#### **2.2.5.1.1. Propagador**

São utilizados para obter células sendo, portanto, biorreatores de pequeno porte. Em pequena escala os propagadores podem ser frascos Erlenmeyer colocados em agitadores orbitais (Shaker), onde haverá controle da temperatura. Um propagador industrial pode ter volumes de até 200 L e possuir todos os controles de um fermentador propriamente dito.

### 2.2.5.1.2. Biorreator

São grandes reatores que tem a finalidade de obtenção do produto. Devem possuir todos os controles que permitam dar condições adequadas de crescimento ao microrganismo, monitorar a formação do produto e consumo do substrato.

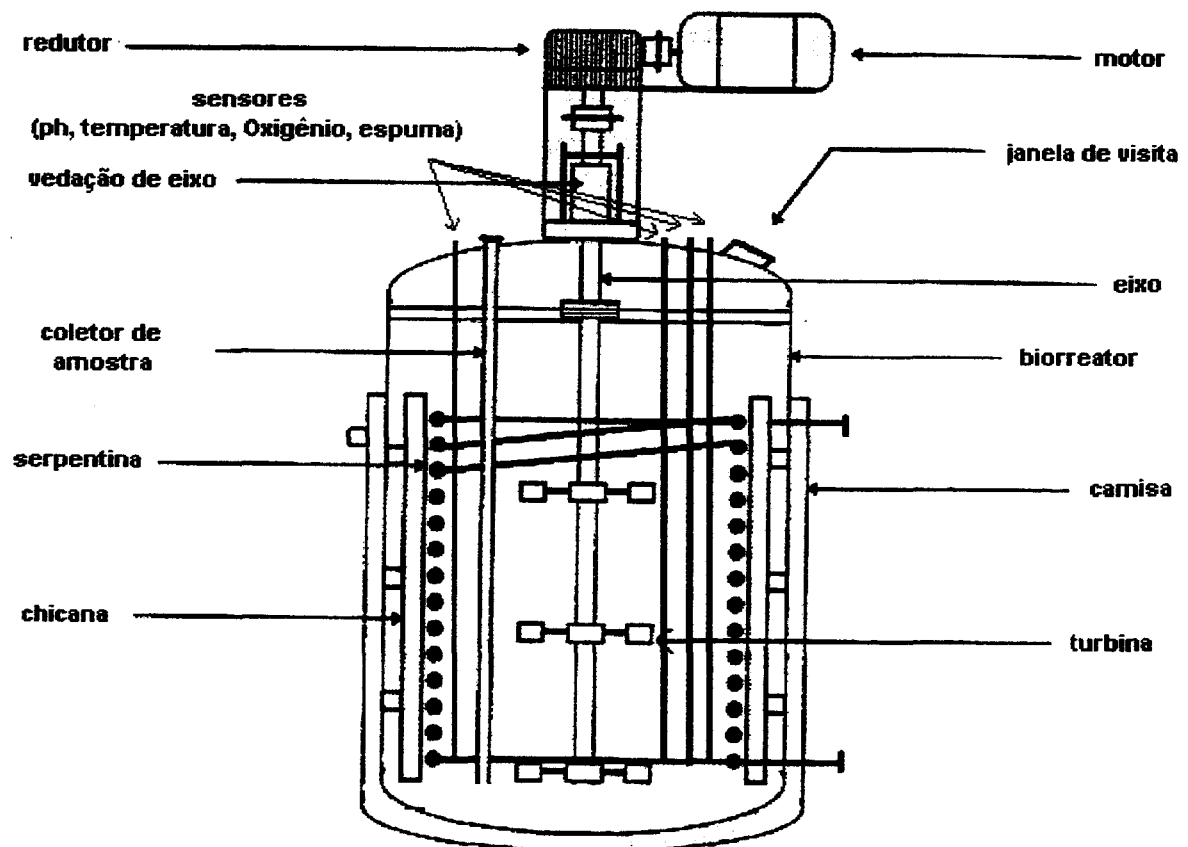
Os biorreatores utilizados para a produção de etanol apresentam-se nas mais diferentes formas. Algumas fermentações são extremamente sofisticadas tendo constante retirada de produto, realizada por membranas poliméricas específicas situadas dentro ou fora do biorreator. Além disso podem possuir diversos controles on-line e serem completamente automatizados.

Segundo GERMEK (1986) os reatores comumente empregados na produção de etanol são de aço carbono, cilíndricos, com fundo cônico, serpentinas de ferro ou cobre; externamente possuem trocadores de calor de placas ou tubulares. Na sua maioria são dornas abertas o que facilita a contaminação e promove perdas de 1 a 2 % de álcool através do arraste pelo gás carbônico. Uma maneira de evitar estas perdas é o uso de dornas fechadas com saída para mistura gás carbônico e etanol. A mistura passa então por uma coluna recheada com anéis de Pall e o etanol é recuperado.

Embora todas estas tecnologias estejam disponíveis hoje em dia, o que observa-se é que a maioria das indústrias constróem e operam seus biorreatores sem muitos controles, seguindo "receitas" pré-estabelecidas de produção desperdiçando energia e matéria-prima. Pode-se assim observar na Figura 2.7. um esquema genérico de um biorreator para a produção de etanol. Todavia é importante ter em mente que um reator assim dificilmente será encontrado no parque industrial brasileiro. Com poucas exceções, a produção nacional de etanol é feita em grandes tanques abertos com agitação, e o único parâmetro medido é o consumo de substrato, feito através de medidores de graus BRIX.

### 2.2.5.1.2.1. Sistema de agitação

É feito através de um eixo vertical, no qual estão colocados hélices ou turbinas. Alguns fermentadores de desenho não usual possuem eixos horizontais, a rotação do eixo é gerada por força motriz e registrada em rpm., a colocação do motor pode ser superior ou inferior ao equipamento.



**Figura 2.7.** Desenho esquemático de um biorreator e seus acessórios.  
Baseado em Figura Engenharia Bioquímica, de AQUARONE; BORZANI; LIMA (1975)

### 2.2.5.1.2.2. Sensor de temperatura

O controle de temperatura é feito por serpentinas ou camisa, por onde circula água fria, quente ou vapor, conforme necessário. Este componente serve para esterilizar o



equipamento e para a manutenção da temperatura durante o processo fermentativo. A leitura de temperatura é feita por termômetro ligado a um controlador digital.

#### **2.2.5.1.2.3. Janela de visita**

Local que permite a adição do inóculo e a adição de qualquer outra substância necessária a fermentação, ou retirada de amostras. O inóculo pode ser adicionado também diretamente do propagador ao biorreator por bombas, assim como amostras em alguns casos são retiradas automaticamente.

#### **2.2.5.1.2.4. Sensor de pH**

O reator deve possuir eletrodo de pH ligado a um controlador, que comanda a adição automática de ácido ou base (estéreis) contidos em tanques auxiliares.

#### **2.2.5.1.2.5. Sensor de espuma**

O biorreator pode ter um sensor de espuma ligado a controladores que comandam o bombeamento de antiespumante de tanques auxiliares. O antiespumante também pode ser adicionado manualmente pela janela de visita.

Os antiespumante mais comumente usados são o óleo de soja, óleo de silicone e o octadecanol.

#### **2.2.5.1.2.6. Chicanas**

As chicanas servem para que ocorra maior mistura no líquido. De maneira geral pode se dizer que a chicana deve ter altura igual ao diâmetro do fermentador e largura ligeiramente menor que o diâmetro interno do reator. A largura de suas aletas deve equivar de 8 a 10 % do diâmetro da turbina.

#### **2.2.5.2. Condução da fermentação**

A produção de etanol varia muito em função do microrganismo, do tempo de processo, do tipo de substrato, e demais condições (temperatura, oxigênio, etc). Além disso, todos os processos, tanto a nível industrial, quanto laboratorial possuem etapas e cuidados comuns que devem ser executadas, como:

- a) preservação das culturas;
- b) preparo do inóculo;
- c) preparo e esterilização do meio;
- d) inoculação;
- e) produção;
- f) purificação.

##### **2.2.5.2.1. Preservação das culturas**

A preservação de cepas por um longo período, é uma necessidade básica das indústrias biotecnológicas. A preservação da viabilidade não é o objetivo principal, pois microrganismos podem facilmente permanecer viáveis por longos períodos de tempo. A preservação da capacidade produtora é o objetivo principal. Repiques sucessivos causam

mutações, que resultam em perda de produção. O objetivo da preservação é manter as cepas inalteradas por um longo período, sem que ocorra a divisão celular.

Existem diferentes métodos de preservação como: armazenamento a baixas temperaturas, sob congelamento, e liofilização.

O armazenamento a baixas temperaturas é feito a temperaturas entre 2 e 6 °C. É um método simples, mas pouco seguro. O microrganismo é mantido em ágar inclinado ou em cultura líquida em refrigeradores. Há um alto risco de contaminação e de mutação reversa (perda da capacidade produtora) pela freqüente transferência a cada 8 a 16 semanas.

O método mais usado é o congelamento, é feito na faixa de temperatura de -18 °C a -80 °C em freezer, ou a -196 °C em nitrogênio líquido. O congelamento em nitrogênio líquido deve ser lento (1 °C/min), mas o congelamento rápido pode ser feito quando são usadas substâncias protetoras para prevenir a formação de cristais. As células podem ser mantidas congeladas por vários anos, a sobrevivência é crítica, pois 95 % dos microrganismos morrem durante o congelamento e posterior descongelamento.

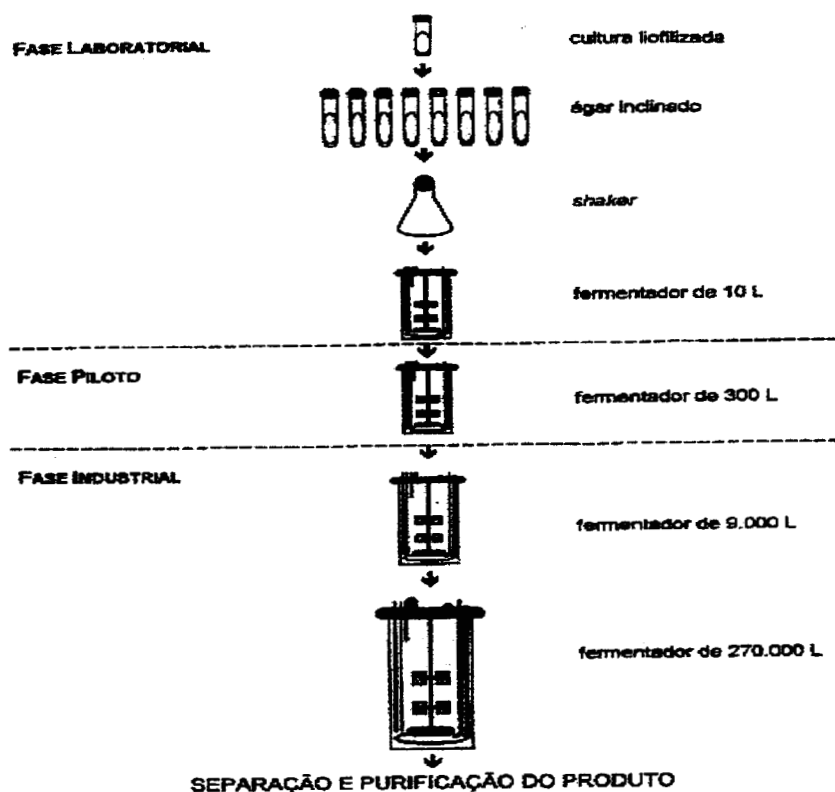
A liofilização é o melhor método de preservação. É feito após o cultivo do microrganismo em meio especial. A adição de agentes protetores reduz a mortalidade durante o processo de liofilização. É o método escolhido para preservação de grandes coleções de microrganismos, pois podem ser preservados por tempo indeterminado.

#### **2.2.5.2.2. Crescimento do inóculo**

A cultura preservada é colocada em meio líquido sob agitação. O meio utilizado e a temperatura de incubação dependem do microrganismo, e o tempo de incubação

depende além do microrganismo, do método de preservação empregado. Em uma primeira etapa o inóculo é transferido a um ou mais Erlenmeyers que serão inoculados em reatores de bancada. Feito o crescimento em reatores de bancada, inocula-se este mosto já povoado em reatores maiores, são feitos sucessivos crescimentos microbianos aumentando-se o tamanho do cultivo até obter-se um inóculo suficientemente grande para realizar a fermentação. O processo descrito anteriormente está ilustrado na Figura 2.8.

O inóculo pode ser preparado sob condições aeróbias pois o crescimento tanto das leveduras quanto das bactérias é muito mais rápido sob estas condições. Outros parâmetros como pH, temperatura, presença de nutrientes, tipo de substrato, etc devem ser iguais aos usados na fermentação propriamente dita, pois assim a fase lag (ver item 2.2.6.) é suprimida.



**Figura 2.8.** Esquema geral de um processo fermentativo.  
Fonte: AQUARONE; BORZANI; LIMA (1975).

### **2.2.5.2.3. Preparo e esterilização do meio**

O meio de cultura para produção de etanol, pode ser de origem sacarínica, amilácea ou celulósica. Para cada um destes há um tratamento específico, a fim de hidrolisar os carboidratos presentes. Estes tratamentos já foram comentados na seção 2.2.2.

Após o meio de cultura estar preparado, ele é carregado no fermentador para ser esterilizado. Em reatores de pequeno porte (de bancada), o meio e o reator são esterilizados ao mesmo tempo colocando-se o conjunto em reatores autoclave. Existem diversas maneiras de se esterilizar o meio de cultura, embora na produção de etanol a esterilização do mosto seja feita com o uso de calor.

O meio de cultura após a sua preparação contém um variedade de células vegetativas e esporos, provenientes dos constituintes, da água e dos equipamentos. Vários meios de cultura são esterilizados no fermentador a 121 °C. O tempo de esterilização é calculado em função dos constituintes do mosto e do tamanho do fermentador. Também é necessário fazer a esterilização de algumas partes do equipamento, como válvulas e eletrodos que entram em contato direto com o meio. Um dos métodos consiste em injetar vapor no fermentador através da camisa ou de serpentinas, é a esterilização indireta.

Outro método consiste em injetar vapor diretamente na solução nutriente, chamada esterilização direta, e neste caso o vapor deve estar livre de aditivos químicos que possam influir nas características do meio de cultura. O vapor gerado pela indústria normalmente contém substâncias potencialmente tóxicas aos microrganismos, derivados de anticorrosivos utilizados no processo de geração do vapor. Com a utilização do vapor

diretamente no meio de cultura, uma parte do vapor se condensará durante a esterilização aumentando o volume de líquido dentro do fermentador.

Para o dimensionamento de uma esterilização deve ser levado em conta o tempo de aquecimento, de esterilização e de resfriamento. A duração de cada um destes tempos dependerá principalmente do microrganismo, do volume e tipo de meio, e do nível de segurança exigido. Uma desvantagem deste método seria que o calor não só mata os microrganismos como também altera a estrutura do meio de cultura. Mudanças na coloração e no pH são resultantes das reações de caramelização e da reação de Maillard. As vitaminas e aminoácidos são degradados e a qualidade do meio de cultura é deteriorada.

Em processos contínuos o método usado é a esterilização contínua, esta é feita através de trocadores de calor. Aqui o processo é muito mais rápido e pode levar de 30 a 120 segundos.

#### **2.2.5.2.4. Inoculação**

A cultura anteriormente crescida é então adicionada ao fermentador, através de tanques auxiliares. Para reatores de bancada, a cultura em um Erlenmeyer é transferida ascépticamente pela cabeça do reator. A quantidade de células presentes no inóculo e a idade deste são fundamentais ao processo, pois inóculos velhos tendem a ter muitas células inviáveis. O tamanho do inóculo depende do tipo de microrganismo. Em geral, para bactérias, deve-se adicionar 0,1 a 3 % do volume do mosto, fungos e leveduras, de 5 a 10 % (v/v). Em alguns casos o reator é inoculado diretamente com culturas liofilizadas, não existindo então a etapa de propagação já descrita.

#### **2.2.5.2.5. Produção**

Com o reator já inoculado começa o processo de produção de etanol propriamente dito, quando são controlados parâmetros como agitação, pH, crescimento, concentração de substrato e produto. O pH é monitorado por eletrodos, que controlam bombas de ácido e base em tanques auxiliares. O crescimento pode ser monitorado por meio de diversos métodos como o de contagem de células. A concentração de substrato é determinada através de métodos de quantificação de açúcares já que este é o constituinte mais importante para a produção de etanol. A quantificação de etanol pode ser feita com o uso de cromatógrafo gasoso. O processo é interrompido no final da fase exponencial (Ver item 2.2.6.).

#### **2.2.5.2.6. Purificação**

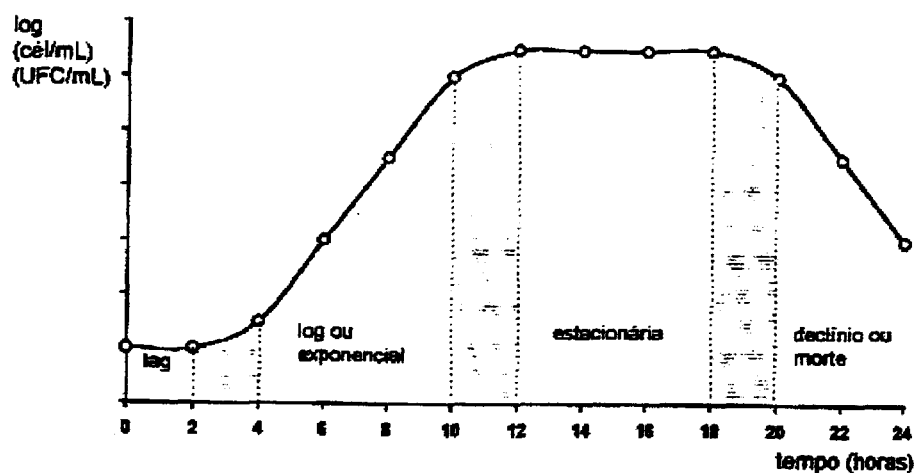
O etanol é um produto extracelular, sendo assim no final do processo as células são separadas do mosto por centrifugação ou filtração, podendo ser reutilizadas (em alguns casos há reciclo). O mosto então é destilado. Quanto maior a concentração de álcool no mosto, menor o custo de operação da destilação, uma vez que uma menor quantidade de vapor é necessária no primeiro efeito. Segundo BU'LOCK & KRISTIANSEN (1987) os estágios da destilação convencionalmente empregados na purificação são:

- a) destilação primária do mosto fermentado, com a finalidade de obter etanol a 85 % (v/v) ou mais, além de retirar voláteis indesejáveis, como aldeídos;
- b) Etapa de retificação do destilado da primeira etapa para a obtenção de um produto 95 % (v/v), mistura azeotrópica etanol-água. Ao mesmo tempo o óleo fusel é removido pela decantação da água;

- c) Com a finalidade de obter um produto a 99,4 % (v/v) ou de maior pureza, uma destilação adicional é feita utilizando benzeno ou ciclohexano, e uma nova mistura azeotrópica é destilada.

### 2.2.6. Cinética do crescimento microbiano em regime descontínuo

O crescimento de microrganismos é demonstrado em função do tempo como na curva típica de crescimento da Figura 2.9., e possui 4 fases distintas (lag, adaptação; exponencial ou log; estacionária; declínio ou morte), e entre elas fases intermediárias. Na fase logarítmica pode-se dizer que dobram por intervalo de tempo o número de células (bactérias e leveduras) ou a biomassa (fungos).



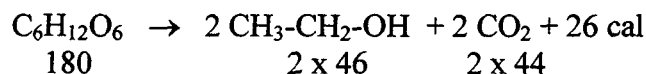
**Figura 2.9.** Curva típica de crescimento microbiano.

A velocidade de crescimento se mantém constante durante a fase logarítmica, ainda que o meio se altere pelo consumo de substrato e excreção de metabólitos. A velocidade de crescimento independe da concentração do substrato, pois um excesso de substrato está presente. O substrato limitante é a substância que pela mudança de sua concentração afeta a velocidade de crescimento do microrganismo, a velocidade de consumo do substrato e a velocidade de formação do produto.



### 2.2.6.1. Rendimento

O mecanismo de fermentação foi proposto pela primeira vez por Gay-Lussac, baseado na conversão estequiométrica de uma hexose em etanol e dióxido de carbono



Portanto, 100 Kg de hexose são convertidas em: 51,1 Kg de etanol e 48,9 Kg de dióxido de carbono. O rendimento teórico de 51,1 % (p/p) é chama de coeficiente de Gay-Lussac e representa um dado básico para a eficiência da conversão.

O próximo passo para compreensão do mecanismo foi feito por Louis Pasteur, que obteve os rendimentos de uma fermentação ideal a partir da glicose, ele obteve (p/p): 48,4 % de etanol, 46,6 % de dióxido de carbono, 3,3 % de glicerol, 0,6 % de ácido succínico, 1,2 % material celular (CRUEGER & CRUEGER,1993). O maior número de produtos que aparecem, são devido ao oxigênio e a nutrientes presentes além da glicose, necessários ao crescimento. O coeficiente de Pasteur é um torno de 94,7 % do rendimento teórico GL (Gay-Lussac). Quando se fermenta substratos não-ideais (melaços, caldos, etc), o rendimento fica em torno de 90% do teórico, estas fermentações produzem (g/100g de carboidratos fermentados): 45-49 etanol, 43-47 dióxido de carbono, 2-5 Glicerol, 0,5-1,5 succinato, 0,2-0,6 óleo fusel, 0-1,4 acetato, 0,2-0,6 Butilenoglicol, 0,7-1,7 material celular (LEMOS & GERMANI, 1996).

Segundo ANCIÃES (1991) para mostos contendo sacarínicos, a inversão da sacarose se dá da seguinte forma:



Para cada molécula de sacarose (342 g) produz duas moléculas de açúcares redutores (360 g). Como cada 180 g (de glicose/frutose) geram 92 g de álcool, cada molécula de sacarose gera 184g de etanol.

Cálculos de rendimento sempre correlacionam produto com substrato ou matéria-prima. Os cálculos variam muito, dependem dos critérios adotados para cada caso. A indústria geralmente escolhe o rendimento que permite uma melhor avaliação do processo. Deve-se sempre especificar em relação a que o rendimento foi calculado (matéria-prima (equação 2.1.), substrato total (equação 2.2.) ou substrato consumido (equação 2.3.))

$$R1 = \frac{\text{produto (g)}}{\text{Matéria-prima (g)}} * 100 \quad (2.1.)$$

$$R2 = \frac{\text{produto (g)}}{\text{Substrato total (g)}} * 100 \quad (2.2.)$$

$$R3 = \frac{\text{produto (g)}}{\text{Substrato consumido (g)}} * 100 \quad (2.3.)$$

#### 2.2.6.2. Eficiência

A eficiência sempre correlaciona produto obtido com produto teoricamente obtido, e pode ser expressa de 3 formas:

a) Eficiência de fermentação (equação 2.4.): Correlaciona o produto formado com a quantidade de produto que seria formado se todo o substrato consumido durante a fermentação fosse transformado em produto.

$$Ef = \frac{\text{produto formado (g)}}{\text{Produto teórico a partir do substrato consumido (g)}} * 100 \quad (2.4.);$$

b) Eficiência de processo (equação 2.5.): Correlaciona o produto formado com a quantidade de produto que seria formado se todo o substrato presente no mosto fosse transformado em produto.

$$E_p = \frac{\text{produto formado (g)}}{\text{Produto teórico a partir do substrato inicial (g)}} * 100 \text{ (2.5.)};$$

c).Eficiência de instalação (equação 2.6.): Correlaciona o produto recuperado com a quantidade de produto que seria formado se todo o substrato fosse transformado em produto. A diferença da eficiência de instalação para a de processo é que ela leva em conta toda a produção, pois relaciona o produto recuperado, levando em conta as perdas ocorridas durante a separação e purificação.

$$E_i = \frac{\text{produto recuperado (g)}}{\text{Produto teórico a partir do substrato inicial (g)}} * 100 \text{ (2.6.)};$$

### 2.2.6.3. Produtividade

A produtividade (2.7.) indica quanto de produto foi formado por litro de mosto por hora. É importante para compararmos dois processos que apresentam rendimentos diferentes, mas também apresentam tempos de duração diferentes. É um dos dados mais importantes de um processo industrial.

A produtividade é dada pela relação concentração do produto por tempo de fermentação, em processos com rendimento da ordem de miligramas, é preferível utilizar a concentração do produto em mg/L.

$$P = \frac{\text{concentração de produto (g/L)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}} \text{ (2.7.)}$$

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas seis cepas de levedura, as cepas utilizadas foram:

- a) *Kluyveromyces marxianus*, CBS 6556, proveniente do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, Joinville, SC, Brasil;
- b) *Saccharomyces cerevisiae hansen*, proveniente da coleção da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil;
- c) *Saccharomyces cerevisiae*, catalogada como cepa C94, do Instituto Pasteur de Paris, obtida como fermento comercial Fermol, Pascal Biotech, França;
- d) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Uvaferm, proveniente da empresa Dantar Fement A/S, Dinamarca;
- e) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Fleischmann, proveniente da empresa Produtos alimentícios Fleischmann e Royal LTDA, Brasil;
- f) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Saf Instant, proveniente da empresa Saf do Brasil produtos alimentícios LTDA, Brasil;

#### 3.2. Esterilização de equipamentos e materiais

Todos os equipamentos, meios de cultura e vidrarias foram esterilizados em autoclave vertical (mod. AV. 75, Phoenix Equipamentos / Brasil) por 15 min, a 121°C e 1 atm.

### **3.3. Meios de cultura**

#### **3.3.1. Meio de cultura complexo para leveduras**

O meio de cultura foi composto por extrato de levedura (10 g/L, Oxoid / Inglaterra), peptona (20 g/L, Oxoid / Inglaterra), glicose (20 g/L, Synth / Brasil) e ágar-ágar (15 g/L, Oxoid / Inglaterra). O pH foi ajustado em 6,0, utilizando-se HCl 1 M ou NaOH 1 M (ambos preparados a partir de reagentes obtidos da Synth / Brasil).

#### **3.3.2. Meio de cultura ágar-melaço**

O meio de cultura é composto de melaço diluído em água destilada até 2 % em carboidrato total (p/p), sendo em seguida adicionado ágar-ágar (15 g/L, Oxoid / Inglaterra).

### **3.4. Tampão fosfato**

Utilizou-se tampão fosfato - pH 6,4, constituído por dihidrogeno fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - 31,20 g/L, Reagen / Brasil), e cloreto de sódio (NaCl - 175,32 g/L Reagen / Brasil). O pH foi ajustado utilizando-se solução aquosa de hidróxido de sódio 5 M (preparado a partir de reagentes obtidos da Synth / Brasil).

### **3.5. Preservação de culturas**

O estoque de culturas foi mantido em placas de petri (Bioplast / Brasil) contendo ágar-melaço. A frequência de repiques era de uma vez por mês.

### **3.6. Métodos de cultivo**

#### **3.6.1. Pré-inóculo**

Colônias isoladas de leveduras foram assepticamente transferidas dentro de câmara de fluxo laminar (Trox Technik / Trox do Brasil / Brasil) a um frasco Erlenmeyer de 300 mL contendo 50 mL de meio de cultura (melaço de concentração variada, dependendo do experimento). O frasco foi então levado a incubadora agitada (mod. NT711 / Nova Técnica Equipamentos para Laboratório / Brasil) a 200 RPM por 15 a 20 horas, usando rigorosamente as mesmas condições de temperatura, pH, e agitação do cultivo a que se destinavam; com o objetivo de suprimir a fase lag.

#### **3.6.2. Cultivo em incubadora agitada**

Muitos dos experimentos foram conduzidos em incubadora agitada (mod. NT711 / Nova Técnica Equipamentos para Laboratório / Brasil), com o objetivo de obter-se condições ótimas de processo (meio de cultura, pH, temperatura, etc.). O cultivo em incubadora agitada tem grande versatilidade já que permite testar-se várias condições simultaneamente.

O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 300 mL, com 50 mL ou 100mL de meio de cultura, sendo agitados a 200 RPM, por tempos variáveis. Para a execução dos experimentos vários frascos idênticos, eram inoculados simultaneamente. O número de frascos preparados era sempre o dobro do número de amostragens e, portanto, em cada amostragem, retirava-se 2 frascos Erlenmeyer representativos do tempo em questão. No caso de testes onde era necessário o uso de diferentes inóculos, sempre foi feita uma contagem em câmara de Neubauer (item 3.13.) a fim de estimar se os inóculos continham quantidades compatíveis de células por mL ( $10^4$ - $10^5$  células/mL), diluindo-se quando

necessário. O pré-inóculo preparado como descrito no item 3.6.2. era adicionado na proporção de 3 % (v/v) ou 1 % (p/p) quando usava-se leveduras liofilizadas.

### 3.6.3. Cultivo em biorreator

Os experimentos realizados no biorreator tiveram o objetivo de detalhar tendência apontadas no cultivo em incubadora agitada ou consolidar estes resultados. Foram usados 2 reatores, o reator Biostat B (B. Braun Biotech International / Alemanha) e o reator BTS 27 (Applikon Dependable Instruments Inc. / USA), mostrados nas Figuras 3.1. e 3.2. O reator BTS 27 não era controlado e o reator Biostat B era controlado e instrumentalizado, sendo fundamental nos experimentos a pH constante. Ambos reatores possuíam controle de agitação e temperatura. O reator era esterilizado completamente montado em autoclave. O inóculo preparado como no item 3.6.1. era adicionado ao mosto na proporção de 3 % (v/v), salvo em alguns experimentos em que leveduras liofilizadas foram adicionadas na proporção de 1 % (p/p).

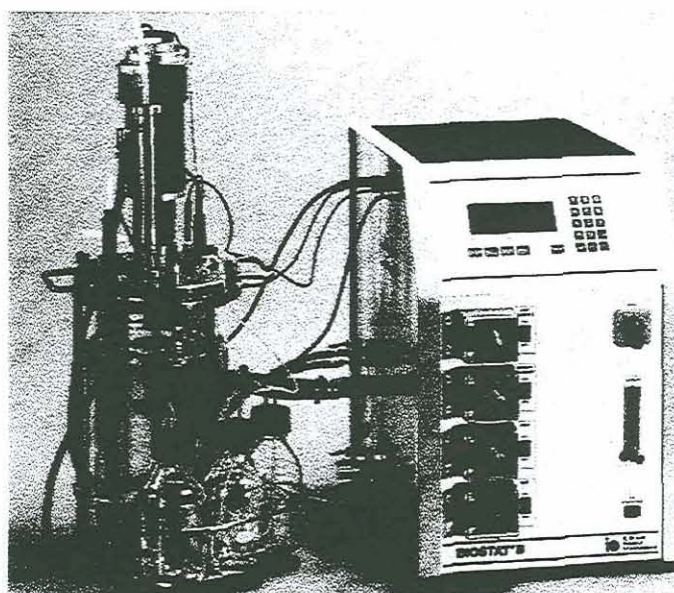
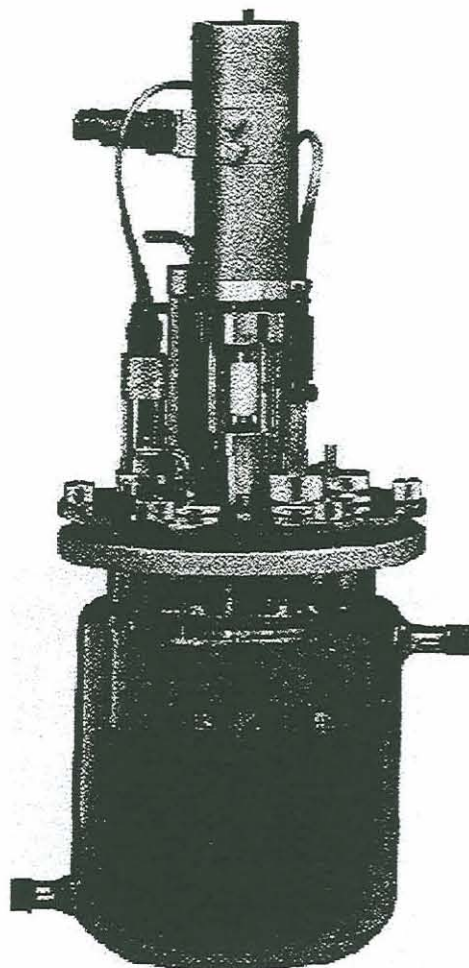


Figura 3.1. Foto do reator Biostat B. – B. Braun Biotech International.



**Figura 3.2.** Foto do reator BTS-27 – Applikon Dependable Instruments Inc.

### **3.7. Métodos Analíticos**

Os métodos utilizados para determinar a composição centesimal do melaço de soja são considerados de rotina, por este motivo são apresentados no apêndice 1. Estes métodos são oficiais para análise de alimentos no Brasil e estão descritos nas referências: BRASIL (1981) e INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976). Segundo a legislação brasileira, o melaço de soja, devido a suas propriedades se enquadra na categoria de xarope.

O erro máximo admitido para estes métodos é em torno 1 %.

#### **3.7.1. Determinação de lipídios**

Foi feito o teste de lipídios segundo o método do extrato etéreo.



### **3.7.2. Determinação de proteína total**

Para determinar a quantidade de proteína total utilizou-se o método de Kjhedal.

### **3.7.3. Determinação de sólidos totais**

Os sólidos totais foram determinados por método gravimétrico.

### **3.7.4. Determinação de carboidratos totais**

Para determinação de carboidratos totais foi utilizado o método do reagente de Fehling.

### **3.7.5. Determinação de fibras**

A determinação de fibras foi feita por hidrólise química.

### **3.7.6. Deteminação de cinzas**

A determinação da parte inorgânica do melão de soja, foi feita por método gravimétrico.

## **3.8. Cromatografia de camada delgada**

A técnica de cromatografia de camada delgada foi utilizada para a determinação qualitativa dos açúcares do melão de soja. Várias soluções eluentes e reveladoras para a análise de carboidratos recomendadas por STAHL (1969) foram testadas, sendo as soluções a seguir apresentadas as mais eficientes.

O eluente usado foi uma mistura de butanol (Merck / Brasil), Acetona (Merck / Brasil) e água destilada na proporção 4/3/1 (em volume) respectivamente.

O revelador era composto por anisaldeído (Merck / Alemanha), ácido acético (Merck / Brasil), metanol (Merck / Brasil), e ácido sulfúrico (Synth / Brasil). Para se obter 100,5 mL deste reagente deve-se adicionar respectivamente 0,5/10/85/5 mL, os reagentes devem ser adicionados nesta ordem.

A eluição foi realizada em placas de vidro cobertas com uma camada de 250  $\mu\text{m}$  de sílica gel com diâmetro médio de poro de 60 Å (artigo 5715, Merck / Alemanha) em uma cuba de vidro de dimensões 21 x 21 x 10 cm (largura x altura x profundidade, marca Schott / USA).

Para a realização da técnica, deve-se traçar uma linha a aproximadamente 2 cm da base da placa, nesta linha aplica-se 2  $\mu\text{L}$  da amostra (ou padrão) previamente diluída em água. A placa contendo a amostra era levada a estufa (Fanem / Brasil) a 100 °C por 7 min, feito isso, a placa é colocada na cuba com aproximadamente 0,5 cm de eluente, e espera-se até o eluente chegar ao topo da placa. Logo após, a placa é posta a 100 °C por 7 min e é feito então uma segunda corrida. Ao terminar a segunda corrida a placa deve ficar a 100 °C por 10 min. Após a placa esfriar deve ser borrifado de forma uniforme o revelador, em seguida a placa impregnada com o revelador é levada a estufa a 100 °C por 5 min, passado este tempo observar se podem ser visualizadas as bandas, caso contrário a placa deve ficar mais 1 a 2 min, e ser novamente observada.

### **3.9. Determinação de açúcares redutores**

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (CHAPLIN, 1986). A sensibilidade do método é de 0,3 a 30 mM de glicose.

O reagente principal deste método é composto de 0,25 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Merck / Alemanha), 75 g de tartarato de sódio e potássio (Reagen /

Brasil) dissolvidos em 50 mL de solução aquosa de NaOH 2 M (preparado a partir de reagentes da Synth / Brasil). Finalmente esta solução foi diluída até 250 mL, obtendo-se assim o reagente DNS.

A técnica é realizada adicionando-se 100 µL de padrão, amostra ou controle a 1 mL do reagente DNS. A mistura deve ser aquecida, em banho-maria a 100 °C por 10 minutos, após o resfriamento a temperatura ambiente é lida a absorbância da mistura (ABS) em espectrofotômetro (U-1100, Hitachi Ltd. / Japão), no comprimento de onda de 570 nm, zerado previamente com ar. A curva de calibração foi feita com glicose (Synth / Brasil), em 4 concentrações diferentes.

A regressão linear das diferenças entre os valores das absorbâncias dos padrões e do controle (100 µL de água com 1 mL de DNS aquecidos a 100 °C por 10 minutos) contra as concentrações de açúcares redutores, fornece a equação 3.1., onde “a” é o coeficiente da reta de ajuste. Para a determinação da concentração das amostras basta ler seus valores de absorbância e substituí-lo na equação 3.1. O desvio máximo admitido para este teste é de 5 %.

$$\text{Açúcares\_redutores} = a * (\text{ABS}) \quad (3.1.)$$

### **3.10. Determinação de carboidratos totais**

O método do fenol ácido sulfúrico foi usado para a determinação de carboidratos totais (CHAPLIN, 1986), devido ao seu dinamismo permite analisar várias amostras ao mesmo tempo. Sua sensibilidade é de 30 µM a 2 mM de glicose. A amostra de melão de soja fermentado sempre era centrifugada por 2 minutos a 14 RPM (centrifuga Eppendorf mod. 5410 / EUA), sendo o sobrenadante diluído 3000 vezes.

A técnica é realizada adicionando-se 500 µL de amostra, padrão ou controle a 500 µL de solução aquosa de fenol 5 % (p/p) (Reagen / Brasil ), e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (Synth / Brasil). Após a mistura atingir a temperatura ambiente, a sua absorvância (ABS) é lida em espectrofotômetro (U-1100, Hitachi Ltd./ Japão) no comprimento de onda 490 nm, zerado com ar.

O padrão usado para a confecção da curva de calibração era glicose (Synth / Brasil), diluída a quatro concentrações diferentes.

A regressão linear das diferenças entre os valores das absorvâncias dos padrões e do controle (500 µL água, 500 µL de fenol 5% com 2 mL ácido sulfúrico) contra as concentrações de açúcares redutores, fornecendo uma equação 3.2., onde “a” é o coeficiente angular da reta de ajuste. Para a determinação da concentração das amostras basta ler seus valores de absorvância e substituí-los na equação 3.2. O desvio máximo admitido para este teste é de 5 %.

$$\text{Carboidratos\_totais} = a * (\text{ABS}) \quad (3.2.)$$

### **3.11. Cromatografia líquida**

A cromatografia líquida foi utilizada para determinar as quantidades dos açúcares glicose, sacarose, frutose, rafinose e estaquiose. Estes testes foram realizados no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT – São Paulo). A amostra foi diluída, filtrada em membrana de acetato/nitrato de celulose, e injetada no sistema cromatográfico, onde os componentes são separados por exclusão molecular e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,0005 N, o fluxo de solvente foi de 0,4 mL/min, a atenuação usada foi 8X, e a temperatura da coluna é 40°C.

### 3.12. Contagem em gota

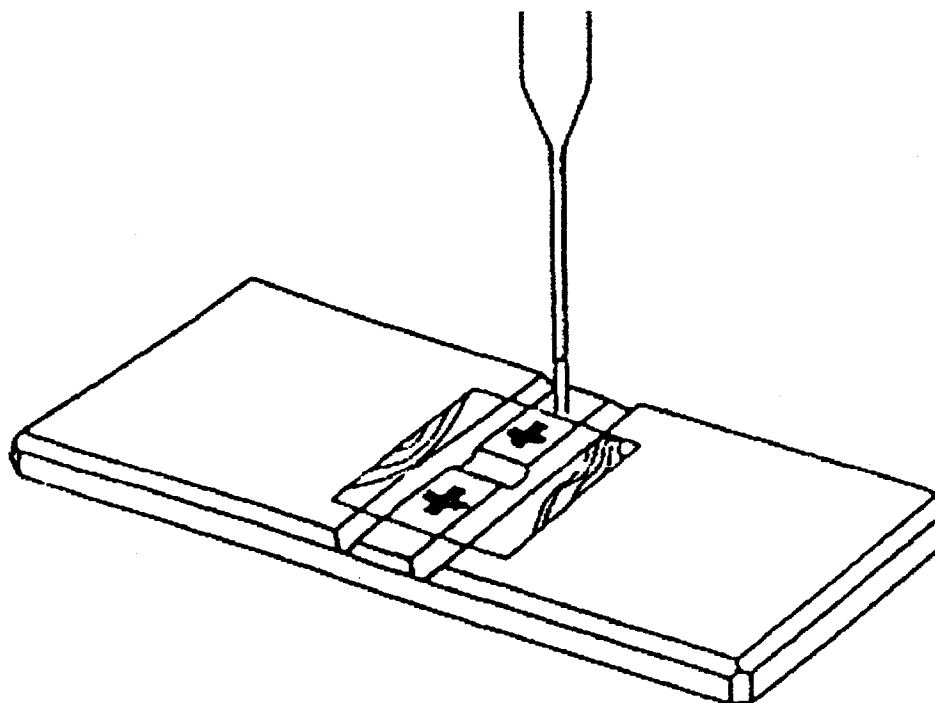
A técnica de contagem, em gota a consiste em fazer-se várias diluições sucessivas da cultura a ser quantificada em tampão o fosfato (item 3.4.), o procedimento descrito a seguir é semelhante ao descrito por MILLES & MISRA (1938). As diluições são feitas usando 500  $\mu\text{L}$  de cultura e 4,5 mL de tampão, obtendo-se uma diluição de 10 vezes. Feito isso é retirado 500  $\mu\text{L}$  da primeira diluição e repetido o processo, obtendo-se as diluições  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^n$ , e assim sucessivamente .

Uma placa de petri (Bioplast/Brasil) com meio complexo (item 3.3.1) é dividida em 4 quadrantes, em cada um destes são depositadas 3 gotas (20  $\mu\text{L}$ ) de cada diluição, finalmente as placas são incubadas a temperatura de 30 °C por 24 h. Após 24 horas é feita a contagem das colônias de cada quadrante, escolhendo-se as diluições (D1) que geraram gotas contendo de 10 a 60 colônias. Após determinar-se a diluição faz-se a média do número de colônias em cada gota (M1). O número de células por mL é dado pela Equação 3.3. O desvio máximo admitido para este teste é de 20 %.

$$\text{Número\_células} = M1 * 50 * D1 \quad (3.3.)$$

### 3.13. Contagem em câmara de Neubauer

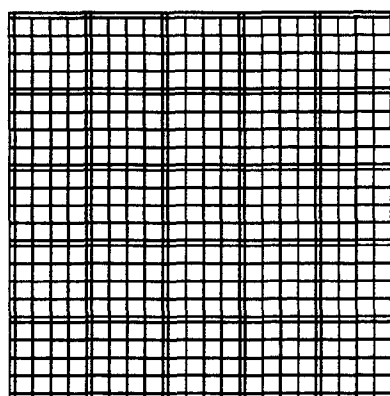
A contagem em câmara de Neubauer foi utilizada ao longo dos experimentos sempre que foi necessário obter uma estimativa rápida do número de células. A câmara de Neubauer é uma placa de vidro contendo 2 cruzeiras escavadas no seu centro observáveis a olho nú, como na Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Desenho esquemático da câmara de Neubauer.

O quadrado central de cada cruz quando colocado sob um microscópio (com um grau de aumento de no mínimo 10 X), revela a existência de 25 quadrados intermediários contendo cada um 16 pequenos quadrados, como na Figura 3.4.

A profundidade da escavação da câmara é conhecida e ao colocar-se uma lâminula sobre esta região da placa aprisiona-se um volume conhecido dentro desta. O volume de cada pequeno prisma quadrangular formado é de  $4 \times 10^{-6}$  mL.



**Figura 3.4.** Desenho esquemático das células da câmara de Neubauer.

Segundo PRESCOTT; HARLEY; KLEIN (1996) a contagem deve ser feita da seguinte maneira:

- Colocar sobre a parte central da Câmara de Neubauer (previamente limpa), uma lâminula.
- Com o auxílio de uma pipeta colocar a cultura previamente diluída na borda da lâminula de forma que escoe por baixo desta enchendo a câmara.
- Focalizar no microscópio (Olympus 5060 / Japão) o quadrado central da cruz.
- Contar a quantidade de células contidas nos 5 quadrados da diagonal do quadrado central da cruz da câmara (NT).
- Obter o número de células por mL através da equação 3.4.

$$\text{Núm\_de\_células} = \text{NT} * 4 * 10^6 * \text{D1} / 80 \quad (3.4.)$$

Uma análise estatística pode ser feita com as quantidades de células contidas em cada pequeno quadrado. Para que o teste tenha significância admite-se um desvio máximo de até 20 %.

### **3.14.Determinação da quantidade de etanol**

O etanol foi quantificado com o uso de cromatógrafo a gás. Nesta técnica a amostra foi primeiramente centrifugada a 14.000 RPM (centrifuga Eppendorf mod. 5410 / EUA), do sobrenadante pesaram-se em balança analítica (mod. ADA 210/C; Adam Equipment Co. LTD / USA) aproximadamente 1 mL, e adicionaram-se de 0,01 a 0,08 g de propanol (Baker Analyzed / Brasil), que é o padrão interno do método. A seguir esta amostra foi injetada em cromatógrafo gasoso (mod. 5890 A, Hewlett-Packard / Canadá), com coluna Simplicity-5 (Supelco Co. / EUA). O programa utilizado é de 40 a 75 crescendo-se 5 °C/min, a pressão na cabeça da coluna é de 5 Psi.

A calibração foi feita por padrões com massas conhecidas etanol (Synth / Brasil) e propanol (Baker analyzed / Brasil) dispersos em água destilada. A equação de regressão linear entre a razão das massa de etanol e propanol versus a razão das áreas integradas dos picos de etanol e propanol, foi obtida encontrando-se um coeficiente angular igual a 0,7511. Os fluxos e pressões são apresentados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Fluxos e pressões usadas no cromatógrafo gasoso

	P (Bar)	Fluxo (mL / min)
Ar	3,0	375-400
Hidrogênio	1,0	38
Nitrogênio	3,5	35
Nitrogênio na coluna	4	0,8-1
Escape do divisor		90
Purga do septo		3-5

O cálculo da quantidade de etanol foi obtido fazendo-se a razão entre as áreas dos picos de etanol e propanol obtidos no cromatógrafo a gás divididos pelo coeficiente angular da curva de calibração, multiplicado pela massa de propanol adicionada a amostra, e finalmente dividida pela massa de amostra, obtendo-se o percentual de etanol (p/p). O desvio máximo deste teste é de 0,5 %.



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Análise do melaço de soja

A análise do melaço de soja foi feita usando os métodos analíticos descritos no item 3.7. Foram analisadas 5 bateladas diferentes de melaço de soja provenientes da planta piloto de produção de proteína concentrada de soja da empresa Ceval Alimentos, tendo sido encontrados os resultados apresentados na Tabela 4.1. Na Tabela 4.2. são apresentados os mesmos resultados em base seca (todos os dados das análises estão no Apêndice 2.).

**Tabela 4.1.** Composição do melaço de soja de diferentes bateladas.

Tipo de análise	Batelada				
	1	2	3	4	5
Lipídios (%)	8,14	5,65	3,17	1,37	2,77
Proteína <sub>6,25</sub> (%)	4,71	4,38	5,33	2,33	3,59
Sólidos totais (%)	48,07	48,60	51,15	19,08	33,41
Carboidratos totais (%)	17,89	20,43	21,08	8,01	13,32
Cinzas (%)	4,61	4,44	4,70	1,82	3,14
Massa específica (g/mL)	1,192	1,191	1,216	1,080	1,145

Obs.: Percentuais expressos em p/p.

**Tabela 4.2.** Composição do melaço de soja em diferentes bateladas expressas em base seca.

Tipo de análise	Batelada				
	1	2	3	4	5
Lipídios (%)	16,93	11,63	6,20 %	7,18	8,29
Proteína <sub>6,25</sub> (%)	9,80	9,01	10,42 %	12,22	10,75
Carboidratos totais (%)	37,22	42,04	41,21 %	42,00	39,87
Cinzas (%)	9,59	9,13	9,19 %	9,54	9,40

Pode-se observar através da Tabela 4.2. que as quantidades de proteínas, carboidratos e cinzas sofrem pequenas variações, enquanto as quantidades de lipídios variam significativamente de batelada em batelada. A variação da quantidade de lipídios se deve ao fato da planta piloto (que gera o melaço de soja) ter uma performance variável

de extração de gordura, tal parâmetro não foi controlado durante a produção experimental de proteína isolada de soja.

Outra observação importante é que o melaço de soja é um resíduo complexo que possui carboidratos de peso molecular elevado, além de carboidratos ligados a outras moléculas. Por este motivo, a análise de carboidratos totais por Fehling fornece um valor aproximado da quantidade de açúcares. Usualmente, o percentual de carboidratos é determinado por diferença na soja, ou seja, determina-se todas as quantidades citadas acima, mais a quantidade de fibras, sendo a quantidade de carboidratos considerada como o restante. Ciente desta prática decidiu-se quantificar os carboidratos pelo método de Fehling, tendo em mente a limitação do método.

Como dado adicional é importante citar que o melaço de soja tem pH em torno de 6,2 e tem características semelhantes a um tampão, pois seu pH é dificilmente alterado por ácidos ou bases. A quantidade de fibras da batelada 5 é de 0,1 % (p/p).

#### **4.2. Seleção de cepas**

O regime adotado para a fermentação do melaço de soja foi o descontínuo, pela sua sua facilidade de operação e controle. Sendo assim, foram escolhidas 6 leveduras, devido a comprovada eficácia destes microrganismos em fermentações alcoólicas. As cepas utilizadas foram:

- a) *Kluyveromyces marxianus*, CBS 6556 (Km);
- b) *Saccharomyces cerevisiae hansen*, (Sch);
- c) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Fermol (Scfe);
- d) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Uvaferm (Scu);
- e) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Fleischmann (Scfl);

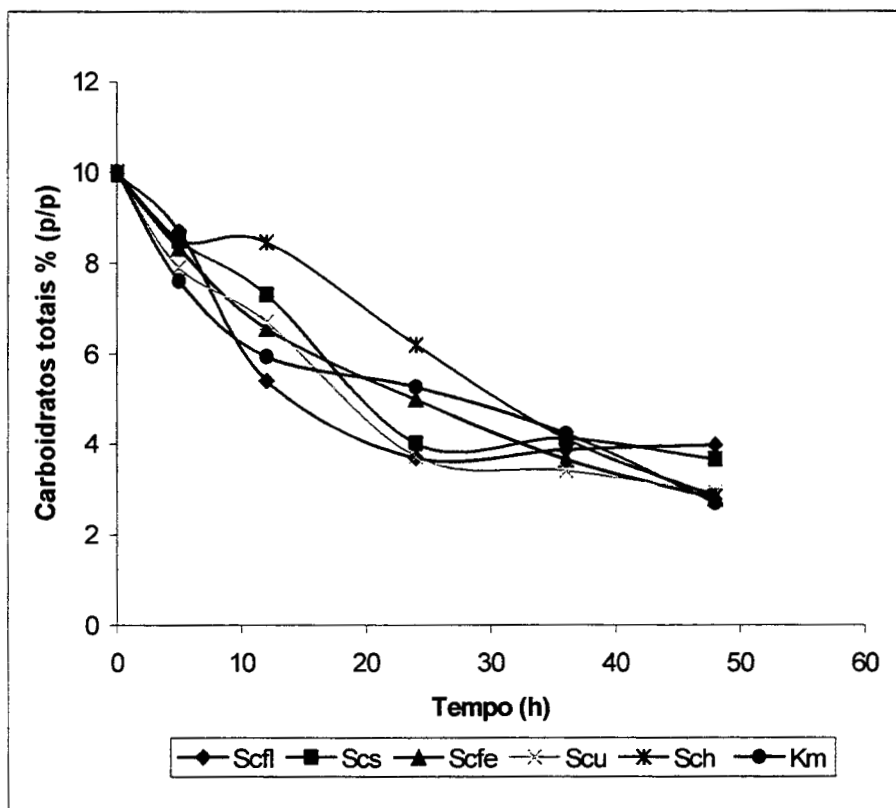
f) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Saf Instant (Scs);

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram escolhidas por serem as mais usadas para a produção industrial de etanol; a cepa *Kluyveromyces marxianus* por ser uma cepa que começa a ser empregada cada vez mais neste tipo de processo (SINGH et al.(a),1998; SINGH et al. (b), 1998; PATARO et al., 1998; GOUGH et al., 1996; ).

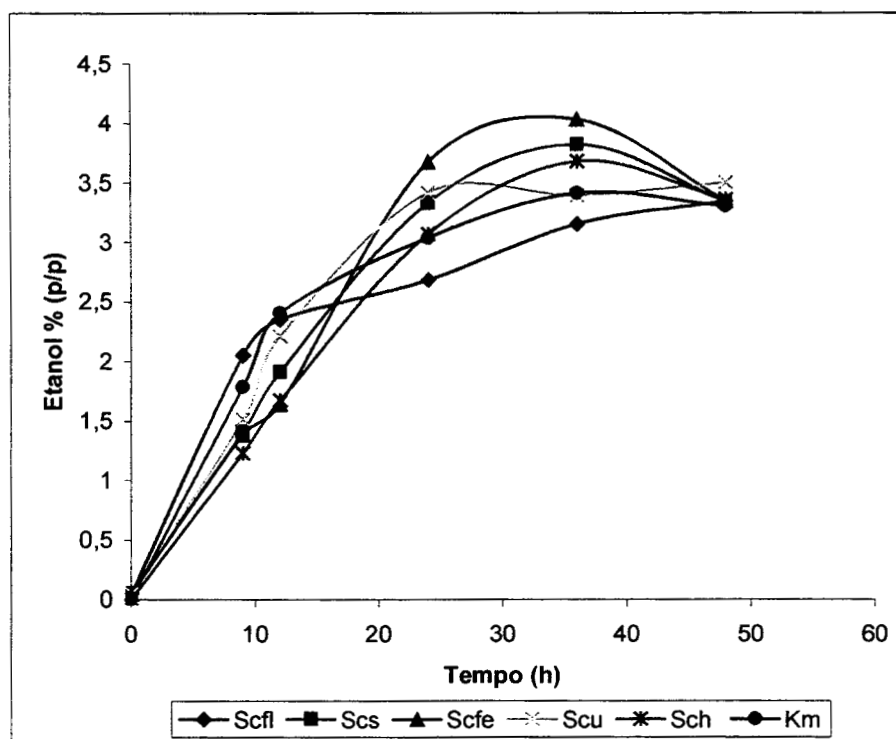
As cepas foram testadas quanto a sua capacidade de consumir os açúcares da soja, produzir um mínimo de metabólitos secundários e um nível industrialmente viável de etanol.

O meio de cultura usado neste teste era composto de melaço de soja diluído a 50 % (v/v) em água destilada. Tal diluição era necessária para evitar a inibição do crescimento microbiano causado pela alta concentração de carboidratos. A temperatura foi mantida a 30 °C e o pH a 6,0, que são as condições ótimas de crescimento das leveduras, já que o etanol é um produto associado ao crescimento. O crescimento nesta etapa foi executado em incubadora rotatória, utilizando frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de cultura, executando o procedimento descrito no item 3.6.2. Foi adicionado um inóculo de 15 h, preparado como descrito no item 3.6.1., na proporção de 3 % (v/v).

As Figuras 4.1. e 4.2. apresentam os resultados obtidos de consumo de substrato e produção de etanol, quantificados pelos métodos descritos nas seções 3.10. e 3.14., respectivamente. Os dados referentes aos gráficos estão no Apêndice 3.



**Figura 4.1.** Consumo de carboidratos totais em função do tempo para diversas cepas cultivadas em melão de soja.



**Figura 4.2.** Produção de etanol em função do tempo para diversas cepas cultivadas em melão de soja.

Os resultados apresentados nas Figuras 4.1. e 4.2. tem mais valor qualitativo que quantitativo, servindo para evidenciar qual cepa tem maior afinidade com o substrato em questão. As cinéticas de consumo de substrato e produção de etanol são muito distantes das cinéticas decorrentes de um cultivo em biorreator que é o objetivo deste trabalho, como será visto mais adiante.

Considerando-se que a produção de etanol termina em 36 horas pode-se calcular o rendimento das cepas por substrato consumido (Equação 2.3.) obtendo-se: 51,59; 63,66; 63,77; 51,54; 62,24; 58,87 % (p/p) para as cepas Scfl, Scs, Scfe, Scu, Sch, Km respectivamente. Através destes valores podemos inferir que as cepas Scs e Sfe, são as que produzem mais etanol com a menor quantidade de substrato, gerando menos secundários. Analisando os resultados encontrados de rendimento pode-se observar que todos os valores foram maiores que o ideal (51,1 %). Este fato pode ser explicado pela associação de vários efeitos como:

a) Os valores de carboidratos totais do melão puro estão em % p/p e as diluições e análises são feitas com base em volume, como a massa específica do melão de soja é maior que 1 e variável, ocorre diferença;

b) A hidrólise aplicada no teste de carboidratos totais do item 3.10. é muito mais forte que a hidrólise do teste de carboidratos totais do item 3.7.4. gerando um maior valor de carboidratos totais;

c) Para a realização do método de carboidratos totais (3.10.) necessita-se diluir a amostra 3000 vezes, o que pode aumentar o erro experimental.

Apesar da relação etanol-carboidratos apresentar estas discrepâncias, as curvas são comparáveis entre si.

O rendimento é um dado importante para a análise deste experimento, mas não deve ser considerado isoladamente. Analisando os gráficos pode-se visualizar que as cepas Scfe e Scs apresentaram uma performance semelhante, pois as variações ocorridas são pequenas, podendo a cepa Scs ser uma boa alternativa em um processo industrial por ser uma cepa comercial disponível a baixo custo no Brasil. Devido a suas características a cepa Scfe foi escolhida para prosseguir os testes com o melão de soja.

Pode-se notar, na Figura 4.2., um declínio da quantidade de etanol depois de 36 horas, este declínio pode estar associado a evaporação de etanol, ou ao consumo deste como fonte de carbono após o término dos carboidratos de baixo peso molecular, já que não se tinha anaerobiose total neste experimento.

#### **4.3. Condições ótimas de processo**

Os experimentos 4.3.1., 4.3.2.1., 4.3.3. apresentados a seguir, foram realizados em incubadora rotatória seguindo o procedimento descrito no item 3.6.2. O inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* C 94 (Scfe) foi preparado como no item 3.6.1. e adicionado a 3 % (v/v), em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de melão de soja diluído a 50 % (v/v) com água destilada.

Nos experimentos 4.3.2.2., 4.4. e 4.6. utilizou-se os reatores de bancada BTS-27 e Biostat B., seguindo o procedimento descrito no item 3.6.3. O inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* C94 foi preparado conforme descrito no item 3.6.1. O meio era constituído de melão de soja diluído a 50 % (v/v) em água destilada.

De forma geral, o pH foi mantido a 6,0 e a temperatura a 30 °C, salvo em experimentos onde estes parâmetros são variáveis. As análises de número de células,

etanol, e carboidratos totais foram realizadas como descritas nos itens 3.12., 3.14. e 3.10., respectivamente.

#### 4.3.1. Temperatura ótima

A determinação da temperatura ótima de processo foi realizada em incubadora rotatória a diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.3., 4.4., 4.5. (Dados dos gráficos estão no Apêndice 4.).

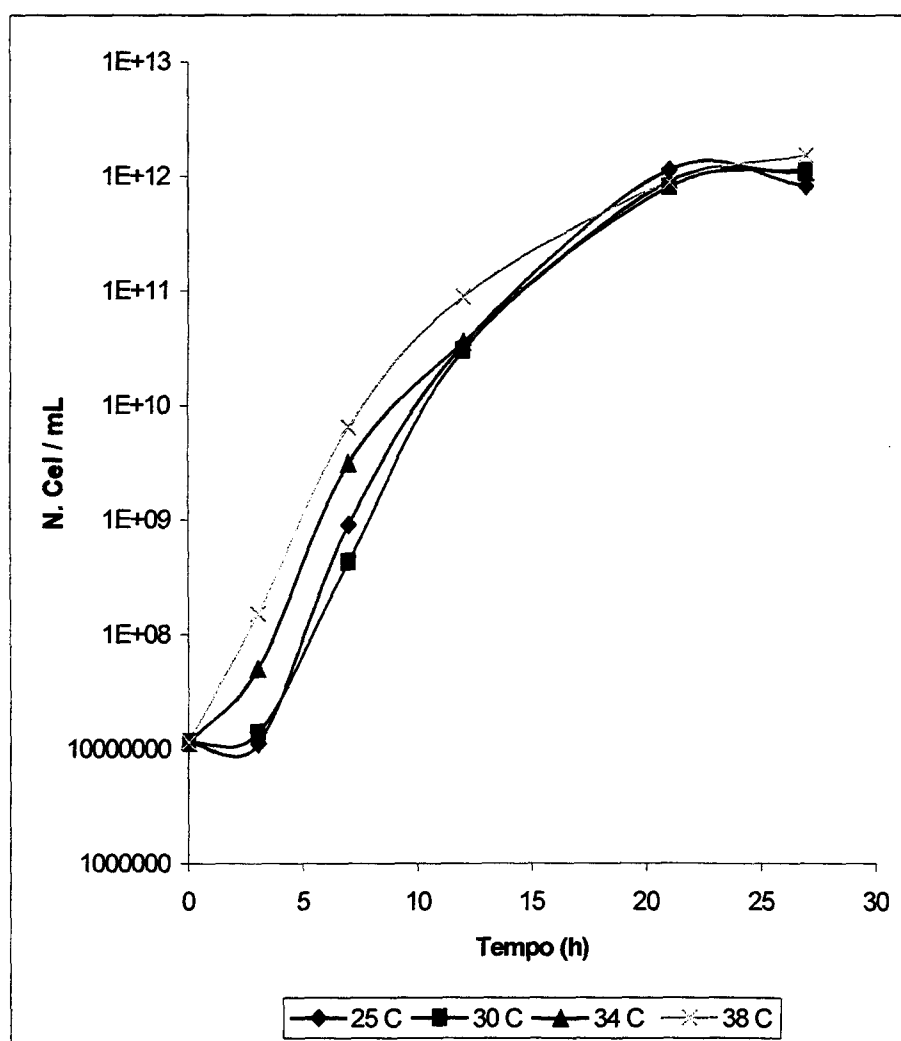
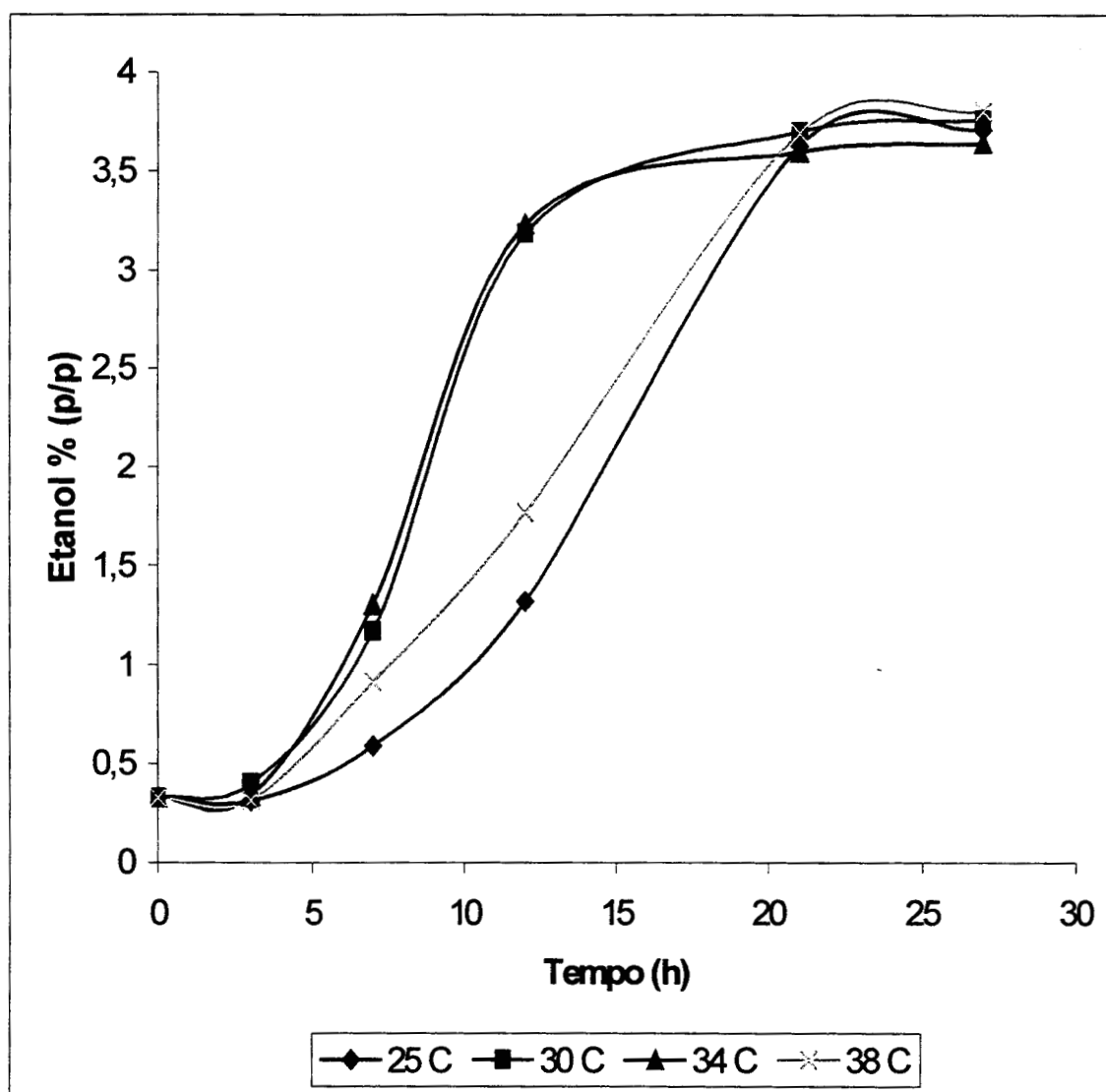
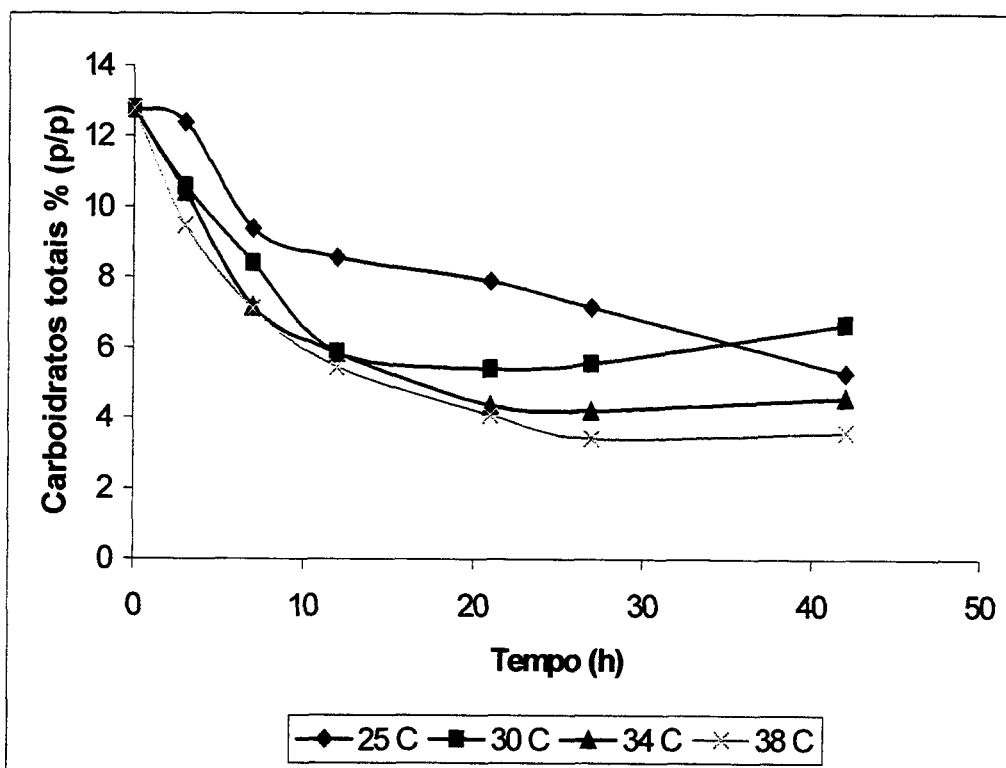


Figura 4.3. Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em função do tempo de cultivo de melço de soja a diversas temperaturas.



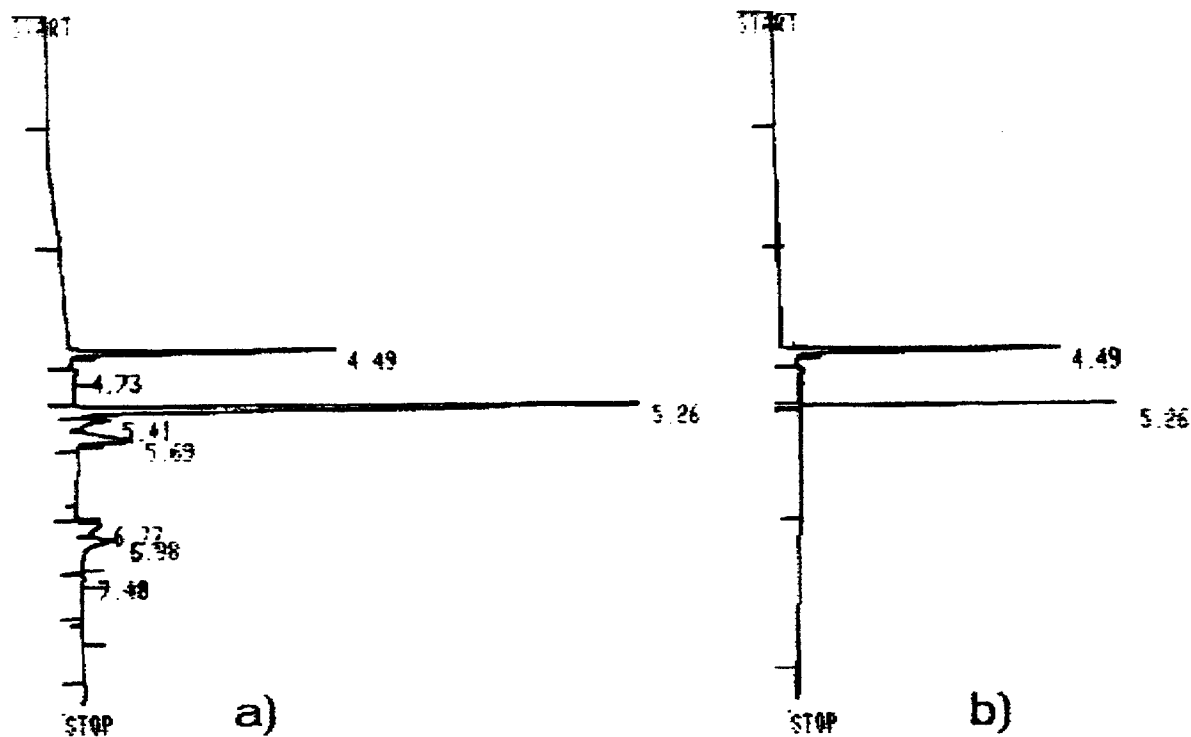
**Figura 4.4.** Produção de etanol em função do tempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em melão de soja a diferentes temperaturas





**Figura 4.5.** Consumo de carboidratos totais em função do tempo de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* em melão de soja a diferentes temperaturas.

Através da observação dos gráficos pode se concluir que a melhor faixa de temperatura é entre 30 e 34 °C, dado que concorda perfeitamente com os descritos por ANCIÃES (1991). Na Figura 4.5. observa-se um crescente consumo de substrato com o aumento da temperatura. Observando-se a Figura 4.4., pode-se notar que não há um crescimento da produção de etanol com o incremento da temperatura. Isto ocorre devido a uma maior produção de produtos secundários a temperaturas mais altas. Os cromatogramas das medições de etanol das temperaturas mais altas apresentam muito mais picos, que os das temperaturas mais baixas, como pode ser observado na figura 4.6.



**Figura 4.6.** Cromatogramas de melão de soja fermentado a 38 (a) e 30 °C (b). Onde o pico 4,49 e 5,26 correspondem a etanol e propanol respectivamente.

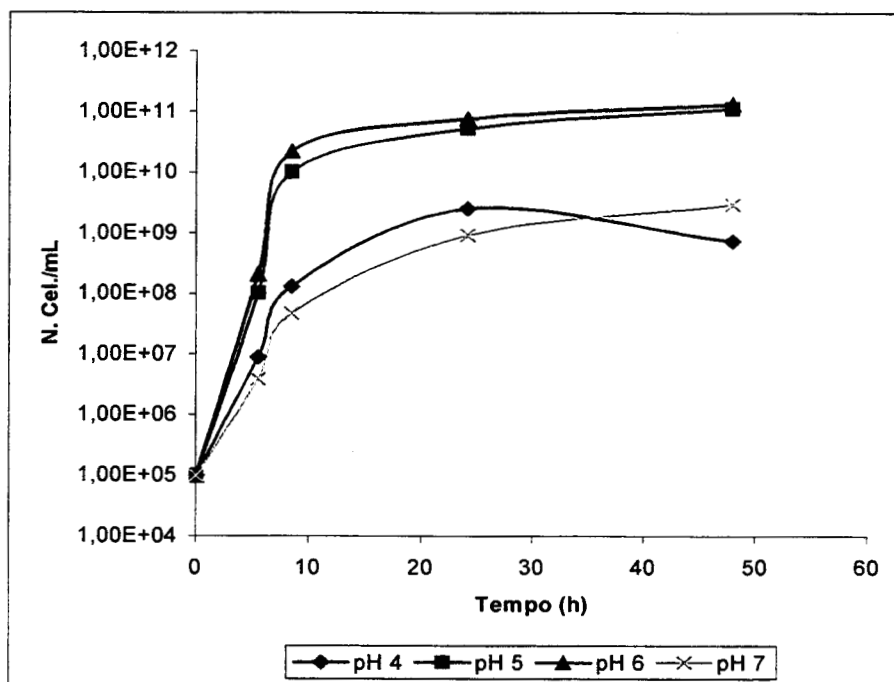
### 4.3.2. pH ótimo

O pH foi estudado de duas formas distintas, levando-se em conta as plantas existentes de etanol industrial: em alguns casos o pH é ajustado inicialmente e a fermentação se desenrola sem controle; a outra situação seria o monitoramento do pH com o auxílio de um eletrodo de pH ligado a um controlador que corrige o pH com o auxílio de bombas de ácido e base. As duas possibilidades são apresentadas a seguir.

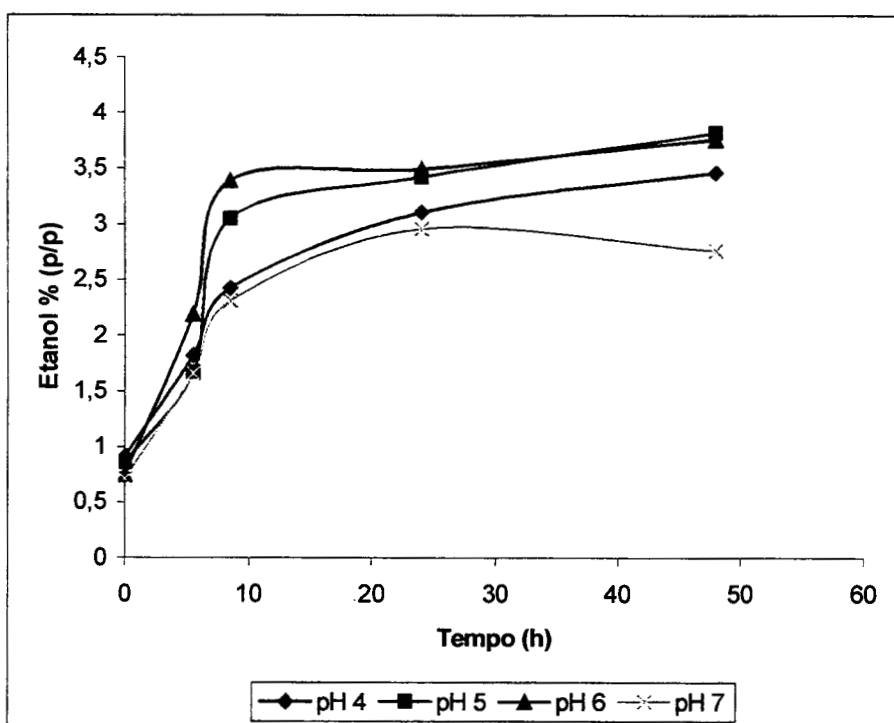
#### 4.3.2.1. pH inicial ótimo

O teste para a determinação do pH inicial ótimo foi realizado em incubadora rotatória, com frascos Erlenmeyers contendo melão de soja com pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0. As Figuras 4.6, 4.7., 4.8. (Dados das Figuras no Apêndice 5) mostram que os resultados

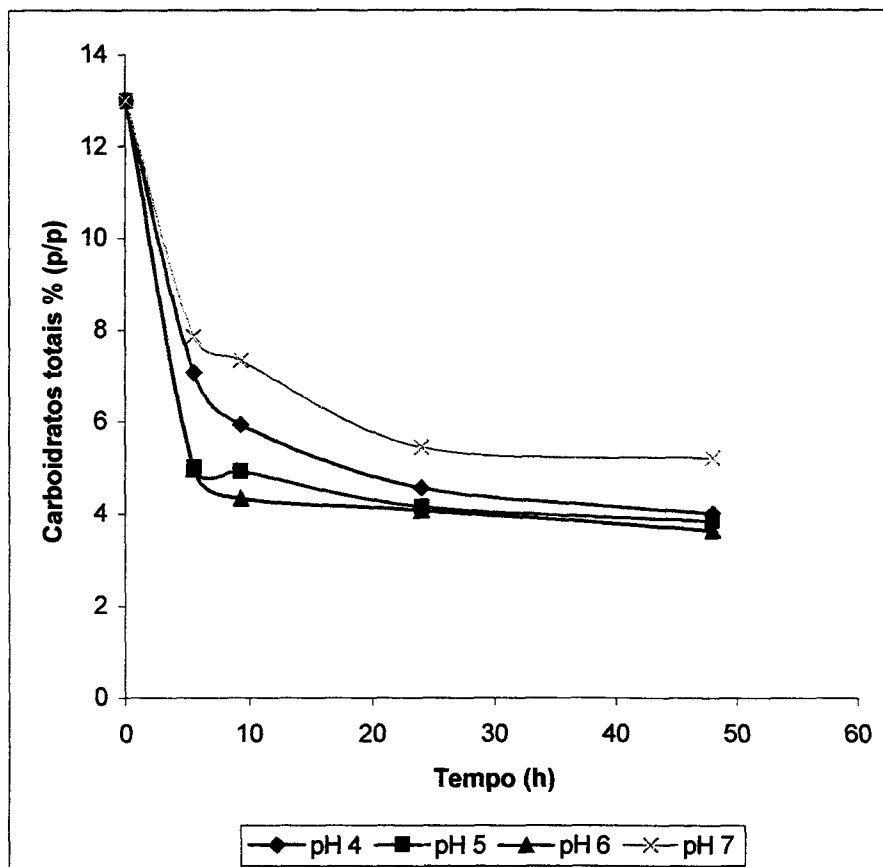
obtidos estão de acordo com os relatados por ANCIÃES (1991) e MAIORELLA (1985) para outros substratos.



**Figura 4.7.** Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em função do tempo de cultivo de melão de soja a diferentes pHs iniciais



**Figura 4.8.** Produção de etanol em função do tempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em melão de soja a pHs variáveis.



**Figura 4.9.** Concentração de carboidratos totais em função do tempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em melão de soja a diferentes pHs.

Com base nos resultados mostrados nas Figuras 4.6., 4.7. e 4.8. pode concluir-se que um cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (C94), sem controle de pH, deve ter um pH inicial na faixa de pH 5,0 a 6,0.

#### 4.3.2.2. pH constante

O experimento de pH constante foi realizado em biorreator, o meio de melão de soja era suplementado com 0,1 g/L de  $MgSO_4$  e mantido a temperatura em 30 °C. O pH era mantido constante com o uso de HCl (1M) e NaOH (1M). Os resultados são apresentados nas Figuras 4.9. e 4.10. (Dados dos gráficos no Apêndice 6.).

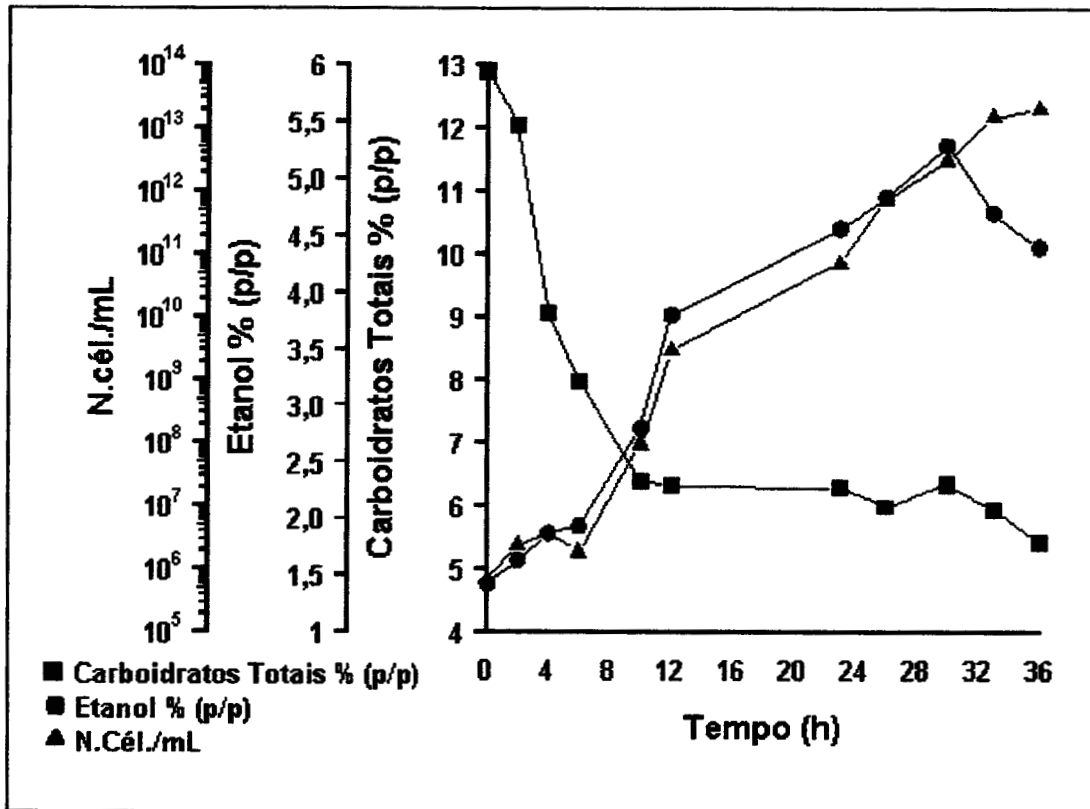


Figura 4.10. Fermentação de melado de soja a pH 6,0 constante.

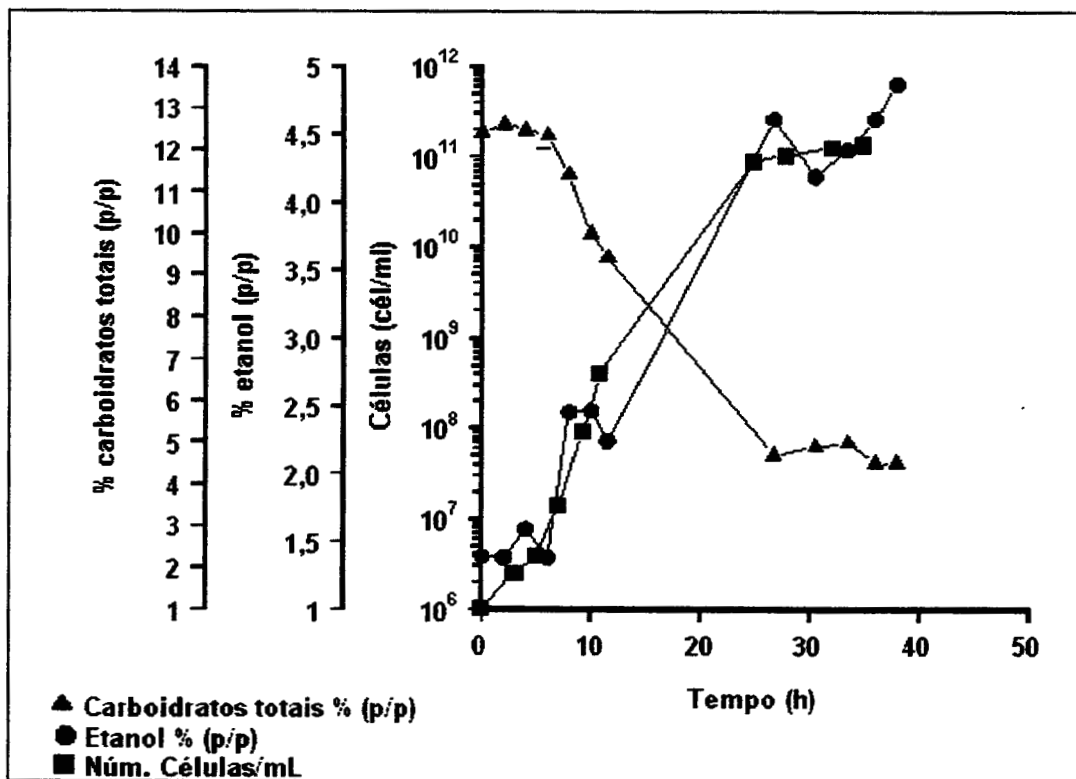


Figura 4.11. Fermentação de melado de soja a pH 5,0 constante.

Devido ao fato deste experimento ser considerado de condições ideais, os valores de: rendimento sobre substrato total, rendimento sobre substrato consumido, eficiência de fermentação e produtividade, a pH 6,0 e 5,0 são apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Dados cinéticos da fermentação de melaço de soja por *Saccharomyces cerevisiae* a pH 5 e 6 constantes.

Dado cinético	pH 6	pH 5
Rendimento (sobre substrato total, 2.2.) (%)	29,55	23,92
Rendimento (sobre substrato consumido, 2.3. ) (%)	55,60	23,92
Eficiência de fermentação (2.4.) (%)	108,23	73,81
Produtividade (2.7.) (% Carboidratos/ h)	0,1588	0,1292

Com base nos dados pode-se afirmar que a fermentação de melaço do soja a pH constante da cepa *Saccharomyces cerevisiae* C94, tem melhores resultados a pH 6,0, apesar do pH mais usado industrialmente ser na faixa de 4,0 a 5,0. Esta diferença pode estar associada a faixa ótima de crescimento da levedura, já que esta era armazenada a pH 6, ficando condicionada a este pH. Outra explicação provável é a precipitação da proteína de soja, pois seu ponto isoelétrico situa-se na faixa de pH 4,0 - 5,0. Apesar do meio ser agitado vigorosamente as proteínas aglutinam-se ficando menos disponíveis.

#### 4.3.3. Aditivos

Vários nutrientes além de fonte de Carbono e Nitrogênio devem estar presentes a fim de suprir as necessidades fisiológicas das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica.

Substâncias como fósforo, enxofre, potássio, magnésio, zinco, entre outras, devem estar presentes, pois participam das rotas metabólicas dos microrganismos, tendo

fisiologia bem definida dentro da célula. Sendo assim foram testados sais comumente usados em fermentações alcoólicas como:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , além de algumas de suas combinações. Também foi testada a adição de extrato de levedura como alternativa de enriquecimento do meio de cultivo.

Os testes foram feitos em incubadora rotatória com frascos contendo melão de soja suplementados com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , na quantidade de 1, 1, 0,2, 0,02 g/l, respectivamente (Concentrações baseadas em quantidades mínimas utilizadas em meios de cultura). Na Tabela 4.4. são apresentados os resultados obtidos. Foram medidos apenas os níveis de etanol e carboidratos totais finais. As quantidades iniciais de carboidratos totais (13,50 % (p/p)) e etanol (0,05 % (p/p)) que eram iguais nos diferentes frascos.

**Tabela 4.4.** Quantidades de etanol e carboidratos totais finais de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* em melão de soja com diferentes adituições.

Aditivo	% Etanol (p/p)	% Açúcares (p/p)
1. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,96	2,42
2. $\text{NH}_4\text{Cl}$	3,88	3,22
3. $\text{MgSO}_4$	5,03	2,41
4. $\text{CaCl}_2$	3,60	3,18
5. Sais 1,2,3,4 juntos	3,30	5,18
6. Sais 1 e 2 juntos	2,08	4,39
7. Extrato de levedura	3,75	2,40
8. Melão puro (controle)	3,69	2,38

Os resultados evidenciam que tanto a suplementação de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , quanto de  $\text{MgSO}_4$  podem trazer um incremento de produtividade a fermentação de melão de soja para a produção de etanol. Contudo, o custo do  $\text{MgSO}_4$  é 2 vezes menor que o do  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o que levou a adotar-se apenas o sal  $\text{MgSO}_4$  como aditivo. A combinação de  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  não apresentou nenhum ganho de produtividade.

Foram testadas várias concentrações de  $MgSO_4$  a fim de se determinar qual seria a mais adequada. Os resultados são apresentados na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5.** Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* em melaço de soja aditivados com  $MgSO_4$  em diferentes concentrações.

Concentração de $MgSO_4$ (g/L)	% Etanol (p/p)	% açúcares (p/p)
2	3,669	3,12
1	3,7297	2,16
0,2	4,059	2,25
0,1	3,890	3,01
0,01	3,900	3,192

Os resultados obtidos mostram que devem ser adicionadas quantidades muito pequena pois a variação de etanol obtido com a suplementação de 0,01 até 0,2 g/L não foi significativa. A partir de 0,2 g/L nota-se uma crescente inibição.

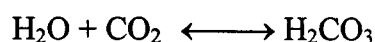
O sal  $MgSO_4$  é um sal muito usado para compor meios de cultura de baixo custo (KADAM & NEWMAN, 1997). Os íons Magnésio são essenciais na via glicolítica (WALKER & MAYNARD, 1997), participando como cofator. Este íon aparece associado a pelo menos 3 enzimas desta via: glicoquinase, fosfofrutoquinase, enolase (DAVID, 1996). Além disso os íons Magnésio podem conferir resistência a etanol (CIESAROVA; SMOGROVICOVA; DOMENY, 1996) e estimular a absorção de fosfato.

#### 4.4. Microaeração

A fermentação alcoólica necessita de pequenas quantidades de oxigênio, já que as leveduras não conseguem multiplicar-se mais que 4 ou 5 gerações sem ao menos 1 ppm de oxigênio dissolvido. Uma das alternativas para suprir-se pequenas quantidades de oxigênio ao processo, é a circulação de ar entre a superfície do líquido e a cabeça do

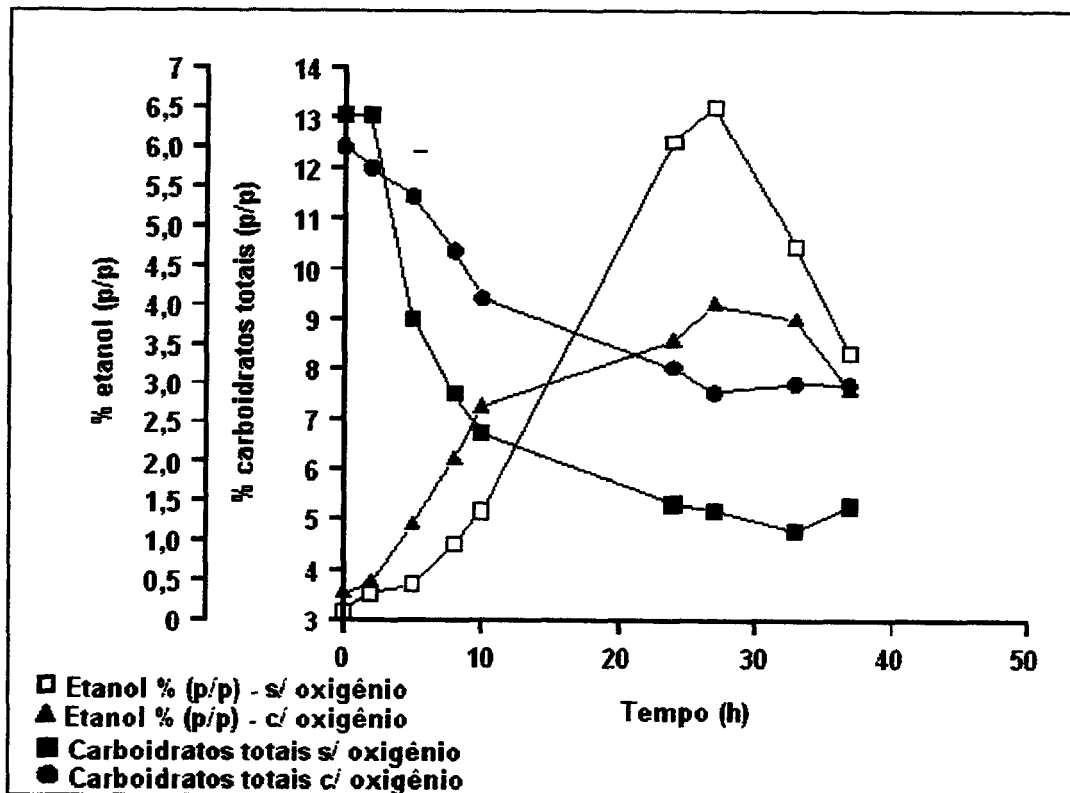


biorreator. Este procedimento apresenta vantagens adicionais pois expulsa o CO<sub>2</sub>, pressurizado no reator. O acúmulo de CO<sub>2</sub> causa aumento de pressão no espaço compreendido entre a cabeça do reator e a superfície do líquido. O aumento de pressão faz com que a quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido no meio aumente gerando a reação abaixo. O rebaixamento do pH causado pelo H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> resulta em inibição de crescimento celular. Segundo DEBS-LOUKA et al. (1999) o CO<sub>2</sub> em conjunto com a pressão é tóxico aos microrganismos, e este efeito pode ser potencializado pelo aumento de pressão, ou tempo de exposição.



O experimento foi realizado com o reator BTS-27 conectado a uma bomba de ar com vazão 0,6 L/min que circula ar filtrado na superfície do líquido mantendo as condições de esterilidade. O pH não foi controlado e o experimento foi realizado com e sem ar, os resultados são apresentados na Figura 4.11. (dados dos gráficos no Apêndice 7.).

Através dos resultados obtidos para a aeração superficial de 0,6 L/min, pode-se notar que houve decréscimo da produção de etanol quando comparado a um cultivo anaeróbio. Este resultado não invalida a estratégia de microaeração, que possivelmente forneça resultados positivos com outros substratos. Este experimento chama a atenção para a importância da presença de oxigênio em concentrações inadequadas em um cultivo, mesmo quando adicionado na superfície do líquido.



**Figura 4.12.** Comparativo entre cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* em melão de soja com e sem microaeração.

Outro aspecto está associado a síntese ácidos graxos essenciais e esteróis, que são fundamentais para a formação de novas células. Estes compostos só são formados na presença de Oxigênio. Como o melão de soja já possui uma quantidade apreciável de lípideos, o processo transcorre melhor com total anaerobiose.

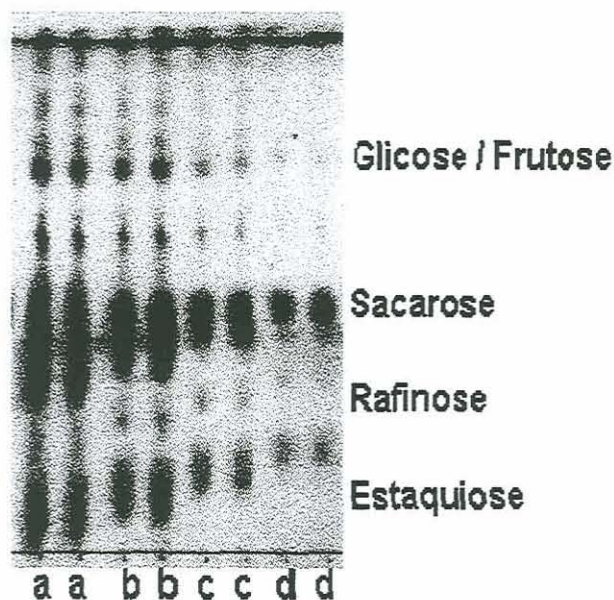
Um efeito adicional de perda de etanol deve ser considerado por arraste da corrente de ar.

#### 4.5. Análises de carboidratos

Dos diversos constituintes do melão soja com certeza os carboidratos são os mais importantes na produção de etanol por fermentação. A soja tem um perfil de carboidratos bem conhecido e descrito na literatura, já o melão de soja tem um perfil ainda desconhecido.

Durante o processamento da soja, os carboidratos desta sofrem várias transformações, que acabam por gerar combinações e variações dos carboidratos originais da soja. Os carboidratos conjugados com outras moléculas ou carboidratos de grande peso molecular não podem ser convertidos diretamente a etanol. Por este motivo resolveu-se pesquisar mais sobre os carboidratos do melaço de soja, a fim de se saber o máximo de etanol que poderia ser obtido deste resíduo. Os testes usuais de detecção e quantificação de carboidratos como os métodos descritos nas seções 3.10., 3.7.4. apresentam, diferenças em seus resultados devido a esta combinação incomum de carboidratos. Além disso, não fornecem uma idéia precisa de rendimento já que são testes de carboidratos totais. O conhecimento do perfil preciso dos carboidratos do melaço de soja possibilita decidir quais ações podem ser tomadas para evitar, ou remediar esta condição.

O primeiro teste realizado foi a determinação qualitativa, pelo método de cromatografia de camada delgada (CCD) descrito na seção 3.8. Na Figura 4.12. pode-se visualizar as amostras de melaço de soja diluídas 2, 3, 4, 10 vezes (em água destilada), indicadas na Figura como a, b, c, d, respectivamente.

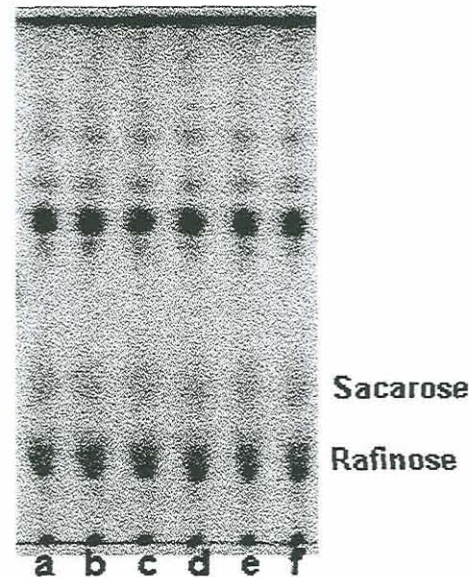


**Figura 4.13.** Placa de CCD com melaço de soja com diferentes concentrações, onde a, b, c, d, são as diluições de: 2, 3, 4, 10 vezes.

Os padrões glicose, frutose, sacarose, estaquiiose, rafinose, foram eluídos junto às amostras, identificando os carboidratos presentes. Contudo, várias bandas não foram identificadas, reforçando a idéia da presença de carboidratos combinados a outras moléculas. Outra hipótese seria a presença de carboidratos  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ , comuns em vegetais (MEYER, 1968), como:

- $C_3$ : gliceraldeído;
- $C_4$ : eritrose, treose;
- $C_5$ : ribose, arabinose, xilose, lixose;
- $C_6$ : alose, altrose, manose, idose, talose, galactose.

A Figura 4.13. apresenta amostras de melaço de soja fermentado, pelas diferentes cepas do item 4.5., depois de 36 h (último ponto do cultivo apresentado na Figura 4.2.). Pode ser visualizado nesta Figura que as bandas referentes a sacarose, desaparecem. As bandas situadas na região da glicose/frutose, ficam mais fracas. Na região das bandas rafinose/estaquiiose, uma das bandas desaparece e outra é preservada.



**Figura 4.14.** Placa de CCD com melão de soja fermentado. Onde: a) *Kluyveromyces marxianus*, b) *Saccharomyces cerevisiae hansen*, c) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Fermol, d) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Uvaferm, e) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Fleischmann, f) *Saccharomyces cerevisiae*, nome comercial Saf Instant.

O segundo teste realizado é o de cromatografia líquida, executado pelo Instituto de Pesquisa Tecnológicas de São Paulo, seguindo o procedimento geral descrito no item 3.11. Foram testadas 2 amostras, uma de melão bruto da batelada 3 (Tabela 4.1.) e outra de melão fermentado por 36 h (ponto 36 h do cultivo apresentado na Figura 4.9.).

As quantidades de carboidratos encontrados por cromatografia líquida são apresentadas na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6.** Resultado da análise de carboidratos do melão de soja por cromatografia líquida

Amostra	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Sacarose (g/L)	Rafinose (g/L)	Estaquiase (g/L)
Melão Bruto	8,43	8,26	77,12	23,12	84,53
Melão Fermentado	2,04	1,96	10,02	50,02	5,30

Com base nestes resultados pode-se afirmar que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Scfe) tem capacidade de fermentar os açúcares: glicose, frutose, sacarose. Além disso tem a capacidade de retirar a galactose mais externa da molécula de

estaquiouse, transformando-a em rafinose que é demonstrado claramente pela Tabela 4.6. (pelo aumento da quantidade de rafinose).

O carboidrato residual presente ao longo das fermentações para a produção de etanol, na sua maioria, é constituído por rafinose e, possivelmente carboidratos combinados a outras moléculas, além de carboidratos  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$  ( que não são fermentáveis), gerados durante o processamento da soja. A etapa mais crítica do processo é sem dúvida a concentração do melão de soja, onde este é exposto a temperaturas altas.

Este problema pode ser contornado realizando-se uma concentração do melão de soja em condições mais brandas. Outra solução seria utilizar-se culturas puras, ou mistas, que degradem rafinose. A rafinose é um carboidrato muito freqüente na natureza, por este motivo já existem cepas recombinantes que consomem este açúcar (MONIRUZZAMAN, 1997).

#### **4.6. Melões modificados**

Como já foi demonstrado o melão de soja tem em sua composição vários tipos de carboidratos, e parte destes não são fermentados pelas leveduras. Tendo em vista este problema, resolveu-se tentar hidrolisar os carboidratos do melão de soja a fim de se obter uma maior conversão. Uma das maneiras viáveis industrialmente de se hidrolisar carboidratos é a hidrólise ácida.

O procedimento que se mostrou mais adequado foi:

- a) Reduzir o pH do melão de soja a 3,0, usando HCl ou  $H_2SO_4$  (Synth / Brasil);
- b) Colocar o melão de soja em reator autoclave a 121 °C por 15 min;

c) Esfriar, ajustar o pH na faixa de 5,0 –6,0.

A eficiência deste tratamento pode ser demonstrada pela quantidade de açúcares redutores. Foram preparadas 2 amostras, uma de melação puro e uma segunda de melação hidrolisado seguindo o procedimento descrito anteriormente, medindo-se quantidade de açúcares totais e quantidade de açúcares redutores pelos métodos 3.10. e 3.9., respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7.** Quantidade de carboidratos totais e açúcares redutores presentes em melação de soja bruto e hidrolisado

Amostra	Carboidratos totais (% p/p)	Açúcares redutores (g/L)
Melaço Bruto	9,87	1,97
Melaço hidrolisado	9,62	47,22

Com base na Tabela 4.7. pode-se afirmar que o tratamento aplicado ao melação de soja disponibilizou uma grande quantidade de açúcares redutores. O melação hidrolisado quando deixado em repouso apresenta 2 fases, separáveis por centrifugação. A porção sólida corresponde em cerca de 10 % (p/p) do total. A composição centesimal das 2 fases, e do melação de soja antes da hidrólise é apresentada na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8.** Composição centesimal do melação de soja puro e das fases do melação de soja hidrolisado.

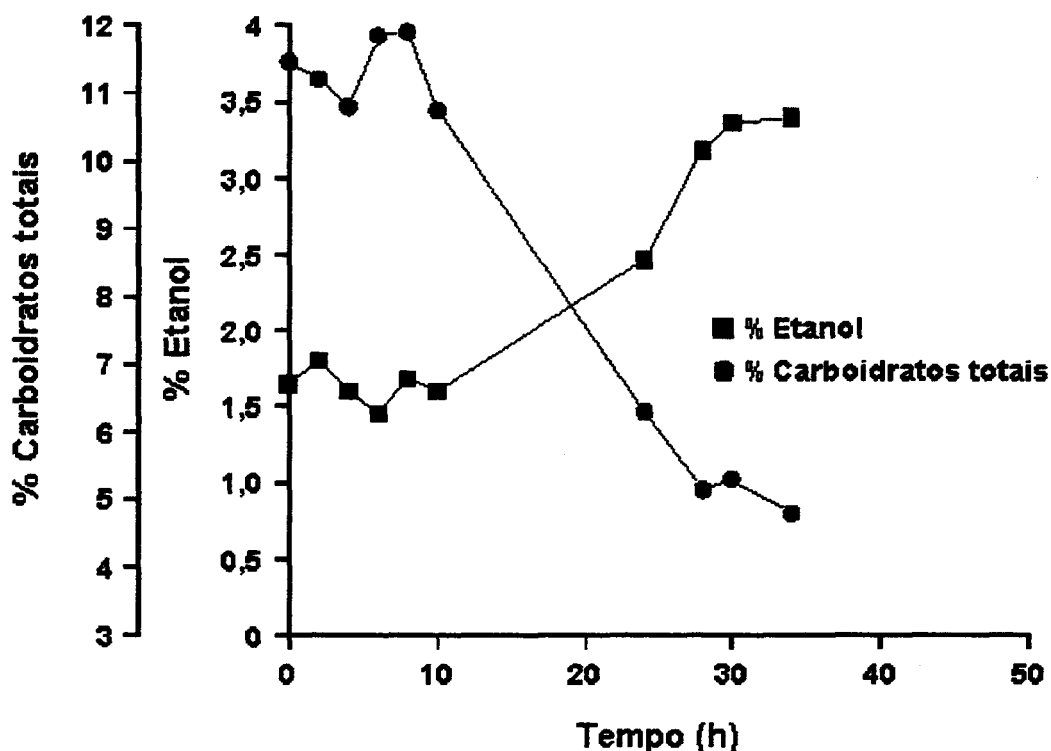
Tipo de análise	Melaço puro	Precipitado	Sobrenadante
Sólidos totais % (p/p)	31,3	41,0	18,9
Cinzas % (p/p)	4,2	3,6	7,5
Proteína total % (p/p)	3,3	5,4	3,3
Lipídios % (p/p)	4,0	2,1	0,1
Fibra bruta % (p/p)	4,0	0,1	0,0
Carboidratos por diferença % (p/p)	19,8	29,7	8,0

Com base nestes resultados pode se afirmar que 70,80 % dos carboidratos, 91,93 % das cinzas, 84,62 % das proteínas, 30 % da matéria graxa ficam na fração sobrenadante. É importante ressaltar que no sobrenadante não foram detectadas fibra.

Estes valores são baseados em termos de massa, e foram obtidos levando-se em conta a densidade e proporção entre as 3 frações.

O sobrenadante separado por centrifugação teve seu pH ajustado a 5,5 e foi fermentado a pH constante igual a 5,5, os resultados são apresentados na Figura 4.14.

(dados do gráfico estão no Apêndice 8.)



**Figura 4.15.** Fermentação do sobrenadante do melaço hidrolizado

A fermentação do melaço hidrolizado apresentou uma fase lag longa, além de não ter tido uma boa produtividade. O provável motivo deste resultado negativo se deve a formação de sais, gerada durante o processo de acidificação e posterior correção do pH (alcalinização). Como o melaço de soja apresenta características tamponantes grandes quantidades de ácido e base foram necessárias para a execução deste procedimento.

Uma das causas possíveis da complexação dos açúcares da soja é a concentração inadequada do melaço de soja na fase de recuperação do etanol, no processo de obtenção de concentrados protéicos. Sendo assim, uma amostra de melaço de soja com



concentração na faixa de 19 % de sólidos totais foi fermentada a fim de se verificar a validade desta hipótese.

A fermentação foi realizada em incubadora e os resultados são apresentados na Tabela 4.9. Os meios testados foram melão de soja da batelada 3 diluído até a concentração de 8 % (p/p) de carboidratos totais (usado como controle), e melão de soja da batelada 4 obtido com 8 % (p/p) de carboidratos totais.

**Tabela 4.9.** Tabela comparativa entre melões obtidos com diferentes níveis de concentração, fermentados por *Saccharomyces cerevisiae*.

Amostra	Etanol (% p/p)	Carboidratos totais consumidos (% p/p)
Controle	3,12	4,40
Melão puro (batelada 4)	3,89	6,41

Através da observação dos resultados da Tabela 4.9., pode-se observar que a quantidade de etanol produzida e a quantidade de carboidratos consumidos é afetada pelo seu nível de concentração. Isto sugere que a exposição a elevadas temperaturas durante a concentração influi na composição dos carboidratos do melão de soja. O uso do melão exposto a altas temperaturas resulta em uma menor produtividade de etanol, menor consumo de carboidratos, reflexo das reações ocorridas. Como já foi citado no item 2.2.2.1., a excessiva exposição de açúcares ao calor gera a desidratação e redução da frutose a 1,3 frutopirranose, e a combinação da glicose e aminoácidos resultando em caramelos escuros (MAIORELLA, 1985), que não são fermentáveis. Uma solução para este problema seria a concentração a vácuo.

#### 4.7. Misturas cana-melão

A maioria das empresas produtoras de etanol no Brasil utilizam como substrato o caldo de cana-de-açúcar, embora esta matéria-prima não esteja disponível durante 3 meses por ano. Além disso, esta matéria-prima é regulada em termos de custo pelo

mercado de açúcar refinado, um produto de valor agregado geralmente maior do que o etanol. Seria extremamente vantajoso para as empresas produtoras de etanol terem ao seu dispor uma fonte de açúcar o ano inteiro, como é o caso do melaço de soja. O melaço pode ser utilizado em conjunto (misturado) com o caldo de cana, e, em períodos onde não haja produção de cana-de-açúcar, poderia ser fermentado sozinho.

Uma vantagem adicional para o uso do melaço de soja para a produção de etanol, consiste no fato da soja apresentar proteínas de alto peso molecular, não contendo quantidades apreciáveis de aminoácidos livres. Este fato é particularmente importante pois segundo NETO & YOKOYA ( 1997) o principal contaminante de fermentações alcoólicas é o *Lactobacillus fermentus*, que cresce na presença de leucina, isoleucina e valina, aminoácidos particularmente raros na soja. Logo, este é um importante fator para inibição deste contaminante.

Devido aos motivos citados anteriormente, resolveu-se testar o efeito da mistura do caldo-de-cana ao melaço de soja. Nesta parte do trabalho estudou-se o efeito da adição, em variadas proporções, do melaço de soja, em plantas que processam caldo de cana por processo fermentativo para obtenção de etanol. Para tanto, utilizou-se no melaço de soja todos os parâmetros de processo utilizados na cana, que são: temperatura ambiente, sem controle de pH.

Em uma primeira etapa, realizaram-se simulações do processamento da mistura melaço de soja com caldo de cana nas proporções 0-100%, a fim de determinar qual a faixa mais viável de mistura. Para isto, utilizou-se cultivo em incubadora rotatória contendo frascos com misturas na proporção 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 90, 100 % de açúcares de cana em relação a soja (p/p), segundo técnica descrita no item 3.6.2. Os experimentos foram realizados em duplicata e o número de células não foi avaliado,

apenas quantificaram-se açúcares totais (pelo método descrito no item 3.10.) e etanol (pelo método descrito no item 3.14.). A quantidade inicial de açúcar total foi sempre em torno de 10 % (p/p) que são as condições da indústria, porém com proporções variáveis entre as fontes de açúcar (soja ou cana).

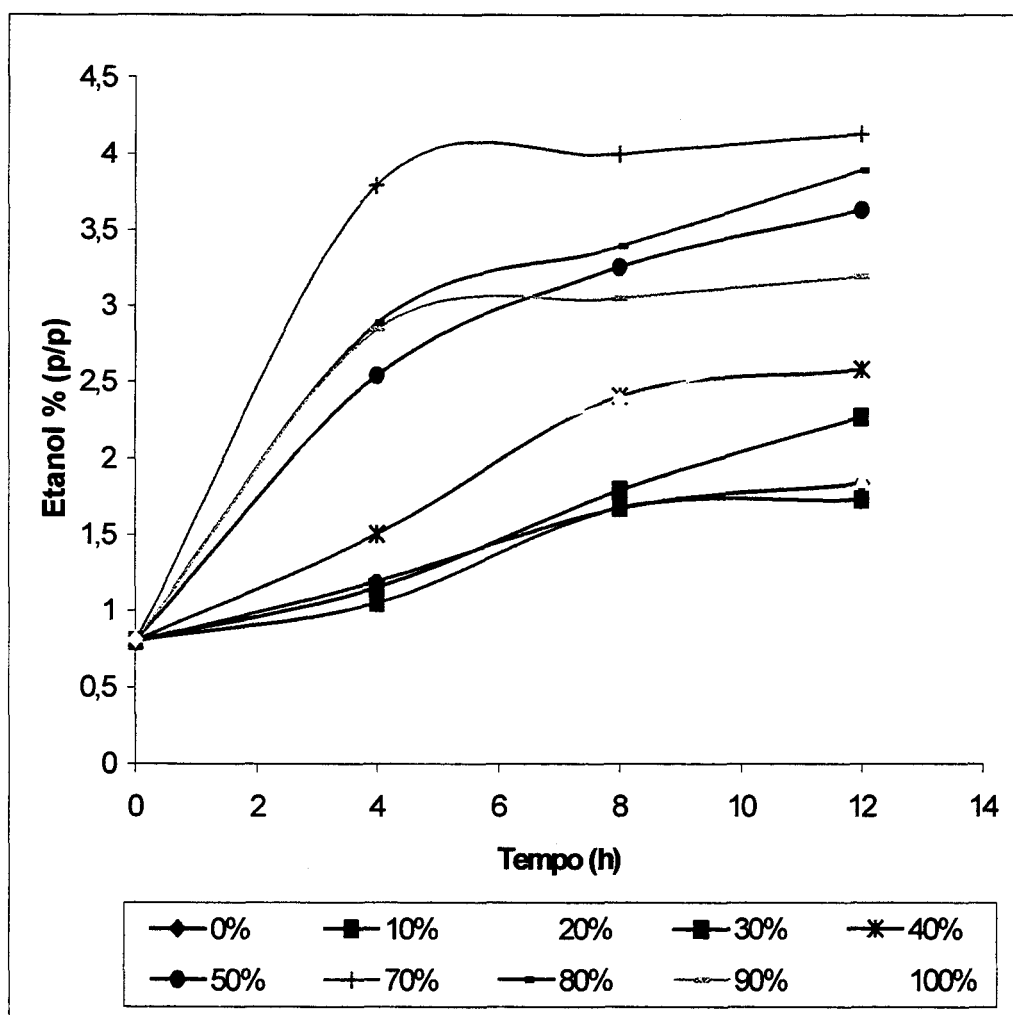
A solução de melaço de soja foi diluída com água destilada até a concentração de 10 % (p/p) e o mesmo procedimento foi realizado para o caldo de cana. Feito isso, foram misturados os dois substratos na proporção de 0-100 %. A notação utilizada ao longo do trabalho foi em relação a cana, ou seja uma amostra rotulada como 10 % contém 10 % de açúcares da cana e 90 % de açúcares da soja, uma amostra rotulada como 90 % contém 90% de açúcares de cana e 10 % de açúcares da soja e assim sucessivamente.

O melaço utilizado era proveniente da batelada 5 (Tabela 4), e o caldo de cana apresentava cerca de 17 % de carboidratos totais (antes da diluição a 10 %).

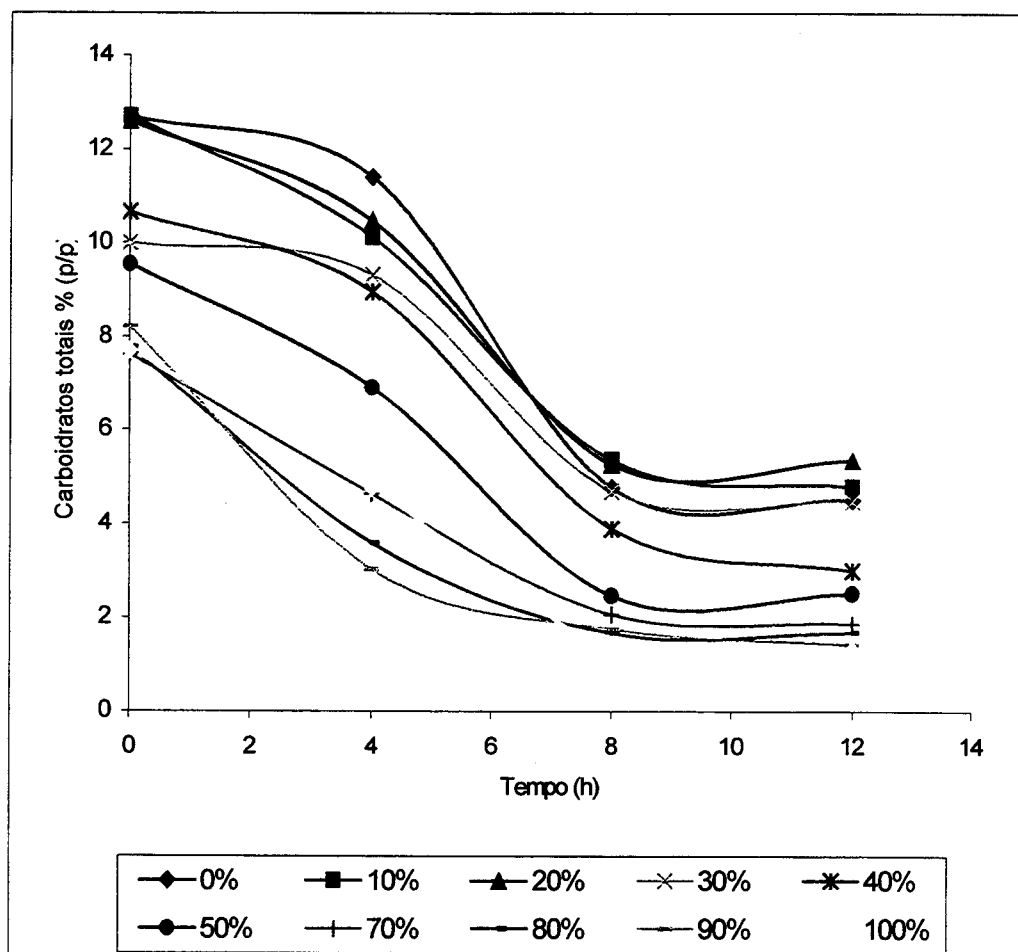
Na Figura 4.15. e na Figura 4.16. (dados dos gráficos Apêndice 9.) podem-se visualizar os resultados obtidos em incubadora rotatória das misturas soja e cana. Os resultados aqui apresentados servem para apontar qual é a proporção ótima da relação soja-cana. Isto ocorre devido a diferença entre a cinética da incubadora agitada e do biorreator.

Observando-se a Figura 4.15. pode-se visualizar que as concentração 50, 70, 80, 90 % apresentaram uma maior produção de etanol que a cana pura (100 %), sendo que a concentração ótima situa-se na faixa dos 70 %. Entretanto, observando-se a Figura 4.16., pode-se notar que a concentração inicial de carboidratos totais é diferente ao longo dos experimentos, pois a quantidade de carboidratos, como já foi citado anteriormente, é difícil de ser determinada no melaço de soja. Desta forma, foi necessário calcular o rendimento em termos de substrato consumido de cada curva.

O rendimento pode ser calculado pela razão entre quantidade de etanol e açúcares totais. Os resultados obtidos para as concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 90, 100 % (considerando que a fermentação termina em 8 horas), foram: 0,1118, 0,1191, 0,1435, 0,1870, 0,2360, 0,3463, 0,5771, 0,4255, 0,3485, 0,2486 (g carboidratos totais consumidos/% etanol gerado p/p), respectivamente. Estes dados confirmam os resultados visualizados nos gráficos.



**Figura 4.16.** Quantidade de etanol gerado pela fermentação em incubadora rotatória de misturas de melado de soja e caldo de cana.

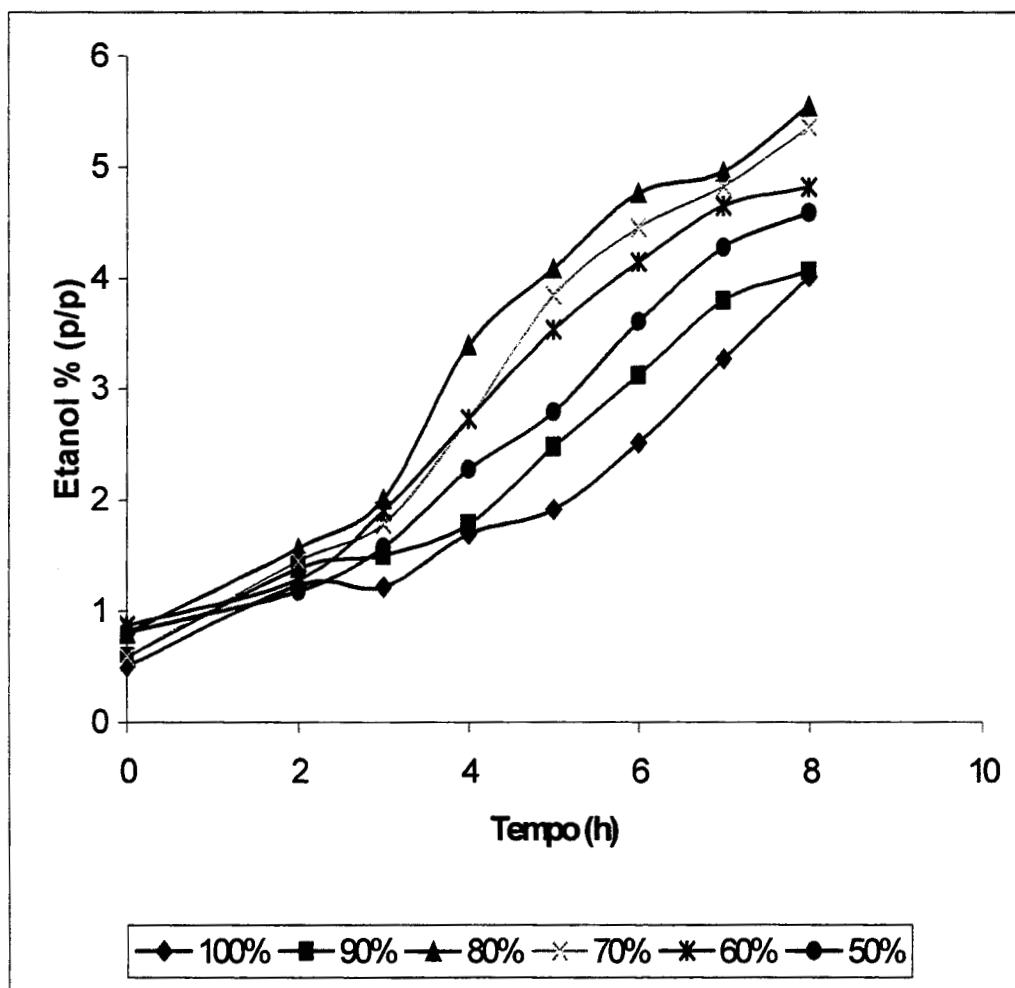


**Figura 4.17.** Quantidade de açúcares consumidos durante a fermentação em incubadora rotatória de misturas de melão de soja e caldo de cana.

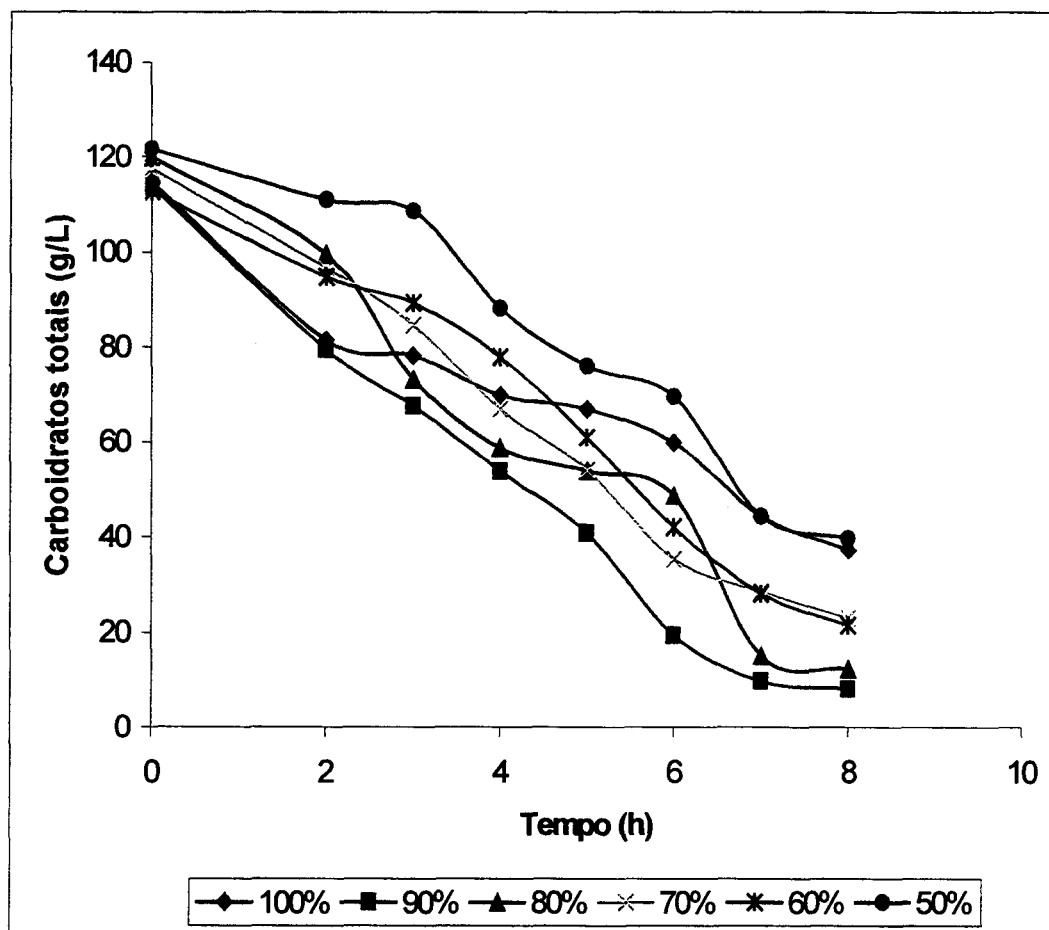
Após determinar que a faixa de 50-90 % de mistura é mais produtiva, detalhou-se esta faixa com simulações realizadas em biorreator de bancada seguindo procedimento descrito no item 3.6.3. A análise dos dados foi feita nas mesmas bases da primeira etapa, ou seja monitorando-se consumo de substrato e produção de etanol, seguindo os métodos descritos nos itens 3.10 e 3.14, respectivamente. A quantidade de células foi determinada pelo método de contagem em gota descrito no item 3.12., mas não houve crescimento significativo das células. O crescimento variou entre  $1,13 \times 10^5$  e  $6,33 \times 10^6$  Cél/mL.

Observando-se as Figuras 4.17. e 4.18. (os dados dos gráficos são apresentados no Apêndice 9.) pode-se concluir que a melhor composição soja-cana é a proporção de 80

%, ou seja 20 % de açúcares da soja para 80 % de açúcares da cana. Entretanto, a adição de até 50 % de melaço de soja pode ser benéfico na fermentação de caldo de cana para produção de etanol.



**Figura 4.18.** Quantidade de etanol produzido durante a fermentação em biorreator de misturas de melaço de soja e caldo de cana.



**Figura 4.19.** Quantidade de açúcares consumidos durante a fermentação em biorreator de misturas de melaço de soja e caldo de cana.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se afirmar que o caldo de cana quando misturado ao melaço de soja (em proporções adequadas) resulta em ganho de produtividade, quando comparado a estes substratos separadamente. A faixa de mistura de 10 a 50 % de carboidratos do melaço de soja com carboidratos provenientes da cana-de-açúcar apresenta uma maior produtividade de etanol que a fermentação de caldo de cana puro. A proporção de maior produtividade foi encontrada na faixa de 20-30 % apresentando um ganho produtividade da ordem de 33,45-37,19 %, quando utiliza-se caldo-de-cana bruto, sem aditivção.

Os ganhos obtidos em misturas de melação de soja com caldo de cana são resultantes da fração proteica e lipídica da soja. Segundo DUARTE et al. (1996; 1997) óleo de soja quando adicionado a meios de cultura em concentrações adequadas pode aumentar a viabilidade celular. Isto ocorre pois a levedura não tem capacidade de sintetizar ácidos graxos e esteróis em anaerobiose. Esta tarefa necessita do ciclo do ácido cítrico sob aerobiose. Os ácidos graxos e esteróis são estrategicamente importantes para a formação de novas células de leveduras e conseqüentemente para a produção de etanol. Segundo BANAT et al. (1998) o mecanismo de tolerância ao etanol ainda não é bem compreendido, embora se saiba que a presença de lipídios confere a célula resistência ao etanol. O óleo de soja ainda tem ação antiespumante.

Além disso, a soja é rica em potássio (1,29-2,17 %) e fósforo (0,419-0,822 %). O fósforo na forma de  $\text{PO}_4^{-2}$  tem função fundamental como já foi citado no item 2.2.4.8.3.

É importante ressaltar que os resultados aqui apresentados foram obtidos sem nenhum tipo de aditivção. Além disso, esses resultados foram obtidos com melação concentrado a 33,45 % de sólidos. Melações menos concentradas podem apresentar efeito muito superior (devido a menor quantidade de polímeros e outros produtos indesejáveis resultantes do tratamento térmico para a concentração).

Os resultados obtidos por estes experimentos, simularam as condições industriais de obtenção de etanol por fermentação de cana-de-açúcar, que não são as ideais. Mesmo assim, estes resultados nos permitem concluir que a utilização do melação de soja, nas proporções de até 30% (p/p) ao caldo-de-cana representa uma vantagem industrial e comercial na produção de etanol.



## 5. Conclusões

Os dados apresentados sugerem que o melaço de soja é um resíduo complexo no que diz respeito a composição de seus carboidratos, que representam cerca de 40,47 % (p/p, média de 5 bateladas em base seca) do melaço de soja. As análises de cromatografia líquida apontam que o melaço concentrado a cerca de 50 % (p/p) apresenta 8,43 g/L de glicose, 8,26 g/L de frutose, 77,12 g/L de sacarose, 23,12 g/L de rafinose e 84,53 g/L de estaquiose. Entretanto, há a possibilidade das quantidades de glicose, frutose e sacarose serem maior no melaço fresco, já que o melaço analisado foi estocado por um longo período de tempo sob refrigeração. Através dos testes de cromatografia de camada delgada pode-se concluir que além dos carboidratos já citados, o melaço apresenta possivelmente outros carboidratos de menor peso molecular, e ou carboidratos ligados a outras moléculas, formados durante a concentração do melaço de soja.

A fração proteica do melaço de soja é de cerca de 10,44 % (p/p, média de 5 bateladas em base seca). A presença de proteínas no melaço de soja é extremamente positivo pois este é justamente um componente pobre em outras fontes utilizadas para a produção de etanol.

A fração lipídica do melaço de soja também é um fator altamente positivo e uma diferença importante entre o melaço de soja e os outros substratos utilizados na produção de etanol. Os lipídios são fundamentais na formação de novas células, além de colaborar para o aumento de resistência ao etanol. O óleo de soja ainda apresenta ação antiespumante.

A fração inorgânica do melaço de soja é de cerca de 9,37 % (p/p, média de 5 bateladas em base seca). O Fósforo e o Potássio são elementos presentes em abundância na soja, e sua presença no melaço de soja é benéfica à fermentação alcoólica.

As condições ótimas de processo foram analisadas encontrando-se melhores resultados quando mantida a temperatura na faixa entre 30 e 34 °C e o pH a 6,0, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (nome comercial Fermol).

A aditivação que se mostrou mais adequada foi a de MgSO<sub>4</sub> a 0,1 g/L, levando-se em conta fatores econômicos e cinéticos.

O controle da quantidade de oxigênio é importante pois mesmo pequenas tensões deste podem reduzir a produtividade de etanol. A estratégia de microaeração não é necessária, já que o melaço de soja apresenta uma quantidade apreciável de lipídios.

O processo de hidrólise ácida do melaço disponibiliza uma grande quantidade de açúcares redutores, mas o substrato hidrolizado não apresenta conversão maior que a do melaço de soja aditivado com MgSO<sub>4</sub>. Este efeito é possivelmente causado pela formação de sais resultantes do processo de acidificação e alcalinização. Cerca de 70,8 % dos carboidratos, 91,93 % das cinzas, 84,6 % das proteínas e 30 % da matéria graxa (% expresso em p/p) ficam no sobrenadante, conservando boa parte das características originais do melaço de soja não hidrolizado.

A concentração do melaço de soja a baixas temperaturas apresentou-se como uma estratégia eficaz para preservar a qualidade dos carboidratos encontrados no melaço de soja de eventuais degradações.

O melaço de soja apresenta um rendimento de 55,60 %, mantidos constantes o pH a 6,0 e a temperatura a 30 °C com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (nome comercial Fermol). Os açúcares consumidos foram glicose, frutose, sacarose e a galactose mais externa da estaquiose. A rafinose não foi consumida.

Foi testada a mistura de melaço de soja com caldo de cana quando na proporção de 10 a 50 % de carboidratos do melaço de soja com carboidratos da cana, e pode-se

observar melhores resultados que estes substratos fermentados separadamente. A melhor conversão observada foi na faixa de 70 % de cana em melaço de soja, com uma produtividade 57,71 % com o uso da *Saccharomyces cerevisiae* (nome comercial Fleischmann) nas condições normalmente usadas nas plantas produtoras de etanol. Contudo é importante ressaltar que os níveis de produtividade citados são semelhante ao do caldo de cana aditivado, Logo o melaço de soja atua como um aditivo.

## 6. Perspectivas

Como perspectivas de continuidade deste trabalho, podemos apontar a busca de estratégias para o total aproveitamento dos carboidratos do melaço de soja, em especial a rafinose que foi o principal carboidrato residual detectado. A rafinose pode ser desdobrada em sacarose e galactose, com o uso de enzimas comerciais, sendo os dois açúcares resultantes fermentáveis. Outra solução para este problema seria a cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* (nome comercial Fermol) com uma cepa que consumisse rafinose.

Outro aspecto a ser explorado futuramente, seria o estudo de condições adequadas para a concentração do melaço de soja, evitando a formação de carboidratos combinados a outras moléculas.

Segundo SANTANA (1996) a vinhaça de cana (resíduo gerado após a destilação do mosto fermentado para recuperação de etanol), é usada com sucesso como adubo mineral. O estudo da validade do uso da vinhaça de soja como adubação mineral é um importante aspecto que pode ser abordado. Outro estudo possível é a degradação da vinhaça em plantas de tratamento de efluentes industriais.

## 7. Referências Bibliográficas

- ABATE, C. et al. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces sp.* **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washinton, v.45, p.580-583, 1996.
- AKOH, C.C.; SWANSON, B.G. One-stage synthesis of raffinose fatty acid polyesters. **Jornal of Food Science**, Chicago, v.52, n.6, p.1570-1576, 1987.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Search the ATCC catalogs**. Capturado em 20 jan. 1999. On line. Disponível na internet <http://www.atcc.org/catalogs.html>
- ANCIÃES, A.W.F. (Cord.). **Avaliação tecnológica do álcool etílico**. Ed.3. Brasília: [s. n.], 1991. 514p.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U.A. **Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial**. v.2. São Paulo: Ed. Edgar Blucher LTDA.,1975. 5v.
- BAILEY, J. E. **Biochemical engineering fundamentals**. Ed.2. USA: McGraw-Hill Book co., 1986.
- BANAT et al. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. **World Jornal of Microbiology & Biotecnology**, v.14, p.804-821, 1998.
- BARFORD, J. P. The technology of aerobic yeast growth. In: BERRY, D. R.;RUSSEL, I.; STEWART, G. G.(Eds.), **Yeast biotechnology**. London: Allen & Uwin, 1987, p.200-230.
- BARTHOLOMAI, A. **Fábricas de alimentos: processos, equipamentos, custos**. Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1987, 293p.
- BAZINET, L. et al. Eletroacidification of soybean proteins for production of isolate. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.9, p.52-58, 1997.
- BENNET, T. P.; FRIEDEN, E. **Tópicos modernos de bioquímica: estrutura e função das moléculas biológicas**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1976,175p.
- BERRY, D. R; STEWART, G.C, RUSSELL, I. (Eds). **Yeast biotechnology**. London: London, Allen & Unwin,1987.
- BRASIL. Ministério da agricultura. Laboratório nacional de referência animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília: LANARA, 1981. v.2: métodos físico e químicos secretaria nacional de defesa agropecuaria - laboratório nacional de referência animal , 81p.

BU'LOCK J., KRISTIANSEN, B. **Biotechnologia basica**. Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1987. 413p.

CARVALHAL, M.L. et al. Ethanol production from lactose and whey by *Escherichia coli* expressing genes from *Zymomonas mobilis*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27,n.4,p.263-267,1996.

CHAPLIN, M. F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. (eds) **Carbohydrate analysis**. Oxford: IRL Press, 1986, p.1-36.

CIESAROVA, Z; SMOGROVICOVA, D.; DOMENY, Z. Enhancement of yeast ethanol tolerance by calcium and magnesium. **Folia Microbiologica**, Bratislava, v. 41, n.6, p.485-488, 1996. Obtido via base de dados BIOLOGICAL ABSTRACTS, CD-ROM, 1998.

CRUEGER, W.; CRUEGER A. **Biotechnologia: manual de microbiologia industrial**. Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1993, 557p.

DAVID, J.C. **Biochimie métabolique**. Condé-sur-Noireau: Technique & Documentation, 1996, p. 378.

DEBS-LOUKA, et al. Effect of carbon dioxide on microbial cell viability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65., n.2, p.626-631,1999.

DEMAIN, A.L.; DAVIES,J.E.; ATLAS, R.M. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Ed.2., Washington: American society for microbiology, 1999. 600p.

DORAN, P.M. **Bioprocess engineering principles**. London: Academic press, 1995, 440p.

DUARTE et al. Effect of lecithin and soy oil on the fermentative performance of *Saccharomyces uvarum* IZ 1904. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.18, p.225-262,1996

DUARTE et al. Effect of soy oil on the carbohydrate reserves of *saccharomyces uvarum* IZ 1904 in fermentative conditions. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.17-22, 1997. Obtido via base de dados BIOLOGICAL ABSTRACTS. CD-ROM. 1998.

FIECHTER, A.; FUHRMANN, G. F.; KÄPPELI, O. Regulation of glucose metabolism in growing yeasts cells. **Advances in Microbial Phisiology**, [s.l.], v.22, p.123-183, 1981.

F.O.LICHT. **International Molasses and Alcohol Report** : Kent, 1998. 471p.

GERMEK, H.A. Uso de dornas fechadas com recuperação de álcool e produção de proteína. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, n.27, p.48-52, 1986.

GOUGH, S. et al. Fermentation of molasses using thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimisation of media supplements. **Applied Microbiology Biotechnology**, Washington, v.46, p.187-190, 1996.

HETTIARACHCHY, N. S.; KALAPATHY, U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.6, p.1110-1115, 1997.

HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R.P. **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**, Washington: American chemical society, 1994. 499p.

HO, N. W. Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.5, p.1852-1859, 1998.

HOU, H. J. ; CHANG, K. C. Yield and quality of soft tofu as affected by soybean physical damage and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.116, p.4798-4805, 1998.

INDIAN SOYBEAN DEVELOPMENT COUNCIL. **Soybean composition and nutrient content**. Capturado em 25 jan. 1999. On line. Disponível na internet <http://soyfoods.com/nutrition/soyprotein.html>

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. American soy products expands soymilk facility. **Food Technology**, Chicago, v.52, n.6, p.14-15, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz - métodos químicos e físicos**. São Paulo: IAL, 1976. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 371p.

IRISH, G.G. et al. Removal of the alpha-galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous alpha-galactosidase and broiler performance. **Poultry Science**, Saskatoon, v.74, n.9, p.1484-1494, 1995. Obtido via base de dados BIOLOGICAL ABSTRACTS. CD-ROM. 1998.

KADAM; K.L.; NEWMAN, M.M. development of a low-cost fermentation medium for ethanol production from biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, n.47, p.625-629, 1997.

KÄPPELI, O. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. **Advances in Microbial Physiology**, [s.l.], v.28, p.181-209, 1986.

KATZ, F. That's using the old bean. **Food Technology**, Chicago, v.52, n.6, p.42-43, 1998.

LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.2, p.221-228, [199?].

LEMOS, W.P.C.; GERMANI, J.C. **Manual de tecnologia bioquímica**. Porto Alegre: [s. n.], 1996. 300p.

MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Feed component inhibition of ethanolic fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, [s.l.], n.26, p.1155-1166, 1984.

MAIORELLA, B.L. Etanol. In: MOO-YOUNG M. (Coord.). **Comprehensive biotechnology**. v.3. The practice of biotechnology current commodity. Ontario: Ed. Pergamon products press LTD, 1985, p.861-908.

MARKLEY, K.S. **Soybean and soybean products**. New York: Interscience Publishers, 1974. 2v.

MATIC, S. Fuel from potatoes. **Chemical engineering**, New York, n.107, p.49, 1997.

MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. **Fermentation a practical approach**. Oxford: IRL press, 1990, 226p.

MEYER, L. H. **Food chemistry**. New York: Reinhold Book Corp., ed. 5., 1968. 385p.

MILLES, A.A.L.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial prower of blood. **Journal of higiene**, Cambridge, v.38, p.732-749, 1938.

MORETI, R.H. **Industrializacion de la soja**. Buenos Ayres: Ed. Publitec, 1975. 65p.

MONIRUZZAMAN, et al. Extracellular melibiose and frutose are intermediates in raffinose catabolism during fermentation to ethanol by engineered enteric bacterial. **Journal of bacteriology**, Washington, v.179, n.6, p.1880-1886, 1997.

MURPHY, P.A et al. Soybean protein composition and tofu quality. **Food technology**, Chicago, v.51, n°3, p.86-88, 110; 1997.

NARENDRANATH, N.V. et al., effect of *lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentation. **Applied and enviromental microbiology**, Washington, v.63, n. 11, p.4158-4163, 1997.

NETO, P.O.; YOKOYA, F. Effect of nutricional factors on growth of *lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de microbiologia**, São Paulo, n. 28, p.25-31, 1997.

NUTRIMENTAL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE ALIMENTOS DE ALIMENTOS. Fichas técnicas: São Paulo, [199?].

PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Recente atualização industrial na produção de etanol a partir de amiláceos por métodos não convencionais, **Boletim SBCTA**, Campinas, v.20, n.3/4, p.181-193, 1986.



PATARO, C.; et al. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in na aguardente distillery. **Revista de microbiologia**, n. 29, p.104-108, 1998.

PÊNA, A. The transport of cations in yeast; characteristics and postulated mechanisms. In: STEWART G. G.; RUSSEL I.(eds.). **Advances in biotechnology, current developments in yeast research**. Toronto: Pergamon press, 1981, p.395-410.

PIRT, J.S. **Principles os microbe and cell cultivation**. U.K.: Blackwell scientific publications, 1975. 280p.

POSTMA, E et al. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.55, p.468-477, 1989.

POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J. H.. **Food Science**. Ed 5. New York: Ed. Chapman & Hall, 1997. 608p.

PRESCOTT, H.K.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**. Dubuque: W.m.c. Brown Publishers, 1996, 935p.

PROTEIN TECHNOLOGIES INTERNACIONAL. Material promocional: São Paulo, [199?].

RECH, R. et . al. **Curso de processamento de soja** . Porto Alegre, UFRGS, 1998. Curso ministrado na semana acadêmica do curso de engenharia de alimentos.

RÉVILLION, J.P.P. **Fisiologia dos processos de regulação da fermentação alcoólica em leveduras**, Porto Alegre, 1994. 37p. Monografia do curso de pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente (agrp-36:fisiologia de microrganismos), UFRGS, 1994.

REZENDE, S.T.; FELIX, C.R. Raffinose-hydrolyzing activity of *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology letters**, Kew, v.19, n.3, p.217-220,1997.

SANTANA, S. S. Economicidade da aplicação de vinhaça em comparação à adubação mineral. **Álcool e açúcar**, São Paulo, n.27, p.26-28, 1996.

SAMBRA/SAMRIG. Material promocional: Esteio, 1995.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996, 517p.

SHERMAN, P.D.; KAVASMANECK, P.R. Ethanol. In: GRAYSON, M. (Ed.). **Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology**. Ed.3. New York: Ed. John Wiley, 1978. 22v.

SILVA, M.T.C.; TURATTI, J.M. Extração de óleo de soja com etanol. **Coletânea ITAL**, Campinas, v.21, n.1, p.73-89, 1991.

SILVA, et al. Effect of germination on oligosaccharide and reducing sugar contents of brazilian soybean cultivars. **Alimentação e nutrição**, São Paulo, n.2, p.13-19, 1990.

SINGH, et al. (a) industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in na Indian distillery. **Biotechnology letters**, Kew, v.20, n.8, p.753-755, 1998.

SINGH, et al. (b) Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II – Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **World jornal of microbiology & biotecnology**, v.14, p.823-834, 1998.

SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. **Soybean: chemistry and technology**. v.1, Westport: The AVI publishing company, 1975. 470p.

SMITH, M.T; CAMERON, D.R.; DUFF, S.J.B. Comparison of industrial yeast strains for fermentation of spent sulphite pulping liquor fortified with wood hydrolysates. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**. Boston, v.9, n°1, p.18-21, 1997.

STAHL, E. **Thin-Layer chromatography: a laboratory handbook**. New York: Ed.Heidelberg, 1969, 1041p.

THANANUNKUL, D. et al. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. **Jornal of food science**, Chicago, v.41, p173-175, 1976.

WALFRIDSSON, M. et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *thermophilus* xylA gene, whith express an active xylose (glucose) isomerase. **Applied and enviromental microbiology**, Washington, v.62 , n.12, p.4648-4651, 1996.

WALKER, G.M.; MAYNARD, A.L. Accumulation of Magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, Boston, v.18, p.1-3, 1997.

WAYMAN, M.; PAREKH, S.R. **Biotechnology of biomass conversion - fuels and chemicals from renewable resources**. Manchester: Open University press, 1990. 278p.

WEREKO-BROBBY, C.Y.; HAGAN, E.B. **Biomass conversion and technology**. Ontario: John Wiley & Sons, 1997. 203p.

WIJSMAN, M. R. et al. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Breattanomyces intermedius* upon a shift from aerobic conditions (Custers effect). **Antonie van leeuwenhoek**, [s.l.], n.55, p.468-477, 1984.

WOLF, W. J.; COWAN, J.C. **Soybeans as a food source**. Ed 2. Cleveland: Ed CRC press inc, 1975. 101p.

## Apêndices

### Apêndice 1

#### Determinação de lipídios pelo método do extrato etéreo.

- a) Pesar aproximadamente 2,5 g de amostra em um Becker de 250 mL (P1);
- b) Em capela adiciona-se 30 mL de ácido clorídrico (Merck / Brasil), e 20 mL de água destilada;
- c) Cobrir com um vidro de relógio;
- d) Colocar na chapa aquecedora (Quimis / Brasil), depois de ferver, deixar 15 min;
- e) Esperar esfriar;
- f) Aquecer aproximadamente 1 L de água destilada;
- g) Filtrar o conteúdo do Becker em papel filtro nº 40 (whatman / Inglaterra), usar funil liso sem haste com papel pregueado. Lavar o papel filtro com água quente, até o pH 4,5-5,0;
- h) Passar algodão com éter de petróleo (Synth / Brasil) para limpar a vidraria, guardar os algodões dentro do papel filtro;
- i) Levar todo o conjunto para a estufa (De Leo / Brasil) a 50 °C, por 8 horas;
- j) Colocar o filtro dentro do cartucho de SOXHLET, limpar a vidraria com algodão e éter de petróleo (Synth / Brasil), colocar dentro do cartucho;
- l) Pesar um balão com 5 pedras de ebulição (P2);
- m) Colocar no extrator de SOXHLET (Fame / Brasil) por 6 horas;
- n) Recuperar o éter;
- o) Colocar o balão na estufa (De Leo / Brasil) a 105 °C, por 1 hora;

- p) Colocar o balão no dessecador por 30 min;
- q) Pesar o balão;
- r) Repetir o passo o,p,q até que a variação não seja mais significativa (P3);
- s) Calcular a quantidade de gordura por diferença de peso, pela Equação 6.1.:

$$\text{Lipídios} = (P3 - P2) / P1 * 100 \text{ (A.1.)}$$

Determinação de proteína total pelo método de Kjhedal.

- a) Pesar 2 mL de amostra (P1);
- b) Adicionar à amostra, 2,5 g de sulfato de sódio (Reagen / Brasil), e 12-14 mL solução sulfocúprica;
  - b.1) Solução sulfocúprica: Colocar em 1 L de ácido sulfúrico (Synth / Brasil), 2 g de selenito de sódio (EEL / Brasil). Pesar 19,5 g de sulfato de cobre (Reagen / Brasil), e adicionar H<sub>2</sub>O até 30 mL. Colocar a segunda solução na primeira, usando quatro alíquotas de 5 mL. Deixar 48 em repouso;
- c) Ligar (30 mim antes) o digestor de proteína (Tekator / Suécia), digerir por 1 horas;
- d) Desligar o digestor, exceto a água, que só deve ser desligada 15-20 min depois;
- e) Em um erlenmyer colocar 12-14 mL de solução aquosa de ácido bórico 4 % (p/p) (preparado a partir de reagentes da Merck / Brasil), e 5 gotas de indicador Tashiro, completar até 50 mL com água;
  - e.1) Indicador Tachiro: adicionar 0,1250 g de vermelho de metila (Merck / Alemanha), 0,0825 g azul de metileno (Merck / Alemanha), diluir até 100 mL em Balão volumétrico com etanol absoluto (Synth / Brasil);
- f) Na amostra colocar 3 gotas de indicador Tashiro;

- g) Passar a amostra para um balão de Kjhedal, lavando 3 vezes cada amostra;
- h) Adicionar aproximadamente 70 mL de solução aquosa de NaOH 35 % (p/p) (preparado a partir de reagentes da Synth / Brasil) (ocorre mudança de cor);
- i) Faz-se a destilação, borbulhando o vapor da amostra no erlenmyer até a marca de 125 mL. Abaixar o erlenmyer e deixar pingar o destilado até a marca de 150 mL;
- j) Titular com solução aquosa de ácido sulfúrico (preparado a partir de reagentes da Synth / Brasil) 0,1 N, obtendo-se V1;
- k) Determinar a quantidades de proteína pela equação 6.2.:

$$\text{Proteína}_{6,25} = V1 * (\text{Fator de correção ácido sulfúrico 1N}) * 6,25 / P1$$

(A.2.)

Determinação de sólidos totais pelo método gravimétrico.

- a) Pesar uma capsula de porcelana, com sulfato de sódio (Synth, Brasil), secar por 3 horas em estufa a 70 °C (De Leo / Brasil) (P1);
- b) Adicionar a amostra na capsula e pesar (P2);
- c) Colocar em uma estufa a vácuo (Fanem / Brasil) por 3 horas;
- d) Colocar a amostra em uma dessecador por 30 min;
- e) Pesar;
- f) Colocar 1 hora na estufa a vácuo;
- g) Repetir o passo d,e ;
- h) Seguir o passo f,d,e até que não se verifique mudança significativa do peso (P3) ;
- h) Calcular a quantidade de sólidos por diferença de peso pela equação 6.3.:

$$\text{Sólidos\_totais} = ( P3 - P1 ) / ( P2 - P1 ) * 100 \text{ (A.3.)}$$

Carboidratos totais pelo método do reagente de Fehling.

- a) Pesar aproximadamente 2 g da amostra (P1);
- b) Adicionar 200 mL de água destilada;
- c) Adicionar 10 mL de ácido clorídrico concentrado (Synth / Brasil);
- d) Colocar em autoclave (mod. AV 75, Phoenix / Brasil) a 120 °C, por 30 minutos;
- e) Esfriar, e transferir para um balão volumétrico de 500 mL, lavando o erlenmyer onde foi feita a hidrólise;
- f) Neutralizar com solução aquosa de hidróxido de sódio 40 % (p/p) (preparado a partir de reagentes da Synth / Brasil), usando papel universal como indicador (Reagen / Brasil);
- g) Adicionar 5 mL de solução aquosa de ferrocianeto de potássio a 15 % (p/p) (preparado a partir de reagentes da Vetec / Brasil) e 5 mL de solução aquosa sulfato ou acetato de zinco a 30 % (p/p) (preparado a partir de reagentes da Synth / Brasil);
- h) Completar o volume até 500 mL, usando água destilada;
- i) Deixar decantar;
- j) Filtrar com papel pregueado;
- k) Colocar em uma bureta o filtrado;
- l) Colocar em um balão 5 mL de Fehling A, 5 mL de Fehling B, 40 mL de água destilada e cinco pérolas de vidro;
  - 1.1) Fehling A: Dissolver 34,639 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  / Reagen / Brasil) em água, e diluir a 1000 mL em balão volumétrico. Titular com açúcar invertido (T1)

l.2) Fehling B: Dissolver 173 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Vetec / Brasil), e 125 g de hidróxido de sódio (Synth / Brasil) em água destilada, e diluir a 1000 mL. Titular com açúcar invertido (T1);

m) Aquecer o balão, quando atingir a fervura deve-se iniciar a titulação;

n) Ao atingir o primeiro ponto de virada, adicionar solução aquosa de azul de metileno a 1 % (p/p) (preparado a partir de reagentes da Merck / Brasil), e continuar a titular até ficar vermelho tijolo. Pode-se confirmar o ponto final adicionando-se mais 1 gota de solução de azul de metileno. (Merck / Brasil) (V1);

o) A quantidade de carboidratos totais é dada pela equação 6.4.:

$$\text{Carboidratos\_totais} = \frac{500 * 100 * (T1) / 2}{V1 * P1} \quad (\text{A.4.})$$

#### Determinação de fibras por hidrólise química.

a) Pesa-se aproximadamente 2 g de amostra dessecada (P1);

b) Fazer a extração de gordura no SOXHLET;

c) Deixar secar para evaporar o éter (Synth / Brasil);

d) Transferir 1 g desta amostra para um balão volumétrico de 500 mL, de fundo chato, com o auxílio de um 200 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1,25 % (v/v) (preparado a partir de reagentes da Synth / Brasil);

e) Preparar antecipadamente um cadinho de Gooch com amianto purificado, já aquecido em forno mufla (Temco 1500 / Thermo Eletronic MPG. Co. / USA) a 550 °C;

f) Ferver o balão sob refluxo, durante 30 minutos.

- g) Filtrar imediatamente com o líquido ainda quente sobre o papel filtro. Manter o papel sempre cheio de líquido, e se a filtração estiver muito lenta, usar um segundo papel filtro;
- h) Lavar o frasco com água destilada, uma vez só, tentar fazer descer para o filtro os resíduos por acaso existentes;
- i) Recuperar o material sólido, transferir o restante para o mesmo balão de 500 mL juntamente com solução aquosa de hidróxido de sódio 1,25 % (p/p) (a partir de reagentes Synth / Brasil). Acrescentar ao balão pérolas de ebulição, 2 gotas de álcool amílico (Merck / Alemanha) e ferver por 30 minutos sob refluxo.
- j) Filtrar no cadinho de Gooch, previamente preparado.
- k) Lavar três vezes com éter para eliminar a gordura residual.
- l) Secar em estufa a 105 °C, por duas horas
- m) esfriar em dessecador e pesar (P2).
- n) Calcinar a 500 °C, esfriar e pesar (P3).
- o) A quantidade de fibras é dado pela equação 6.5.:

$$\text{Fibras} = ((P2 - P3) / P1) * 100 \text{ (A.5.)}$$

#### Cinzas pelo método gravimétrico.

- a) Aquecer um cadinho de porcelana em mufla a 550°C;
- b) esfriar em dessecador com sílica ou cloreto de cálcio anidro, por 30 min;
- c) Pesar o cadinho (P1);
- d) Pesar aproximadamente 2 g da amostra (P2);
- e) Evaporar a amostra em chapa aquecedora até a secagem;



- f) Carbonizar em bico de Bunsen;
- g) Incinerar em forno mufla a 550°C, 5 horas (as cinzas deverão ficar brancas);
- h) Resfriar em dessecador por 30 min;
- i) Pesar as cinzas (peso P3);
- j) Calcular a quantidade de cinzas pela equação 6.6.:

$$\text{cinzas} = (P3 - P1) * 100 / P2 \text{ (A.6.)}$$

**Apêndice 2.**

Resultados brutos das análises centesimais das bateladas de melação de soja.

## a) Primeira batelada

**Lipídios**

1. Tara Becker [g]	172,9191	172,4783
2. Becker + amostra [g]	175,4191	174,9784
3. Tara balão [g]	92,7950	104,5129
4. Balão + lipídios [g]	92,9883	104,7265
5. Lipídios ("4"- "3") [g]	0,1933	0,2136
6. Amostra ("2"- "1") [g]	2,5000	2,5001
7. lipídios ("5"/"6")	0,0773	0,0854
8. Média % ("7.1"+"7.2")*100 [% p/p]	8,14	

**Proteína**

1. Peso da amostra [g]	2	2
2. Volume titulado [ml]	7,85	7,60
3. Fator do ácido	0,1948	0,1948
4. Proteína ("2"*"3"/"1")*6,25	4,78	4,63
5. Média % ("4.1"+"4.2")/2 [% p/p, 6,25]	4,71	

**Sólidos totais**

1. Capsula + sulfato [g]	71,4360	49,5405
2. Capsula + sulfato + amostra [g]	81,4715	59,5751
3. Última pesagem [g]	76,2650	54,3585
4. Peso da amostra ("2"- "1") [g]	10,0355	10,0346
5. Peso da massa seca ("3"- "1") [g]	4,8290	4,8180
6. Sólidos totais ("5"/"4")	0,4812	0,4801
7. Média % ("6.1"+"6.2")/2*100 [% p/p]	48,07	
8. Água % (100-"7") [% p/p]	51,93	

**Carboidratos totais**

1. Becker [g]	28,2109	31,4926
2. Becker + amostra [g]	30,2444	33,4906
3. Volume titulado [ml] (primeira titulação)	36,5	37,0
4. Volume titulado [ml] (segunda titulação)	36,8	38,0
5. Peso da amostra ("2"- "1") [g]	2,0335	1,9980
6. Volume titulado médio ("3"+"4")/2 [ml]	36,7	37,5
7. Titulo da sol. De Fehling [g/10 ml]	0,0535	0,0535
8. Carboidratos totais $500*100*7/(2*5*6)$ [% p/p]	17,92	17,85
9. Carboidratos totais %, média ("8.1"+"8.2")/2 [% p/p]	17,89	

## Cinzas

1. Peso do cadinho [g]	8,8521	8,1288
2. Peso amostra + cadinho [g]	9,8632	9,1519
3. Peso das cinzas [g]	8,8987	8,1759
4. Cinzas % $(\text{"3"}-\text{"1"})/(\text{"2"}-\text{"1"})\cdot 100$ [%p/p]	4,61	4,60
4. Cinzas %, média $(\text{"4.1"}+\text{"4.2"})/2$ [% p/p]	4,61	

## b) Segunda batelada

## Lipídios

1. Tara Becker [g]	172,9255	172,6056
2. Becker + amostra [g]	174,9495	174,7094
3. Tara balão [g]	111,6158	86,0239
4. Balão + lipídios [g]	111,7329	86,1401
5. Lipídios $(\text{"4"}-\text{"3"})$ [g]	0,1170	0,1162
6. Amostra $(\text{"2"}-\text{"1"})$ [g]	2,0240	2,1038
7. Lipídios % $(\text{"5"}/\text{"6"})$	0,0578	0,0552
8. Média % $(\text{"7.1"}+\text{"7.2"})\cdot 100$ [% p/p]	5,65	

## Proteína

1. Volume da amostra [ml]	2	2
2. Massa específica da amostra [g/ml]	1,217	1,217
3. Peso da amostra $(\text{"1"}\cdot\text{"2"})$ [g]	2,434	2,434
4. Volume titulado [ml]	8,63	8,88
5. Fator do ácido	0,1948	0,1948
6. Proteína $(\text{"4"}\cdot\text{"5"}/\text{"3"})\cdot 6,25$	4,32	4,44
7. Média % $(\text{"6.1"}+\text{"6.2"})/2$ [% p/p, 6,25]	4,38	

## Sólidos totais

1. Capsula + sulfato [g]	78,5522	79,3789
2. Capsula + sulfato + amostra [g]	88,6000	89,4724
3. Última pesagem [g]	83,4695	84,2500
4. Peso da amostra $(\text{"2"}-\text{"1"})$ [g]	10,0478	10,0935
5. Peso da massa seca $(\text{"3"}-\text{"1"})$ [g]	4,9173	4,8711
6. Sólidos totais $(\text{"5"}/\text{"4"})$	0,4894	0,4826
7. Média % $(\text{"6.1"}+\text{"6.2"})/2\cdot 100$ [% p/p]	48,60	
8. Água % $(100-\text{"7"})$ [% p/p]	51,40	

## Carboidratos totais

1. Becker [g]	97,1032	89,6790
2. Becker + amostra [g]	99,2545	92,0134
3. Volume titulado [ml]	30,5	28
4. Peso da amostra $(\text{"2"}-\text{"1"})$ [g]	2,1513	2,334
5. Titulo da sol. De Fehling [g/10 ml]	0,0535	0,0535
6. Carboidratos totais % $500\cdot 100\cdot\text{"5"}/(\text{"2"}\cdot\text{"3"}\cdot\text{"4"})$ [% p/p]	20,38	20,47
7. Carboidratos totais %, média $(\text{"6.1"}+\text{"6.2"})/2$ [% p/p]	20,43	

## Cinzas

1. Peso do cadinho [g]	8,2158	8,3315
2. Peso amostra + cadinho [g]	9,2180	9,4338
3. Peso das cinzas [g]	8,2600	8,3808
4. Cinzas % (“3” – “1”)/ (“2” – “1”) * 100 [% p/p]	4,41	4,47
4. Cinzas %, média (“4.1”+“4.2”)/2 [% p/p]	4,44	

## c) Terceira batelada

## Lipídios

1. Tara Becker [g]	172,5987	172,9168
2. Becker + amostra [g]	175,2185	175,5012
3. Tara balão [g]	105,5614	97,9196
4. Balão + lipídios [g]	105,6526	97,9935
5. Lipídios (“4”-“3”) [g]	0,0912	0,0739
6. Amostra (“2”-“1”) [g]	2,6198	2,5844
7. Lipídios (“5”/“6”)	0,0348	0,0286
8. Média % (“7.1”+“7.2”)*100 [% p/p]	3,17	

## Proteína

1. Peso da amostra [g]	1,0086	1,0078
2. Volume titulado [ml]	4,16	4,12
3. Fator do ácido	0,2075	0,2075
4. Proteína % (“2”*“3”/“1”)*6,25	5,35	5,30
5. Média % (“6.1”+“6.2”)/2 [% p/p, 6,25]	5,33	

## Sólidos totais

1. Capsula + sulfato [g]	81,6741	79,8419
2. Capsula + sulfato + amostra [g]	91,7206	89,8541
3. Última pesagem [g]	86,7633	85,0111
4. Peso da amostra (“2”-“1”) [g]	10,0465	10,0122
5. Peso da massa seca (“3”-“1”)[g]	5,0892	5,1612
6. Sólidos totais (“5”/“4”)	0,5065	0,5163
7. Média % “6.1”+“6.2”)/2*100 [% p/p]	51,15	
8. Água % (100-“7”) [% p/p]	48,85	

## Carboidratos totais

1. Becker [g]	96,6038	104,2711
2. Becker + amostra [g]	98,6532	106,3166
3. Volume titulado [ml]	30,7	30,7
4. Peso da amostra (“2”-“1”) [g]	2,0494	2,0455
5. Título da sol. de Fehling [g/10 ml]	0,0530	0,0530
6. Carboidratos totais % $500 \cdot 100 \cdot \frac{5}{(2 \cdot 3 \cdot 4)}$ [% p/p]	21,06	21,099
7. Carboidratos totais %, média (“6.1”+“6.2”)/2 [% p/p]	21,08	

## Cinzas

1. Peso do cadinho [g]	8,1112	8,3515
2. Peso amostra + cadinho [g]	9,1132	9,2233
3. Peso das cinzas [g]	8,1585	8,3923
4. Cinzas % $(\text{"3"} - \text{"1"}) / (\text{"2"} - \text{"1"}) * 100$ [% p/p]	4,72	4,68
4. Cinzas %, média $(\text{"4.1"} + \text{"4.2"}) / 2$ [% p/p]	4,70	

## d) Quarta batelada

## Lipídios

1. Tara Becker [g]	175,2045	173,7923
2. Becker + amostra [g]	177,7057	176,3126
3. Tara balão [g]	92,8250	103,2348
4. Balão + lipídios [g]	92,8598	103,2687
5. Lipídios $(\text{"4"} - \text{"3"})$ [g]	0,0348	0,0339
6. Amostra $(\text{"2"} - \text{"1"})$ [g]	2,5012	2,5203
7. Lipídios % $(\text{"5"} / \text{"6"})$	0,0139	0,0135
8. Média % $(\text{"7.1"} + \text{"7.2"}) * 100$ [% p/p]	1,37	

## Proteína

1. Peso da amostra [g]	2	2
2. Volume titulado [ml]	3,81	3,82
3. Fator do ácido	0,1948	0,1948
4. Proteína % $(2 * \text{"3"} / \text{"1"}) * 6,25$	2,32	2,33
5. Média % $(\text{"6.1"} + \text{"6.2"}) / 2$ [% p/p, 6,25]	2,33	

## Sólidos totais

1. Capsula + sulfato [g]	74,3614	73,5449
2. Capsula + sulfato + amostra [g]	84,4849	83,5449
3. Última pesagem [g]	76,2930	75,4529
4. Peso da amostra $(\text{"2"} - \text{"1"})$ [g]	10,1235	10,0000
5. Peso da massa seca $(\text{"3"} - \text{"1"})$ [g]	1,9316	1,9080
6. Sólidos totais % $(\text{"5"} / \text{"4"})$ [% em peso]	0,1908	0,1908
7. Média % $(\text{"6.1"} + \text{"6.2"}) / 2 * 100$ [% p/p]	19,08	
8. Água % $(100 - \text{"11"})$ [% p/p]	80,92	

## Carboidratos totais

1. Becker [g]	29,2342	30,4872
2. Becker + amostra [g]	31,3343	32,4952
3. Volume titulado [ml] (primeira titulação)	41,0	42,5
4. Volume titulado [ml] (segunda titulação)	42,0	43,5
5. Peso da amostra $(\text{"2"} - \text{"1"})$ [g]	4,1201	3,7902
6. Volume titulado médio $(\text{"3"} + \text{"4"}) / 2$ [ml]	41,5	43
7. Título da sol. de Fehling [g/10 ml]	0,0535	0,0535
8. Carboidratos totais % $500 * 100 * \text{"7"} / (2 * \text{"5"} * \text{"6"})$ [% p/p]	7,82	8,20
9. Carboidratos totais %, media $(\text{"8.1"} + \text{"8.2"}) / 2$ [% p/p]	8,01	

## Cinzas

1. Peso do cadinho [g]	8,2112	8,0012
2. Peso amostra + cadinho [g]	9,3369	9,0245
3. Peso das cinzas [g]	8,2315	8,01399
4. Cinzas % $(\text{"3"} - \text{"1"}) / (\text{"2"} - \text{"1"}) * 100$ [% p/p]	1,81	1,83
4. Cinzas %, média $(\text{"4.1"} + \text{"4.2"}) / 2$ [% p/p]	1,82	

## e) Quinta batelada

## Lipídios

1. Tara Becker [g]	172,8564	172,2348
2. Becker + amostra [g]	174,8587	174,3798
3. Tara balão [g]	111,6238	86,1125
4. Balão + gordura [g]	111,6782	86,1730
5. Lipídios $(\text{"4"} - \text{"3"})$ [g]	0,0544	0,0605
6. Amostra $(\text{"2"} - \text{"1"})$ [g]	2,0023	2,1450
7. Lipídios % $(\text{"5"} / \text{"6"})$	0,0272	0,0282
8. Média % $(\text{"7.1"} + \text{"7.2"}) * 100$ [% p/p]	2,77	

## Proteína

1. Volume da amostra [ml]	2	2
2. Massa específica da amostra [g/ml]	1,145	1,145
3. Peso da amostra $(\text{"1"} * \text{"2"})$ [g]	2,290	2,290
4. Volume titulado [ml]	6,69	6,79
5. Fator do ácido	0,1948	0,1948
6. Proteína % $(\text{"4"} * \text{"5"} / \text{"3"}) * 6,25$	3,56	3,61
7. Média % $(\text{"6.1"} + \text{"6.2"}) / 2$ [% em peso, 6,25]	3,59	

## Sólidos totais

1. Capsula + sulfato [g]	71,2213	73,7999
2. Capsula + sulfato + amostra [g]	81,1478	84,7339
3. Última pesagem [g]	74,5506	77,4387
4. Peso da amostra $(\text{"2"} - \text{"1"})$ [g]	9,9265	10,9340
5. Peso da massa seca $(\text{"3"} - \text{"1"})$ [g]	3,3293	3,6388
6. Sólidos totais % $(\text{"5"} / \text{"4"})$ [% em peso]	0,3354	0,3328
7. Média % $(\text{"6.1"} + \text{"6.2"}) / 2 * 100$ [% em peso]	33,41	
8. Água % $(100 - \text{"11"})$ [% em peso]	66,59	

## Carboidratos totais

1. Becker [g]	97,1022	92,7250
2. Becker + amostra [g]	99,2516	95,2718
3. Volume titulado [ml] (primeira titulação)	31	25
4. Peso da amostra $(\text{"2"} - \text{"1"})$ [g]	2,1494	2,5468
5. Título da sol. de Fehling [g/10 ml]	0,0347	0,0347
6. Açúcares totais % $500 * 100 * \text{"5"} / (2 * \text{"3"} * \text{"4"})$ [% em peso]	13,01	13,62
7. Açúcares totais medio % $(\text{"6.1"} + \text{"6.2"}) / 2$ [% em peso]	13,32	

Cinzas

1. Peso do cadinho [g]	8,1221	9,9251
2. Peso amostra + cadinho [g]	9,2883	11,1596
3. Peso das cinzas [g]	8,1587	9,9639
4. Cinzas % ("3" - "1") / ("2" - "1") * 100 [% p/p]	3,13	3,14
4. Cinzas %, média ("4.1" + "4.2") / 2 [% p/p]	3,14	

### Apêndice 3

#### Experimento de seleção de cepas

Dados referentes a Figura 4.1.

Carboidratos totais (% p/p)

Tempo	Scfl	Scs	Scfe	Scu	Sch	Km
0	9,96	10,10	9,97	9,97	10,00	10,00
5	8,70	8,49	8,33	7,90	8,50	7,60
12	5,39	7,29	6,56	6,69	8,45	5,93
24	3,68	3,99	4,98	3,71	6,19	5,25
36	3,86	4,11	3,65	3,39	4,10	4,21
48	3,96	3,64	2,80	2,92	2,83	2,69

Dados referentes a Figura 4.2.

Etanol (% p/p)

Tempo	Scfl	Scs	Scfe	Scu	Sch	Km
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00	0,00
9	2,05	1,41	1,38	1,51	1,22	1,78
12	2,35	1,91	1,64	2,21	1,67	2,40
24	2,68	3,33	3,67	3,41	3,06	3,03
36	3,15	3,81	4,03	3,39	3,67	3,4
48	3,34	3,33	3,34	3,50	3,35	3,30



## Apêndice 4

### Experimento de temperatura ótima

Dados referente a Figura 4.3.

Número de células (número de células/mL)

Tempo	25 C	30 C	34 C	38 C
0	1,14E+07	1,14E+07	1,14E+07	1,14E+07
3	1,11E+07	1,38 E+07	5,00 E+07	1,50E+08
7	8,92E+08	4,25E+08	3,08E+09	6,41E+09
12	3,30E+10	3,00E+10	3,50E+10	8,75E+10
21	1,14E+12	8,06E+11	9,00E+11	8,91E+11
27	8,17E+11	1,12E+12	1,09E+12	1,53E+12

Dados referente a Figura 4.4.

Etanol (% p/p)

Tempo	25 C	30 C	34 C	38 C
0	0,33	0,33	0,33	0,33
3	0,31	0,40	0,33	0,32
7	0,59	1,17	1,30	0,91
12	1,32	3,18	3,23	1,77
21	3,63	3,7	3,6	3,69
27	3,71	3,76	3,64	3,80
42	3,35	3,48	3,11	3,00

Dados referente a Figura 4.5.

Carboidratos totais (% p/p)

Tempo	25 C	30 C	34 C	38 C
0	12,76	12,76	12,76	12,76
3	12,38	10,56	10,40	9,45
7	9,37	8,40	7,15	7,09
12	8,54	5,84	5,85	5,44
21	7,87	5,38	4,35	4,08
27	7,14	5,54	4,20	3,41
42	5,26	6,64	4,573	3,59

## Apêndice 5

### Experimento do pH inicial ótimo

Dados referentes as Figuras 4.7.

Número de células (número de células/mL)

Tempo	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
0	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05
5,5	8,71E+06	1,00E+08	2,04E+08	3,80E+06
8,5	1,26E+08	1,00E+10	2,19E+10	4,57E+07
24,2	2,51E+09	5,13E+10	7,59E+10	9,12E+08
48	7,24E+08	1,12E+11	1,35E+11	2,95E+09

Dados referente a Figura 4.8.

Etanol (% p/p)

Tempo	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
0	0,91	0,85	0,74	0,71
5,5	1,81	1,66	2,19	1,65
8,5	2,41	3,04	3,38	2,30
24	3,10	3,41	3,49	2,95
48	3,45	3,81	3,76	2,75

Dados referente a Figura 4.9.

Carboidratos totais (% p/p)

Tempo	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
0	13,00	13,00	13,00	13,00
5,5	7,06	4,99	4,97	7,85
9,3	5,93	4,9	4,34	7,33
24	4,56	4,15	4,07	5,43
48	4,00	3,82	3,63	5,20

## Apêndice 6

Dados do experimento de cultivo a pH constante

Cultivo a pH 6 constante, dados da Figura 4.10.

Tempo	Carboidratos totais (% p/p)	Etanol (% p/p)	Número de células/ mL
0	12,89	1,43	6,83E4
2	12,03	1,63	2,37E6
4	9,06	1,87	3,65E6
6	7,69	1,93	1,83E6
10	6,38	2,80	9,33E7
12	6,33	3,80	3,00E9
23	6,29	4,56	7,50E10
26	5,99	4,84	7,33E11
30	6,35	5,29	3,08E12
33	5,93	4,70	1,50E13
36	5,43	4,40	1,98E13

Cultivo a pH 5 constante, dados da Figura 4.11.

Tempo	Número de células / mL	Tempo	Etanol (% p/p)	% Carboidratos totais (p/p)
0	1,03E6	0,00	1,39	12,42
3	2,51E6	2,00	1,38	12,60
5	3,92E6	4,00	1,59	12,46
7	1,38E7	6,00	1,38	12,34
9,25	9,01E7	8,00	2,45	11,40
10,75	4,08E8	10,00	2,46	10,00
24,75	8,66E10	11,50	2,24	9,40
27,5	1,02E11	26,75	4,61	4,70
32,00	1,25E11	30,50	4,19	4,90
34,83	1,35E11	33,50	4,38	5,00
		36,00	4,61	4,51
		38,00	4,87	4,56

## Apêndice 7

### Experimento de cultivo com microaeração

Dados referentes a Figura 4.12.

Tempo	Carboidratos s/ % oxigênio (p/p)	Carboidratos c/ % oxigênio (p/p)	% Etanol oxigênio (p/p)	% Etanol s/ oxigênio (p/p)
0	13,04	12,41	0,33	0,10
2	13,04	12,00	0,46	0,34
5	8,98	11,44	1,20	0,45
8	7,48	10,35	2,02	0,95
10	6,69	9,41	2,69	1,37
24	5,31	8,03	3,54	6,06
27	5,18	7,52	4,00	6,50
33	4,77	7,70	5,80	4,74
37	5,27	7,68	2,91	3,39

**Apêndice 8**

Dados referentes a fermentação de melão hidrolizado

Dados referente a Figura 4.15.

Tempo	Etanol (%, p/p)	Carboidratos totais (%,p/p)
0	1,65	11,46
2	1,80	11,20
4	1,60	10,80
6	1,45	11,84
8	1,68	11,90
10	1,60	10,74
24	2,47	6,30
28	3,18	5,15
30	3,36	5,30
34	3,39	4,79

**Apêndice 9.**

Dados dos experimentos de mistura cana/melaço

Resultados da Figura 4.15.

Etanol (% p/p)

Tempo	0	10	20	30	40	50	70	80	90	100
0	0,79	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,81
4	1,19	1,05	1,30	1,15	1,50	2,54	3,79	2,89	2,85	1,80
8	1,68	1,68	1,85	1,79	2,40	3,25	4,00	3,39	3,05	2,38
12	1,84	1,73	1,86	2,27	2,58	3,63	4,13	3,89	3,20	2,77

Resultados da Figura 4.16.

Carboidratos totais (% p/p)

Tempo	0	10	20	30	40	50	70	80	90	100
0	12,68	12,68	12,59	9,98	10,66	9,53	7,62	7,75	8,20	7,69
4	11,40	10,11	10,46	9,31	8,94	6,89	4,63	3,57	3,02	4,75
8	4,75	5,34	5,24	4,68	3,87	2,45	2,07	1,66	1,74	1,37
12	4,50	4,77	5,34	4,46	2,99	2,5	1,87	1,68	1,42	1,31

Resultados da Figura 4.17.

Etanol (% p/p)

Tempo	100	90	80	70	60	50
0	0,50	0,59	0,80	0,59	0,87	0,81
2	1,23	1,38	1,56	1,44	1,28	1,18
3	1,22	1,49	2,01	1,77	1,89	1,57
4	1,69	1,78	3,40	2,73	2,73	2,27
5	1,91	2,48	4,09	3,85	3,54	2,80
6	2,51	3,12	4,77	4,46	4,15	3,61
7	3,27	3,80	4,96	4,82	4,65	4,28
8	4,02	4,07	5,55	5,36	4,82	4,59

Resultados da Figura 4.18

Carboidratos totais (% p/p)

Tempo	100	90	80	70	60	50
0	114,57	113,66	119,91	117,41	112,64	121,61
2	81,41	79,48	99,58	96,63	94,81	110,94
3	78,12	67,45	73,24	84,59	89,25	108,55
4	69,83	53,71	58,71	66,77	77,89	88,11
5	66,77	40,76	53,82	54,05	60,86	75,97
6	59,84	19,30	48,71	35,31	42,01	69,38
7	44,40	9,65	15,22	28,61	28,16	44,40
8	37,24	8,06	12,26	23,16	21,46	39,63

## Abstract

This work aimed to study the use of soya molasses as a substrate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* (C94, Pasteur Institute). Soya molasses is an industrial by-product containing 10.44% of proteins; 40.77% of carbohydrates; 9.37% of ashes; 10.05% of lipids; 0.1 g/L of fibers (as result of 5 batch samples analysis, expressed as % w/w).

The optimisation of process parameters was developed both in shaker and bench bioreactor. Best possible productivity was found under the following conditions: 30-34 °C, pH 6.0, added with 0.1 g/L of MgSO<sub>4</sub>.

A detailed analysis of the composition of carbohydrates present in the soya molasses showed that this substrate is very complex, containing 8.43 g/L glucose; 8.26 g/L fructose; 77.12 g/L sucrose; 23.12 g/L raffinose; 84.53 g/L stachyose; besides some non-identified carbohydrates.

Finally, the mixed fermentation of soya molasses and sugar cane was tested. Results showed that a 10 to 50% mixture of carbohydrates of these two different substrates gives higher yields than any of the sources used alone.