

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS E CONDIÇÕES DE
FERMENTAÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR POR

Zymomonas mobilis CP4.

Parecer

Este exemplar
corresponde a
edição final da
tese defendida
por Maria Cristina
Diez Jerez e apro-
vada pela Comissão
Julgadora em 18
de outubro de 1993.

Maria Cristina Diez Jerez 7/858

Prof. Dr. Fumio Yokoya
Orientador

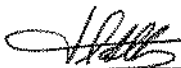
Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas.
para obtenção do Título de Doutor em
Ciência de Alimentos

Campinas - 1993

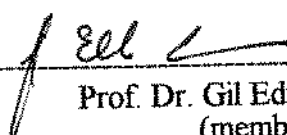
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Furnio Yokoya
(Orientador)



Prof. Dr. Claudio Rosa Gallo
(membro)



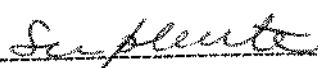
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(membro)



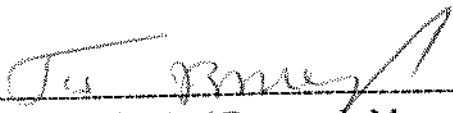
Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(membro)



Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
(membro)



Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
(membro)



Prof. Dr. Tobias José Barreto de Menezes
(membro)

Campinas, 18 de outubro de 1993

**Ao meu esposo Felipe
Aos meus filhos Maria Cristina,
Felipe Gregório e Neuza Carolina
Aos meus pais**

AGRADECIMENTOS

À Universidad de la Frontera - Temuco, Chile, e à Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Ao Professor Dr. Fumio Yokoya pela orientação e apoio.

Ao Professor Dr. Santiago Ramirez M., Decano de la Facultad de Ingeniería y Administración de la Universidad de la Frontera, pelo constante estímulo, apoio e amizade.

A Rosa Maria Tosello pelo constante apoio, colaboração e amizade.

A todos do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela colaboração, amizade e convivência.

Ao meu esposo Felipe e aos meus filhos pelo incansável incentivo, apoio e compreensão.

Aos meus colegas do Departamento de Ingeniería y Administración da Universidad de la Frontera, pelo estímulo e permanente apoio.

A todos que, de algum modo, tenham contribuído para a realização deste trabalho.

À CNPq e FAEP, pelo auxílio financeiro

À ABIA pelas cópias.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
NOMENCLATURA	xvi
RESUMO	xviii
SUMMARY	xix
1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- Produção de etanol por fermentação	3
2.2-Microrganismos da fermentação alcoólica	4
2.2.1- <i>Zymomonas mobilis</i>	4
2.3-Matérias-primas da fermentação alcoólica	7
2.3.1 Utilização de glicose	8
2.3.2- Utilização de sacarose	8
2.3.3- Caldo de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp)	9
2.3.4- Utilização de melaço	10
2.3.5- Melaço de alta qualidade (HTM)	12
2.4- Formação de subprodutos durante a fermentação alcoólica	12
2.4.1- Levana	13
2.4.2- Sorbitol	14
2.5- Processo de fermentação	15
2.5.1- Processo descontínuo	15
2.5.2- Processo descontínuo alimentado (Fed-batch)	15
2.5.3- Processo contínuo	16
2.6- Fatores que afetam a fermentação alcoólica	17

3- MATERIAL E MÉTODOS

	20
3.1- Material	20
3.1.1- Microrganismo utilizado	20
3.1.2- Manutenção do microrganismo	20
3.1.3- Preparação do inóculo	20
3.1.4- Preparação dos meios utilizados na fermentação	20
3.1.4.1- Preparação do meio semissintético com sacarose (controle)	20
3.1.4.2- Preparação do meio com melaço de cana-de-açúcar	20
3.1.4.3- Preparação do meio com HTM	21
3.1.4.4- Preparação do meio com caldo de cana-de-açúcar	21
3.1.5- Condições de fermentação em frascos erlenmeyer	21
3.1.6- Condições de fermentação em fermentador de laboratório	21
3.2- Métodos	22
3.2.1- Estudo da formação de produtos e subprodutos em sacarose	22
3.2.1.1- Efeito da temperatura	22
3.2.1.2- Efeito do pH	22
3.2.2- Estudo do efeito da adição de alguns sais ao meio com sacarose	22
3.2.2.1- Efeito da adição de vários sais ao meio de fermentação	22
3.2.2.2- Efeito da variação da concentração de KCl	22
3.2.2.3- Efeito da variação da concentração de magnésio	23
3.2.2.4- Efeito da variação da concentração de CaCl ₂	23
3.2.3- Estudo utilizando melaço de cana-de-açúcar em processo descontínuo	23
3.2.3.1- Clarificação do melaço	23
3.2.3.2- Efeito da adição ou não de nutrientes no melaço clarificado e não clarificado	24
3.2.3.3- Efeito da variação da concentração de açúcar (So) no melaço	24
3.2.3.4- Efeito da variação da temperatura de fermentação	24
3.2.4- Fermentação de melaço em processo contínuo em fermentador de laboratório.	24
3.2.4.1- Efeito da taxa de diluição	25
3.2.4.2- Efeito da variação da concentração de açúcar (So) no melaço	25
3.2.4.3- Efeito da temperatura de fermentação	25

	Página
3.2.5- Fermentação de melaço em processo descontínuo alimentado em fermentador de laboratório	25
3.2.5.1- Estudo da variação do fluxo de alimentação	25
3.2.5.2- Estudo da variação da concentração inicial de açúcar na alimentação	25
3.2.6- Estudos em escala piloto	26
3.3- Métodos Analíticos	26
3.3.1- Massa celular	26
3.3.2- Etanol	26
3.3.3- Levana	26
3.3.4- Determinação de açúcar	27
3.3.5- Análise de íons	27
3.4- Cálculos dos parâmetros cinéticos	27
3.4.1- Cálculos cinéticos para o processo descontínuo	27
3.4.2- Cálculos cinéticos para o processo descontínuo alimentado	28
3.5- Esquema da metodologia.	29
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1- Efeito da temperatura e pH na fermentação de etanol e subprodutos durante a fermentação de sacarose por <i>Zymomonas mobilis</i>	30
4.1.1- Efeito da variação de temperatura	30
4.1.2- Efeito do controle de pH em temperaturas de 30 e 37 °C	34
4.2- Fermentação de melaço de cana de açúcar por <i>Zymomonas mobilis</i>	38
4.2.1- Tratamento de clarificação de melaço	39
4.3- Estudo do efeito da adição de alguns íons ao meio com sacarose	41
4.3.1- Efeito da adição de sais ao meio de fermentação	41
4.3.2- Efeito da variação da concentração de potássio	45
4.3.3- Efeito da variação da concentração de cálcio	47
4.3.4- Efeito da variação da concentração de magnésio	49
4.4- Fermentação de melaço em processo descontínuo	56

	Página
4.4.1- Efeito da temperatura e concentração de melaço	56
4.4.2- Efeito da suplementação de melaço com nutrientes	62
4.5- Fermentação de melaço em processo contínuo	66
4.5.1- Estudo do efeito da taxa de diluição	66
4.5.2- Efeito da concentração inicial de açúcar (So) na alimentação	73
4.5.3- Efeito da variação da temperatura	75
4.6- Fermentação de melaço em processo descontínuo alimentado	76
4.6.1- Efeito da variação do fluxo de alimentação	77
4.6.2- Efeito da variação da concentração inicial de melaço (So)	78
4.7- Estudos em fermentador piloto	84
4.8- Parâmetros cinéticos de fermentação em processo descontínuo, em fermentador de laboratório utilizando diversas matérias-primas	88
5- CONCLUSÕES	93
6- REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.	96

ÍNDICE DAS TABELAS

Página

Tabela 1. Efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos de fermentação de sacarose (100 g/l) por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. pH inicial 5,7.	31
Tabela 2. Parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4, a 30 e 37 °C sem e com controle de pH em 5,7.	34
Tabela 3. Concentração de íons do melaço após os respectivos tratamentos de clarificação e esterilização.	39
Tabela 4. Taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}) e etanol produzido (E) em 24 horas de fermentação, em relação aos tratamentos de clarificação efetuados no melaço. Temperatura de 30 °C e pH inicial 5,7.	40
Tabela 5. Parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por <i>Zymomonas mobilis</i> em função a os sais (g/l) adicionados. Temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7.	42
Tabela 6. Efeito da variação da concentração de KCl nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. Temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7.	45
Tabela 7. Efeito da variação da concentração de CaCl ₂ nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. Temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7.	47

Tabela 8. Efeito da variação da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7 .	52
Tabela 9. Efeito da variação da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ na taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}) em temperaturas de 30 e 37 °C, durante a fermentação de sacarose (100g/l) por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. pH inicial 5,7.	52
Tabela 10. Efeito da variação da concentração de S_o (g/l) e temperatura (°C), nos parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4.	57
Tabela 11. Parâmetros cinéticos da fermentação de melaço (90 g/l) clarificado com $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ e não clarificado, em relação com a suplementação ou não do melaço com nutrientes pH inicial 5,5..	63
Tabela 12. Efeito da variação da taxa de diluição (D) sobre os parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. $S_o=97$ g/l, $T=34$ °C, $V=640$ ml	67
Tabela 13. Efeito da variação da taxa de diluição (D) sobre os parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. $S_o=133$ g/l, $T=34$ °C, $V=640$ ml.	68
Tabela 14. Efeito da variação da concentração inicial de melaço (S_o) sobre os parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. $D=0,172$ h^{-1} , $T=34$ °C, $V=510$ ml.	73
Tabela 15. Efeito da variação da temperatura de fermentação de melaço por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4, sobre os parâmetros cinéticos de fermentação. $S_o=102,6$ g/l, $D=0,1705$ h^{-1} , $T = 34$ °C, $V=510$ ml ..	75

Tabela 16. Efeito da variação do fluxo de alimentação nos parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. $S_0=145$ g/l, $T=34$ °C.	77
Tabela 17. Efeito da variação da concentração inicial de alimentação (S_0) sobre os parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. Fluxo = 114 ml/h. $T=34$ °C.	81
Tabela 18. Parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4 em processo descontínuo e descontínuo alimentado ($F=78,3$ ml/h), em fermentador piloto. Temperatura de 34 °C, sem controle de pH.	86
Tabela 19. Efeito de diversas matérias-primas sobre os parâmetros cinéticos de fermentação por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4. Temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7.	88

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Página
Figura 1. Efeito da variação de temperatura sobre o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> em sacarose. pH inicial 5,7.	32
Figura 2. Efeito da variação de temperatura sobre o etanol produzido por <i>Zymomonas mobilis</i> em sacarose. pH inicial 5,7	32
Figura 3. Efeito da variação de temperatura no açúcar residual (AR) por <i>Zymomonas mobilis</i> em sacarose. pH inicial 5,7	33
Figura 4. Efeito da variação de temperatura sobre a levana formada por <i>Zymomonas mobilis</i> em sacarose. pH inicial 5,7	33
Figura 5. Efeito da variação de temperatura e pH no crescimento celular de <i>Z. mobilis</i> , em sacarose 100 g/l	35
Figura 6. Efeito da variação de temperatura e controle pH sobre o etanol produzido por <i>Z. mobilis</i> , em sacarose 100 g/l	35
Figura 7. Efeito da variação de temperatura e controle de pH em 5,7 no açúcar redutor residual (AR).	37
Figura 8. Efeito da variação de temperatura e controle de pH em 5,7 na levana formada.	37
Figura 9. Perfil de pH durante a fermentação de sacarose, sem e com controle de pH a 30 e 37 °C.	38
Figura 10. Efeito da adição de sais ao meio de fermentação sobre o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> . 34 °C e pH inicial 5,7.	43
Figura 11. Efeito da adição de sais ao meio de fermentação sobre a produção de etanol. 34 °C e pH inicial 5,7.	43

Figura 12. Efeito da adição de sais ao meio de fermentação no açúcar redutor residual (AR). 34 °C e pH inicial 5,7	44
Figura 13. Efeito da adição de sais ao meio de fermentação na levana formada. 34 °C e pH inicial 5,7.	44
Figura 14. Efeito da adição de KCl ao meio de fermentação sobre o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> . 34 °C e pH inicial 5,7	46
Figura 15. Efeito da adição de KCl ao meio de fermentação sobre a produção de etanol. 34 °C e pH inicial 5,7.	46
Figura 16. Efeito da concentração de KCl no açúcar redutor residual (AR). 34 °C e pH inicial 5,7.	48
Figura 17. efeito da concentração de KCl na levana formada. 34 °C e pH inicial 5,7.	48
Figura 18. Efeito da adição de CaCl ₂ ao meio de fermentação sobre o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> . 34 °C e pH inicial 5,7	50
Figura 19. Efeito da adição de CaCl ₂ ao meio de fermentação sobre a produção de etanol. 34 °C e pH inicial 5,7.	50
Figura 20. Efeito da concentração de CaCl ₂ no açúcar redutor residual (AR). 34 °C e pH inicial 5,7.	51
Figura 21. Efeito da concentração de CaCl ₂ na levana formada. 34 °C e pH inicial 5,7.	51
Figura 22. Efeito da adição de MgSO ₄ ao meio de fermentação sobre o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> . 34 °C e pH inicial 5,7	53
Figura 23. Efeito da adição de MgSO ₄ ao meio de fermentação sobre produção de etanol. 34 °C e pH inicial 5,7.	53

	Página
Figura 24. Efeito da concentração de $MgSO_4$ no açúcar redutor residual (AR). 34 °C e pH inicial 5,7.	54
Figura 25. Efeito da concentração de $MgSO_4$ na levana formada. 34 °C e pH inicial 5,7.	54
Figura 26. Efeito da adição de $MgSO_4$ ao meio de fermentação sobre produção de levana. 30 °C e 37 °C, pH inicial 5,7 .	55
Figura 27. Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> em melão. $S_o=55$ g/l	59
Figura 28. Efeito da variação da temperatura de fermentação sobre a produção de etanol em melão. $S_o=55$ g/l.	59
Figura 29. Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> em melão. $S_o=108$ g/l	60
Figura 30. Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre a produção de etanol em melão. $S_o=108$ g/l.	60
Figura 31. Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> em melão. $S_o=145$ g/l	61
Figura 32. Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre a produção de etanol em melão. $S_o=145$ g/l.	61
Figura 33. Massa celular, ART e Etanol em melão sem clarificar com e sem adição de nutrientes. $S_o=83$ g/l, 34 °C.	64
Figura 34. Massa celular, ART e etanol em melão clarificado com e sem adição de nutrientes. $S_o=90$ g/l .	64
Figura 35. Perfil de pH e açúcar redutor residual (AR) na fermentação de melão com e sem adição de nutrientes .	65

- Figura 36. Efeito da taxa de diluição (D) sobre a massa celular, açúcar residual, etanol, produtividade, $Y_{x/s}$, q_s , e q_p . $S_0=97$ g/l, $T=34$ °C. 70
- Figura 37. Efeito da taxa de diluição (D) sobre a massa celular, açúcar residual, etanol, produtividade, $Y_{x/s}$, q_s , e q_p . $S_0=133$ g/l, $T=34$ °C. 71
- Figura 38. Efeito da taxa de diluição (D) sobre a relação m/q_s (%) em concentração de melão de 97 e 133 g/l. 72
- Figura 39. Etanol, ART_a , ART_c , ART_r e massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. $S_0=140$ g/l, Fluxo=114 ml/h. 79
- Figura 40. Etanol, ART_a , ART_c , ART_r e massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. $S_0=145$ g/l, Fluxo=78,3 ml/h. 79
- Figura 41. Etanol, ART_a , ART_c , ART_r e massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. $S_0=145$ g/l, Fluxo=64,5 ml/h. 80
- Figura 42. Efeito da variação do fluxo de alimentação sobre o ART_r (g), em processo descontínuo alimentado. $S_0=145$ g/l. 80
- Figura 43. Etanol, ART_a , ART_c , ART_r e massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. $S_0=114$ g/l, Fluxo=114 ml/h. 82
- Figura 44. Etanol, ART_a , ART_c , ART_r e massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. $S_0=140$ g/l, Fluxo=114 ml/h. 83

	Página
Figura 45. Etanol, ARTa, ARTc, ARTr e massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. So=215 g/l, Fluxo=114 ml/h.	83
Figura 46. Variação da concentração de açúcar sobre o ARTr (g), em processo descontínuo alimentado. Fluxo=114 ml/h.	83
Figura 47. Massa celular, ART, e etanol na fermentação de melaço, processo descontínuo, em fermentador piloto. So=125 g/l	85
Figura 48. Etanol, ARTa, ARTc, ARTr e massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. So=150 g/l, Fluxo=78,3 ml/h.	85
Figura 49. Massa celular, ART e Etanol em HTM com e sem adição de nutrientes. So=119 g/l.	90
Figura 50. Massa celular, ART e Etanol em caldo de cana-de-açúcar com e sem adição de nutrientes. So=110 g/l.	90
Figura 51. Perfil de pH durante a fermentação de diversas matérias-primas por <i>Z. mobilis</i> .	92

NOMENCLATURA

AC	:	Açúcar consumido (%)
AR	:	Açúcares redutores (g/l)
ART	:	Açúcares redutores totais (g/l)
ARTa	:	Açúcares redutores totais adicionados (g/l)
ARTc	:	Açúcares redutores totais consumidos (g/l)
ARTr	:	Açúcares redutores totais residuais (g/l)
E	:	Etanol (g/l)
E10	:	Etanol produzido em 10 horas (g/l)
D	:	Taxa de diluição (h^{-1})
F	:	Fluxo (ml/h)
m	:	Coefficiente de Manutenção
ME10	:	Massa de etanol produzido em 10 horas (g)
ME12	:	Massa de etanol produzido em 12 horas (g)
ME0	:	Massa de inicial de etanol (g)
MEt	:	Massa de etanol teórica
MX10	:	Massa de células produzidas em 10 horas (g)
MX0	:	Massa inicial de células (g)
P	:	Produtividade em etanol (g/l.h)
qs	:	Taxa específica máxima de consumo de substrato (g/g.h)
qp	:	Taxa específica máxima de produção de etanol (g/g.h)
PS10	:	Taxa específica de consumo de açúcar em 10 horas (g/g.h)
PE10	:	Taxa específica de produção de etanol em 10 horas (g/g.h)
R	:	Rendimento (%)
R10	:	Rendimento em 10 horas (%)
R24	:	Rendimento em 24 horas (%)
S	:	Concentração de ART (g/l)

S_0	:	Concentração inicial de ART na alimentação (g/l)
T	:	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
t	:	Tempo de fermentação (h)
Γ	:	Tempo de enchimento do reator (h)
τ	:	Tempo de residência (h)
μ	:	Taxa específica de crescimento
μ_{max}	:	Taxa específica máxima de crescimento
V	:	Volume do reator (ml)
X	:	Concentração celular (g/l)
X_{10}	:	Massa celular em 10 horas (g/l)
$Y_{X/S}$:	Coefficiente de rendimento em massa celular (g/g)
$Y_{P/S}$:	Coefficiente de rendimento em etanol (g/g)
$Y\%$:	Rendimento em etanol, % do valor teórico.

RESUMO

Foi conduzido um estudo sobre métodos e condições de fermentação de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* CP4 e seu efeito sobre os parâmetros cinéticos de fermentação. Avaliou-se o efeito da temperatura, controle de pH e efeito de íons Ca^{++} , K^+ , Cl^- e Mg^{++} em meio de fermentação com sacarose. Em melaço de cana-de-açúcar foi estudado o efeito da clarificação e suplementação com nutrientes. Determinaram-se os parâmetros cinéticos de fermentação do melaço em processo descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo em escala de laboratório; e descontínuo e descontínuo alimentado em fermentador piloto. Foram também realizados ensaios de fermentação em processo descontínuo, em escala de laboratório, utilizando caldo de cana-de-açúcar e HTM como substratos da fermentação.

Determinou-se que a temperatura de 34 °C é a mais apropriada para o crescimento e produção de álcool por *Zymomonas mobilis* CP4 em meio com sacarose e melaço; a produção de levana diminui com o aumento da temperatura e com o controle de pH durante a fermentação. Os tratamentos de clarificação do melaço, removeram Ca^{++} e K^+ , mas não aumentaram os rendimentos fermentativos. Ca^{++} , K^+ e Cl^- são inibidores do crescimento e fermentação de *Zymomonas mobilis* CP4, mas o Mg^{++} não apresentou efeito inibitório em nenhuma das condições estudadas. A suplementação do melaço é necessária para aumentar os rendimentos fermentativos. Em processo descontínuo os melhores resultados foram em concentração de melaço de 108 g/l. A produtividade em processo contínuo foi superior a dos processos descontínuo e descontínuo alimentado. Em fermentador piloto os rendimentos fermentativos em processo descontínuo foram superiores aos do fermentador de laboratório, mas a produtividade foi menor. Em descontínuo alimentado os rendimentos foram superiores aos do ensaio em fermentador de laboratório. O melaço de cana-de-açúcar e o caldo de cana de açúcar são matérias-primas apropriadas para a fermentação, mas devem ser suplementadas para obter rendimentos fermentativos altos.

SUMMARY

This study was carried out to characterize the methods and parameters affecting the fermentation of *Zymomonas mobilis* CP4 on sugar cane molasses as substrate. Temperature, pH, Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} and Cl^- were the experimental variables using on a saccharose culture medium. Besides, the effects of clarification and nutrients supplementation of sugar cane molasses was studied. Kinetics parameters on sugar cane molasses were analyzed under different experimental conditions: a prototype lab fermenter was used in batch, fed-batch and continuous fermentations, and a pilot prototype scale was used for batch and fed-batch fermentations. At the same time, fermentation assays in a discontinuous process under laboratory scale procedures were carried out using sugar cane medium and HTM as the substrate of the fermentation.

Growth rate and ethanol production by *Zymomonas mobilis* CP4 in saccharose and molasses culture medium were optimum at 34 °C. Levan output decreased with increasing temperature and pH control during the fermentation. Clarification treatments in molasses decreased the amount of Ca^{++} and K^+ but not better results in fermentation rate were observed, despite the fact that both ions and chlorides ions exert an inhibitory effect in growing and fermentation activities of *Zymomonas mobilis* CP4. No negative effect was observed concerning Mg^{++} . Besides, molasses supplementation with nutrients was necessary to increase yields. In batch process better kinetics results were obtained with molasses concentrations of 108 g/l. The productivity was higher in continuous process compared with batch and fed-batch processes. The fermentation output obtained with batch process were higher under pilot plant operation in contrast with laboratory scale models. Sugar cane molasses and sugar cane culture medium were better nutritional products for fermentation purposes but must be supplemented to get better results.

1-INTRODUÇÃO.

A partir de 1973 a crise do petróleo gerou grande interesse na busca de recursos energéticos renováveis como em encontrar fontes de recursos orgânicos capazes de substituir os atuais produtos petroquímicos. Assim, por um lado realizaram-se esforços para melhorar a rentabilidade dos processos de obtenção de bioálcool, e por outro lado tratou-se de substituir os processos do tipo químico por outros do tipo biológico. Devido a queda no preço do petróleo, no início da década de 80, estes estudos perderam impulso durante um certo tempo; contudo, a consciência de que os combustíveis fósseis vão se esgotar e que é necessário utilizar tecnologias menos contaminantes, tem feito renascer o interesse nestes processos biológicos.

A fermentação alcoólica envolve fundamentalmente a utilização de carboidratos como matéria-prima. O substrato pode conter açúcares diretamente fermentescíveis ou carboidratos mais complexos como amido ou celulose. O melão, subproduto do processo de extração e refinação de açúcar de cana ou de beterraba, contém aproximadamente 50% de açúcar, sendo que a maior parte corresponde a sacarose.

O melão apresenta a vantagem de ser uma matéria-prima relativamente barata e disponível em grande quantidade no Brasil. Contudo, alguns de seus componentes podem provocar inibição do crescimento e da fermentação por leveduras e bactérias. Tem sido postulado que herbicidas e alguns componentes menores como fenol e indofenol, produtos da degradação térmica, nitratos e clorofenolato, os quais se acumulam devido ao uso elevado de fertilizantes artificiais, podem ser responsáveis por esta inibição (RHEE *et alii*, 1984). Especificamente, na fermentação de melão realizada por *Zymomonas mobilis*, tem sido sugerido que os baixos rendimentos são devidos ao efeito inibidor de certos componentes do melão como seus níveis relativamente elevados de íons potássio, magnésio e cloro (Skotnicki *et alii*, 1981b; VAN VUUREN & MEYER, 1982).

Apesar das vantagens apresentadas por *Zymomonas mobilis* perante as leveduras, como: fermentações mais rápidas com maior rendimento em etanol, condições de crescimento mais simples, maior taxa específica de produção de álcool e consumo de substrato, maior tolerância a elevadas temperaturas, concentração de açúcar e etanol, o rendimento fermentativo diminui quando se utiliza sacarose como carboidrato para a fermentação. Isto é devido segundo alguns autores, à formação de subprodutos como levana (PARK *et alii*, 1983) e sorbitol (VIKARI 1984a,b; BARROW *et alii*, 1984).

As condições de fermentação e os processos fermentativos são muito importantes para determinar os parâmetros cinéticos de fermentação de um determinado microrganismo em

determinadas condições de fermentação e nem sempre tem sido considerados. Portanto o objetivo deste trabalho é estudar as condições de fermentação de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* CP4, considerando efeito de temperatura, concentração de açúcar no melaço, controle de pH, formação de subprodutos; condições de preparação do melaço, efeito de compostos inibidores; processos de fermentação descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo, ensaios em fermentador piloto; e comparação dos parâmetros cinéticos de fermentação, em processo descontínuo, com àqueles obtidos em caldo de cana-de-açúcar e HTM.

2.- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1- Produção de etanol por fermentação.

No Brasil a via fermentativa é a mais importante, e a recente crise mundial do petróleo tem contribuído para ratificar a importância da via fermentativa na produção de etanol. O Brasil ocupa posição de destaque na fronteira de conhecimentos ligados à produção e uso do álcool em substituição aos derivados do petróleo.

Com cerca de 4 milhões de hectares de terra cultivada com cana-de-açúcar, hoje o Brasil detém as maiores produções mundiais de cana-de-açúcar, açúcar e álcool (BRUNELLI, 1986, FAO, 1990). Agrega-se à evidência de sua liderança no campo da produção de álcool toda uma infraestrutura de bens de capital sob o comando de empresas, sem nenhuma dependência estrangeira no campo tecnológico (SANTOS, 1985).

Em 1990, a produção de cana-de-açúcar no mundo foi de 1.035,1 milhões de toneladas métricas, sendo 263,6 milhões de toneladas métricas produzidas no Brasil (FAO 1990). A produção de álcool cresceu surpreendentemente quando passou da modesta produção de pouco mais de 600 milhões de litros em 1974/1975 para 12 bilhões de litros em 1991/1992. A intensificação do programa e a busca de tecnologias cada vez mais rentáveis, acabou por tornar as usinas e destilarias auto-suficientes na produção de energia que necessitam, através da queima do bagaço de cana. Considerando que as unidades industriais geram mais energia do que consomem o setor sucroalcooleiro tem condições de se tornar uma importante fonte produtora de energia elétrica (BERTELLI, 1992).

Do ponto de vista ambiental, a adição de 22% de álcool anidro à gasolina ou a substituição desta pelo álcool hidratado nos motores de ciclo OTTO já comprovaram sua contribuição à melhoria da qualidade do ar nos grandes centros urbanos. O uso de álcool como combustível reduz as emissões de hidrocarbonetos, de monóxido de carbono e de óxido de nitrogênio. E além de não produzir emissões de enxofre, dispensa a adição do chumbo tetraetila à gasolina, elemento que provoca a degradação da qualidade do ar (BERTELLI, 1992).

No Brasil, toda a produção industrial de álcool é realizada utilizando leveduras como microrganismo da fermentação e pouco se conhece de outros microrganismos que produzam álcool a nível industrial. Segundo INGRAM *et alii* (1984), no Japão existem várias plantas-piloto operando em sistema contínuo e utilizando *Zymomonas mobilis* para a produção de etanol. No Canadá, em Biohol, existe em funcionamento uma planta piloto para a produção de etanol utilizando serragem previamente hidrolisada por via ácida e fermentação por *Zymomonas*.

Na Austrália e Nova Zelândia existem também plantas-piloto funcionando com *Zymomonas*. Segundo esses autores, este microrganismo pode ser especialmente útil em países como o Brasil e a Índia, levando em consideração a característica termotolerante de *Zymomonas mobilis*. Recentemente tem sido realizados alguns trabalhos utilizando *Zymomonas mobilis* em escala industrial, utilizando diversas matérias-primas. MILLICHIP & DOELLE (1989), utilizaram *Zymomonas mobilis* para produzir álcool em larga escala (586.000 litros) utilizando sorgo moído a seco, encontrando produção de etanol de 13% (v/v). DOELLE *et alii* (1989), testaram *Zymomonas mobilis* em escala industrial (64.000 litros) para fermentação de milho, sorgo e outras matérias-primas amiláceas.

2.2- Microrganismos da fermentação alcoólica.

Para a produção industrial de álcool, várias características dos organismos fermentadores são importantes, afim de minimizar os custos envolvidos. Os microrganismos devem ser capazes de crescer em altas concentrações de açúcar e ter alta tolerância ao álcool, entre outras características (SKOTNICKI *et alii*, 1981a).

Em comparação com a riqueza de informação disponível sobre leveduras utilizadas na produção de cerveja, vinho e álcool industrial, relativamente pouco se conhece de outros microrganismos produtores de etanol (ROGERS *et alii*, 1980). Desde alguns anos e, em virtude da situação em que se encontra o Brasil no setor energético, diversas instituições vêm selecionando microrganismos mais eficientes no processo de produção de álcool (CRUZ & BORZANI, 1980). Nos últimos tempos, em vários países, tem sido realizados estudos de fermentação que incluem o uso de bactérias em vez de leveduras para reduzir os tempos de fermentação, destacando-se as bactérias do gênero *Zymomonas* (LEE *et alii*, 1979, 1980, 1981a,b; ROGERS *et alii* 1979, 1980, 1982, 1984; DOELLE & GREENFIELD, 1985a,b; DOELLE *et alii*, 1989; DOELLE & DOELLE, 1990a,b; FAVELA TORRES & BARATTI, 1987; TORAN-DIAZ *et alii*, 1984)

2.2.1- *Zymomonas mobilis*.

Na fermentação alcoólica, as leveduras são os microrganismos comumente utilizados para fermentações industriais. Contudo, *Zymomonas mobilis* apresenta várias vantagens perante as leveduras. *Zymomonas mobilis* são mais termotolerantes, mais osmotolerantes, mais tolerantes ao álcool e são capazes de converter mais rapidamente o substrato em etanol (ROGERS *et alii*, 1982, LAWFORD *et alii*, 1982). Além disso, *Zymomonas mobilis* tem resistência natural a vários antibióticos e não requer oxigênio para a síntese de lipídios (INGRAM *et alii*, 1984).

Esta bactéria tem sido extensamente estudada nos últimos 15 anos, como agente promissor para a produção de etanol, por fermentar rapidamente e com elevada eficiência (LEE *et alii*, 1979; ROGERS *et alii*, 1982, 1984; SKOTNICKI *et alii*, 1981a, 1983; BARATTI & BU LOCK, 1986; FAVELA TORRES & BARATTI, 1987). Esta bactéria apresenta tolerância a elevadas concentrações de glicose, de sacarose e de etanol (SKOTNICKI *et alii*, 1981a; SWINGS & DELEY, 1977); pode tolerar pH entre 2,5 e 7,5 e apresenta bom rendimento em etanol (SWINGS & DELEY, 1977).

De acordo com ROGERS *et alii* (1982), a *Zymomonas*, quando comparada com a levedura, apresenta maior velocidade específica de conversão de açúcar e produção de etanol, maior produtividade volumétrica de etanol em sistema contínuo com recirculação de células (superior a 120 g/l.h), maior produção de etanol e menor formação de biomassa. Esta menor formação de biomassa parece ser consequência da menor energia metabólica disponível para o crescimento: 1 mol de ATP por mol de glicose fermentado.

Espécies de *Zymomonas* podem produzir de 1,8 a 1,9 moles de etanol por mol de glicose em condições de anaerobiose (ROGERS *et alii*, 1980; SWINGS & DELEY, 1977). *Zymomonas*, crescem anaerobicamente e, comparadas com as leveduras, não requerem controle adicional de oxigênio para manter sua viabilidade em altas concentrações de células (ROGERS *et alii*, 1980). A capacidade de crescer rapidamente na ausência de oxigênio sugere o uso de *Zymomonas mobilis* em processo contínuo de fermentação para a produção comercial de etanol (BRINGER *et alii*, 1984a).

A tolerância a elevadas concentrações de álcool em algumas cepas de *Zymomonas* é comparável ou superior à encontrada em *S. cerevisiae*. ROGERS *et alii* (1980), obtiveram produções de etanol maior a 10% (p/v) utilizando glicose 250g/l. Entretanto, ROGERS *et alii* (1982), reportaram que concentrações de etanol de 70 a 80 g/l foram obtidas em cultivo contínuo e acima de 130 g/l, em cultivo descontínuo. SREEKUMAR & BASAPPA (1991), obtiveram por mutação com nitrosoguanidina uma cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CP4 (ZMI2) que possui a morfologia normal da célula, mas apresenta uma melhor tolerância ao etanol, ainda em temperaturas de 42 °C, que a cepa original. Em meio de glicose 200 g/l, pH 5,5 e 42 °C a cepa mutante produziu 73,7 g/l de álcool e um maior conteúdo da enzima álcool desidrogenase.

Zymomonas pode crescer em concentrações relativamente elevadas de açúcar (ROGERS *et alii*, 1980; DOELLE & GREENFIELD, 1985a,b.; PARK & BARATTI, 1992). A cinética de produção de etanol por *Zymomonas*, em altas concentrações de açúcar foi estudada por ROGERS *et alii* (1979). Resultados revelaram que 100 a 250 g/l de açúcar podem ser rápida e eficientemente convertidos em etanol em processo descontínuo. Comparando *Zymomonas*

mobilis ATCC 10988 e *S. carlsbergensis (uvarum)* ATCC 26602, esses autores encontraram que ambos microrganismos fermentam completamente 250 g/l de glicose, produzindo etanol, em 30 a 40 horas, com concentração final de etanol superior a 100g/l. A concentração de biomassa de *Zymomonas mobilis* foi consideravelmente menor que a massa obtida por *S. uvarum*, indicando maior velocidade específica de consumo de açúcar e de produção de etanol para *Zymomonas*.

A produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em processo contínuo em altas concentrações de glicose foi estudada por LEE *et alii* (1979). Quando presente em concentrações de 150 a 200 g/l, a glicose não foi completamente metabolizada, mesmo em taxas de diluição baixas, observando-se comportamento oscilatório. Esses autores sugeriram que a inibição do crescimento pelo etanol foi responsável por esse comportamento.

Zymomonas mobilis ATCC 29191 e *S. cerevisiae* ATCC 4126 foram comparadas por LAVERS *et alii* (1980) em sistemas de fermentação descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo. Obtiveram semelhantes taxas de crescimento para ambos os microrganismos. Segundo esses autores, *Zymomonas mobilis* fermenta glicose e frutose com produções superiores às obtidas por leveduras, mas é incapaz de metabolizar galactose, pentoses e dissacarídeos como maltose e lactose. Em processo descontínuo alimentado, os autores observaram que 12% (p/v) de etanol pode ser produzido a partir de 250 g/l de glicose com *Zymomonas* e que em processo contínuo sem reciclagem de células a concentração ótima de açúcar é de 100 g/l tanto para leveduras quanto para *Zymomonas*. A máxima produtividade em etanol, de 10 a 12 g/l.h, foi obtida com *Zymomonas mobilis*, sendo aproximadamente 30% superior à encontrada para *S. cerevisiae*.

Esta bactéria, que utiliza a via metabólica de Entner Doudoroff, fermenta glicose, frutose e sacarose. Por esta via metabólica, a bactéria obtém 1 mol de ATP por mol de glicose, conseqüentemente deve minimizar os requerimentos energéticos de crescimento e manutenção, de modo a conduzir o máximo de glicose possível para a produção de etanol (CROMIE & DOELLE, 1980). Quando glicose e frutose são utilizados como fonte de carbono, é obtido um rendimento superior a 95 % em relação ao rendimento teórico (LEE *et alii*, 1981a), já que a fermentação produz quase exclusivamente etanol e CO₂ (SWINGS & DELEY, 1977). Quando sacarose, um substrato industrialmente disponível e de baixo custo, é utilizado, o rendimento de etanol representa 75-80 % do valor teórico, devido à formação de subprodutos como levana e sorbitol (SKOTNICKI *et alii*, 1981a; PARK *et alii*, 1983; BARROW *et alii*, 1984; VIKARI, 1984a,b).

SKOTNICKI *et alii* (1981a) estudaram as velocidades de crescimento e produção de etanol de 11 diferentes cepas de *Zymomonas*. Os resultados revelaram que algumas cepas são

mais tolerantes a altas concentrações de açúcar e de etanol que outras. Das duas cepas selecionadas a CP4 foi superior à ATCC 10988 em todas as condições de crescimento em meio contendo glicose, enquanto no meio preparado com sacarose o crescimento e a produção de etanol das duas cepas foram similares, embora a CP4 produziu menos levana que a cepa ATCC 10988. Segundo WARR *et alii* (1984), *Zymomonas mobilis* CP4 é menos produtiva em meio com sacarose e mutações não têm melhorado significativamente a produção de etanol a partir deste carboidrato.

LYNESS & DOELLE (1981), determinaram a glicose livre no meio, afim de estabelecer a correlação entre hidrólise de sacarose, formação de glicose e utilização de glicose em duas cepas de *Zymomonas*. As duas cepas estudadas, Z7 e Z10, apresentaram respostas diferentes. A cepa Z7 apresentou alta atividade de invertase acompanhada da não utilização de glicose, e significativo acúmulo de glicose no fermentador. Os autores concluíram que o incremento no acúmulo de glicose em consequência do aumento da concentração de sacarose, pode indicar limitado sistema metabólico ou progressiva inibição pelos dois carboidratos monoméricos sobre o sistema enzimático catabólico.

2.3- Matérias-primas da fermentação alcoólica.

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui matéria-prima para a obtenção de etanol. Entretanto, para que seja viável economicamente, é preciso levar em consideração o seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação (LIMA *et alii*, 1975).

As matérias-primas ricas em carboidratos podem conter açúcares diretamente fermentescíveis ou carboidratos mais complexos como amido e celulose, os quais devem ser hidrolisados previamente, sendo a transformação da celulose muito mais complexa e dispendiosa do que a do amido (MENEZES, 1980).

Grande variedade de matérias-primas tem sido estudadas como fontes de carboidratos para a produção de etanol, dentre elas o sorgo sacarino (MANCILHA *et alii*, 1984; DOELLE *et alii*, 1989; MILLICHIP & DOELLE, 1989), melaços (MURPHY, 1984, 1988; VAN VUUREN & MEYER, 1982; BORZANI, 1987; LETOURNEAU & VILLA, 1987; DOELLE & DOELLE, 1990a), alcachofra de Jerusalém (MARGARITIS & BAJPAL, 1982; DUVNJAK *et alii*, 1982), caldo de cana-de-açúcar (CRUZ & BORZANI, 1980; DOELLE & GREENFIELD 1985a; SÉRVULO & FRANÇA, 1986), beterraba forrageira (KOSARIK *et alii*, 1983; GIBBONS & WESTBY, 1984, 1986), beterraba açucareira (KIRBY & MARDOM, 1980; DIEZ & MANCILHA, 1990; AMIM, 1992) e extratos de diversas frutas (KOLIOS *et alii*, 1989). Segundo KOSARIC *et alii* (1980), a França e a Bélgica utilizam como matéria-prima a beterraba

açucareira; a Alemanha, a batata; e outros países europeus o licor de sulfito e a serragem de madeira, ressaltando-se que o milho e melações de cana e beterraba são as matérias-primas mais utilizadas nos Estados Unidos.

2.3.1- Utilização de glicose.

A cinética de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, em elevadas concentrações de glicose tem sido estudada em processo descontínuo de fermentação (ROGERS *et alii*, 1979), em processo contínuo (LEE *et alii*, 1979; ROGERS *et alii*, 1980, 1982); processo contínuo com recirculação de células (ROGERS *et alii*, 1980), utilizando vácuo (LEE *et alii*, 1981b), com células imobilizadas (GROTE *et alii*, 1980; BORREGO *et alii*, 1987, 1988; CASTELLAR *et alii*, 1989) entre outros.

O efeito da concentração inicial de glicose nos parâmetros cinéticos da fermentação foi investigado por ROGERS *et alii* (1979), LEE *et alii* (1979) e CROMIE & DOELLE (1981). Os resultados encontrados por estes autores mostraram que aumento na concentração de glicose de 100 para 200 g/l resultou em uma diminuição significativa da velocidade específica de crescimento, no rendimento celular e no rendimento de etanol. Elevadas concentrações de glicose (200-250 g/l) conduzem a fermentações muito prolongadas e incompletas em processo descontínuo (ROGERS *et alii*, 1979) e em processo contínuo (LEE *et alii*, 1979). O efeito dessas elevadas concentrações de glicose na utilização da mesma deve-se à limitação da atividade catabólica nessas condições (CROMIE & DOELLE, 1980).

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados utilizando glicose como matéria-prima para a fermentação com *Zymomonas*, é evidente que a glicose como matéria-prima representa um custo muito elevado para fermentações industriais, tornando-se, assim, importante investigar a produção de etanol por *Zymomonas* a partir de substratos baratos e disponíveis em grandes quantidades. Diversas pesquisas tem sido conduzidas utilizando sacarose, tanto em meios de laboratório como com fontes naturais (LYNESS & DOELLE, 1980, 1981; VIKARI, 1984a; DOELLE & GREENFIELD, 1985a,b).

2.3.2- Utilização de sacarose.

A temperatura e o pH desempenham um papel importante no controle da fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. Este microrganismo hidrolisa sacarose rapidamente sendo que a taxa de hidrólise depende da temperatura de fermentação (LYNESS & DOELLE, 1980), concentração de sacarose (LYNESS & DOELLE, 1981) e pH. Baixas temperaturas (30 °C) conduzem a uma maior indução da levansacarase, a qual exibe sua melhor atividade hidrolítica entre 35 e 40 °C e em pH ótimo de 6.5 (LYNESS & DOELLE, 1983).

Conseqüentemente elevadas temperaturas e elevado pH inicial podem reprimir a produção de levana pela enzima levansacarase (LYNESS & DOELLE, 1983).

Recentemente, O'MULLAN *et alii* (1991) mostraram a presença de três enzimas que hidrolisam a sacarose em *Zymomonas mobilis* CP4, utilizando electroforese e corante zimograma. Segundo estes autores, uma banda corresponde a levansacarase e as outras duas parecem ser invertases (InvA e InvB). A invertase A ocorre intracelularmente, enquanto que a invertase B ocorre extra e intracelularmente.

LYNESS & DOELLE (1981), estudaram a fermentação descontínua de sacarose com duas linhagens de *Zymomonas mobilis* e observaram que aumentos na concentração de sacarose afetam a velocidade específica de crescimento da linhagem Z10 e a atividade hidrolisante da sacarose para a linhagem Z7, mas não afetam significativamente a formação de biomassa. Os autores também demonstraram que a hidrólise da sacarose pode ser independente da utilização da glicose; que, de acordo com a linhagem utilizada, a hidrólise da sacarose pode conduzir a um acúmulo significativo de glicose no meio; e que a velocidade de produção de etanol e o tempo de fermentação dependem da velocidade do catabolismo dos produtos da hidrólise da sacarose.

DOELLE & GREENFIELD (1985a), reportaram que *Zymomonas mobilis* é capaz de apresentar eficiência de hidrólise acima de 95% com 32 horas de fermentação em meio com concentração de sacarose superior a 250 g/l, mas o rendimento em etanol cai subitamente em concentrações de sacarose superiores a 200 g/l.

2.3.3- Caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*)

A produção de álcool no Brasil é efetuada quase que exclusivamente a partir de cana-de-açúcar. Contudo, o aproveitamento de outras culturas constitui importante passo para a regionalização da produção de álcool, redução dos custos de transporte e, principalmente, diminuição da dependência de uma única cultura para a produção de álcool (EMBRAPA, 1983).

No Brasil a produção de cana-de-açúcar está em torno de 50 a 100 toneladas por hectare, dependendo da região (LIMA *et alii*, 1975). A região Centro-Sul do país é responsável por 59% da produção nacional de açúcar e por 82% da produção nacional de álcool (ANON, 1986).

O fato da indústria canavieira ser altamente desenvolvida, proporcionando elevado rendimento em álcool obtido por fermentação direta do colmo, além de fornecer o bagaço como fonte de energia, faz com que o saldo energético resultante da produção de etanol seja positivo. O bagaço, subproduto rico em celulose e de elevada cotação no mercado, apresenta ainda outras utilidades, além de combustível, como matéria-prima para diversas aplicações industriais,

particularmente na fabricação de papel, pasta de celulose, placas de fibra e furfural (MENEZES, 1980). Só alguns trabalhos de fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* tem sido realizados (CRUZ & BORZANI, 1980; DOELLE & GREENFIELD 1985a; SÉRVULO & FRANÇA, 1986; DOELLE & DOELLE, 1990b; DOELLE *et alii*, 1991). SÉRVULO & FRANÇA (1986) em estudo realizado variando-se a concentração de açúcar no caldo de cana de 10 até 100 g/l encontraram taxa específica de crescimento de 0,29 a 0,36 h⁻¹ e rendimento em massa (Y_{x/s}) de 0,009 a 0,02 g/g. A variação do inóculo inicial não afetou o teor de álcool, mas um inóculo maior diminuiu o tempo de fermentação. Encontraram também que o teor alcoólico foi similar na faixa de temperatura de 25 a 35 °C e que o pH ótimo de fermentação foi entre 5,0 e 6,0. DOELLE *et alii* (1991), testaram *Zymomonas mobilis* em escala piloto (100 e 1000 litros) encontrando rendimentos de 91 a 95% em menos de 20 horas de fermentação.

2.3.4- Utilização de melaço.

O melaço é um subproduto do processo de extração e refinação de sacarose, quer seja de cana ou de beterraba, o qual pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de etanol. O melaço de cana-de-açúcar caracteriza-se por apresentar maior conteúdo de vitaminas, ao passo que o melaço de beterraba é mais rico em nitrogênio e minerais. Ambos contém aproximadamente 50% de açúcar, sendo a maior parte sacarose. Em virtude de sua composição, o melaço é utilizado fundamentalmente como fonte de carbono e energia, sendo necessário suplementá-lo com nitrogênio e alguns minerais, especialmente fósforo e magnésio (ACEVEDO, 1980).

Segundo ALMEIDA (1966), a composição do melaço varia com os seguintes fatores: a variedade, idade, estado de sanidade, maturação, sistema de cultivo, adubação, tratamentos culturais, condições climáticas e outras (para a cana-de-açúcar), além dos processos de fabricação normais utilizados nas diversas usinas. VALSECHI & OLIVEIRA (1968), detalharam mais os fatores que influenciam a composição do melaço, dos quais podem ser citados: natureza da matéria-prima (cana-de-açúcar, beterraba, etc); processo de extração do caldo; sistema de clarificação, evaporação e cozimento; sistema de resfriamento; sistema de turbinagem; tipo de açúcar e condições técnico-econômicas da região açucareira.

A composição média do melaço de cana-de-açúcar corresponde a 20% de água, 72% de constituintes orgânicos sendo 62% de açúcares como sacarose, glicose, frutose, ou açúcar invertido e rafinose, e 10% de não açúcares como material nitrogenado, ácidos livres e combinados, substâncias gomosas solúveis ; e 8% de constituintes inorgânicos como óxidos de silício, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, fósforo e alumínio, além de resíduos de soda e carbonatos, resíduos de sulfatos e cloretos (OLBRICH, 1974). Estudo realizado por VASCONCELOS (1985), sobre a composição química de melaços do Estado de Alagoas

mostrou que o melão é um produto de alta heterogeneidade em todos seus componentes; que dentre os macronutrientes o K_2O se encontra em maior proporção, seguido por CaO , MgO , N , e P_2O_5 e que dentre os micronutrientes destaca-se o Fe como o de maior proporção, seguido, em menor proporção e em escala decrescente por Mn , Zn e Cu . Verificou-se também que comparado com melões do Estado de São Paulo, os melões do Estado de Alagoas apresentam menor riqueza em açúcar.

O melão apresenta a vantagem de ser relativamente barato e disponível em grande quantidade. Contudo, um número de componentes no melão pode causar inibição do crescimento e da fermentação. Tem sido postulado que herbicidas e alguns componentes traços como fenol e indol, produtos da degradação térmica e/ou alguns ácidos, nitritos e clorofenolato os quais se acumulam no melão devido ao uso elevado de fertilizantes artificiais, podem ser responsáveis por esta inibição (RHEE *et alii*, 1984).

O conteúdo de cálcio nos melões pode variar amplamente dependendo do processo de fabricação de açúcar. Segundo OURA (1983), melões de baixa qualidade possuem elevadas concentrações de cálcio o que inibe as leveduras. BAJPAI & MARGARITIS (1984), determinaram que elevadas concentrações de cloreto de cálcio diminuíram os rendimentos fermentativos das *Zymomonas*. Entretanto, SREEKUMAN & BASAPPA (1992), verificaram que a adição de carbonato de cálcio e sódio neutralizaram a produção de ácido e aumentaram a produção de etanol na fermentação de glicose 150 a 400 g/l, utilizando *Zymomonas mobilis* ZM4 e mutante ZMI2. Determinaram também que a concentração de 2 g/l de carbonato de cálcio era a mais apropriada e que a melhor concentração de glicose para a fermentação era 250 g/l.

Diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* foram comparadas com *S. cerevisiae* por VAN VUUREN & MEYER (1982) para a produção de etanol a partir do melão de cana-de-açúcar em sistema descontínuo de fermentação. Segundo esses autores, a habilidade de *Zymomonas* produzir etanol do melão varia de cepa para cepa. Em baixa concentração de açúcar (5% p/v), *Zymomonas* compara-se favoravelmente com *S. cerevisiae*, ao passo que em altas concentrações de açúcar (maior a 5% p/v) *S. cerevisiae* produziu consideravelmente mais etanol que *Zymomonas*. A baixa eficiência obtida por *Zymomonas* deve-se provavelmente à presença no melão de certos compostos inibidores do crescimento e da produção de etanol.

O efeito inibidor do melão sobre *Zymomonas* foi atribuído por SKOTNICKI *et alii* (1981b) aos níveis relativamente altos de potássio e magnésio. ROGERS *et alii* (1982), relataram também, inibição significativa do crescimento e da produção de etanol em *Zymomonas* ZM4, em razão, provavelmente, das altas concentrações de potássio, magnésio e cloreto no

melaço. Estes autores solucionaram parcialmente o problema, passando o melaço através de uma membrana seletiva de íons e da seleção de um mutante, ZM4 82, tolerante a sais.

No passado, a dessalinização de melaço foi praticada utilizando trocadores de íons e técnicas de electrodiálises. Contudo, estas técnicas não são comercialmente viáveis para processos em larga escala particularmente para produtos de baixo valor comercial (RHEE *et alii*, 1984). Contudo, a utilização de tecnologia de membranas desenvolvida por LEFEBRE *et alii* (1982), parece reduzir o custo da dessalinização. RHEE *et alii* (1984), estudaram a dessalinização de melaço utilizando uma membrana tubular de fibra oca pré-tratada quimicamente e avaliaram a fermentação de *S. uvarum* ATCC 26602 e *Z. mobilis* ZM4 utilizando o melaço dessalinizado. Os autores indicaram que esta técnica pode oferecer um meio comercialmente atraente para a diminuição da concentração de potássio, magnésio, cálcio e cloreto no melaço e que também pode ser utilizada para pré-tratamento de melaço para produção de fermento para panificação, ácido glutâmico e ácido cítrico.

2.3.5- Melaço de alta qualidade (HTM).

O HTM é definido como um xarope clarificado, parcialmente invertido para evitar a cristalização e evaporado a 85 °Brix. A composição do melaço de alta qualidade difere notavelmente da composição do melaço tradicional. Possui alto conteúdo de açúcares o que o faz muito interessante para a produção de álcool e baixo conteúdo de cinzas pelo que é uma ótima matéria-prima para fabricação de rum (MURPHY, 1984). O conteúdo de P₂O₅, K₂O, MgO, CaO e nitrogênio é mínima comparada com a do melaço de cana e de beterraba. Quanto ao conteúdo de fatores de crescimento, a quantidade de inositol é baixíssima, muito abaixo da quantidade requerida pelas leveduras para um bom rendimento em etanol (OLBRICH, 1974).

2.4- Formação de subprodutos durante a fermentação alcoólica.

O principal produto da fermentação de açúcares por *Zymomonas mobilis* é o etanol. Quando sacarose é utilizada para a fermentação, o rendimento fermentativo diminui devido a formação de subprodutos como levana (RIBBONS *et alii*, 1962; DAWES & RIBBONS, 1966; PARK *et alii*, 1983, LYNESS & DOELLE, 1983) e sorbitol (BARROW *et alii*, 1984; VIIKARI 1984a,b; ZACHARIOU & SCOPES, 1986; AMIN & KHALAF ALLAH, 1992). Além destes compostos também são produzidos acetaldeído e ácido acético (BELAICH & SENEZ, 1965; BRINGER *et alii*, 1984b; PANKOVA *et alii*, 1985; WECKER & ZALL, 1987; TANAKA *et alii*, 1990; ISHIKAWA & TANAKA, 1992) e pequenas quantidades de alguns álcoois superiores e fenol (RAO & JONES, 1987).

É interessante destacar que modificações no metabolismo da bactéria podem provocar a obtenção destes subprodutos como produto principal o que é de muito interesse

industrial. Recentes estudos realizados por CHUN & ROGERS (1988) mostraram que, a alteração na permeabilidade das células de *Zymomonas* com tolueno, resulta em elevadas concentrações de sorbitol e ácido glucônico com a mínima produção de etanol. Por outro lado TANAKA *et alii* (1990), sugeriram a utilização de *Zymomonas mobilis* para a produção de acetaldeído aumentando a concentração de oxigênio no fermentador. ISHIKAWA & TANAKA (1992), estudaram o efeito da ventilação sobre a produção de acetaldeído e determinaram as condições ótimas para produção de acetaldeído. YOSHIDA *et alii* (1990), isolaram do caldo de palmeira no Sudeste Asiático, uma cepa de *Zymomonas mobilis* (IN-17-10) que produz quantidade abundante de levana: 53% do valor teórico, em sacarose 150 g/l.

2.4.1- Levana.

A formação de levana foi inicialmente demonstrada por RIBBONS *et alii* (1962) e posteriormente estudada por DAWES e RIBBONS (1966) e PARK *et alii* (1983). A enzima responsável pela formação de levana, levansacarase, foi parcialmente purificada (LYNESS & DOELLE, 1983). Mas, estudos recentes mostraram que, além da levana, o sorbitol é também produzido como subproduto da fermentação de sacarose por *Zymomonas* (BARROW *et alii*, 1984; VIKARI, 1984 a,b) e a enzima envolvida purificada (LEIGH *et alii*, 1984; ZACHARIOU & SCOPES, 1986).

O mecanismo da hidrólise da sacarose e formação de levana não estão ainda totalmente claros (VIKARI, 1984a). Duas enzimas distintas podem estar envolvidas na hidrólise da sacarose: levansacarase (EC 2.4.1.10) e invertase (EC 3.2.1.26). De acordo com BLACKBEARD & DOELLE (1983), a hidrólise da sacarose é independente da utilização de glicose. A taxa de formação de etanol é limitada tanto pelo catabolismo da glicose e frutose como pela hidrólise da sacarose, sendo que, este último parece ser o fator mais limitante.

De acordo com estes antecedentes, FAVELA TORRES & BARATTI (1987), postularam duas estratégias possíveis para melhorar a eficiência da fermentação a partir de sacarose: a) reduzir a formação de subprodutos, por exemplo, mediante otimização das condições de fermentação ou b) encontrar mercado para os subprodutos formados (DOELLE & GREENFIELD, 1985a,b).

Devido ao fato da levansacarase não só catalisar a hidrólise da sacarose, mas, também a produção de levana, é importante que as condições de cultura impostas sejam desfavoráveis à formação de levana e favoráveis a hidrólise da sacarose (DOELLE & GREENFIELD, 1985 b). Estes autores relataram que aumento na temperatura de fermentação de 30 °C para 35 °C reduziram a formação de levana e aumento no pH inicial do meio reduziram a formação de sorbitol, em fermentação em batelada.

Alguns autores estudaram a produção de etanol a elevadas temperaturas, entre 30 e 36 °C (LEE *et alii*, 1981a; LAUDRIN & GOMA, 1982; FIESCHKO & HUMPHREY, 1983). As principais conclusões foram que a maioria dos parâmetros cinéticos não foram afetados na faixa de temperatura de 30 e 36 °C, mas, o rendimento em etanol decresceu de 94 para 78 % do valor teórico (LEE *et alii*, 1981a). Isto foi atribuído à formação de subprodutos (LEE *et alii*, 1981a) ou ao aumento no coeficiente de manutenção (LAUDRIN & GOMA, 1982; FIESCHKO & HUMPHREY, 1983).

2.4.2- Sorbitol.

A formação de sorbitol por microrganismos é um tópico que não tem recebido muita atenção. *Zymomonas mobilis*, na presença de ambas, glicose e frutose, produz quantidade substancial de sorbitol (BARROW *et alii*, 1984; DOELLE & GREENFIELD, 1985a; VIKARI, 1984a,b). Desde que sorbitol é formado a partir de frutose somente na presença de glicose, parece provável que glicose seja o doador de elétrons, sendo oxidada a gluconato no processo. A presença de uma glicose desidrogenase (LEIGH *et alii*, 1984) e uma gluconatoquinase (ZACHARIOU & SCOPES, 1985) ajuda a sustentar esta hipótese e indica uma rota direta pela qual a glicose oxidada pode retornar à via de Entner Doudoroff.

A formação de sorbitol depende da concentração de glicose e frutose no meio tanto quanto da taxa de crescimento do organismo. Os aspectos reguladores da formação de levana e sorbitol parecem ser antagônicos: uma alta taxa de hidrólise de sacarose, elevada atividade de levansacarase e invertase, favorecem a formação de sorbitol. Entretanto, uma baixa atividade hidrolítica favorece a formação de levana de elevado peso molecular (VIKARI & GISLER, 1986).

Aumentos na concentração de sacarose acima de 200 g/l podem, teoricamente, conduzir ao acúmulo de glicose, no fermentador, (DOELLE & GREENFIELD, 1985 a,b). Este acúmulo provocaria inibição da frutoquinase, conduzindo ao acúmulo de frutose e conseqüentemente à formação de sorbitol (DOELLE & GREENFIELD, 1985 a,b). A redução da frutose para sorbitol também serve como meio para regeneração das coenzimas (VIKARI, 1984a).

Estudos conduzidos por DOELLE & GREENFIELD (1985b), sugerem que o pH pode ser um parâmetro muito importante para controlar a relação de conversão para sorbitol. Estes autores determinaram que a relação de frutose para formação de sorbitol varia significativamente com as condições de cultivo, por exemplo, um pH controlado de 5,0, em concentração inicial de sacarose acima de 288 g/l, favorece a formação de sorbitol; entretanto pH próximo de 6,0 parece favorecer a formação de frutose. Sugeriram também a possibilidade de

obter etanol mais frutose, etanol mais frutose e sorbitol ou etanol mais sorbitol, numa única fermentação.

2.5- Processo de fermentação.

Nas últimas décadas tem-se observado um progresso extraordinário na tecnologia dos processos de fermentação alcoólica, tanto no que concerne a microbiologia, como a cinética, e a engenharia dos sistemas de reação. Contudo, os resultados obtidos não tem sido aplicados a nível industrial, desde que a maioria das destilarias continuam com o processo convencional de fermentação (RUBIO & NAVARRO, 1989).

2.5.1- Processo descontínuo.

Os processos descontínuos, tipo batelada apesar de serem facilmente conduzidos industrialmente, apresentam a desvantagem de utilizar um grande volume de dornas devido a sua baixa produtividade. A estabilidade do sistema biológico é baixa devido a grande chance de contaminação. Convém salientar que existem duas variedades deste tipo de processo: por corte, muito empregado na produção de bebidas alcoólicas, e com recirculação de microrganismos (CARIOCA *et alii*, 1985).

2.5.2- Processo descontínuo alimentado (Fed-batch).

A fermentação por processo descontínuo alimentado é um tipo de condução do processo fermentativo em que a alimentação do substrato é feita gradativamente. O volume é variável e a fermentação se realiza durante a carga do fermentador a qual é completada até o enchimento do reator. Segundo ALMEIDA (1980), o controle apropriado do fluxo de alimentação atenua alguns mecanismos de inibição pelo substrato e produto. O processo descontínuo alimentado com recirculação de microrganismos, Melle-Boinot, é atualmente o mais empregado no Brasil (CARIOCA *et alii*, 1985).

Este processo começou a ser empregado em escala industrial na fabricação de fermento para panificação e desde então tem sido estudado e operado como um processo adequado para o cultivo de microrganismos. Contudo, poucos trabalhos tem sido realizados com o processo descontínuo alimentado para fermentação alcoólica. ENDO & INOUE (1977), apresentaram resultados obtidos nas condições experimentais muito diferentes aos adotados em plantas industriais de etanol; como KOSHIMIZU *et alii* (1984), que estudaram a influência de fatores como: concentração de células no inóculo, concentração de açúcar na alimentação e tempo de enchimento; SILMAN (1984), que demonstrara as vantagens do processo em batelada alimentada em fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis*; BORZANI (1987), que estudou a cinética de produção de etanol durante a etapa de enchimento do reator e YAMANE *et alii*

(1992), que desenvolveram um método de controle automático no qual a taxa de alimentação é determinada medindo-se continuamente a massa celular e o volume do reator.

2.5.3- Processo contínuo.

O processo contínuo do tipo CSTR (reator de tanque com agitação) sem reciclo de células é o mais simples e consiste de um vaso agitado onde os açúcares são alimentados para permitir a sua conversão continuamente em etanol. O vinho contendo células, etanol e o açúcar residual deixa continuamente o reator. A produtividade deste tipo de processo é limitada pela inibição causada pela alta concentração de produto sobre o crescimento dos microrganismos (HOPPE & HANSFORD, 1982), porém é quase três vezes superior à do processo descontínuo. Este fato ocasiona uma redução no volume do fermentador numa proporção de um terço (CARIOCA *et alii*, 1985). Segundo estes autores, observa-se uma preferência em relação aos processos contínuos que utilizam reator do tipo CSTR devido às boas perspectivas apresentadas por este tipo de processo, especialmente no que diz respeito à produtividade.

O desempenho de *Zymomonas mobilis* tem sido estudado em diferentes processos contínuos, tais como: sem reciclo de células (LEE *et alii*, 1979; VIIKARI & LINKO, 1986), com reciclo de células (CYSEWSKI & WILKE, 1977; LEE *et alii*, 1980; ROGERS *et alii*, 1980; FAVELA TORRES & BARATTI, 1987), a vácuo (LEE *et alii*, 1981b), em reatores com células imobilizadas (GROTE *et alii*, 1980; JAIN *et alii*, 1985; BORREGO *et alii*, 1987, 1988; CASTELLAR *et alii*, 1989), com células floculentas (TORAN DIAZ *et alii*, 1984; BARATTI *et alii*, 1986; LOPES *et alii*, 1991), utilizando um mutante de *Zymomonas mobilis* osmotolerante (PARK & BARATTI (1992) e em torres de fermentação (PRINCE & BARDFORD, 1982).

ROGERS *et alii* (1980), comparando a cinética e os parâmetros operacionais de vários processos contínuos e utilizando leveduras e *Zymomonas*, concluíram que *Zymomonas* apresenta maior velocidade específica de conversão de açúcar e produção de etanol e maior produtividade volumétrica de etanol em sistema contínuo com reciclagem de células (120-200 g/l.h) em comparação com leveduras. De acordo com LAWYER *et alii* (1982), no sistema de fermentação contínua com reciclo de células aproveita-se a habilidade da *Zymomonas* para produzir etanol com uma velocidade muito maior que a mesma biomassa de levedura.

Recentemente tem sido desenvolvidos novos processos e tecnologias na fermentação de matérias-primas por *Zymomonas mobilis*. DOELLE *et alii* (1989), desenvolveram um processo em escala industrial (64.000 litros) para fermentação de milho, sorgo e outras matérias-primas amiláceas utilizando um sistema de inóculo em cascata que substitue o sistema de recirculação de biomassa e portanto reduz os custos envolvidos em centrifugação e reciclo de células. AMIN & KHALAF ALLAH (1992), testaram *Zymomonas mobilis* ATCC 396760 para

fermentar pedaços de beterraba açucareira (185 g/l) em fermentação em estado sólido obtendo produtividade de 12 g/l.h e concentração de etanol de 130 g/l. PARK & BARATTI (1992), utilizaram uma cepa osmotolerante (*Z. mobilis* SBE15), mutante de *Zymomonas mobilis* ATCC 32821, para fermentação de melaço de beterraba açucareira previamente hidrolisado enzimaticamente, em processo contínuo de dois estágios. O fermentador operou por 18 dias, obtendo-se concentração de etanol de 60 g/l e 97% de conversão de açúcar.

O grande volume de álcool requerido para atender o mercado energético do Brasil e a redução nos custos de produção do álcool são fatores fortemente considerados em qualquer tipo de análise sobre qual seria o processo mais conveniente para produção de álcool industrialmente. Segundo CARIOCA *et alii*, (1985), a tendência é no sentido de aproveitar a experiência e os equipamentos do processo Melle-Boinot em favor dos processos contínuos utilizando dois ou mais reatores CSTR em série.

2.6-Fatores que afetam a fermentação alcoólica.

Sabe-se que o acúmulo de etanol como produto final da fermentação causa inibição progressiva na taxa de conversão de açúcar, tanto em bactérias (LAUDRIN & GOMA, 1982) quanto em leveduras (AIBA *et alii*, 1968; MOULIN *et alii*, 1984). Este fenômeno é particularmente importante durante a produção comercial de etanol em razão do aumento do tempo requerido para a completa conversão de açúcar em etanol e limita a concentração final de etanol obtida (INGRAM & BUTTKE, 1984). Segundo OSMAN & INGRAM (1985), o etanol reduz a efetividade da membrana plásmica da célula microbiana, permitindo perdas de cofatores e coenzimas.

Investigações realizadas por LYNESS & DOELLE (1981), revelaram que aumentos na concentração de glicose de 100 para 200 g/l resultaram em significativa diminuição da velocidade específica de crescimento, produção de células e produção de etanol. Também altas concentrações de glicose prolongaram o tempo de fermentação e conduziram à não utilização de glicose. De acordo com LEE *et alii* (1981b), fermentação realizada a vácuo remove os produtos inibidores aumentando a produtividade.

HARRISON & GRAHAM (1970), estabeleceram que, assim que a concentração de açúcar aumenta, a velocidade de fermentação e a quantidade máxima de etanol produzida diminuem. A concentração de açúcar que pode ser fermentada mais eficientemente depende, em certo grau, de outros componentes do meio, como minerais e outros compostos não assimiláveis, que podem provocar inibição.

O rendimento industrial de álcool depende, em grande parte, dos nutrientes presentes no mosto. É indispensável, por exemplo, corrigir o caldo de cana, que é normalmente deficiente em nitrogênio e fósforo, com a adição de fosfato de amônio ou superfosfato na proporção de 1 g/l, quando a fermentação é conduzida com leveduras (MENEZES, 1980). Aconselha-se também enriquecer diariamente, após o tratamento com ácido sulfúrico, o pé-de-cuba, isto é, o inóculo que deverá dar início à nova fermentação nas dornas, com sulfato de amônio e farelo de arroz, na proporção de 1 g/l. Também pode-se utilizar uma fração de vinhaça para diluir o meio e corrigir a acidez, diminuindo o gasto em ácido. Além disso, a vinhaça contém nitrogênio e fatores de crescimento que estimulam a fermentação (MENEZES, 1980).

Sabe-se também que o crescimento de *Zymomonas mobilis* pode ser limitado, em razão de requerimentos de fatores de crescimento (SWINGS & DELEY, 1977), e que altas quantidades de extrato de levedura aumentam a produção de células, mas não necessariamente a produtividade de etanol (CROMIE & DOELLE, 1980). BEXON & DAWES, citados por KOSARIK *et alii* (1982), encontraram que esta bactéria requer no mínimo, 11 vitaminas no meio glicose-peptona para substituir, parcialmente, 1% (p/v) de extrato de levedura.

Segundo SWING & DELEY (1977), a maioria das cepas de *Zymomonas mobilis* requer ácido pantotênico, biotina e, ocasionalmente, alguns outros fatores de crescimento como vitamina B₁₂, riboflavina, tiamina, ácido lipóico e ácido fólico.

A ausência de pantotenato seria um dos fatores de crescimento desacoplado observado em *Zymomonas*. Este composto aparentemente não pode ser sintetizado por *Zymomonas* e como um componente da coenzima A ele é requerido para a atividade de várias transferases, sendo, portanto, de grande importância em processos de biossíntese (SWING & DELEY, 1977).

Várias enzimas da via Entner Doudoroff requerem Mg como cofator, incluindo glicoquinase, glicose 6-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase e enolase (SOLS *et alii*, 1971; STOUTHAMER, 1978; MILLAR *et alii*, 1982). Enquanto CROMIE & DOELLE (1981, 1982), mencionaram o efeito benéfico de elevadas concentrações de Mg, LAWFOORD *et alii* (1982), não encontraram vantagem na cinética de fermentação utilizando elevadas concentrações de Mg. ROGERS *et alii* (1982), sugeriram que elevadas concentrações de magnésio diminuem a velocidade de produção de etanol em processo descontínuo.

Outros cofatores que podem ser necessários na fermentação incluem cálcio e potássio. HOPNER & DOELLE (1983), reportaram que o cálcio ativa a enzima piruvato descarboxilase em *Zymomonas*, enquanto SOLS *et alii* (1971), reportaram que potássio ativa a

enzima piruvato quinase. Contudo, a adição destes dois cofatores não reduziu a inibição da fermentação pelo etanol (OSMAN & INGRAM, 1985).

A temperatura também influi no metabolismo fermentativo, mas a maioria dos estudos metabólicos utilizando bactérias do gênero *Zymomonas* tem sido conduzidos a 30 °C. Explicação provável reside no fato da temperatura ótima de crescimento destas bactérias estar entre 25 e 31 °C (LYNESS & DOELLE, 1980). Entretanto, nem sempre a temperatura ótima de crescimento é também a ideal para o processo fermentativo. Além disso, considerando que em processos industriais é importante reduzir os gastos, o emprego de temperaturas mais altas na fermentação desde que próximas à temperatura local, minimiza o consumo de energia na refrigeração bem como na destilação (PINCUS *et alii*, 1980). Na atualidade existem vários trabalhos que mostram que *Zymomonas mobilis* apresenta melhores condições de fermentação na faixa de 30 a 34 °C (LEE *et alii*, 1981a; FIESCHKO & HUMPHREY, 1983; SREEKUMAR & BASSAPA, 1991).

Em relação ao pH, este microrganismo apresenta uma extensa faixa de pH para crescimento, de 3,5 a 7,0. Entretanto, devem existir valores ótimos para produção do etanol, considerando-se que pode ocorrer a formação de outras substâncias, tais como: ácido lático, acetoina, ácido acético (SWINGS & DELEY, 1977).

O crescimento e a produção de etanol são afetados pela presença de certos compostos químicos no meio de fermentação. Por exemplo compostos encontrados em hidrolisados ácidos da madeira, como ácido acético, fórmico ou propiônico, furfural, fenol são inibitórios na faixa de concentração de 2 a 20 g/l (FEIN *et alii*, 1984). O oxigênio apresenta efeito inibidor (BRINGER *et alii*, 1984b; TANAKA *et alii*, 1990) especialmente em elevada concentração de substrato (TORAN-DIAZ *et alii*, 1983). O dióxido de carbono inibe a produção de biomassa e aumenta a concentração de glicose residual diminuindo a produtividade (NIPKOW *et alii*, 1985).

A maior inibição é provocada pelo próprio etanol produzido pela bactéria (BURRILL *et alii*, 1983; INGRAM *et alii*, 1984). O etanol inibe reversivelmente algumas enzimas da via Entner Doudoroff (MILLAR *et alii*, 1982) como a álcool desidrogenase (JAIN *et alii*, 1985) e aumenta a permeabilidade da membrana plasmática (OSMAN & INGRAM, 1985). Conseqüentemente há perda de cofatores essenciais, coenzimas e de metabolitos intermediários reduzindo a taxa de conversão de açúcar em etanol (BARATTI BU'LOCK, 1986).

3- MATERIAL E MÉTODOS.

3.1- MATERIAL.

3.1.1- Microrganismo utilizado.

Foi utilizada a bactéria *Zymomonas mobilis* CP4, isolada no Nordeste Brasileiro pelo Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) a partir de caldo de cana fermentado.

3.1.2- Manutenção do microrganismo.

Para a manutenção da cultura foi utilizado o meio RM, pH 6,0 contendo: glicose 20 g/l, extrato de levedura 10 g/l, KH_2PO_4 2,0 g/l e agar-agar 15 g/l. Após o crescimento durante 30 horas a 30 °C, os tubos foram mantidos a 4 °C e a cultura reativada a cada 20 dias.

3.1.3- Preparação do Inóculo.

A bactéria foi incubada por 24 horas a 30 °C em meio contendo: sacarose 100 g/l, KH_2PO_4 1,0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l e extrato de levedura (Difco) 10,0 g/l, pH 5,7. 10% (v/v) desta cultura foi transferido para novo meio e incubado por 24 horas a 30 °C. Em todos os ensaios realizados foi utilizado o inóculo na relação de 10% (v/v) ao volume final de cada ensaio.

3.1.4- Preparação dos meios utilizados na fermentação.

3.1.4.1- Preparação do meio semissintético com sacarose (Controle).

O meio de fermentação semissintético foi preparado com sacarose 100 g/l (ou outra concentração em estudo), KH_2PO_4 1,0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l e extrato de levedura 10 g/l, pH 5,7. A solução de sacarose foi esterilizada separadamente dos sais a 121 °C por 15 min e misturada no momento do preparo do meio de fermentação.

3.1.4.2- Preparação do meio com melaço de cana-de-açúcar.

O melaço foi diluído para 20 a 30 °Brix dependendo das condições requeridas para o ensaio, com água destilada e clarificado com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,87 g/l), fervendo-se por 10 min.

Após resfriar decantou-se por 24 horas e bombeou-se 2/3 partes do melaço clarificado (BORZANI *et alii*, 1977). O melaço foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Nos estudos com melaço suplementado, adicionaram-se KH_2PO_4 1,0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l e extrato de levedura 5,0 g/l. Estas soluções foram esterilizadas

separadamente e adicionadas ao melaço no momento de preparar o meio de fermentação. A concentração de açúcar redutor total (ART) final do meio com melaço dependeu do estudo realizado. O pH final do melaço preparado desta forma foi na faixa de 5 a 5,5, portanto em nenhum dos ensaios realizados com melaço foi ajustado o pH.

3.1.4.3- Preparação do meio com HTM.

O HTM foi diluído para 20 °Brix e esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Uma vez decantado, foi transferido assepticamente e acertada a concentração de ART a 100 g/l com água destilada estéril. Nos estudos com HTM suplementado adicionaram-se KH_2PO_4 1,0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l e extrato de levedura 5,0 g/l. Estas soluções foram esterilizadas separadamente e adicionadas ao HTM no momento de preparar o meio de fermentação.

3.1.4.4- Preparação do meio com caldo de cana-de-açúcar.

O caldo de cana foi clarificado com CaO (0,6 g/l), fervendo-se por 10 minutos. Após esfriar decantou-se por 24 horas bombeando-se 2/3 partes do caldo clarificado. O caldo foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos e ajustada a concentração de ART a 100 g/l com água destilada estéril. Nos estudos com caldo de cana suplementado, adicionaram-se KH_2PO_4 1,0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l e extrato de levedura 5,0 g/l. Estas soluções foram esterilizadas separadamente e adicionadas ao caldo de cana no momento de preparar o meio de fermentação.

3.1.5- Condições de fermentação em frascos erlenmeyer.

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo na tampa um tubo em forma de U para facilitar a saída do CO_2 . Os frascos foram incubados em shaker (New Brunswick) com agitação de 100 rpm. Todos os ensaios foram realizados no mínimo em duplicata. Durante as fermentações foram colhidas amostras cada duas horas para realizar as análises respectivas.

3.1.6- Condições de fermentação em fermentador de laboratório.

Uma vez estabelecidas as Condições de operação foi utilizado um fermentador de laboratório de 1 litro de capacidade, com controle de temperatura e agitação mantida a 100 rpm. O pH foi controlado apenas nos ensaios realizados com sacarose. As fermentações foram realizadas no mínimo em duplicata colhendo-se amostras cada duas ou três horas para realizar as análises respectivas.

3.2- MÉTODOS.

3.2.1- Estudo da formação de produtos e subprodutos em sacarose.

3.2.1.1-Efeito da temperatura.

Os ensaios para avaliar o efeito da temperatura nos produtos e subprodutos formados foram realizados utilizando meio semissintético preparado com sacarose. Foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml de meio de fermentação e pH inicial de 5,7. As temperaturas em estudo foram: 30, 34, 37 e 40 °C. Cada frasco foi inoculado com 10% (v/v) do inóculo cultivado por 12 horas na correspondente temperatura em estudo.

3.2.1.2-Efeito do pH.

Para estudar o efeito do pH na formação de produtos e subprodutos, os ensaios foram conduzidos em fermentador de laboratório de 1 litro de capacidade, utilizando 700 ml de meio de fermentação contendo sacarose. Foi conduzida a fermentação com e sem controle de pH nas temperaturas de 30 e 37 °C. Na fermentação com controle de pH este foi mantido em 5,7 pela adição de NaOH 1M através de uma bomba dosadora.

3.2.2- Estudo do efeito da adição de alguns sais ao meio com sacarose.

3.2.2.1-Efeito da adição de vários sais ao meio de fermentação.

Foi estudado o efeito da adição de alguns sais ao meio semissintético de fermentação descrito no item 3.1.4.1. Como fonte de potássio foram adicionados KCl (10 g/l) e K₂SO₄ (12,5 g/l); como fonte de sódio foram adicionados NaCl (0,5 g/l) e NaH₂PO₄.H₂O (0,5 g/l); como fonte de cálcio foi adicionado CaCl₂ (5,0 g/l); como fonte de magnésio foi adicionado MgSO₄.7H₂O (5 g/l) e como fonte de cloreto foi adicionado NaCl (5,0 g/l). Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml de cada meio em estudo. A temperatura de fermentação foi de 34 °C, pH inicial de 5,7 e agitação de 100 rpm.

3.2.2.2-Efeito da variação da concentração de KCl.

Foi estudado o efeito da variação da concentração de K na forma de KCl. Ao meio semissintético de fermentação (controle) foi adicionado KCl nas concentrações de 5,0; 10,0; 12,5 e 17,5 g/l. Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml de cada meio em estudo. A temperatura de fermentação foi de 34 °C, pH inicial de 5,7 e agitação de 100 rpm.

3.2.2.3-Efeito da variação da concentração de Magnésio.

Foi estudado o efeito da variação da concentração de Mg na forma de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. No primeiro ensaio, ao meio semissintético de fermentação (controle) foi adicionado $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ nas concentrações de 5,0; 10,0; 15,0 e 25,0 g/l e as fermentações conduzidas a 34 °C. No segundo ensaio foi adicionado $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 g/l e as fermentações conduzidas a 30 e 37 °C. Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml de cada meio em estudo, pH inicial de 5,7 e agitação de 100 rpm.

3.2.2.4-Efeito da variação da concentração de $CaCl_2$.

Foi estudado o efeito da variação da concentração de Ca na forma de $CaCl_2$. Ao meio semissintético de fermentação (controle) foi adicionado $CaCl_2$ nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 g/l. Os ensaios foram conduzidos a 34 °C em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml de meio, pH inicial de 5,7 e agitação de 100 rpm.

3.2.3-Estudo utilizando melação de cana-de-açúcar em processo descontínuo.

3.2.3.1- Clarificação do melação.

Foram realizados os seguintes tratamentos de clarificação do melação, após diluição prévia para 20 °Brix:

- 1- Fervura por 10 minutos.
- 2- Adição de 1,87 g/l de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ e fervura por 10 minutos.
- 3- Adição de 1,87 g/l de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ e 0,6 g/l de CaO, fervura por 10 minutos.
- 4- Adição de H_2SO_4 concentrado até pH 3 a 4, aquecimento de 95 a 100 °C. Adição de H_2O_2 30% (10 ml/l), resfriamento e ajuste do pH para 5,7 com NH_4OH .
- 5- Adição de ferrocianeto de potássio 10% (1ml/100ml) e fervura por 10 minutos.

Em todos os casos, após resfriar decantou-se por 24 horas e bombeou-se 2/3 partes do líquido clarificado. Estes melações foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Nos melações clarificados e esterilizados foram determinadas as concentrações dos íons Ca, Na, K e Mg e as concentrações de fosfato e de cloreto.

Uma parte de cada um destes melaços foi utilizada para fermentação, após prévio ajuste do ART a 100 g/l com água destilada estéril e Adição de nutrientes. As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer nas Condições descritas no item 3.1.5.

3.2.3.2-Efeito da Adição ou não de nutrientes no melaço clarificado e não clarificado.

Uma vez determinado o melhor tratamento para Clarificação do melaço foi estudado o efeito da suplementação do melaço com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/l) e extrato de levedura (5 g/l). Os ensaios de fermentação foram conduzidos em fermentador de laboratório, sem controle de pH e a temperatura de 34 °C.

3.2.3.3-Efeito da variação da concentração de açúcar (So) no melaço.

Foram testadas quatro concentrações de açúcar no melaço, 55, 108, 145 e 215 g/l de ART. O melaço clarificado com NaH_2PO_4 (1,87 g/l) e esterilizado foi suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/l) e extrato de levedura (5 g/l). Os ensaios de fermentação foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 500 ml nas Condições descritas no item 3.1.5, sem controle de pH e temperatura de 30 °C.

3.2.3.4-Efeito da variação da temperatura de fermentação.

Foram testadas quatro temperaturas de fermentação (30, 34, 37 e 40 °C) em três concentrações de açúcar no melaço (55, 108 e 145 g/l de ART). O melaço clarificado com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,87 g/l) e esterilizado foi suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/l) e extrato de levedura (5 g/l). Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 500 ml nas Condições descritas no item 3.1.5, sem controle de pH.

3.2.4- Fermentação de melaço em processo contínuo em fermentador de laboratório.

As fermentações foram conduzidas em processo descontínuo por aproximadamente 10 horas, antes de começar a alimentação em forma contínua. A cada 3 horas, foram tomadas amostras afim de verificar o estabelecimento do regime permanente e determinada a concentração da massa celular. Durante o regime permanente foram tomadas três amostras para determinação de massa celular, ART e etanol. Em todos os estudos em processo contínuo, foi utilizado melaço de cana-de-açúcar clarificado com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,87 g/l) e suplementado com nutrientes como descrito no item 3.1.4.2. Os ensaios foram conduzidos em fermentador de laboratório, sem controle de pH e com agitação de 100 rpm.

3.2.4.1-Efeito da taxa de diluição.

Para o estudo do efeito da taxa de diluição foi utilizado um biorreator de 1 litro com volume útil de trabalho de 640 ml, temperatura de 34 °C. Este estudo foi realizado em duas concentrações de açúcar no melaço: 97 e 133 g/l de ART. As taxas de diluição estudadas foram: 0,08; 0,12; 0,206; 0,278; 0,36 e 0,47 h⁻¹.

3.2.4.2-Efeito da variação da concentração de açúcar (So) no melaço.

Foram estudadas cinco concentrações diferentes de açúcar no melaço: 70, 91, 107, 133 e 143 g/l de ART. Os ensaios foram conduzidos em fermentador de laboratório com volume útil de trabalho de 510 ml, na taxa de diluição de 0,1725 h⁻¹ e temperatura de 34 °C.

3.2.4.3-Efeito da temperatura de fermentação.

Foram estudadas 6 temperaturas diferentes de fermentação: 27, 30, 32, 34, 36 e 40 °C. A concentração de açúcar no melaço foi de 100 g/l de ART, o volume útil de trabalho do fermentador foi de 510 ml e a taxa de diluição de 0,1705 h⁻¹.

3.2.5- Fermentação de melaço em processo descontínuo alimentado em fermentador de laboratório.

Para este estudo foi utilizado um fermentador de 1 litro de capacidade. Em todos os estudos em processo descontínuo alimentado, foi utilizado melaço de cana-de-açúcar clarificado com NaH₂PO₄.H₂O (1,87 g/l) e suplementado com nutrientes como descrito no item 3.1.4.2. Os ensaios foram conduzidos sem controle de pH, com agitação de 100 rpm e temperatura de 34 °C.

3.2.5.1- Estudo da variação do fluxo de alimentação.

Foram estudados três fluxos de alimentação : 64,5; 78,3 e 114 ml/h equivalentes a 10, 8 e 5 horas de tempo de enchimento do fermentador, respectivamente. A alimentação era interrompida no tempo programado de enchimento do reator e a fermentação continuou até completar 24 horas. A concentração de açúcar no melaço neste estudo foi de 145 g/l de ART.

3.2.5.2- Estudo da variação da concentração inicial de açúcar na alimentação.

Foram estudadas concentrações iniciais de açúcar de alimentação na faixa de 114 a 215 g/l de ART. O tempo de enchimento do reator neste estudo foi de 5 horas (vazão de alimentação de 114 ml/h). As fermentações foram acompanhadas por 24 horas.

3.2.6- Estudos em escala piloto.

Foi utilizado um fermentador piloto de 30 litros (Superohm F-30II). Neste reator foram testados os processos descontínuo e descontínuo alimentado nas condições ótimas de fermentação obtidas dos estudos anteriores. Os ensaios foram realizados utilizando melão clarificado (1,87 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), não esterilizado e suplementado com nutrientes como descrito no item 3.1.4.2. A agitação do mosto foi de 100 rpm, temperatura de 34 °C sem controle de pH. As fermentações foram realizadas em duplicata colhendo-se amostras cada duas horas para realizar as análises respectivas. As concentrações iniciais de açúcar no melão foram de 125 e 150 g/l de ART para os processos descontínuo e descontínuo alimentado respectivamente. O fluxo de alimentação foi de 78,3 ml/h no processo descontínuo alimentado.

3.3- MÉTODOS ANALÍTICOS.

3.3.1- Massa celular.

A massa celular foi determinada medindo-se a turbidez a 600 nm de uma suspensão de células em água destilada, após separação das mesmas por centrifugação a 7000 rpm por 10 minutos. O correspondente peso seco é obtido da curva de correlação de absorvância vs peso seco. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.3.2- Etanol.

O etanol produzido foi determinado por cromatografia gasosa, após separação das células por centrifugação, utilizando cromatógrafo CG-37-D e integrador CG-20, com coluna de poropak Q, nitrogênio como gas de arraste (75 ml/min), temperatura da coluna de 130 °C, temperatura do detector de 195 °C e do injetor de 177 °C. Para a calibração foi utilizado etanol (99,8%) na concentração de 1,5 g/l como padrão externo. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.3.3- Levana.

A determinação do conteúdo de levana foi realizada medindo-se a turbidez do meio de fermentação a 600 nm, após separação das células a 7000 rpm por 10 minutos, segundo a metodologia sugerida por SKOTNICKI *et alii* (1981a). Os resultados foram correlacionados com a concentração de levana determinada medindo-se a quantidade total de frutose, que é precipitável com etanol 75 %, pela metodologia do DNS (MILLER, 1959). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.3.4- Determinação de açúcar.

O açúcar redutor (AR) e o açúcar redutor total (ART), foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico-DNS, após separação das células por centrifugação. Na determinação de ART, uma alíquota do sobrenadante foi hidrolisada com HCl 1,0 N, aquecida em banho de água em ebulição, por 15 minutos, resfriada e neutralizada com NaOH 1,0 N (PEARSON, 1976). Uma alíquota deste hidrolisado foi utilizada para determinação do ART pelo método de DNS. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.3.5-Análises de íons.

As determinações das concentrações dos íons foram realizadas no melaço após os tratamentos descritos no item 3.2.3.1, e esterilização. O material foi mineralizado por via seca (ITAL, 1987). Os íons cálcio, potássio, sódio e magnésio foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (espectrofotômetro Perkin Elmer 5000). O fósforo foi determinado pelo método de vanadomolibdato (AOAC, 1980), e o cloreto pelo método de Mohr (WINTON & WINTON, 1958). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.4- CÁLCULOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.

3.4.1- Cálculos cinéticos para o processo descontínuo.

Os parâmetros cinéticos foram calculados na fase exponencial de crescimento de acordo com PIRT (1975). A taxa específica de crescimento foi calculada a partir do gráfico semilogarítmico de X vs t. Os cálculos da taxa específica de produção de etanol (qp) e taxa específica de consumo de substrato (qs) foram realizados através de um programa computacional desenvolvido por DIEZ & YOKOYA (1990).

-Taxa específica de crescimento

$$\mu = 1/\Delta t \ln X_2/X_1 \quad (\text{h}^{-1})$$

-Taxa específica de produção de etanol

$$q_p = 1/X \, dP/dt \quad (\text{g/g.h})$$

-Taxa específica de consumo de substrato

$$q_s = 1/X \, dS/dt \quad (\text{g/g.h})$$

Os coeficientes de conversão em etanol ($Y_{p/s}$) e massa celular ($Y_{x/s}$) foram calculados pela curva de regressão de P vs S e X vs S, respectivamente.

-Coeficiente de rendimento em etanol

$$Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S \quad (\text{g/g})$$

-Coeficiente de rendimento em massa celular

$$Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S \quad (\text{g/g})$$

O rendimento em etanol (Y) foi calculado dividindo-se o coeficiente de conversão em etanol ($Y_{p/s}$) pelo rendimento teórico.

$$Y = Y_{p/s} / 0,511 \quad (\%)$$

3.4.2- Cálculos cinéticos para o processo descontínuo alimentado.

-Rendimento

$$R = \frac{ME_{12} - ME_0}{ME_t} \times 100 \quad (\%)$$

$$\text{onde: } ME_t = 0,511 \times F \times S_0 \times \Gamma$$

-Produtividade em etanol

$$PE = \frac{ME_{10} - ME_0}{t \times V} \quad (\text{g/l.h})$$

-Taxa específica de consumo de açúcar em 10 horas

$$PS_{10} = \frac{ART_c}{t \times MX_{10}} \quad (\text{g/g.h})$$

-Taxa específica de produção de etanol em 10 horas

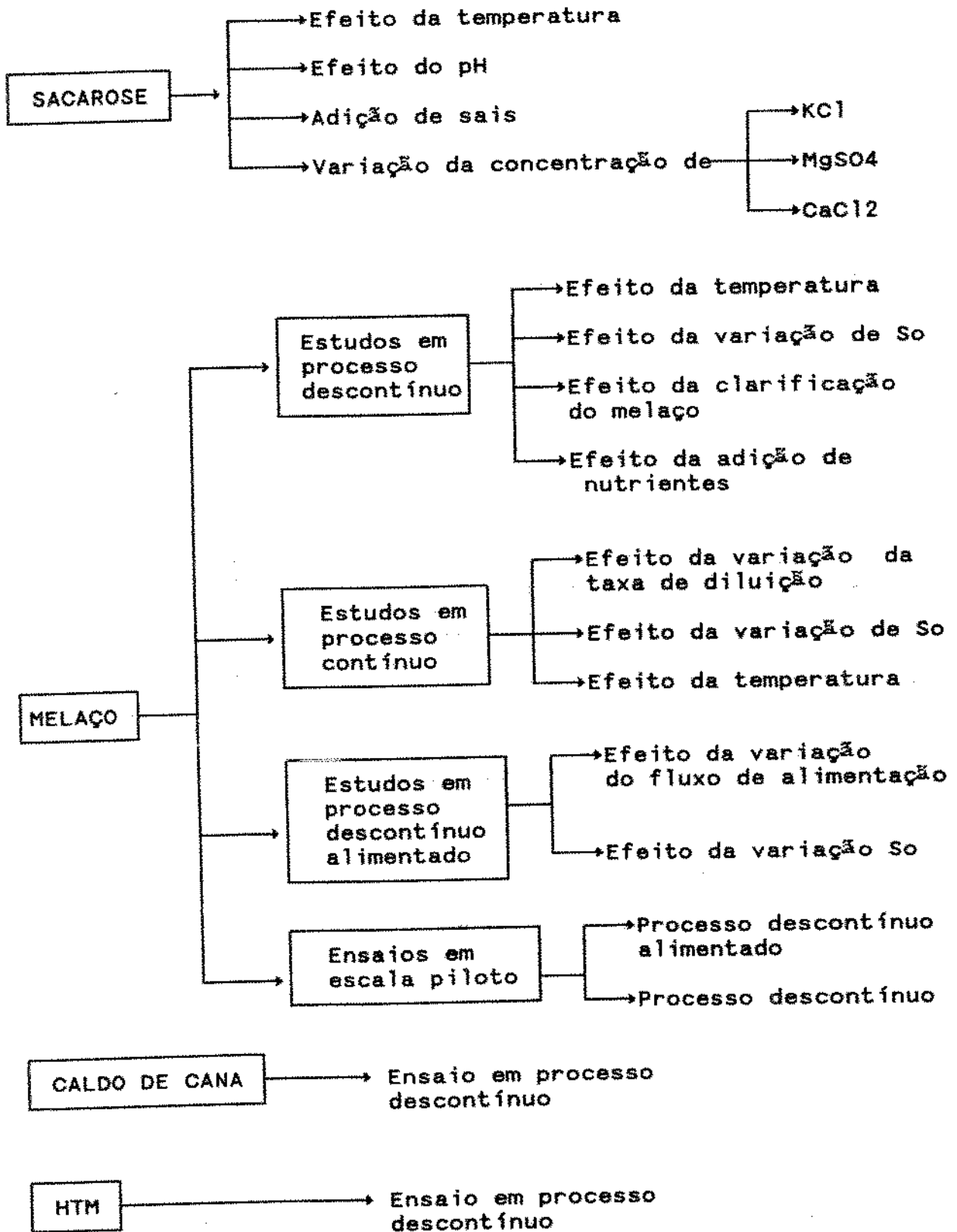
$$PE_{10} = \frac{ME_{10} - ME_0}{t \times MX_{10}} \quad (\text{g/g.h})$$

-Coeficiente de rendimento em 10 horas de fermentação

$$Y_{p/s10} = \frac{ME_{10} - ME_0}{ART_c} \quad (\text{g/g})$$

$$Y_{x/s10} = \frac{MX_{10} - MX_0}{ART_c} \quad (\text{g/g})$$

3.5- ESQUEMA DA METODOLOGIA



4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1-Efeito da temperatura e pH na formação de etanol e subprodutos durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*.

Considerando que a temperatura e o pH desempenham um papel importante no controle da fermentação, foi estudado o efeito destes fatores na formação de etanol e subprodutos durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*.

4.1.1-Efeito da variação de temperatura.

A Tabela I mostra os resultados obtidos no estudo do efeito da temperatura sobre a formação de levana, consumo de açúcar e produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP4, utilizando sacarose (100 g/l) como fonte de carbono. Esses resultados mostram que em temperatura de fermentação superior a 37 °C se reduz a taxa específica de crescimento e a produtividade do microrganismo. Além disso, temperaturas superiores a 34 °C provocam uma marcada inibição do crescimento (Figura 1) e produção de álcool (Figura 2), diminuindo drasticamente os rendimentos fermentativos. Em temperatura de 34 °C obtém-se a máxima taxa de crescimento ($0,407 \text{ h}^{-1}$) e o máximo coeficiente de rendimento Y_p/s ($0,483 \text{ g/g}$) equivalente a 94,5 % do valor teórico.

SKOTNICKI *et alii* (1981a), trabalhando com várias cepas de *Zymomonas mobilis*, verificaram que em temperatura de 37 °C a produção de etanol foi menor do que a 30 °C, apresentando concentração de etanol de 38 e 56 g/l respectivamente em meio com 200 g/l de sacarose. LYNESS & DOELLE (1980), também observaram variação na produção de etanol na faixa de 30 a 42,5 g/l, em função da variação da temperatura em meio utilizando sacarose (200g/l). Para faixa de temperatura entre 30 e 35 °C encontraram valores de etanol de 69,5 g/l para *Z. mobilis* Z7 e de 66,1 g/l para *Z. mobilis* Z10.

Em temperaturas de 30 e 37 °C os resultados obtidos em termos de rendimento foram levemente inferiores àqueles obtidos em 34 °C, mas, semelhantes àqueles reportados na literatura (LEE *et alii*, 1981a; LAUDRIN & GOMA, 1982; FIESCHKO & HUMHREY, 1983; DOELLE & GREENFIELD, 1985b) para fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. Estes autores concluíram que a maioria dos parâmetros cinéticos não foram afetados na faixa de temperatura de 30 a 36 °C, mas o rendimento em etanol decresceu de 94 para 78 % do valor teórico. Isto foi atribuído à formação de subprodutos (LEE *et alii*, 1981a) ou a aumento no coeficiente de manutenção (LAUDRIN & GOMA, 1982; FIESCHKO & HUMPHREY, 1983).

Tabela 1- Efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos de fermentação de sacarose (100 g/l) por *Zymomonas mobilis* CP4. pH inicial 5,7. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Temperatura (°C)			
	30	34	37	40
μ_{max} (h ⁻¹)	0,392	0,407	0,383	0,294
Y _{p/s} (g/g)	0,432	0,483	0,457	0,319
Y (%)	84,2	94,5	89,4	62,4
Y _{x/s} (g/g)	0,020	0,024	0,019	0,009
P (g/l.h)	2,96	3,31	3,12	2,32
AC (%)	85,1	87,0	86,1	51,8
Levana (g/l)	3,56	2,31	1,60	0,60

É interessante notar que com o aumento da temperatura de fermentação diminui a produção de levana. A levana é um polímero de frutose que se forma quando sacarose é fermentada por *Zymomonas mobilis*. Alguns autores têm atribuído a baixa produtividade da fermentação por *Zymomonas* à formação de subprodutos como levana e sorbitol (PARK *et alii*, 1983, Viikari, 1984a).

Zymomonas mobilis hidrolisa sacarose rapidamente sendo que a taxa de hidrólise depende da temperatura de fermentação (LYNESS & DOELLE, 1980), concentração de sacarose e pH (LYNESS & DOELLE, 1981). Baixas temperaturas (30 °C) conduzem a uma maior indução da levansacarase enquanto que as temperaturas elevadas e pH inicial elevado reprimem a produção de levana pela enzima (LYNESS & DOELLE, 1983).

Com o aumento da temperatura de incubação, há hidrólise da sacarose observando-se que nas primeiras 6 horas obtém-se a máxima liberação de açúcar redutor, produto da hidrólise da sacarose (Figura 3). Isto parece estar associado com a produção de levana, desde que o máximo valor de levana obtido coincide com a máxima quantidade de açúcar redutor presente no caldo fermentado, em cada temperatura em estudo (Figura 4). Apesar de que em temperaturas superiores a 37 °C quase não há formação de levana, não seria recomendável trabalhar nestas temperaturas porque os rendimentos da fermentação são baixos devido a problemas de inibição da bactéria.

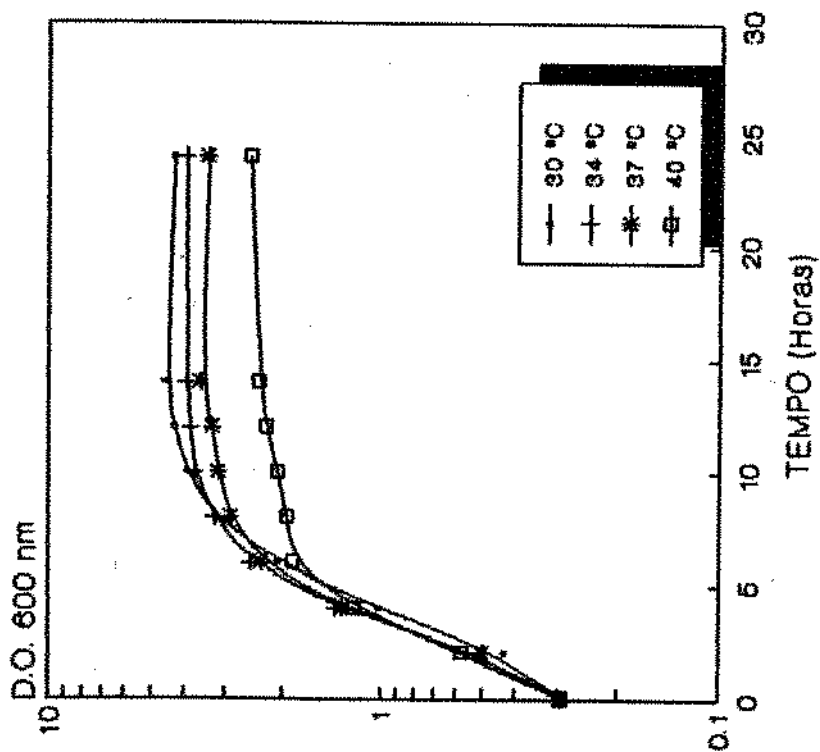


Fig.1-Efeito da variaçao de temperatura sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis* em sacarose. pH inicial 5,7.

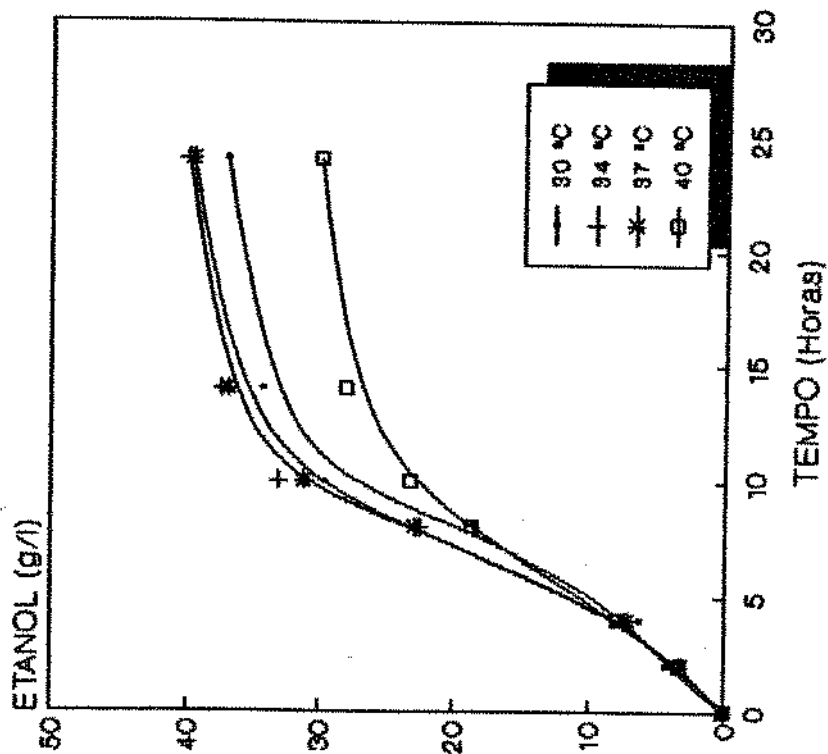


Fig.2-Efeito da variaçao de temperatura sobre o etanol produzido por *Zymomonas mobilis* em sacarose. pH inicial 5,7.

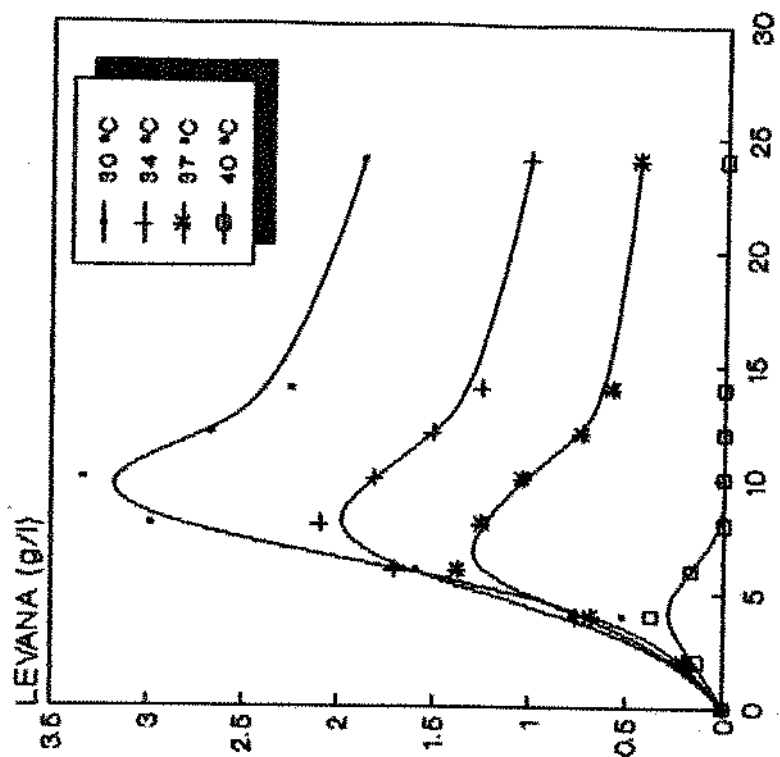


Fig.4-Efeito da variaçao de temperatura sobre a levana formada por *Zymomonas mobilis* em sacarose. pH inicial 5,7.

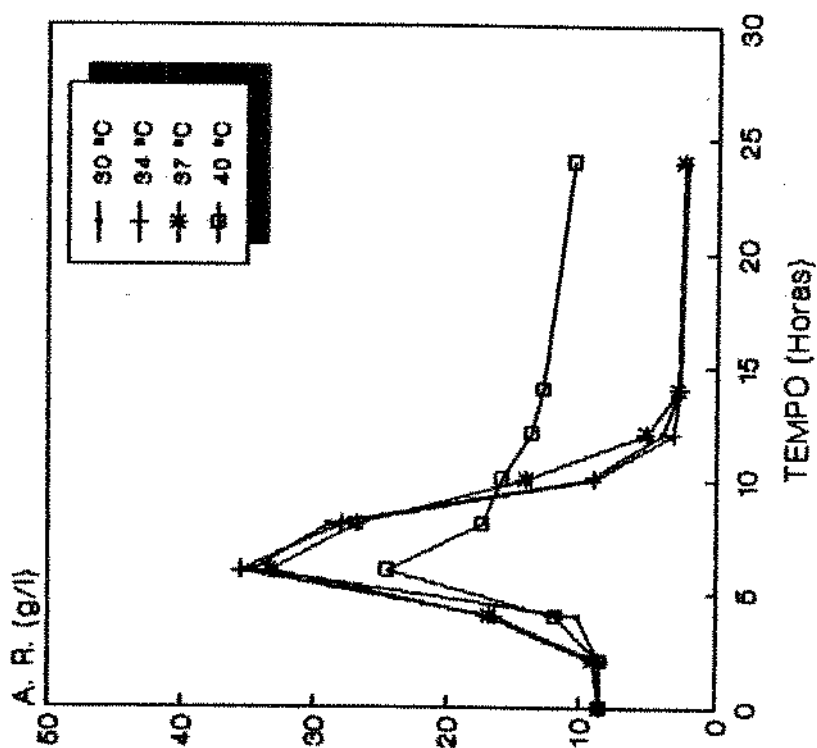


Fig.3-Efeito da variaçao de temperatura no açucar residual (AR) por *Zymomonas mobilis* em sacarose. pH inicial 5,7.

A produtividade de etanol (g/l.h) também é afetada pela variação da temperatura, apresentando valor mais alto a temperatura de 34 °C (3,31 g/l.h). A produtividade em temperatura de 37 °C é ligeiramente inferior à obtida na temperatura de 34 °C, mas, a produção de levana a 37 °C é bem menor. Resultados similares foram obtidos por FAVELA TORRES & BARATTI (1987), trabalhando com uma cepa floculenta de *Zymomonas mobilis*.

4.1.2-Efeito do controle de pH em temperaturas de 30 e 37 °C.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados sobre o efeito da temperatura (30 e 37 °C) no crescimento, açúcar consumido, produção de levana e etanol pela *Zymomonas mobilis* em fermentador de laboratório de 1 litro com e sem controle da acidez em pH 5,7. Foi utilizada sacarose (100 g/l) suplementada com nutrientes como descrito no item 3.1.4.1.

Os resultados mostram que os parâmetros cinéticos são afetados tanto pela temperatura quanto pelo controle de pH do meio de fermentação. Utilizando temperatura de 37 °C, com e sem controle de pH, a taxa específica de crescimento (μ_{max}) é maior e a quantidade de levana é menor que em temperatura de 30 °C. O crescimento celular diminui após 5 horas de fermentação no meio sem controle de pH na temperatura de 37 °C (Figura 5). Contudo, a produção de etanol foi superior na temperatura de 37 °C com e sem controle de pH (Figura 6).

Tabela 2- Parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por *Zymomonas mobilis* CP4, a 30 e 37 °C sem e com controle de pH em 5,7. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Temperatura (°C)			
	Com controle de pH		Sem controle de pH	
	30	37	30	37
μ_{max} (h ⁻¹)	0,448	0,482	0,392	0,454
Y _{p/s} (g/g)	0,475	0,477	0,441	0,447
Y (%)	93,0	93,3	86,3	87,5
Y _{x/s} (g/g)	0,034	0,034	0,030	0,033
P (g/l.h)	4,07	5,08	4,09	4,99
AC (%)	88,2	88,8	85,8	87,2
Levana (g/l)	2,86	0,06	3,77	1,53

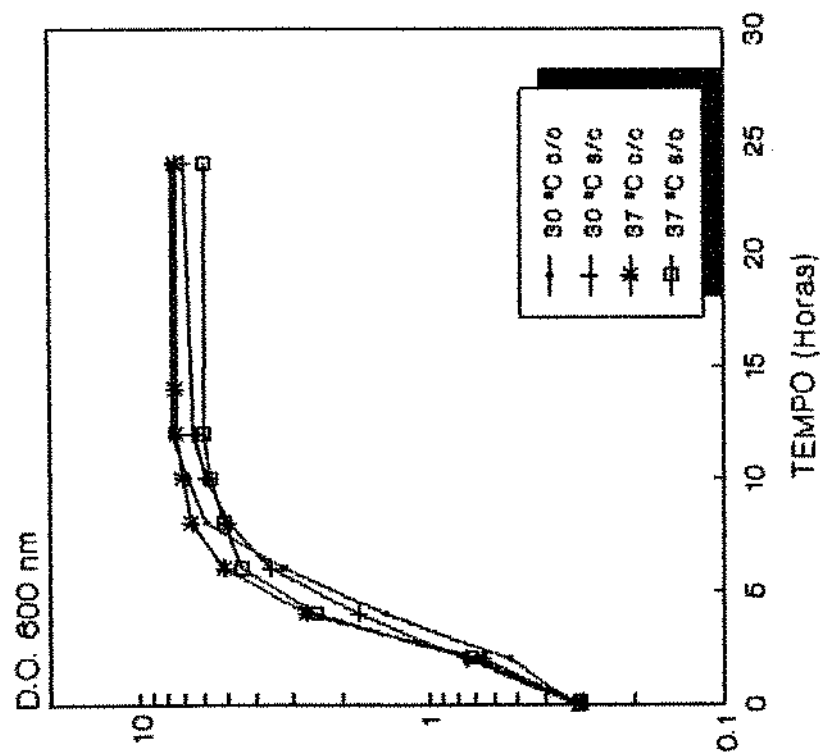


Fig.5-Efeito da variação de temperatura e controle de pH no crescimento celular de *Z. mobilis*, em sacarose 100g/l.

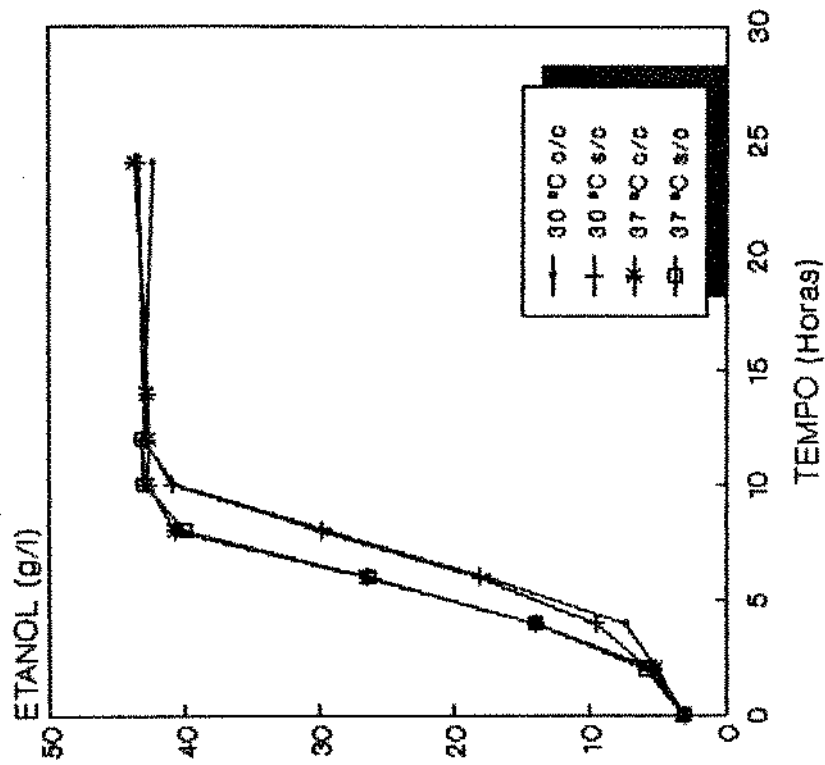


Fig.6-Efeito da variação de temperatura e controle de pH sobre o etanol produzido por *Z. mobilis*, em sacarose 100g/l.

A porcentagem de açúcar consumido (em 12 horas), o rendimento em etanol (% do valor teórico) e a produtividade foram superiores em temperatura de 37 °C, em processo com controle de pH. As quantidades de levana na temperatura de 37 °C foram inferiores às obtidas a 30 °C principalmente quando se fazia o controle de pH. O coeficiente de rendimento em etanol (Yp/s) obtido durante a fermentação com controle de pH, nas temperaturas de 30 e 37 °C, foi também elevado 0,475 e 0,477 g/g, com rendimento de 93,0 e 93,3% do valor teórico, respectivamente, o que equivale a resultados obtidos quando glicose é utilizada como fonte de carbono para fermentação (LEE *et alii*, 1979; ROGERS *et alii*, 1979). Estes resultados comprovam que a formação de subprodutos, como levana, diminuem os rendimentos fermentativos das *Zymomonas*.

As Figuras 7 e 8 mostram o açúcar redutor (AR) liberado e a levana formada durante a fermentação com e sem controle de pH a 30 e 37 °C. Observa-se que a máxima quantidade de levana formada (3,77 g/l) foi obtida a 30 °C, sem controle de pH, após 6 horas de fermentação, coincidindo com a máxima quantidade de açúcar redutor liberado pela hidrólise da sacarose. Observa-se (Figura 7) que nos ensaios com controle de pH a 30 e 37 °C o açúcar residual é menor que aquele obtido sem controle de pH nas mesmas temperaturas. A 30 °C as máximas quantidades de AR, nos ensaios sem e com controle de pH, correspondem a 50,95 e 36,89 g/l, respectivamente, representando, o controle de pH, cerca de 28% menos de AR liberado em 6 horas de fermentação. Sem e com controle de pH, a 37 °C as máximas quantidades de AR correspondem a 27,52 e 19 g/l, respectivamente, representando, o controle de pH, cerca de 30% menos de AR liberado em 6 horas de fermentação. Estes resultados confirmam que o controle de pH é um fator muito importante no controle da hidrólise da sacarose e portanto na formação de subprodutos. A variação da temperatura só influi na formação da levana, como já foi mostrado na Figura 3, sem afetar a quantidade de AR liberado exceto na temperatura de 40 °C na qual há um forte efeito inibidor do crescimento e fermentação (Figuras 1 e 2).

A Figura 9 mostra o perfil de pH durante a incubação nas temperaturas de 30 e 37 °C, nas fermentações com e sem controle de pH. Não se observam diferenças no perfil de pH nas duas temperaturas em estudo. Nas fermentações sem controle de pH, esse valor sofreu uma queda gradual atingindo o valor de 4,0 após 10 horas de incubação. Nas fermentações com controle de pH, este foi mantido em 5,7 pela adição de NaOH. Os rendimentos fermentativos foram superiores nas fermentações com controle de pH, em ambas temperaturas em estudo, contudo, a quantidade de levana formada foi superior na temperatura de 30 °C (Tabela 2). DOELLE & GREENFIELD (1985a), mostraram que o aumento na temperatura de fermentação de 30 °C para 35 °C reduziu a formação de levana e o aumento no pH inicial do meio reduziu a formação de sorbitol, em fermentação por *Zymomonas mobilis* em processo descontínuo. Os resultados aqui apresentados concordam com aqueles obtidos por aqueles autores que ressaltaram a importância

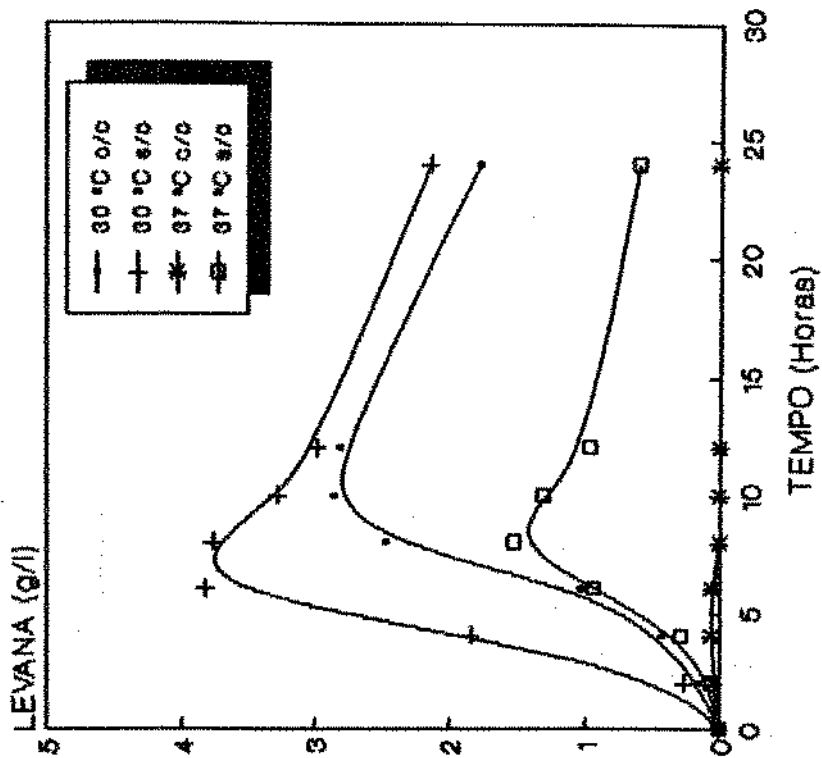


Fig.8-Efeito da variaçao de temperatura e controle de pH em 5,7 na levana formada.

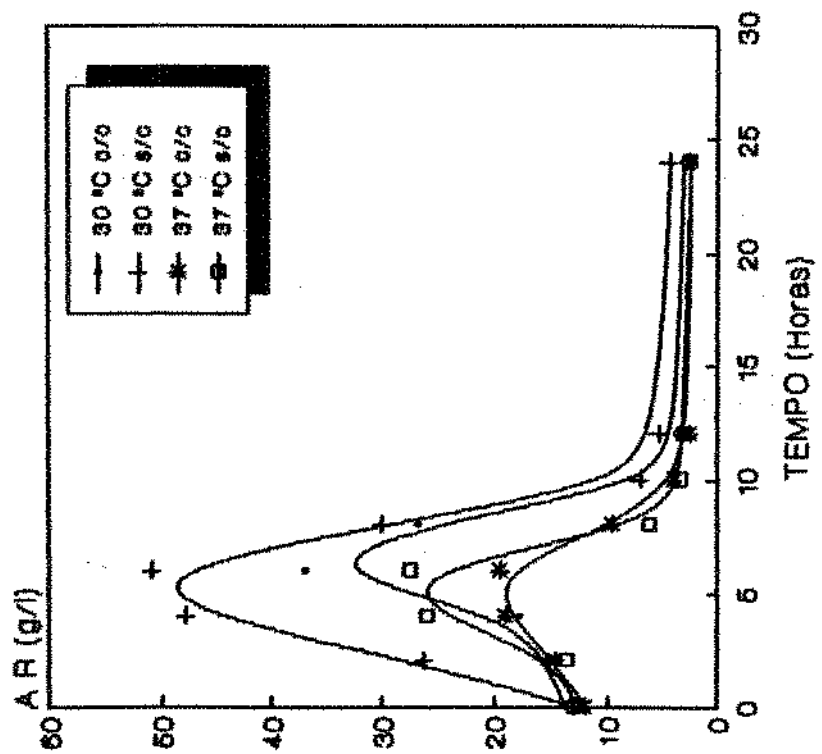


Fig.7-Efeito da variaçao de temperatura e controle de pH em 5,7 no açucar redutor residual (AR).

do controle dos parâmetros de fermentação (pH e temperatura) para controlar a formação dos subprodutos e desta maneira aumentar o rendimento alcoólico.

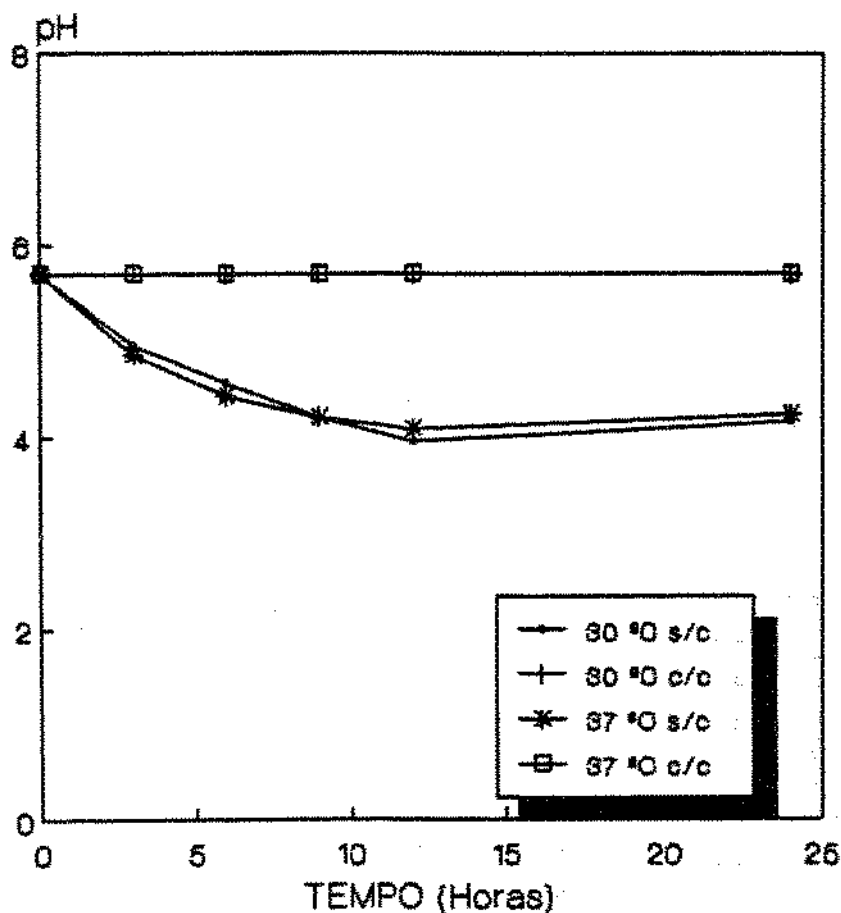


Fig.9-Perfil de pH durante a fermentação de sacarose, sem e com controle de pH a 30 °C e 37 °C.

4.2-Fermentação de melão de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis*.

O melão, tem a vantagem de ser uma matéria-prima de baixo custo e disponível em grandes quantidades no Brasil. Contudo, alguns de seus componentes podem causar inibição do crescimento e da fermentação por *Zymomonas*. Os níveis relativamente elevados de alguns sais inorgânicos, especialmente cloreto de potássio, e alguns íons como cálcio e magnésio podem apresentar um significativo efeito inibidor da fermentação (SKOTNICKI *et alii*, 1981b; OURA, 1983; RHEE *et alii*, 1984). Os melões apresentam grande variedade na sua composição química (ALMEIDA, 1966; OLBRICH, 1974), portanto é difícil poder determinar qual ou quais componentes provocam inibição da fermentação.

4.2.1-Tratamentos de clarificação de melaço.

A Tabela 3 mostra os resultados dos análises de ions efetuadas no melaço após os tratamentos de clarificação e esterilização, como descrito no item 3.2.3.1. O meio 1, que foi preparado unicamente fervendo-se o melaço diluído por 10 minutos, foi considerado como controle para ver o efeito de remoção dos ions. A análise da Tabela 3 mostra que o cálcio é removido em aproximadamente 40 % em todos os tratamentos; o sódio e o fósforo aumentam sua concentração em todos aqueles tratamentos que utilizam algum sal que contenha estes ions na sua composição; o potássio é removido em aproximadamente 34 % em todos os tratamentos; mas magnésio e cloreto praticamente não são removidos com os tratamentos utilizados. Para o tratamento 5 não foram feitas as análises dos ions.

Tabela 3- Concentração de ions do melaço após os respectivos tratamentos de clarificação (descritos no item 3.2.3.1) e esterilização.

Tratamentos	Ca ⁺⁺ ppm	Na ⁺ ppm	K ⁺ ppm	Mg ⁺⁺ ppm	P ppm	Cl ⁻ %
1	2894	88,5	7795	925	100,0	0,46
2	1783	418,0	5440	813	309,0	0,39
3	1850	423,0	5271	815	238,6	0,44
4	1786	107,2	5327	793	101,2	1,68

A Tabela 4 mostra os resultados da taxa específica de crescimento e etanol produzido (em 24 horas de fermentação) quando o melaço, preparado de acordo com os tratamentos descritos no item 3.2.3.1, é utilizado para fermentação pela bactéria *Zymomonas mobilis* CP4. A taxa específica de crescimento diminui notoriamente quando são utilizados os tratamentos 4 e 5. Durante a fermentação utilizando os tratamentos 4 e 5, a produção de etanol é menor que nos outros tratamentos em estudo. No meio 4 o íon Cl⁻ está na concentração 4 vezes maior que os demais o que poderia ser responsável por esse resultado. O íon Na⁺ do meio 4 que se encontra quatro vezes inferior em relação ao meio 2 e 3 pode também ser responsável por esse resultado porque o meio 1 também apresenta pouco sódio e a produção de etanol foi menor em comparação com os meios 2 e 3 (Tabela 3). Os tratamentos 1, 2 e 3 não afetam nem a taxa específica de crescimento e nem a produção de etanol. Contudo, estes resultados são inferiores àqueles reportados quando a *Zymomonas* fermenta glicose (LEE *et alii*, 1979; CROMIE &

DOELLE, 1980,1981), frutose (NELLAIAH *et alii*, 1988) ou mesmo sacarose (LYNESS & DOELLE, 1980, 1981; DOELLE & GREENFIELD, 1985a,b).

Tabela 4- Taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}) e etanol produzido (E) em 24 horas de fermentação, em relação aos tratamentos de clarificação efetuados no melaço. Temperatura de 30 °C e pH inicial 5,7.

Parâmetros	Tratamentos				
	1	2	3	4	5
μ_{max} (h^{-1})	0,253	0,269	0,260	0,140	0,157
E (g/l)	29,52	30,51	34,59	26,4	28,64

Pouca informação existe na literatura em relação a produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, utilizando melaço. VAN VUUREN & MEYER (1982), utilizaram diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* e as comparou com *S. cerevisiae* quanto a produção de etanol utilizando melaço de cana-de-açúcar em sistema descontínuo de fermentação. Segundo esses autores, a habilidade de *Zymomonas* produzir etanol de melaço varia de cepa para cepa. Em baixa concentração de açúcar (5% p/v), *Zymomonas* compara-se favoravelmente com *S. cerevisiae*, ao passo que em altas concentrações de açúcar (maior a 5 % p/v) *S. cerevisiae* produziu consideravelmente mais etanol que *Zymomonas*. A baixa eficiência obtida por *Zymomonas* deve-se segundo estes autores, provavelmente, à presença no melaço de certos compostos inibidores do crescimento e da produção de etanol.

O efeito inibidor do melaço sobre *Zymomonas* foi atribuído por SKOTNICKI *et alii* (1981b) aos níveis relativamente altos de potássio e magnésio. ROGERS *et alii* (1982), relataram, também, inibição significativa do crescimento e da produção de etanol em *Zymomonas* ZM4, em razão, provavelmente, das altas concentrações de potássio, magnésio e cloreto no melaço. Estes autores solucionaram parcialmente o problema, passando o melaço através de uma membrana seletiva de íons e da seleção de um mutante, ZM4 82, tolerante a sais.

Além destes íons, outros componentes do melaço como fenol, indol, nitratos, clorofenolatos, ácidos alifáticos e aromáticos, etc. podem ser responsáveis pela inibição da fermentação (OURA, 1983; RHEE *et alii*, 1984). Segundo OURA (1983), melaço de baixa

qualidade pode provocar problemas durante a fermentação por leveduras. Substâncias coloidais e material em suspensão, material colorido, ácido sulfuroso e nitritos e nitratos, dentre outros compostos, são também prejudiciais à fermentação por leveduras.

É importante destacar que a literatura tem mencionado que o melaço é uma matéria-prima difícil de fermentar a nível industrial, devido principalmente a infecções primárias ou secundárias nos mostos, composição química anormal como presença de ácidos graxos voláteis, quantidades excessivas de caramelo e quantidade excessiva de rafinose, dentre outras (OLBRICH, 1974). Por outro lado, além de sacarose e de açúcar invertido o melaço contém carboidratos não fermentáveis. Estima-se que estes compostos são formados pela reação entre compostos reativos ácidos e alcalinos durante a clarificação e tratamentos subsequentes da fabricação de açúcar, mas, não se encontram originalmente no caldo de cana (OLBRICH, 1974).

4.3-Estudo do efeito da adição de alguns íons ao meio com sacarose.

Os resultados do estudo anterior mostraram que os rendimentos obtidos na fermentação com melaço de cana-de-açúcar, em todos os tratamentos foram inferiores àqueles reportados na literatura para substratos como glicose e sacarose. Os tratamentos de clarificação não foram suficientes para remover alguns íons, especialmente cloreto, magnésio e potássio os quais podem causar inibição do crescimento e da fermentação por *Zymomonas* (SKOTNICKI *et alii*, 1981b; VAN VUUREN & MEYER, 1982; RHEE *et alii*, 1984). Para verificar esta hipótese e determinar qual ou quais íons e em qual concentração poderiam inibir a fermentação, foram realizados experimentos utilizando sacarose em vez de melaço para evitar que a presença de diversos componentes deste subproduto pudessem interferir nos resultados.

4.3.1-Efeito da adição de sais ao meio de fermentação.

De acordo com o resultado das análises de íons mostrado na Tabela 3 foram preparados meios de fermentação adicionando-se, ao meio controle, sais que contém os íons em estudo (K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{++} e Mg^{++}) numa concentração similar aquela encontrada no melaço. O meio controle foi preparado com sacarose 100 g/l, KH_2PO_4 1,0 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g/l e extrato de levedura 10 g/l.

A Tabela 5 mostra os resultados da taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}), coeficiente de rendimento em etanol (Y_p/s), rendimento em porcentagem do valor teórico (Y), coeficiente de rendimento em massa celular (Y_x/s) e produtividade em etanol (P) durante a fermentação da sacarose (100 g/l), em função dos sais adicionados ao meio de fermentação.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, observa-se que o meio preparado com Mg^{++} apresentou resultados similares àqueles obtidos no meio controle, mostrando que não há efeito inibidor por este íon. Os sais adicionados ao meio de fermentação que continham K^+ , Cl^- e Ca^{++} afetaram os parâmetros cinéticos de fermentação diminuindo os valores de μ_{max} , Y_p/s , Y_x/s e $Y\%$. Os sais que continham Na^+ só afetaram o rendimento em etanol (Y_p/s) sem afetar o crescimento da bactéria. RHEE *et alii* (1984), BAJPAI & MARGARITIS (1984) e SWINGS & DELEY (1977) mostraram inibição de *Zymomonas* por potássio, cálcio e cloreto, respectivamente.

As Figuras 10 e 11 mostram as curvas de crescimento e produção de etanol da bactéria em relação aos sais adicionados. Observa-se inibição do crescimento e da produção de etanol nos meios que continham potássio, cálcio e cloreto. Nos meios que continham sódio e magnésio as curvas de crescimento e produção de etanol são similares as obtidas no meio controle.

Tabela 5- Parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por *Zymomonas mobilis* CP4 em função dos sais (g/l) adicionados. Temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetros	Controle	KCl 10	K ₂ SO ₄ 12,5	NaCl 0,5	NaH ₂ PO ₄ 0,5	NaCl 5,0	CaCl ₂ 5,0	MgSO ₄ 5,0
μ_{max}	0,438	0,397	0,421	0,459	0,441	0,389	0,344	0,406
Y_p/s	0,460	0,381	0,403	0,405	0,399	0,383	0,355	0,463
$Y\%$	90,0	74,5	78,8	79,2	78,1	74,9	69,5	90,6
Y_x/s	0,023	0,016	0,020	0,024	0,024	0,018	0,016	0,024
P	4,34	3,65	4,23	4,58	4,24	3,87	3,25	4,17
qp	4,79	6,80	6,70	5,16	5,54	5,38	4,94	4,84
qs	11,88	16,85	16,05	13,17	15,54	12,0	14,26	12,76
AC	86,81	85,36	82,27	85,36	86,11	86,11	84,99	87,47

As Figuras 12 e 13 mostram o açúcar redutor liberado e a levana formada durante a fermentação em função dos sais adicionados ao meio de fermentação. Observa-se que naqueles meios que contem potássio, cálcio e cloreto forma-se a maior quantidade de levana (3,91, 4,025 e 3,15 g/l, respectivamente), obtendo-se com estes meios os menores rendimentos fermentativos

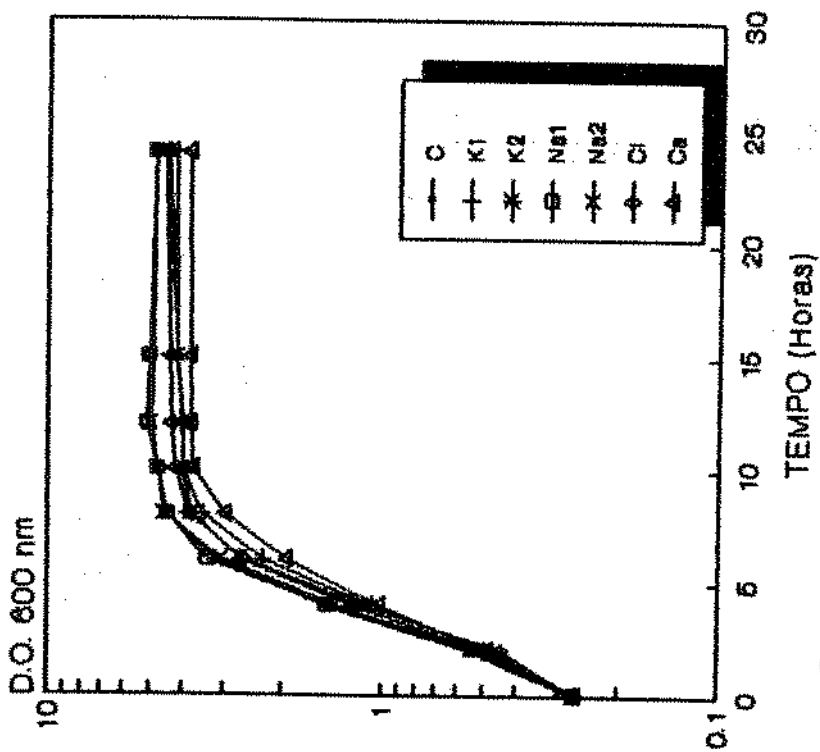


Fig.10-Efeito da adição de sais ao meio de fermentação sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis*: 34°C e pH inicial 5,7.

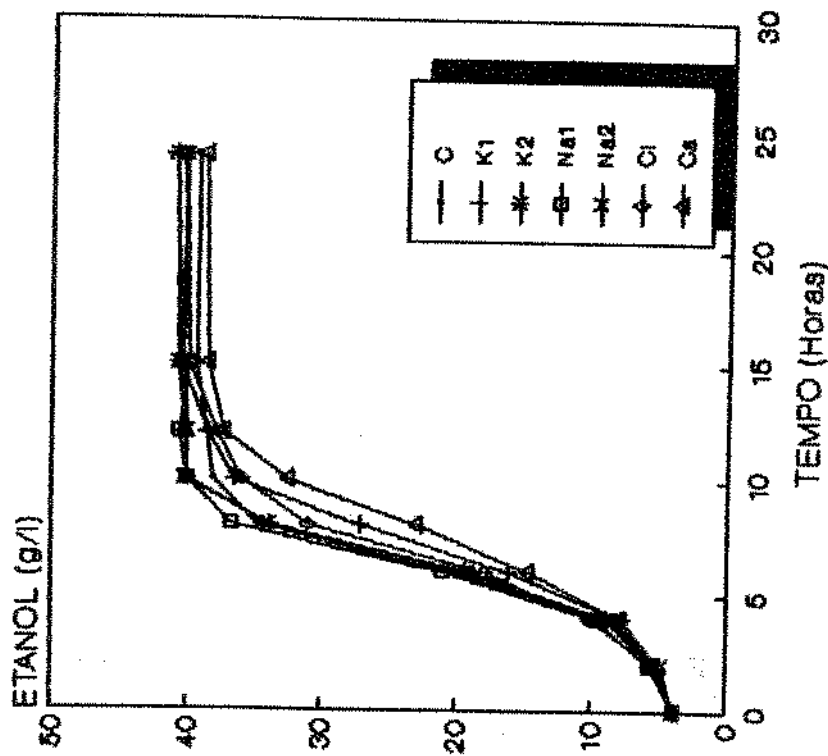


Fig.11-Efeito da adição de sais ao meio de fermentação sobre a produção de etanol. 34 °C e pH inicial 5,7.

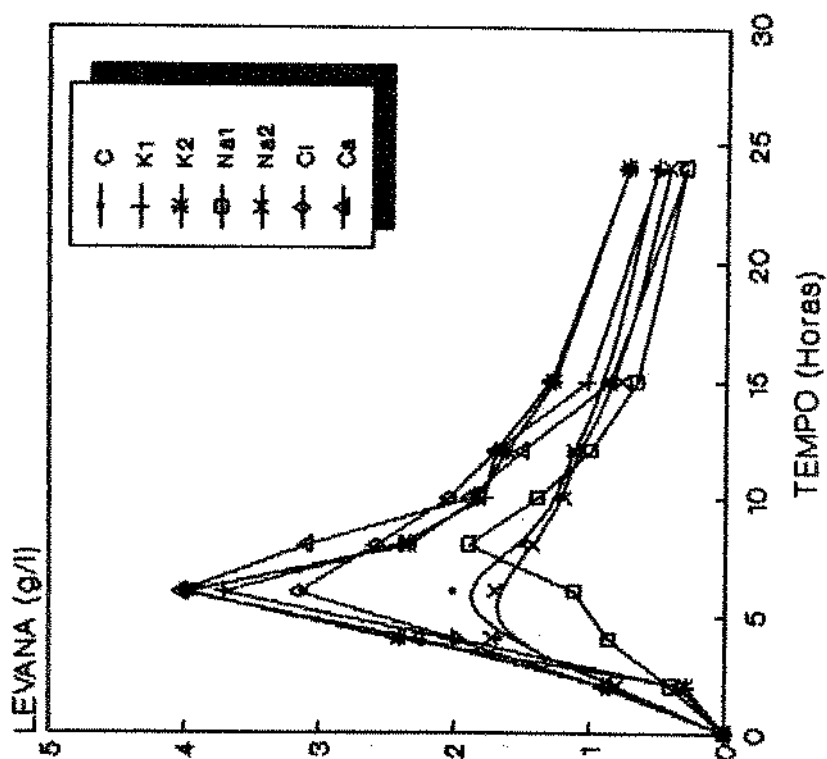


Fig.13- Efeito da adiçao de sais ao meio de fermentaçao na levana formada. 34 °C e pH inicial 5,7.

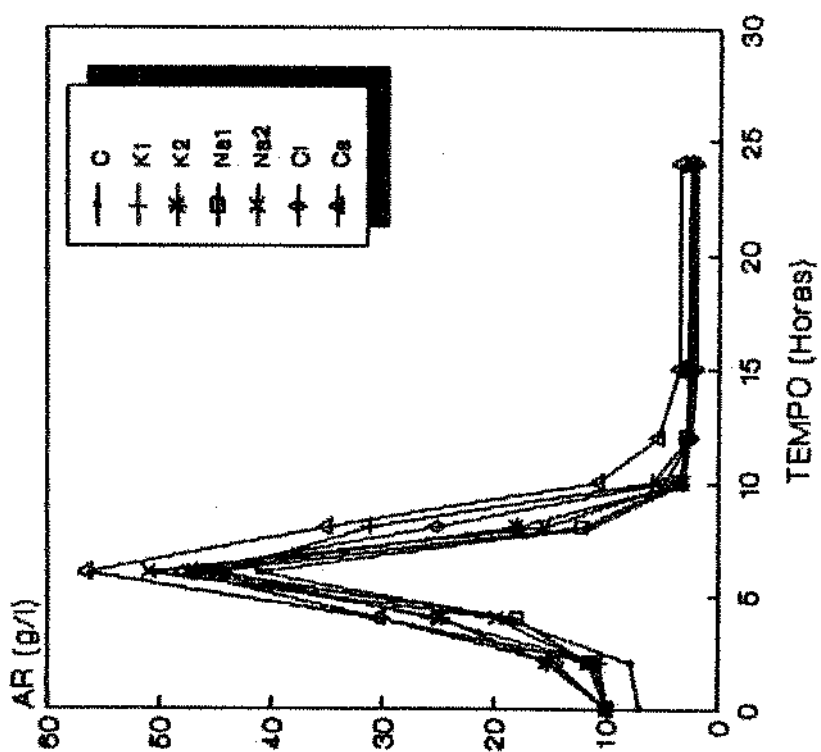


Fig.12- Efeito da adiçao de sais ao meio de fermentaçao no açucar redutor residual (AR). 34 °C e pH inicial 5,7.

(Tabela 5). Entretanto nos meios que contem sódio e magnésio a quantidade de levana formada é similar àquela obtida com o meio controle (1,499 g/l). A máxima quantidade de levana formada em cada meio em estudo coincide novamente com a máxima quantidade de açúcar redutor liberado pela hidrólise da sacarose (Figura 12).

4.3.2.-Efeito da variação da concentração de Potássio.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados do efeito da variação da concentração de KCl nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l), à temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7. O meio controle foi preparado da mesma forma que no ensaio anterior.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, observa-se que com o aumento da concentração de KCl diminuíram a taxa específica de crescimento (μ_{max}), a produtividade (P), os coeficientes de rendimento em etanol ($Y_{p/s}$) e massa celular ($Y_{x/s}$). Estes resultados claramente indicam que o KCl em concentrações superiores a 0,5 g/l é inibidor do crescimento e da fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4 (Figuras 14 e 15). Resultados similares foram reportados por RHEE *et alii* (1984) em trabalho realizado com *Zymomonas mobilis* ZM4 utilizando meio com glicose, 250 g/l.

Tabela 6- Efeito da variação da concentração de KCl (g/l) nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por *Zymomonas mobilis* CP4. Temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetros	Concentração de KCl (g/l)				
	Controle	5	10	12,5	17,5
μ_{max} (h ⁻¹)	0,440	0,409	0,396	0,332	0,239
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,461	0,430	0,385	0,377	0,360
Y (%)	90,2	84,1	77,3	73,9	70,5
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,023	0,017	0,016	0,011	0,007
P (g/l.h)	4,01	3,5	3,4	2,89	2,1
qp (g/g.h)	4,79	6,19	6,80	6,90	NC
qs (g/g.h)	11,80	15,33	16,85	9,88	NC
AC (%)	84,57	84,37	82,27	62,23	48,61

NC = Não calculado.

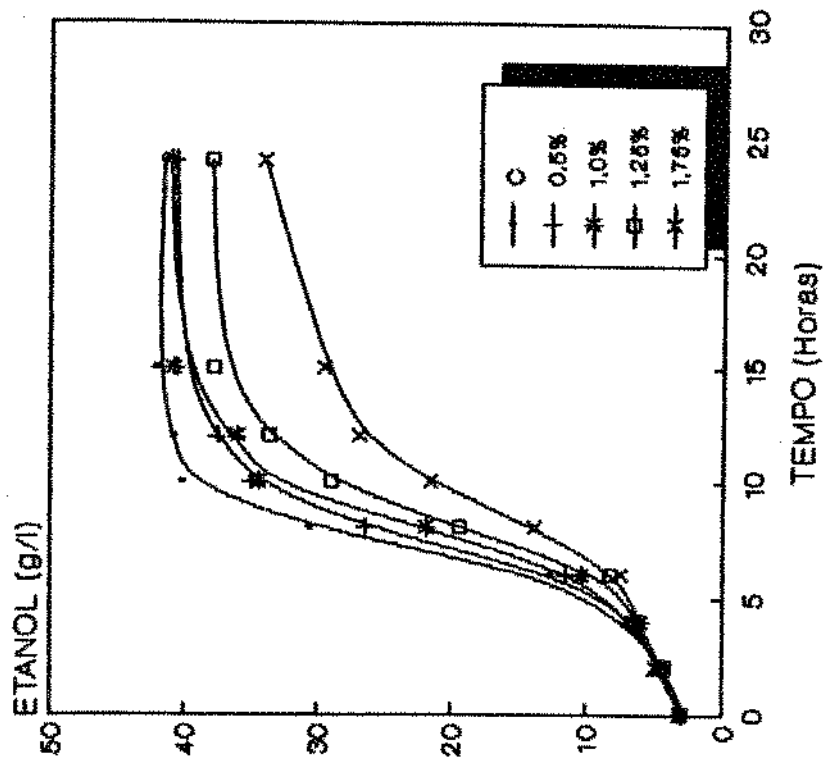


Fig.15-Efeito da adiçao de KCl ao meio de fermentaçao sobre a produçao de etanol. 34 °C e pH inicial 5,7.

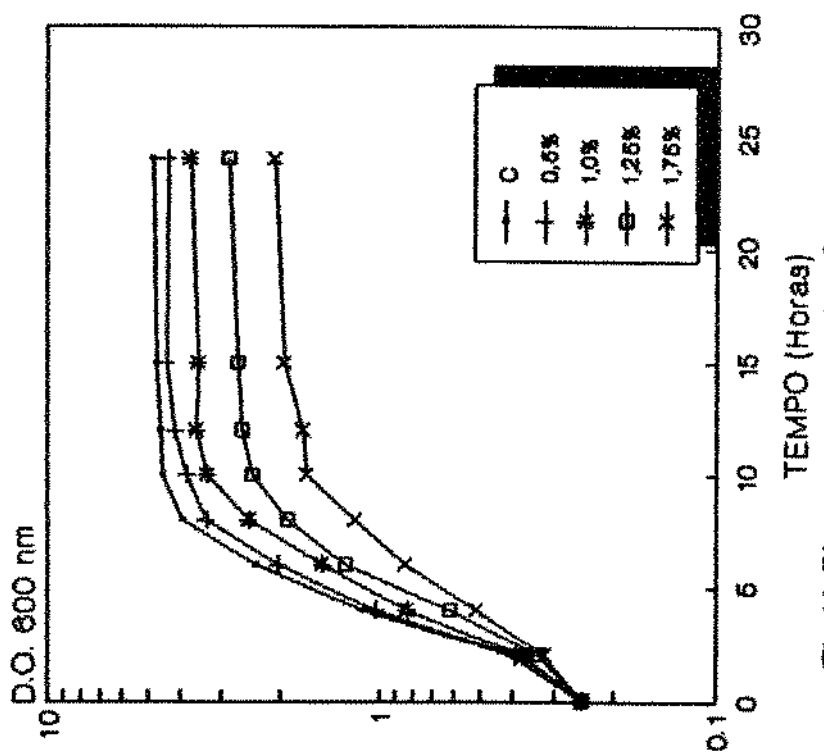


Fig.14-Efeito da adiçao de KCl ao meio de fermentaçao sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis*. 34 °C e pH inicial 5,7.

As Figuras 16 e 17 mostram os resultados do açúcar redutor liberado e a levana formada em função da variação na concentração de KCl. Observa-se que a quantidade de levana formada aumenta com o aumento da concentração de KCl até a concentração de 10 g/l acompanhando as curvas de açúcar redutor liberado. Em concentrações superiores a levana formada é menor devido provavelmente a redução da hidrólise da sacarose e inibição do crescimento e fermentação, havendo portanto menor concentração de açúcar redutor no meio. A porcentagem de açúcar consumido também diminui com o aumento da concentração do KCl (Tabela 6).

4.3.3-Efeito da variação da concentração de Cálcio.

A Tabela 7 mostra os resultados do efeito da variação da concentração de CaCl_2 nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) à temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7. Com o aumento da concentração de CaCl_2 além de 2,5 g/l diminuem os rendimentos fermentativos e a produtividade. A taxa específica de crescimento diminui de $0,438 \text{ h}^{-1}$ no meio controle para $0,183 \text{ h}^{-1}$ no meio preparado com 10 g/l de CaCl_2 ; o coeficiente de rendimento em massa celular ($Y_{x/s}$) diminui de $0,023 \text{ g/g}$ no meio controle para $0,009 \text{ g/g}$ no meio com 10 g/l de CaCl_2 . Estes resultados claramente indicam que o CaCl em concentrações superiores a 2,5 g/l inibe a fermentação por *Zymomonas*.

Tabela 7- Efeito da variação da concentração de CaCl_2 nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por *Zymomonas mobilis* CP4. Temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetros	Concentração de CaCl_2 (g/l)				
	Controle	1	2,5	5	10
μ_{max} (h^{-1})	0,438	0,441	0,445	0,344	0,183
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,460	0,408	0,407	0,355	0,305
Y (%)	90,0	79,8	79,7	69,4	59,7
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,023	0,022	0,022	0,016	0,009
P (g/l.h)	4,34	4,28	4,49	3,25	1,45
q_p (g/g.h)	4,79	5,41	5,74	4,94	5,76
q_s (g/g.h)	11,88	12,87	13,96	14,26	8,70
AC (%)	86,81	85,86	84,72	82,65	25,11

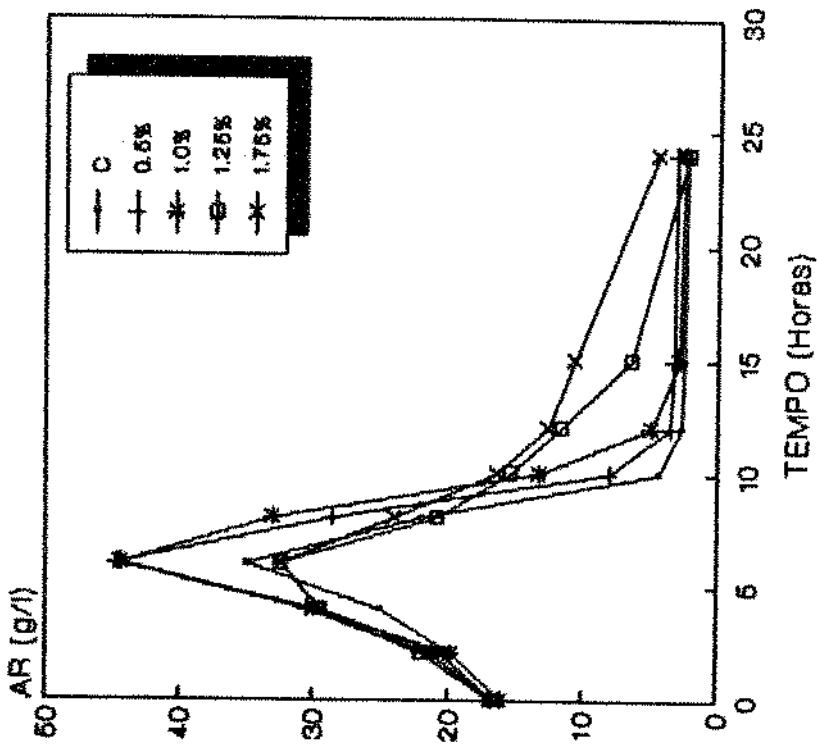


Fig.16-Efeito da concentração de KCl no açúcar redutor residual (AR). 34 °C e pH inicial 5,7.

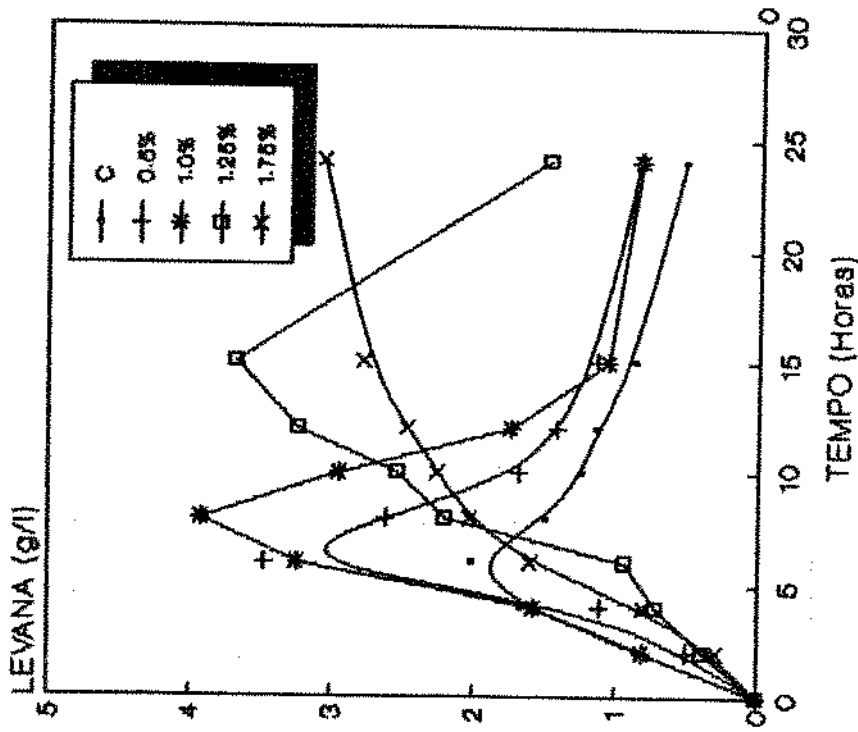


Fig.17- Efeito da concentração de KCl na levana formada. 34°C e pH inicial 6,7.

A massa celular e o conteúdo de álcool diminuem com o aumento da concentração de CaCl_2 (Figura 18 e 19), contrastando-se com resultado apresentado por BAIJAI & MARGARITIS. (1984), em um estudo realizado com glicose utilizando *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. Esses autores verificaram que a massa celular aumentava com o aumento na concentração de CaCl_2 , obtendo 3,64 g/l de massa celular no meio com 4 g/l de CaCl_2 .

As Figuras 20 e 21 mostram os resultados de açúcar redutor liberado e levana formada em função da variação da concentração de CaCl_2 . A quantidade de levana formada aumenta com o aumento da concentração do CaCl_2 até 5 g/l acompanhando as curvas de açúcar redutor liberado. Na concentração de 10 g/l de CaCl_2 a levana continua-se formando devido a concentração de açúcar redutor liberado permanecer constante após 6 horas de fermentação. A porcentagem de açúcar consumido nesta concentração de CaCl_2 é baixa permanecendo em 25,11 g/l em 12 horas de fermentação (Tabela 7).

4.3.4.-Efeito da variação da concentração de Magnésio.

A Tabela 8 mostra os resultados do efeito da variação da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) à temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7. A concentração de Mg na forma de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, na faixa de 5 a 25 g/l, não afeta o crescimento, a produtividade, os rendimentos em etanol e massa celular. Estes resultados são contrários aos reportados na literatura que mostram que o magnésio pode ter um efeito inibidor da fermentação por *Zymomonas* (SKOTNICKI *et alii*, 1981b).

Em relação ao crescimento celular e produção de etanol (Figuras 22 e 23), não se observam diferenças nas curvas de crescimento em nenhuma das concentrações de magnésio em estudo. O açúcar redutor liberado foi similar àquele obtido no meio controle (Figura 24). Quanto à levana, o aumento na concentração de magnésio não aumentou a quantidade de levana formada (Figura 25), obtendo-se a máxima quantidade de levana na faixa de 2,6 a 2,5 g/l, quantidade inferior àquela obtida com o meio controle (2,989 g/l)

O efeito do $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi também estudado em concentrações menores (0,5-3 g/l) e em temperaturas de 30 e 37 °C. A taxa específica máxima de crescimento em concentrações menores que 1g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ é menor que àquela do meio controle, na temperatura de 30 °C, indicando que pequenas quantidades de magnésio são necessárias para o crescimento de *Zymomonas*. Em temperaturas de 37 °C a taxa específica máxima de crescimento é semelhante àquela do meio controle (Tabela 9).

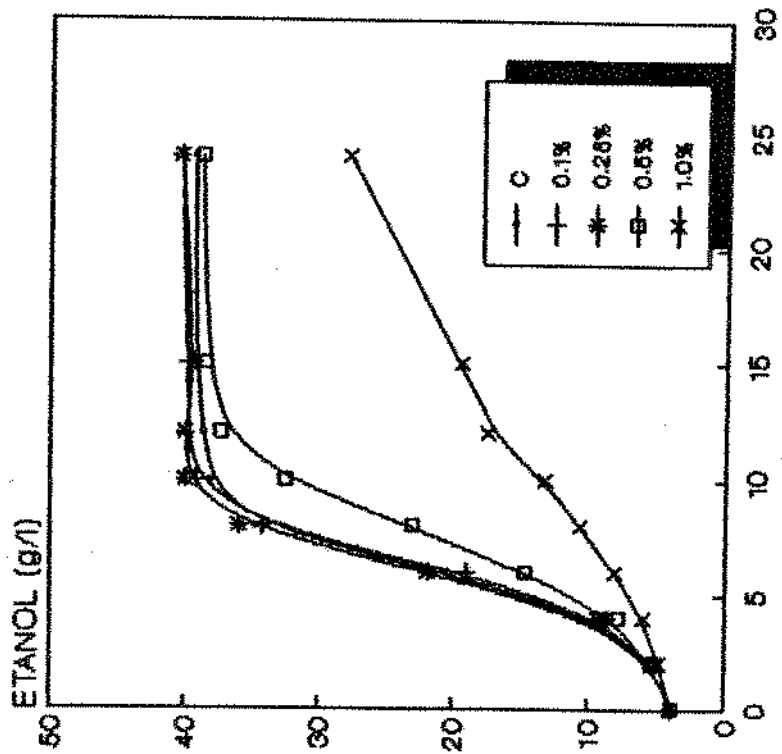


Fig.19-Efeito da adição de CaCl₂ ao meio de fermentação sobre a produção de etanol. 34 °C e pH inicial 5,7.

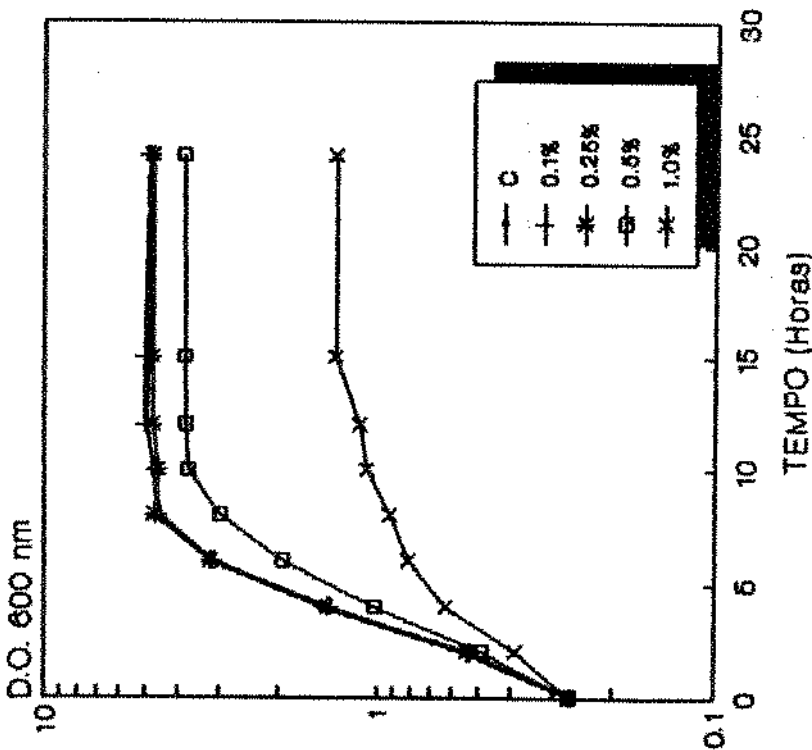


Fig.18-Efeito da adição de CaCl₂ ao meio de fermentação sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis*. 34°C e pH inicial 5,7.

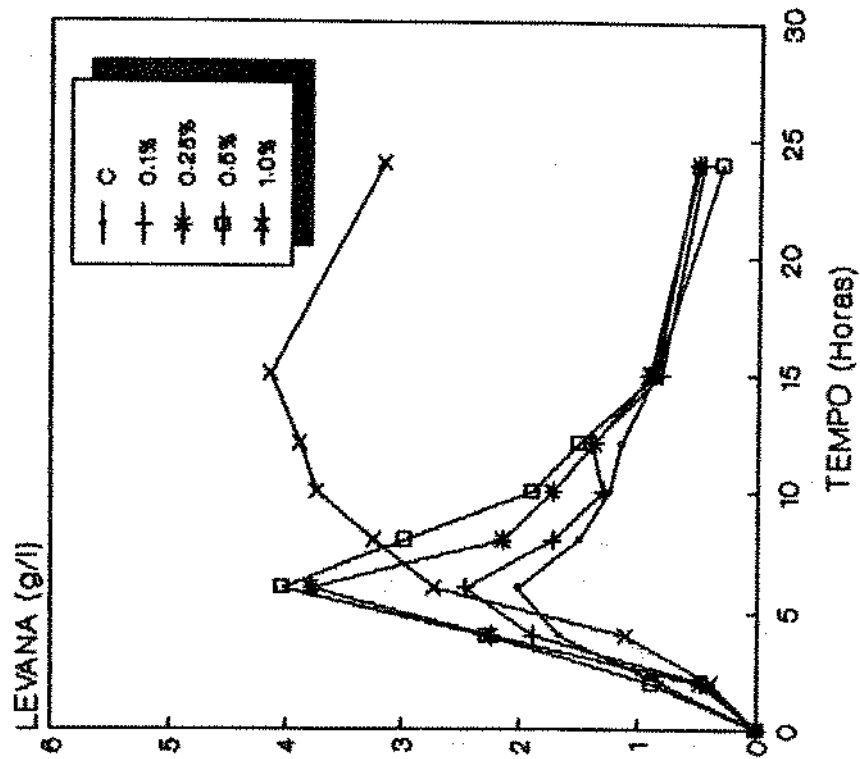


Fig.21-Efeito da concentração de CaCl_2 na levana formada. 34°C e pH inicial 5,7.

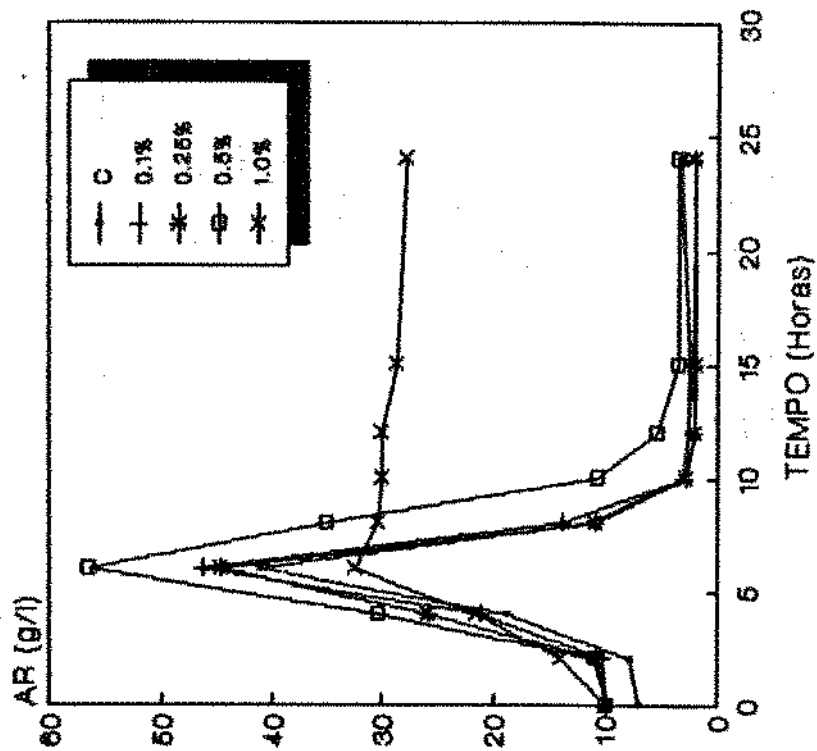


Fig.20-Efeito de concentração de CaCl_2 no açúcar redutor residual (AR). 34°C e pH inicial 5,7.

Tabela 8- Efeito da variação da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ nos parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100 g/l) por *Zymomonas mobilis* CP4. Temperatura de 34 °C e pH inicial 5,7. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetros	Concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/l)				
	Controle	5	10	15	25
μ_{max} (h^{-1})	0,404	0,406	0,404	0,398	0,387
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,460	0,463	0,463	0,461	0,462
Y (%)	90,0	90,6	90,6	90,1	90,4
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,024	0,024	0,022	0,026	0,023
P (g/l.h)	4,18	4,17	4,12	4,06	4,08
qp (g/g.h)	4,88	4,84	4,80	4,65	4,50
qs (g/g.h)	12,76	12,76	12,70	11,72	10,66

Tabela 9- Efeito da variação da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ na taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}), em temperaturas de 30 e 37 °C, durante a fermentação de sacarose (100 g/l) por *Zymomonas mobilis* CP4. pH inicial 5,7.

Temp.	Concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/l)					
	Controle	0,5	1	1,5	2	3
30 °C	0,404	0,365	0,392	0,411	ND	0,406
37 °C	0,422	0,413	0,415	0,419	0,406	0,412

ND = Não determinado.

A Figura 26 mostra a variação da concentração de levana formada em relação a variação do conteúdo de magnésio e da temperatura de fermentação. Observa-se que a medida que aumenta a concentração de magnésio, diminui levemente o conteúdo de levana, sendo este menor em temperatura de 37 °C.

Os resultados obtidos no presente estudo sobre o efeito da concentração de magnésio sobre os parâmetros cinéticos de fermentação por *Zymomonas mobilis* são contrários aos reportados por SKOTNICKI *et alii* (1981b) que indicam que o Mg pode ter um efeito

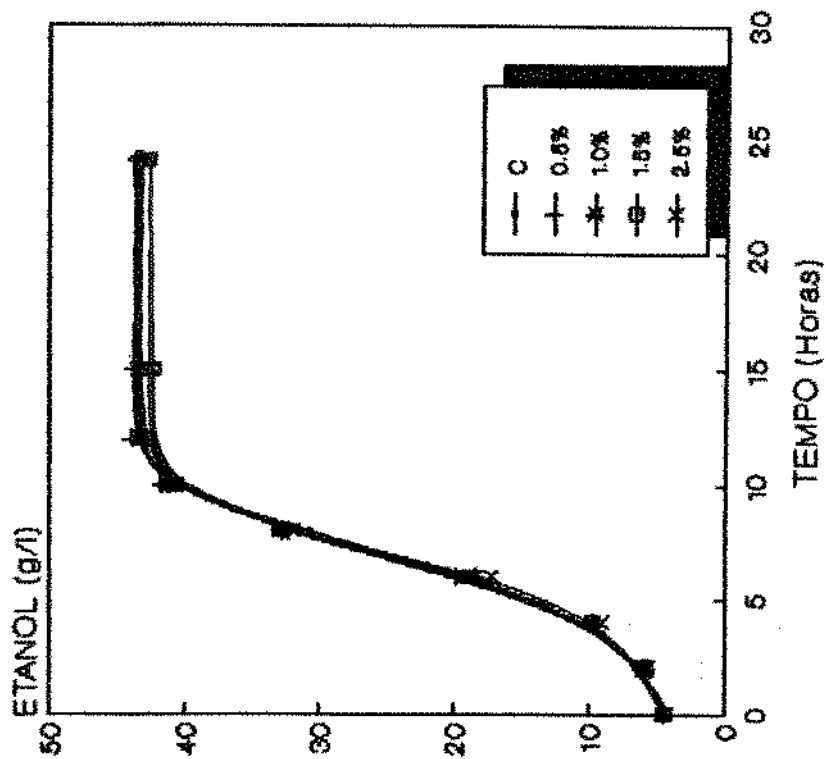


Fig.23-Efeito da adição de MgSO₄ ao meio de fermentação sobre a produção de etanol. 34 °C e pH inicial 5,7.

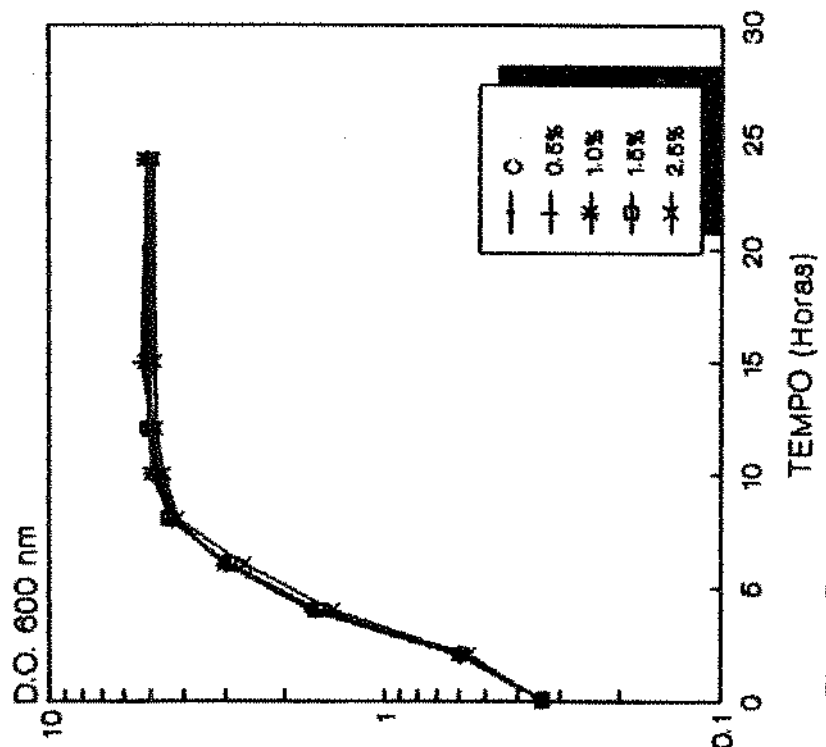


Fig.22-Efeito da adição de MgSO₄ ao meio de fermentação sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis*. 34°C e pH inicial 5,7.

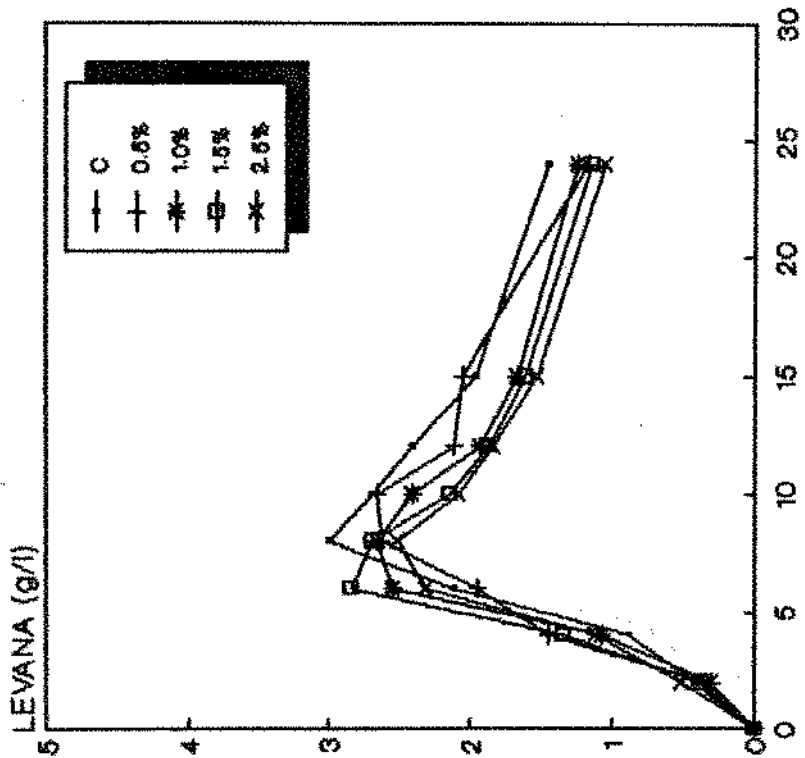


Fig.25-Efeito da concentração de MgSO4 na levana formada. 34°C e pH inicial 6,7.

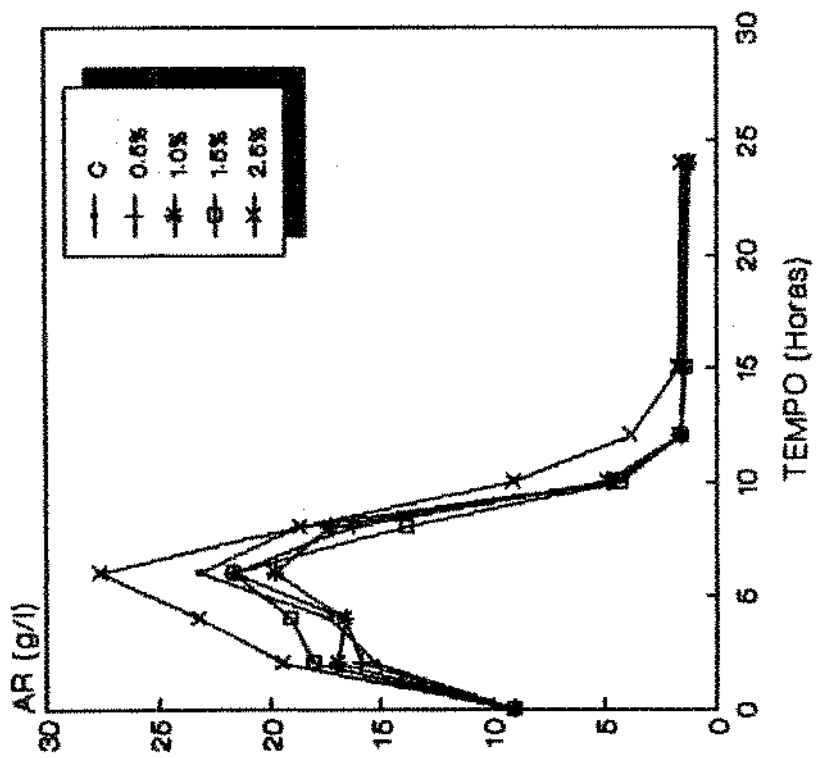


Fig.24-Efeito da concentração de MgSO4 no açúcar redutor residual (AR). 34 °C e pH inicial 5,7.

inibidor da fermentação da *Zymomonas*. ROGERS *et alii* (1982) também reportaram significativa inibição do crescimento e da produção de etanol em *Zymomonas mobilis* CP4 em razão, provavelmente, das altas concentrações de sais de potássio, magnésio e cloreto nos melaços.

A presença de magnésio é muito importante na fermentação por *Zymomonas*, desde que íons magnésio são requeridos como cofatores de várias enzimas da via Entner Doudoroff, incluindo glucoquinase, glicose 6-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase e enolase (MILLAR *et alii*, 1982; SOLS *et alii*, 1971; STOUTHAMER, 1978). Segundo DAWES & LARGE (1970) o íon magnésio tem um papel muito importante na prevenção da degradação do RNA prolongando a sobrevivência das *Zymomonas*.

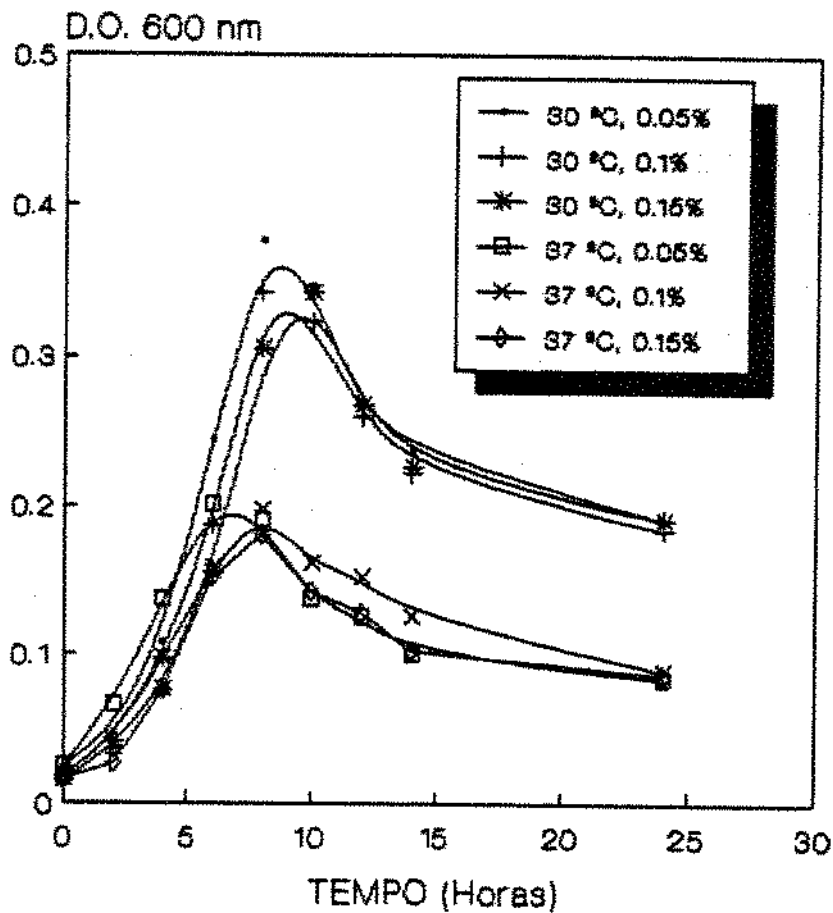


Fig. 26—Efeito da adição de $MgSO_4$ ao melo de fermentação sobre a produção de levana. 30 °C e 37 °C. pH 5,7.

Outros co-fatores que podem ser necessários na fermentação por *Zymomonas* incluem cálcio e potássio. Segundo HOPPNER & DOELLE (1983), o cálcio ativa a enzima piruvato descarboxilase em *Zymomonas*, enquanto que SOLS *et alii* (1971), reportaram que o potássio ativa a enzima piruvato quinase. Contudo, a adição destes co-fatores não reduzem a inibição da fermentação pelo etanol, segundo OSMAN & INGRAM (1985).

CROMIE & DOELLE (1980), observaram incremento na taxa específica máxima de consumo de substrato (qs) e de produção de etanol (qp) com o aumento da concentração de magnésio até a concentração de 3,0 g/l. A concentração de etanol também foi aumentada com o aumento da concentração de magnésio até 3,0 g/l diminuindo levemente quando a concentração aumentou para 4,5 g/l.

Estudos realizados por DIEZ & MANSILHA (1990), mostraram que, utilizando caldo de beterraba açucareira, a presença ou ausência de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ não afetou os rendimentos fermentativos nem apresentou efeito inibidor da *Zymomonas mobilis* CP4, uma vez que a concentração de magnésio no caldo de beterraba é superior à fornecida pela suplementação com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05% e que o fator limitante da fermentação era o extrato de levedura.

Os resultados gerais do estudo sobre clarificação de melão e efeito da concentração de íons na fermentação de *Zymomonas mobilis* CP4, mostram que, nas condições de fermentação utilizadas, os tratamentos de clarificação do melão não são suficientes para aumentar os rendimentos fermentativos. Potássio, cálcio e cloreto inibem a fermentação por *Zymomonas*, mas o magnésio não teve efeito inibidor da fermentação em nenhuma das concentrações estudadas.

4.4-Fermentação de melão em processo descontínuo.

4.4.1-Efeito da temperatura e concentração de melão.

A Tabela 10 mostra os resultados dos parâmetros cinéticos da fermentação de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de ART e em várias temperaturas. O melão utilizado foi tratado com $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (1,87 g/l), esterilizado e suplementado com nutrientes de acordo com o item 3.1.4.2. Os ensaios foram realizados sem controle de pH.

Tabela 10- Efeito da variação da concentração de So (g/l) e temperatura (°C) nos parâmetros cinéticos da fermentação de melação por *Zymomonas mobilis* CP4.

So g/l	Temp °C	μ_{max} h^{-1}	$Y_{p/s}$ g/g	Y %	$Y_{x/s}$ g/g	P g/l.h	qp g/g.h	qs g/g.h
55	30	0,375	0,424	82,9	0,021	2,16	6,66	12,04
	34	0,420	0,441	86,4	0,022	2,53	6,12	16,27
	37	0,366	0,429	83,9	0,017	2,37	4,92	12,70
	40	0,265	0,293	57,3	0,010	1,97	4,66	9,26
67	30	0,397	0,442	86,5	0,024	2,30	4,50	10,26
108	30	0,329	0,452	88,4	0,020	3,41	7,32	14,87
	34	0,393	0,461	90,2	0,024	3,70	6,29	14,92
	37	0,403	0,447	87,5	0,017	3,28	5,35	15,71
	40	0,286	0,325	63,9	0,010	2,65	4,99	13,93
125	30	0,325	0,452	88,5	0,024	2,8	6,33	16,31
145	30	0,256	0,410	80,2	0,019	3,63	5,37	15,17
	34	0,300	0,421	82,5	0,018	3,23	6,22	17,70
	37	0,329	0,419	81,9	0,013	3,72	4,06	12,04
	40	0,259	0,296	57,9	0,007	3,12	4,45	10,31
157	30	0,258	0,399	78,08	0,017	2,6	5,27	14,73
215	30	0,162	0,283	55,38	0,008	1,80	5,39	12,01

A taxa específica máxima de crescimento variou pouco até a temperatura de 37 °C caindo bruscamente na temperatura de 40 °C. Nesta temperatura, em todas as concentrações de ART o valor de μ_{max} foi menor, indicando inibição da bactéria pela elevada temperatura. Nas concentrações de 55 e 108 g/l o valor de μ_{max} foi elevado na faixa de temperatura de 30 a 37 °C, alcançando o valor de 0,42 h^{-1} a 34 °C na concentração de 55 g/l de ART e 0,403 h^{-1} a 37 °C na concentração de 108 g/l.

O coeficiente de rendimento, $Y_{p/s}$, acompanhou os resultados da taxa específica máxima de crescimento, obtendo-se valores máximos em temperaturas de 30 a 37 °C até a concentração de 145 g/l. Na temperatura de 40 °C este coeficiente foi baixo em todas as concentrações de ART em estudo. Resultados similares foram obtidos por KING & HOSSEIN (1982) em trabalho realizado com glicose nas concentrações de 75 a 150 g/l, pH de 5 a 8 e temperaturas de 30 a 40 °C.

O coeficiente de rendimento $Y_{x/s}$ apresentou o valor máximo (0,024 g/g) na temperatura de 34 °C e concentração de 108 g/l. Em temperaturas superiores a 34 °C e concentrações de ART superiores a 125 g/l este parâmetro diminuiu bruscamente. Os demais parâmetros cinéticos também acompanharam estes resultados, sendo os menores valores obtidos de produtividade, taxa específica de produção de etanol (q_p) e consumo de substrato (q_s) na temperatura de 40 °C.

As Figuras 27, 28, 29, 30, 31, e 32 mostram as curvas de produção de massa celular e produção de etanol em 3 concentrações de ART em relação as temperaturas de fermentação. Observa-se que em todas elas a quantidade de massa celular e etanol são menores na temperatura de 40 °C indicando uma clara inibição nesta temperatura.

Quanto ao efeito da variação da concentração de melaço, os resultados da Tabela 10 mostram que com o aumento da concentração de melaço, diminui a taxa específica de crescimento, caindo de 0,375 h⁻¹ em 55 g/l para 0,162 h⁻¹ na concentração de 215 g/l, na temperatura de 30 °C. Esta tendência se repete em todas as temperaturas estudadas.

O coeficiente de rendimento $Y_{p/s}$ também diminui com o aumento da concentração de melaço, principalmente em concentrações acima de 100 g/l, caindo de 0,452 g/g a 108 g/l para 0,283 g/g em concentração de melaço de 215 g/l, na temperatura de 30 °C. Estes resultados são similares aqueles obtidos por ROGERS *et alii* (1979), LEE *et alii* (1979), CROMIE & DOELLE (1981), que reportaram que aumentos na concentração de glicose de 100 para 200 g/l resultaram em uma significativa diminuição da taxa específica de crescimento, no rendimento celular e no rendimento em etanol.

O máximo valor de rendimento (Y) obtido neste estudo corresponde a 90,2% a 34 °C e 108 g/l (Tabela 10). Entretanto, DOELLE & DOELLE (1990a) encontraram surpreendente rendimento de 99% em fermentação do melaço (100 g/l) a 35 °C utilizando *Zymomonas mobilis* UQM 2716. Estes autores mostraram também que concentração de melaço acima de 300 g/l conduz a acúmulo de frutose no fermentador e que a presença de sorbitol foi desprezível em todas

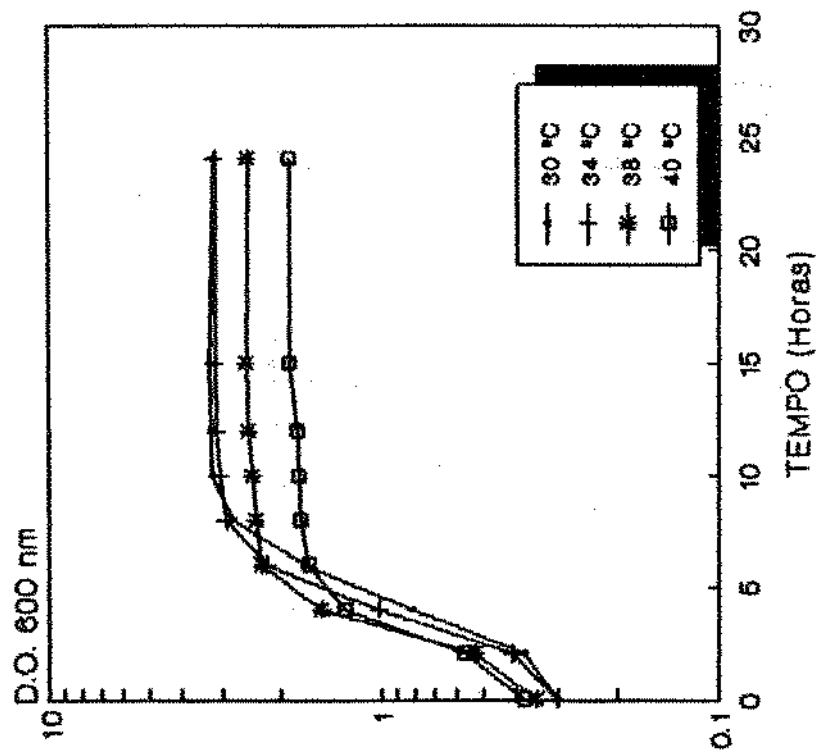


Fig.27-Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis* em melão. So=55 g/l.

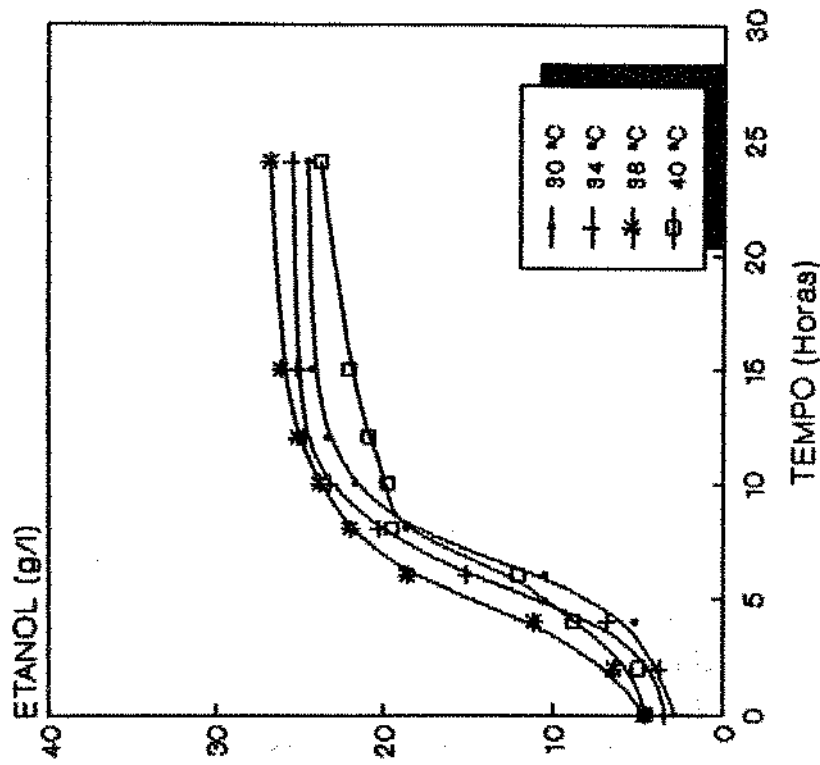


Fig.28-Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre a produção de etanol em melão. So=55 g/l.

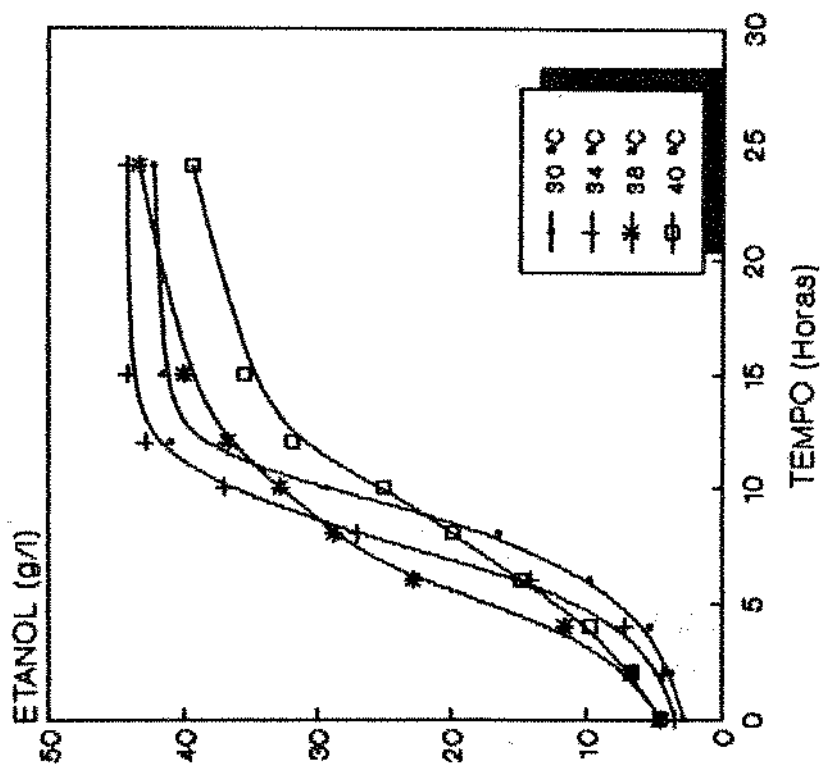


Fig.30-Efeito de variação de temperatura de fermentação sobre a produção de etanol em melão. $S_0=108$ g/l.

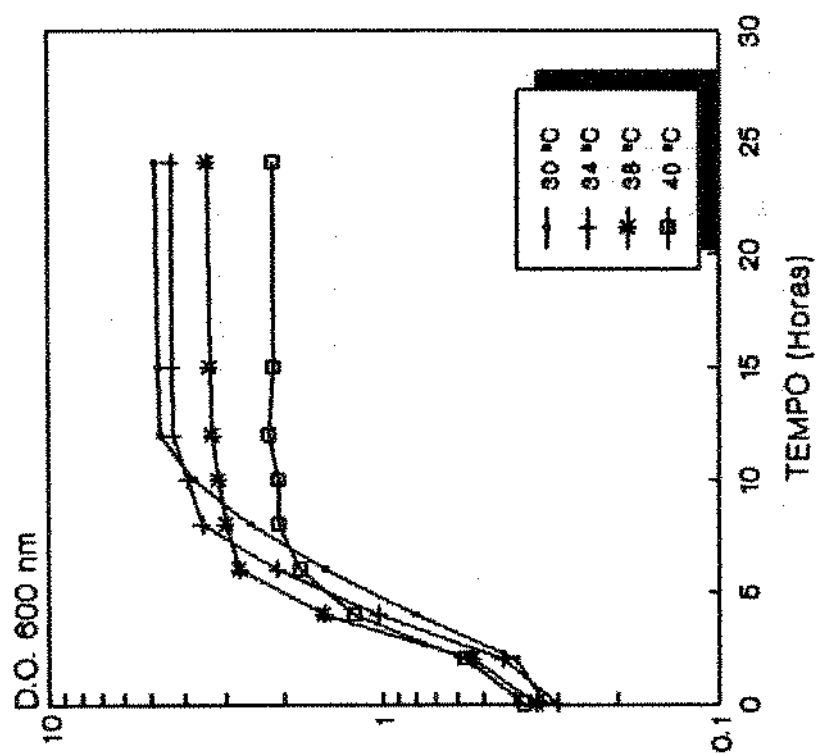


Fig.29-Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis* em melão; $S_0=108$ g/l.

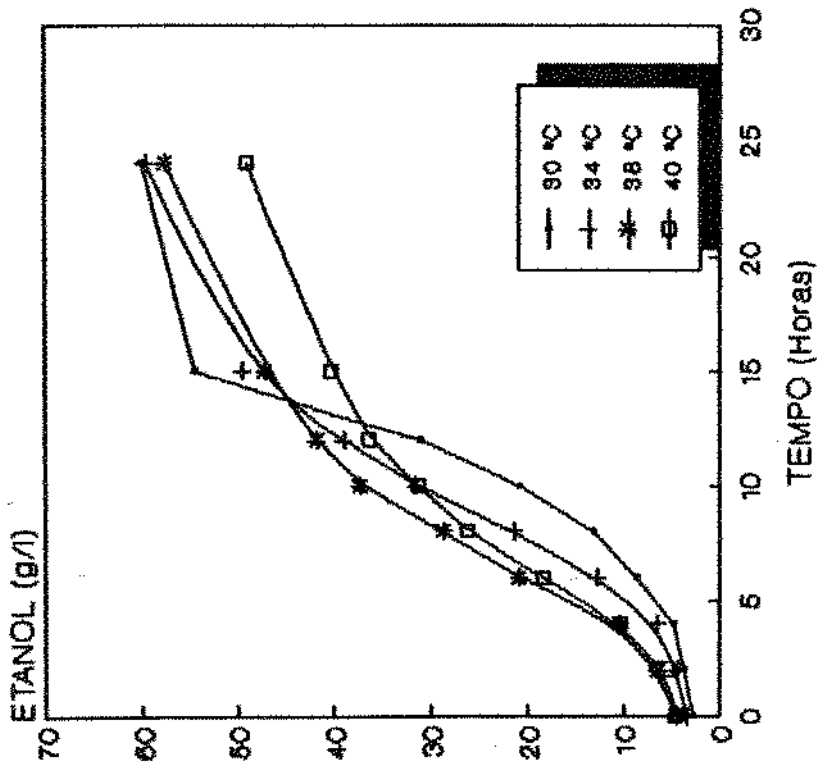


Fig. 32-Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre a produção de etanol em melão. $S_0=145$ g/l.

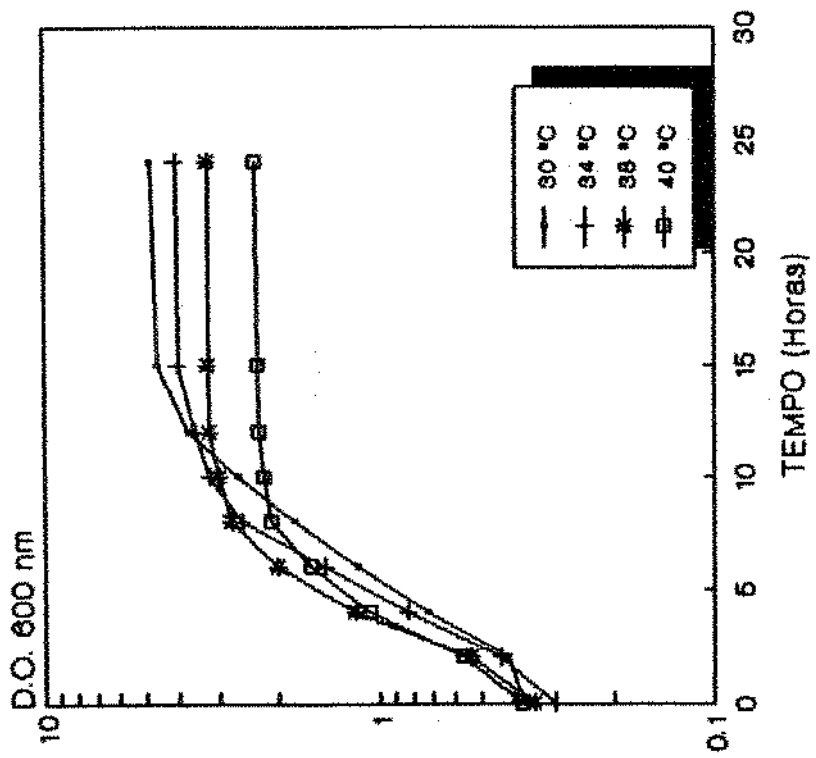


Fig. 31-Efeito da variação de temperatura de fermentação sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis* em melão. $S_0=145$ g/l.

as concentrações de melão estudadas. Concentrações de sorbitol mínimas (menor que 1 g/l) foram mostradas por DIEZ *et alii* (1991), em fermentação de melão por *Zymomonas mobilis*.

VAN VUUREN & MEYER (1982), trabalhando com *Zymomonas mobilis* ATCC 10988, verificaram ser 32 °C a temperatura ideal para a produção de etanol a partir de melão de cana-de-açúcar (100 g/l) e que temperaturas superiores causaram variações significativas na produção de etanol.

4.4.2-Efeito da suplementação do melão com nutrientes.

A eficiência da conversão de açúcar depende de vários fatores, tais como: substrato, condições ambientais, tipo de microrganismo, entre outros (GRAY, 1945). O rendimento industrial de etanol depende, em grande parte, dos nutrientes presentes no mosto de fermentação (MENEZES, 1980).

Os ensaios para estudar o efeito da suplementação do melão com nutrientes como definido no item 3.1.4.2, com e sem tratamento de clarificação com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,87 g/l, foram realizados em fermentador de laboratório de 1 litro de capacidade sem controle de pH em temperatura de 34 °C. A concentração de melão utilizada foi de 90 g/l de ART e o pH inicial de 5,5. Os resultados dos parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 11.

A taxa específica máxima de crescimento é maior no melão suplementado clarificado ($0,376 \text{ h}^{-1}$) e não clarificado ($0,366 \text{ h}^{-1}$). O coeficiente de rendimento em etanol Y_p/s é maior no melão clarificado e suplementado (0,45 g/g). A produtividade é maior no melão clarificado com e sem suplementação. O rendimento em etanol (Y) foi superior no melão clarificado e suplementado (88%), entretanto não há quase diferença entre os melões clarificado sem suplementação e não clarificado com e sem suplementação, indicando que a suplementação com nutrientes é o que favorece o aumento do rendimento e não a clarificação.

As Figuras 33 e 34 mostram as curvas de crescimento, produção de etanol e ART obtidas com o melão clarificado e não clarificado com e sem suplementação. Observa-se (Figura 33) que o crescimento celular diminui após 4 horas de fermentação quando é utilizado melão não clarificado e sem suplementação, mas o etanol produzido e o ART consumido não são afetados pela suplementação ou não do melão não clarificado.

O melão de cana-de-açúcar contém biotina na concentração de 2,5 mg/g, mas, o conteúdo de ácido pantotênico é baixo (OURA, 1983). A maioria das cepas de *Zymomonas mobilis* requer ácido pantotênico, biotina e, ocasionalmente, alguns outros fatores de crescimento como vitamina B₁₂, riboflavina, tiamina, ácido lipóico e ácido fólico. A ausência de pantotenato

seria um dos fatores de crescimento desacoplado observado em *Zymomonas*. Este composto aparentemente não pode ser sintetizado pela bactéria (SWINGS & DELEY, 1977).

Tabela 11- Parâmetros cinéticos da fermentação de melão (90 g/l) clarificado com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e não clarificado, em relação com a suplementação ou não do melão com nutrientes. pH inicial 5,5. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Clarificado		Não Clarificado	
	s/s	c/s	s/s	c/s
μ_{max} (h^{-1})	0,348	0,376	0,328	0,366
$Y_{\text{p/s}}$ (g/g)	0,421	0,450	0,416	0,428
Y (%)	82,4	88,0	81,4	83,7
P (g/l.h)	3,7	3,8	3,3	3,3
$Y_{\text{x/s}}$ (g/g)	0,017	0,022	0,017	0,020
AC (%)	82,0	83,7	80,2	81,9

A concentração de extrato de levedura adicionada ao meio de fermentação é também importante para o crescimento das *Zymomonas*. Segundo JU *et alii* (1983), a concentração ótima de extrato de levedura foi de 10 g/l, ao passo que em estudos realizados por CROMIE & DOELLE (1981), a concentração ótima foi de 2,5 g/l. Entretanto, CROMIE & DOELLE (1980), mostraram que elevadas concentrações de extrato de levedura aumentam a produção de massa celular, mas não necessariamente a produtividade em etanol.

A diferença no crescimento celular quando é utilizado melão clarificado suplementado e não suplementado não é tão acentuada como aquela observada com o melão não clarificado (Figura 34), indicando que a adição de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ favorece o crescimento celular, confirmando os resultados obtidos no ensaio de clarificação de melão com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Tabela 4). Segundo OURA (1983), o melão deve ser tratado antes de ser utilizado em fermentação para precipitar alguns compostos inorgânicos e materiais em suspensão e posteriormente deve ser suplementado com suficiente quantidade de minerais e vitaminas. Contrário a esta afirmação, DOELLE & DOELLE (1990a) encontraram rendimentos de 99% em fermentação a 35 °C de melão 100g/l por *Zymomonas mobilis* UQM 2716, sem nenhum tratamento, esterilização, nem adição de nutrientes.

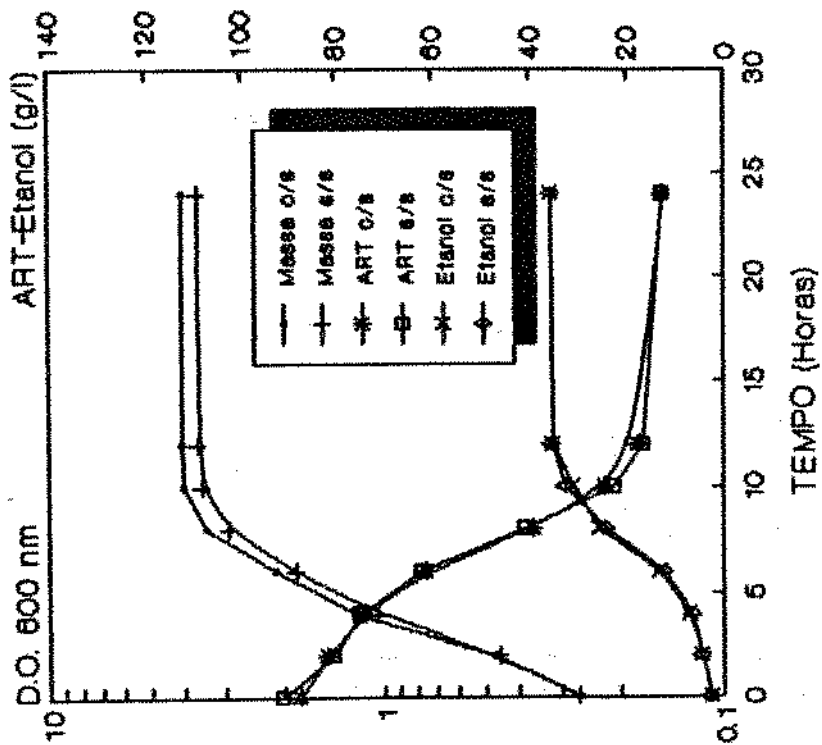


Fig.34-Massa celular, ART e Etanol em melão clarificado com e sem adição de nutrientes. So=30 g/l.

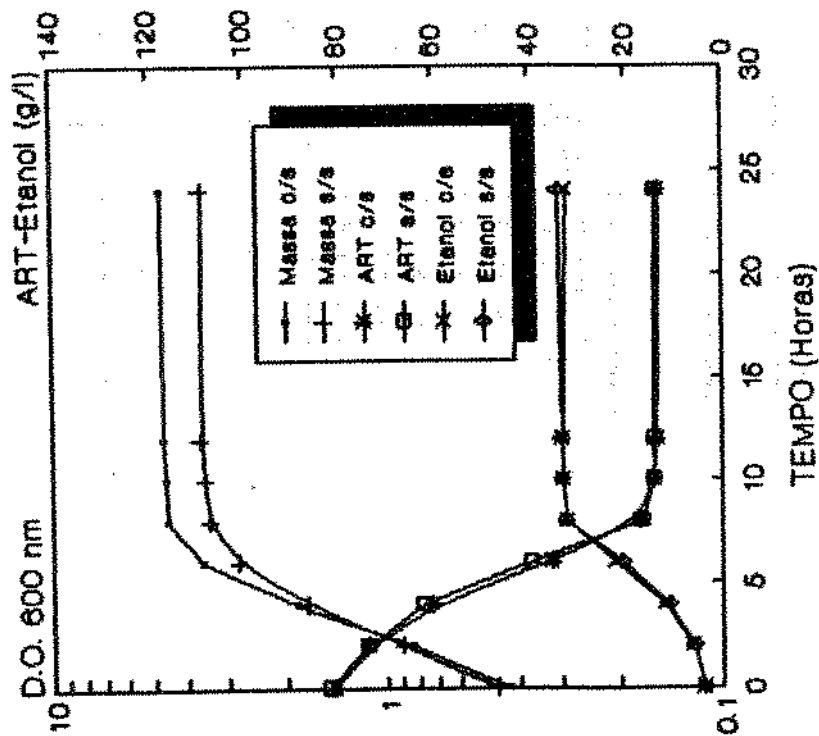


Fig.33-Massa celular, ART e Etanol em melão sem clarificar com e sem adição de nutrientes. So=33 g/l, 34 °C.

É interessante notar que o pH praticamente não diminui durante a fermentação obtendo-se no final da fermentação pH de 5,16 e 5,26, nos estudos com e sem suplementação, respectivamente (Figura 35). Este comportamento é totalmente diferente daquele observado quando sacarose é utilizada para fermentação (Figura 9). O melaço apresenta, portanto, efeito tamponante. Segundo OLBRIKH (1974), esta ação estabilizadora do pH depende da composição química do melaço. Os principais materiais estabilizadores do pH são o ácido carboxílico fraco e os aminoácidos que atuam na região ácida, principalmente entre pH 3 e 5. Quando o melaço contém quantidades importantes de fosfatos, o efeito tamponante acentua-se na faixa de 6 a 7.

O açúcar redutor liberado pela hidrólise da sacarose (Fig.35) é também menor àquele obtido com sacarose (Figuras 3, 7). Este fato unido a que o pH permanece praticamente constante durante a fermentação fazem supor que o conteúdo de levana também deveria ser menor daquele obtido com sacarose. A determinação de levana não pode ser realizada pois as características do melaço não permitem a análise como foi descrita na metodologia. Quanto ao sorbitol, a quantidade encontrada foi desprezível (menor que 1%). Em trabalho prévio realizado por DIEZ *et alii* (1991), foi determinado que a quantidade de sorbitol formada durante a fermentação de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* é menor que 1%.

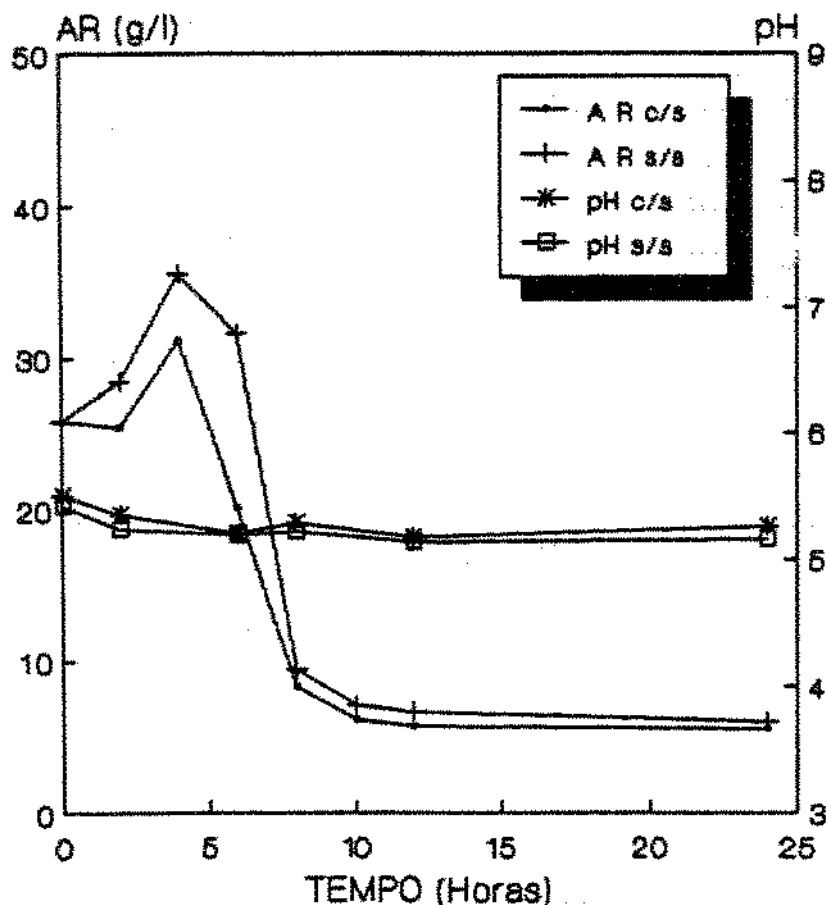


Fig.35-Perfil de pH e açúcar redutor residual (AR) na fermentação de melaço com e sem adição de nutrientes.

Em leveduras existe um estreito acoplamento entre processos anabólicos e catabólicos, portanto são necessárias altas concentrações de células para conseguir uma aceitável velocidade de fermentação. Isto está em acentuado contraste com a situação observada com *Zymomonas*, em que o suplemento energético não é controlado pela demanda energética dos processos biossintéticos anabólicos e catabólicos (LAWFORD *et alii*, 1982). A máxima concentração de massa celular de *Zymomonas* obtida durante as fermentações com melaço foram por volta de 2 g/l. Resultados similares foram obtidos por FAVELA-TORRES *et alii* (1986), em fermentação de alcachofra de Jerusalém por *Zymomonas mobilis* ZM4F. A concentração final de massa celular encontrada por estes autores foi de 1,9 g/l.

Em geral, os resultados dos parâmetros cinéticos da fermentação de melaço em processo descontínuo estão em conformidade com os resultados reportados na literatura. Em temperatura na faixa de 30 a 37 °C e concentração de melaço na faixa de 70 a 130 g/l foram obtidos valores médios de Y_p/s e Y_x/s de 0,40 g/g e 0,020 g/g, respectivamente (Tabela 10). FAVELA-TORRES *et alii* (1986), em fermentação de alcachofra de Jerusalém com *Zymomonas mobilis* ZM4 obtiveram valores de Y_p/s de 0,37 g/g e Y_x/s de 0,018 g/g, menores aos obtidos neste estudo.

4.5-Fermentação de melaço em processo contínuo.

Foi estudada a cinética de fermentação de melaço de cana-de-açúcar, em processo contínuo. As variáveis estudadas foram: taxa de diluição na faixa de 0,08 a 0,47 h⁻¹, concentração inicial de açúcar de alimentação na faixa de 70 a 145 g/l de ART e temperatura na faixa de 27 a 40 °C. As fermentações foram conduzidas sem controle de pH em temperatura de 34 °C. O melaço foi clarificado com NaH₂PO₄.7H₂O (1,87 g/l) e suplementado como especificado no item 3.1.4.2.

4.5.1-Estudo do efeito da taxa de diluição.

Para se estudar o efeito da variação da taxa de diluição (D) foram utilizadas duas concentrações de ART no melaço (97 e 133 g/l) e os resultados são apresentados nas Tabelas 12 e 13. Os resultados para taxa de diluição de 0,47 h⁻¹ não aparecem na Tabela 12 porque nesta taxa de diluição houve lavagem das células, indicando que se estava trabalhando em $D > \mu_{max}$. Utilizando valores de taxa de diluição superiores a 0,20 h⁻¹ observa-se uma acentuada diminuição da porcentagem de açúcar consumido, especialmente em concentração de 133 g/l (Tabela 13).

Tabela 12- Efeito da variação da taxa de diluição (D) sobre os parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4. $S_0=97$ g/l, $T=34$ °C, $V=640$ ml. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetros	Taxa de Diluição (h^{-1})				
	0,08	0,120	0,206	0,278	0,360
X (g/l)	1,038	1,263	1,523	1,308	1,293
S (g/l)	11,05	11,63	13,02	24,49	40,45
E (g/l)	34,21	35,45	35,50	29,78	19,59
F (ml/h)	52	78	132	179	230,4
τ (h)	12,5	8,33	4,85	3,59	2,77
ΔS (g/l)	85,95	85,37	83,98	72,51	56,55
AC (%)	88,6	88,0	86,5	74,7	58,3
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,398	0,415	0,423	0,410	0,346
Y (%)	77,9	81,26	82,78	80,3	67,7
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,012	0,015	0,018	0,018	0,022
P (g/l.h)	2,74	4,25	7,32	8,29	7,07
qp (g/g.h)	2,63	3,37	4,80	6,33	5,45
qs (g/g.h)	6,62	8,11	11,36	15,41	15,75
m/qs (%)	43,71	35,68	25,47	18,78	18,37

O açúcar residual permaneceu praticamente constante (menor que 13 g/l) até a taxa de diluição de $0,206 h^{-1}$ no estudo com $S_0=97$ g/l (Tabela 12). Entretanto, no estudo com $S_0=133$ g/l, o açúcar residual foi aumentando levemente até taxa de diluição de $0,14 h^{-1}$ atingindo o valor de 32 g/l, aumentando bruscamente em taxas de diluição maiores (Tabela 13).

Observa-se (Tabela 12) que a porcentagem de açúcar consumido foi superior a 86% até a taxa de diluição de $0,206 h^{-1}$. Estes resultados são superiores àqueles encontrados por LEE *et alii* (1979). Estes autores encontraram que somente 80% da glicose (100 g/l) foi utilizada em processo contínuo na taxa de diluição de $0,2 h^{-1}$.

Tabela 13- Efeito da variação da taxa de diluição (D) sobre os parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4. $S_0=133$ g/l, $T=34$ °C, $V=640$ ml. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetros	Taxa de Diluição (h^{-1})					
	0,08	0,114	0,140	0,178	0,230	0,36
X (g/l)	1,105	1,166	1,171	1,202	1,176	0,687
S (g/l)	21,94	24,23	32,40	46,76	59,03	99,2
E (g/l)	44,04	43,40	42,00	36,30	32,20	12,20
F (ml/h)	51,2	73,0	89,6	114,0	147,2	230,4
t (h)	12,5	8,77	7,14	5,61	4,34	2,77
ΔS (g/l)	111,06	108,77	100,6	86,24	73,97	33,8
AC (%)	83,5	81,8	75,6	64,8	55,6	25,4
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,396	0,399	0,417	0,421	0,435	0,360
Y (%)	77,5	78,1	81,6	82,4	85,1	70,4
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,009	0,011	0,011	0,014	0,015	0,020
P (g/l.h)	3,52	4,95	5,88	6,47	7,42	4,40
qp (g/g.h)	3,18	4,24	5,02	5,38	6,31	6,40
qs (g/g.h)	8,04	10,63	12,03	12,79	14,5	17,76
m/qs (%)	69,52	52,6	46,47	43,70	38,50	31,50

Segundo CROMIE & DOELLE (1980), em condições de coeficiente energético igual a zero, deve-se esperar maior eficiência de conversão de glicose a etanol. CROMIE & DOELLE (1982), variando não só a taxa de diluição, mas também as concentrações de sulfato de amônio e sulfato de magnésio, obtiveram coeficiente energético de manutenção reduzido a zero para todas as taxas de diluição ($0,05$ a $0,2 h^{-1}$) estudadas, com $4,5$ g/l de sulfato de magnésio e $0,5$ ou 1 g/l de sulfato de amônio.

As Figuras 36a e 37a mostram os resultados da massa celular, açúcar residual e etanol produzido, durante o estado estacionário nas diferentes taxas de diluições estudadas, utilizando melaço nas concentrações de 97 e 133 g/l respectivamente. Observa-se que com o aumento da taxa de diluição até $0,20 h^{-1}$, na concentração de 97 g/l de ART, aumenta levemente a concentração de etanol, biomassa e açúcar residual. Em taxas de diluição superiores, o etanol e

a massa celular diminuem, aumentando por outro lado o açúcar residual. Estes resultados são similares àqueles reportados na literatura para fermentação com sacarose (LEE *et alii*, 1979, 1981; FAVELA TORRES *et alii*, 1986, FAVELA TORRES & BARATTI, 1987). Entretanto, em concentração de 133 g/l de ART, o açúcar residual aumenta rapidamente e o etanol produzido diminui com o aumento da taxa de diluição .

LEE *et alii* (1981a), em fermentação de sacarose (100 g/l), estudaram o efeito da variação da taxa de diluição e encontraram significativo incremento na concentração de sacarose, frutose e glicose e presença de levana nas taxas de diluição entre 0,15 e 0,33 h⁻¹.

As Figuras 36b e 37b representam os parâmetros cinéticos durante o processo contínuo, nas concentrações de melão em estudo. O rendimento em etanol Yp/s foi próximo de 0,4 g/g nas diferentes taxas de diluição em estudo e em ambas concentrações de açúcar. Foi obtida elevada produtividade em etanol, a qual aumenta linearmente com o aumento da taxa de diluição, alcançando valores de 8,29 g/l.h em concentração de 97 g/l de açúcar no melão e taxa de diluição de 0,278 h⁻¹ e de 7,42 g/l.h para concentração de 133 g/l de açúcar no melão e taxa de diluição de 0,23 h. Estes valores são similares aos encontrados por LEE *et alii* (1979) em fermentação de glicose 100 g/l por *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 que encontraram produtividade de 7,5 g/l.h na taxa de diluição de 0,017 h⁻¹, e menores aos encontrados por LAVERS *et alii* (1980), que encontraram produtividades de 10-12 g/l.h em fermentação de glicose 100g/l por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 e por FAVELA TORRES & BARATTI (1987), que encontraram produtividade de 13,3 g/l.h em fermentação de sacarose 100 g/l por *Zymomonas mobilis* flocculenta ZM4JM1, em temperatura de 34 °C e taxa de diluição de 0,3 h⁻¹. Produtividades extremamente elevadas foram conseguidas em fermentações de *Zymomonas mobilis* com recirculação de células (ROGERS *et alii*, 1980; FAVELA TORRES & BARATTI, 1987).

ROGERS *et alii* (1980), obtiveram produtividade de até 120 g/l.h na fermentação de glicose por *Zymomonas mobilis* ATCC 10988, em processo contínuo com recirculação de células. Estes autores conseguiram operar o reator na taxa de diluição de 2,7 h⁻¹ mantendo a concentração de açúcar residual próxima de zero.

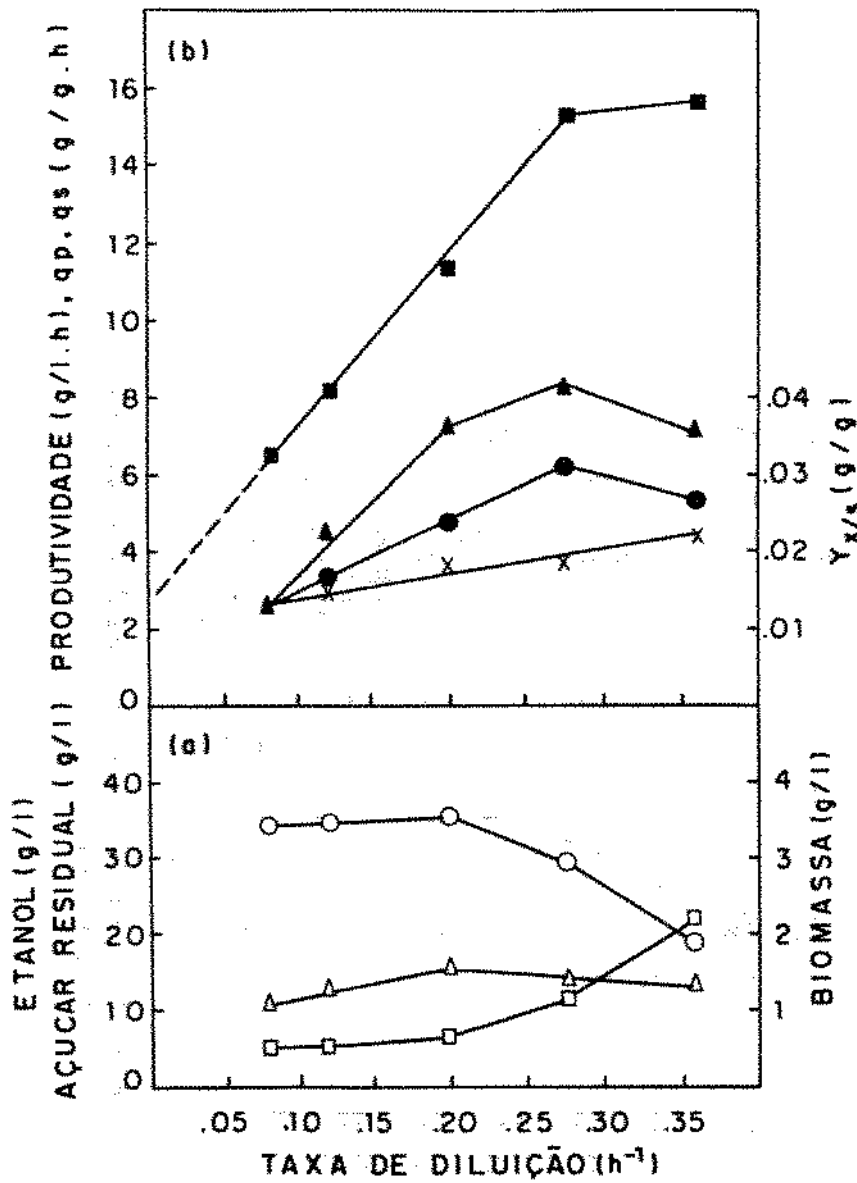


Figura 36- Efeito da taxa de diluição (D) sobre a massa celular (Δ), açúcar residual (\square), etanol (o), produtividade (\blacktriangle), $Y_{x/s}$ (x), q_s (\blacksquare) e q_p (\bullet), na fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4. $S_0=97$ g/l, $T=34$ °C.

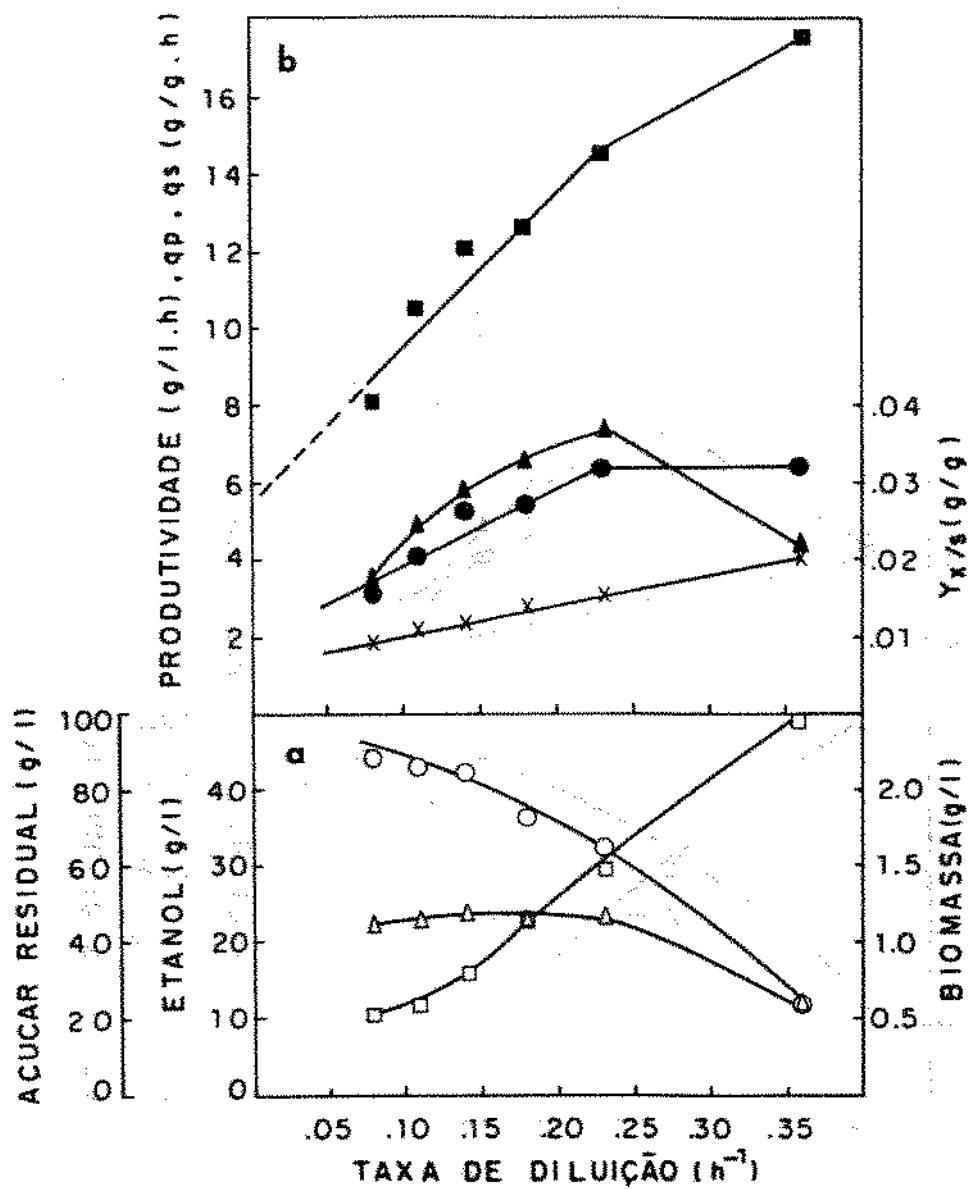


Figura 37- Efeito da taxa de diluição (D) sobre massa celular (Δ), açúcar residual (\square), etanol (o), produtividade (\blacktriangle), $Y_{x/s}$ (x), q_s (\blacksquare) e q_p (\bullet), na fermentação de meloço por *Zymomonas mobilis* CP4. $S_0=133$ g/l, $T=34$ °C.

Por extrapolação da taxa específica de consumo de substrato (q_s) até a taxa de diluição zero (Figuras 36b e 37b), é possível calcular o coeficiente de energia de manutenção (m) de acordo com a seguinte equação (PIRT, 1975)

$$q_s = \mu/Y + m$$

Os coeficientes de manutenção calculados de acordo com esta expressão, correspondem a 2,894 e 5,59 g de açúcar/ g de biomassa por hora para as concentrações de 97 e 133 g/l de açúcar no melaço, respectivamente. LEE *et alii* (1980), encontraram coeficiente de manutenção de 3,8 em concentração de glicose de 60 g/l e de 5,1 em concentração de 170 g/l em trabalho realizado com *Zymomonas mobilis* ZM4.

A Figura 38 mostra a proporção de açúcar utilizado para manutenção celular comparado com a taxa específica de consumo de substrato (q_s) nas concentrações de açúcar em estudo. *Zymomonas mobilis* utiliza uma proporção elevada de açúcar para energia de manutenção, a qual é mais acentuada em taxas de diluição menores. Observa-se também que em maior concentração de açúcar, maior é o coeficiente de manutenção. Resultados similares foram reportados por LEE *et alii* (1979), em fermentação contínua de glicose (100 e 150 g/l) por *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. De acordo com estes autores isto pode ser explicado pelo aumento da concentração de açúcar no fermentador, aumento da pressão osmótica e aumento da concentração de etanol.

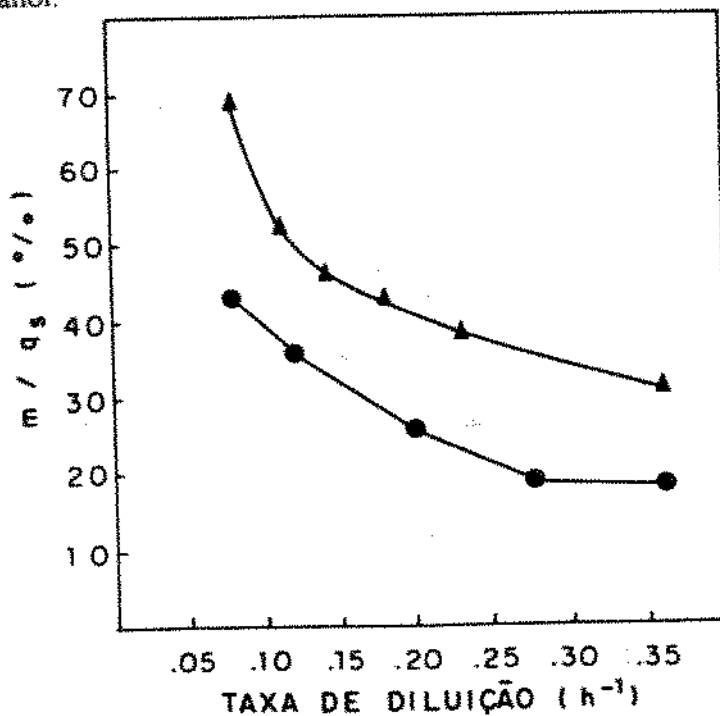


Figura 38- Efeito da taxa de diluição (D) sobre a relação m/q_s (%), em fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4. Concentrações de açúcar de 97 g/l (●) e 133 g/l (▲).

4.5.2-Efeito da concentração inicial de açúcar (So) na alimentação.

Os resultados apresentados na Tabela 14 mostram que com o aumento na concentração de So, aumentaram quase todos os parâmetros cinéticos alcançando a produtividade máxima de 7,42 g/l.h com So=133 g/l. Em concentrações de açúcar superiores a 133 g/l, a massa celular, a percentagem de consumo de açúcar, a produtividade e o rendimento Yp/s diminuíram.

Tabela 14- Efeito da variação da concentração inicial de açúcar (So) sobre os parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4. D=0,172 h⁻¹, T=34 °C, V=510 ml. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Concentração inicial de açúcar (g/l)				
	70	91	107	133	143
X (g/l)	0,880	1,133	1,213	1,043	0,171
S (g/l)	8,65	12,39	17,9	36,5	45,87
E (g/l)	26,59	34,43	40,24	42,94	19,62
ΔS (g/l)	61,35	78,61	89,1	96,5	97,13
AC (%)	87,6	86,4	83,3	72,5	32,07
Yp/s (g/g)	0,430	0,438	0,451	0,445	0,202
Y (%)	84,15	85,71	88,3	87,08	39,5
Yx/s (g/g)	0,014	0,014	0,013	0,010	0,002
P (g/l.h)	4,59	5,95	6,95	7,42	3,39
qp (g/g.h)	5,21	5,25	5,73	7,11	NC
qs (g/g.h)	12,04	11,98	12,68	15,98	NC

NC = Não calculado

É interessante notar que no processo convencional de fermentação contínua sem recirculação de células utilizado neste estudo, a produtividade máxima na concentração de 107 g/l foi de 6,95 g/l.h, similar à mostrada na literatura para sacarose (CYSEWSKI & WILKE, 1976; STEVNSBORG *et alii*, 1986). Entretanto, utilizando processos mais sofisticados de fermentação contínua é possível aumentar a produtividade. BAJPAI *et alii* (1989), em trabalho realizado com diversas leveduras imobilizadas em alginato de cálcio encontraram valores de 32, 39 e 36 g/l.h utilizando 150, 180 e 200 g/l de caldo de cana, respectivamente.

No presente estudo foram encontrados valores de coeficiente de rendimento em etanol (Yp/s) de 0,451 g/g e coeficiente de rendimento em massa celular (Yx/s) de 0,013 g/g,

utilizando uma concentração de açúcar inicial de 107 g/l (Tabela 14), os quais são menores àqueles obtidos por LEE *et alii* (1979) em processo contínuo na taxa de diluição de $0,2 \text{ h}^{-1}$, fermentando glicose (100 g/l) por *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. Estes autores encontraram valores de Y_p/s de 0,5 g/g e Y_x/s de 0,029 g/g.

LEE *et alii* (1979), trabalhando com glicose na faixa de concentração de 60 a 170 g/l com *Zymomonas mobilis* ZM4, encontraram que em concentração de glicose até 135 g/l e em taxas de diluição baixas, o cultivo comportou-se como quimiostato limitado por glicose; acima desta concentração a glicose aparece em excesso em todas as taxas de diluição. Os parâmetros cinéticos diminuíram com o aumento da taxa de diluição; obtendo por exemplo, valor de taxa específica de crescimento de $0,45 \text{ h}^{-1}$ em concentração de 60 g/l e de $0,24 \text{ h}^{-1}$ em concentração de 170 g/l.

VIKARI & LINKO (1986), em trabalho realizado variando a concentração de sacarose, encontraram uma queda do rendimento de 95% para 50% do valor teórico com o aumento da concentração do substrato. Encontraram também que mesmo em taxas de diluição elevadas só 4% da sacarose original permaneceu no meio. Isto contrasta com os resultados relatados na literatura (LEE *et alii*, 1981; LYNESS & DOELLE, 1981; PARK *et alii*, 1983) que mostram elevado conteúdo de açúcar residual. Os autores atribuem esta diferença a dificuldade de distinguir entre fructooligômeros e sacarose com a metodologia utilizada (β -fructosidase ou hidrólise ácida).

JU *et alii* (1983), trabalhando com *Zymomonas mobilis* CP3 na taxa de diluição de $0,18 \text{ h}^{-1}$ e utilizando meio com glicose (100 g/l) suplementado com 10 g/l de farinha de soja, encontraram valores de massa celular de 1,51 g/l, açúcar residual de 8,6 g/l e etanol de 38,5 g/l, valores superiores aos encontrados neste estudo para a concentração de melação de 107 g/l (Tabela 14).

Em contraste ao observado com sacarose, concentrações de glicose acima de 10-15% (p/v) afetam a membrana celular de *Zymomonas mobilis* (DOELLE, 1982), e altas produções podem ser obtidas, por reciclagem da biomassa ou por imobilização do microrganismo (ARCURI, 1982).

A principal limitação em processo contínuo de fermentação é o efeito inibitório pela elevada concentração dos produtos sobre o crescimento dos microrganismos (HOPPE & HANSFORD, 1982). Em presença de sacarose, *Zymomonas mobilis* forma uma camada protetora ao redor da célula, a qual, freqüentemente, conduz a uma aparência de Gram + (DOELLE & GREENFIELD, 1985b). Esta característica de *Zymomonas mobilis* é de grande importância

quando se pretende fermentar matérias-primas com alto teor de sacarose para produção industrial de álcool.

Outro aspecto característico das *Zymomonas* é que estes microrganismos não precisam de oxigênio para o crescimento (ROGERS *et alii*, 1980,1982), em contraste com as leveduras que necessitam de pequenas quantidades de oxigênio para crescer, o que impede a aplicação industrial num simples processo contínuo de fermentação (KOSARIC *et alii*, 1983).

4.5.3.-Efeito da variação de temperatura.

O coeficiente de rendimento em etanol (Y_p/s) permaneceu constante ao variar a temperatura de fermentação até 36 °C. Em temperaturas superiores a 34 °C diminuem principalmente a massa celular, o coeficiente de rendimento (Y_x/s) e a porcentagem de açúcar consumido, indicando que temperaturas elevadas são fatores limitantes do crescimento (Tabela 15).

Tabela 15- Efeito da variação da temperatura de fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4, sobre os parâmetros cinéticos de fermentação. $S_0=102,06$ g/l, $D=0,1705$ h⁻¹, $V=510$ ml. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Temperatura (°C)					
	27	30	32	34	36	40
X (g/l)	1,033	1,230	1,145	1,155	0,77	ND
S (g/l)	32,07	17,43	16,97	18,78	25,40	61,48
E (g/l)	30,05	37,54	37,47	38,00	34,54	12,62
ΔS (g/l)	69,99	84,63	85,09	83,28	76,66	40,58
AC (%)	68,6	82,92	83,4	81,6	75,1	39,7
Y_p/s (g/g)	0,429	0,443	0,440	0,456	0,441	0,310
Y (%)	84,02	86,70	86,1	89,3	86,3	60,6
Y_x/s (g/g)	0,014	0,014	0,013	0,014	0,010	NC
P (g/l.h)	5,13	6,40	6,39	6,48	5,89	2,15
qp (g/g.h)	4,96	5,20	5,58	5,61	7,65	NC
qs (g/g.h)	11,56	11,74	12,68	12,30	16,98	NC

ND = Não determinado.

NC = Não calculado

A máxima produtividade (6,48 g/l.h), foi obtida a 34 °C (Tabela 15). O coeficiente de rendimento em etanol (Y_p/s) permaneceu quase constante (0,44 h⁻¹) na faixa de temperatura de 30 a 36 °C caindo para 0,31 h⁻¹ em temperatura de 40 °C. O coeficiente de rendimento em massa celular permaneceu na faixa de 0,014 g/g até a temperatura de 34 °C, caindo bruscamente a 0,010 g/g em temperatura de 36 °C. FAVELA TORRES & BARATTI (1987), encontraram produtividades maiores que 12,5 g/l.h e coeficiente de rendimento (Y_p/s) de 0,45 g/g na faixa de temperatura de 30 a 36 °C, em fermentação de sacarose por *Z.mobilis* ZM4JM1. Estes autores também encontraram que a biomassa e a produção de etanol permaneceram relativamente constantes (6,0 e 43,4 g/l) na faixa de temperatura de 30 a 36 °C e não detectaram presença de sorbitol. Segundo eles, a hidrólise da sacarose foi inibida a 38 °C, mas não a concentração de biomassa, contrário ao observado neste estudo que mostra que temperaturas superiores a 34 °C inibem o crescimento (Tabela 15).

A comparação dos resultados obtidos neste estudo é difícil desde que não há trabalhos realizados em condições similares utilizando melaço de cana-de-açúcar. Contudo, DIEZ (1988), encontrou valores de etanol de 49,7 g/l, coeficiente de rendimento em etanol de 0,483 g/g, coeficiente de rendimento em massa celular de 0,0121 g/g e produtividade de 6,41 g/l.h em trabalho realizado com beterraba açucareira (100 g/l), em temperatura de 30 °C e taxa de diluição de 0,15 h⁻¹.

BORREGO *et alii* (1987), estudaram o efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos de fermentação por *Zymomonas* na taxa de diluição de 1,0 h⁻¹ e encontraram que, na faixa de temperatura de 25 a 35 °C, a produtividade em etanol e a conversão de glicose permaneceram constantes sendo de aproximadamente 49 g/l.h e 98%, respectivamente. Estes valores foram menores em temperaturas menores que 25 °C e superiores a 35 °C.

A energia de ativação obtida neste estudo, foi de 6,29 Kcal/mol para a faixa de temperatura de 27 a 34 °C, o valor obtém-se através da equação de Arrhenius, plotando-se o valor da taxa específica de consumo de açúcar (qp) em função da temperatura absoluta. BAJPAI & MARGARITIS (1986), encontraram energia de ativação de 7,9 Kcal/mol em estudo realizado com *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 imobilizada em alginato de cálcio para fermentação de glicose.

4.6-Fermentação de melaço em processo descontínuo alimentado.

Foi estudada a cinética de fermentação de melaço de cana-de-açúcar, em processo descontínuo alimentado. As variáveis estudadas foram: fluxo de alimentação do reator de 64,5 a 114 ml/h, concentração inicial de açúcar de alimentação de 98-215 g/l de ART. As fermentações

foram conduzidas sem controle de pH em temperatura de 34 °C. O melaço foi clarificado com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,87 g/l) e suplementado como especificado no item 3.1.4.2.

4.6.1-Efeito da variação do fluxo de alimentação.

Observa-se (Tabela 16) que o rendimento (R12) e a produtividade em etanol (P10) foram superiores no fluxo de alimentação de 114 ml/h (68,17% e 4,27 g/l.h, respectivamente). O coeficiente de rendimento em massa celular ($Y_{x/s10}$) permaneceu constante com a variação do fluxo de alimentação (0,020 g/g). O crescimento celular teve um comportamento similar àquele obtido no processo em batelada, o que quer dizer que a massa celular aumentou exponencialmente durante a fermentação sendo significativamente maior durante a etapa de enchimento do fermentador, exceto com fluxo de alimentação de 114 ml/h, onde a máxima massa celular foi obtida em 10 horas de fermentação (Figuras 39, 40 e 41).

Tabela 16- Efeito da variação do fluxo de alimentação nos parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4. $S_0=145$ g/l, $T=34$ °C (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Fluxo de alimentação (ml/h)		
	64,5	78,3	114
Γ (h)	10	8	5
$Y_p/s10$ (g/g)	0,401	0,387	0,394
$Y_x/s10$ (g/g)	0,020	0,020	0,020
P10 (g/l.h)	3,85	3,80	4,27
R12 (%)	66,5	64,9	68,17
PS10 (g/g.h)	5,0	4,85	4,8
PE10 (g/g.h)	2,01	1,77	1,89
X10 (g/l)	1,91	2,05	2,22

A quantidade de massa celular formada, em 10 horas de fermentação, aumenta com o aumento do fluxo de alimentação (Tabela 16), variando de 1,91 a 2,22 g/l em fluxo de alimentação de 64,5 e 114 ml/h, respectivamente. PERINGER & BLACHERE (1979), afirmaram que o controle apropriado da vazão de alimentação atenua alguns mecanismos de inibição por produto e substrato, o que favorece a reprodução celular.

A velocidade de produção de etanol é significativamente maior durante a etapa de enchimento do fermentador nos fluxos de alimentação de 64,6 e 78,3 ml/h. Este fato aliado ao maior crescimento celular durante o enchimento indica claramente que a população microbiana encontrava-se bem mais ativa durante o enchimento do fermentador.

As Figuras 39, 40 e 41 mostram o comportamento da massa celular, etanol e açúcar redutor total (adicionado, consumido e residual) em função da variação do fluxo de alimentação, utilizando melão 145 g/l. Observa-se (Figura 42) que com o aumento do fluxo de alimentação, aumenta a quantidade de açúcar residual no meio. O teor de açúcar residual para fluxos de alimentação de 114, 78,3 e 64,5 ml/h atingiu valores bastante altos, 64,0; 49,7 e 32,7% do ART adicionado no final de cada tempo de enchimento, respectivamente. Este fato indica que a velocidade de adição de açúcar foi maior que a sua velocidade de consumo, fazendo com que a fase de fermentação pós-enchimento fosse mais longa do que a de enchimento. Resultados similares foram encontrados por BUENO NETTO (1982) para tempos de enchimento de 3 e 5 horas em fermentação de melão por leveduras.

Nenhuma das fermentações foram completadas no tempo de enchimento estabelecido. BUENO NETTO (1982), determinou que em alguns de seus ensaios a fermentação foi praticamente completada no tempo de enchimento de 10 horas. Segundo BORZANI (1987), nas fermentações industriais o tempo de enchimento das dornas está entre 5 e 10 horas e que tempos menores que 5 horas podem provocar a formação exagerada de espuma e valores superiores a 10-12 horas podem abaixar a produtividade.

4.6.2-Efeito da variação da concentração inicial de melão (So).

Na Tabela 17 observa-se que o rendimento em etanol (R10) e o coeficiente de rendimento em massa celular ($Y_{x/s10}$) diminuem com o aumento na concentração de açúcar de alimentação. A produtividade, a taxa específica de formação de etanol (PE10) e a taxa específica de consumo de substrato (PS10) obtiveram seu valor máximo na concentração de 140 g/l (4,8 g/l.h, 1,89 g/g.h e 4,8 g/g.h, respectivamente). KOSHIMIZU *et alii* (1984), trabalhando com *S. cerevisiae* e variando-se a concentração de melão, encontraram que o rendimento em etanol não foi praticamente afetado com a variação da concentração. Eles encontraram valores de rendimento de 76% e 76,9% em concentrações de 165 e 289,6 g/l, respectivamente.

Em todas as condições estudadas foi determinada uma concentração de açúcar residual final de aproximadamente 10% da concentração de açúcar de alimentação, devido presumivelmente a açúcares não fermentáveis no melão. Esta quantidade de açúcar residual é similar aquela encontrada no processo de fermentação descontínuo.

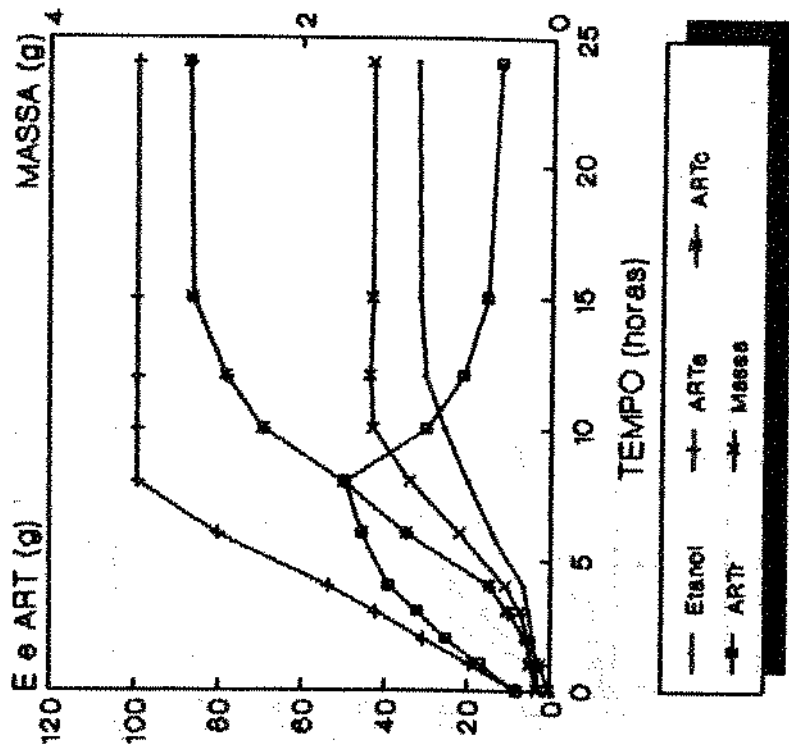


Fig.40-Etanol, ARTe, ARTc, ARTr e Massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. $S_0=145$ g/l, Fluxo=78,3 ml/h.

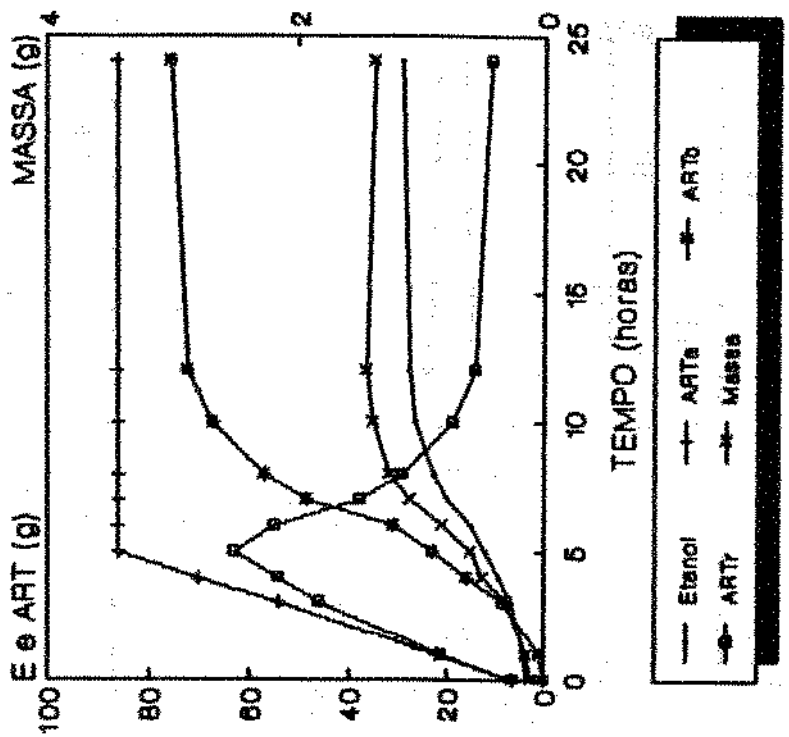


Fig.39-Etanol, ARTe, ARTc, ARTr e Massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. $S_0=140$ g/l, Fluxo=114 ml/h.

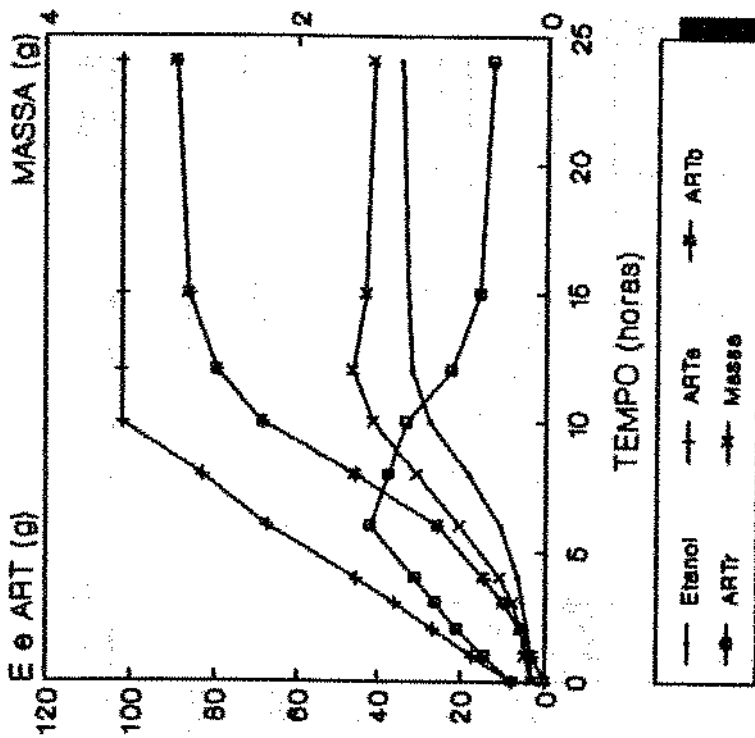


Fig.41-Etanol, ARTa, ARTb, ARTc, ARTd e Massa celular (g); em processo descontinuo alimentado. So=145 g/l. Fluxo=64,5 ml/h.

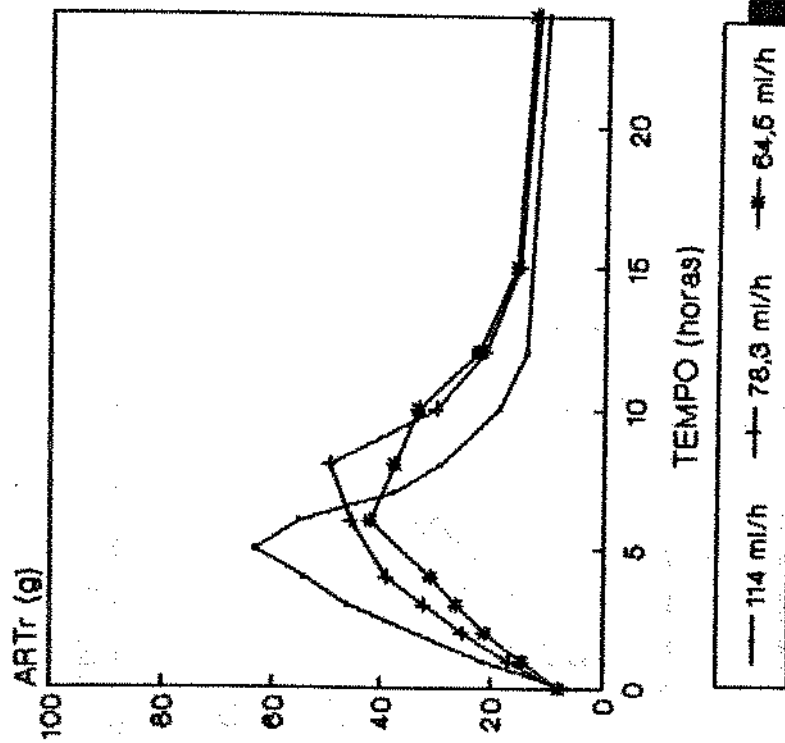


Fig.42-Variacao do fluxo de alimentacao sobre o ARTr (g), em processo descontinuo alimentado. So=145 g/l.

As Figuras 43, 44 e 45 mostram os resultados da massa celular, etanol e açúcar redutor total, adicionado, consumido e residual (ARTa, ARTc e ARTr), em relação a variação da concentração de melaço, utilizando 5 horas para o enchimento do fermentador (Fluxo=114 ml/h). Observa-se (Figura 46) que com o aumento da concentração de melaço aumenta a quantidade de açúcar residual no meio. O teor máximo de açúcar residual para concentrações iniciais de açúcar de 114, 140, 145, e 215 g/l, atingiu valores bastante altos, 57,0; 64,0; 79,0; e 79,6% do ART adicionado no final do tempo de enchimento, respectivamente. Este fato novamente indica que a velocidade de adição de açúcar foi maior que a sua velocidade de consumo principalmente em concentração de 140 a 215 g/l, fazendo com que a fase de fermentação pós-enchimento fosse mais longa do que a de enchimento.

Tabela 17- Efeito da variação da concentração inicial de alimentação (S_0) sobre os parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4. Fluxo=114 ml/h. T=34 °C. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Concentração inicial de açúcar (g/l)			
	114	140	145	215
Yp/s10 (g/g)	0,377	0,394	0,365	0,342
Yx/s10 (g/g)	0,025	0,020	0,019	0,016
P10 (g/l.h)	3,69	4,27	3,32	3,85
R10 (%)	69,2	65,5	48,8	38,2
R24 (%)	NC	NC	68,9	63,9
PS10 (g/g.h)	3,69	4,8	2,97	NC
PE10 (g/g/h)	1,46	1,89	1,08	NC
X10 (g/l)	2,53	2,22	1,76	1,79

NC= Não calculado

A massa celular produzida em 10 horas de fermentação diminuiu com o aumento da concentração de açúcar, caindo de 2,53 g/l em concentração de 114 g/l para 1,79 g/l em concentração de açúcar de 215 g/l. Contudo esta massa celular é superior à obtida em processo contínuo (Tabela 15 e 16).

A velocidade de produção de etanol e a massa celular não foram significativamente maiores durante a etapa de enchimento do fermentador. A máxima quantidade de etanol e massa

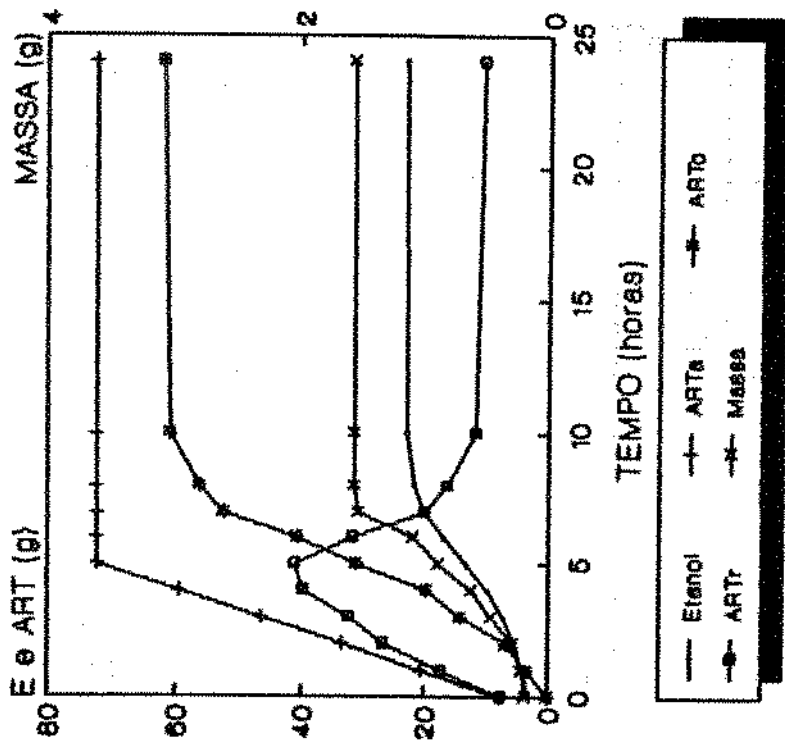


Fig. 43-Etanol, ARTa, ARTc, ARTr e Massa celular (g); em processo descontinuo alimentado. So-114 g/l. Fluxo-114 ml/h.

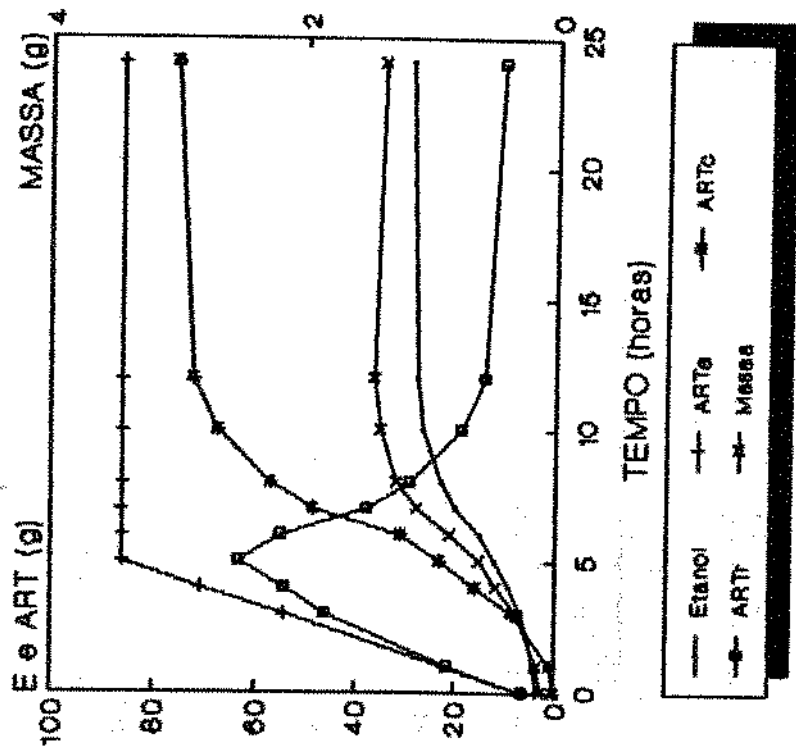


Fig. 44-Etanol, ARTa, ARTc, ARTr e Massa celular (g); em processo descontinuo alimentado. So-140 g/l. Fluxo-114 ml/h.

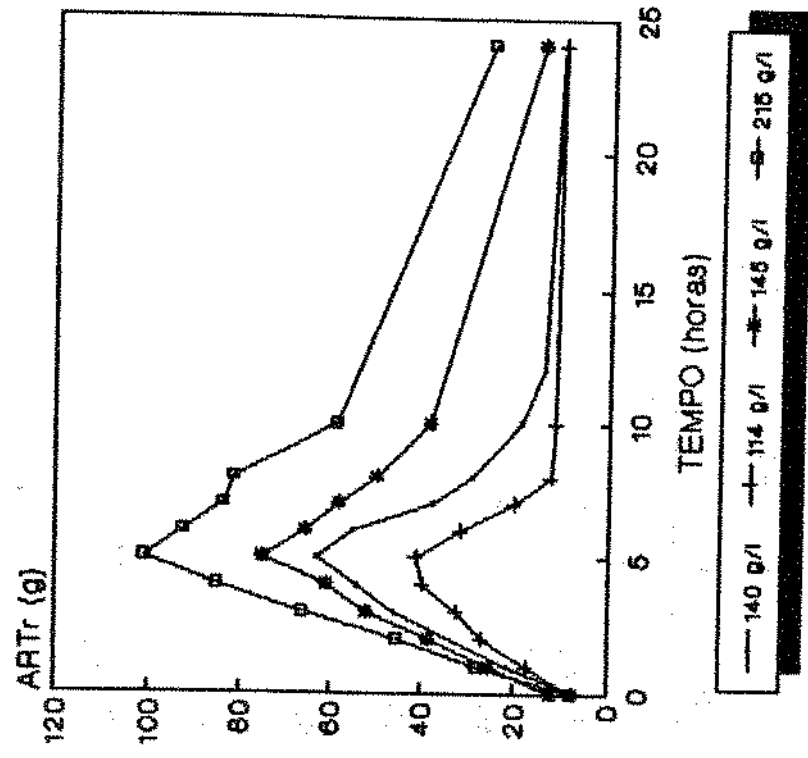


Fig. 46-Variação da concentração de açúcar sobre o ARTr (g), em processo descontinuo alimentado. Fluxo=114 ml/h.

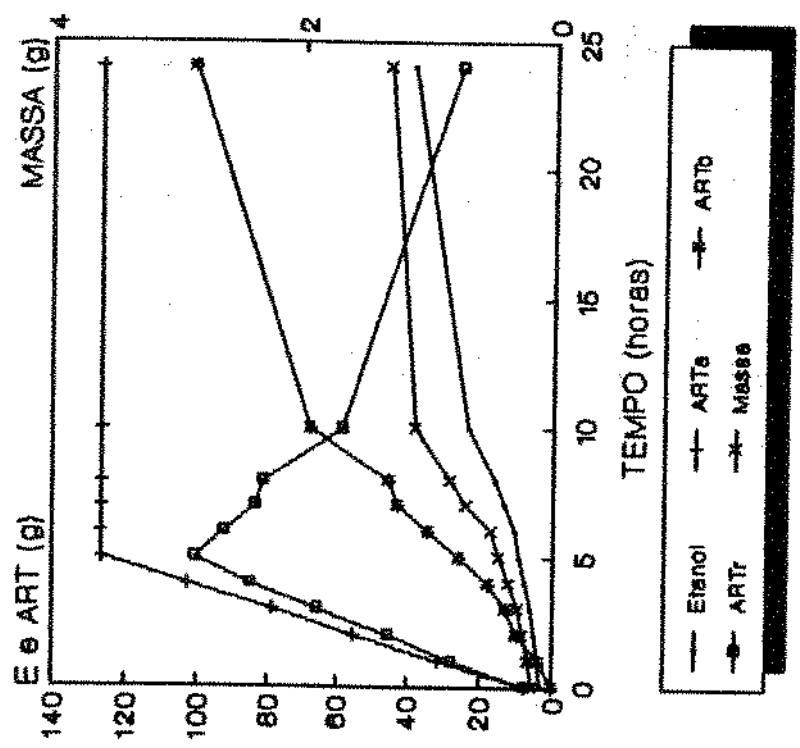


Fig. 45-Etanol, ARTa, ARTc, ARTe e Massa celular (g); em processo descontinuo alimentado. So=215 g/l, Fluxo=114 ml/h.

celular foram obtidas por volta de 10 horas de fermentação nas concentrações de 114 e 140 g/l (Figuras 43 e 44). Em concentrações de 215 g/l observa-se inibição do crescimento e da produção de etanol (Figura 45).

A principal finalidade do processo descontínuo alimentado, além da economia de tempo (já que enquanto o mosto vai sendo adicionado ocorre a fermentação), está na possibilidade do uso de elevadas concentrações de substrato (100 a 200 g/l), sem haver inibição pelo mesmo. JONES *et alii* (1981), reportaram inibição pelo substrato da atividade fermentativa e do crescimento de leveduras, em concentrações superiores a 150 g/l. Esse valor não foi atingido neste trabalho, já que a máxima concentração de substrato residual no fermentador foi de 100,8 g/l no estudo com $S_0=215$ g/l na taxa de alimentação de 114 ml/h. Isto é típico deste processo, onde o controle apropriado da taxa de alimentação de substrato evita o efeito inibidor do açúcar sobre o microrganismo (ALMEIDA, 1980).

O rendimento alcoólico segundo STUPIELLO & HORII (1981), varia nos processos convencionais utilizados com leveduras nas usinas numa faixa de 70 a 90%, dependendo das condições de instalação, matéria-prima e condução da fermentação.

4.7-Estudos em fermentador piloto.

Foram testados os processos descontínuo e descontínuo alimentado em fermentador de 30 litros, munido com controle de temperatura e medidor de pH. Os ensaios foram realizados utilizando melaço clarificado com 1,87 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, sem esterilização e suplementado com nutrientes como descrito no item 3.1.4.2. A agitação do mosto foi de 100 rpm, temperatura de 34 °C sem controle de pH. Os resultados deste estudo são mostrados nas Figuras 47 e 48. O fluxo de alimentação foi de 78,3 ml/h no estudo em processo descontínuo alimentado. Para fins de comparação foram incluídos na Tabela 18, ensaios em descontínuo (130 g/l) e descontínuo alimentado (145 g/l) realizados em fermentador de laboratório de 1 litro de capacidade.

Observa-se que a massa celular obtida no processo descontínuo alimentado é superior aquela obtida em descontínuo convencional, mas o rendimento em etanol é inferior. Fato semelhante foi observado nos estudos em fermentador de laboratório. O processo descontínuo alimentado favorece o crescimento celular diminuindo o rendimento em etanol quando comparado com o descontínuo convencional. Seria interessante começar a fermentação com maior quantidade de inóculo. Em todos os estudos realizados nesta tese foi utilizado 10% (v/v) de inóculo em relação ao mosto de fermentação.

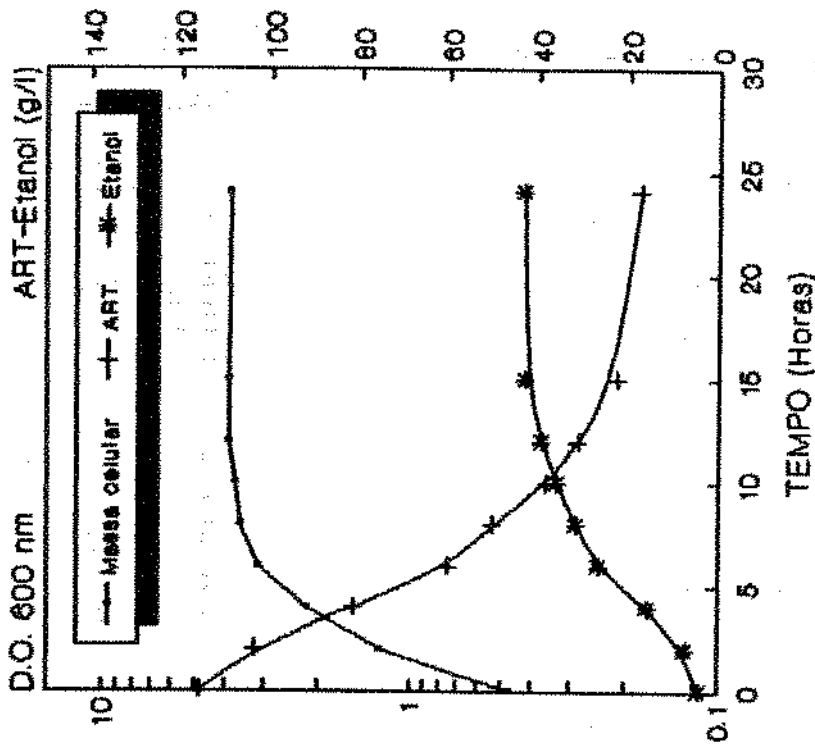


Fig.47-Massa celular, ART e Etanol na fermentação de melão, processo descontínuo, em fermentador piloto. $S_0=125$ g/l.

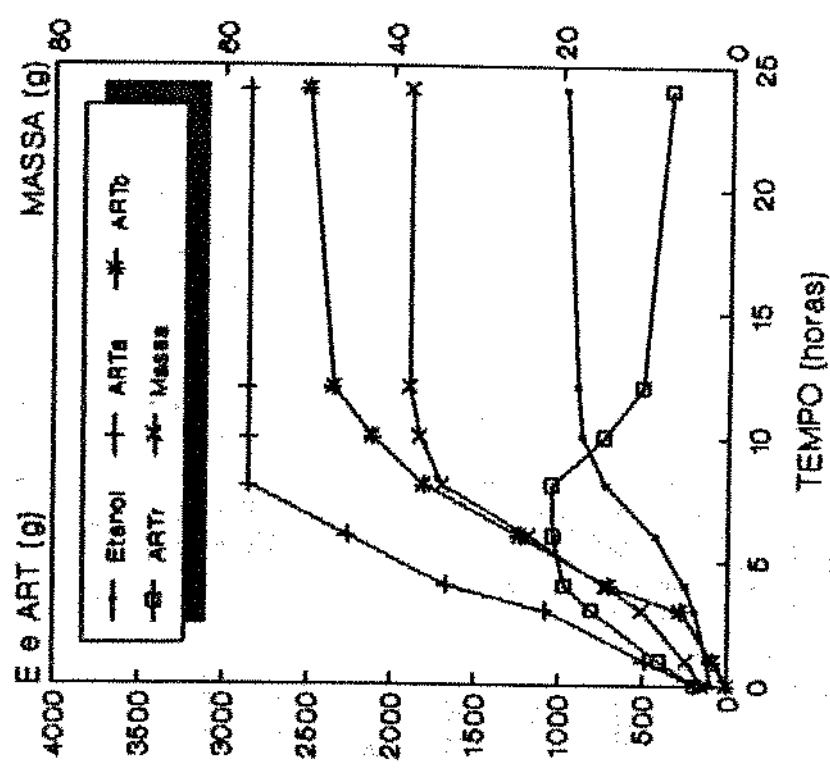


Fig.48-Etanol, ARTe, ARTc, ARTTr e Massa celular (g); em processo descontínuo alimentado. $S_0=150$ g/l, Fluxo=78.3 ml/h.

Tabela 18- Parâmetros cinéticos da fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4 em processo descontínuo e descontínuo alimentado (F=78,3 ml/h), em fermentador piloto. Temperatura de 34 °C, sem controle de pH. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Descontínuo		Parâmetro	Descontínuo alimentado	
	Lab.	Piloto		Lab.	Piloto
μ_{max} (h ⁻¹)	0,351	0,385			
So (g/l)	130	125	So (g/l)	145	150
Yp/s (g/g)	0,435	0,448	Yp/s10 (g/g)	0,387	0,409
Y (%)	85,1	87,6	R10 (%)	64,9	71,9
Yx/s (g/g)	0,018	0,018	Yx/s10 (g/g)	0,020	0,017
P (g/l.h)	4,24	3,93	P10 (g/l.h)	3,80	4,14
X (g/l)	1,68	1,49	X10 (g/l)	2,05	1,97
E (g/l)	49,88	42,94	E10 (g/l)	36,64	46,47

No processo descontínuo alimentado o teor de açúcar residual foi de 36,6% do ART adicionado no final do tempo de enchimento (8 horas). Este fato novamente indica que a velocidade de adição de açúcar foi maior que a sua velocidade de consumo, fazendo com que a fase de fermentação pós-enchimento fosse mais longa do que a de enchimento. A velocidade de produção de etanol e a produção de massa celular foram significativamente maiores durante a etapa de enchimento do fermentador. Este fato, aliado ao maior consumo de açúcar durante o enchimento indica claramente que a população microbiana se encontrava bem mais ativa durante o enchimento do fermentador.

A quantidade de álcool encontrada no ensaio em fermentador piloto, em 10 horas de fermentação (46,57 g/l) é maior que a encontrada em fermentador de laboratório (36,64 g/l). A produtividade (P10), o rendimento (R10) e o rendimento em etanol (Yp/s10) também foram maiores (Tabela 18). Entretanto a massa celular e o coeficiente específico de produção de biomassa (Yx/s10) foram menores, indicando que a produção de etanol foi maior do que formação de biomassa nestas condições. Isto pode ser devido a que no fermentador piloto a agitação foi mais homogênea, a temperatura mais estável e a adição do melaço mais controlada. Segundo RUBIO & NAVARRO (1989), em vasos de fermentação com agitação, a transferência

de nutrientes até o microrganismo varia de acordo com sua localização no reator, especialmente quando a alimentação é realizada numa determinada posição.

A quantidade de massa celular (1,49 g/l) em processo descontínuo, foi menor no ensaio em fermentador piloto comparada com a encontrada no fermentador de laboratório (1,68 g/l), contrário ao que foi observado em descontínuo alimentado. A produtividade e o etanol produzido em processo descontínuo foram também menores no fermentador piloto. Só a taxa específica de crescimento e o rendimento em etanol (Y_p/s) foram um pouco maiores no fermentador piloto. Isto poderia ser devido a inibição pelo substrato, pois o microrganismo permanece em alta concentração de substrato desde o início da mesma.

Neste trabalho, durante o transcurso das fermentações foram observadas modificações morfológicas na bactéria, "blebbing" na membrana externa e formação de longos filamentos, principalmente quando era submetida a condições de "stress" como as elevadas concentrações de açúcar, elevadas concentrações de ions Ca^{++} , K^+ e Cl^- e elevadas temperaturas. DOELLE & MCGREGOR (1983), atribuíram a formação de "blebbing" à elevadas concentrações de etanol e CO_2 . NIPKOW *et alii* (1985), também mostraram o efeito da presença de CO_2 na fermentação de *Zymomonas*. TANAKA *et alii* (1990), verificaram que a forma da bactéria mudava de bastonete-globosa para bastonete e que o comprimento da célula aumentava com o aumento da concentração de oxigênio. Observação similar tinha sido mostrada por JOBSES *et alii* (1985) em estudo realizado em processo contínuo. Segundo eles, estas modificações dependiam da taxa de diluição e da temperatura de fermentação.

A formação de longos filamentos, devido provavelmente a diminuição da frequência de septação, apresentou-se principalmente em elevadas temperaturas e concentração de açúcar, e reverteram ao se voltar a condições de menor temperatura e concentração de açúcar. Segundo FEIN *et alii* (1984), a reversão da septação em temperaturas mais baixas se deve à presença de uma enzima envolvida na septação, sensível a temperatura. STEVNSBORG *et alii* (1986), mostraram a formação de filamentos na fermentação de glicose por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, no processo em batelada e contínuo, quando era modificada a temperatura e a concentração de glicose.

Segundo BEVERIDGE *et alii* (1984), a divisão celular por septação é comum em bactérias Gram +, mas é incomum que a bactéria *Zymomonas mobilis*, que é Gram -, divida-se por septação. Contudo, alterações morfológicas foram observadas em processo contínuo (FEIN *et alii*, 1984), utilizando melaço (ROGERS *et alii*, 1980), em hidrolisado de madeira (FEIN *et alii*, 1984), com células imobilizadas (DAUGULIS *et alii*, 1985; KLEIN & KRESSDORF, 1983), na presença de elevadas concentrações de cloreto de cálcio (STEVNSBORG & LAWFORDE,

1986) e elevadas concentrações de CO₂ e etanol (DOELLE & MCGREGOR, 1983; NIPKOW *et alii*, 1984).

4.8-Parâmetros cinéticos de fermentação em processo descontínuo, em fermentador de laboratório, utilizando diversas matérias-primas.

O grande interesse pela bactéria *Zymomonas mobilis*, como produtora potencial de etanol, têm levado muitos pesquisadores a realizar estudos da fermentação utilizando diferentes substratos, diferentes condições de fermentação e diferentes processos afim de aumentar a produtividade em etanol. Contudo, há limitada informação disponível em relação a trabalhos realizados utilizando matérias-primas naturais. Neste trabalho foram estudadas as seguintes matérias-primas: sacarose, HTM, melão de cana-de-açúcar clarificado e caldo de cana-de-açúcar. Os ensaios foram conduzidos em fermentador de laboratório de 1 litro, temperatura de 30 °C e pH inicial de 5,7.

Os resultados apresentados na Tabela 19 mostram que todos os parâmetros cinéticos foram superiores para o meio preparado com sacarose; de qualquer forma, o rendimento em etanol é inferior àquele obtido com glicose (LEE *et alii*, 1979; ROGERS *et alii*, 1979) devido provavelmente à formação de levana e outros subprodutos.

Tabela 19- Efeito de diversas matérias-primas sobre os parâmetros cinéticos de fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4. Temperatura de 30 °C e pH inicial 5,7. (Ver o capítulo da nomenclatura para definição dos símbolos).

Parâmetro	Mostos (So=100g/l)						
	Suplementado				Sem suplementação		
	Sacarose	HTM	Melão	Cana	HTM	Melão	Cana
μ_{max} (h ⁻¹)	0,438	0,280	0,376	0,455	0,020	0,348	0,330
Y _{p/s} (g/g)	0,46	0,387	0,450	0,411	NC	0,421	0,260
Y (%)	90,0	75,7	88,0	80,4	NC	82,4	50,8
Y _{x/s} (g/g)	0,023	0,015	0,022	0,037	<0,001	0,017	0,019
P (g/l.h)	4,34	2,77	3,80	4,39	NC	3,7	2,90
AC (%)	86,81	81,8	83,7	84,2	57,9	81,9	64,8
X (g/l)	3,2	1,51	1,44	1,38	0,6	1,7	3,58

NC = Não calculado

O estudo realizado com HTM (high test molasses) mostrou que não é um meio adequado para este tipo de fermentação (Tabela 19) devido, possivelmente a deficiências nutricionais. Ao se utilizar HTM suplementado com sais, observa-se um aumento significativo na taxa específica de crescimento e no consumo de açúcar, mas, continuam sendo menores àqueles obtidos com os outros meios em estudo. Observa-se (Figura 49) diferença nas curvas de crescimento da *Zymomonas* em HTM suplementado e não suplementado. MURPHY (1984), encontrou que a velocidade de fermentação de HTM por leveduras é menor que com melão, para produção de rum, devido a ausência de certos compostos nutricionais no HTM. Segundo estes autores, fósforo e inositol são fatores que influenciam a velocidade de crescimento e fermentação e sua deficiência é crítica no caso de fermentação com HTM. Eles encontraram que o HTM deve ser suplementado com nutrientes e recomendam adicionar melão suplementado com sulfato de amônio para uma eficiente fermentação de HTM.

Os resultados obtidos utilizando melão de cana-de-açúcar, mostraram que a taxa específica de crescimento e o coeficiente de rendimento (Y_p/s) foram maiores no melão suplementado (Tabela 19). O coeficiente de rendimento em massa celular (Y_x/s) foi menor no melão sem suplementação, indicando que o crescimento foi mais afetado pela falta de nutrientes. Contudo, o melão mostrou-se como uma matéria-prima promissora para a produção de álcool por *Zymomonas mobilis*. Segundo ACEVEDO (1980), o melão de cana-de-açúcar caracteriza-se por apresentar maior conteúdo de vitaminas, ao passo que o melão de beterraba é mais rico em nitrogênio e minerais. Em virtude da sua composição, os melões são utilizados fundamentalmente como fonte de carbono e energia, sendo necessário suplementá-los com nitrogênio e alguns minerais, especialmente fósforo e magnésio.

O estudo realizado com caldo de cana-de-açúcar mostrou que houve diferença no crescimento e na produção de etanol (Figura 50) entre o caldo de cana suplementado e não suplementado. Os parâmetros cinéticos foram também afetados pela falta de nutrientes no caldo sem suplementação. A taxa específica de crescimento diminuiu de $0,455 \text{ h}^{-1}$ no meio suplementado para $0,33 \text{ h}^{-1}$ no meio sem suplementação. Os coeficientes de rendimento em etanol (Y_p/s), massa celular (Y_x/s) e produtividade também diminuíram no caldo de cana sem suplementação (Tabela 19). De acordo com MENEZES (1980), o caldo de cana-de-açúcar é normalmente deficiente em nitrogênio e fósforo. Portanto recomenda-se a adição de fosfato de amônio ou superfosfato na concentração de 1 g/l , quando a fermentação é conduzida com leveduras. Aconselha-se também enriquecer diariamente, após o tratamento com ácido sulfúrico, o pé-de-cuba, com sulfato de amônio e farelo de arroz (1 g/l).

Com caldo de cana-de-açúcar suplementado obtiveram-se resultados de taxa específica de crescimento (μ_{max}) de $0,455 \text{ h}^{-1}$ e produtividade em etanol de $4,39 \text{ g/l.h}$,

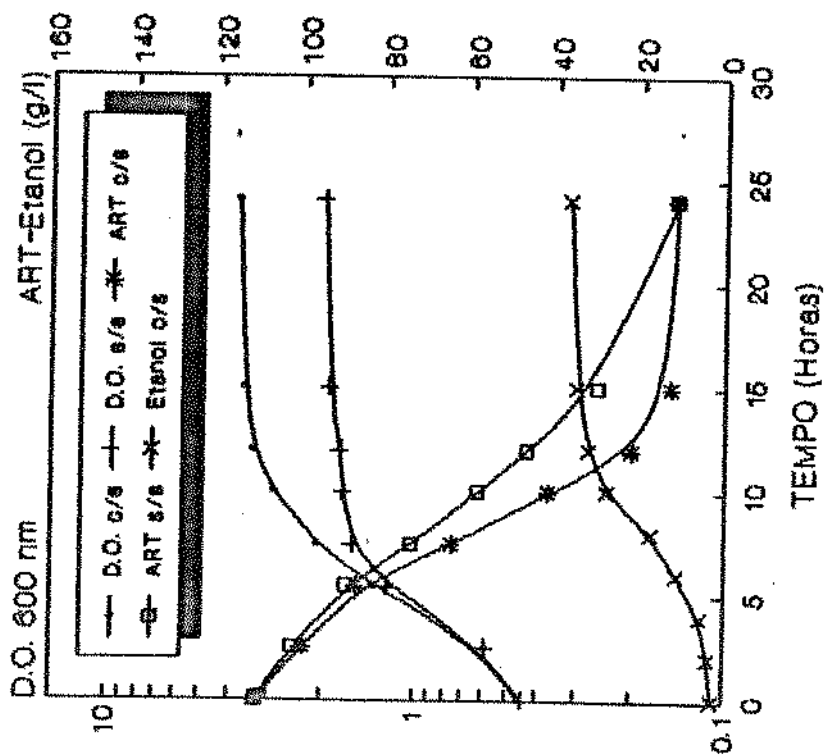


Fig. 40-Massa celular, ART e Etanol em HTM com e sem adiçao de nutrientes. So=110 g/l.

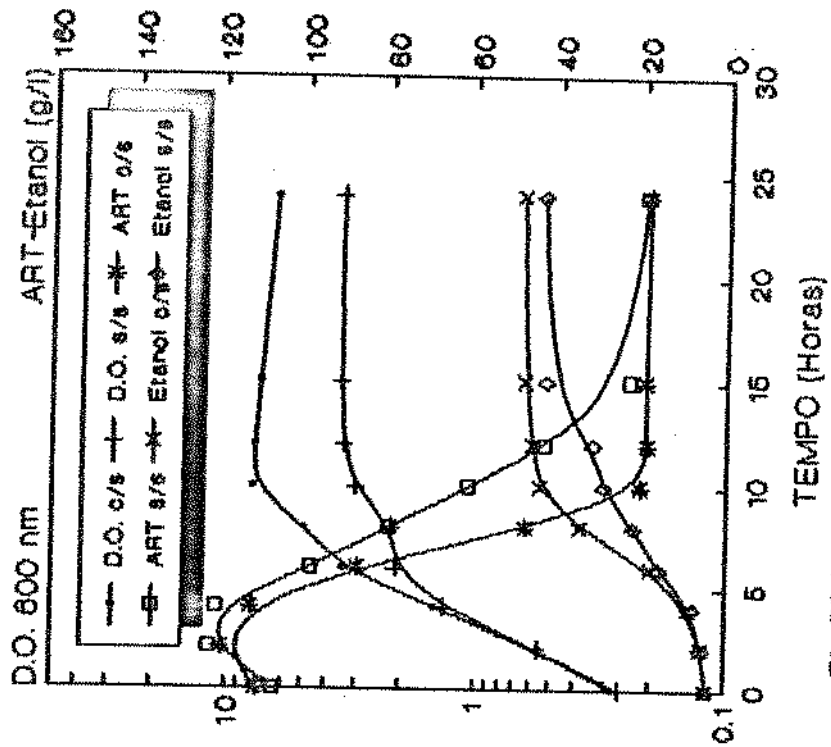


Fig. 50-Massa celular, ART e Etanol em caldo de cana-de-açúcar com e sem adiçao de nutrientes. So=110 g/l.

obtidas com sacarose, mas a massa celular obtida (3,58 g/l) foi superior a obtida com sacarose e as outras matérias-primas (Tabela 19). SÉRVULO & FRANÇA (1986), encontraram produtividade de 3,8 g/l.h e taxa específica de crescimento de 0,45 g/g em fermentação de cana-de-açúcar (157 g/l) com *Zymomonas mobilis* CP3 e que a melhor faixa de pH para a fermentação era de 5 a 6. Utilizando caldo de cana de açúcar suplementado o rendimento (Y) foi baixo (80,4%) comparado com as outras matérias-primas sendo só superior ao HTM (Tabela 19). Este resultado é muito inferior ao encontrado por DOELLE & DOELLE (1990b), que encontraram rendimento superior a 91% em fermentação de caldo de cana 250 g/l.

A Figura 51 mostra o perfil de pH durante a fermentação com as diferentes matérias-primas em estudo. Observa-se que não há uma queda pronunciada do pH quando se utiliza melão suplementado e não suplementado, devido ao poder tamponante do melão (OLBRICH, 1974). Na fermentação de sacarose e caldo de cana o pH caiu sensivelmente de 5,4 a 3,8. SÉRVULO & FRANÇA (1986), encontraram pH final de 4,35 em fermentação de caldo de cana em condições similares. A variação de pH no caso da fermentação de HTM não foi tão acentuada, caiu de 5,3 a 4,3, mas foi maior que a do melão.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo o melão de cana-de-açúcar e o caldo de cana-de-açúcar são matérias-primas promissoras para a produção de etanol, Contudo, deve ser feito um estudo sobre o custo e a disponibilidade destas matérias-primas para se tomar uma decisão a respeito.

KOLIOS *et alii* (1989), mostraram que *Zymomonas mobilis* pode crescer e produzir álcool em extratos de diversas frutas como pêssigo, maçã, laranja, melancia e caldo de beterraba. Os extratos não foram esterilizados nem suplementados. Os melhores resultados obtidos foram obtidos com melancia e *Z. mobilis* CP4. Segundo eles, a fermentação não seria interessante industrialmente a menos que a concentração de açúcar nos extratos fosse aumentada.

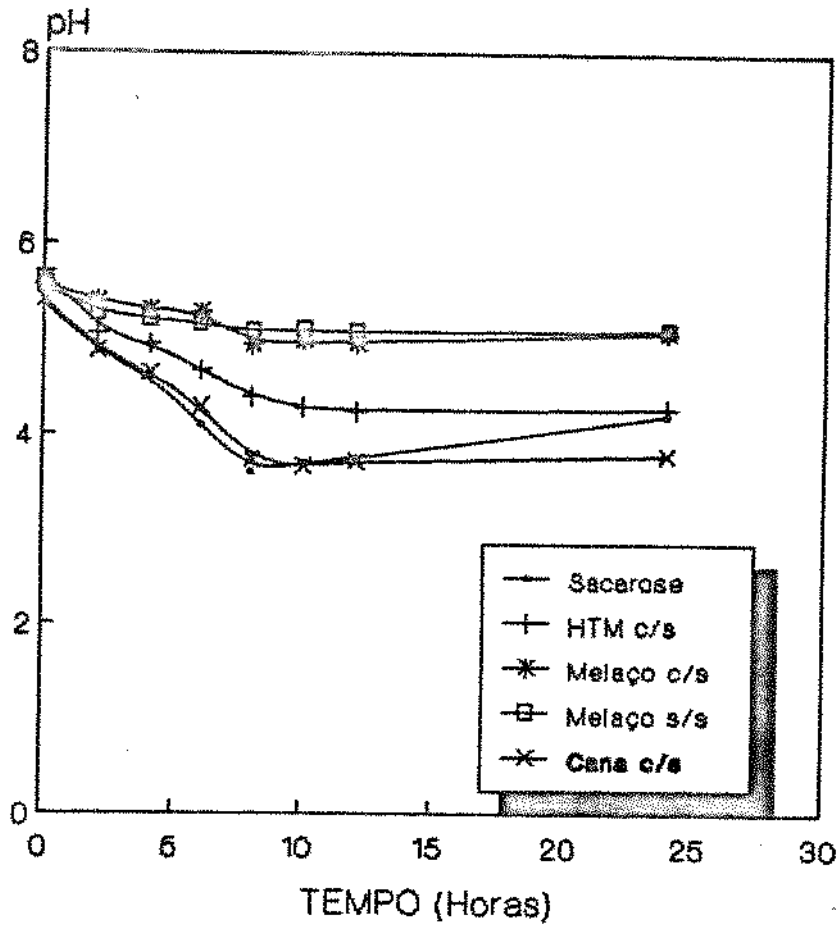


Fig.51—Perfil de pH durante a fermentação de diversas matérias-primas por *Zymomonas mobilis*.

5-CONCLUSÕES

1. Temperatura de 34 °C é a mais apropriada para o crescimento e produção de álcool por *Zymomonas mobilis* CP4 em meios contendo sacarose, em processo descontínuo de fermentação.
2. Temperaturas superiores a 34 °C provocam diminuição do crescimento e produção de álcool por *Zymomonas mobilis* CP4 em meios contendo sacarose, em processo descontínuo de fermentação.
3. Produção de levana diminui com o aumento da temperatura e com o controle do pH durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis* CP4, em processo descontínuo de fermentação.
4. Os rendimentos fermentativos foram superiores na fermentação de sacarose com controle de pH em temperaturas de 30 e 37 °C, em processo descontínuo de fermentação.
5. Os tratamentos de clarificação de melaço removeram Ca e K (40 e 34%), mas não removeram Mg e Cl enquanto Na e P aumentaram sua concentração.
6. Em concentração similar na qual os íons se encontram no melaço, Mg não apresentou efeito inibidor. K, Cl e Ca afetaram os rendimentos fermentativos diminuindo os valores de μ_{max} , Y_p/s , Y_x/s e $Y\%$, além de produzirem maior quantidade de levana. O Na só afetou o rendimento (Y) sem afetar o crescimento de *Zymomonas mobilis* CP4.
7. Cloreto de potássio em concentração superior a 0,5 g/l é inibidor do crescimento e da fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4.
8. Cloreto de cálcio em concentração superior a 2,5 g/l é inibidor do crescimento e da fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4. Com o aumento da concentração de cloreto de cálcio há maior produção de levana.
9. Sulfato de magnésio não afetara os parâmetros cinéticos de fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4 em nenhuma das concentrações estudadas. A quantidade de levana formada é similar a do controle, só diminuindo com o aumento de temperatura.
10. Em fermentação de melaço clarificado e enriquecido com nutrientes foram obtidos resultados superiores dos parâmetros cinéticos em relação aos do melaço não clarificado.

11. Em processo descontínuo, com o aumento da concentração de melaço diminui a taxa específica de crescimento e o coeficiente de rendimento Y_p/s , principalmente em concentração superior a 100 g/l, em todas as temperaturas em estudo.
12. Em processo descontínuo, os melhores rendimentos fermentativos foram em concentração de melaço de 108 g/l e temperatura de 34 °C.
13. Em processo descontínuo, temperaturas superiores a 37 °C e concentração de melaço superior ou igual a 145 g/l são inibidores do crescimento e fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4.
14. A produtividade (P) obtida na fermentação de melaço por *Zymomonas mobilis* CP4 em processo contínuo, é superior a dos processos descontínuo e descontínuo alimentado.
15. Em processo contínuo de fermentação de melaço, a produtividade (P) maior foi obtida na taxa de diluição de 0,278 h⁻¹, mas o rendimento (Y) foi maior na taxa de diluição 0,206 h⁻¹.
16. Os rendimentos fermentativos, em processo contínuo, aumentaram com o aumento da concentração de melaço na alimentação até a concentração de 133 g/l. Em concentrações superiores os rendimentos diminuíram quando $D=0,172 \text{ h}^{-1}$.
17. Temperaturas superiores a 34 °C diminuem a massa celular, o coeficiente de rendimento (Y_x/s) e a porcentagem de açúcar consumido, em processo contínuo de fermentação de melaço quando $D=0,1705 \text{ h}^{-1}$.
18. O coeficiente de rendimento (Y_p/s) permaneceu constante até a temperatura de 36 °C, mas o rendimento máximo e a produtividade máxima foram a temperatura de 34 °C, em processo contínuo de fermentação de melaço, quando $D=0,1705 \text{ h}^{-1}$.
19. Em processo descontínuo alimentado de fermentação de melaço, o rendimento (R) e a produtividade (P), foram superiores quando foi utilizado fluxo de alimentação de 114 ml/h.
20. Em processo descontínuo alimentado, o rendimento (R) e o coeficiente de rendimento (Y_x/s) diminuíram com o aumento da concentração de melaço na alimentação (F=114 ml/h). Os melhores rendimentos foram em concentração de 140 g/l.
21. Os rendimentos fermentativos em processo descontínuo alimentado foram inferiores aos dos processos descontínuo e contínuo, mas a massa celular foi maior.

22. Em processo descontínuo alimentado de fermentação de melaço, nenhuma das fermentações foi completada no tempo de enchimento estabelecido, apresentando-se quantidades muito altas de açúcar residual.
23. Em fermentador piloto, o rendimento da fermentação de melaço foi superior em processo descontínuo, mas a produtividade foi menor que a do processo descontínuo alimentado.
24. Os rendimentos da fermentação de melaço em processo descontínuo, em fermentador piloto, foram inferiores aos do processo descontínuo em fermentador de laboratório.
25. Os rendimentos da fermentação de melaço em processo descontínuo alimentado, em fermentador piloto, foram superiores aos do descontínuo alimentado em fermentador de laboratório.
26. Caldo de cana-de-açúcar e o melaço de cana-de-açúcar são matérias-primas adequadas para a fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4, mas devem ser suplementados, principalmente o caldo de cana, para obter rendimentos fermentativos altos. Contudo, o melaço apresenta a vantagem do menor preço e do efeito tamponante com o qual há diminuição de subprodutos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, F. 1980. Fermentaciones Industriales. Tercer Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica, Valparaíso, Chile.
- AIBA, S., M. SHODA & M. NAGATANI, 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng. 10:845-864.
- ALMEIDA, J.R.de, 1966. Matérias-primas. In: Semana de Fermentação Alcoólica. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, v.1. p.1-13.
- ALMEIDA, S.B.G., 1980. Fermentação alcoólica: ensaios em batelada convencional e em batelada alimentada. Rio de Janeiro. 1980. Tese (Mestre). Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- AMIN, G., 1992. Conversion of sugar-beet particles to ethanol by the bacterium *Zymomonas mobilis* in solid-state fermentation. Biotechnol. Lett. 14(6): 499-504.
- AMIN, G. & A.M. KHALAF ALLAH, 1992. By-products formed during direct conversion of sugar beets to ethanol by *Zymomonas mobilis* in conventional submerged and solid-state fermentations. Biotechnol. Lett. 14(12):1187-1192.
- A.O.A.C. Official Methods of Analysis. Williams H. Ed. XIII Ed. Washington, 1980.
- ANON, 1986. Perspectivas da safra 86/87. Alcool e Açúcar 27(6):
- ARCURI, E.J., 1982. Continuous ethanol production and cell growth in an immobilized cell bioreactor employing *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. 24:595-604.
- BAJPAI, P. & A. MARGARITIS, 1984. Effect of calcium chloride on the growth and ethanol production by free cells of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 6(10):673-676.
- BAJPAI, P. & A. MARGARITIS, 1986. Effect of temperature and pH on immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol. Biotechnol. Bioeng. 28:824-828.
- BAJPAI, P., N. VERMA & BAJPAI, 1989. Continuous ethanol production using immobilized cells of high-ethanol-producing yeast. Biotechnol. and Appl. Biochemistry, 11:471-476.
- BARROW, K.D., J.G. COLLINS, D.A. LEIGH, P.L. ROGERS & R.G. WARR, 1984. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:225-232.

- BARATTI, J. & J.D. BU'LOCK, 1986. *Zymomonas mobilis*: a bacterium for ethanol production. Biotechnol. Adv. 4: 94-115.
- BARATTI, J., R. VARMA, & J.D. BU'LOCK, 1986. High productivity ethanol fermentation on a mineral medium using a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 8(3):175-180.
- BELAICH, J.P. & J.C. SENEZ, 1965. Influence of aeration and pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 89:1195-1200.
- BERTELLI, L.G., 1992. Dezesesseis anos de Proálcool. STAB 11(1):19-20.
- BEVERIDGE, T., R. HARRIS, J. FEIN, H.G. LAWFORD & G.R. LAWFORD, 1984. Septation in *Zymomonas mobilis*. Can. J. Microbiol. 30:1283-1289.
- BLACKBEARD, J.R. & H.W. DOELLE, 1983. The effect of glucose on the sucrose hydrolyzing activity of *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Appl Microbiol. Biotech. 17: 261-263.
- BORREGO, F., J.M. OBON, M. CANOVAS, A. MANJON & J.L. IBORRA, 1987. Effect of temperature and long-term operation on passively immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous ethanol production. Biotechnol. Lett. 9(8): 573-576.
- BORREGO, F., J.M. OBON, M. CANOVAS, A. MANJON & J.L. IBORRA, 1988. pH influence on ethanol production and retained biomass in a passively immobilized *Zymomonas mobilis* system. Biotechnol. Lett. 11(6): 437-442.
- BORZANI, W., R.E. GREGORI & M.L.R. VAIRO, 1977. Some observations on oscillatory change in the growth rate of *S. cerevisiae* in aerobic continuous undisturbed culture. Biotechnol. Bioeng. 19:1363-1374.
- BORZANI, W., 1987. Kinetics of ethanol production during the reactor feeding phase in constant fed-batch fermentation of molasses. Biotechnol. Bioeng. 29:844-849.
- BRINGER, S., H. SAHM & W. SWYZEN, 1984a. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale. Biotechnol. Bioeng. Symp. 14:311-319.
- BRINGER, S., R.K. KIM & H. SAHM, 1984b. Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 139:376-381.
- BRUNELLI, A., 1986. Mercado de cana-de-açúcar. Alimentos e Tecnologia. 9 (2):25-27.

- BUENO NETTO, C.L., Influência da concentração inicial de células e do tempo de enchimento da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar (So=300 g/l). São Paulo, 1982. Tese (Mestre) Escola Politécnica, Univ. São Paulo.
- BURRILL, H., H.W. DOELLE & P.L. GREENFIELD, 1983. The inhibitory effect of ethanol on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 5:423-428.
- CARIOCA, J.O.B., P.V. SELMAN & E.S. ROCHA, 1985. Análise e perspectivas de processos de fermentação alcoólica. Anais do II seminário de "Hidrólise Enzimática de Biomassa" Vol. I p:198-213. Maringá, Brasil.
- CASTELLAR, M.R., F. BORREGO, M. CANOVAS, A. MANJON, & J.L. IBORRA, 1989. Stability against stop of flow of an immobilized *Zymomonas mobilis* bioreactor. Biotechnol. Lett. 2(9): 665-668.
- CHUN, U.H. & P.L. ROGERS, 1988. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29:19-24.
- CROMIE, S. & H.W. DOELLE, 1980. Relationship between maintenance energy requirements, mineral salts and efficiency of glucose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 2:357-352.
- CROMIE, S. & H.W. DOELLE, 1981. Nutritional effects on the kinetics of ethanol production from glucose by *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11:116-119.
- CROMIE, S. & H.W. DOELLE, 1982. Limitations in substrate utilization efficiency by *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:69-73.
- CRUZ, M.R. & W. BORZANI, 1980. Fermentação alcoólica de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas* (Ensaio preliminares). Revista Brasileira de Tecnologia 11:51-57.
- CYSEWSKI, G.R. & C.R. WILKE. Fermentation kinetics and process economics for the production of ethanol. Ph.D. Thesis, University of California at Berkeley, march 1976.
- CYSEWSKI, G.R. & C.R. WILKE, 1977. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. Biotechnol. Bioeng. 19: 1125- 1143.
- DAUGULIS, A.J., T.A. KRUG & C.E.T. CHOMA, 1985. Filament formation and ethanol production by *Zymomonas mobilis* in adsorbed cell bioreactors. Biotechnol. Bioeng. 27:626-631.

- DAWES, E.A. & D.W. RIBBONS, 1966. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: Formation of levan. Biochem. J. 98:808-812.
- DAWES, E.A. & P.J. LARGE, 1970. Effect of starvation on the viability and cellular constituents of *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. J. Gen. Microbiol. 60:31-42.
- DIEZ, M.C. Avaliação da utilização de beterraba açucareira para produção de etanol via fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4. Viçosa. 1988. 80 p. Tese (Mestre). Universidade Federal de Viçosa.
- DIEZ, M.C. & I.M. de MANCILHA, 1990. Utilização de beterraba açucareira para obtenção de etanol via fermentação por *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces uvarum* IZ 1904. Arq. Biol. Tecnol. 33(4):915-924.
- DIEZ, M.C. & F. YOKOYA, 1990. Programa que determina a derivada de uma função experimental: aplicável a cálculos de parâmetros cinéticos de fermentação. Abs. VI Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Curitiba, Paraná. p:87.
- DIEZ, M.C., F. YOKOYA & P.R. CARVALHO, 1991. Produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis*. Arq. Biol. Tecnol. 34(3/4):375-380.
- DOELLE, H.W., 1982. The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15:20-24.
- DOELLE, H.W. & A.N. Mc GREGOR, 1983. The effect of high ethanol and CO₂ concentrations on the ultrastructure of *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:44-48.
- DOELLE, H.W. & P.F. GREENFIELD, 1985a. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 22: 405-410.
- DOELLE, H.W. & P.F. GREENFIELD, 1985b. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 411-415.
- DOELLE, M., R. MILLICHIP & H.W. DOELLE, 1989. Production of ethanol from Corn using Inoculum Cascading of *Zymomonas mobilis*. Process Biochemistry. August 137-140.
- DOELLE, M.B. & H.W. DOELLE, 1990a. Sugar-cane molasses fermentation by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:31-35.
- DOELLE, H.W. & M.B. DOELLE, 1990b. Prospects for the use of *Zymomonas mobilis* in a sugar cane ethanol industry. Proceedings 9th Australian Biotechnology Conference. Gold Coast. Queensland. Australia:272-277.

- DOELLE, H.W., L.D. KENNEDY & M.B. DOELLE, 1991. Scale-up of ethanol production from sugar cane using *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 13(2):131-136.
- DUVNJAK, Z., N. KOSARIK & S. KLIZA, 1982. Production of alcohol from Jerusalem artichoke by yeast. Biotechnol. Bioeng. 24:2297-2308.
- EMBRAPA, 1983. Energia. Programa Nacional de Pesquisa de Energia. 2 ed. Brasília, D.F., p:54-57.
- ENDO, I. & I. INOUE, 1977. A fundamental research of fed-batch fermentation. Topics in Biochemical Engineering 2(1): 583-588.
- FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION of the UNITED NATIONS. F.A.O., 1990. Production Yearbook.
- FAVELA TORRES, E., J. ALLAIS & J. BARATTI, 1986. Kinetics of batch fermentations for ethanol production using *Zymomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice. Biotechnol. Bioeng. 28:850-856
- FAVELA TORRES, E. & J. BARATTI, 1987. The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:121-128.
- FEIN, J.E., D.L. BARBER, R.C. CHARLEY, T.J. BEVERIDGE & H.C. LAWFORD, 1984. Effect of commercial feedstocks on growth and morphology of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 6:123-128.
- FIESCHKO, J. & A.E. HUMPHREY, 1983. Effect of temperature and ethanol concentration on the maintenance and yield coefficient of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. 25:1655-1660.
- GIBBONS, W. & C. WESTBY, 1984. A continuous, Farm-Scale, solid- phase fermentation process for fuel ethanol and protein feed production from fodder beets. Biotechnol. Bioeng. 26:1098-1107.
- GIBBONS, W. & C. WESTBY, 1986. Effect of pulp pH solid phase fermentation of fodder beets for fuel ethanol production. Biotechnol. Lett. 8 (9):657-662.
- GRAY, W.D., 1945. The sugar tolerance of four strains of distiller's yeast. J. Bact. 49:445-452.
- GROTE, W., K.J. LEE, & P.L. ROGERS, 1980. Continuous ethanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 2:481-486.
- HARRISON, J.S. & GRAHAM. Yeast in distillery practice. In:ROSE, A.H. & J.S. HARRISON. The Yeast, Academic Press, 1970. v.3. 298 p.

- HOPPE, G.K. & G.S.HANSFORD, 1982. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. Biotechnol. Lett. 4 (1):39-44.
- HOPPNER, T.C. & H.W. DOELLE, 1983. Purification and kinetics characteristics of pyruvate decarboxilase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:152-157.
- INGRAM, L.O. & T.M. BUTTKE, 1984. Effects of alcohols on microorganisms. Adv. Microbiol. Physiol. 25:256-300.
- INGRAM, L.O., V.C. CAREY, K.M. DOMBEK, A.S. HOLT, W.A. HOLT, Y.A. OSMAN & S.K. WALIA, 1984. Biochemical and genetic improvement of *Zymomonas mobilis*. Biomass 6:131-143.
- ITAL, 1987. Análises Químicas de Alimentos. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas.
- ISHIKAWA, H. & H. TANAKA, 1992. Effect of ventilation on the production of acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. J. Ferment. Bioeng. 73 (4):297-302.
- JAIN, V.K., I. TORAN-DIAZ & J. BARATTI, 1985. Preparation and characterization of immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. Biotechnol. Bioeng. 27:273-279.
- JÖBSES, I.M.L., G.T.C. EGBERTS, A. van BAALEN & J.A. ROELS, 1985. Mathematical modelling of growth and substrate conversion of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35 °C. Biotechnol. Bioeng. 27:984-995.
- JONES, R.P., N. PAMMENT & P.F. GREENFIELD, 1981. Alcohol fermentation by yeast—the effect of environmental and other variables. Process biochemistry 16(1):42-49.
- JU, N.J., D. DAMIANO, C.S. SHIN, N.K. KIM & S.S. WANG, 1983. Continuous ethanol fermentation of *Zymomonas mobilis* using soy flour as a protective agent. Biotechnol. Lett. 5:837-842.
- KING, F.G. & M.A. HOSSAIN, 1982. The effect of temperature, pH and initial glucose concentrations on the kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. Biotechnol. Lett. 4:531-536.
- KIRBY, K.D. & C.J. MARDOM, 1980. Solid phase fermentation for intermediate scale ethanol production. Proc. IV Int. Symp. Alc. Fuels Tech. Guarujá SP, Brasil. v.1. p:13-19.

- KLEIN, J. & B. KRESSDORF, 1983. Improvement of productivity and efficiency in ethanol production with Ca-alginate immobilized *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 5:497-502.
- KOLIOS, G., M. LEKKA, M.A. TYPAS & C. DRAINAS, 1989. Bioconversion of fruit and sugar beet extracts by *Zymomonas mobilis* to ethanol and other fine chemicals. J. Ferment. Bioeng. 67(5):363-365.
- KOSARIC, N., D.C.M. NG, I. RUSSEL & G.S. STEWART, 1980. Ethanol production by fermentation: An alternative liquid fuel. Adv. Appl. Microbiol. 26:147-227.
- KOSARIC, N., S.L. ONG & Z. DUVNJAK, 1982. Fuel alcohol biosynthesis by *Zymomonas anaerobia*: Optimization studies. Biotechnol. Bioeng. 24:691-701.
- KOSARIC, N., A. WIECZOREK & S. KLIZA, 1983. Ethanol production from fodder beets. Biotechnol. Bioeng. 25:1737-1745.
- KOSHIMIZU, L.H., E.I. VALDEOLIVAS GOMEZ, C.L. BUENO NETTO, M.R. MELO CRUZ, M.L.R. VAIRO & W. BORZANI, 1984. Constant fed-batch ethanol fermentation of molasses. J. Ferment. Technol. 62:205-210.
- LAUDRIN, I. & G. GOMA, 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*: Effect of temperature on cell growth, ethanol production and intracellular ethanol accumulation. Biotechnol. Lett. 4:537-542.
- LAVERS, B.H., P. PANG, C.R. MACKENZIE, G.R. LAWFORD, J.R. PIK, & H.G. LAWFORD, 1980. Industrial alcohol production by high performance bacterial fermentation. Abs. VI Int. Fermentation Symposium, Canada, p:195-200.
- LAWFORD, G.R., B.H. LAVERS, D. GOOD, R. CHARLEY & J. FEIN, 1982. *Zymomonas* ethanol fermentation: Biochemistry and bioengineering. In: The Royal Society of Canada Int. Symp. on ethanol from biomass. Canada. p:482-506.
- LEE, K.J., D.E. TRIBE, & P.L. ROGERS, 1979. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. Biotechnol. Lett. 1(10):421-426.
- LEE, K.J., M. LEFEBVRE, D.E. TRIBE, & P.L. ROGERS, 1980. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis* using continuous cell recycle. Biotechnol. Lett. 2(11):487-492.
- LEE, K.J., M.L. SKOTNICKI, D.E. TRIBE, & P.L. ROGERS, 1981a. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 3:291-296.

- LEE, K.J., J.C. WOODARD, R.J. PAGAN, & P.L. ROGERS, 1981b. Vacuum fermentation for ethanol production using strains of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 3(4):177-182.
- LEFEBVRE, M.F., L. MULLER, D. BATSTONE, & R. JOHNSON, 1982. (Proc) Desalting techniques for the fermentation industry, Fifth Australian Biotechnology Conference, Aug 25-27, Sydney. p:175.
- LEIGH, D., R.K. SCOPES, & P.L. ROGERS, 1984. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol. Biotechnol. 20:413-415.
- LETOURNEAU, F. & P. VILLA, 1987. *Saccharomyces* yeast growth on beet molasses effects of substrate concentration on alcohol toxicity. Biotechnol. Lett. 9(1):53-58.
- LIMA, U., E. AQUARONE, & W. BORZANI. Biotechnologia. Tecnologia das Fermentações v.1. 1975.
- LOPES, C.E., G.M.T. CALAZANS, E.M.M.M. RIOS & T.F. CARLOS, 1991. On the effect of temperature and pH on the settling behaviour of a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 13(1):43-46.
- LYNESS, E.W. & H.W. DOELLE, 1980. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Z. mobilis* strains. Biotechnol. Lett. 2:549-554.
- LYNESS, E.W. & H.W. DOELLE, 1981. Fermentation pattern of sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. 23:1449-1460.
- LYNESS, E.W. & H.W. DOELLE, 1983. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 5:345-350.
- MANCILHA, I.M.de, A.M. PEARSON, J. WALLER & G.J. HOGABOAM, 1984. Increasing alcohol yield by selected yeast fermentation of sweet sorghum I. Evaluation of yeast strains for ethanol production. Biotechnol. Bioeng. 26:632-634.
- MARGARITIS, A. & P. BAJPAI, 1982. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*) using *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces rosei*. Biotechnol. Bioeng. 24:941-953.
- MENEZES, T.J.B. Ethanol, combustível do Brasil. Ed. Agronômica Ceres Ltda. S, o Paulo, 1980. 229 p.
- MILLAR, D.G., K. GRIFFITHS-SMITH, E. ALGAR & R.K. SCOPES, 1982. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. Biotechnol. Lett. 4:601-606.

- MILLICHIP, R. & H.W.DOELLE, 1989. Large-scale ethanol production from milo (Sorghum) using *Zymomonas mobilis*. Process Biochemistry. August. p:141-145.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3):426-428.
- MOULLIN, G., H. BOZE & P. GALZY, 1984. Inhibition of alcoholic fermentation. Biotechnol. Genetic Eng. Rev. 2:365-382.
- MURPHY, N.F.de, 1984. Fermentation of high test molasses. Sugar y azúcar, sept. p:37-44.
- MURPHY, N.F., 1988. *Zymomonas mobilis* batch and fed-batch fermentation of high test molasses ethanol production. J. Agric. Univ. PR , 72:485-488.
- NELLAIAH, H., T. KARUNAKARAN & P. GUNASEKARAN, 1988. Ethanol fermentation by an efficient strain, NRRL B-4286, of *Zymomonas mobilis*. J. Ferment. Technol. 66(2):219-223.
- NIPKOW, A., B. SONNLEITNER & A. FIECHTER, 1985. Effect of carbon dioxide on growth of *Zymomonas mobilis* in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21:287-291.
- OLBRICH, H. Melazas. In: HONIG, P. ed. Principios de tecnología azucarera. Tomo III Comp. Ed. Continental S.A., Mexico, 1974. Cap. 11. p:425-575.
- O'MULLAN, P., M. SKAKACS-DOBOZI & D.E. EVELEIGH, 1991. Identification of saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4. Biotechnol. Lett. 13(2):137-142.
- OSMAN, Y.A. & L.O. INGRAM, 1985. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. J. Bacteriol. 164:173-180.
- OURA, E. Biomass from carbohydrates. In: REHM, H.J. & G. REED ed. Biotechnology Vol 3. Dellweg, H. ed. Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I, energy from renewable resources. 1983. p:1-41.
- PANKOVA, L.M., Y.E. SHVINKA, M.E. BEKER & E.E. SLAVA, 1985. Effect of aeration on *Zymomonas mobilis* metabolism. Microbiology 54:120-123.
- PARK, S.C. & J. BARATTI, 1992. Continuous ethanol production from sugar beet molasses using an osmotolerant mutant strain of *Zymomonas mobilis*. J. Ferment. Bioeng. 73(1):16-21.
- PARK, K.Y., M.P.L. MORTATTI & H.H. SATO, 1983. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. Biotechnol. Lett. 5:515-518.

- PEARSON, D. The Chemical Analysis of Foods. 7 ed., 1976. 575 p.
- PERINGER, P. & H.T. BLACHERE, 1979. Modeling and optimal control of Bakers Yeast production in repeated fed batch culture. Biotechnol. Bioeng. Symposium. 9:205-213.
- PINCUS, R., J.T. CHASE, D.H. EVELEIGH & B.S. MONTENECOURT, 1980. Production of ethanol by *Zymomonas mobilis*. New Brunswick, Cook Coll., Rutgers Univ., 80th Annual Meeting, May:11-16.
- PIRT, S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publication. 274 p.
- PRINCE, J.G. & J.P. BARDFORD, 1982. Tower fermentation using *Zymomonas mobilis* for ethanol production. Biotechnol. Lett. 4:525-530.
- RAO, S.C. & L.P. JONES, 1987. Formation of higher alcohols and phenol by strains of *Zymomonas sp.* Acta Biotechnol. 7:209-219.
- RHEE, S.K. R.J. PAGAN, M.F. LEFEBVRE, L. WONG & P.L. ROGERS, 1984. Ethanol production from desalted molasses using *Saccharomyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*. J. Ferment. Technol. Vol. 62(3):297-300.
- RIBBONS, D.E., E.A. DAWES & D.A. REES, 1962. Levan formation by *Z. mobilis*. Biochem. J. 82:45p.
- ROGERS, P.L., K.J. LEE & D.E. TRIBE, 1979. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. Biotechnol. Lett. 1(10):165-170.
- ROGERS, P.L., D. PHIL, K.J. LEE & D.E. TRIBE, 1980. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. Process. Biochemistry, 15:7-11.
- ROGERS, P.L., K.J. LEE, M.L. SKOTNICKI & D.E. TRIBE, 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Adv. Biochem. Eng. 23:37-84.
- ROGERS, P.L., M.L. SKOTNICKI, K.J. LEE & J.H. LEE, 1984. Recent developments in the *Zymomonas* process for ethanol production. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 1:273-288.
- RUBIO, M.C. & A.R. NAVARRO, 1989. Effect of agitation on the kinetic variables of alcoholic fermentation in batch culture. Int. Sugar J. 91:171-177.
- SANTOS, J.P., 1985. Tecnologia e desenvolvimento no setor sucro- alcooleiro. Brasil Açucareiro. 103(1):43-47.
- SÉRVULO, E.F.C. & F.P.de FRANÇA, 1986. Fermentação alcoólica de caldo de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis*. Rev. Microbiol. 17(4):376-384.

- SILMAN, R.W., 1984. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in fed-batch fermentations. Biotechnol. Bioeng. 26:247-251.
- SOLS, A., C. GONCEDO & G. DE LA FUENTE. Energy yielding metabolism in yeast. In: ROSE, A.H. & J.S. HARRISON ed. The Yeast, Academic Press, Inc., 1971. p:271-307.
- SKOTNICKI, M.L., K.J. LEE, D.E. TRIBE & P.L. ROGERS, 1981a. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* Strains. Appl. Env. Microbiol. 41(4):889-893.
- SKOTNICKI, M.L., K.J. LEE, D.E. TRIBE & P.L. ROGERS, 1981b. In: Genetic Engineering of Microorganisms for Chemical. p:271-290. Eds. A.H. Hollaender et alii, Plenum Press (New York).
- SKOTNICKI, M.L., R.G. WARR, A.E. GOODMAN, K.J. LEE & P.L. ROGERS, 1983. High productivity alcohol fermentations using *Zymomonas mobilis*. Biochem. Soc. Symp. 48:53-86.
- SREEKUMAR, O. & S.C. BASAPPA, 1991. Characterization of a sugar thermotolerant mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 for ethanol production in glucose medium. Biotechnol. Lett. 13(5):365-370.
- SREEKUMAR, O. & S.C. BASAPPA, 1992. Effect of calcium and sodium salts on ethanol production in high sugar fermentation by free cells of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 14(6):511-514.
- STEVNSBORG, N. & H.G.LAWFORD, 1986. Performance assessment of two patent strains of *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:106-115.
- STEVNSBORG, N., H.G.LAWFORD, N. MARTIN & T. BEVERIDGE, 1986. Effect of growth temperature on an morphology and performance of *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in batch and continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:116-123.
- STOUTHAMER, A.H. Energy-yielding pathways. In: RUSTON, L.N. & J.R. SOKATTCH ed. The bacteria: a treatise on structure and function. Academic Press, Inc., 1978. p:398-462.
- STUPIELLO, J. P. & J. HORII, 1981. Condução da fermentação alcoólica. Saccharum. 4(17):43-46.
- SWINGS, J. & J. DELEY, 1977. The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Reviews. 41(1):1-46

- TANAKA, H., H. ISHIKAWA, K. OSUGA & Y. TAKAGI, 1990. Fermentative ability of *Zymomonas mobilis* under various oxygen supply conditions in batch culture. J. Ferment. Bioeng. 69(4):234-239.
- TORAN-DIAZ, I., C. DELEZON & J. BARATTI, 1983. The kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* on fructose medium. Biotechnol. Lett. 5:409-412.
- TORAN-DIAZ, I., V.K. JAIN & J.C. BARATTI, 1984. Ethanol production from fructose in continuous culture by free and flocculent cells of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 6:389-394.
- VAN VUUREN, H.J.J. & L. MEYER, 1982. Production of ethanol from sugar cane molasses. Biotechnol. Lett. 4(4):253-256.
- VALSECHI, O. & E.R. OLIVEIRA, Tecnologia do álcool. Piracicaba. ESALQ/USP. 1968. 275 p
- VASCONCELOS, J.N.de, 1985. Estudo sobre a composição química de melações do Estado de Alagoas. STAB maio/junho:45-51.
- VIIKARI, L. 1984a. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:252-255.
- VIIKARI, L. 1984b. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:118-123.
- VIIKARI, L. & R. GISLER, 1986. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:240-244.
- VIIKARI, L. & M. LINKO, 1986. Rate and yield limiting factors in continuous fermentations of sucrose by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 8(2):139-144.
- WARR, R.G., A.E. GOODMAN, P.L. ROGERS & M.L. SKOTNICKI, 1984. Isolation and characterization of highly productive strains of *Zymomonas mobilis*. Microbios. 41:71-78.
- WECKER, M.S.A. & R.R. ZALL, 1987. Production of acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. Appl. Env. Microbiol. 53:2815-2820.
- WINTON, K.B. & A.L. WINTON, 1958. Análisis de Alimentos. Editorial Hispanoamericana, Barcelona.
- YAMANE, T., W. HIBINO, K. ISHIHARA, Y. KADOTANI & M. KOMINAMI, 1992. Fed-batch culture automated by uses of continuously measured cell concentration and culture volume. Biotechnol. Bioeng. 39(5):550-555.

- YOSHIDA, Y., R. SUZUKI & Y. YAGI, 1990. Production of levan by *Zymomonas* sp. J. Ferment. Bioeng. 70 (4):269-271.
- ZACHARIOU, M. & R. SCOPES, 1985. Gluconate kinase from *Zymomonas mobilis*. Biochem Int. 10:367-371.
- ZACHARIOU, M. & R.K. SCOPES, 1986. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J. Bact. 167:863-869.