

"ESTUDO COMPARATIVO DA FERMENTAÇÃO  
DE GLICOSE E SACAROSE POR  
*Zymomonas mobilis*"

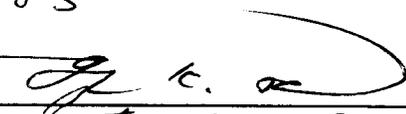
04/85

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final  
da Tese defendida por Maria da Penha  
Longo Mortatti e aprovada pela Comissão  
Examinadora em 28.3.85  
Campinas, 28 de março/85.

  
Presidente da Banca

"Estudo comparativo da fermentação

de glicose e sacarose por *Zymomonas mobilis*"

Maria da Penha Longo Mortatti

Orientador:

Prof. Dr. Yong Kun Park

Tese apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos e Agrí-  
cola da Universidade Estadual  
de Campinas para obtenção do  
grau de Mestre em Ciência de  
Alimentos.

1985

Aos meus pais,  
Rosina e Vinício

Às minhas irmãs,  
Maria de Lourdes e Maria do Rosário

Ao meu irmão,  
Renato

Ao meu marido,  
Wilson

e a Daniela e Juliana

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park pela dedicada orientação.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, através de sua Direção e Coordenadoria de Pós-Graduação, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pela colaboração prestada na discussão dos resultados.

Aos amigos do laboratório de bioquímica: Sílvia, Gláucia, Regina, Dora, Lúcia, Hélia, Marilena, Célia, Ingrid, Raul, Walter e Rubens pela amizade e ânimo sempre presentes.

E também a Tânia, Paula, Marta, Rosinha, Aldionso, Thebano, Fernando e a todos os outros amigos, cujos incentivos foram muito valiosos para a realização deste trabalho.

Ao pessoal da Biblioteca da FEAA pela excelente colaboração prestada.

À minha irmã, Maria do Rosário, pela correção dos erros de português.

Ao Wilson, meu marido, pela elaboração do programa de computador para a realização dos cálculos envolvidos no trabalho e também pela sua presença e constante incentivo nos momentos de dificuldade.

A Edina e Taka pelo trabalho de datilografia.

À Profa. Dra. Cecília Laluce, do Instituto de Química da UNESP, pelo meu encaminhamento à UNICAMP.



3.2.10	-	Determinação da concentração de álcool etílico.	19
3.2.11	-	Determinação quantitativa de levano.....	20
3.2.12	-	Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	21
3.2.13	-	Determinação da atividade da enzima hidrolizante da sacarose.....	21
3.2.14	-	Purificação da enzima hidrolizante da sacarose.	22
3.2.15	-	Efeito do pH na atividade da enzima hidrolizante da sacarose.....	23
3.2.16	-	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da enzima hidrolizante da sacarose.....	23
3.2.17	-	Cromatografia descendente em papel.....	24
3.2.18	-	Utilização de glicose e frutose durante a fermentação alcoólica da sacarose pelo <i>Z. mobilis</i> NRRL B-14022 .....	24
CAPÍTULO IV	-	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1	-	Estudo da produção e indução da enzima hidrolizante da sacarose pelo <i>Z. mobilis</i> .....	25
4.2	-	Seleção da linhagem para fermentação alcoólica da sacarose.....	26
4.3	-	Estudo do crescimento e produção de etanol pelo <i>Z. mobilis</i> NRRL B-14022.....	27
4.3.1	-	Efeito da temperatura e diferentes concentrações iniciais de glicose sobre a fermentação alcoólica.....	27
4.3.2	-	Efeito da temperatura e diferentes concentrações iniciais de sacarose sobre a fermentação alcoólica.....	29
4.3.3	-	Estudo dos parâmetros cinéticos da fermentação de <i>Z. mobilis</i> NRRL B-14022 em meio de glicose .	31

4.3.4	-	Estudo dos parâmetros cinéticos da fermentação de <i>Z. mobilis</i> NRRL B-14022 em meio de sacarose .....	33
4.4	-	Estudo comparativo dos parâmetros cinéticos das fermentações de <i>Z. mobilis</i> NRRL B-14022 em meios de glicose e sacarose .....	35
4.4.1	-	Efeito de inibição pelo substrato e produto formado .....	37
CAPÍTULO V	-	CONCLUSÕES .....	65
BIBLIOGRAFIA		.....	66

## NOMENCLATURA

$\mu$	taxa específica de crescimento (1/hr)
$q_p$	taxa específica de formação de produto (g/g/hr)
$Y_{p/s}$	rendimento de etanol (g/g)
$Y_{x/s}$	rendimento de massa celular (g/g)
$\mu_{\text{máx}}$	valor máximo da taxa específica de crescimento (1/hr)
$q_{p \text{ máx}}$	valor máximo da taxa específica de formação de produto (g/g/hr)
$S_0$	concentração inicial de substrato.

## ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA I - Indução da enzima hidrolizante da sacarose em vários açúcares.
- TABELA II - Parâmetros cinéticos para a fermentação de *Z. mobilis* NRRL B-14022 em cultura descontínua, empregando diversas concentrações de glicose e sacarose e diferentes temperaturas.
- TABELA III - Valores das constantes de inibição pelo etanol produzido durante a fermentação pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Efeito do pH na atividade da enzima hidrolizante da sacarose.
- FIGURA 2 - Efeito da temperatura na atividade da enzima hidrolizante da sacarose.
- FIGURA 3 - Cromatografia em papel - hidrólise da sacarose pela enzima hidrolizante da sacarose (EHS) de *Z. mobilis*
- FIGURA 4 - Cromatografia em papel - hidrólise da rafinose pela E.H.S. de *Z. mobilis*.

- FIGURA 5 - Cromatografia em papel - hidrólise da *melezitose* pela E.H.S. de *Z. mobilis*.
- FIGURA 6 - Seleção da melhor linhagem para fermentação alcoólica da sacarose.
- FIGURA 7 - (a,b,c) - Efeito da temperatura e diferentes concentrações iniciais de glicose sobre a fermentação alcoólica da linhagem *Z. mobilis* NRRL B-14022.
- FIGURA 8 - (a,b,c) - Efeito da temperatura e diferentes concentrações iniciais de sacarose sobre a fermentação alcoólica da linhagem *Z. mobilis* NRRL B-14022.
- FIGURA 9 - Cromatografia em papel do substrato sacarose, durante a fermentação pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.
- FIGURA 10 - Variação da taxa específica de crescimento com o tempo, durante a fermentação de glicose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.
- FIGURA 11 - Variação da taxa específica de formação de produto com o tempo, durante a fermentação de glicose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.
- FIGURA 12 - Efeito da temperatura e da concentração inicial de glicose sobre  $\mu_{\text{máx}}$  e  $q_p \text{ máx}$ .
- FIGURA 13 - Efeito da temperatura e da concentração inicial de glicose sobre  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/s}$ .

- FIGURA 14 - Variação da taxa específica de crescimento com o tempo, durante a fermentação de sacarose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.
- FIGURA 15 - Variação da taxa específica de formação de produto com o tempo, durante a fermentação de sacarose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.
- FIGURA 16 - Efeito da temperatura e da concentração inicial de sacarose sobre  $\mu_{\text{máx}}$  e  $q_p \text{ máx}$ .
- FIGURA 17 - Efeito da temperatura e da concentração inicial de sacarose sobre  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/s}$ .
- FIGURA 18 - Exemplo da determinação das "constantes de inibição pelo etanol produzido" ( $K_p^I$ ) durante as fermentações pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.

## R E S U M O

A linhagem de *Zymomonas mobilis* NRRL B-806 apresentou a maior atividade da enzima hidrolizante da sacarose (E.H.S.) em um meio contendo frutose, quando foi comparada com as outras linhagens testadas. Essa enzima extracelular hidrolizou rafinose e sacarose mas não hidrolizou melezitose, assemelhando-se à uma  $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutohidrolase (E.C. 3.2.1.26).

A linhagem de *Z. mobilis* NRRL B-14022 é capaz de crescer bem em um meio contendo sacarose e produzir a enzima hidrolizante da sacarose. Essa linhagem fermentou sacarose à etanol mais rapidamente do que as outras linhagens testadas e foi, portanto, selecionada para o estudo comparativo da fermentação de glicose e sacarose.

Para esse estudo comparativo, empregou-se glicose e sacarose nas respectivas concentrações de 100 a 200 g/L e temperaturas de incubação de 30 e 35°C. Os parâmetros cinéticos  $\mu_p$ ,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{x/s}$  foram calculados. Verificou-se que essa linhagem fermentou a glicose à etanol mais eficientemente do que a sacarose. O melhor rendimento de etanol a partir de glicose foi obtido com a concentração do substrato de 200 g/L e temperatura de 30°C. Nas fermentações realizadas com sacarose, o melhor rendimento de etanol foi obtido com a concentração inicial de sacarose de 100 g/L e temperatura de 35°C. Os valores das taxas específicas de crescimento,  $\mu_{m\acute{a}x}$ , para as fermentações de glicose são menores quando comparados com aqueles obtidos das fermentações com sacarose.

Durante a fermentação da sacarose a 30°C

por esse microrganismo, observou-se a produção de levano. A formação de levano foi inibida quando a fermentação foi realizada a 35°C.

A concentração de açúcares residuais no final das fermentações com sacarose, à temperatura de 30°C, foi mais elevada em comparação com as fermentações de glicose. No caso das fermentações de sacarose a 35°C, a concentração de açúcares residuais foi ligeiramente menor em relação à fermentação a 30°C. E nas fermentações de glicose a 35°C, a concentração de açúcares residuais foi bastante elevada em comparação com a fermentação a 30°C.

## S U M M A R Y

*Z. mobilis* NRRL B-806 produced more sucrose hydrolysing enzyme (S.H.E.) on medium containing fructose than other tested strains. This extracellular enzyme hydrolysed sucrose and raffinose, but did not hydrolyse melczitose resembling a  $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase (E.C. 3.2.1.26).

*Z. mobilis* NRRL B-14022 is able to grow in a medium containing sucrose and produces the sucrose hydrolysing enzyme. This strain rapidly utilized sucrose to ethanol as compared to other tested strains. Therefore this strain was used for comparison of fermentation of glucose and sucrose.

Comparative fermentation of glucose and sucrose was studied by fermentating respective glucose and sucrose concentration 100~200 g/L at 30 and 35°C by this microorganism. Kinetic parameters  $\mu$ ,  $q_p$ ,  $Y_{p/s}$  and  $Y_{x/s}$  were estimated. The results demonstrated that yields of ethanol from glucose were higher than sucrose fermentation. Highest ethanol yield of glucose was obtained when concentration of substrate 200 g/L was fermented at 30°C. In the case of sucrose fermentation, highest yield was obtained when sucrose concentration 100 g/L was fermented at 35°C. Values of maximum specific growth rate,  $\mu_{m\bar{a}x}$ , for glucose fermentations were lower than sucrose fermentations.

Sucrose fermentation by this microorganism, produced levan at 30°C, whereas formation of levan was inhibited at 35°C.

Concentrations of residual sugars after fermentation of sucrose at 30°C, were higher than when glucose

was used. In the case of fermentation of sucrose at 35<sup>0</sup>C, the concentrations of residual sugars were slightly decreased as compared with 30<sup>0</sup>C. In fermentation of glucose at 35<sup>0</sup>C the concentrations of residual sugars were increased markedly in comparison with 30<sup>0</sup>C.

CAPÍTULO I  
INTRODUÇÃO

O grande interesse atual pela utilização de álcool como combustível tem estimulado muitas pesquisas sobre vários aspectos dos processos fermentativos. Algumas modificações nas técnicas já existentes, tais como o aprimoramento dos processos de fermentação tradicional com leveduras e o estudo de fontes naturais e renováveis, cuja conversão a etanol seja viável economicamente, têm sido avaliadas.

Outra consideração importante está relacionada ao microrganismo produtor de etanol. A bactéria *Z. mobilis* tem-se revelado um microrganismo promissor para a produção de etanol, pois apresenta algumas vantagens sobre a fermentação tradicional com leveduras, tais como: taxas específicas de consumo de substrato e de produção de etanol mais elevados e melhores rendimentos.

Para a produção industrial de álcool é necessário também que o microrganismo apresente algumas propriedades para diminuir o custo das fermentações, como por exemplo a capacidade de crescer a altas concentrações de açúcar e ter elevada tolerância ao etanol.

Têm surgido alguns trabalhos pesquisando a produção de etanol a partir dos substratos fermentáveis pelo *Z. mobilis* — glicose, frutose e sacarose. Não se tem conhecimento, no entanto, de estudos comparativos entre as fermentações realizadas em glicose e sacarose.

Como o Brasil é um grande produtor de sacaro

se, a produção de etanol a partir desse substrato tem grande significação, sendo, portanto, o objetivo deste trabalho comparar a fermentação de glicose e sacarose por uma linhagem de *Z.mobilis* seleccionada.

CAPÍTULO II  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A identificação representativa de *Zymomonas* foi atribuída a Lindner em 1924, mas BARKER e HILLIER (1911) foram os primeiros a estudar uma bactéria que era responsável pela deterioração do sabor e *flavour* de bebidas fermentadas, sendo a eles atribuída a real descoberta desse gênero. LINDNER (1928) deu o nome de *Termobacterium mobile* a seu isolado.

A bactéria foi posteriormente denominada *Pseudomonas lindneri* por KLUYVER e HOPPENBROUWERS (1931). A partir de 1936, a bactéria foi fixada no gênero *Zymomonas* (KLUYVER e VAN NIEL, 1936) e KluYver inseriu o gênero na 7a. edição do Bergey's Manual (1957), propondo duas espécies: *Zymomonas mobilis* e *Zymomonas anaerobia*.

Na 8a. edição do Bergey's Manual (1974), o gênero *Zymomonas* ficou dividido em: *Z. mobilis* (Lindner)KluYver e Van Niel; *Z. anaerobia* (Shimwell)KluYver; *Z. anaerobia* var. *anaerobia* (Shimwell)Carr; *Z. anaerobia* var. *immobilis* (Shimwell)Carr; *Z. anaerobia* var. *pomaceae* (Millis). O gênero está inserido na Parte 8 do Bergey's Manual, como gênero de afiliação incerta.

SWINGS e DE LEY (1975) e DE LEY e SWINGS (1976) reexaminaram muitas características de um grande número de linhagens de *Zymomonas*, utilizando métodos mais modernos e propuseram nova classificação taxonômica para *Zymomonas* (Swings e De Ley, 1976): *Z. mobilis* subsp. *mobilis* (KluYver e Van Niel)De Ley e Swings, 1976; *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* (Millis)De Ley e Swings, 1976.

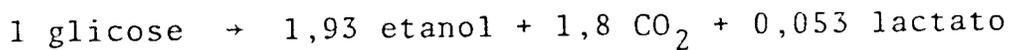
## 2.1 - Características fisiológicas

Zymomonas são bastonetes gram-negativos, com 2 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento por 1 a 1,4  $\mu\text{m}$  de largura, geralmente ocorrendo aos pares e não formam esporos. Se m $\acute{o}$ teis, t $\acute{e}$ m de um a quatro flagelos polares e a motilidade pode ser perdida espontaneamente. S $\acute{a}$ o organismos anaer $\acute{o}$ bios, mas que toleram algum oxig $\acute{e}$ nio. N $\acute{a}$ o  $\acute{e}$  observado o crescimento em  $\acute{a}$ gar nutriente ou caldo nutriente. As c $\acute{e}$ lulas requerem pantotenato e biotina para o crescimento. Crescem e fermentam glicose e frutose com produ $\acute{c}$ o de quantidades equimolares de etanol e  $\text{CO}_2$ , sendo que algumas linhagens utilizam a sacarose. Pouco  $\acute{a}$ cido l $\acute{a}$ ctico e tra $\acute{c}$ os de acetilmetilcarbinol s $\acute{a}$ o formados. Muitas linhagens toleram altas concentra $\acute{c}$ oes de glicose, na propor $\acute{c}$ o de 20% at $\acute{e}$  40%; s $\acute{a}$ o tolerantes tamb $\acute{e}$ m ao etanol na concentra $\acute{c}$ o de 7,7 a 10% de etanol. Zymomonas tamb $\acute{e}$ m pode crescer a baixos valores de pH; entretanto, o pH  $\acute{o}$ timo para o crescimento  $\acute{e}$  7,3, e o pH final depois de 3 dias a 30 $^{\circ}$  em um meio padr $\acute{o}$   $\acute{e}$  4,8 a 5,2. A temperatura na qual as c $\acute{e}$ lulas de Zymomonas podem crescer  $\acute{e}$  de 25 a 30 $^{\circ}$ C (SWINGS e DE LEY, 1977).

## 2.2 - Metabolismo dos carboidratos

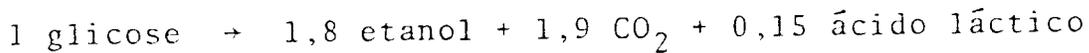
A fermenta $\acute{c}$ o quase quantitativa de glicose e frutose a etanol e di $\acute{o}$ xido de carbono  $\acute{e}$  considerada uma caracter $\acute{i}$ stica importante do g $\acute{e}$ nero Zymomonas. GIBBS e DeMOSS (1951, 1954) demonstraram que essa bact $\acute{e}$ ria utiliza, para o catabolismo anaer $\acute{o}$ bico desses carboidratos, uma modifica $\acute{c}$ o do mecanismo de Entner-Duodoroff, podendo produzir mais do que 1,9 mol de etanol por mol de glicose fermentada e pequena quantidade de lactato, de acordo

com a seguinte equação:



(GIBBS e DeMOSS, 1954)

Já o balanço molar da fermentação estudado por KLUYVER e HOPPENBROUWERS (1931) é o seguinte:



A descoberta do mecanismo de Entner-Duodoroff em *Zymomonas* foi surpreendente, pois foi o primeiro exemplo (e ainda é um dos poucos) de uma bactéria anaeróbica utilizando uma via que ocorre principalmente em bactérias estritamente aeróbias (KERS<sub>TER</sub>S e DE LEY, 1968).

BAUCHOP e ELSDEN (1960), estudando o crescimento do microrganismo em relação ao seu suprimento de energia, calcularam o rendimento molar de crescimento e sugeriram que somente um mol de ATP era produzido por mol de glicose fermentada pelo *Z. mobilis*, isto é, a fermentação pela via de Entner-Duodoroff rende metade da energia obtida pela glicólise.

Como foi citado, *Zymomonas* precisa de um açúcar fermentável no meio de cultura para o crescimento, podendo ser glicose ou frutose ou ainda, para algumas linhagens, sacarose. A característica de utilizar ou não a sacarose foi descrita por vários autores (KLUYVER e HOPPENBROUWERS, 1931; DADDS e col., 1973; RICHARD e CORBEY, 1974; SHIMWELL, 1950) como um fenômeno indutível específico de uma linhagem e sem valor taxonômico. O primeiro passo da quebra da sacarose deve inevitavelmente render glicose e frutose ou ambos. DAWES e col. (1966.a) e RIBBONS e col. (1962) estudaram importantes aspectos do mecanismo enzimático de quebra da sacarose e observaram: (a) que durante o crescimento do microrganismo

no meio de sacarose ocorre a formação de levano, um polissacarídeo contendo somente unidades de frutose; (b) que o coeficiente de rendimento de crescimento de *Z.mobilis* no meio contendo sacarose é apreciavelmente menor do que o mesmo coeficiente obtido em meios contendo concentrações equivalentes de glicose, frutose ou glicose mais frutose; (c) que esse baixo coeficiente obtido no meio contendo sacarose ocorre devido à formação de levano durante o crescimento; (d) e que *Zymomonas* produz levano de sacarose, mas não de glicose ou frutose ou uma mistura de ambos.

Os mesmos autores, em 1966.a, sugeriram então tentativamente que uma levano-sacarose pode ser a responsável tanto pela formação de levano como pela hidrólise da sacarose à glicose e frutose.

Anteriormente, MORTATTI e col. (1983) estudaram várias linhagens de *Z.mobilis* para comparar a capacidade de utilizar a sacarose e descrever algumas características da enzima hidrolizante de sacarose. Dentre as 6 linhagens estudadas, descreveram que a linhagem NRRL B-14022 é capaz de crescer e utilizar a sacarose mais rapidamente e que a atividade da enzima extracelular hidrolizante da sacarose é bastante elevada. Essa enzima é específica para grupos  $\beta$ -frutossil, assemelhando-se a uma  $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutohidrolase (E.C. 3.2.1.26).

Uma importante característica do metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas* é que, quando cultivada em meio complexo contendo grandes quantidades de peptona e extrato de levedura, 98% da glicose consumida é convertida em etanol, CO<sub>2</sub>, ATP e calor, e somente 2% é usado para material celular (SWINGS e DE LEY, 1977). No entanto, BELAICH e SENEZ (1965) demonstraram que metade do carbono celular é derivado dos 2% da glicose incorporada pelo *Z.mobilis* e que os amino-ácidos e/ou os vários constituin

tes orgânicos da peptona ou do extrato de levedura não são utilizados como fonte de energia para crescimento, mas como blocos construtivos para biossíntese.

### 2.3 - Meios de cultura para crescimento

O meio líquido padrão citado por SWINGS e DE LEY (1977) contém 0,5% de extrato de levedura e 2% de glicose; para o meio sólido adiciona-se 2% de ágar. KLUYVER e HOPPENBROUWERS (1931) recomendaram a adição de 2% de  $\text{CaCO}_3$  a esse meio.

SHIMWELL (1937) propôs o uso de um meio contendo cerveja mais 2% de glicose. Outros meios contendo caldo de peptona mais 2% de glicose e caldo nutriente ou ágar nutriente mais 2% de glicose também suportam bom crescimento (SWINGS e DE LEY, 1977).

O meio MYPG (WICKERHAM, 1951) contém 0,3% de extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar.

KLUYVER e HOPPENBROUWERS (1931) propuseram um meio sintético mínimo contendo 2% de glicose, 0,1% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 0,05% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

GIBBS e DeMOSS (1954) propuseram o meio contendo 1% de glicose, 1% de tryptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 98 ml + 2 ml de solução de sais com 0,8% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,16% de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,04% de NaCl e 0,04% de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### 2.4 - Fermentação - efeito do pH, temperatura e substratos

O grande interesse pela bactéria *Z. mobilis*

como produtor em potencial de álcool tem levado muitos pesquisadores a estudar a fermentação dos diferentes substratos, sob diversas condições, com a finalidade de aumentar a produtividade. Têm sido utilizadas técnicas tais como: fermentações em culturas descontínuas, em culturas contínuas, reciclagem de células, destilação a vácuo (CYSEWSKI e WILKE, 1977 e RAMALINGHAM e FINN, 1977), e também diferentes pH, temperaturas e concentrações de substrato.

LEE e col. (1979) e ROGERS e col. (1979, 1980) estabeleceram que *Z. mobilis* pode produzir etanol a taxas consideravelmente mais elevadas que as das leveduras e observaram produtividades extremamente elevadas em culturas contínuas com reciclagem de células.

Com o substrato glicose, vários pesquisadores (LEE e col., 1979, 1980.a; ROGERS e col., 1979, 1980; SKOTNICKI e col., 1980; DOELLE e LYNESS, 1980) têm investigado a cinética de produção de álcool pelo *Z. mobilis*, pois esta bactéria pode converter glicose a etanol rápida e eficientemente, com maiores taxas específicas de consumo do açúcar e de produção de etanol e com altos rendimentos e elevadas produtividades de etanol, em relação às leveduras usadas industrialmente.

O efeito da concentração inicial de glicose nos parâmetros cinéticos da fermentação foi investigado por ROGERS e col. (1979), LEE e col. (1979) e CROMIE e DOELLE (1981) e revelou que aumentos na concentração de glicose de 100 para 200 g/ℓ resultam em significativa diminuição na taxa específica de crescimento, no rendimento celular e rendimento de etanol. Elevadas concentrações de glicose (20 a 25%) conduzem a fermentações muito longas e incompletas em culturas descontínuas (ROGERS e col., 1979) e culturas contínuas (LEE e col., 1979). O efeito dessas elevadas concentrações de glicose na utilização da mesma deve-se à limita

ção na atividade catabólica sob essas condições (CROMIE e DOELLE, 1980), apesar de ter sido relatado que *Z.mobilis* pode tolerar concentrações iniciais de glicose mais elevadas que as leveduras (SWINGS e DE LEY, 1977).

KING e HOSSAIN (1982) observaram que a concentração inicial de glicose ótima é de 100 g/L e que a taxa específica de crescimento e o rendimento de etanol serão menores elevando-se a concentração acima dessa citada.

OHTA e col. (1981) estudaram a fermentação de *Z.mobilis* em meio sintético, a concentrações iniciais de glicose de 5 a 30% (w/v). Descreveram que a fermentação era rapidamente completada quando a concentração inicial de glicose era de 5% (w/v) e que um aumento na concentração inicial resultou em atraso na fermentação e em uma diminuição na concentração de etanol produzido.

Como descrito por Gibbs e DeMoss, *Z.mobilis* pode fermentar glicose, frutose ou sacarose e, diante das várias pesquisas realizadas, essa bactéria parece ter um potencial considerável para a produção de etanol em larga escala. Entretanto, é evidente que a glicose como matéria prima tem 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. Várias pesquisas foram desenvolvidas com o substrato sacarose, seja em meios de laboratório ou com fontes naturais.

LYNESS e DOELLE (1981.a) estudaram a fermentação descontínua da sacarose com duas linhagens de *Z.mobilis* e observaram que um aumento na concentração de sacarose afeta a velocidade específica de crescimento na linhagem  $Z_{10}$  bem como a atividade hidrolizante da sacarose para a linhagem  $Z_7$ , mas não influen

cia significativamente a formação de biomassa. Demonstraram que a hidrólise da sacarose pode ser independente da utilização da glicose; que, de acordo com a linhagem usada, a hidrólise da sacarose pode levar à acumulação significativa de glicose no meio; e que a velocidade de produção de etanol e o tempo de fermentação dependem da velocidade de catabolismo dos produtos de hidrólise da sacarose.

LEE e col. (1981.a) testaram uma linhagem de *Z.mobilis* com relação à fermentação em meio contendo 100 e 150 g/L de sacarose em cultura contínua e descreveram uma redução no rendimento de etanol – devido à formação de levano – e uma concentração final de etanol mais baixa. A inibição pelo etanol, no metabolismo da sacarose, também foi observada e essa inibição ocorre a uma concentração de etanol relativamente baixa, se comparada àquela concentração que inibe o metabolismo da glicose.

LYNESS e DOELLE (1981.b) estudaram uma linhagem de *Z.mobilis* – Z.M.<sub>7</sub> – capaz de fermentar de 100 a 200 g/L de sacarose no caldo de cana a etanol, sem adição de cofatores ou sais minerais.

VAN VUUREN e MEYER (1982) pesquisaram linhagens de *Z.mobilis*, comparando-as entre si e com uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* com relação à capacidade de produzir etanol de melaço de cana em fermentações descontínuas. Constataram uma forte inibição na produção de álcool por *Z.mobilis* a altas concentrações de açúcar, sendo melhor o desempenho da levedura sob essas condições.

Outros autores (RIBBONS e col., 1962; DAWES e col., 1966.a; MCGILL e DAWES, 1971; LEE e col., 1981.a) têm discutido algumas características do crescimento de *Z.mobilis* em sacarose e frutose. LEE e col. (1981.a) testaram uma linhagem de Z.M.

com relação à fermentação em meio contendo 250 g/L de frutose e verificaram uma redução significativa na taxa de crescimento e no rendimento celular. DAWES e col. (1966.a) e MCGILL e DAWES (1971) também observaram, no meio contendo frutose, um rendimento de massa celular relativamente baixo e um crescimento lento. No meio contendo sacarose, a redução observada no rendimento de massa celular comparando-se ao crescimento em glicose tem sido atribuída à formação de levano (RIBBONS e col., 1962 e LEE e col., 1981.a).

A temperatura provavelmente desempenha um papel importante no controle da fermentação de etanol, particularmente quando se trabalha com reciclagem de células, sacarificação/fermentação simultâneas ou operação a vácuo (STOKES, 1970; KROWELL e BRABER, 1979 e LEE e col., 1980.b).

A influência da temperatura de fermentação sobre o crescimento de várias linhagens de Z.M. em meio contendo glicose foi descrita por SWINGS e DE LEY (1977). Esses autores observaram que, à temperatura de 30°C, ocorria 100% de crescimento; elevando-se a temperatura diminui a porcentagem de linhagens que crescem; e, a 40°C, raramente havia crescimento.

O efeito da temperatura na cinética de produção de etanol foi estudado por LEE e col. (1981.b) para duas linhagens de Z.M., à temperatura entre 25 e 40°C. Os parâmetros  $\mu$ ,  $q_s$  e  $q_p$  não foram afetados nessa faixa de temperatura. A temperaturas elevadas, no entanto, há um decréscimo da viabilidade das células, do rendimento de biomassa, do rendimento de etanol e da concentração final de etanol, havendo evidências de um aumento da inibição pelo etanol.

KING e HOSSAIN (1982) avaliaram o efeito de temperaturas entre 30 e 40°C sobre os parâmetros cinéticos de uma fermentação descontínua de Z.M., utilizando glicose como substrato

to e observaram que o rendimento final de etanol é máximo e quase constante entre 30 e 37°C, mas cai marcadamente entre 37 e 40°C, enquanto que todos os outros parâmetros atingem o máximo à 34°C, diminuindo mais a temperaturas maiores. Concluíram que a temperatura de 34°C é ótima e que 37°C pode ser considerada a temperatura máxima de fermentação.

LAUDRIN e GOMA (1982) estudaram o comportamento cinético de Z.M. fermentando glicose, em temperaturas entre 27 e 34,5°C e descreveram que aumentos na temperatura têm um efeito negativo no rendimento de etanol, principalmente por aumentar o coeficiente de manutenção das células.

O efeito do pH durante a fermentação de glicose em processo descontínuo foi avaliado por KING e HOSSAIN (1982) para uma linhagem de Z.M.. Os parâmetros  $\mu$ ,  $Y_{p/s}$  e  $q_p$  são relativamente constantes na faixa de pH entre 5,0 a 7,0 e decrescem com o aumento do pH acima de 7,5.

OHTA e col. (1981), estudando a fermentação de Z.M. a 30°C em meio sintético, com diferentes valores de pH, observaram que com pH inicial de 4,0 a fermentação era muito lenta; com pH inicial de 5,0 e 6,0 a fermentação foi rápida; e com pH inicial de 7,0 foi obtida a melhor concentração de etanol. Com o desenvolvimento da fermentação o pH cai entre 3,8 a 4,5.

Para a produção industrial de etanol são importantes também várias propriedades do organismo fermentador, visando a minimizar os custos envolvidos. Para tanto, o organismo deve ser capaz de crescer a altas concentrações de substrato e ter alta tolerância ao etanol. Visando a selecionar uma linhagem com elevada produtividade de etanol para futuras manipulações genéticas, SKOTNICKI e col. (1981) fizeram uma comparação das taxas de crescimento e produção de etanol para 11 diferentes linhagens

de Z.M.. Encontraram, então, uma larga faixa de características com algumas linhagens sendo mais tolerantes do que outras a altas concentrações de açúcar ou concentração de etanol e a altas temperaturas de incubação. Algumas linhagens são incapazes de utilizar sacarose; outras produzem grandes quantidades de levano e outras ainda crescem bem no meio de sacarose, mas não produzem levano.

CAPÍTULO III  
MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - *Materiais*

3.1.1 - Microrganismos

Foram utilizadas linhagens de *Zymomonas mobilis* recebidas liofilizadas da ATCC - American Type Culture Collection, NRRL - Northern Regional Research Laboratories, Peoria, ILL. USA e da Universidade Federal de Pernambuco.

*Z. mobilis* - NRRL B-14022

*Z. mobilis* - NRRL B-14023

*Z. mobilis* - NRRL B-806

*Z. mobilis* - ATCC-10988

*Z. mobilis* - CP<sub>3</sub> (IA-UFPE 198)

*Z. mobilis* - CP<sub>4</sub> (IA-UFPE 202)

3.1.2 - Reagentes e equipamentos utilizados

Os reagentes utilizados foram obtidos das firmas Carlo Erba, Merck e Sigma. Da Merck, obteve-se ainda glicose, frutose e sacarose, enquanto que peptona, extrato de levedura e ágar para formulação de meios de cultura foram adquiridos da Difco.

Todas as pesagens envolvidas no presente

trabalho foram executadas em balança analítica ou semi-analítica SAUTER; as operações de centrifugação em centrífuga BECKMAN, modelo J-21B. Para as diversas determinações de pH e preparações de tampões foi empregado um pHmetro HORIBA H-5. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave SOC. FABLE LTDA., enquanto a fermentação desenvolveu-se em estufa bacteriológica FANEN. Na determinação do crescimento microbiano e nas leituras colorimétricas empregou-se um espectrofotômetro COLEMAN 295-E.

### 3.2 - Métodos

#### 3.2.1 - Meio de conservação do microrganismo

Para conservação dos microrganismos foi empregado o meio de ágar-nutriente + 2% de glicose (DAWES e col., 1966.b) em tubos de ensaio que foram esterilizados a 121°C por 15 minutos, esfriados e inclinados para posterior inoculação das diferentes linhagens de *Z. mobilis*. Os tubos foram incubados a 30°C por 72 horas, após o que foram mantidos sob refrigeração a 4°C.

#### 3.2.2 - Preparo dos meios de fermentação

Os meios de cultura empregados para a fermentação foram formulados de modo a apresentar 1,0% de extrato de levedura e 1,0% de bacto-peptona. Glicose ou sacarose foram adicionadas nas concentrações desejadas e o pH final foi 6,0 (DAWES e col., 1966.b).

O meio de cultura foi distribuído em frascos

cos Erlenmeyer de 500 mL e esterilizados a 121°C por 15 minutos. As soluções de açúcar, glicose ou sacarose foram esterilizadas separadamente e adicionadas ao meio contido nos frascos, de forma a obter as concentrações de carboidratos desejados e o volume final de 200 mL.

### 3.2.3 - Preparo do inóculo

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL, foram distribuídos 40 mL do meio de cultura citado no item 3.2.2 e autoclavados a 121°C por 15 minutos. As soluções de açúcar, glicose ou sacarose foram esterilizadas separadamente e 10 mL das respectivas soluções foram adicionadas assepticamente ao meio, para obter a concentração de 2% do carboidrato.

Os meios foram inoculados com uma alçada da cultura-estoque e incubados à temperatura de 30°C por 72 horas.

### 3.2.4 - Estudo da indução e produção da enzima hidrolizante da sa carose (E.H.S.)

Frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL do meio de cultura citado no item 3.2.2, foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. As soluções de açúcar foram esterilizadas separadamente e 10 mL adicionados assepticamente ao meio para obter as respectivas concentrações dos carboidratos : 2% glicose, 2% frutose, 2% sacarose, 1% sacarose + 1% glicose e 1% sacarose + 1% frutose.

Os frascos foram inoculados com uma alçada

da cultura-estoque e incubados estaticamente a 30°C; após 3 dias, o meio de cultura era centrifugado. As células precipitadas foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente. Após 3 lavagens, as células foram suspensas em água destilada. O sobrenadante foi dializado contra água destilada, durante uma noite; a atividade da enzima hidrolizante da sacarose foi determinada na suspensão de células (enzima hidrolizante da sacarose ligada à célula) e no sobrenadante (extracelular), de acordo com o item 3.2.15.

#### 3.2.5 - Fermentação alcoólica

A fermentação descontínua foi desenvolvida em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL do meio de cultura preparado de acordo com o item 3.2.2 mais 5% (v/v) do respectivo inóculo preparado de acordo com o item 3.2.3.

Os frascos foram fechados com uma rolha de borracha que possui um dispositivo de vidro em forma de "U", onde é colocado ácido sulfúrico concentrado. Este sistema permite que o CO<sub>2</sub> liberado pela fermentação do carboidrato possa ser expelido, retendo vapor d'água e outras substâncias. Os frascos foram incubados estaticamente, sendo pesados periodicamente para acompanhar a fermentação, pois a perda de peso do conteúdo representa a formação de CO<sub>2</sub> (UEDA e col., 1981) e, conseqüentemente de etanol, sendo a concentração deste calculada de acordo com o item 3.2.10.

O término da fermentação foi determinado quando 3 pesagens sucessivas não apresentavam variação de peso e o pH final foi determinado.

### 3.2.6 - Seleção da melhor linhagem para fermentação da sacarose

Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultura descrito em 3.2.2 e sacarose na concentração de 100 g/L foram inoculados com 5% (v/v) do inóculo preparado de acordo com o item 3.2.3. O procedimento para a fermentação alcoólica está descrito no item 3.2.5 e os frascos foram incubados à temperatura de 30°C.

### 3.2.7 - Efeito da temperatura e concentração dos carboidratos - glicose e sacarose - sobre a fermentação alcoólica de *Zygospora mobilis* NRRL B-14022

Para a fermentação alcoólica foi utilizado o procedimento descrito em 3.2.5 e os carboidratos glicose e sacarose foram empregados nas respectivas concentrações de 100 g/L, 150 g/L e 200 g/L. Os frascos foram incubados às temperaturas de 30°C e 35°C.

Em todas as concentrações e em ambas as temperaturas testadas os frascos foram preparados em duplicata, sendo que um dos frascos foi utilizado para acompanhar a fermentação através da formação de CO<sub>2</sub> e do outro foram retiradas alíquotas de 10 mL, a determinados intervalos de tempo, para a realização das análises. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 5°C por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação dos açúcares residuais de acordo com o item 3.2.9, para a análise quantitativa da formação de levano, de acordo com o item 3.2.11, e para a determinação da concentração de álcool etílico, de acordo com o item 3.2.10. O precipitado foi utilizado para a determinação do

crescimento microbiano de acordo com o item 3.2.8.

### 3.2.8 - Determinação do crescimento microbiano

O crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente, através da leitura da absorbância a 660 nm, contra branco água destilada. O precipitado obtido da centrifugação de 10 mL da amostra foi submetido a 3 lavagens e centrifugações sucessivas, com água destilada, sendo então ressuspendido em 10 mL de água destilada e, quando necessário, eram feitas diluições convenientes para se obter a leitura na faixa de linearidade do método.

### 3.2.9 - Determinação dos açúcares residuais

A análise dos açúcares residuais foi feita pelo Método de SOMOGYI (1945) e expresso como hexose. No meio contendo sacarose, efetuou-se uma hidrólise ácida com uma alíquota de amostra + 40 mL de  $H_2SO_4$  2,0 N + 32 mL de água destilada, durante 45 minutos, sob bico de Bunsen.

### 3.2.10 - Determinação da concentração de álcool etílico

Inicialmente estimou-se a quantidade de etanol pelo Método enzimático da Álcool-desidrogenase para estabelecer-se a real correlação entre a reação estequiométrica geral e os dados obtidos da fermentação com *Z. mobilis*. A concentração de etanol foi estimada através da quantidade de  $CO_2$  produzido durante o processo fermentativo utilizando-se para isso os conhecimen-

tos da estequiometria de formação de produto a partir de glicose e sacarose.

- Método da Álcool-desidrogenase

A concentração de etanol foi estimada pela medida da absorvância a 340 nm, depois da incubação de uma alíquota do sobrenadante com  $\text{NAD}^+$  e álcool desidrogenase (ADH), por 70 minutos a  $25^\circ\text{C}$  (BOEHRINGER MANNHEIM, 1980).



3.2.11 - Determinação quantitativa de levano

A formação de levano foi determinada como descrito por HESTRIN e col. (1943) e DAWES e col. (1966.a). A 1 mL do sobrenadante livre de células contido em um tubo de centrífuga foram adicionados 3 mL de álcool etílico e uma gota de  $\text{CaCl}_2$  a 1%. Essa mistura foi agitada para promover a floculação do levano. A suspensão foi centrifugada e o levano precipitado e livre de açúcares redutores e resíduos de sacarose foi ressuspendido em água destilada, por aquecimento em banho-maria, e precipitado novamente com etanol; esse tratamento é repetido por 3 vezes.

O sedimento final foi ressuspendido em 3 mL de ácido oxálico 0,5% e a hidrólise completa foi efetuada por aquecimento em água em ebulição, por 1 hora. O hidrolizado obtido é neutralizado com  $\text{NaOH}$  2,0 N e completado ao volume inicial com água destilada. A quantidade de frutose no hidrolizado foi determinado pelo Método da cisteína-carbazol (DISCHE E BORENFREUND, 1951) e pelo Método de SOMOGYI-NELSON (1944).

### 3.2.12 - Cálculo dos parâmetros cinéticos

Os dados experimentais – concentração de etanol e concentração de massa celular – foram plotados contra tempo e os parâmetros, taxa específica de produção de etanol ( $q_p$ ) e taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) foram calculados pelo Método geométrico de LeDUY e ZAKIC (1973) empregando-se um microcomputador modelo TK-82C, da Microdigital. Para o cálculo da taxa específica de crescimento máxima e a duração da fase logarítmica foram empregados gráficos de  $\ln x$  contra tempo de fermentação. Outros parâmetros foram calculados de acordo com PIRT (1975). O rendimento de etanol –  $Y_{p/s}$  – expresso em g de etanol/g de substrato, foi calculado dividindo-se a quantidade de etanol produzido no final da fermentação pela quantidade de substrato metabolizado, e o rendimento de massa celular –  $Y_{x/s}$  – foi calculado dividindo-se a quantidade de biomassa formada pela quantidade de substrato consumido, ambos baseando-se no final da fermentação. O rendimento teórico de etanol foi calculado em porcentagem, dividindo-se o valor de etanol produzido pelo rendimento de etanol teoricamente possível a partir da quantidade de substrato presente inicialmente no meio. Os valores das constantes de inibição pelo etanol produzido ( $K_p^I$ ) durante o processo fermentativo foram calculados de acordo com NOVAK e col. (1981), e o método para determinação desses parâmetros está exemplificado na figura 18.

### 3.2.13 - Determinação da atividade da enzima hidrolizante da sacarose

Uma mistura de 4,5 mL de solução 8,0% de sacarose em tampão fosfato pH 6,0 foi incubada com 0,5 mL de amos-

tra da suspensão de células lavadas ou do sobrenadante do meio de cultura à 40°C durante 15 minutos. (As amostras foram obtidas da forma descrita no item 3.2.4.). Depois da incubação, a glicose liberada foi determinada pelo Método de SOMOGYI-NELSON (1944). Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a formação de 1 µmol de glicose/minuto/mL de enzima sob essas condições.

#### 3.2.14 - Purificação da enzima hidrolizante da sacarose (E.H.S.)

A E.H.S. foi produzida de acordo com o item 3.2.4 e o meio de cultura continha 2% de frutose. Após 5 dias, o meio de cultura foi centrifugado; as células precipitadas foram desprezadas e o sobrenadante usado para a purificação.

##### - Fracionamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

A 800 mL do sobrenadante obtido, foram adicionados 448 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 80% de saturação, sob fraca e constante agitação. Após repouso de 24 horas a 5°C, o precipitado foi submetido à centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos, e o material sedimentado foi redissolvido em água deionizada. Tal solução foi então dializada contra água deionizada por 24 horas e depois contra tampão McIlvaine pH 5,0, sendo em seguida submetida à cromatografia em coluna DEAE-celulose.

##### - Cromatografia em coluna de DEAE-celulose

Para a cromatografia em coluna de DEAE-celulose, 40 g de resina foram misturados com NaOH 1 N e em seguida lavados com água deionizada, após o que foram misturados com HCl

1 N e em seguida novamente lavados com água deionizada, sendo finalmente equilibrados com tampão McIlvaine pH 5,0. O material foi empacotado em uma coluna de 37,5x2,7 cm. A enzima foi aplicada e eluída da coluna com concentrações crescentes de NaCl (0,1 M a 0,8 M) no mesmo tampão e com um fluxo de 10 mL/30 minutos.

### 3.2.15 - Efeito do pH na atividade da enzima hidrolizante da sacarose

Para a determinação do pH ótimo da enzima, a atividade enzimática foi estimada de acordo com o item 3.2.13, após incubação dos sistemas de reação em tampão McIlvaine 0,05 M na faixa de pH 2,5 a 7,6.

### 3.2.16 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da enzima hidrolizante da sacarose

Para a determinação da temperatura ótima da enzima, a atividade enzimática foi estimada de acordo com o item 3.2.13, após incubação dos sistemas de reação em tampão McIlvaine 0,05 M, pH 5,0 na faixa de temperatura entre 30 a 55°C.

A estabilidade da enzima em função da temperatura foi determinada medindo-se a atividade residual sobre a sacarose, após incubação de amostras da enzima a temperaturas de 35, 45 e 50°C. Alíquotas foram retiradas a intervalos determinados e a atividade residual foi determinada de acordo com o item 3.2.13.

### 3.2.17 - Cromatografia descendente em papel

A especificidade da enzima hidrolizante da sacarose foi testada incubando-se a enzima com sacarose, rafinose e melezitose. Foi utilizado papel Whatman nº 1 e neste papel foram aplicadas amostras das misturas citadas acima. O sistema de solvente utilizado para a cromatografia descendente foi n-butanol:piridina:água na proporção de 6:4:3 (v/v, respectivamente). O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 15 horas à temperatura ambiente e, para revelação do mesmo, foi utilizada a mistura de difenilamina-anilina-fosfato.

### 3.2.18 - Utilização de glicose e frutose durante a fermentação alcoólica da sacarose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022

Para a determinação qualitativa dos produtos de hidrólise da sacarose durante o curso de uma fermentação, foi empregada a cromatografia descendente em papel. Utilizou-se papel Whatman nº 1 e nesse papel foram aplicadas amostras do sobrenadante do meio de cultura, livre de células, colhidas em diferentes intervalos de tempo. O cromatograma foi desenvolvido de acordo com o descrito no item 3.2.17.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 - *Estudo da produção e indução da enzima hidrolizante da sacarose (E.H.S.) pelo Z. mobilis*

O estudo da indução e produção da E.H.S. foi feito de acordo com o item 3.2.4 e os resultados são mostrados na TABELA I.

Como pode ser verificado nessa tabela, a linhagem de *Z. mobilis* NRRL B-806 produz, no meio contendo frutose, uma enzima extracelular hidrolizante da sacarose, que apresenta maior atividade (3,39  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ) do que as outras linhagens testadas. A linhagem NRRL B-14022 é a única capaz de crescer bem em um meio contendo somente sacarose e produzir a enzima extracelular (1,94  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ). As linhagens de *Z. mobilis* NRRL B-14023, CP<sub>5</sub> e CP<sub>4</sub> apresentaram baixas atividades da enzima extracelular em qualquer um dos meios testados e as linhagens CP<sub>5</sub> e CP<sub>4</sub> também mostraram um crescimento muito lento e pequeno nesse meio de cultura empregado. Desta forma, as linhagens NRRL B-14022, NRRL B-14023, NRRL B-806 e ATCC 10988 foram selecionadas para testar a capacidade de fermentar a sacarose.

Como mostrado na TABELA I, a atividade da enzima hidrolizante da sacarose foi encontrada no meio de cultura independentemente da fonte de carbono usada, sendo que no meio contendo frutose (ou sacarose + frutose) a E.H.S. é induzida em maior quantidade do que nos meios de glicose ou sacarose + glicose.

A enzima extracelular hidrolizante da sacarose obtida da linhagem NRRL B-806 foi purificada de acordo com o item 3.2.14; o pH ótimo foi caracterizado de acordo com o item 3.2.15 e a temperatura ótima e a temperatura de estabilidade foram caracterizadas de acordo com o item 3.2.16.

Como pode ser verificado nas figuras 1 e 2, a atividade máxima da enzima ocorreu na faixa de pH entre 4,7 a 5,6 e à temperatura de 50°C respectivamente. Quando a enzima foi mantida por 12 horas às temperaturas de 35, 45 e 50°C, a atividade enzimática obtida foi de 90%, 82% e 61% respectivamente.

A especificidade da enzima hidrolizante da sacarose foi testada incubando-se a enzima com os trissacarídeos rafinose (O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-frutofuranosídeo) e melezitose (O- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2 $\rightarrow$ 1)-O- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo). Os produtos da hidrólise enzimática foram analisados através da cromatografia descendente em papel, de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.17.

A figura 3 mostra que a E.H.S. hidrolisa a sacarose, e as figuras 4 e 5 ilustram respectivamente que essa enzima hidrolisa a rafinose em melibiose e frutose, mas não hidrolisa a melezitose.

Esses resultados mostram que a enzima hidrolizante da sacarose é específica para os grupos  $\beta$ -frutosil, e assemelha-se à uma  $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutohidrolase (E.C. 3.2.1.26).

#### 4.2 - Seleção da linhagem para fermentação alcoólica da sacarose

Para verificação da capacidade de fermentar

a sacarose foram utilizadas as linhagens selecionadas no item anterior.

A fermentação foi realizada de acordo com o item 3.2.6., empregando-se como substrato a sacarose na concentração de 100 g/L. A variação da concentração de etanol produzido durante o curso das fermentações é mostrada na figura 6.

Podemos observar por essa figura que quando a fermentação é realizada com a linhagem de *Z. mobilis* NRRL B-14022 a formação de etanol é bastante rápida quando comparada com as outras linhagens testadas. A fermentação da sacarose pelo *Z. mobilis* NRRL B-806 é mais lenta, mas mesmo assim a curva de formação de etanol assemelha-se à da linhagem NRRL B-14022, sendo que para ambas as linhagens à partir de 10 horas de fermentação inicia-se uma fase de máxima produção de etanol. Já nas fermentações realizadas com as linhagens NRRL B-14023 e ATCC 10988 a formação de etanol é muito lenta, e a fase de máxima produção inicia-se com aproximadamente 20 horas de fermentação.

Pode-se observar que nas condições empregadas, a linhagem de *Z. mobilis* NRRL B-14022 apresentou a melhor capacidade de utilizar a sacarose, apesar de ser observada uma menor atividade da enzima hidrolizante da sacarose do que a apresentada pela linhagem NRRL B-806. Portanto a linhagem de *Z. mobilis* NRRL B-14022 foi selecionada para os estudos da fermentação alcoólica com os substratos glicose e sacarose.

#### 4.5 - Estudo do crescimento e produção de etanol pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022

##### 4.3.1 - Efeito da temperatura e diferentes concentrações iniciais ( $S_0$ ) de glicose sobre a fermentação alcoólica

Para se avaliar o efeito da temperatura e da concentração inicial de glicose sobre a fermentação alcoólica da linhagem NRRL B-14022, foram utilizadas as concentrações de 100, 150 e 200 g/L do substrato e as temperaturas de 30 e 35°C. O procedimento empregado para a fermentação foi descrito no item 3.2.7. Os resultados do curso das fermentações – produção de etanol e formação de biomassa – são mostrados na figura 7 (a,b,c). A concentração de açúcares residuais (g/L), concentração final de massa celular (g/L) e de etanol (g/L) e o rendimento de etanol (% do valor teórico) são mostrados na TABELA II.

A partir de 60 horas de fermentação, a formação de produto foi muito pequena, excetuando-se somente o caso da concentração inicial de glicose de 200 g/L, quando a fermentação ainda prosseguiu.

Como pode ser observado pela figura 7, a duração da fase de latência no meio contendo glicose é grande, verificando-se um grande intervalo de tempo após inoculação para o microrganismo iniciar a fase logarítmica.

Nas fermentações realizadas com glicose como substrato, à temperaturas de 30 e 35°C, observa-se pela TABELA II que a concentração final de massa celular (g/L) e a concentração final de etanol (g/L) aumentam quando há um aumento na concentração inicial do substrato ( $S_0$ ) até as concentrações testadas. A formação de biomassa diminui quando a temperatura de fermentação é elevada para 35°C, em todas as concentrações estudadas.

À temperatura de 30°C, a fermentação é rapidamente completada com a concentração inicial de glicose de 100 g/L, como pode ser visto pela figura 7, e um aumento na concentração inicial de glicose resulta em uma fermentação mais prolongada e maior quantidade de glicose não utilizada no fermentador, sendo

que os mesmos resultados também foram citados por ROGERS e col. (1979) e LYNESS e DOELLE (1981.a). Esse aumento de  $S_0$ , no entanto, não afeta a concentração final de etanol (g/L) e nem o rendimento de etanol (% do valor teórico) (TABELA II).

Quando a temperatura é elevada para 35°C, observa-se que a fermentação inicia-se mais rapidamente que a 30°C em todas as concentrações do substrato estudadas, mas a concentração final de etanol (g/L) e, conseqüentemente, o rendimento de etanol (% do valor teórico) são afetados, diminuindo acentuadamente com o aumento na concentração inicial de glicose para 150 e 200 g/L. A quantidade de açúcares residuais também é maior em relação à fermentação realizada a 30°C, tendo aumentado marcadamente com o aumento de  $S_0$  (TABELA II).

#### 4.3.2 - Efeito da temperatura e diferentes concentrações iniciais ( $S_0$ ) de sacarose sobre a fermentação alcoólica

Para se avaliar o efeito da temperatura e da concentração inicial de sacarose sobre a fermentação alcoólica da linhagem NRRL B-14022, foram utilizadas as concentrações de 100, 150 e 200 g/L do substrato e as temperaturas de 30 e 35°C. O procedimento empregado foi descrito no item 3.2.7 e os resultados do curso da fermentação – produção de etanol e formação de biomassa – são mostrados na figura 8 (a,b,c). A concentração de açúcares residuais (g/L), concentração final de massa celular (g/L) e de etanol (g/L) e o rendimento de etanol (% do valor teórico) são mostrados na TABELA II.

Pela figura 8 pode-se observar que nas fermentações realizadas com sacarose a duração da fase de latência é pequena.

Nas fermentações realizadas com sacarose como substrato, à temperatura de 30 e 35°C, observa-se pela TABELA II que a concentração final de massa celular (g/L) e a concentração final de etanol (g/L) aumentam, quando há um aumento na concentração inicial do substrato ( $S_0$ ) até as concentrações estudadas. Quando a temperatura de fermentação é elevada para 35°C há um aumento na concentração de massa celular.

A fermentação no caso da sacarose também é rapidamente completada com a concentração inicial de 100 g/L, e um aumento na concentração inicial resultou em uma fermentação incompleta, como pode ser visto pela TABELA II, e mais demorada, como pode ser visto pela figura 8.

A formação de levano – polissacarídeo formado por unidades de frutose – foi observada durante a fermentação da sacarose a 30°C, mas não ocorre a formação de levano quando a fermentação é realizada a 35°C. Como pode ser observado pela TABELA II, a quantidade de açúcares residuais depois de terminada a fermentação a 30°C é bastante elevada. Nas fermentações realizadas a 35°C, observa-se que a quantidade de açúcares residuais é ligeiramente menor quando a concentração inicial de sacarose era de 100 e 150 g/L e aumentou de maneira significativa na concentração de 200 g/L.

Nas fermentações realizadas à temperatura de 35°C, as concentrações finais de etanol e os rendimentos de etanol (% do valor teórico) foram ligeiramente mais elevados quando as concentrações iniciais de sacarose foram de 100 e 150 g/L, comparando-se com as fermentações realizadas a 30°C. Ocorreu, porém, uma diminuição nos citados parâmetros quando a fermentação foi realizada com a concentração inicial do substrato de 200 g/L e à temperatura de 35°C.

Durante o curso de uma fermentação com sacrose, foi realizada a cromatografia em papel dos produtos de hidrólise da sacarose, como descrito no item 3.2.18, e os resultados são mostrados na figura 9. Como pode ser observado por essa figura, após a hidrólise da sacarose em frutose e glicose, esta última é utilizada rápida e totalmente nas primeiras horas de fermentação, seguindo-se a lenta utilização da frutose.

#### 4.3.3 - Estudo dos parâmetros cinéticos da fermentação de *S. mobilis* NRRL B-14022, em meio de glicose

Para avaliar a influência das diferentes temperaturas e concentrações iniciais de glicose sobre a cinética de fermentação dessa linhagem, utilizou-se os resultados das curvas apresentados na figura 7, e os parâmetros cinéticos ( $\mu$ ,  $q_p$ ,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{x/s}$ ) foram calculados de acordo com o item 3.2.12.

Os gráficos, demonstrando a variação da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e da taxa específica de formação de produto ( $q_p$ ) contra tempo de fermentação às temperaturas de 30°C e 35°C, são mostrados respectivamente nas figuras 10 (a,b) e 11 (a,b). Os valores de  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $q_{p \text{ máx}}$ ,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{x/s}$  são mostrados na TABELA II.

Pela figura 10 observa-se que quando as fermentações são realizadas com glicose tanto a temperatura de 30 como de 35°C, a taxa específica de crescimento atinge seu valor máximo algumas horas após a inoculação do meio, quando empregou-se a concentração inicial de substrato de 100 g/L; aumentando-se  $S_0$ , o intervalo de tempo necessário para o microrganismo atingir a  $\mu_{\text{máx}}$  aumenta. Observa-se também que o valor de  $\mu$  diminui rapidamente após a fase de crescimento exponencial, e continua decres-

cendo até o final da fermentação.

Pela figura 11 observa-se que a taxa específica de formação de produto passa por um valor máximo e decresce rapidamente à baixos valores até o final da fermentação. O intervalo de tempo necessário para que o máximo valor de  $q_p$  seja atingido é pequeno quando  $S_0$  é de 100 g/L e esse intervalo de tempo aumenta quando há um aumento de  $S_0$ . Na temperatura de 35°C a diminuição de  $q_p$  é um pouco mais acentuada em relação à 30°C.

Observa-se pelas figuras anteriores e também pela figura 12 (a,b), que quando as fermentações são realizadas com glicose, tanto à temperatura de 30°C como de 35°C, a taxa específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e a taxa específica máxima de produção de etanol ( $q_{p\ m\acute{a}x}$ ) são maiores com a concentração inicial de 100 g/L e diminuem significativamente quando a concentração do substrato é aumentada para 150 e 200 g/L.

Pode-se notar também pela TABELA II que o crescimento e a formação de produto ocorrem a taxas consideravelmente mais elevadas à temperatura de 35°C e esses resultados sugerem um melhor desempenho das células nesta temperatura. Anteriormente, KING e HOSSAIN (1982) concluíram que a temperatura ideal para *E. coli* era 34°C e que 37°C pode ser considerada a temperatura de fermentação máxima.

Pela figura 13 (a,b) e também pela TABELA II, pode-se observar que, quando a fermentação é realizada à temperatura de 30°C, o rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) pode ser considerado eficiente e não ocorre uma diferença significativa neste parâmetro com o aumento na concentração inicial do substrato. Aumentando-se a temperatura para 35°C, observa-se que o rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) não é afetado quando a concentração inicial de glicose é de 100 e 150 g/L e ocorre uma ligeira diminuição quando a concentração é aumentada para 200 g/L. O rendimento de massa celular

$(Y_{x/s})$  não é afetado significativamente pelo aumento de  $S_0$  em ambas as temperaturas estudadas.

#### 4.3.4 - Estudo dos parâmetros cinéticos da fermentação de *Z. mobilis* NRRL B-14022, em meio de sacarose

Para avaliar a influência das diferentes temperaturas e concentrações iniciais de sacarose sobre a cinética de fermentação dessa linhagem, utilizou-se os resultados das curvas apresentados na figura 8 e os parâmetros cinéticos ( $\mu$ ,  $q_p$ ,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{x/s}$ ) foram calculados de acordo com o item 3.2.12.

Os gráficos, demonstrando a variação da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e da taxa específica de formação de produto ( $q_p$ ) contra tempo de fermentação às temperaturas de 30 e 35°C, são mostrados respectivamente nas figuras 14 (a,b) e 15 (a,b). Os valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$ ,  $q_{p\ m\acute{a}x}$ ,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{x/s}$  são mostrados na TABELA II.

Pela figura 14 observa-se que quando as fermentações são realizadas com sacarose tanto à temperatura de 30°C como de 35°C, a taxa específica de crescimento atinge seu valor máximo praticamente na primeira hora após a inoculação do meio quando empregou-se concentrações iniciais de substrato de 100 e 150 g/L; aumentando-se  $S_0$  para 200 g/L, o tempo necessário para o microrganismo atingir  $\mu_{m\acute{a}x}$  aumenta. Observa-se que o valor de  $\mu$  diminui rapidamente após a fase de crescimento exponencial e mantém-se em um valor baixo até o final da fermentação.

Pela figura 15 observa-se que a taxa específica de formação de produto passa por um valor máximo e decresce à baixos valores até o final da fermentação, sendo que na temperatura de 35°C a diminuição de  $q_p$  é mais acentuada em relação a 30°C.

Observa-se pelas figuras anteriores e também pela figura 16, que quando as fermentações são realizadas com sacarose, tanto à temperatura de 30°C como de 35°C, as taxas específicas máximas de crescimento são maiores com a concentração inicial de 100 g/L e diminuem quando  $S_0$  é aumentada para 150 e 200 g/L. À temperatura de 30°C, a taxa específica máxima de formação de produto ( $q_p$  máx) no caso da fermentação da sacarose aumenta quando a concentração inicial do substrato é aumentada de 100 g/L para 200 g/L. Já na fermentação a 35°C, a  $q_p$  máx é máxima para a concentração de 100 g/L de sacarose e diminui com o aumento da concentração inicial para 150 e 200 g/L, sendo que nestas duas últimas concentrações não há diferença significativa neste parâmetro.

Como foi observado para a fermentação em glicose, neste caso também o crescimento e a produção de etanol ocorrem a taxas consideravelmente mais elevadas à temperatura de 35°C.

Pela figura 17 (a,b) e também pela TABELA II, pode-se observar que, quando a fermentação é realizada com sacarose, o rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) é baixo em ambas as temperaturas estudadas, comparando-se com a fermentação realizada com glicose. Quando a fermentação é realizada a 30°C, observa-se que com um aumento na concentração de sacarose de 100 para 200 g/L não ocorre diferença significativa nesse parâmetro. À temperatura de 35°C, é interessante notar que o rendimento de etanol é ligeiramente maior quando as concentrações iniciais são de 100 e de 150 g/L e diminui quando  $S_0$  é 200 g/L, comparando-se com a fermentação a 30°C. O rendimento de massa celular é máximo quando a concentração de sacarose é de 100 g/L em ambas as temperaturas estudadas. Com o aumento de  $S_0$ , o rendimento de massa celular diminui.

#### 4.4 - Estudo comparativo dos parâmetros cinéticos das fermentações de *Z.mobilis* NRRL B-14022 em meios de glicose e sacarose

Após o estudo das fermentações desenvolvidas em sacarose e glicose, como descrito anteriormente pelos itens 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4, é possível agora comparar alguns aspectos cinéticos da fermentação descontínua desta linhagem.

Os parâmetros cinéticos das fermentações de *Z.mobilis* realizadas em meio de glicose e sacarose às temperaturas de 30 e 35°C são resumidos na TABELA II.

Pelos resultados apresentados nas figuras 7 e 8, observa-se que a fermentação desenvolvida no meio contendo sacarose inicia-se rapidamente e no meio contendo glicose é mais lenta.

Pela TABELA II, pode-se observar que os valores de  $\mu_{m\grave{a}x}$  são mais elevados quando a fermentação é realizada com sacarose do que quando a glicose está presente no meio de cultura. Também se nota que os valores de  $\mu_{m\grave{a}x}$  são mais elevados a baixas concentrações iniciais (100 g/L) de ambos os substratos, tanto à temperatura de 30 como de 35°C.

Quando a fermentação é realizada a 35°C, o parâmetro  $q_p m\grave{a}x$  é muito mais afetado pelo aumento na concentração inicial de glicose do que com o aumento na concentração inicial de sacarose (figuras 12 e 16).

Nas fermentações realizadas com glicose e sacarose à temperatura de 30°C, os rendimentos de etanol ( $Y_{p/s}$ ) não apresentam uma variação significativa com o aumento da concentração inicial de ambos os substratos. A concentração máxima final de etanol foi obtida quando empregou-se  $S_0 = 200$  g/L, tanto no meio contendo glicose como no meio de sacarose, sendo respectivamente 96,0

g/L e 73,0 g/L. Observa-se que o rendimento de etanol é maior no meio contendo glicose do que no meio de sacarose. Também o rendimento teórico de etanol (%), no caso da fermentação realizada com glicose à temperatura de 30°C, é praticamente igual em todas as concentrações iniciais testadas (93,0%, 94,6% e 94,0% para as respectivas  $S_0$  de 100, 150 e 200 g/L), enquanto que, nas fermentações de sacarose a essa temperatura, o maior rendimento teórico de etanol (76,7%) foi obtido para a concentração inicial de 100 g/L, sendo de 75,6% para  $S_0=150$  g/L e de 71,4% para  $S_0=200$  g/L.

No caso das fermentações realizadas a 35°C, quando a glicose é usada como substrato, o rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) diminui ligeiramente quando a concentração inicial é de 200 g/L, comparando-se a  $S_0$  de 100 e 150 g/L. No caso da sacarose ser usada como substrato, observa-se que, aumentando a concentração inicial de 100 para 150 g/L, há uma ligeira diminuição no rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) e uma queda mais marcante no rendimento é notada quando a concentração inicial é aumentada para 200 g/L. Também nessa temperatura, a concentração máxima de etanol (g/L) aumenta com a elevação da concentração inicial de ambos os substratos.

Também à temperatura de 35°C, o rendimento teórico de etanol (%), no caso da fermentação realizada com glicose, foi maior a  $S_0=100$  g/L (92,0%), sendo 82,2% e 68,5% para  $S_0$  de 150 e 200 g/L respectivamente, enquanto que, na fermentação realizada com sacarose, à concentração inicial de 100 g/L, o rendimento teórico de etanol foi de 82,2%, sendo este o melhor rendimento observado para a fermentação da sacarose a essa temperatura. E ainda, na fermentação de sacarose a 35°C, os rendimentos teóricos de etanol são mais elevados nas concentrações iniciais de 100 e 150 g/L (82,2% e 77,6% respectivamente), comparando-se com as fermenta

ções realizadas a 30°C (76,7% e 75,6%) nas respectivas concentrações iniciais.

A formação de levano somente pôde ser observada quando a fermentação foi realizada em meio de sacarose e à temperatura de 30°C, não ocorrendo a formação do polissacarídeo no meio contendo glicose, ou quando a fermentação da sacarose é realizada a 35°C.

No caso da fermentação com sacarose realizada à temperatura de 30°C, a quantidade de açúcares residuais no final da fermentação é mais elevada quando comparada com a fermentação realizada com glicose. Já à temperatura de 35°C, a quantidade de açúcares residuais é elevada nas fermentações realizadas com ambos os açúcares.

#### 4.4.1 - Efeito de inibição pelo substrato e produto formado

Nas fermentações realizadas com sacarose, o aumento de  $S_0$  de 100 para 200 g/L tem apenas um efeito pequeno sobre  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $q_p m\acute{a}x$ , tanto nas fermentações realizadas à temperatura de 30°C como de 35°C. Esses resultados sugerem que ocorre uma ligeira inibição pelo substrato quando o mesmo é sacarose. Observa-se também, uma apreciável inibição pelo etanol, ilustrada pelos valores de  $K_p^I$  (TABELA III) e evidenciada pelos baixos rendimentos e concentrações finais de etanol obtidos em qualquer uma das concentrações estudadas.

Com um incremento na temperatura de fermentação de 30°C para 35°C, a performance das células é melhorada, mas um efeito inibitório mais significativo pode ser observado pelos valores de  $K_p^I$ . A 35°C não ocorre a formação de levano e os rendimentos e concentrações finais de etanol são ligeiramente mais

elevados quando a concentração inicial do substrato é baixa. A elevadas concentrações de sacarose, o efeito sinérgico da concentração do substrato-concentração do produto sugere a responsabilidade pela diminuição ainda maior no rendimento de etanol.

O elevado efeito de inibição pelo etanol sobre o metabolismo da sacarose também foi observado por LEE e col. (1981.a).

Nas fermentações realizadas com glicose, tanto à temperatura de 30°C como de 35°C, o aumento de  $S_0$  de 100 para 200 g/L afeta os parâmetros  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $q_p m\acute{a}x$ , causando uma diminuição acentuada dos mesmos. Esses resultados sugerem sensível inibição pelo excesso de substrato, no caso da glicose.

Uma elevação da temperatura de fermentação de 30°C para 35°C melhora a performance das células e observam-se valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $q_p m\acute{a}x$  mais elevados. À temperatura de 35°C, aumenta o efeito de inibição pelo etanol, como ilustrado pelos valores de  $K_p^I$ . Observam-se também concentrações finais de etanol e rendimentos de etanol reduzidos, e esta diminuição é mais marcante com o aumento de  $S_0$ , indicando, neste caso, também um sinergismo de inibição pelo substrato-produto.

O efeito do etanol claramente aumentado com a elevação da temperatura também foi observado por outros pesquisadores trabalhando com linhagens de *Z. mobilis* (LEE e col. 1981.b e LAUDRIN e GOMA, 1982) e com linhagens de leveduras (NAVARRO e DURAND, 1978, NAGODAWITHANA e col., 1974 e 1976).

Pode-se dizer, portanto, que, quando a glicose é utilizada como substrato, a fermentação apresenta melhores rendimentos a 30°C e nas concentrações iniciais de 150 e 200 g/L. E, nas fermentações realizadas a 35°C, é mais interessante utilizar-se a concentração de 100 g/L desse substrato. Quando a sacaro

se é utilizada como substrato, a fermentação por esta linhagem de *Z. mobilis* apresenta melhores rendimentos a 35°C e  $S_0$  de 100 g/L.

TABELA I - Indução da enzima hidrolizante da sacarose em vários açúcares

Microrganismo	Massa Celular mg/mL	Atividade Enzimática $\mu$ /mol/min/mL		Açúcar no meio de cultura
		Extracelular	Intracelular	
<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	0.09	0	0	S
	0.85	2.62	0.90	F
	0.96	2.03	0.99	G
	1.03	2.39	2.03	S+F
	1.15	1.54	0.5	S+G
<i>Z. mobilis</i> NRRL B-806	0.04	0	0	S
	0.86	5.39	1.51	F
	1.00	2.49	1.04	G
	1.00	2.93	2.75	S+F
	1.12	1.89	0.77	S+G
<i>Z. mobilis</i> NRRL B-14022	0.96	1.94	1.58	S
	0.73	0.18	0.09	F
	0.95	0.59	0.105	G
	0.95	1.08	1.04	S+F
	1.06	0.57	0.49	S+G
<i>Z. mobilis</i> NRRL B-14023	0.08	0	0	S
	0.66	0.02	0	F
	1.00	0	0	G
	1.00	0.27	0.14	S+F
	0.99	0.18	0.18	S+G
<i>Z. mobilis</i> IA-UFPE 198	0.06	0	0	S
	0.52	0	0	F
	0.87	0.08	0.02	G
	0.64	0.06	0	S+F
	0.90	0.08	0	S+G
<i>Z. mobilis</i> IA-UFPE 202	0.05	0	0	S
	0.64	0.05	0	F
	0.96	0.07	0.02	G
	0.96	0.43	0.25	S+F
	0.99	0.32	0.13	S+G

S = 10% sacarose; F = 10% frutose; G = 10% glicose

S+F = 5% sacarose + 5% frutose; S+G = 5% sacarose + 5% glicose

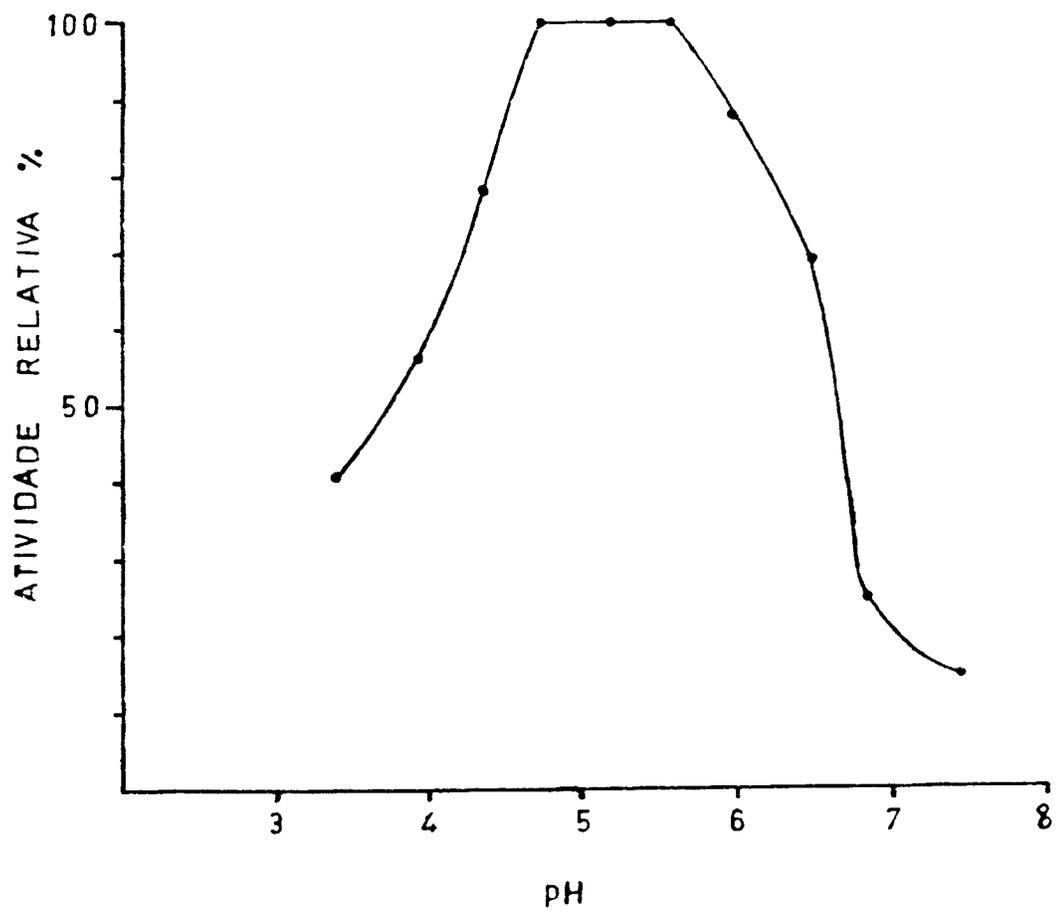


FIGURA 1 - Efeito do pH na atividade da enzima hidrolizante da sacarose

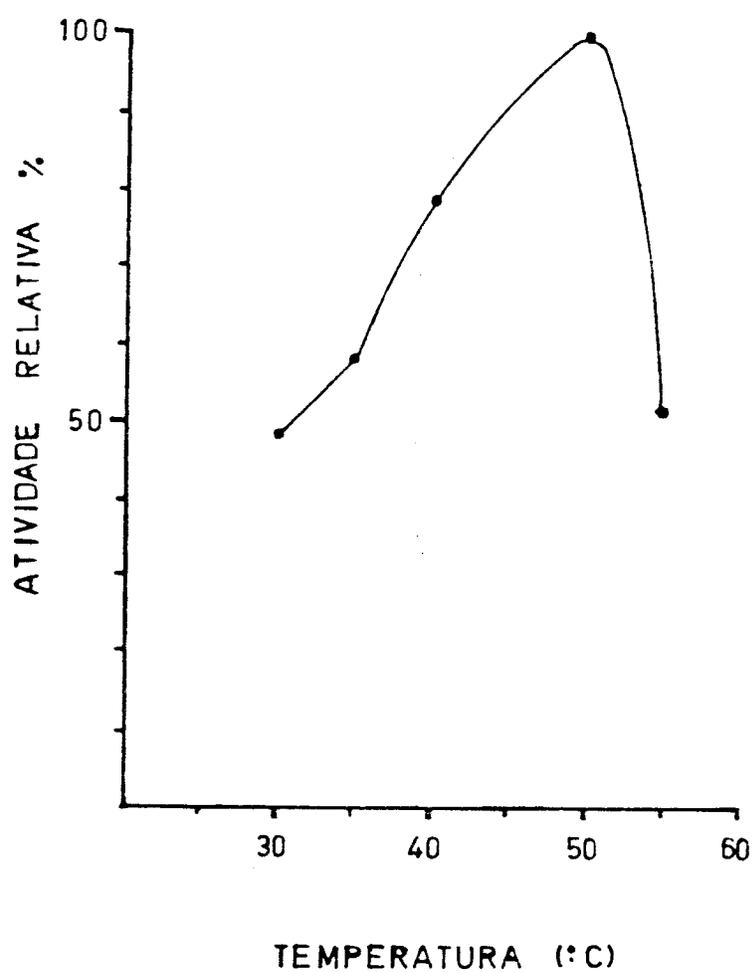


FIGURA 2 - Efeito da temperatura na atividade da enzima hidrolizante da sacarose



FIGURA 3 - Cromatografia em papel - hidrólise da  
*sacarose* pela E.H.S. de *Z. mobilis*.

1 - tempo - 0h

2 - tempo - 4h



FIGURA 4 - Cromatografia em papel - hidrólise da  
*rafinose* pela E.H.S. de *Z. mobilis*.

1 - tempo - 0h

2 - tempo - 4h

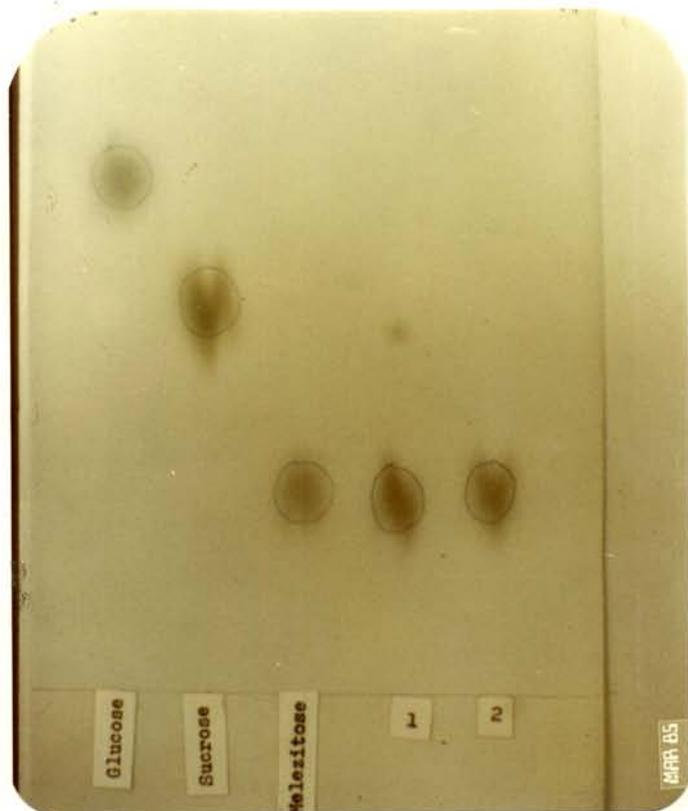


FIGURA 5 - Cromatografia em papel - hidrólise da  
*melezitose* pela E.H.S. de *Z. mobilis*.

1 - tempo - 0h

2 - tempo - 4h

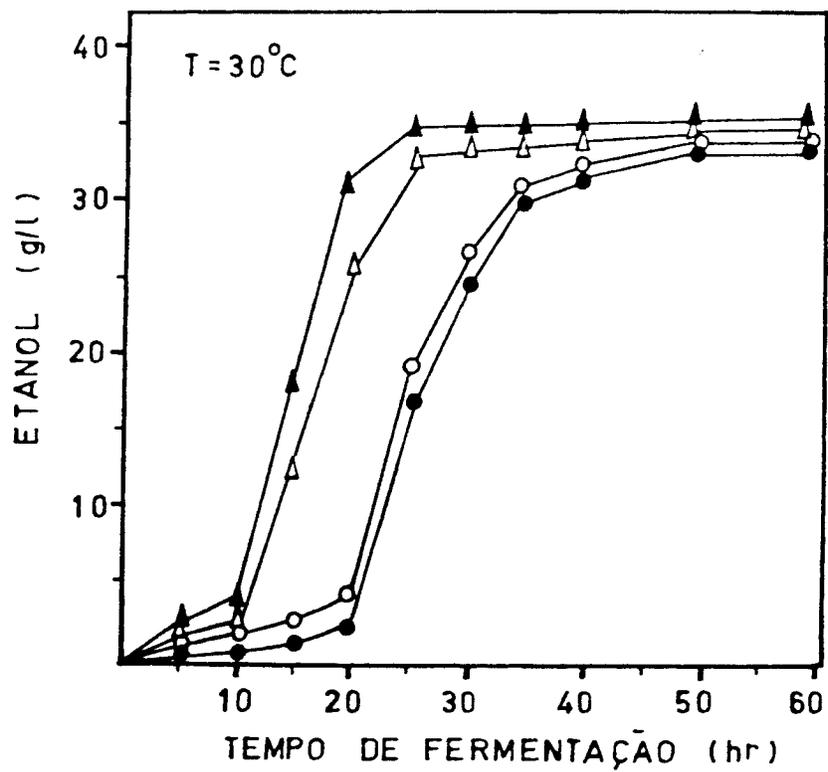


FIGURA 6 - Seleção da melhor linhagem para fermentação alcoólica da sacarose ( $S_0 = 100$  g/l)

- ▲—▲ *Z. mobilis* NRRL B-14022
- △—△ *Z. mobilis* NRRL B-806
- *Z. mobilis* ATCC 10988
- *Z. mobilis* NRRL B-14025

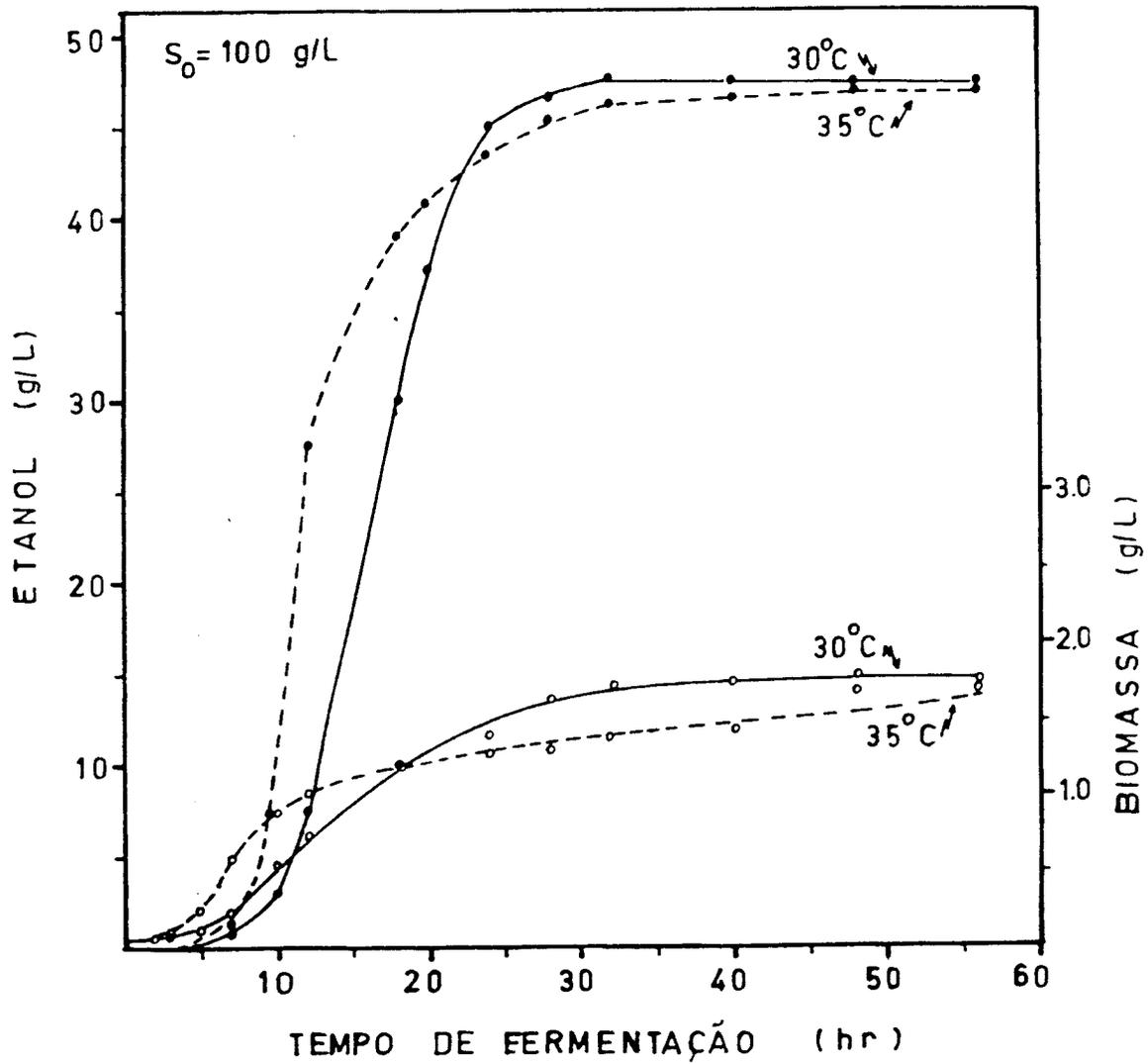


FIGURA 7(a) - Efeito da temperatura sobre a fermentação alcoólica da glicose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022, utilizando  $S_0 = 100$  g/L

—○— biomassa

—●— etanol

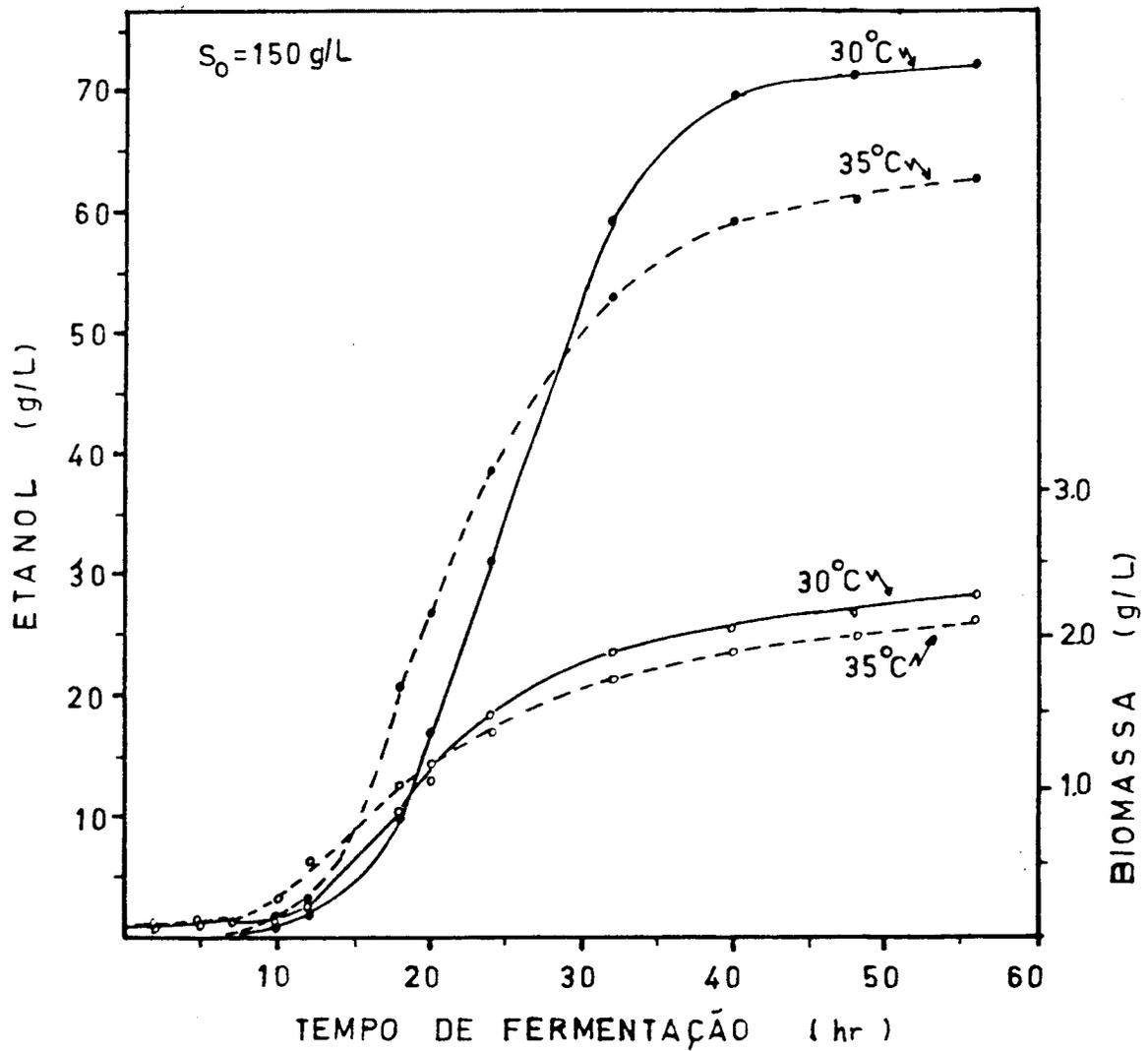


FIGURA 7(b) - Efeito da temperatura sobre a fermentação alcoólica da glicose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022, utilizando  $S_0 = 150 \text{ g/L}$

—○— biomassa

—●— etanol

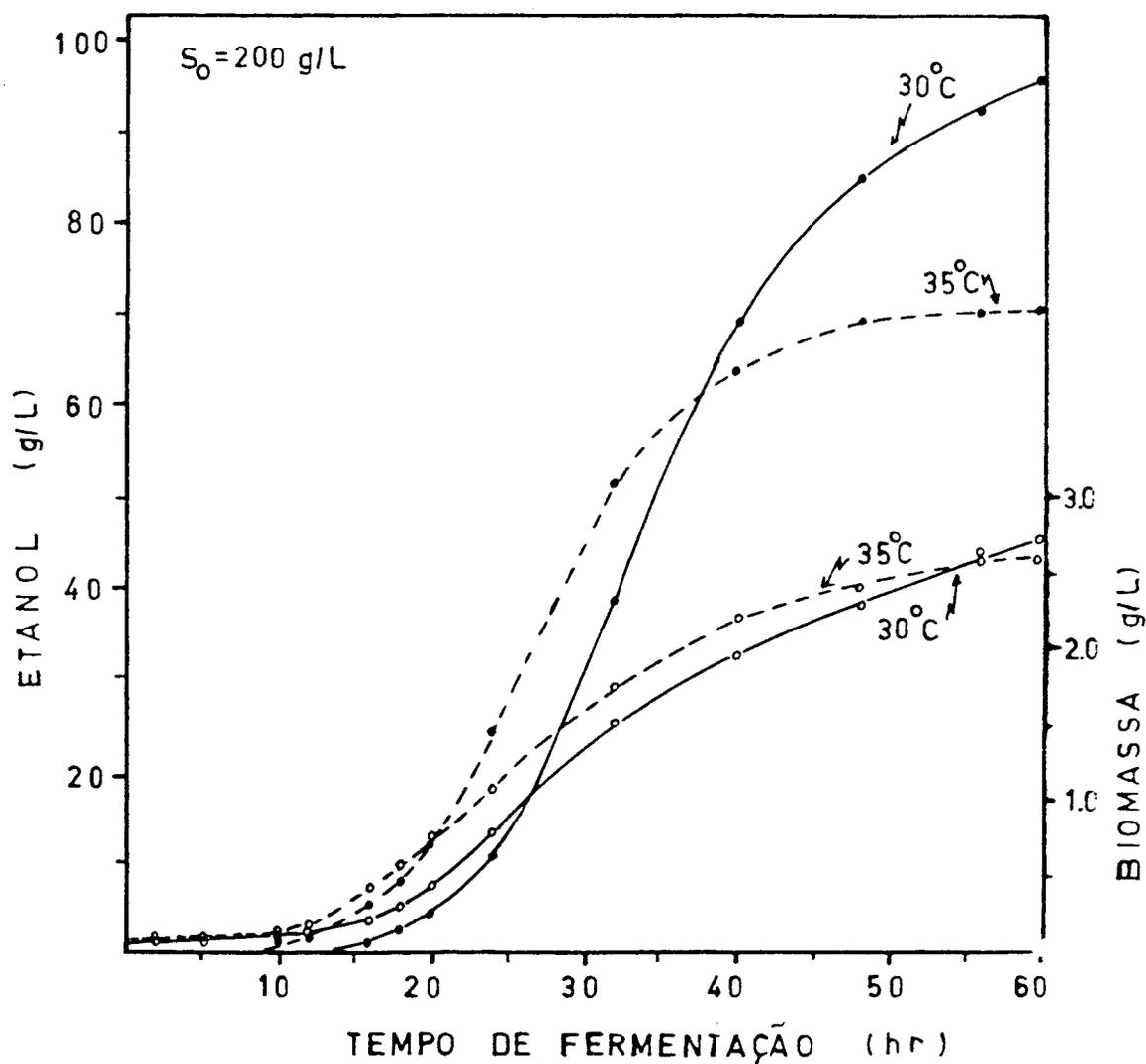


FIGURA 7(c) - Efeito da temperatura sobre a fermentação alcoólica da glicose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022, utilizando  $S_0 = 200$  g/L.

—○— biomassa  
 —●— etanol

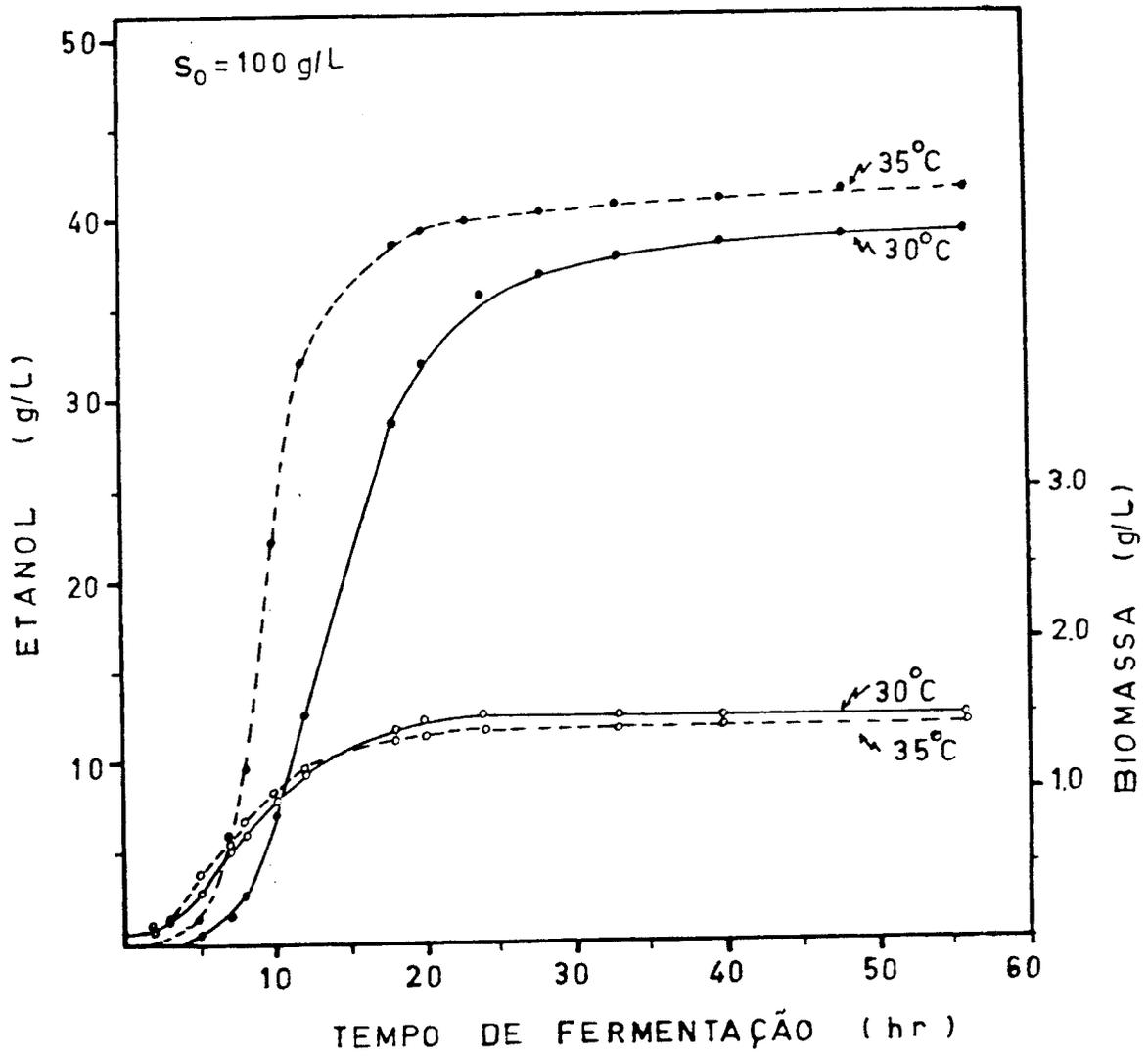


FIGURA 8(a) - Efeito da temperatura sobre a fermentação alcoólica da sacarose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022, utilizando  $S_0=100 \text{ g/L}$ .

—o— biomassa

—●— etanol

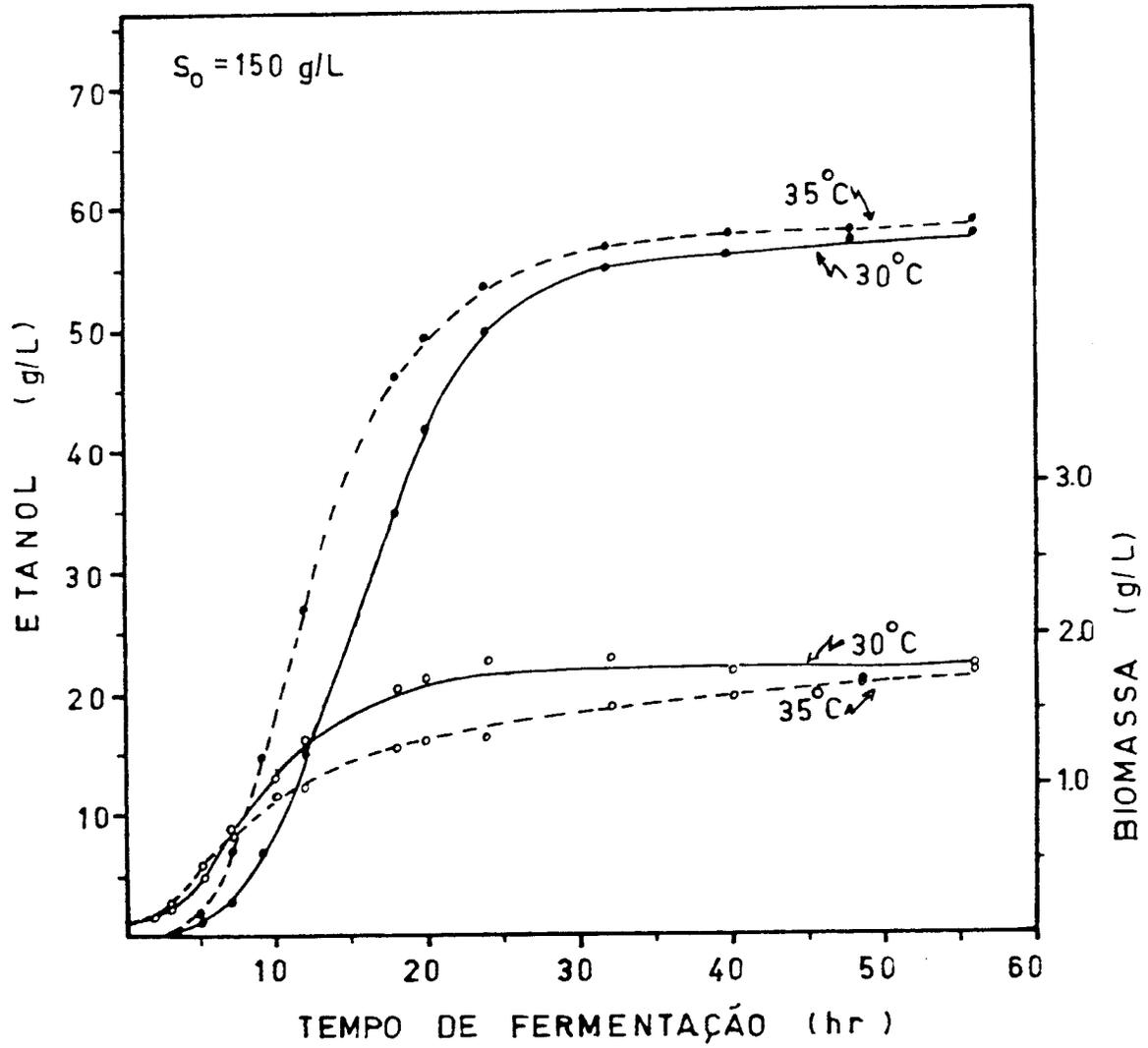


FIGURA 8(b) - Efeito da temperatura sobre a fermentação alcoólica da sacarose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022, utilizando  $S_0 = 150$  g/L.

—○— biomassa  
 —●— etanol

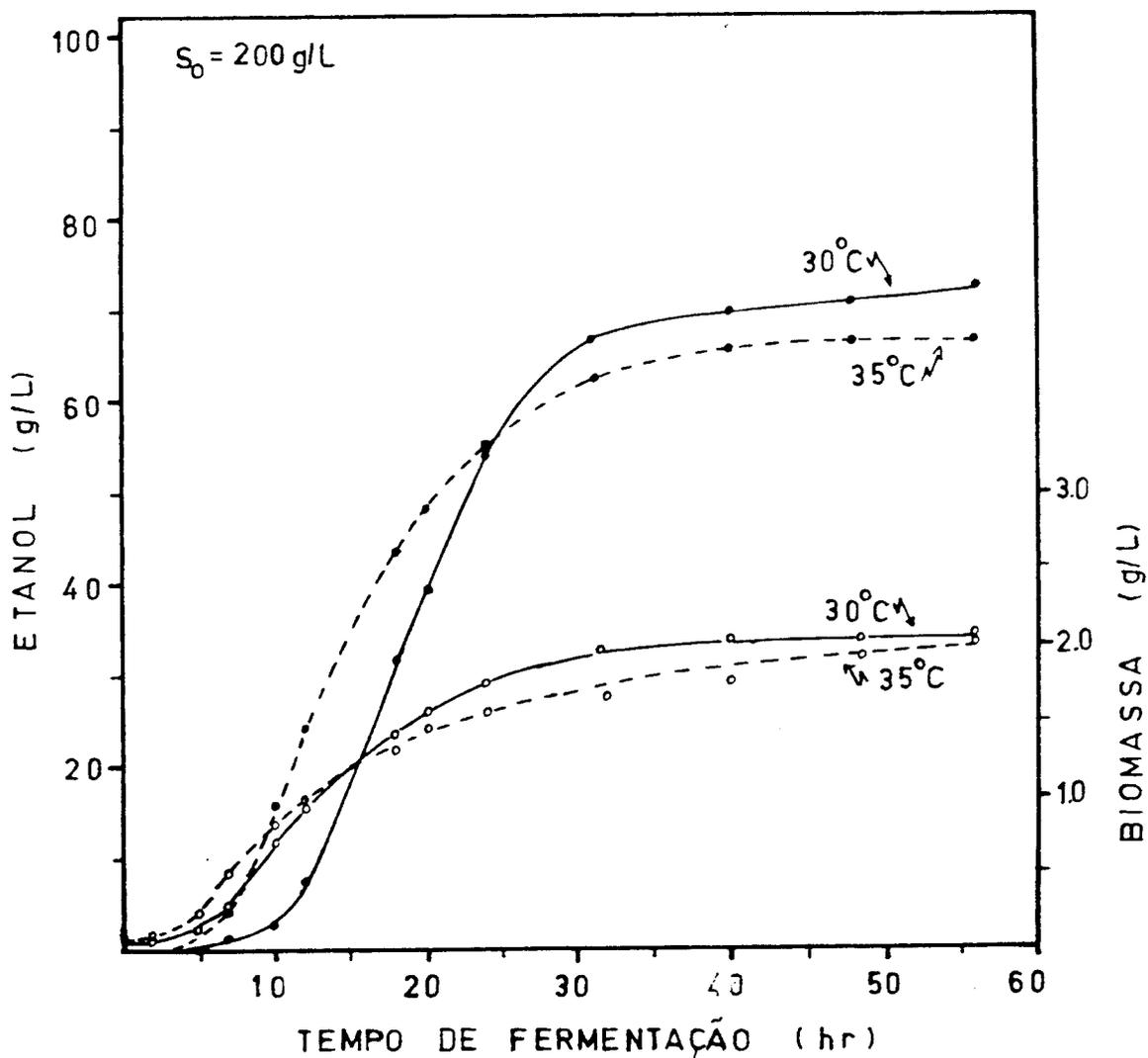


FIGURA 8(c) - Efeito da temperatura sobre a fermentação alcoólica da sacarose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022, utilizando  $S_0 = 200$  g/L.

—○— biomassa

—●— etanol

CONCENTRAÇÃO INICIAL g/L	T E M P E R A T U R A											
	30 °C						35 °C					
	GLICOSE		SACAROSE		GLICOSE		SACAROSE		GLICOSE		SACAROSE	
PARÂMETROS CINÉTICOS	100	150	200	100	150	200	100	150	200	100	150	200
Taxa específica de crescimento máxima $\mu_{\max}$ (hr <sup>-1</sup> )	0.473	0.300	0.248	0.477	0.418	0.404	0.561	0.333	0.261	0.591	0.485	0.428
Taxa específica de formação de etanol máxima $q_p \max$ (g/g/hr)	4.06	3.28	2.89	2.37	2.66	3.43	7.07	3.95	3.03	7.33	4.81	5.21
Concentração final de massa celular g/L	1.7	2.3	2.9	1.5	1.73	1.9	1.5	2.0	2.55	1.5	1.84	2.2
Rendimento de massa celular $Y_{x/s}$ (g/g)	0,017	0,015	0,015	0,016	0,012	0,011	0,015	0,015	0,016	0,016	0,013	0,013
Rendimento de etanol $Y_{p/s}$ (g/g)	0.48	0.49	0.49	0.43	0.43	0.42	0.48	0.48	0.46	0.45	0.44	0.41
Rendimento de etanol (% do valor teórico)	93.0%	94.6%	94.0%	76.7%	75.6%	71.4%	92.0%	82.2%	68.5%	82.2%	77.6%	66.0%
Concentração máxima de etanol (g/L)	47.5	72.5	96.0	39.2	58.0	73.0	47.0	63.0	70.0	42.0	59.5	67.5
Concentração de açúcares residuais (g/L)	0.8	1.6	4.8	8.8	14.4	27.2	4.0	19.2	48.8	7.2	12.8	38.1
Concentração máxima de levano (g/L)	-	-	-	0.95	1.95	3.0	-	-	-	0	0	0

TABELA II - Parâmetros cinéticos para a fermentação da linhagem de *Z. mobilis* NRRL B-14022 em cultura descontínua, empregando diversas concentrações de glicose e sacarose e diferentes temperaturas

TABELA III - Valores das constantes de inibição pelo etanol produzido durante a fermentação pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.

TEMPERATURA $S_0$ (g/L)	SACAROSE		GLICOSE	
	30°C	35°C	30°C	35°C
100	1,24	0,68	3,81	3,25
150	2,36	1,93	7,18	5,07
200	4,94	3,0	8,36	9,01

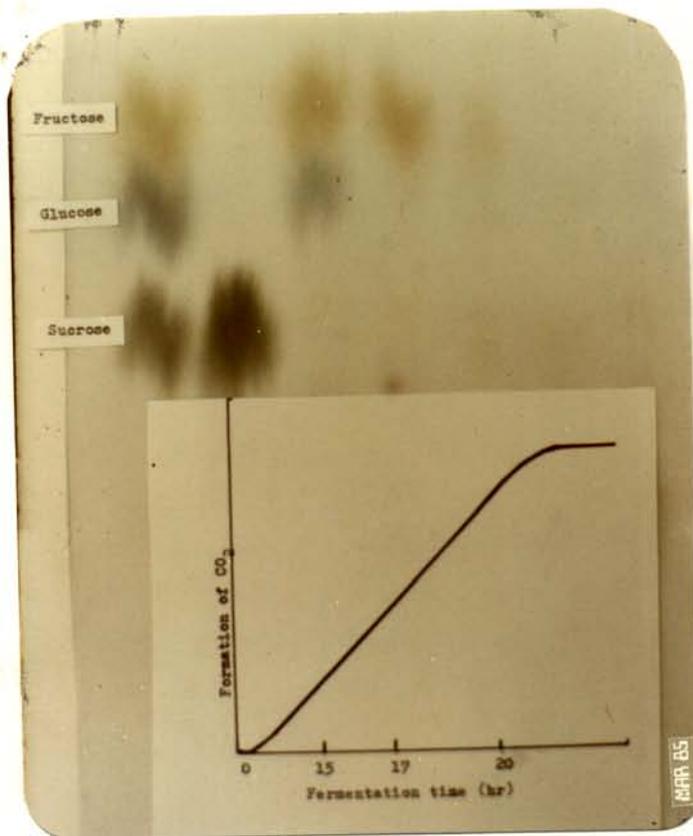


FIGURA 9 - Cromatografia em papel do substrato sacarose, durante a fermentação pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.

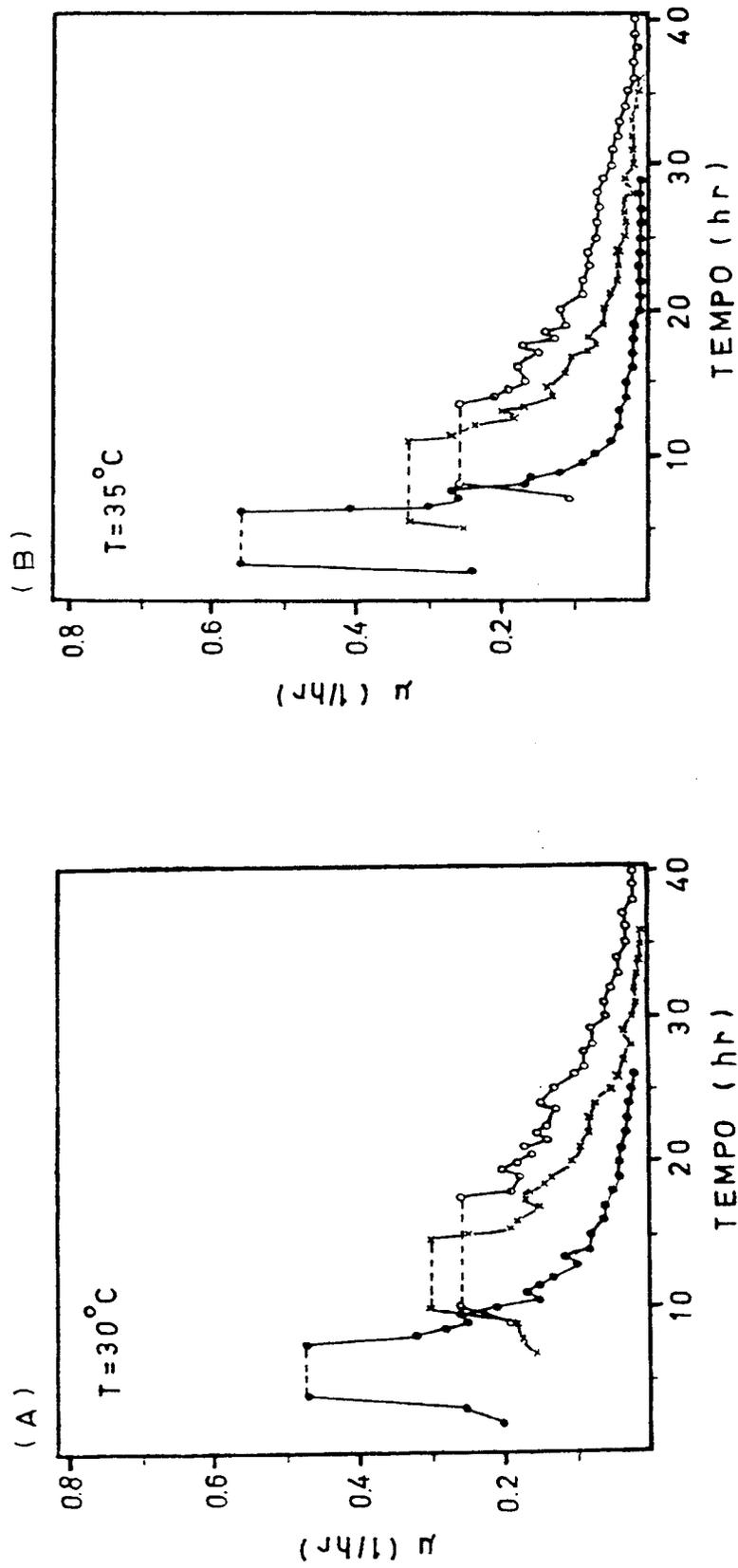


FIGURA 10 - Variação da taxa específica de crescimento com o tempo, durante a fermentação de GLI COSI pelo *S. mobilis* NRRL B-14022.

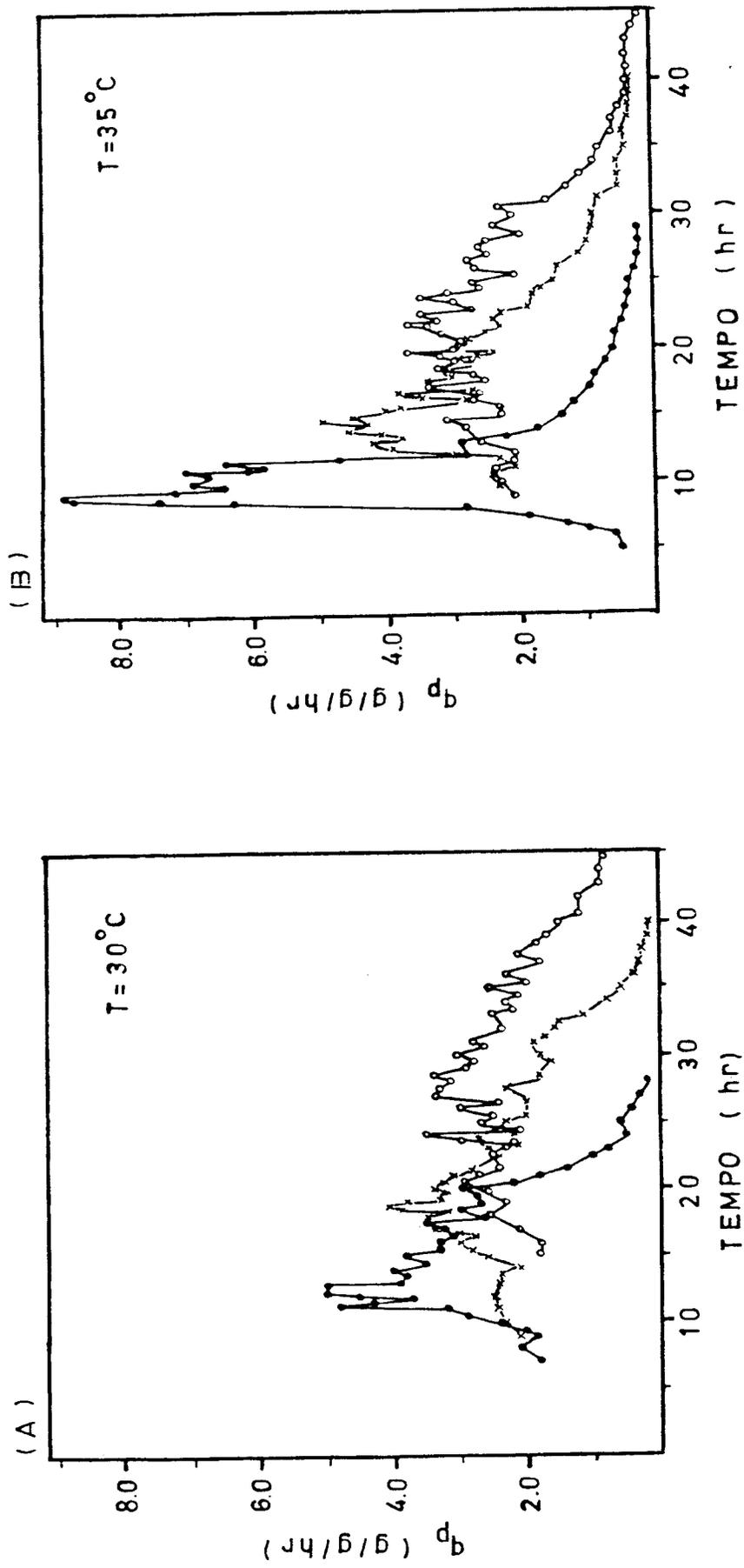


FIGURA 11 - Variação da taxa específica de formação de produto com o tempo, durante a fermentação de GLICOSE pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.

$\bullet\text{---}\bullet$   $S_0=100$  g/l     $\text{x---x}$   $S_0=150$  g/l     $\circ\text{---}\circ$   $S_0=200$  g/l

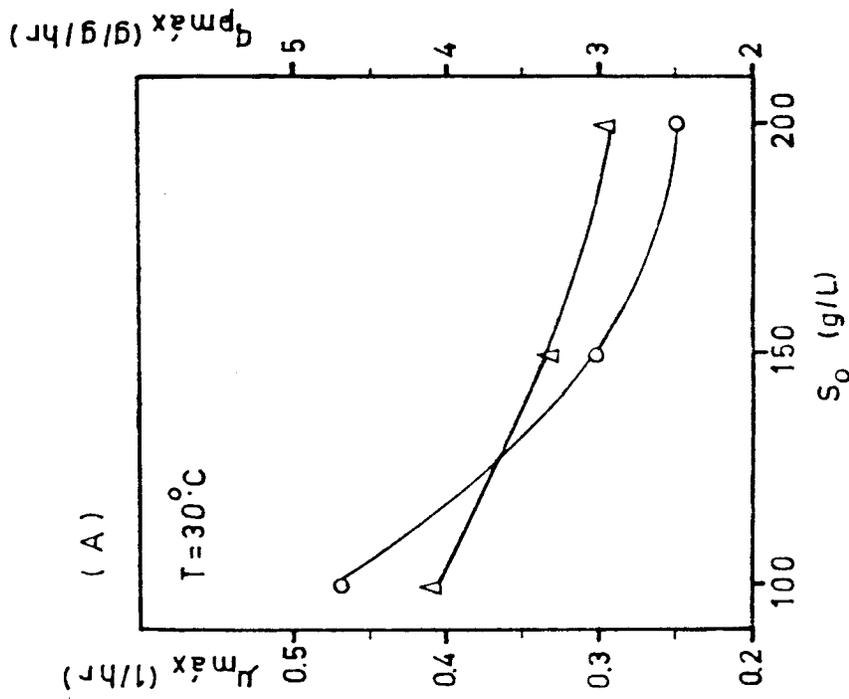
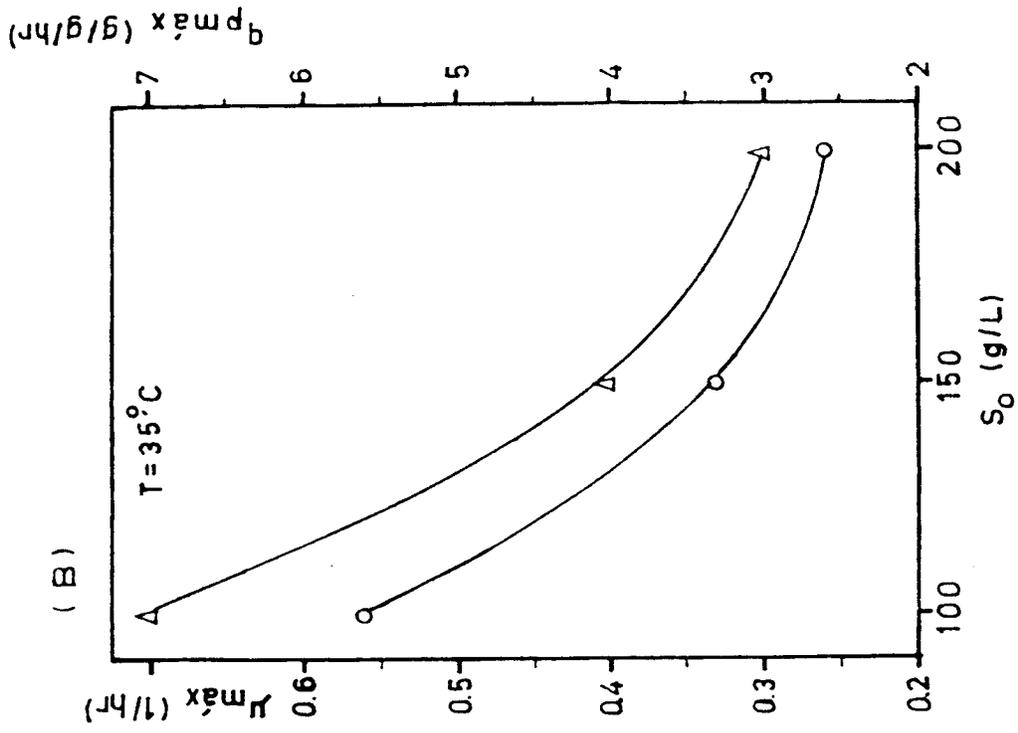


FIGURA 12 - Efeito da temperatura e da concentração inicial de GLICOSE ( $S_0$ ) sobre  $\mu_{\text{máx}}$  e  $q_{p\text{máx}}$

---○---  $\mu_{\text{máx}}$       ---△---  $q_{p\text{máx}}$

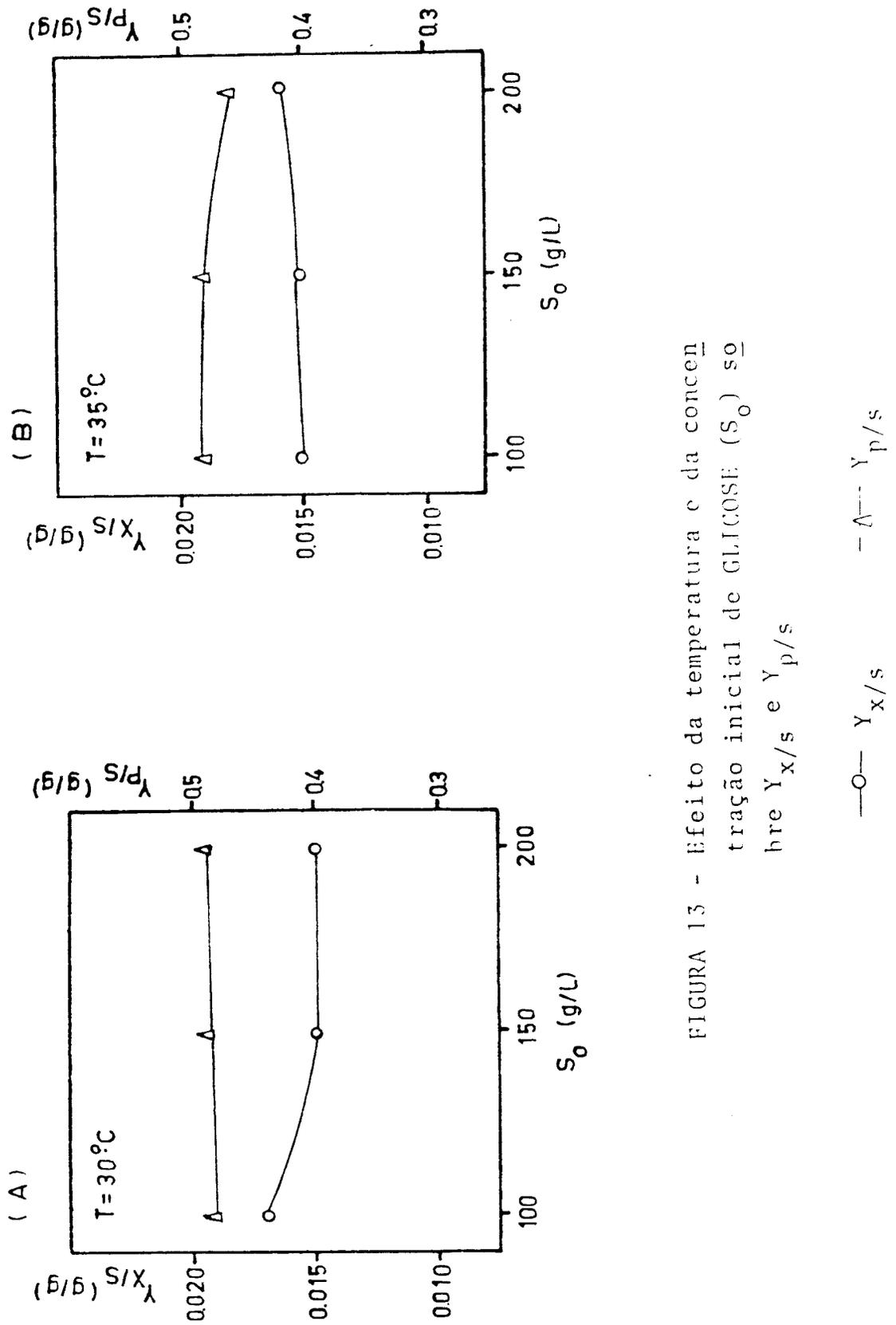


FIGURA 13 - Efeito da temperatura e da concentração inicial de GLICOSE ( $S_0$ ) sobre  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/s}$

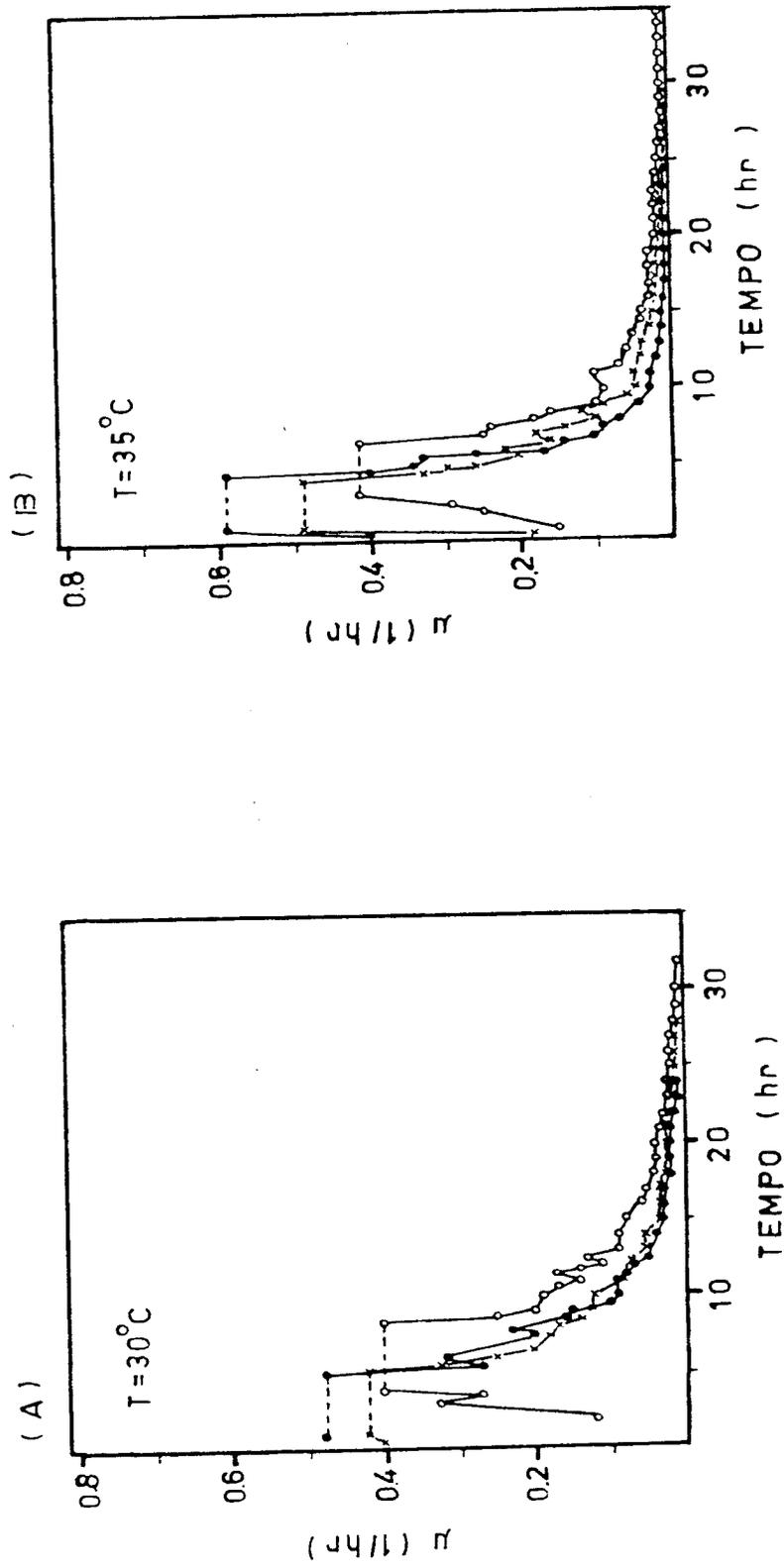


FIGURA 14 - Variação da taxa específica de crescimento com o tempo, durante a fermentação de SACA ROSE pelo *S. mobilis* NRRL B-14022.

●  $S_0=100$  g/g    x  $S_0=150$  g/g    ○  $S_0=200$  g/g

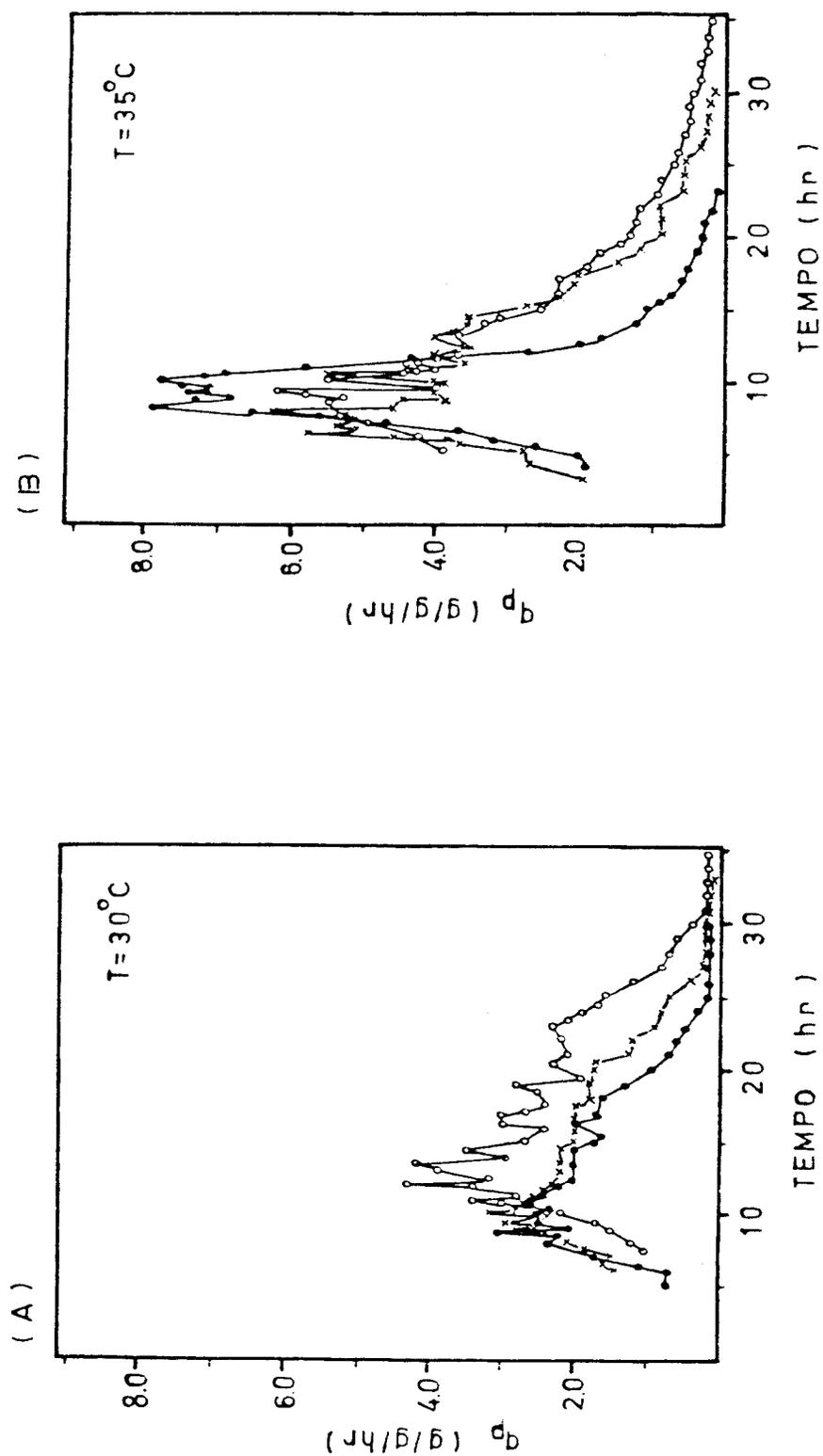


FIGURA 15 - Variação da taxa específica de formação de produto com o tempo, durante a fermentação de SACAROSE pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.

$\bullet$   $S_0=100$  g/l     $\times$   $S_0=150$  g/l     $\circ$   $S_0=200$  g/l

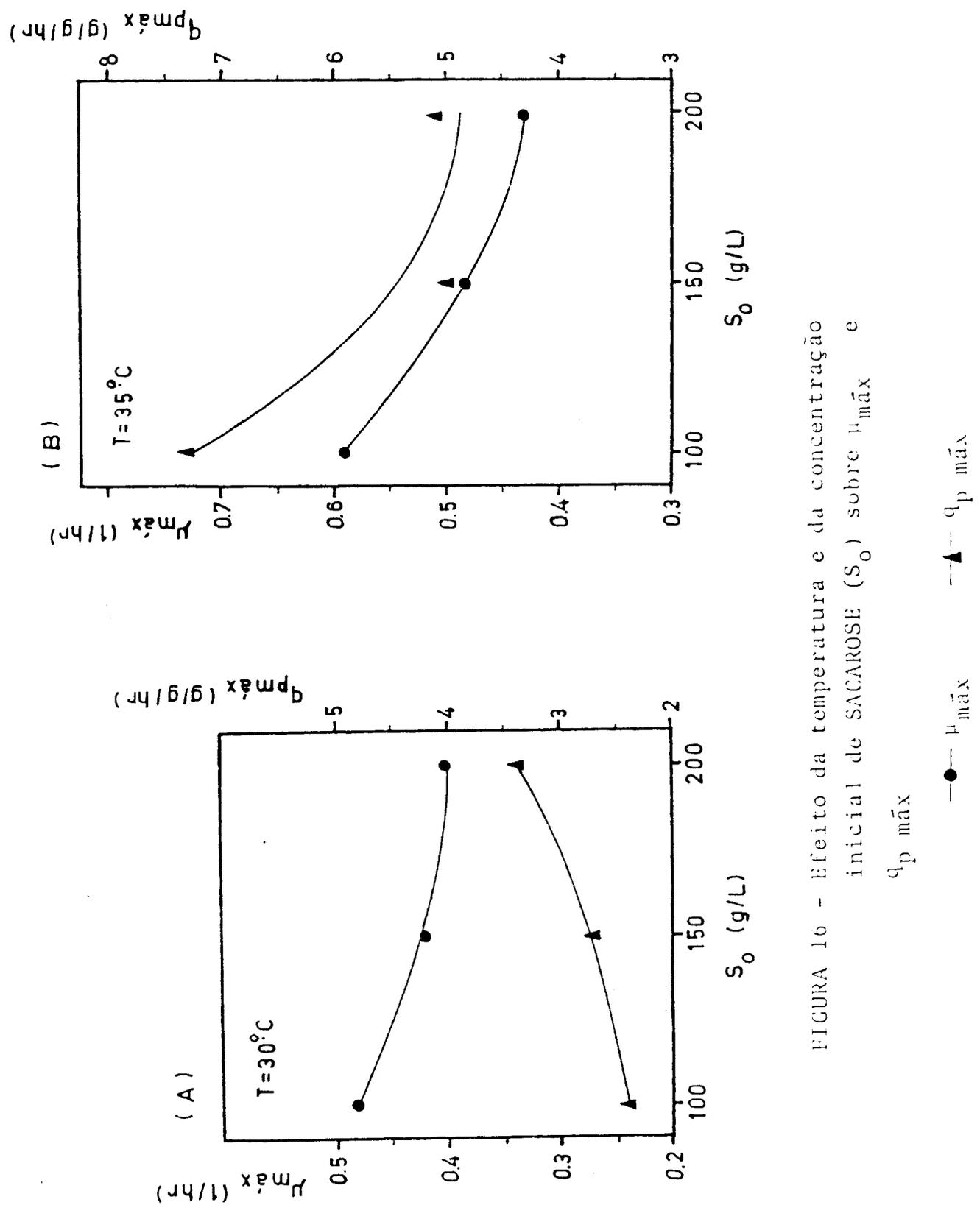


FIGURA 16 - Efeito da temperatura e da concentração inicial de SACAROSE ( $S_0$ ) sobre  $\mu_{\text{m\acute{a}x}}$  e  $q_{p\text{m\acute{a}x}}$

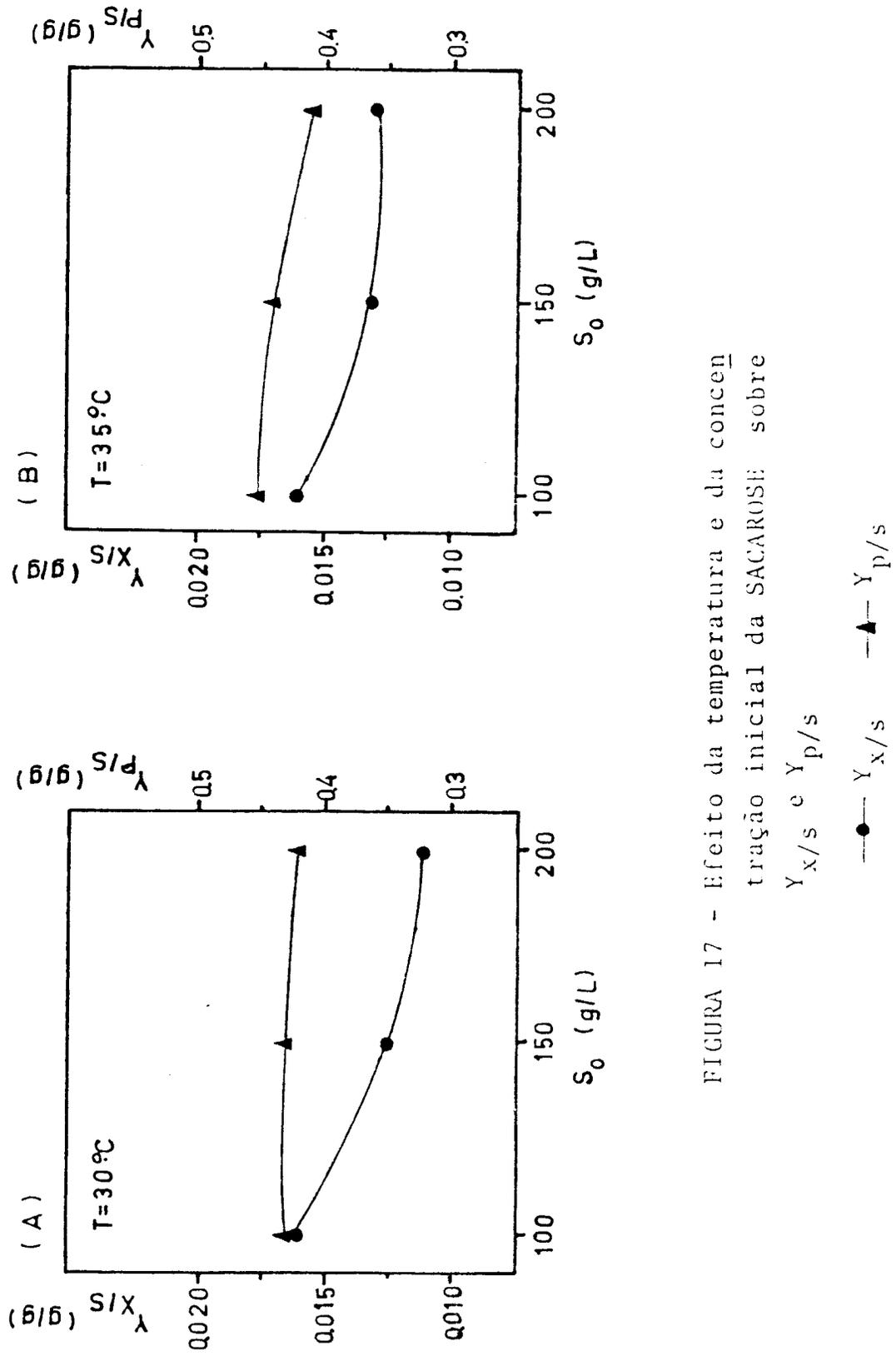


FIGURA 17 - Efeito da temperatura e da concentração inicial da SACAROSE sobre  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/s}$

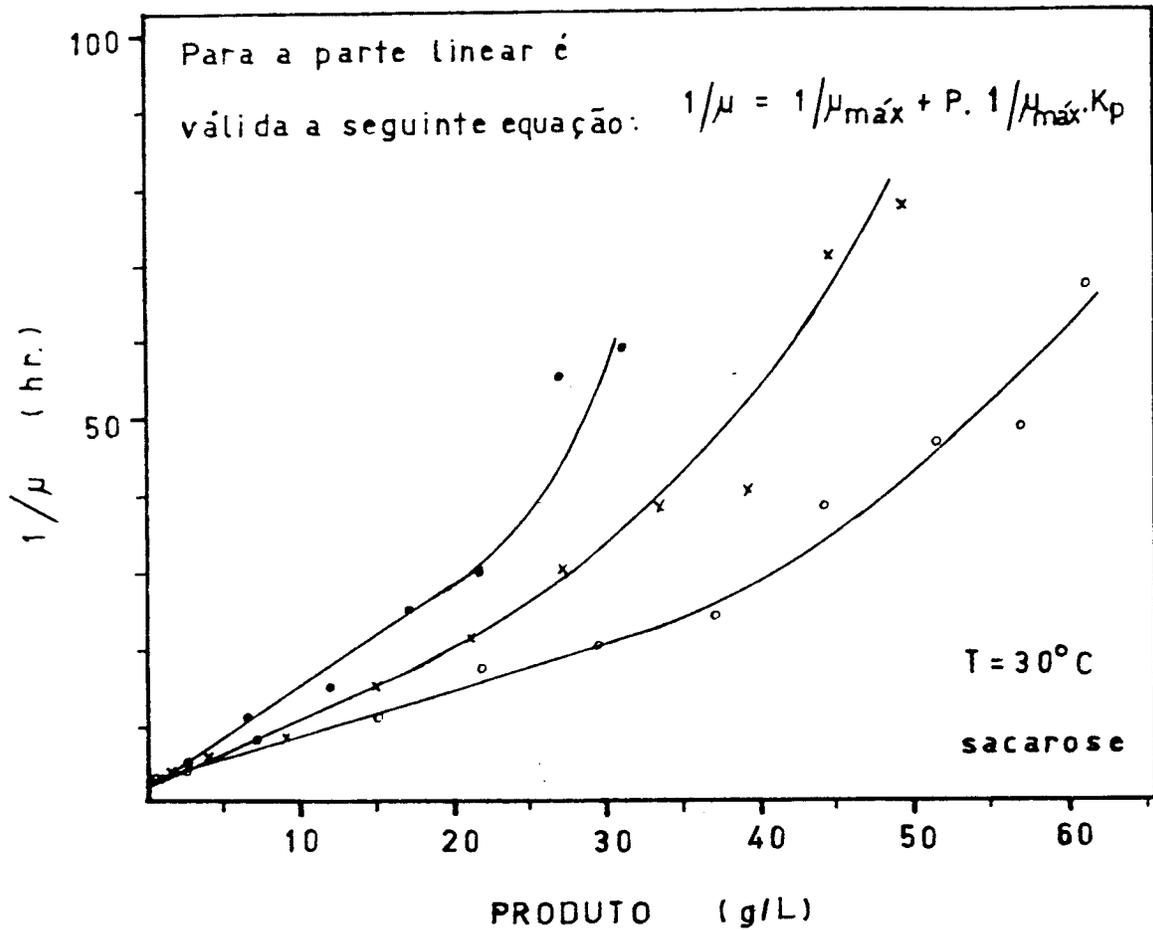


FIGURA 18 - Exemplo da determinação das "constantes de inibição pelo etanol produzido" ( $K_p^I$ ) durante as fermentações pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022.

—●— 100 g/L

—x— 150 g/L

—○— 200 g/L

## CAPÍTULO V

## CONCLUSÕES

- A linhagem de *Z. mobilis* NRRL B-806 apresenta maior atividade da enzima extracelular hidrolizante da sacarose que as outras linhagens testadas.

- A enzima extracelular hidrolizante da sacarose é semelhante à uma  $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutohidrolase (E. C. 3.2.1.26).

- Entre as linhagens de *Z. mobilis* testadas, a linhagem NRRL B-14022 fermenta a sacarose mais rapidamente.

- Essa mesma linhagem fermenta a glicose mais eficientemente do que a sacarose, produzindo maior quantidade de etanol.

- O melhor rendimento de etanol a partir de glicose pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022 foi obtido sob as seguintes condições: quando a temperatura de incubação era 30°C e a concentração inicial 200 g/L, e quando a temperatura de incubação era 35°C e a concentração inicial 100 g/L.

- Nas fermentações realizadas com sacarose, pelo *Z. mobilis* NRRL B-14022, o melhor rendimento de etanol é observado quando a temperatura de incubação é 35°C e a concentração inicial do substrato é mantida em 100 g/L.

## B I B L I O G R A F I A

- BARKER, B.T.P. e HILLIER, V.F. - J. Agric. Sci., 5:67-85, 1912
- BAUCHOP, T. e ELSDEN, S.R. - J. Gen. Microbiol., 23:457-469, 1960
- BELAÏCH, J.P. e SENEZ, J.C. - J. of Bacteriol., 89(5):1.195-1.200,  
1965
- BOEHRINGER MANNHEIN, Biochemica - Methods of Enzymatic Food  
Analysis, 1980
- CARR, J.G. - Bergey's manual of determinative bacteriology,  
8th. ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974
- CROMIE, S. e DOELLE, H.W. - Biotech. Lett., 2:357, 1980
- CROMIE, S. e DOELLE, H.W. - European J. Appl. Microbiol.  
Biotechnol., 11:116-119, 1981
- CYSEWSKI, G.R. e WILKE, C.R. - Biotechnol. Bioeng., 19:1.125-  
-1.143, 1977
- DADDS, M.J.S.; MARTIN, P.A. e CARR, J.G. - J. Appl. Bacteriol.,  
36:531-539, 1973
- DAWES, E.A.; RIBBONS, D.W. e REES, D.A. - Biochem. J.,  
98:804-812, 1966.a

- DAWES, E.A.; RIBBONS, D.W. e LARGE, P.J. - Biochem. J.,  
98:795-803, 1966.b
- DELEY, J. e SWINGS, J. - Int. J. Syst. Bacteriol., 26:146-157,  
1976
- DISCHE, Z. e BORENFREUND, E. - J. Biol. Chem., 192:583-587, 1951
- DOELLE, H.W. e LYNESS, E. - Biotech. Lett., 2:549-554, 1980
- GIBBS, M. e DeMOSS, R.D. - Arch. Biochem. Biophys., 34:478-479,  
1951
- GIBBS, M. e DeMOSS, R.D. - J. Biol. Chem., 207:689-694, 1954
- HESTRIN, S.; SHAPIRO, S.A. e ASCHNER, M. - Biochem. J., 37:450,  
1943
- KERSTERS, K. e DE LEY, J. - J. Microbiol. Serol., 34:393-408,  
1968
- KING, F.G. e HOSSAIN, M.A. - Biotech. Lett., 4(8):531-536, 1982
- KLUYVER, A.J. e HOPPENBROUWERS, W.J. - Arch. Mikrobiol. 2:245-  
-260, 1931
- KLUYVER, A.J. e VAN NIEL, K. - Zentralb. Bakteriolog. Parasitenkd.  
Infektionskr. Hyg. Abt., 2/94:369-403, 1936
- KLUYVER, A.J. - Bergey's manual of determinative bacteriology,

7th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1957

KROUWELL, P.G. e BRABER, L. - Biotech. Lett., 1:403-408, 1979

LAUDRIN, I. e GOMA, G. - Biotech. Lett., 4(8):537-542, 1982

LeDUY, A. e ZAJIC, J.E. - Biotech. Bioeng., XV:805-810, 1973

LEE, K.J.; TRIBE, D.E. e ROGERS, P.L. - Biotech. Lett., 1:421-  
-426, 1979

LEE, K.J.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E. e ROGERS, P.L. -  
Biotech. Lett., 2:339-344, 1980.a

LEE, J.H.; WILLIAMSON, D. e ROGERS, P.L. - Biotech. Lett.,  
2:141-146, 1980.b

LEE, K.J.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E. e ROGERS, P.L. -  
Biotech. Lett., 3(5):207-212, 1981.a

LEE, K.J.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E. e ROGERS, P.L. -  
Biotech. Lett., 3(6):291-296, 1981.b

LINDNER, P. - Atlas der mikroskopischen Grundlagen der  
Gänngskunde, Tafel 68, 3rd ed. Berlin., 1928

LYNESS, ED. e DOELLE, H.W. - Biotech. Bioeng., XXIII:1.449-1.460,  
1981.a

- LYNESS, E. e DOELLE, H.W. - Biotech. Lett., 3(5)257-260, 1981.b
- McGILL, D.J. e DAWES, E.A. - Biochem. J., 125:1.059-1.068, 1971.
- MORTATTI, M.P.L.; SATO, H.H. e PARK, Y.K. - Biotech. Lett.,  
5(4):229-232, 1983.
- NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C. e STEINKRAUS, K.H., Appl.  
Microbiol., 28:383-391, 1974.
- NAGODAWITHANA, T.W. e STEINKRAUS, K.H. - Appl. Env. Microbiol..  
31:158-162, 1976.
- NAVARRO, J.M. e DURAND, G. - Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur),  
124 B, 215, 1978.
- NELSON, N. - J. Biol. Chem., 153:375-380, 1944.
- NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M. e GOMA, G. - Biotech. Bioeng.  
23, 201-211, 1981.
- OHTA, K.; SUPANWONG, K. e HAYASHIDA, S. - J. Ferment. Technol.,  
59(6):435-439, 1981.
- PIRT, S.J. - "Parameters of growth and analysis of growth data",  
in Principles of Microbe and Cell Cultivation (Blackwell  
Scientific, Cambridge, England) 1975.
- RAMALINGHAN, A. e FINN, R.K. - Biotechnol. Bioeng., 19:583-589,  
1977.

- RIBBONS, D.W.; DAWES, E.A. e REES, D.A. - Biochem. J., 82, 45 p.,  
1962
- RICHARDS, M. e CORBEY, D.A. - J. Inst. Brewing, 80:241-244, 1974
- ROGERS, P.L.; LEE, K.J. e TRIBE, D.E. - Biotech. Lett.,  
1:165-170, 1979
- ROGERS, P.L.; LEE, K.J. e TRIBE, D.E. - Process. Biochem.,  
15(6):7-11, 1980
- SHIMWELL, J.L. - J. Inst. Brewing, 43:507-509, 1937
- SHIMWELL, J.L. - J. Inst. Brewing, 56:179-182, 1950
- SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E. e ROGERS, P.L. - Appl. Env. Microbiol  
Microbiol., 40:7-12, 1980
- SKOTNICKI, M.L.; LEE, K.J.; TRIBE, D.E. e ROGERS, P.L. -  
Appl. Env. Microbiol., 41(4):889-893, 1981
- SOMOGYI, M. - J. Biol. Chem., 160:61-68, 1945
- STOKES, J.L. - The Yeasts, Vol. 2, Academic Press, Eds. Rose,  
A.H. e Harrison, J. - 119-134, 1970
- SWINGS, J. e DE LEY, J. - Int. J. Syst. Bacteriol., 25:324-328,  
1975

SWINGS, J. e DE LEY, J. - Bacteriol. Reviews, 41(1):1-46, 1977

UEDA, S.; ZENIN, C.T.; MONTEIRO, D.A. e PARK, Y.K. - Biotech.  
Bioeng., 23:291-299, 1981

VAN VUUREN, H.J.J. e MEYER, L. - Biotech. Lett., 4(4);  
253-256, 1982

WICKERHAM, L.J. - Bull. nº 1.029 - U.S. Department of  
Agriculture, Washington, D.C., 1951