

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA
OBTENÇÃO DE ETANOL
A PARTIR DE MANDIOCA
POR FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

Iracema Miyako Nakamura Sawada
Engenheiro de Alimentos

Orientadora:

Dra. Iracema de Oliveira Moraes

Professor Assistente Doutor da
Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do título de Doutor em Ciência de Alimentos

CAMPINAS - 1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A

meu esposo,

minha mãe e meus irmãos

ÍNDICE GERAL

	PAG.
<u>RESUMO</u>	iii
<u>SUMMARY</u>	v
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
1.1. Objetivo	2
<u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1. Considerações sobre matéria-prima	4
2.2. Enzimas amilolíticas, sua produção e aplicação	12
2.3. Fermentação alcoólica	19
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	37
3.1. Material	37
3.2. Métodos	38
<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	62
4.1. Seleção de microrganismo produtor de enzima amilo- lítica	62
4.2. Estabilidade de enzima amilolítica produzida por <i>A.</i> <i>usambé</i> , em presença de etanol	62
4.3. Tratamento enzimático do amido contido na farinha de mandioca integral	62

4.4. Estudo comparativo de alguns meios de cultura	63
4.5. Processo de fermentação contínua em um estágio utilizando enzimas amilolíticas comerciais co- mo agente sacarificante	64
4.6. Processo de fermentação contínua em dois está- gios, utilizando enzimas amilolíticas produzi- das por <i>A. usami</i>	67
<u>ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS</u>	73
<u>5. CONCLUSÕES</u>	113
<u>NOMENCLATURA</u>	116
<u>6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</u>	119
<u>AGRADECIMENTOS</u>	130

RESUMO

A problemática resultante da crescente escassez de Petróleo aumentou a demanda por fontes renováveis para produção de energia , tendo sido proposta como uma das alternativas , a produção de etanol através de fermentação.

O presente trabalho teve como objetivo contribuir ao estudo de produção de etanol , via fermentação contínua , utilizando como matéria-prima a farinha de mandioca integral , que se destaca entre as matérias amiláceas , por ser um vegetal bastante difundido nos países tropicais e subtropicais.

A primeira etapa do trabalho consistiu em estudar a sacarificação do amido contido na farinha por dois métodos : a) utilização de enzimas comerciais ; b) cultura contínua de *Aspergillus usami* var. *shirousami* que produz amilases.

Os ensaios de fermentação alcoólica foram feitos utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* Haken-1.

Através dos experimentos de hidrólise enzimática de amido e fermentação contínua em escala de laboratório , foram obtidos os valores de constantes de reação enzimática e os parâmetros cinéticos de crescimento dos microorganismos , de produção de enzima e de produção de etanol.

Observou-se que tecnologicamente há viabilidade de utilização da mandioca como matéria-prima para produção de etanol , podendo o amido ser hidrolizado continuamente , tanto pela aplicação de enzimas comerciais como pela cultura contínua de fungo.

De acordo com as considerações econômicas realizadas e nas condições de análise , o processo utilizando enzimas comerciais como agente sacarificante mostrou-se mais promissor que o processo utilizando as enzimas obtidas da cultura contínua do fungo.

SUMMARY

The problem resulting from the scarcity of petroleum increased the importance for renewable sources of energy and an alternative is the production of ethanol through a fermentation process.

This work was intended as a contribution on the studies for the production of ethanol by a continuous fermentation process utilizing cassava meal as the raw material.

The cassava, among the amylaceous plants, is a well established culture in tropical and subtropical Countries.

At the first stage, two methods of starch saccharification were studied: a) utilization of commercial enzymes; b) utilization of enzymes produced by a continuous cultivation of *Aspergillus usami* var. *shirousami*.

The experiments on alcohol fermentation were carried out with *Saccharomyces cerevisiae* Haken-1.

The parameters of the enzymatic reaction, and the kinetics of microorganisms growth, enzyme production and ethanol production were obtained with laboratory scale experiments of enzymatic hydrolysis of starch and continuous fermentation.

It proved to be technologically feasible the utilization of cassava as the raw material for the production of ethanol through a continuous hydrolysis of the starch by

either using commercial enzymes or continuous cultivation of fungus.

An overall analysis of the process , including economy , proved rather promising for the use of commercial enzymes than using enzymes produced by continuous cultivation of fungus.

1. INTRODUÇÃO

Diante da atual conjuntura petrolífera internacional e da necessidade que o Brasil tem de reduzir o problema de sangria de divisas, decorrente das importações de combustível, surgiu o Proálcool, Programa Nacional de Alcool, em 1975, com o objetivo de ampliar a produção de álcool, estimulando a implantação de novas destilarias.

Considerando a tecnologia agroindustrial disponível em nosso país, o etanol via fermentação aparece como uma alternativa de matéria-prima promissora para diversos produtos ora derivados de petróleo.

Atualmente, a agroindústria açucareira é a responsável pela produção brasileira de etanol para fins carburantes, industriais e alimentícios, porém, quaisquer matérias-primas vegetais, ricas em açúcares, amido ou celulose, constituem fontes para produção de etanol. Deve ser ressaltado, entretanto, que a viabilidade de exploração de uma determinada espécie vegetal para fins industriais depende muito das condições clima-edafológicas reinantes na região.

Um dos principais motivos que têm incentivado a utilização destas matérias-primas é a sua renovabilidade, ao contrário de compostos de origem fóssil, que são esgotáveis.

O desenvolvimento e o aproveitamento das fontes renováveis depende de uma combinação propícia de recursos naturais, tec-

nológicos e econômicos.

A mandioca é uma planta que se destaca entre as matérias primas amiláceas, devido à facilidade de sua cultura, sendo cultivada em vastas extensões no nosso país e também em quase todos os países tropicais e subtropicais.

1.1. OBJETIVO

Neste trabalho foi estudado o processo de obtenção de etanol a partir de farinha de mandioca integral por fermentação contínua.

Devido à natureza da matéria-prima, a primeira etapa do trabalho consistiu em estudar a sacarificação do amido contido na farinha. Este estudo foi conduzido segundo duas vias. Uma foi pela utilização, em sistema contínuo, de α -amilase e amiloglicosidase comerciais. A outra foi a sacarificação contínua pelas enzimas amilolíticas extracelulares produzidas por *Aspergillus usami* var. *Shi-rousami* durante a sua cultura contínua.

A fermentação alcoólica, em cultura contínua, foi conduzida utilizando *Saccharomyces cerevisiae* var. *Hakken-1*.

Através dos experimentos em laboratório e com o uso de modelos matemáticos, foram obtidos os valores de constantes de reação enzimática e os parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos, de produção da enzima e de produção do etanol. Baseando-

se nestes parâmetros, alguns aspectos econômicos dos processos foram analisados, através de cálculos com auxílio de computador, tomando-se como função objetiva o custo de produção do etanol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE MATÉRIA-PRIMA

Como foi exposto também por Stupiello (75), a indústria alcooleira no Brasil funcionou sempre como indústria subsidiária, para manter o equilíbrio econômico quando a demanda de açúcar era menor e a sobra de cana era transformada em álcool. Em consequência da crise energética que o mundo atravessa, o panorama atual é diferente, colocando a agroindústria alcooleira entre as mais importantes, principalmente após a oficialização do Programa Nacional do Alcool, em 1975.

Embora todo produto agrícola rico em carboidratos transformáveis em álcool (sacarose, glicose, amido, celulose, etc.) possa ser considerado matéria-prima para a fermentação alcoólica, é imprescindível considerar alguns pontos fundamentais, como condições de cultivo, custo aquisitivo, facilidade de transformação, rendimento em álcool, disponibilidade durante ano, etc..

Ainda de acordo com Stupiello (75), as matérias-primas que apresentam maiores possibilidades são geralmente enquadradas em três grupos:

- açucaradas: melaço de cana-de-açúcar, cana-de-açúcar, sorgo sacarino (colmo), etc.
- amiláceas ou feculentas: mandioca, milho, batata, babaçu, sorgo sacarino (grãos) etc.

- celulósicas: bagaço residual, sabugos, resíduos de madeiras, palhas de amendoim, etc.

Os rendimentos obtidos por algumas destas matérias-primas, em litros/tonelada, são da seguinte ordem:

melaço de cana-de-açúcar	300-380 l/t
cana-de-açúcar	60- 75 l/t
sorgo sacarino (colmo)	60- 75 l/t
sorgo sacarino (grãos)	350-400 l/t
mandioca	150-180 l/t
milho	330-380 l/t
coco de babaçu	70- 80 l/t
batata-doce	120-130 l/t

Ao comparar esses dados, verifica-se que o rendimento de álcool por unidade de massa de matéria-prima é substancialmente mais elevado nas amiláceas ou feculentas que nas açucaradas.

Os valores médios de produtividade agrícola e teor de carboidrato transformável em álcool, para algumas matérias-primas, são da seguinte ordem:

	Produtividade agrícola (t/ha)	Açúcares totais (%)
cana-de-açúcar	60	16
sorgo sacarino (colmo)	25	14
mandioca	12	30
batata-doce	15	25
milho	1,4	65
coco de babaçu	8	15

Na opinião de Moraes (66) e Jackson (36) a cana-de-açúcar e a mandioca são matérias-primas que se complementam para fabricação de álcool, porque a cultura de mandioca é viável em terras arenosas e baratas, que não se prestam à lavoura canavieira, podendo as duas culturas coexistir e expandir sem a interferência de uma com a outra. Além disso, as unidades industriais mistas, desde que sejam bem programadas, aumentariam o período de utilização da planta industrial, reduzindo os custos de manutenção ociosa.

2.1.1. MANDIOCA COMO MATÉRIA-PRIMA PARA PROCESSO FERMENTATIVO

A mandioca encontra-se distribuída em grandes áreas nos países tropicais e subtropicais, sendo conhecida por várias denominações, como macaxeira, cassava, yuca, manioc e tapioca. Seu nome científico é *Manihot esculenta* var. Crantz (11, 27).

De acordo com o Prognóstico 77/78 da Secretaria da Agricultura (63), o Brasil continua sendo o maior produtor mundial da mandioca, embora produza basicamente para o mercado interno e a participação brasileira no mercado mundial seja bastante instável, em decorrência da variação no excedente exportável e da gravosidade do produto brasileiro em relação ao tailandês. As perspectivas para as próximas safras são otimistas, em virtude do incentivo para maior utilização de mandioca na fabricação de álcool carburante.

De uma maneira ou de outra, todas as partes desta planta

podem ser aproveitadas: como alimento, como ração ou industrializada (11, 27).

Para a composição típica do tubérculo de mandioca, os seguintes valores são reportados:

	Edwards (27)	Yang <i>et al.</i> (84)
	%	%
Água	65 - 70	71 - 63
Amido	20 - 30	25 - 33
Açúcares e gorduras	5,0	-
Gorduras	-	0,3
Proteína	1,0 - 2,0	1,0
Fibras	1,0 - 2,0	2,0
Cinzas	0,5 - 1,0	1,7

Os estudos no sentido de melhoramento da cultura têm sido realizados intensamente e algumas publicações relatam que estão sendo obtidas novas variedades que produzem tubérculos com maior teor de proteína e maior rendimento de amido (36, 69).

Esta planta vem desempenhando um papel importante desde os primórdios, não só como fonte de subsistência para muitos povos, mas também como matéria-prima para diversos produtos fermentados.

Um produto de fermentação de mandioca, típico da Nigéria é o "gari" (7, 21), em cujo processamento os microrganismos predominantes são *Corynebacterium manihot* e *Geotrichum candida*.

No Brasil temos a "tiquira", uma aguardente de mandioca muito apreciada no Maranhão, cuja fabricação pelos indígenas era feita por processos primitivos. Hoje, uma técnica mais aperfeiçoa-

da é usada, reduzindo ao mínimo o desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis. Os principais fungos identificados por Lima (41) como responsáveis pela sacarificação do amido na elaboração da "tiquira" são *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum* e *Monília citophila*.

Além da "tiquira", temos ainda alguns alimentos obtidos pela fermentação de mandioca, como "farinha-d'água" e "polvilho azedo", e bebidas alcoólicas conhecidas no Nordeste como "vicou", "caissuma", "cachiri" e "voua-paia" (8, 48).

Com o aumento de interesse em obter alimentos mais ricos em proteínas a partir de matérias-primas vegetais, realizaram-se pesquisas recentes visando a obtenção de concentrados microbianos pela fermentação de farinha de mandioca ou utilizando os resíduos de fecularias de mandioca (18, 53, 65, 70, 82). Uma das indústrias pioneiras bem sucedidas, na Suécia, com aplicação de recursos tecnológicos avançados, desenvolveu o processo Symba, um processo de produção de proteína microbiana com utilização de dois microrganismos, um com a capacidade de sacarificar o amido e o outro com alta velocidade específica de crescimento. O produto final consiste na mistura homogênea de biomassa dos dois microrganismos.

2.1.2. ALCÓOL DE MANDIOCA

No Brasil, o aproveitamento da mandioca para obtenção de álcool foi pesquisado no período de 1932-1945. Nesta época chega-

ram a funcionar com êxito, por alguns anos, algumas destilarias de álcool de mandioca nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (8, 9, 46).

Uma das principais razões por que a mandioca não tem sido devidamente explorada pela indústria alcooleira parece ter sido o progresso exponencial dessa indústria à base de melaço de cana, que prescinde da trabalhosa e onerosa etapa de hidrólise de amido.

Hoje, com a necessidade premente de encontrar novas fontes de energia e com o grande avanço tecnológico, tornou-se oportuno um reexame desta via de industrialização de mandioca.

A manufatura do álcool a partir de mandioca consistia em transformar o tubérculo em farinha, pelo processo tradicional, suspender a farinha em água e aquecer para obter uma mistura pastosa, hidrolisar o amido gelatinizado a glicose, pelo método ácido, fermentar e destilar, semelhantemente ao processamento com qualquer outro material amiláceo (74). O malte de milho passou a ser empregado em substituição aos ácidos minerais (hidrólise ácida), tendo sido constatadas muitas vantagens, tais como não-corrosão do equipamento e maior rendimento de fermentação.

Teixeira (76) comparou alguns agentes de conversão de amido em açúcares fermentescíveis, tendo conseguido os maiores rendimentos em álcool quando utilizou a biomassa seca, obtida pela fermentação em cultura submersa de *Aspergillus niger* NRRL 337, como se pode observar de seus resultados:

Agente de conversão	Rendimento em álcool (% do valor teórico)
Ácidos inorgânicos	43 - 74
Malte de milho 11%	70 - 74
Malte de cevada 7%	70 - 74
Biomassa seca 10%	80 - 85

Conforme a pesquisa realizada por Yang *et al.* (84), o processo de obtenção de etanol de mandioca por fermentação em cultura descontínua é uma opção tecnicamente viável que depende apenas de análise econômica. Foi colocado também que um complexo alcoolquímico, comparado com complexo petroquímico, necessita de um menor número de unidades satélites e oferece a possibilidade de poder ser dimensionado para suprir as necessidades de mercado de um seletivo número de produtos, aspectos esses que parecem importantes ao considerar a carência de capital e o crescimento a taxas diferentes da demanda dos produtos básicos da indústria petroquímica.

Foi desenvolvido por Bianco *et al.* (15) um processo de conversão da mandioca em álcool. Para a produção de α -amilase de *Bacillus subtilis* e de amiloglicosidase de *Aspergillus awamori*, em frascos de Erlenmeyer sob agitação e fermentador pequeno, respectivamente, utilizaram-se meios contendo farinha de mandioca como principal constituinte. A produção de xarope de dextrose a partir da farinha foi conseguida mediante a aplicação das soluções enzimáticas obtidas nas fermentações acima referidas. Como agente de fermentação alcoólica utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1133, realizando-se alguns ensaios em processo descontínuo e em contínuo.

Foi concluído pelos autores que o processamento global (conversão do amido de mandioca em glicose, multiplicação do fermento e produção de álcool por fermentação contínua) apresentou resultados satisfatórios, preenchendo as expectativas alimentadas quanto à utilização da mandioca para produção de álcool de boa qualidade, em condições possivelmente competitivas com fabrico de álcool de cana-de-açúcar.

Para a Nordon, Indústrias Metálicas (63), a mandioca é a única matéria-prima que permitirá sejam atingidas as metas do Pró-álcool. O processo contínuo de destilarias autônomas apresentado pela empresa é muito interessante teoricamente.

Sua instalação é bivalente, isto é, pode ser usada com cana-de-açúcar, bastando eliminar os estágios iniciais correspondentes até a sacarificação da mandioca, que são responsáveis pelo aumento de custos da instalação de 30 a 40%.

O processo envolve a industrialização de fécula de mandioca pelo método convencional associada a uma fermentação alcoólica tipo Melle-Boinot, uma unidade de destilação de multiestágios e um processo de tratamento de resíduos, combinados num sistema contínuo e automatizado.

Em seqüência à obtenção da fécula, o cozimento é realizado em dois estágios, alta e baixa pressão a 140°C, e a hidrólise que é considerada o "calcanhar-de-Aquiles" da tecnologia do álcool de mandioca é efetuada por processos enzimáticos.

Quanto à etapa final, o processo prevê duas alternativas: concentrar a vinhaça para obter um produto com alto teor de proteí

nas, ou incorporar mais um sistema fermentativo para gerar metano combustível que poderia suprir em parte as necessidades da própria instalação.

2.2. ENZIMAS AMILOLÍTICAS, SUA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO

As enzimas podem ser definidas como catalisadores orgânicos que ativam as reações bioquímicas, sendo de suma importância nas indústrias de fermentação, pois todos os processos fermentativos são regidos pelas atividades enzimáticas dos microrganismos (12, 54, 81).

O malte de cevada e farelo fúngico ("mold bran") são os exemplos mais antigos registrados como agentes de conversão de amido nas indústrias de bebidas alcoólicas.

Sabe-se que certos microrganismos produzem dezenas de enzimas de aplicação industrial, sendo muitos deles cultivados e suas enzimas purificadas encontram aplicação comercial.

A qualidade e quantidade relativa ou absoluta das enzimas produzidas pelos microrganismos varia muito entre as espécies e mesmo entre as linhagens da mesma espécie, podendo a produção ser melhorada com alterações de meio de cultura, condições de cultivo e mutações genéticas.

As enzimas amilolíticas de origem fúngica, que são muitas, são quase todas extracelulares e são marcadamente específicas para cada substrato.

A α -amilase que ataca as ligações glicosídicas α -1,4 internas das moléculas de amido causa sua solubilização e redução de viscosidade, formando dextrinas e açúcares redutores.

A β -amilase rompe as ligações glicosídicas α -1,4, sempre a partir das extremidades não-redutoras, com a formação de maltose.

A glicoamilase, que é referida por alguns autores como maltase fúngica, tem ação sobre as ligações glicosídicas α -1,4 das dextrinas e maltose, convertendo-as em glicose. Atualmente, a denominação amiloglicosidase é preferida.

As isoamilases são aquelas que rompem as ligações glicosídicas α -1,6 contidas nas dextrinas-limite, como por exemplo a isomaltase e amilo-1,6-glicosidase.

É interessante lembrar que as enzimas com o mesmo nome, porém obtidas de linhagens distintas de microrganismos, apresentam na maioria das vezes propriedades diferentes.

Originalmente, uma prática comum nos países orientais, era o uso de arroz tratado com vapor como meio de cultura, onde o fungo se desenvolvia e produzia as enzimas amilolíticas - processo "koji", processo "amylo" e processo "amylo-koji".

Na Europa, outros cereais eram usados na forma de farelo, principalmente o farelo de trigo, como meio de cultura para fermentação em superfície. O processo era chamado "bran" e o produto, "mold bran" (farelo fúngico).

Estes processos, modificados e aperfeiçoados, são ainda hoje amplamente utilizados pelas indústrias.

Tendo obtido bons resultados pelos métodos de cultura

submersa de fungos na produção de antibióticos, processos similares têm sido desenvolvidos para obter tais enzimas (58, 59, 74).

É apreciável o número de processos onde as enzimas amilolíticas fúngicas são aplicadas, como na obtenção de xarope, na panificação, nas indústrias têxteis, etc.; a maior aplicação é como agente sacarificante das matérias-primas amiláceas para fermentação alcoólica.

Um dos trabalhos pioneiros de sacarificação de grãos para fermentação alcoólica em escala industrial foi desenvolvido por Underkofler *et al.* (80), segundo os quais o *Aspergillus oryzae* foi considerado o microrganismo mais adequado para produzir as enzimas amilolíticas pelo processo "bran". O rendimento médio em álcool obtido com "mold bran" foi aproximadamente 8% mais alto que o obtido com malte. Analisando o aspecto econômico, concluíram que a produção de álcool industrial com o uso de "mold bran" é definitivamente mais vantajosa que com o malte.

Fukimbara *et al.* (30) fizeram o estudo com batata-doce e várias linhagens de *Aspergillus* e chegaram à conclusão de que existe uma correlação entre a eficiência da fermentação alcoólica e a quantidade de açúcares redutores obtidos pela ação de agentes sacarificantes.

De acordo com as citações de Underkofler (81), Corman e Tsuchiya confirmaram que o rendimento em álcool a partir de grãos tratados com amilases fúngicas está positivamente correlacionado com o teor de maltase, desde que haja quantidade adequada de α -amilase. Pan *et al.* concluíram que a velocidade de fermentação depen-

de da velocidade de hidrólise que, por sua vez, está relacionada com a atividade de maltase contida na enzima amilolítica adicionada e pouco relacionada com α -amilase ou hidrolase de dextrina-limite. No trabalho realizado por Pool e Underkofler, nenhuma correlação direta foi encontrada para o rendimento em álcool com a quantidade absoluta de cada uma das enzimas amilolíticas produzidas por *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger*.

No trabalho desenvolvido por Fukimbara (29) com *Aspergillus awamori*, em fermentação submersa em descontinuo, a biomassa aumentou proporcionalmente com o aumento de aeração, mas o mesmo não aconteceu com o seu poder sacarogênico. Foi tomado o valor de K_d , constante de velocidade de dissolução de oxigênio no meio (g mol de O_2 dissolvido/min.atm.ml de meio), como parâmetro expressivo da intensidade de aeração durante cada fermentação; a produção máxima de α -amilase foi conseguida com K_d próximo a 30×10^{-7} e a produção máxima de enzima sacarogênica foi conseguida numa faixa larga de valores de K_d , de 15×10^{-7} a 45×10^{-7} .

Aikawa *et al.* (3, 4) testaram 98 linhagens de fungos pertencentes ao grupo "amyl" (gênero *Rhizopus*), concluindo que as linhagens que são fortemente amilolíticas em fermentação submersa são as mesmas que produzem mais amilases em fermentação em superfície. Diferentes meios de cultura levaram a proporções diferentes de amilases produzidas por cada linhagem.

Um fator muito importante apontado neste trabalho foi a idade dos esporos utilizados como inóculo da fermentação submersa. Foi observado que existe uma faixa etária ótima dos esporos para

serem transferidos do meio sólido para meio líquido e, fora dessa faixa, resulta em produção baixa de amilases durante a fermentação.

Okazaki *et al.* (55) concluíram que a fermentação descontínua com *Aspergillus niger* U20-2-5 pode ser considerada constituída de duas fases distintas: inicialmente, a fase de proliferação e posteriormente, a fase de produção de glicoamilase. A velocidade específica de crescimento na primeira fase é correlacionada com a concentração de adenina, seguindo a equação de Monod. Na segunda fase, a produção da enzima é acelerada pelos compostos do grupo guanina. Sendo um exemplo típico de fermentação do tipo síntese preferencial, pela classificação de Monod, apresentaria vantagens em fermentação contínua com multiestágio, onde cada estágio receberia controle adequado para a fase correspondente.

Quanto ao efeito da idade de pré-cultura em experimentos de fermentação descontínua, observou-se que a velocidade específica de produção da enzima está correlacionada com o teor de adenina consumida durante a pré-cultura (56). Assim, esquematizou-se a fermentação contínua com três estágios: o primeiro correspondendo ao crescimento, o segundo à produção de glicoamilase e o terceiro ao aproveitamento de atividade produtiva remanescente, fazendo fluir neste último uma solução de adenina.

O modelo cinético para processo de produção de α -amilase por *Bacillus subtilis*, em fermentação descontínua, foi apresentado assumindo que a causa do fenômeno de síntese preferencial de α -amilase bacteriana seria a alta estabilidade de mRNA (38).

Com a utilização de várias enzimas parcialmente purificadas, durante a preparação de infusão de arroz, para a produção de sakê, o seguinte resultado foi obtido por Miyoshi *et al.* (47):

Correlação positiva: álcool vs glicoamilase

dextrina vs α -amilase

nitrogênio total vs glicoamilase

açúcares totais vs protease ácida

Correlação negativa: dextrina vs glicoamilase

Sem correlação: álcool vs α -amilase

Quando o fungo é submetido a fermentação submersa, a forma de crescimento pode variar desde filamentosa até "pellets", com formas intermediárias como floculosa e granular (83). Na forma filamentosa as hifas ficam dispersas no meio de cultura e os "pellets" consistem de massas de hifas aglomeradas.

A velocidade de crescimento dos "pellets" é mais lenta do que das formas filamentosas, porque nos primeiros há menor contato do microrganismo com o oxigênio dissolvido no meio.

São vários os fatores que propiciam a peletização: constituição genética do microrganismo, condições ambientais, como pH, agitação e viscosidade, composição do meio de cultura, tamanho do inóculo e fatores físicos, como forma, tamanho e construção do fermentador.

Algumas fermentações, como a produção de ácido cítrico, são favorecidas pela peletização e as outras, como a produção de penicilina, são prejudicadas.

Na produção de dextrose em escala industrial, tem-se observado com freqüência que há persistência de substâncias turvas e pastosas no líquido sacarificado, acarretando baixo rendimento de hidrólise do amido com α -amilase bacteriana e glicoamilase. Os trabalhos realizados no laboratório da Companhia Nagasse, Japão (39), confirmaram que esse material é constituído de partículas insolúveis de amido e é formado durante o tratamento térmico da suspensão no processo de liquefação. A quantidade dessas partículas foi maior quando se processou a liquefação a temperaturas relativamente baixas ($\sim 68^{\circ}\text{C}$) ou por aquecimento gradativo da suspensão e foi reduzida ao mínimo quando se processou a $88-90^{\circ}\text{C}$ por aquecimento instantâneo, ou com tratamento térmico prévio, a temperaturas altas de $120-130^{\circ}\text{C}$, sob pressão durante 30 minutos (74).

Foi observado também que o nível mínimo de partículas insolúveis apresentado durante o tratamento enzimático depende da fonte de extração do amido. Com a fécula de batata-doce foi obtido o mínimo de partículas insolúveis, oscilando entre 20 e 30mg por 100g de fécula. Com o amido de milho, esse valor foi 9 vezes maior, isto é, aproximadamente 250mg/100g de amido.

Park *et al.* (57) estudaram o efeito da concentração das enzimas, α -amilase e amiloglicosidase e do tempo e temperatura de sacarificação, com condições fixas de liquefação, no processo de produção de xarope de glicose a partir do amido de mandioca pelo mé

todo enzima-enzima. Concluíram que, para se obter uma conversão satisfatória, são necessárias, no mínimo, 1.500 unidades SKB de α -amilase de *Aspergillus niger* NRRL 3122 por 500g de amido e 70 unidades AU de amiloglicosidase de *Bacillus subtilis* NRRL B-941.

A atividade da α -amilase expressa em unidade SKB, definida inicialmente por Sandstendt, Kneen e Blish, é a quantidade de enzima necessária para dextrinizar 1g de amido solúvel em uma hora, sob as condições de análise (12).

A unidade de amiloglicosidase AU é a quantidade de enzima necessária para produzir 1g de glicose em uma hora, quando incubada com uma solução de amido solúvel a 60°C e pH 4,0 (57).

2.3. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica de açúcares fermentescíveis na presença de leveduras obedece à ordem sequencial de reações metabólicas da via Embden-Meyerhof-Parnas (31, 33, 42, 74).

O fenômeno como um todo pode ser representado pela equação de Gay-Lussac, que serve de base para cálculos de eficiência:



Na realidade, há ainda desprendimento de calor e formação de pequena quantidade de produtos secundários, como glicerol, ácido succínico, ácido láctico, etc..

Observa-se na literatura a falta de uniformidade para expressar o rendimento da fermentação alcoólica. As definições, de acordo com Stark (74), são:

a) Eficiência da fermentação (%)

$$\frac{\text{álcool realmente produzido}}{\text{álcool teoricamente produzido dos açúcares fermentescíveis totais}} \times 100$$

b) Eficiência da planta (%)

$$\frac{\text{álcool realmente produzido}}{\text{álcool teoricamente produzido dos carboidratos totais utilizados}} \times 100$$

Esta é a expressão mais empregada nos processos que utilizam matérias-primas amiláceas.

c) Rendimento em álcool

$$\frac{\text{volume de álcool a determinada concentração}}{\text{unidade padrão de matéria-prima processada}}$$

Usualmente é expresso na literatura internacional em galões/bushel.

Pela estequiometria, partindo de 1 mol de glicose, 51,1%

seria transformado em álcool e 48,9% em dióxido de carbono. A produção teórica de álcool é usualmente considerada como 95% do álcool esperado com base na transformação química de açúcar a álcool, assumindo que o 5% restante de açúcar destina-se ao crescimento celular e produtos secundários (33, 74).

Muitos são os fatores que exercem efeito significativo sobre o rendimento ou a eficiência da fermentação: a qualidade da matéria-prima, as condições fisiológicas do inóculo e fatores ambientais, como pH, nível inicial de contaminantes, temperatura, concentração do substrato no mosto, composição nutricional do mosto e concentração do álcool produzido.

Durante a fermentação alcoólica, distinguem-se três fases (42), embora não possam ser estabelecidos, com rigidez, os limites de separação, entre eles: a fase preliminar que se caracteriza por multiplicação celular intensa; a fase tumultuosa, cuja característica é a elevação de temperatura com o intenso desprendimento de dióxido de carbono e conseqüente agitação do mosto e a fase complementar que se caracteriza pela diminuição da intensidade de desprendimento de dióxido de carbono e calor, obtendo-se o vinho com um teor mínimo de açúcares fermentescíveis.

Os principais tipos de processos de fermentação alcoólica industrial são:

a) Sistema de cortes - divisão do vinho da primeira fermentação em dois recipientes, completando-se com mosto fresco para subsequente fermentação.

b) Sistema de reaproveitamento do inóculo - obtenção do pé-de-cuba decantado, retirando o líquido fermentado e realimentando o fermentador com novo mosto.

c) Sistema usando cultura pura - sistema clássico de fermentação que segue todas as etapas, partindo do tubo de cultura pura até as dornas de fermentação.

d) Sistema de recuperação de leveduras - centrifugação de todo o vinho, onde se separa o que se denomina leite ou creme de leveduras e que constitui de 10 a 20% do volume total. As células recuperadas são tratadas com ácido sulfúrico e reaproveitadas numa nova fermentação.

Este último sistema é o chamado processo Melle-Boinot e é o mais comumente usado no Brasil (35). Quando bem controlado, é o processo que oferece maior rendimento pelo fato de se minimizar o consumo de açúcar para produção celular. Entretanto, após várias fermentações sucessivas, muitas substâncias presentes nas matérias primas ou formadas durante a própria fermentação podem agir como inibidoras do metabolismo das leveduras em condições anaeróbicas, causando fermentações incompletas, longas e de menor rendimento.

Um ponto do processo que requer maiores cuidados operacionais é a fase final da fermentação. Não é conveniente aguardar a paralisação total da fermentação na dorna para bombear o vinho ao decantador e, subsequentemente, à caixa de nível, pois neste período final as condições se tornam mais adversas às células, devido à

presença dos produtos secundários tóxicos acima mencionados. Além dessa consideração, a perda do vinho, à espera da centrifugação, é um convite às contaminações, entre as quais se destaca a acética.

e) Outro processo que resulta em rendimentos altos é o de dois estágios, descrito por Hildebrant e Erb (33). Baseia-se no reaproveitamento dos açúcares remanescentes na vinhaça, que são hidrolisados durante a destilação e transformados em açúcares fermentescíveis. Estes açúcares são utilizados pela levedura, no primeiro estágio, sob condições ideais de aeração e agitação para multiplicação celular. No segundo estágio, a fermentação alcoólica é efetuada sob condições anaeróbicas, com adição de mosto novo.

Um cuidado comum indispensável em todos os processos é o que diz respeito à tolerância ao álcool pela levedura, a característica mais importante de cada linhagem. É a taxa de fermentação que é afetada pela concentração de álcool (74).

Trabalhos recentes têm procurado desenvolver a tecnologia de fermentação contínua e, paralelamente, descobrir ou conseguir, através de mutações, as leveduras tolerantes a altas concentrações de açúcar e álcool, sem prejuízo na produção de etanol.

Rose (67) utilizou *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, para fermentar em laboratório mosto com 20 e 25% de açúcares e conseguir rendimentos de 75 a 85%. Neste trabalho, foi considerado o rendimento (%) expresso por:

$$\frac{\text{g etanol formado}}{\text{g etanol teoricamente produzido}} \times 100$$

Saccharomyces carlsbergensis foi testado também em fermentação comercial e comparado com levedura padrão. A concentração de açúcar do mosto para o microrganismo teste foi de 23,6% e, para o microrganismo padrão foi de 12,3%, obtendo-se o rendimento de 77% com o padrão e 80% com o teste.

2.3.1. FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

De acordo com Borzani (17), as primeiras referências sobre a teoria do crescimento de microrganismos em cultura contínua com um nutriente ou substrato limitante datam de 1933, quando foram concedidas as patentes de Kuffner e Kuffner na Áustria, em 1933 e de Scholler na Grã-Bretanha, em 1938. Os primeiros textos com as idéias básicas da fermentação contínua foram publicados por Monod, Novick e Szilard, em 1950. Desde então foram observadas grandes evoluções nas suas técnicas e, hoje, o assunto é profundamente estudado, encontrando-se detalhes apresentados em muitos simpósios e publicações (25, 44, 62, 68, 77).

Atualmente, esta operação é utilizada não só como uma ferramenta para pesquisar o comportamento dos microrganismos, mas também como um processo de produção industrial.

No Brasil, o primeiro trabalho prático foi apresentado por Borzani (17), onde foram obtidas conclusões interessantes e bá

sicas, entre as quais destacam-se as seguintes:

- a) A velocidade de reprodução da levedura e também a de fermentação são bem maiores em um mosto agitado do que no mosto sem agitação.
- b) O número econômico de dornas em uma fermentação descontínua é 8 e na fermentação contínua é 1.
- c) Para uma mesma produção, o custo de instalação para fermentação contínua é cerca de 50 a 60% do custo de instalação para fermentação descontínua ("clássica" ou "Melle-Boinot").
- d) Há possibilidade de utilizar mosto não-esterilizado e efetuar fermentação contínua, em escala de laboratório, com período mínimo de fermentação de 11 horas e, em escala semi-industrial, com período médio de fermentação de 22 horas (período de fermentação = tempo de residência).

De acordo com Borzani (19), um processo fermentativo contínuo compreende várias etapas:

- i) inoculação de uma dorna pelo processo usual;
- ii) quando a fermentação nessa dorna atinge um estágio apropriado, inicia-se a alimentação ininterrupta do tanque com mosto novo, ao

mesmo tempo em que, com igual vazão, retira-se do fermentador material total ou parcialmente fermentado;

iii) algum tempo depois de iniciada a alimentação, estabelece-se regime permanente.

Dada a impossibilidade de manter constantes todos os fatores que interferem no processo, na prática dificilmente se atinge regime permanente.

Os casos mais importantes de fermentação alcoólica, em contínuo, são:

a) Fermentação sem aeração:

- a1) fermentação completa em um único tanque, com ou sem recirculação do microrganismo;
- a2) fermentação completa em dois ou mais tanques ligados em série, com ou sem recirculação do microrganismo;

b) Fermentação com aeração:

- b1) análogo a a1;
- b2) análogo a a2, com aeração na primeira dorna e sem aeração na segunda.

Os problemas que podem aparecer durante a execução do processo são:

- a) Contaminação da cultura - depende dos parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos presentes no mosto.
- b) Degeneração do microrganismo produtor - raramente acontece.
- c) "Oscilações" na curva de resultados (impossibilidade de obtenção de regime permanente), sem que o sistema tenha sido perturbado - problema raro também.
- d) "Arraste" ou "lavagem" ("wash-out") das células - quando a vazão específica ou taxa de diluição (D) é maior do que a máxima velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_m).

Diversas vantagens do processo contínuo, em relação ao descontínuo, podem ser apontadas: produtividade maior, produto mais homogêneo, possibilidade de controles automáticos, etc.

De acordo com Shichiiji (71), quando as células são parcial ou totalmente recuperadas na fermentação contínua, o processo é denominado "re-use". A recuperação pode ser feita por centrifugação ou método de Melle-Beinot e por decantação ou método de Scholler. O primeiro processo é aberto, com separação completa e o segundo é fechado, com separação parcial. Uma dificuldade enorme encontrada na interpretação cinética ou fisiológica do processo foi causada pela falta total de homogeneidade em relação à idade das células.

Asai *et al.* (10, 78) investigaram a fermentação contínua

de melaço, baseando-se nas curvas de crescimento e fermentação em sistema de dois recipientes. Alguns resultados foram concordantes com aqueles obtidos por Iorizani (17).

O trabalho foi desenvolvido aplicando a teoria de Adams:

$$\theta = \frac{V}{\phi} = \frac{n}{v}, \text{ onde}$$

θ - "período de fermentação" ou "tempo de residência" é o intervalo de tempo necessário para substituir todo o líquido existente no recipiente

V - volume ou capacidade útil do recipiente

ϕ - vazão constante do mosto em alimentação

n - concentração de levedura no mosto em fermentação

v - velocidade de reprodução da levedura

Um estudo comparativo de alguns sistemas multiestágios de fermentação foi realizado por Ueda (79) em 1958:

a) Sistema de dois fermentadores, em série, com agitação mecânica;

b) Sistema de quatro colunas de fermentação, em série, cuja agitação foi provocada pelo próprio movimento de entrada e saída do mosto em cada coluna;

c) Sistema de acoplamento de quatro tubos em U, em série, com agitação motivada pela corrente do mosto.

O melhor resultado foi obtido por um sistema combinado de um fermentador agitado mecanicamente e tubos em U, conseguindo uma capacidade de produção 18 vezes maior do que a de sistema de dois fermentadores.

O efeito das condições de fermentação foi estudado por Nishiyama *et al.* (51, 52) e alguns dos seus resultados foram:

a) Durante a esterilização de meio contendo amido de milho sacarificado ocorreu transformação de açúcares fermentescíveis e a intensidade da transformação dependeu do método de sacarificação e da fonte de enzima sacarificante.

b) A velocidade de agitação exerceu influência acentuada no crescimento e viabilidade dos microrganismos e influência menor em relação ao consumo de açúcares.

c) A porcentagem de leveduras viáveis variou com a temperatura de fermentação, principalmente quando a fermentação foi prolongada. Com 25°C esse percentual foi maior do que com 30°C.

d) Acima de pH 5,0 foi observado com freqüência o problema de contaminação. Entretanto, pH abaixo de 4,0 causou dificuldade na manutenção do percentual de leveduras viáveis.

Bose *et al.* (20) conseguiram 43g de etanol/100g de açúcares redutores contidos no melaço, em fermentação contínua, quando

se adicionou uréia e fosfato no mosto de melaço de cana. Ao substituir os nutrientes suplementares por água de maceração de arroz, o rendimento foi maior: 47g de etanol/100g de açúcares.

A utilização de material celulósico, submetido a hidrólise enzimática, como substrato para produção de etanol e proteína microbiana foi investigada por Cysewski *et al.* (22, 23). A produção máxima de etanol por fermentação contínua conduzida com *S. cerevisiae* ATCC 4126 ocorreu com tensão de oxigênio de 0,07mm Hg e 10% de glicose no mosto em alimentação.

Foi provada a praticabilidade da fermentação contínua utilizando material celulósico, embora na estimação do custo de produção de etanol, quase 70% do total são relativos ao custo de matéria-prima.

Uma inovação interessante apresentada foi o uso de vácuo no processo (24). Uma bomba de vácuo foi aplicada a um recipiente para manter pressão baixa no seu interior. Este, por sua vez, foi conectado ao fermentador através de um tubo com dispositivo para condensação de vapor que passasse por ele. Controlando a pressão no recipiente e no fermentador, foi possível fazer com que o vapor de etanol gerado no fermentador fosse condensado e depositado no recipiente. Com isso, eliminou-se parcialmente a inibição causada por alta concentração de álcool e foram obtidos ótimos resultados, aumentando a concentração de glicose no mosto alimentado continuamente até 33,4%.

A produtividade do processo foi elevada combinando o sistema de vácuo com o de recirculação de leveduras.

Um novo tipo de fermentador lançado é o chamado "rotor-fermentador" (45), que consiste de três partes principais: a câmara de fermentação, o eixo revestido com membrana microporosa e a câmara de filtração. A rotação do eixo é variável, sendo acionado por um motor. O meio de cultura fresco é introduzido pelo fundo do fermentador, o meio fermentado que atravessa a membrana microporosa é retirado pela câmara de filtração e a massa celular é retida no fermentador. Com isso, o efeito inibitório causado pela elevação de teor alcoólico é parcialmente eliminado e a energia necessária para o crescimento de novas células é diminuída.

2.3.2. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

Recentemente tem crescido o interesse dos bioquímicos, microbiologistas e bioengenheiros em descrever seus experimentos com modelos matemáticos (5, 6, 13, 16, 37, 40, 60, 61). Usualmente os problemas são complexos e a sua solução requer a ajuda do computador.

Como primeiro passo, o problema deve ser clara e cuidadosamente analisado através de trabalhos práticos. O segundo passo consiste em transformar os conceitos em termos matemáticos e o terceiro passo é a solução das equações diferenciais, ou pelo método analítico, ou pelo método gráfico.

O termo "fermentação" atualmente não é usado com sentido clássico original. Significa reações químicas catalisadas por sis-

tema de enzimas que, por sua vez, são produzidas durante o crescimento de microrganismos (43). Nesses termos, cinética da fermentação é concernente à velocidade dessas reações bioquímicas. As velocidades significantes em fermentação comercial são aquelas de crescimento de microrganismos, utilização de substratos e formação de produtos finais.

Paradoxalmente, enquanto os dados cinéticos são necessários para projetar satisfatoriamente as fermentações contínuas, muitas informações cinéticas são obtidas através de culturas contínuas.

Basicamente, as equações diferenciais para o balanço de massa, de determinado composto, em intervalo de tempo dt , são obtidas seguindo o conceito: variação de massa do composto no fermentador = massa do composto que entra + massa do composto produzido - massa do composto utilizado - massa do composto arrastado.

O problema de abstração matemática em processos biológicos reside na dificuldade de elaboração de modelos de validade geral e, portanto, na dificuldade de extrapolação para processos de caráter diferente (28).

Holzberg *et al.* (34) realizaram experimentos de fermentação de suco de uva, em descontínuo e em contínuo, com *S. cerevisiae* var. *ellipsoidea* e apresentaram a equação cinética correlacionando a concentração do produto álcool, P , e a concentração de célula, N .

$$\frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt} = \mu_{\max} \{1 - 0,235 (P - 2,6)\} \quad , \text{ onde}$$

$\mu_{\max}$ é a máxima velocidade específica de crescimento.

Não constatarem inibição de crescimento com concentração de álcool abaixo de 2,6g/100ml, mas acima de 6,85g/100ml a inibição foi total.

Aiba *et al.* (1) utilizaram meio de cultura contendo glicose e concluíram que o efeito inibitório do produto etanol sobre o microrganismo (mutante de *S. cerevisiae*) é do tipo não-competitivo. As equações apresentadas foram:

$$\mu = \mu_0 e^{-k_1 P} \frac{S}{K_s + S}$$

$$v = v_0 e^{-k_2 P} \frac{S}{K'_s + S}$$

onde:

μ - velocidade específica de crescimento

μ_0 - velocidade específica de crescimento quando $P=0$

v - velocidade específica de produção de etanol

v_0 - velocidade específica de produção de etanol quando $P=0$

P - concentração do produto (etanol)

S - concentração do substrato glicose

K_s, K'_s - constantes de saturação

k_1, k_2 - expoentes empíricos

Após algumas considerações e reavaliação, as equações a-

cima foram rearranjadas (2), obtendo-se:

$$\mu = \frac{\mu_0}{1 + \frac{P}{K_p}} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

$$v = \frac{v_0}{1 + \frac{P}{K'_p}} \cdot \frac{S}{K'_s + S}$$

onde:

K_p , K'_p - constantes empíricas

Observaram que estas equações apresentam similitude com as equações típicas de inibição não-competitiva de enzima pura *in vitro*, e, portanto, seria possível interpretar o significado fisiológico das constantes.

De acordo com Yarovenko *et al.* (85) a quantidade de álcool P produzida em tempo t pode ser calculada utilizando a seguinte equação:

$$P = 0,6222 a (1 - \exp(-k_1 t))$$

onde:

a - concentração inicial de açúcar no meio

k_1 - constante de velocidade de reação que equivale à quantidade de substrato utilizado na unidade de tempo

Bazua *et al.* (14) executaram também experimentos de fer-

mentação utilizando *S. cerevisiae* ATCC 4126 em meio de cultura contendo glicose como substrato. As equações obtidas foram do tipo parabólico:

$$\mu_{\max} = \mu_0 (1 - \bar{P}/P_{\max})^{1/2}$$

$$v_{\max} = v_0 (1 - \bar{P}/P_{\max})^{1/2}$$

onde:

$\bar{P}$ - valor médio de concentração do produto P obtido, quando foram realizados experimentos de fermentação contínua, variando a velocidade específica de crescimento, com determinada concentração de etanol P_0 no meio alimentado

$P_{\max}$ - valor máximo de concentração do produto P, em que as células são ainda viáveis

Uma análise comparativa destas equações com as de Holzb $\ddot{e}$ rg (34) e Aiba (1, 2) foi feita pelos próprios autores e concluiu-se que diferentes expressões foram obtidas, não s $\ddot{o}$ devido à linhagem diferente de microrganismo usado, mas também às condições de experimento e ao m $\acute{e}$ todo de an $\acute{a}$ lise dos dados obtidos.

Na revis $\ddot{a}$ o feita por Zines (36), encontrou-se uma concord $\ddot{a}$ ncia geral de que a concentra $\ddot{c}$ o de etanol causa redu $\ddot{c}$ o na velocidade de crescimento dos microrganismos. No entanto, foi observado que as correla $\ddot{c}$ es desenvolvidas para caracterizar essa redu $\ddot{c}$ o s $\ddot{a}$ o diferentes:

Redução exponencial, segundo Aiba:

$$\mu = \mu_m e^{-kp}$$

Retangular hiperbólica, segundo Eganberdiev:

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot K_p}{K_p + P}$$

Linear, segundo Holzberg e Hinshelwood:

$$\mu = \mu_m (1,0 - qP)$$

Ao investigar o comportamento de *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes*, em quimiostato, com nitrogênio como substrato limitante, Zines (86) concluiu que o mecanismo inibitório do etanol sobre o crescimento do microrganismo é complexo e parece atuar na via sintética do material celular e não na via glicolítica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios práticos foram realizados no Laboratório II do Departamento de Tecnologia de Fermentação da Faculdade de Engenharia da Universidade de Osaka, Japão, e os cálculos no Centro de Computação da mesma Universidade.

3.1. MATERIAL

3.1.1. FARINHA DE MANDIOCA INTEGRAL

A farinha de mandioca integral, contendo cerca de 75% de açúcares totais, foi gentilmente fornecida pela Companhia Mitsui, Osaka, Japão. A constituição média de açúcares totais foi de 1,5% de açúcares redutores, como glicose, e 98,5% de amido.

3.1.2. REAGENTES

Os reagentes químicos utilizados foram adquiridos da Companhia Wako Junyaku Kodo, Japão.

3.1.3. ENZIMAS

α -amilase (Neospitase P K), da Companhia Nagasse Ltda. , Japão, foi utilizada para liquefação do amido da farinha de mandioca integral.

Amiloglicosidase (Amyloglucosidase grade II from *Rhizopus*) da Companhia Sigma Ltda., EUA, foi utilizada para sacarificação do amido liquefeito.

3.1.4. MICRORGANISMOS

Aspergillus usami var. *shirousami* foi escolhido entre as seis linhagens testadas (*Aspergillus usami* var. *shirousami*, *Rhizopus japonicus* 1079, *Rhizopus javanicus* 1082, *Rhizopus javanicus* 1163, *Rhizopus delemar* 1076 e *Rhizopus tonkinensis* 1092), para sacarificar o amido contido na farinha de mandioca, através de seu cultivo em contínuo.

Saccharomyces cerevisiae var. *Hakken-1* foi utilizada para fermentação alcoólica.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1.1. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR

A determinação de açúcares redutores, como glicose, foi

feita pelo método de Somogyi-Nelson (59, 72) e a de açúcares totais, em termos de glicose, pelo método de fenol (26).

3.2.1.2. DETERMINAÇÃO DE ETANOL

A concentração de etanol foi determinada pelo método de difusão de Conway (49).

O rendimento em álcool foi calculado seguindo a fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{etanol (ml/100ml)} \times 100}{\text{açúcares totais iniciais (\%)} \times 0,644}$$

3.2.1.3. DETERMINAÇÃO DE MASSA CELULAR

A massa celular de *S. cerevisiae* foi estimada pela densidade ótica a 610nm, com curva de calibração correlacionada à massa celular seca.

A massa celular de *A. usami* foi determinada pesando a massa celular seca, após a separação por centrifugação e duas lavagens com água destilada.

3.2.1.4. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da enzima amilolítica produzida pelos fungos

foi determinada fazendo atuar 1ml de sobrenadante do meio fermentado do centrifugado sobre 8ml de solução 0,2% de amido solúvel em tam-pão fosfato 10mM a pH 4,5, durante 30min a 30°C. Para interromper a atividade enzimática, adicionou-se 1ml de NaOH 0,5N e a quantidade de glicose liberada foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson.

Uma unidade de atividade amilolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar o amido para liberar 1µmol de glicose em 1 minuto, sob as condições de análise. Durante o balanço de massa, essa unidade foi expressa em termos de g glicose/l/h.

3.2.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMO PRODUTOR DE ENZIMA AMILOLÍTICA

O teste das 6 linhagens de fungos, para sacarificação de amido, foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 500ml, contendo 150ml de meio de cultura esterilizado, que consistiu de 5% de farinha de mandioca integral e 2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH ajustado para 4,5.

Como inóculo, os esporos de fungo foram introduzidos para obter um número aproximado de 10^6 esporos/ml de meio.

A incubação foi feita a 30°C sob agitação rotatória de ~180rpm, durante 24, 48 e 72 horas.

Após a tomada de amostras efetuou-se a inoculação com 10% V/V de mosto previamente preparado na pré-fermentação de *S. cerevisiae*.

A fermentação alcoólica foi conduzida durante 72h, a 30°C, sem agitação mecânica.

3.2.3. ESTABILIDADE DA ENZIMA AMILOLÍTICA PRODUZIDA POR *A. usami*, EM PRESENÇA DE ETANOL

A produção de enzima amilolítica foi feita em frascos de Erlenmeyer de 500ml, contendo 150ml do mesmo meio utilizado em 3.2.2.. O mesmo critério de inoculação e incubação foi seguido. Com 50h de incubação, analisou-se a atividade enzimática, adicionou-se etanol em concentrações diferentes e os frascos foram fechados com rolha de borracha e mantidos a 30°C, sob agitação magnética, durante 100 horas.

3.2.4. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO AMIDO CONTIDO NA FARINHA DE MANDIOCA INTEGRAL

Foi preparada a suspensão contendo 30% de farinha de mandioca, 0,5g de Neospitase P K/100g de amido, 5mM de NaCl e 1mM de acetato de cálcio em água destilada. Os sais foram adicionados para aumentar a estabilidade da enzima ao calor. O pH da suspensão foi ajustado para 6,0.

A suspensão foi submetida à liquefação enzimática em contínuo, utilizando fermentador de 2 litros, com 1 litro de volume

de operação, mantendo-se a temperatura entre 85-87°C durante o regime permanente. Variou-se o fluxo da suspensão para trabalhar com diferentes tempos de residência.

A influência da alteração do tempo de residência foi analisada pela velocidade com que a dextrina da suspensão liquefeita é sacarificada pela ação de amiloglicosidase. As amostras de cada tempo de residência foram centrifugadas e diluídas várias vezes e a velocidade de sacarificação foi determinada a 30°C, pela mesma técnica utilizada para a determinação de atividade enzimática.

3.2.5. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM VIABILIDADE PARA UTILIZAÇÃO EM PROCESSO COMERCIAL

Objetivou-se utilizar um meio de cultura à base de farinha de mandioca integral, com adição mínima de nutrientes complementares.

O meio de cultura à base de farinha de mandioca foi preparado adicionando-se apenas o sulfato de amônia como fonte de nitrogênio, que é deficiente na farinha (0,2-0,3%). Foi comparado com o meio de cultura contendo amido solúvel, sulfato de amônia, extrato de levedura e fosfato de potássio.

Composição do meio de cultura 1.a

Farinha de mandioca integral	100g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20g/l

Composição do meio de cultura 1.b

Amido solúvel	100g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20g/l
Extrato de levedura	3g/l
KH_2PO_4	10,9g/l

Composição do meio de cultura 2.a

Farinha de mandioca integral sacarificada (em termos de glicose)	100g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20g/l

Composição do meio de cultura 2.b

Amido solúvel sacarificado (em termos de glicose)	100g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20g/l
Extrato de levedura	3g/l
KH_2PO_4	10,9g/l

O pH dos meios foi ajustado para 4,5 e a esterilização foi feita a 121°C durante 15 minutos.

Para preparar o amido sacarificado, a suspensão foi inicialmente submetida à liquefação pelo método descrito no item 3.2. 4., com tempo de residência de 90 minutos. Ajustando-se a pH 4,5, adicionou-se 0,5g de amiloglicosidase/100g de amido e a sacarificação se processou durante 12h a 50°C. Após a completa sacarificação, a suspensão foi filtrada a vácuo para eliminar os sólidos insolúveis.

Com os meios 1.a e 1.b, a hidrólise do amido foi feita a través do cultivo de *A. nramii*. Introduziu-se inicialmente 10^6 esporos/ml de meio, incubando-se a 30°C, sob agitação rotatória a 180rpm, durante 12 e 18 horas. Foi inoculado então com 10% V/V de mosto obtido na pré-fermentação de *S. cerevisiae*. O etanol produzido foi determinado após 48h de fermentação sem agitação mecânica.

Com os meios 2.a e 2.b, os meios esterilizados foram inoculados com 10% V/V de mosto obtido na pré-fermentação de *S. cerevisiae*. A fermentação alcoólica realizou-se durante 48 horas, a 30°C, sem agitação mecânica.

3.2.6. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.6.1. MEIO DE CULTURA UTILIZADO NA PRÉ-FERMENTAÇÃO, PARA PREPARAR INÓCULO DE *S. Cerevisiae*

Componente	g/l
Glicose	50
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5
KH_2PO_4	10,9
Extrato de levedura	1
pH 4,5	

3.2.6.2. MEIO DE CULTURA PARA FERMENTAÇÃO CONTÍNUA COM *S. cerevisiae*

O meio de cultura para fermentação contínua com *S. cerevisiae* consistiu de farinha de mandioca sacarificada, filtrada e esterilizada. A solução de sulfato de amônia, esterilizada separadamente, foi adicionada, obtendo-se a composição final do meio com 10g de açúcares redutores, como glicose e 5g de sulfato de amônia/l. Ajustou-se a pH 4,5.

3.2.6.3. MEIO DE CULTURA PARA OBTENÇÃO DE ESPOROS DE *A. usami*

Foi utilizado o meio de batata-dextrose-agar:

Componente	g/l
Extrato de batata (200g batata/l água cozida e filtrada)	
Glicose	20
Agar	15
pH 4,5	

3.2.6.4. MEIO DE CULTURA PARA PRÉ-FERMENTAÇÃO DE *A. usami*

O inóculo para cultura contínua de *A. usami* foi preparado semeando os esporos (10^7 - 10^8 esporos/ml) no seguinte meio: farinha de mandioca sacarificada diluída para 20±2g de açúcares redutores, como glicose/l de meio, adicionando-se-lhe 8g de sulfato de amônia. pH 4,5.

3.2.6.5. MEIO DE CULTURA PARA CULTURA CONTÍNUA DE *A. usami*

Dois diferentes meios de cultura foram utilizados para a cultura contínua de *A. usami*.

Meio A - Farinha de mandioca sacarificada. Após filtração, o filtrado da suspensão de farinha de mandioca sacarificada foi diluído e esterilizado, adicionando-se-lhe solução de sulfato de amônia esterilizada separadamente, obtendo-se o meio de cultura contendo $6,4 \pm 0,2$ g de açúcares redutores e 2,5g de sulfato de amônia/litro.

Meio B - Farinha de mandioca cozida. A suspensão de farinha de mandioca integral foi submetida a cocção até ebulição. Para eliminar o material fibroso da suspensão cozida, passou-se por uma peneira; a concentração desejada de açúcares totais foi conseguida pela diluição com água destilada. A adição de sulfato de amônia foi feita da mesma maneira como na preparação do meio A.

Em ambos os meios o pH foi ajustado para 4,5.

3.2.7. CULTURA CONTÍNUA

3.2.7.1. *S. cerevisiae*

Os experimentos de fermentação contínua com *S. cerevisiae*

foram feitos em um fermentador convencional de 2 litros de capacidade, com 1 litro de volume de operação, ajustando-se a temperatura e o controle de pH a 30°C e 4,5, respectivamente. A agitação foi de 200rpm e para manter a pressão positiva no interior do fermentador, sob anaerobiose, gás de nitrogênio foi introduzido numa taxa constante de 0,1vvm. A pré-fermentação se realizou em aproximadamente 18 a 24 horas e mais 18 a 24 horas foram necessárias para cultura descontínua antes de começar a fermentação contínua. Cuidadosamente, a velocidade de alimentação foi mantida constante em cada valor de taxa de diluição, tomando-se 5 a 6 amostras com intervalos de 4 horas para confirmar o regime permanente.

O efeito inibitório do etanol sobre o crescimento da levedura e produção de etanol foi investigado adicionando quantidades determinadas de etanol ao meio estéril de alimentação, durante os experimentos de fermentação contínua. A quantidade de etanol produzido foi determinada pela diferença de concentração de etanol no meio fermentado e no meio em alimentação.

3.2.7.2. *A. usami*

O inóculo de *A. usami* foi preparado em frascos de Erlenmeyer, incubando-se no agitador rotatório a 30°C, durante aproximadamente 30 horas, após introdução de grande concentração de esporos (10^7 - 10^8 esporos/ml).

A cultura contínua de *A. usami* iniciou-se após 48-55 horas de cultivo descontínuo, num fermentador semelhante àquele uti-

lizado com *S. cerevisiae*. A taxa de aeração aplicada foi de 1vvm e a temperatura e pH foram mantidos a 30°C e 4,5, respectivamente.

Geralmente a cultura contínua de microrganismo filamentoso em escala de laboratório é dificultada devido à aderência na parede e à existência de acessórios, possibilitando a formação de massas compactas de filamentos. Este fato causa erros apreciáveis na determinação de concentração celular e também torna impossível a obtenção de regime permanente.

A dificuldade foi contornada utilizando fermentador de vidro, de parede lisa, introduzindo no interior apenas a barra de agitação magnética e eletrodo de pH. O sistema de transferência de calor foi um banho-maria e a drenagem do meio fermentado foi intermitente ao invés de contínua, através de uma bomba peristáltica connectada a um temporizador controlado para acionar a bomba sempre que o volume do meio dentro do fermentador chegasse a 30-40ml acima do volume útil estabelecido (2 a 2,5mm).

Para cada velocidade específica de crescimento, o regime permanente foi confirmado analisando 5 a 6 amostras com intervalos de 10 a 12 horas.

3.2.8. MÉTODOS MATEMÁTICOS

3.2.8.1. MODELO MATEMÁTICO

A. Processo de fermentação contínua em um estágio, utilizando enzim

mas amilolíticas comerciais, cujo fluxograma está mostrado na Fig. 1.

Considerando-se o fermentador com agitação contínua e calculando-se a quantidade de amido no meio pela diferença entre a concentração de açúcares totais e de açúcares redutores, as seguintes expressões para balanço de massa no fermentador foram obtidas:

Em relação à concentração de amido S:

$$\frac{dS}{dt} = D (S_0 - S) - f_C r' \quad (1)$$

onde:

D - taxa de diluição, definida como a taxa de alimentação do meio pelo volume de operação

S₀ - concentração de amido no meio em alimentação

f_C - fator de conversão amido-glicose, igual a 0,9

r' - velocidade de sacarificação por amiloglicosidase

A velocidade de sacarificação é expressa como função da concentração de amido, de acordo com a equação de Michaelis-Menten:

$$r' = \frac{r'_m E' S}{(K'_m + S)} \quad (2)$$

onde,

r'_m - máxima velocidade específica de sacarificação por amiloglicose

sidase

E' - concentração de amiloglicosidase

K'_m - constante de Michaelis-Menten

Em relação à concentração de glicose G :

$$\frac{dG}{dt} = r' + D(G_0 - G) - \left(\frac{\mu_S}{Y_{GS}} + m_S \right) X_S \quad (3)$$

onde,

G_0 - concentração de glicose no meio de alimentação

μ_S - velocidade específica de crescimento de *S. cerevisiae*

Y_{GS} - coeficiente de rendimento relativo ao crescimento de *S. cerevisiae*

m_S - coeficiente de manutenção de *S. cerevisiae*

O terceiro termo da equação (3) corresponde à velocidade específica de consumo de glicose por *S. cerevisiae*, conforme a equação:

$$v_S = \left(m_S + \frac{\mu_S}{Y_{GS}} \right) X_S \quad (4)$$

ou

$$\frac{1}{Y_{apS}} = \frac{1}{Y_{GS}} + \frac{m_S}{\mu_S} \quad (4')$$

onde,

Y_{apS} - coeficiente de rendimento aparente relativo ao crescimento

de *S. cerevisiae*

Para a concentração de células de *S. cerevisiae* X_S :

$$\frac{dX_S}{dt} = \mu_S X_S - DX_S \quad (5)$$

onde,

μ_S - velocidade específica de crescimento de *S. cerevisiae* e função da concentração de glicose, de acordo com a equação de Monod:

$$\mu_S = \frac{\mu'_{mS} G}{K_{SS} + G} \quad (6)$$

onde,

μ'_{mS} - máxima velocidade específica de crescimento de *S. cerevisiae* sob influência de alta concentração de etanol

K_{SS} - constante de saturação

Para a concentração do etanol P :

$$\frac{dP}{dt} = \pi_S X_S - DP \quad (7)$$

onde,

π_S - velocidade específica de produção de etanol e também função da concentração de glicose, de acordo com a equação de Monod:

$$\mu_S = \frac{\mu'_{mS} G}{K'_{sS} + G} \quad (8)$$

onde,

μ'_{mS} - máxima velocidade específica de produção de etanol, sob a influência de alta concentração de etanol

K'_{sS} - constante de saturação

Quando se considera o efeito inibitório causado pelo etanol:

$$\mu'_{mS} = \mu_{mS} f(P) \quad (9)$$

$$\mu'_{mS} = \mu_{mS} f'(P) \quad (10)$$

onde,

$f(P)$ e $f'(P)$ - funções obtidas empiricamente e dependem da concentração de etanol

μ_{mS} e μ'_{mS} - máximas velocidades específicas de crescimento e produção de etanol, respectivamente, quando não há efeito inibitório do etanol

Em regime permanente:

$$\mu_S = D \quad (11)$$

$$S = \frac{1}{2} \left\{ -\left(\frac{f_C r'_m E'}{D} + K'_m - S_O\right) + \sqrt{\left(\frac{f_C r'_m E'}{D} + K'_m - S_O\right)^2 + 4K'_m S_O} \right\} \quad (12)$$

$$r' = \frac{1}{2} \cdot \frac{D}{f_C} \left(S_O + K'_m + \frac{f_C r'_m E'}{D} - \sqrt{\left(\frac{f_C r'_m E'}{D} + K'_m - S_O \right)^2 + 4K'_m S_O} \right) \quad (13)$$

$$G = \frac{D K_{SS}}{\mu_{mS} f(P) - D} \quad (14)$$

$$X_S = \frac{r' + D(G_O - G)}{\frac{D}{Y_{GS}} + \mu_S} \quad (15)$$

$$P = \frac{\mu_{mS} f'(P) G X_S}{D(K'_{SS} + G)} \quad (16)$$

B. Processo de fermentação contínua em dois estágios, utilizando enzima amilolítica produzida por *A. usami*, cujo diagrama de fluxo está mostrado na Fig. 2.

1º Estágio:

Durante o cultivo contínuo de *A. usami* descobriu-se que quando se utiliza o meio de cultura B, existe um substrato limitante L que não é glicose.

A expressão obtida para a massa celular de *A. usami* foi:

$$X_{Al} = Y(L_O - L_1) \quad (17)$$

onde,

L_O - concentração de substrato limitante no meio de alimentação ,

contendo determinada concentração de açúcares totais

L_1 - concentração de substrato limitante no interior do primeiro fermentador

Y - rendimento relativo ao crescimento, para substrato limitante L

Quando a concentração do meio de alimentação é aumentada

A vezes L_0 , a massa celular passa de X_{A1} para X'_{A1} :

$$X'_{A1} = Y (AL_0 - L_1) \quad (18)$$

O termo YL_0 pode ser expresso como uma função de X_{A1} e X'_{A1} , podendo ser determinado experimentalmente.

$$YL_0 = \frac{X'_{A1} - X_{A1}}{A - 1} \quad (19)$$

Assumindo que a máxima velocidade específica de crescimento de *A. usami* é uma função da concentração de substrato limitante L , de acordo com a equação de Monod, obtém-se a expressão:

$$\mu_{A1} = \frac{\mu_{mA1} L_1}{L_1 + K_{SA1}} \quad (20)$$

Desde que, em regime permanente, $\mu_{A1} = D_1$,

$$\frac{1}{D_1} = \frac{1}{\mu_{mA1}} + \frac{1}{(YL_0 - X_{A1})} \cdot \frac{YK_{SA1}}{\mu_{mA1}} \quad (21)$$

A equação (18) pode ser generalizada para qualquer concentração de meio de alimentação:

$$X_{A1} = Y(BL_O - L_1) = B(YL_O) - \frac{(YK_{SA1}) D_1}{\mu_{mA1} - D_1} \quad (22)$$

B é múltiplo de L_O .

Assumindo-se que a concentração de amido é igual à concentração de açúcares totais menos a concentração de glicose, tem-se a equação de balanço de massa do amido no primeiro fermentador:

$$\frac{dS_1}{dt} = D_1(S_O - S_1) - f_c r_1 \quad (23)$$

onde,

r_1 - velocidade de sacarificação de amido pelas enzimas amilolíticas produzidas por *A. usami*

Considerando que a reação enzimática obedece à equação de Michaelis-Menten, tem-se a seguinte expressão:

$$r_1 = \frac{r_m E_1 S_1}{K_m + S_1} \quad (24)$$

A concentração de enzima E_1 e a atividade enzimática U_1 estão diretamente correlacionadas pelo fator k

$$E_1 = k U_1 \quad (25)$$

O balanço de massa com respeito à concentração de enzima pode ser expressa pela seguinte equação:

$$\frac{dE_1}{dt} = g(X_{A1}) - D_1 E_1 \quad (26)$$

onde,

$g(X_{A1})$ - velocidade de produção de enzima por *A. usami*

A velocidade específica de produção de enzima é uma função da velocidade específica de crescimento μ_{A1} , que em regime permanente corresponde à taxa de diluição D_1 :

$$\frac{g(X_{A1})}{X_{A1}} = a + b D_1 \quad (27)$$

Aplicando as equações (25) e (26), em regime permanente, obtêm-se a equação:

$$\frac{D_1 U_1}{X_{A1}} = \frac{a}{k} + \frac{b}{k} D_1 \quad (28)$$

A partir das equações (24) e (25), obtêm-se a expressão:

$$\frac{U_1}{r_1} = \frac{1}{r_m k} + \frac{K_m}{r_m k} \cdot \frac{1}{S_1} \quad (29)$$

O balanço de massa em relação à concentração de glicose, pode ser expresso por:

$$\frac{dG_1}{dt} = r_1 - D_1(G_1 - G_0) - \left(\frac{\mu_{A1}}{Y_{GA1}} + m_{A1}\right) X_{A1} \quad (30)$$

onde o terceiro termo da equação corresponde à velocidade específica de consumo de glicose por *A. usami*, conforme a seguinte equação:

$$v_{A1} = \left(m_{A1} + \frac{\mu_{A1}}{Y_{GA1}}\right) X_{A1} \quad (31)$$

A concentração de amido e de glicose, em regime permanente, pode ser calculada, respectivamente, pelas expressões:

$$S_1 = \frac{1}{2} \left(S_0 - K_m - \frac{f_c r_m E_1}{D_1} + \sqrt{\left(S_0 - K_m - \frac{f_c r_m E_1}{D_1} \right)^2 + 4 S_0 K_m} \right) \quad (32)$$

$$G_1 = \frac{r_1}{D_1} + G_0 - \left(\frac{1}{Y_{GA1}} + \frac{m_{A1}}{D_1} \right) X_{A1} \quad (33)$$

2º Estágio

O balanço de massa com respeito à concentração de amido:

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_1 S_1}{V_2} + \frac{F'_0 S_0}{V_2} - D_2 S_2 - f_c r_2 \quad (34)$$

onde,

$$r_2 = \frac{r_m E_2 S_2}{K_m + S_2} \quad (35)$$

e

$$D_2 = \frac{F_1 + F'_0}{V_2} \quad (36)$$

onde,

F_1 = fluxo de meio de cultura que passa de primeiro fermentador para o segundo

F'_0 = fluxo do meio fresco alimentado ao segundo fermentador

Em relação à concentração de enzima:

$$\frac{dE_2}{dt} = \frac{F_1 \cdot V_1}{V_2} - D_2 E_2 \quad (37)$$

Em relação à concentração de glicose:

$$\frac{dG_2}{dt} = \frac{F_1 G_1}{V_2} + \frac{F'_0 G_0}{V_2} + r_2 - \left(\frac{\mu_{S2}}{Y_{GS2}} + m_{S2} \right) X_{S2} - \frac{(F_1 + F'_0) G_2}{V_2} \quad (38)$$

Com respeito à massa celular:

$$\frac{dX_{S2}}{dt} = \mu_{S2} X_{S2} - D_2 X_{S2} \quad (39)$$

$$\mu_{S2} = \frac{\mu'_{mS2} G_2}{K_{S2} + G_2} \quad (40)$$

Para concentração de etanol:

$$\frac{dP_2}{dt} = \mu_{S2} X_{S2} - D_2 P_2 \quad (41)$$

$$\mu_{S2} = \frac{\mu'_{mS2} G_2}{K'_{SS2} + G_2} \quad (42)$$

Em regime permanente, as seguintes equações são obtidas:

$$S_2 = \frac{1}{2F_2} (F_1 S_1 + F'_O S_O - F_2 K_m - f_{Cr_m E_2} V_2) + \frac{1}{2F_2} \cdot \sqrt{(F_1 S_1 + F'_O S_O - F_2 K_m - f_{Cr_m E_2} V_2)^2 + 4F_2 K_m (F_1 S_1 + F'_O S_O)} \quad (43)$$

$$G_2 = \frac{D_2 K_{SS2}}{\mu_{mS2} f(P) - D_2} \quad (44)$$

$$X_{S2} = \frac{F_1 G_1 + F'_O G_O + V_2 r_2 - F_2 G_2}{\left(\frac{D_2}{Y_{GS2}} + m_{S2}\right) V_2} \quad (45)$$

$$P_2 = \frac{\mu_{mS2} f'(P) G_2 X_{S2}}{(K'_{SS2} + G_2) D_2} \quad (46)$$

3.2.8.2. OBTENÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

Após os experimentos de fermentação em laboratório, foram

desenvolvidos os modelos matemáticos, determinando-se através dos gráficos, as constantes da reação enzimática, os parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos, de produção da enzima e de produção do etanol. Para traçar as retas, foi utilizado o método dos mínimos quadrados (73).

3.2.8.3. CONSIDERAÇÕES ECONÔMICAS SOBRE OS PROCESSOS

Os aspectos econômicos dos processos foram analisados com o auxílio de um computador, do sistema N700, série NEAC 2200.

Os cálculos foram feitos utilizando-se os parâmetros cinéticos obtidos empiricamente, constantes obtidas da literatura e dados de custo.

Para encontrar os valores ótimos de parâmetros operacionais, como taxa de diluição, taxa de aeração e velocidade de rotação do agitador, utilizou-se o método Simplex modificado (32), seguindo-se o diagrama de cálculos esquematizado na Fig. 10. O diagrama foi subdividido em duas partes: 1 e 2. A parte 1 foi aplicada para fermentação anaeróbia e todo o diagrama foi utilizado no caso de sistema aerado.

A função objetiva foi definida como a soma dos custos requeridos no processo:

- a) matéria-prima (farinha de mandioca integral)
- b) material suplementar (fonte de nitrogênio e enzimas)
- c) equipamento

d) eletricidade

e) água

f) vapor

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SELEÇÃO DE MICRORGANISMO PRODUTOR DE ENZIMA AMIOLÍTICA

Os resultados do teste de 6 linhagens de fungos no experimento em frascos de Erlenmeyer estão mostrados no Quadro I. Maior atividade enzimática e maior produção de etanol foram conseguidas com *A. usamii* var. *shirousamii*.

4.2. ESTABILIDADE DE ENZIMA AMIOLÍTICA PRODUZIDA POR *A. usamii*, EM PRESENÇA DE ETANOL

Como se pode observar na Fig. 3, a enzima produzida por *A. usamii* mostrou-se estável durante 100h, em presença de etanol, na faixa de concentração de 1-8%.

4.3. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO AMIDO CONTIDO NA FARINHA DE MANDIOCA INTEGRAL

O mesmo problema reportado por Komaki (39) foi observado por Nojiri (53), durante o tratamento enzimático da farinha de mandioca. De acordo com suas informações, toda vez que a suspensão de farinha de mandioca era submetida a aquecimento gradativo, em batelada, resultava em formação de partículas pastosas e insolúveis à

ação enzimática. Conseqüentemente, obtinha-se um baixo grau de sacarificação e baixo grau de aproveitamento do substrato. Segundo o mesmo autor, no processo de tratamento enzimático por aquecimento instantâneo, o menor grau de insolubilização de amido, sem que houvesse inativação considerável de enzima pelo calor, era conseguido a 85-87°C.

Com base nessas informações, foram feitos os ensaios de liquefação contínua do amido de farinha de mandioca, pelo método descrito em 3.2.4., cujos resultados estão mostrados no Quadro II. Maior grau de hidrólise de amido, isto é, maior grau de conversão de amido em açúcares redutores, foi conseguido com tempo de residência de 90 minutos.

Para amostras de suspensões liquefeitas com diferentes tempos de residência, submetidas à ação de amiloglicosidase, a maior velocidade específica de formação de açúcares redutores determinados, como glicose, foi conseguida com a amostra da suspensão liquefeita com 90min de tempo de residência, como mostra a Fig. 4.

A constante de Michaelis-Menten (K'_m) e a máxima velocidade específica de sacarificação de amido da farinha de mandioca (r'_m), determinadas para cada tempo de residência, pelo gráfico de Lineweaver-Burk, estão mostradas no Quadro III. O maior valor de r'_m e menor valor de K'_m foram conseguidos com a mesma amostra de suspensão liquefeita com 90min de tempo de residência.

4.4. ESTUDO COMPARATIVO DE ALGUNS MEIOS DE CULTURA

Os 4 diferentes meios de cultura (1.a, 1.b, 2.a e 2.b) foram testados para observar a viabilidade do uso da farinha de mandioca integral como principal componente do meio.

O Quadro IV mostra que os meios de cultura 1.a e 2.a foram superiores aos meios 1.b e 2.b, tanto do ponto de vista econômico, quanto pelo rendimento em álcool e utilização de açúcar. Confirmou-se, assim, a viabilidade do uso do meio de cultura contendo apenas a farinha de mandioca integral e sulfato de amônia.

4.5. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA EM UM ESTÁGIO, UTILIZANDO ENZIMAS AMILOLÍTICAS COMERCIAIS COMO AGENTE SACARIFICANTE

4.5.1. CULTURA CONTÍNUA DE *S. cerevisiae*

A Fig. 5 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de fermentação contínua com *S. cerevisiae*, utilizando o meio de cultura definido em 3.2.6.2.. O rendimento em álcool conseguido foi relativamente baixo (cerca de 70%), com baixa taxa de utilização de açúcares redutores em termos de glicose.

4.5.2. OBTENÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

Foi assumido que, nas concentrações de álcool obtido durante os ensaios de fermentação contínua, cujos resultados foram

mostrados na Fig. 5, o efeito inibitório do etanol é desprezível.

A Fig. 6 apresenta o gráfico de Lineweaver-Burk, através do qual foram determinados os valores da máxima velocidade específica de crescimento de *S. cerevisiae* (μ_{mS}) e da constante de saturação (K_{sS}).

A Fig. 7 correlaciona o rendimento aparente relativo ao crescimento com a velocidade específica de crescimento. Através dela foram obtidos os valores do rendimento real relativo ao crescimento (Y_{GS}) e coeficiente de manutenção de *S. cerevisiae* (m_S).

Através da Fig. 8, que correlaciona a concentração de glicose com a velocidade específica de produção de etanol, foram obtidos os valores da máxima velocidade específica de produção de etanol por *S. cerevisiae* (q_{mS}) e constante de saturação (K'_{sS}).

Estes parâmetros cinéticos relativos a *S. cerevisiae* foram resumidos no Quadro V.

A Fig. 9 mostra o efeito inibitório do etanol sobre o crescimento da levedura e a produção de etanol. Através deste gráfico foram obtidas as funções empíricas $f(P)$ e $f'(P)$, que dependem da concentração de etanol e representam o efeito inibitório desta sobre o crescimento da levedura e a produção de etanol, respectivamente. As funções obtidas foram:

$$f = f(P) = f'(P) = 1,43 - 0,01593P$$

4.5.3. CONSIDERAÇÕES ECONÔMICAS

Alguns aspectos econômicos do processo apresentado na Fig.1 foram analisados utilizando-se os dados resumidos nos Quadros III, V e VII e a Parte 1 da Fig. 10.

A Fig. 11 mostra o efeito da concentração de amiloglicosidase e do volume do fermentador sobre o custo de produção de etanol. Na faixa considerada, a economia do processo foi proporcional ao tamanho do fermentador. Quanto à concentração de amiloglicosidase em relação ao amido, o processo foi mais econômico com 0,03%. Quando a amiloglicosidase é adicionada em excesso, o custo do processo é influenciado pelo preço da enzima e quando há falta de amiloglicosidase a baixa produtividade acarreta maior custo.

Na Fig. 12 são apresentados os resultados do efeito do volume de fermentador e da concentração de açúcares totais na alimentação. Ocorreu a mesma tendência anteriormente descrita quanto ao volume de fermentador. O processo apresentou-se mais econômico, na faixa de concentração de açúcares totais de 8 a 10%.

No Quadro VIII resumem-se as condições operacionais ótimas para o processo.

Uma análise da distribuição do custo total de produção de etanol, sob estas condições operacionais, está apresentada no Quadro IX. Pode-se observar que mais de 80% do custo total é devido aos componentes do meio de cultura. Nestas mesmas condições operacionais, assumindo-se a venda do subproduto proteína, o preço estimado para álcool foi 48 yens/kg.

4.6. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA EM DOIS ESTÁGIOS, UTILIZANDO ENZIMAS AMIOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *A. usami*

4.6.1. CULTURA CONTÍNUA DE *A. usami*

Os resultados obtidos em cultura contínua de *A. usami*, utilizando farinha de mandioca sacarificada (meio A, definido em 3.2.6.5.), estão mostrados na Fig. 13.

Ao traçar o gráfico de Lineweaver-Burk, na Fig. 14, notou-se a existência de duas retas interceptando-se onde a concentração de glicose corresponde a 0,6g/l. Portanto, para *A. usami*, cultivado nessas condições, a máxima velocidade específica de crescimento e sua afinidade pelo substrato apresentaram dois valores diferentes:

$$\text{para } G: 0,6\text{g/l} : \mu_m = 0,05 \text{ h}^{-1} \text{ e } K_S = 0,04\text{g/l}$$

$$\text{para } G: 0,6\text{g/l} : \mu_m = 0,09 \text{ h}^{-1} \text{ e } K_S = 0,6\text{g/l}$$

A Fig. 15 mostra os resultados obtidos na cultura de *A. usami*, utilizando o meio de cultura B, definido em 3.2.6.5., com concentração de açúcares totais de 7,4g/l.

Confrontando as Fig. 13 e 15, notou-se que a concentração de glicose é diferente nos dois meios, aos mesmos valores de taxa de diluição, apesar de ter mantido constante o seu valor du-

rante cada regime permanente.

Devido a este fato, foi considerado que no meio B existe um substrato limitante L que não é glicose. Com base nesse conceito, foi desenvolvido o modelo matemático para o 1º estágio.

Foram feitos também ensaios de cultura contínua de *A. u-samii*, utilizando o mesmo meio B, com outra concentração de açúcares totais: 3,6g/l. Os resultados estão apresentados na Fig. 19.

Nos primeiros experimentos utilizando fermentador com todos os controles internos, deparou-se com grave problema de peletização. Este problema foi contornado pelo método descrito no item 3.2.7.2.

Algumas observações práticas na cultura submersa de *A. u-samii*:

a) quando há peletização do microrganismo na pré-fermentação, difícilmente se consegue retornar a cultura à forma filamentosa no fermentador.

b) alguns dos métodos observados para evitar a peletização durante a pré-fermentação foram: utilização de meio de cultura altamente viscoso ou introdução de número grande de esporos (10^7 - 10^8 esporos/ml).

c) sempre que houver algum ponto de retenção de microrganismo (superfície rugosa, pequenas saliências ou reentrâncias) no interior do fermentador, este ponto poderá ser o foco inicial da peletização.

d) a drenagem do meio fermentado deve ser bem controlada porque, dependendo do sistema de drenagem, as hifas aderem à tubulação, causando a saída do mosto com concentração celular menor do que a do interior do fermentador.

4.6.2. OBTENÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

Nas Fig. 16 e 20 a velocidade de consumo específico por *A. usami* foi correlacionada com a taxa de diluição e determinados os valores do coeficiente de rendimento relativo ao crescimento (Y_{GA}) e coeficiente de manutenção de *A. usami* (m_A).

Pelas Fig. 17 e 21, onde a taxa de diluição foi correlacionada com a atividade específica da enzima amilolítica, foram obtidos os valores de constantes empíricas a/k e b/k . Os valores encontrados não foram exatamente iguais nos dois gráficos e foi calculado o valor médio.

Os valores da constante de Michaelis-Menten (K_m) da enzima amilolítica produzida por *A. usami* e da máxima velocidade específica foram obtidos pelas Fig. 18 e 22.

Utilizando-se a Fig. 23 e a equação (19), foi encontrado o valor da expressão (YL_0), coeficiente de rendimento celular aparentemente multiplicado pela concentração de substrato limitante na alimentação.

A Fig. 24 é o gráfico representativo da equação (21), tendo sido determinados os valores das constantes (μ_{mA}) e (YK_{SA}) atra

vês dele.

Os parâmetros relativos a *A. uvarum* foram resumidos no Quadro VI.

4.6.3. CONSIDERAÇÕES ECONÔMICAS

Os aspectos econômicos do processo, cujo fluxograma foi representado na Fig. 2, foram analisados com base nos dados resumidos nos Quadros V, VI e VII e Fig. 10.

A Fig. 25 mostra o efeito da concentração de açúcares totais na alimentação sobre o custo de produção de etanol, considerando o volume do segundo fermentador igual a 300m³. A concentração de açúcares totais de 8 a 10% na alimentação resultou em produção de etanol mais econômica.

Quanto ao efeito do volume do fermentador, na faixa considerada, 300m³ em ambos os estágios, resultou em processo mais econômico. Observou-se também, pela Fig. 26, que a combinação de mesmo volume nos dois estágios foi sempre mais vantajosa.

As condições operacionais ótimas para este processo foram resumidas no Quadro X.

A distribuição do custo total de produção de etanol nestas condições operacionais está apresentada no Quadro XI. Neste processo o gasto devido aos componentes do meio de cultura foi 64% do total e a parcela devida ao equipamento foi 27%.

Considerando-se a venda da proteína, o preço estimado pa

ra etanol produzido nas condições operacionais, apresentadas no Quadro X, foi 53 yens/kg.

A Fig. 27 mostra o que aconteceria ao custo se a atividade enzimática obtida no 1º fermentador fosse o dobro daquela considerada na Fig. 26. Nota-se um grande decréscimo no custo unitário do etanol obtido, confirmando-se assim que a atividade da enzima produzida pelo fungo é um fator importante que atua na produtividade do processo e, em consequência, no custo de produção de etanol.

A tendência geral observada em relação à influência da produtividade do processo sobre o custo total de produção de etanol está ilustrada na Fig. 28. O exemplo tomado foi o processo em um estágio, com 0,03% de amiloglicosidase em relação ao amido e 8% de açúcares redutores na alimentação.

Foi observada a existência de uma correlação inversa entre a produtividade de etanol e o custo total de sua produção. Existe uma correlação direta entre o custo total de produção e o percentual devido a equipamento, sendo inversa a correlação entre este e o percentual devido a componentes do meio de cultura.

Comparando os Quadros VIII e X, a taxa de diluição ótima para fermentação alcoólica foi bem maior no processo que utiliza enzimas comerciais. Sendo o valor da taxa de diluição ótima para fermentação alcoólica uma função da concentração da enzima presente, a baixa taxa de diluição no segundo estágio do processo que utiliza *A. usami* deve-se à baixa produtividade da enzima amilolítica obtida no primeiro estágio.

Como consequência da diferença no valor da taxa de dilui

ção ótima, a produtividade de etanol pelo processo utilizando enzimas comerciais foi aproximadamente 4 vezes maior do que pelo processo utilizando *A. niger*.

Do ponto de vista operacional, pode-se afirmar que o controle da aplicação de enzima comercial é muito mais fácil do que o controle de uma cultura de fungo. Nas condições estudadas, com a aplicação de enzimas e microrganismos utilizados no estudo, o primeiro processo apresentou-se muito mais favorável do que o outro, também pelo aspecto econômico.

ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS

PAG.

QUADROS

Quadro I. Fermentação em frascos de Erlenmeyer, utilizando diferentes linhagens de fungos	78
Quadro II. Liquefação contínua do amido de farinha de mandioca integral	79
Quadro III. Parâmetros cinéticos para a ação de amiloglicosidase comercial com farinha de mandioca liquefeita a diferentes tempos de residência	79
Quadro IV. Resultados do estudo comparativo de farinha de mandioca com amido solúvel como meio de cultura	80
Quadro V. Parâmetros cinéticos para fermentação contínua de <i>S. cerevisiae</i>	81
Quadro VI. Parâmetros cinéticos da fermentação contínua de <i>A. usami</i> , em meio de cultura B	81
Quadro VII. Dados de custo e constantes utilizados para considerações econômicas	82
Quadro VIII. Condições operacionais ótimas para o processo de fermentação contínua em um estágio, utilizando enzimas comerciais como agente sacarificante	83
Quadro IX. Distribuição do custo total de produção de etanol	

nol pelo processo de fermentação contínua em um estágio, utilizando enzimas comerciais para hidrólise de amido	83
Quadro X. Condições operacionais ótimas para o processo de fermentação contínua em dois estágios, utilizando enzimas amilolíticas produzidas por <i>A.usamii</i>	84
Quadro XI. Distribuição do custo total de produção de etanol pelo processo de fermentação contínua em dois estágios com dois microrganismos	84

FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo de etanol utilizando enzimas comerciais como agente sacarificante	85
Figura 2. Fluxograma do processo de produção de etanol utilizando dois microrganismos	86
Figura 3. Efeito do etanol na estabilidade da enzima sob condições anaeróbias	87
Figura 4. Velocidade de hidrólise de amido de mandioca por amiloglicosidase, após diferentes tempos de tratamento com α -amilase	88
Figura 5. Fermentação contínua de farinha de mandioca sacarificada, com <i>S. cerevisiae</i>	89
Figura 6. Gráfico de Lineweaver-Burk para fermentação contínua com <i>S. cerevisiae</i>	90

Figura 7. Correlação entre rendimento aparente e velocidade específica de crescimento (<i>S. cerevisiae</i>)	91
Figura 8. Correlação entre velocidade específica de produção de etanol e concentração de glicose (<i>S. cerevisiae</i>)	92
Figura 9. Efeito inibitório de etanol sobre velocidade específica de crescimento e de produção de etanol	93
Figura 10. Diagrama de cálculos para considerações econômicas sobre os processos	94
Figura 11. Efeito da concentração de amiloglicosidase na alimentação e volume do fermentador sobre função objetiva	95
Figura 12. Efeito da concentração de açúcares totais e volume do fermentador sobre função objetiva	96
Figura 13. Fermentação contínua de farinha de mandioca sacarificada, com <i>A. usami</i> (meio A)	97
Figura 14. Gráfico de Lineweaver-Burk para fermentação contínua com <i>A. usami</i>	98
Figura 15. Fermentação contínua de farinha de mandioca (meio B) ($AT_0=7,4g/l$), com <i>A. usami</i>	99
Figura 16. Correlação entre taxa de diluição e velocidade específica de consumo de glicose por <i>A. usami</i> ($AT_0=7,4g/l$)	100
Figura 17. Correlação entre taxa de diluição e atividade	

específica de enzima amilolítica ($AT_O=7,4g/l$)	101
Figura 18. Gráfico de U/r vs $1/S$ ($AT_O=7,4g/l$)	102
Figura 19. Fermentação contínua de farinha de mandioca, (meio B) ($AT_O=3,6g/l$), com <i>A. usami</i>	103
Figura 20. Correlação entre taxa de diluição e velocidade específica de consumo de glicose por <i>A. usami</i> ($AT_O=3,6g/l$)	104
Figura 21. Correlação entre taxa de diluição e atividade específica de enzima amilolítica ($AT_O=3,6g/l$)	105
Figura 22. Gráfico de U/r vs $1/S$ ($AT_O=3,6g/l$)	106
Figura 23. Fermentação contínua de farinha de mandioca, com <i>A. usami</i> , usando-se concentração diferente de açúcares totais na alimentação	107
Figura 24. Gráfico de $1/D$ vs $1/(Y_{L_O}-X_1)$	108
Figura 25. Efeito da concentração de açúcares totais na <u>a</u> limentação sobre função objetiva, considerando o volume do segundo fermentador = $300m^3$	109
Figura 26. Efeito do volume de fermentadores sobre a função objetiva. Açúcares totais na alimentação = $80g/l$	110
Figura 27. Efeito do volume de fermentadores sobre a função objetiva, ao assumir a atividade enzimática duas vezes maior. Açúcares totais na <u>alimen</u> tação = $80g/l$	111

Figura 28. Influência da produtividade de etanol sobre o
custo total de processo e sua distribuição 112

Quadro I. Fermentação em frascos de Erlenmeyer, utilizando diferentes linhagens de fungos

Cultura de fungo (agitado)	24h	48h			72h		
	72h				72h		
Ferment.alcoólica (estático)							
	Etanol (mg/ml)	Glicose (mg/ml)	Ativ.enz. (U/ml)	Etanol (mg/ml)	Glicose (mg/ml)	Ativ.enz. (U/ml)	Etanol (mg/ml)
<i>A. uvarum</i> var. <i>Schoubskii</i>	7,5	11,0	0,03	7,5	0,69	0,54	8,75
<i>R. javanica</i> 1163	-	9,2	-	3,75	0,17	-	5,75
<i>R. delenar</i> 1076	-	2,7	-	6,0	0,96	-	6,75
<i>R. javanica</i> 1079	5,0	1,6	-	6,0	0,24	-	6,25
<i>R. javanica</i> 1082	7,5	4,3	0,06	7,5	2,5	0,15	7,25
<i>R. torulensis</i> 1092	2,5	2,3	-	3,75	1,2	-	4,0

Quadro II. Liquefação contínua do amido de farinha de mandioca integral

Tempo de residência (min)	Açúcares totais (g/l)	Açúcares redutores (g/l)	Grau de hidrólise (%)
30	173,5	56,5	32,6
50	179,8	63,1	35,1
90	183,1	65,2	35,6
110	178,1	48,4	27,2

Quadro III. Parâmetros cinéticos para a ação de amiloglicosidase comercial com farinha de mandioca liquefeita, a diferentes tempos de residência

Tempo de residência (min)	Constante de Michaelis-Menten (K'_m) (g/l)	Máxima velocidade específica de sacarificação de amido (r'_m) (g/glicose/g enzima/min)
30	4,17	7,14
50	3,10	9,10
90	2,86	11,1
110	2,94	10,0

Quadro IV. Resultados do estudo comparativo de farinha de mandioca com amido solúvel
como meio de cultura

Meio	Tempo de cultivo de <i>A. niger</i>	Ativ. Enz. (U/ml)	Etanol (ml/100ml)	Rendimento em álcool (%)	Utilização de açúcar (%)
1.a	12	0,16	3,99	82,8	91,2
	18	0,60	4,39	90,9	93,5
1.b	12	0,08	2,88	44,7	80,6
	18	0,18	4,24	65,8	83,6
2.a			5,10	79,2	91,9
2.b			3,39	52,7	77,6

Quadro V. Parâmetros cinéticos para fermentação contínua de *S. cerevisiae*

Parâmetro	Valor
μ_{mS}	0,176 h ⁻¹
m_S	0,322 g glicose/g célula/h
Y_{GS}	0,148 g célula/g glicose
K_{sS}	0,53 g glicose/l
η_{mS}	0,752 g etanol/g célula/h
K'_{sS}	0,303 g glicose/l

Quadro VI. Parâmetros cinéticos da fermentação contínua de *A. ustralis*, em meio de cultura B

Parâmetro	Valor
μ_{mA}	0,057 h ⁻¹
m_A	0,006 g glicose/g célula/h
Y_{GA}	0,54 g/célula/g glicose
Y_{L_O}	1,40 g célula/l
YK_{SA}	0,012 g célula/l
a/k	-0,0375g glicose/g célula/h ²
b/k	3,482 g glicose/g célula/h
r_m	0,09
K_m	0,60 g glicose/l

Quadro VII. Dados de custo e constantes utilizadas para considerações econômicas

Calor específico do vapor	1,0 Kcal/kg/°C
Calor específico da água	1,0 Kcal/kg/°C
Temperatura de saturação do vapor	164,0 °C
Temperatura de esterilização	120,0 °C
Temperatura do meio	20,0 °C
Calor latente de vaporização	494,0 Kcal/kg
Temperatura da água de resfriamento	17,0 °C
Coeficiente global de transferência de calor do trocador de calor	10000,0 Kcal/m ² /h/°C
Área de transferência de calor	0,52m ² /m ³
Coeficiente para custo de construção de fermentador	123,0 yen/h
Temperatura de cultivo	30,0 °C
Coeficiente global de transferência de calor do resfriador no fermentador	1200,0 Kcal/m ² /h/°C
Massa específica da água e meio	1000,0 kg/m ³
Pressão do ar de entrada no compressor	10336,0 kg/m ²
Custo da água de resfriamento	4,48yen/m ³
Custo da eletricidade	0,635yen/kWh
Custo do vapor	7,0 yen/m ³

Quadro VIII. Condições operacionais ótimas para o processo de fermentação contínua em um estágio, utilizando enzimas comerciais como agente sacarificante

Taxa de diluição	0,131 h ⁻¹
Volume do fermentador	300 m ³
Concentração de amiloglicosidase	0,03% em relação a amido
Concentração de açúcares totais na alimentação	80-100g/l

Quadro IX. Distribuição do custo total de produção de etanol pelo processo de fermentação contínua em um estágio, utilizando enzimas comerciais para hidrólise de amido

	Custo (yen/kg etanol)	Porcentagem (%)
Matéria-prima	49,543	50,4
Material suplementar	30,375	30,9
Equipamento	10,911	11,1
Eletricidade	1,475	1,5
Água	0,688	0,7
Vapor	5,308	5,4
Total	98,3	100,0

Produtividade do etanol = 1430kg/h

Produtividade da proteína = 400kg/h

Quadro X. Condições operacionais ótimas para o processo de fermentação contínua em dois estágios, utilizando enzimas amilolíticas produzidas por *A. niger*

Taxas de diluição

D_1	$0,050 \text{ h}^{-1}$
D_2	$0,072 \text{ h}^{-1}$

Volume dos fermentadores

V_1	300m^3
V_2	300m^3

Taxa de aeração no 1º estágio $0,22\text{vvm}$

Velocidade de agitação no 1º estágio 195rpm

Concentração de açúcares totais na alimentação $80-100\text{g/l}$

Quadro XI. Distribuição do custo total de produção de etanol pelo processo de fermentação contínua em dois estágios, com dois microrganismos

	Custo (yen/kg etanol)	Porcentagem (%)
Matéria-prima	103,390	49,0
Material suplementar	30,806	14,6
Equipamento	57,181	27,1
Eletricidade	5,908	2,8
Água	4,431	2,1
Vapor	9,284	4,4
TOTAL	211,000	100,0
Produtividade do etanol = 374kg/h		
Produtividade de proteína = 490kg/h		

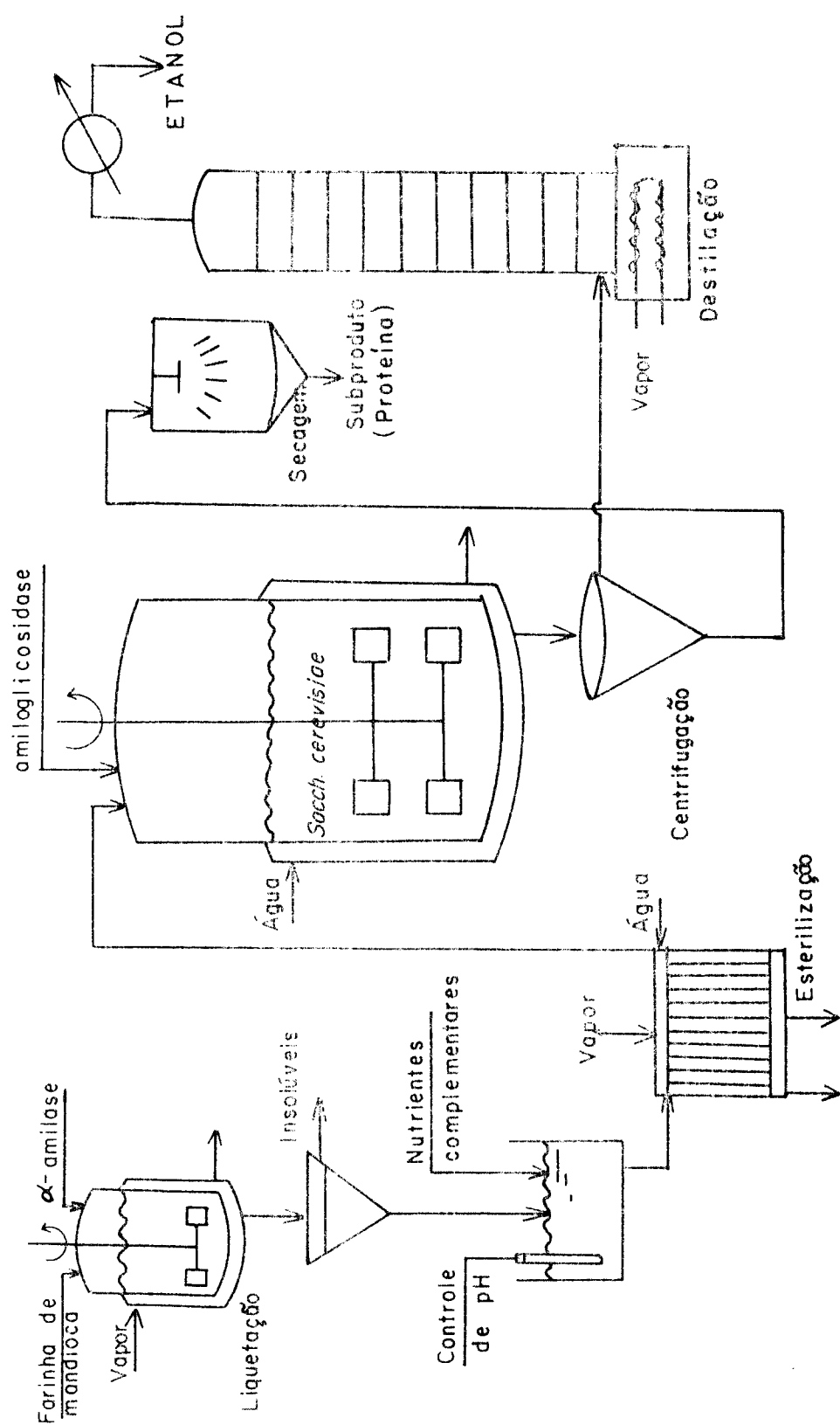


Fig. 1. Fluxograma do processo de produção de etanol utilizando enzimas comerciais como agente sacarificante.

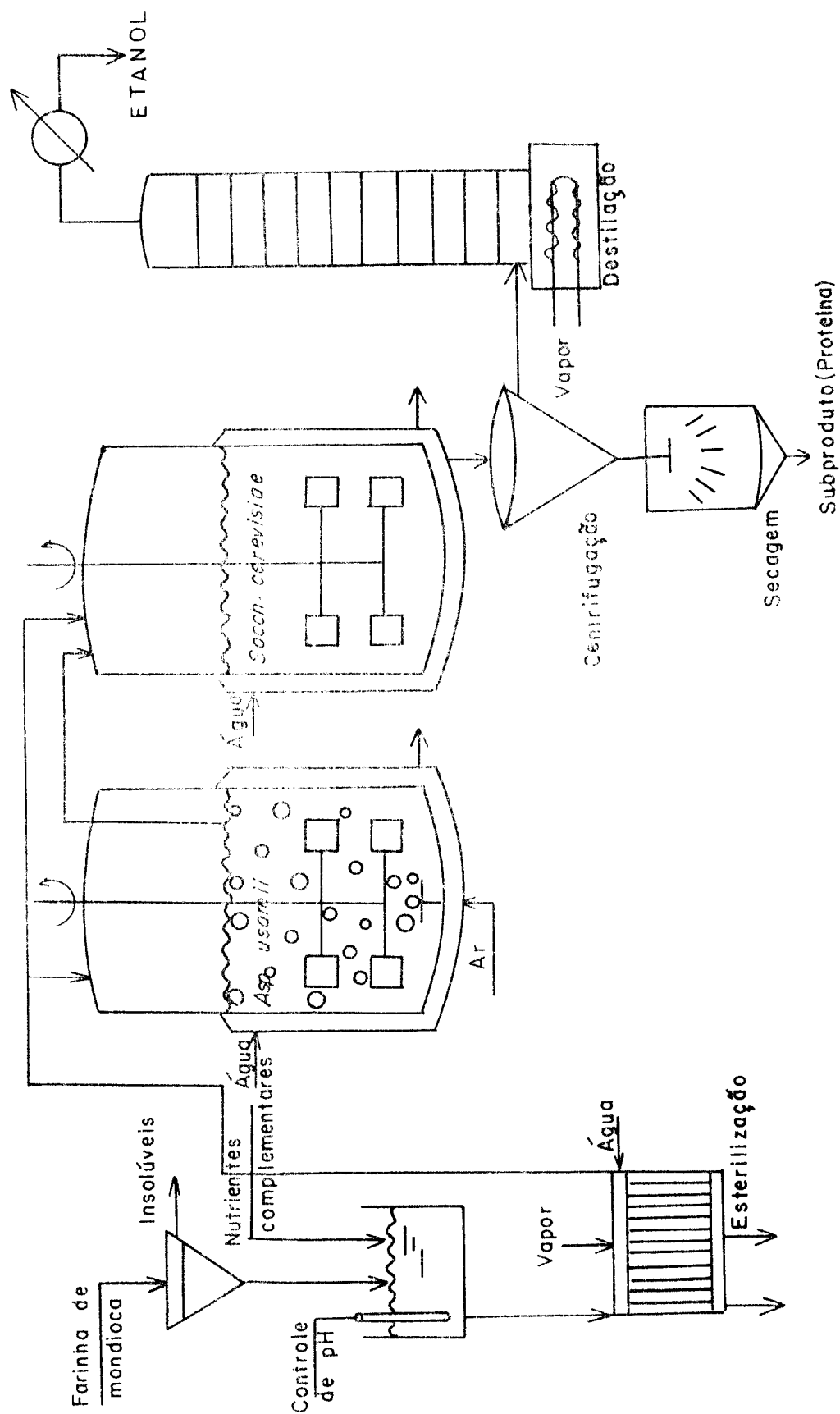


Fig. 2. Fluxograma do processo de produção de etanol utilizando dois microrganismos.

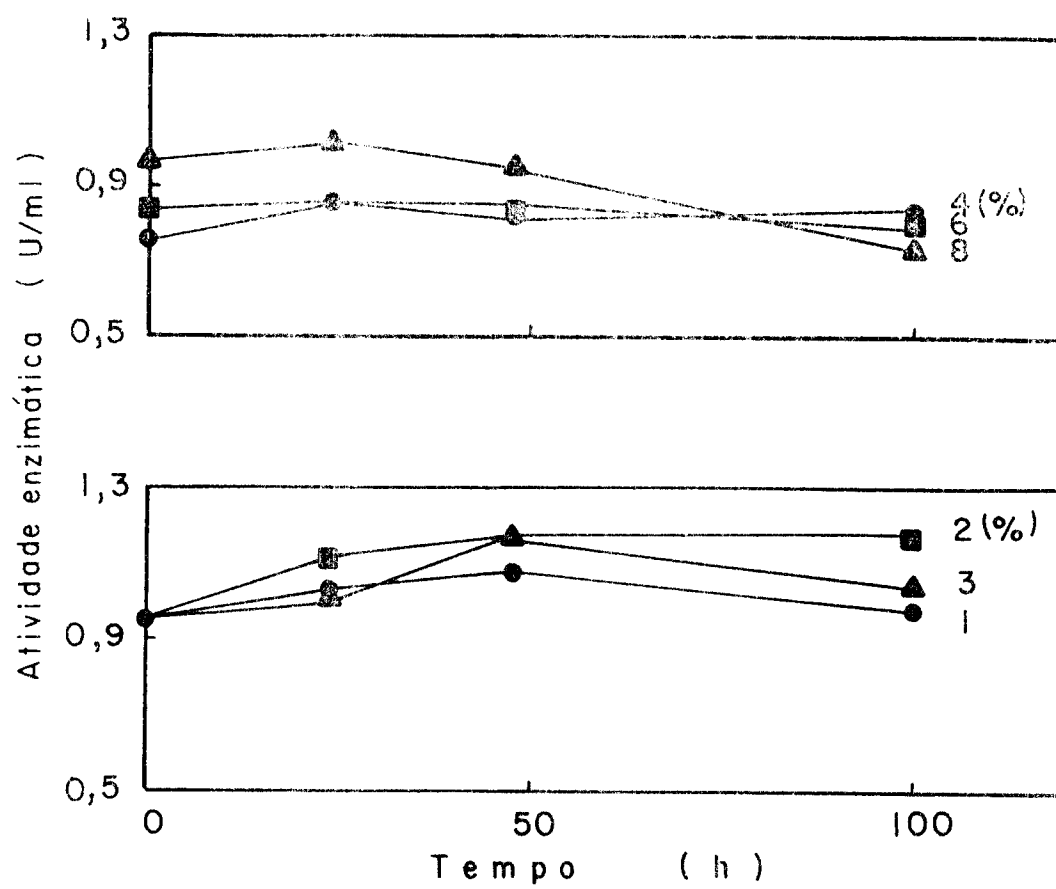


Fig. 3. Efeito do etanol na estabilidade da enzima sob condições anaeróbias

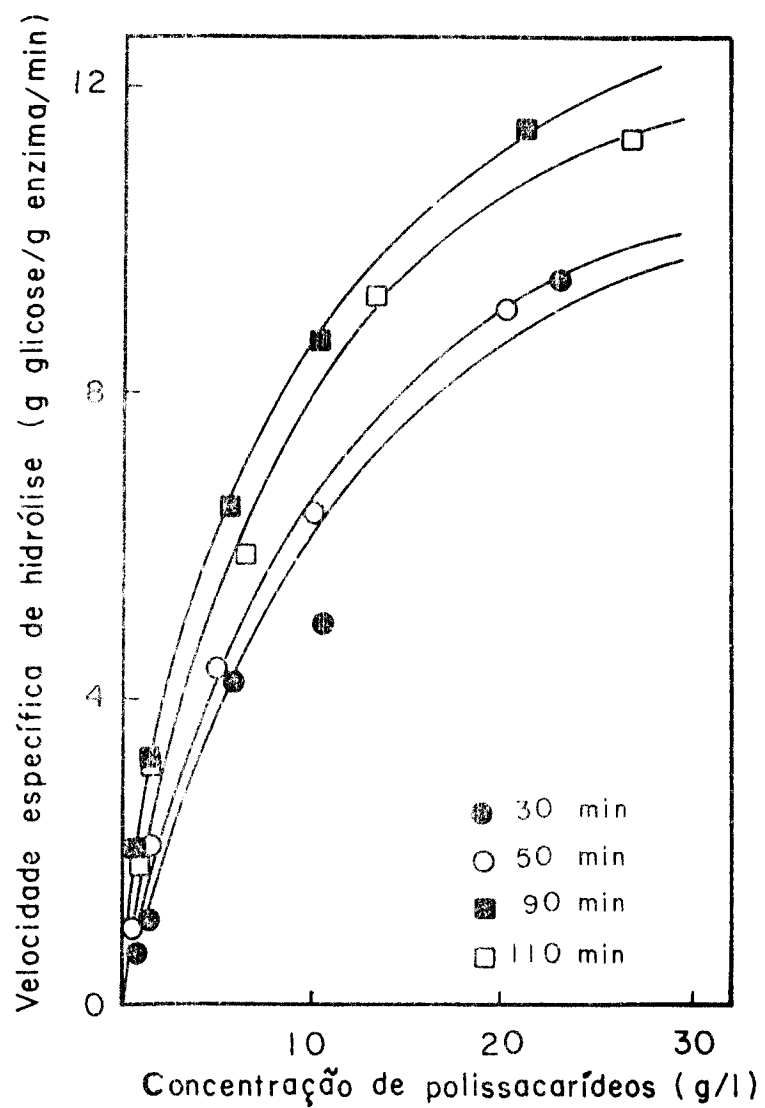


Fig. 4. Velocidade de hidrólise de amido de mandioca por amiloglicosidase, após diferentes tempos de tratamento com α -amilase.

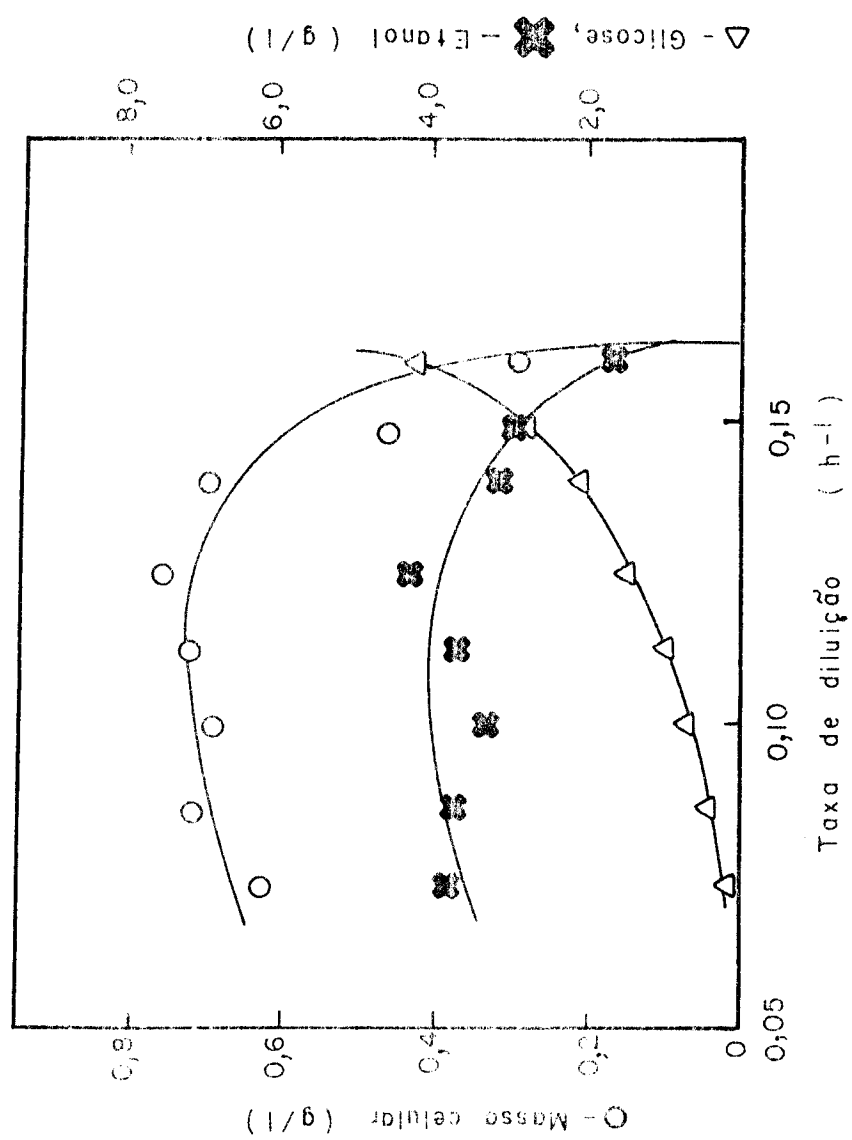


Fig. 5. Fermentação contínua de farinha de mandioca sacarificada, com *S. cerevisiae*.

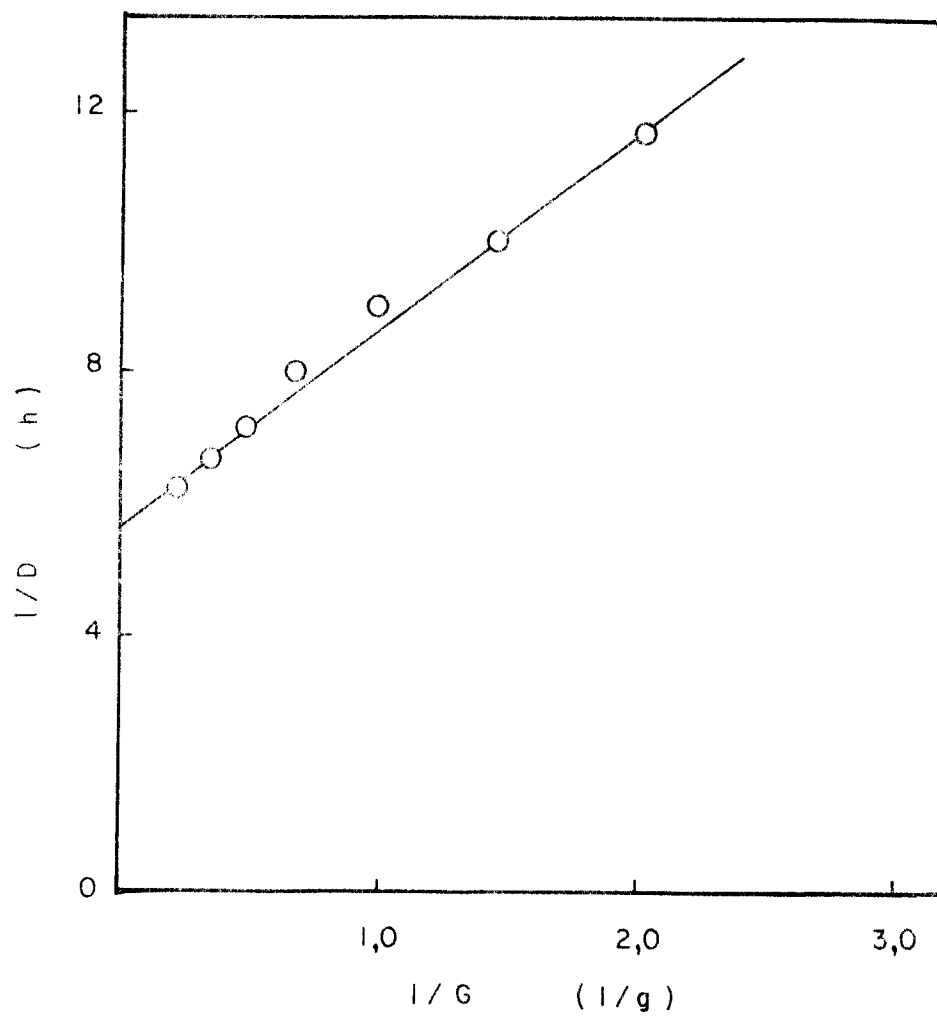


Fig. 6. Gráfico de Lineweaver - Burk (*S. cerevisiae*)
 $\mu_m = 0,176 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 0,53 \text{ g glicose/l}$

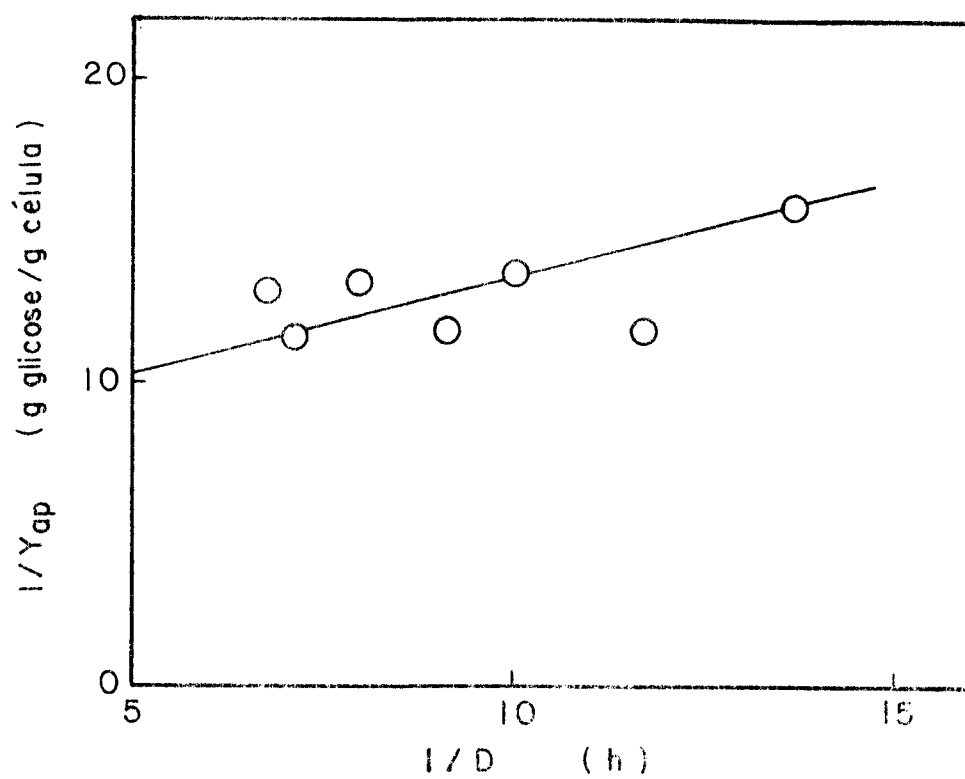


Fig. 7. Correlação entre rendimento aparente e velocidade específica de crescimento

(*S. cerevisiae*)

$Y_G = 0,148 \text{ g célula/g glicose}$

$m = 0,322 \text{ g glicose/g célula/h}$

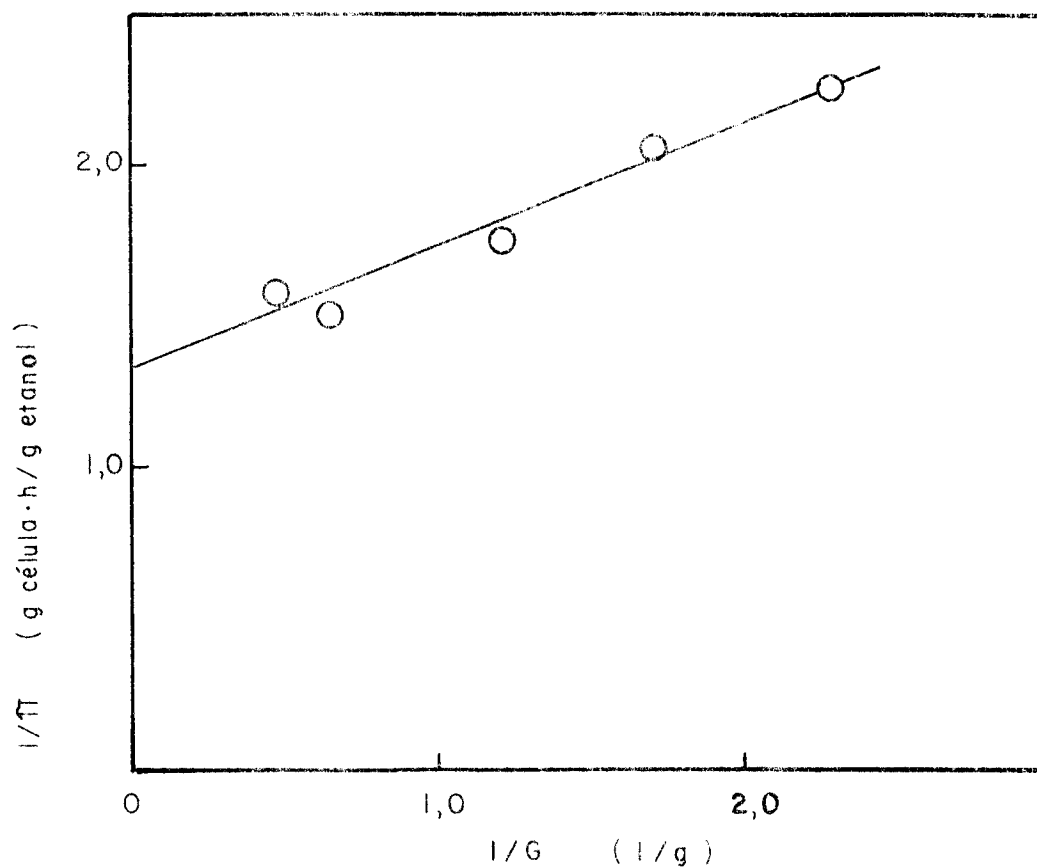


Fig. 8. Correlação entre velocidade específica de produção de etanol e concentração de glicose (*S. cerevisiae*)
 $K_s' = 0,303 \text{ g glicose/l}$, $\Pi_m = 0,752 \text{ g etanol/g célula/h}$

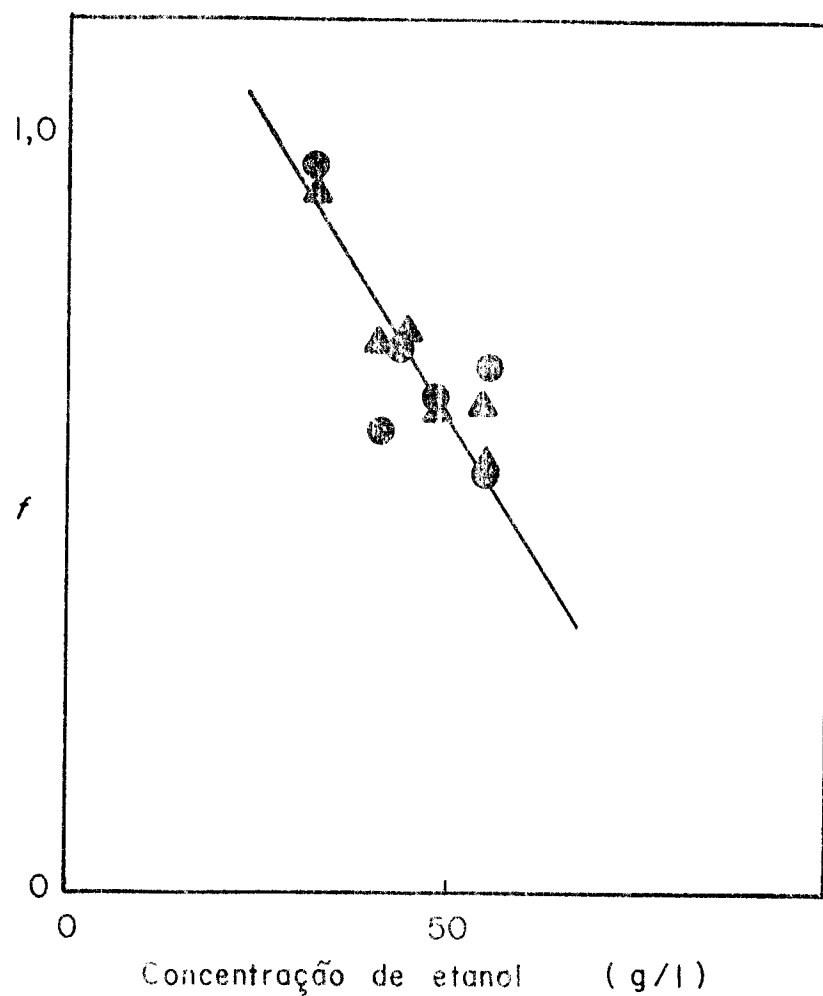


Fig. 9. Efeito inibitório do etanol sobre velocidade específica de crescimento e de produção de etanol

● - Crescimento, ▲ - Produção de etanol

$$r = 1,43 - 0,01593 P$$

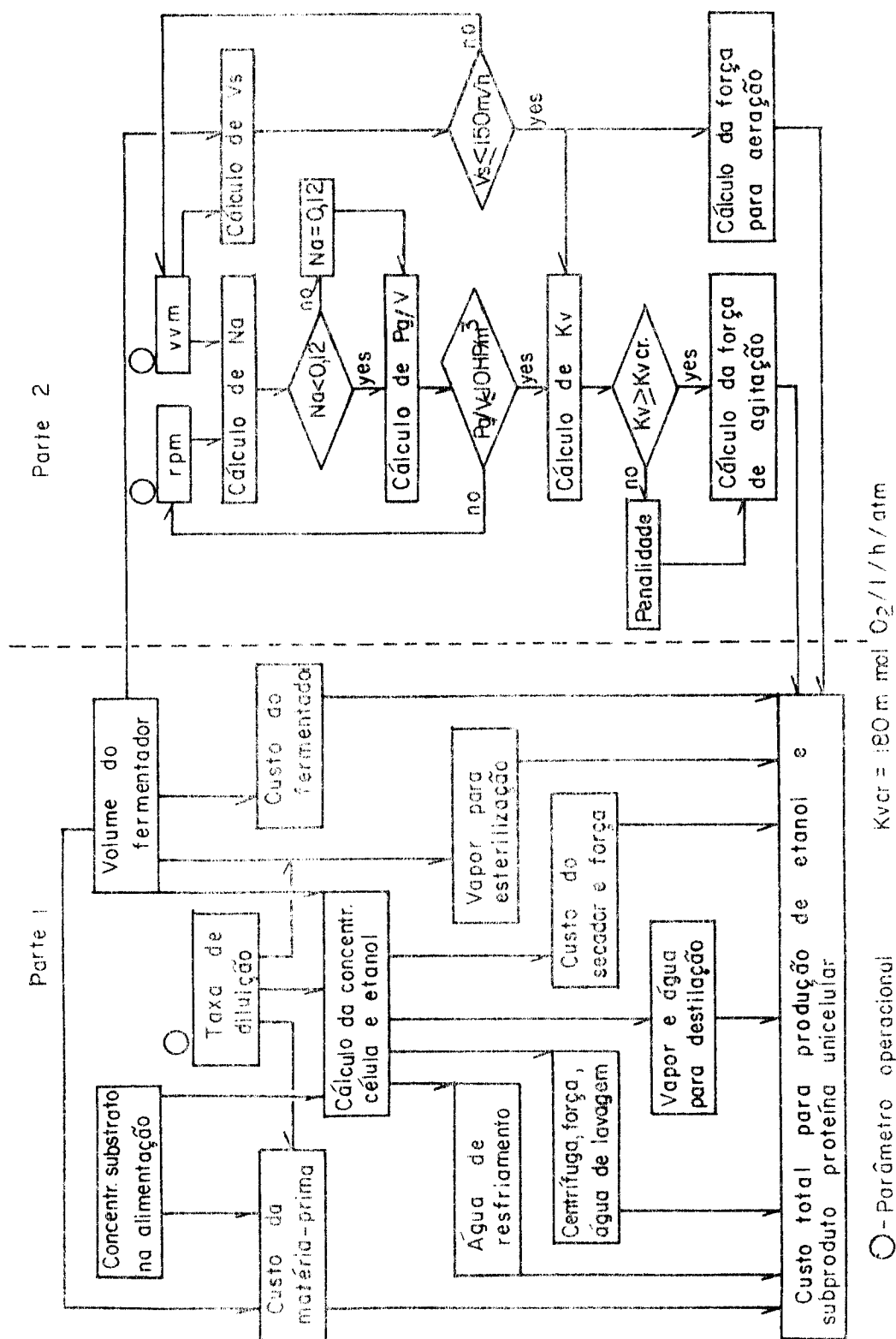


Fig. 10. Diagrama de cálculos para considerações econômicas sobre os processos

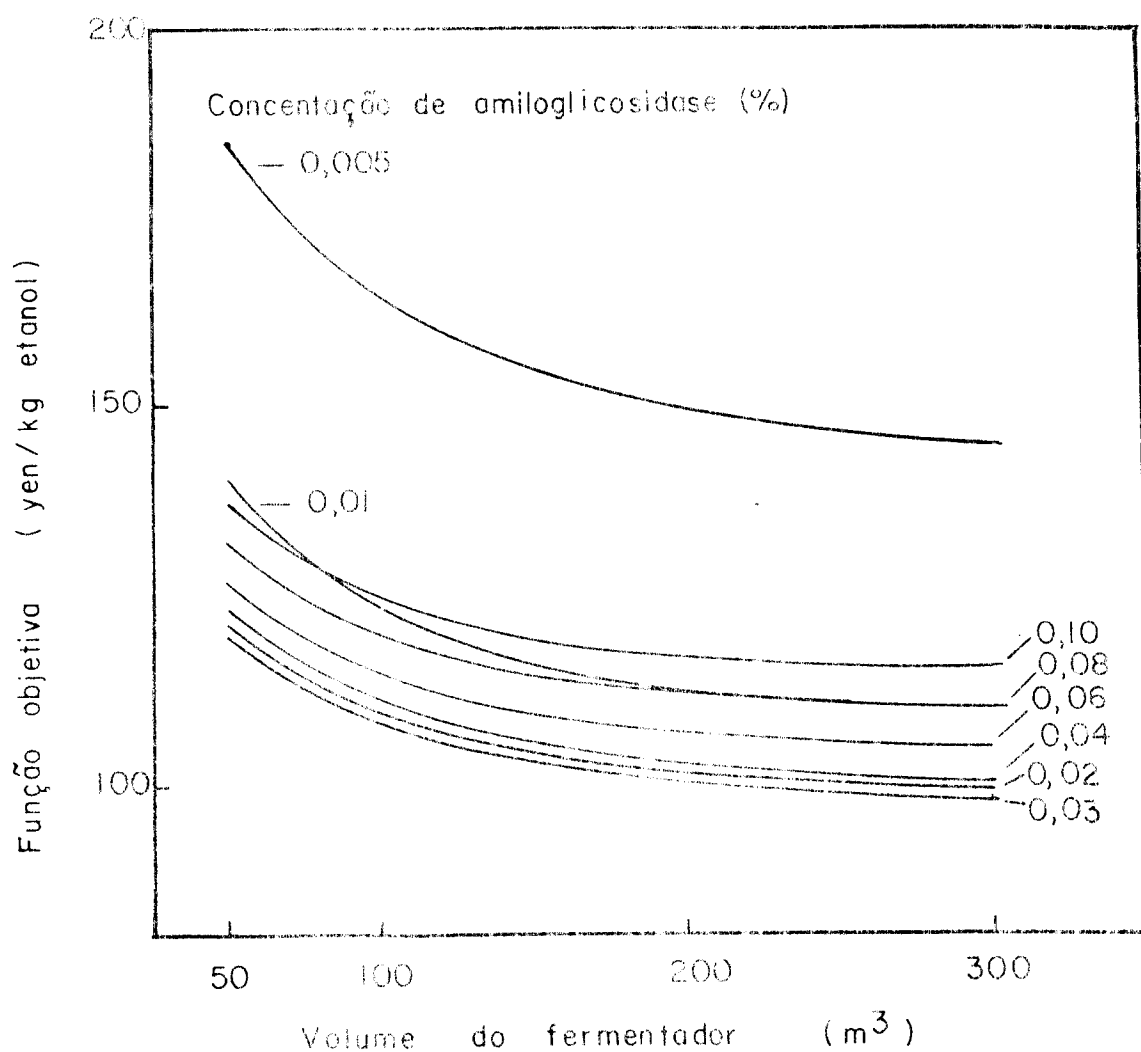


Fig. II. Efeito da concentração de amiloglicosidase na alimentação e volume do fermentador sobre função objetiva

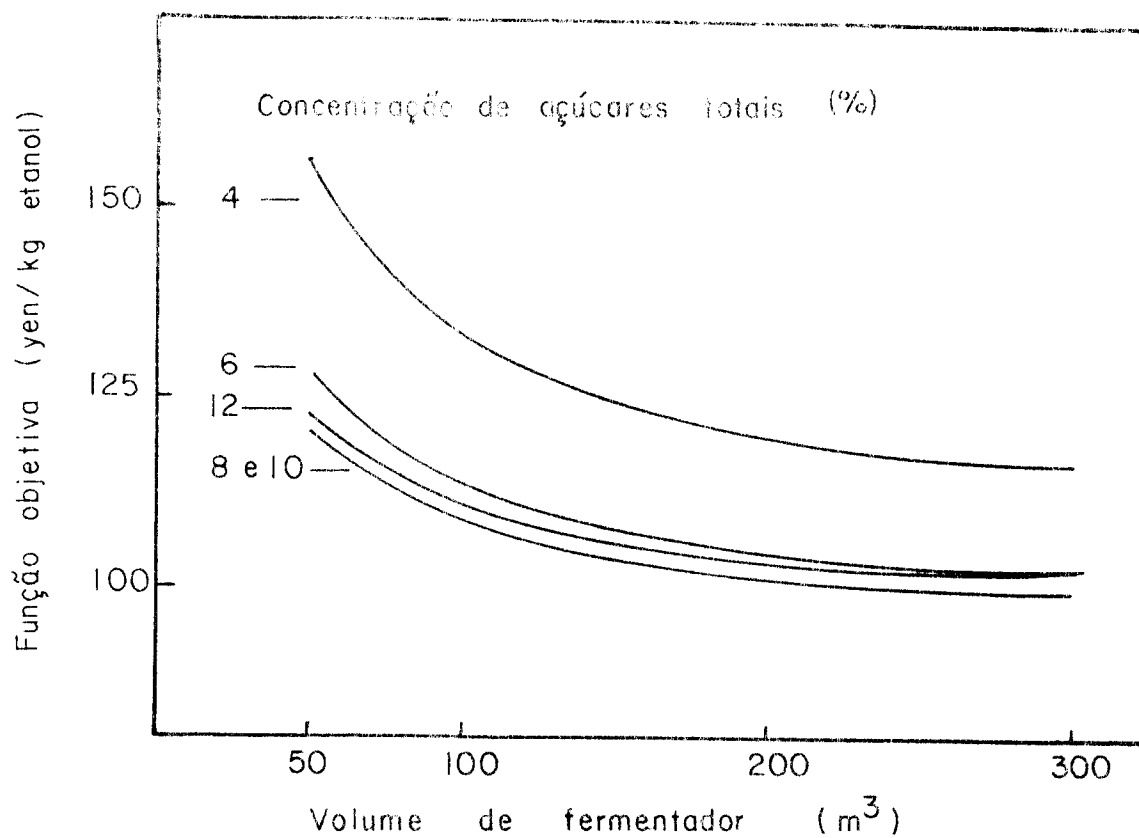


Fig. 12. Efeito da concentração de açúcares totais e volume do fermentador sobre função objetiva

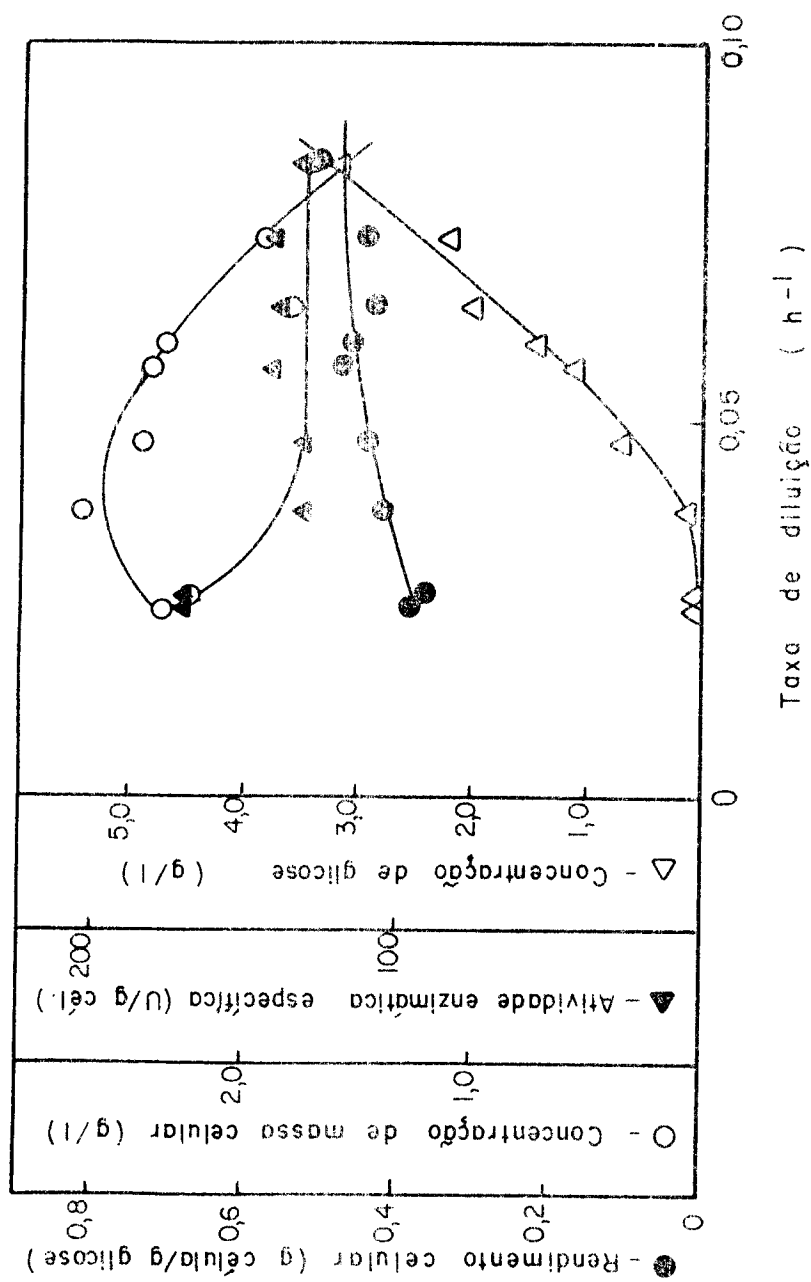


Fig. 13. Fermentação contínua de farinha de mandioca sacarificada, meio A, com *A. usamii*

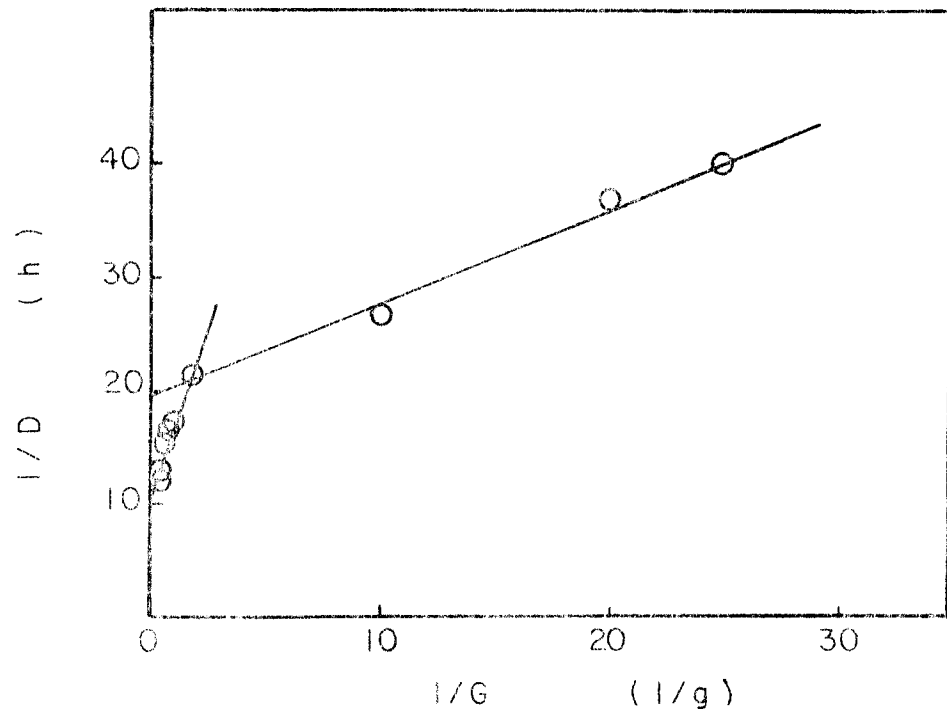


Fig. 14. Gráfico de Lineweaver-Burk (*A. usamii*)

$\mu_m = 0,05 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 0,04 \text{ g/l}$; $G \leq 0,6 \text{ g/l}$

$\mu_m = 0,09 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 0,6 \text{ g/l}$; $G \geq 0,6 \text{ g/l}$

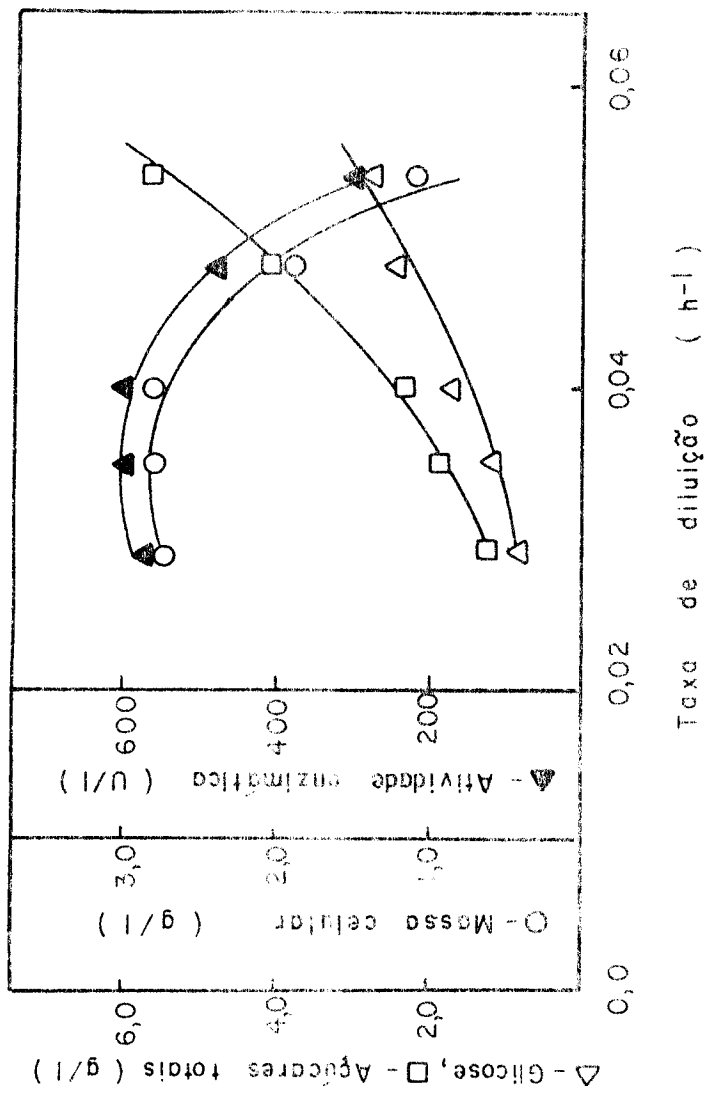


Fig. 15. Fermentação contínua de farinha de mandioca ($AT_0 = 7.4 \text{ g/l}$),
com *A. usamii* (Meio B)

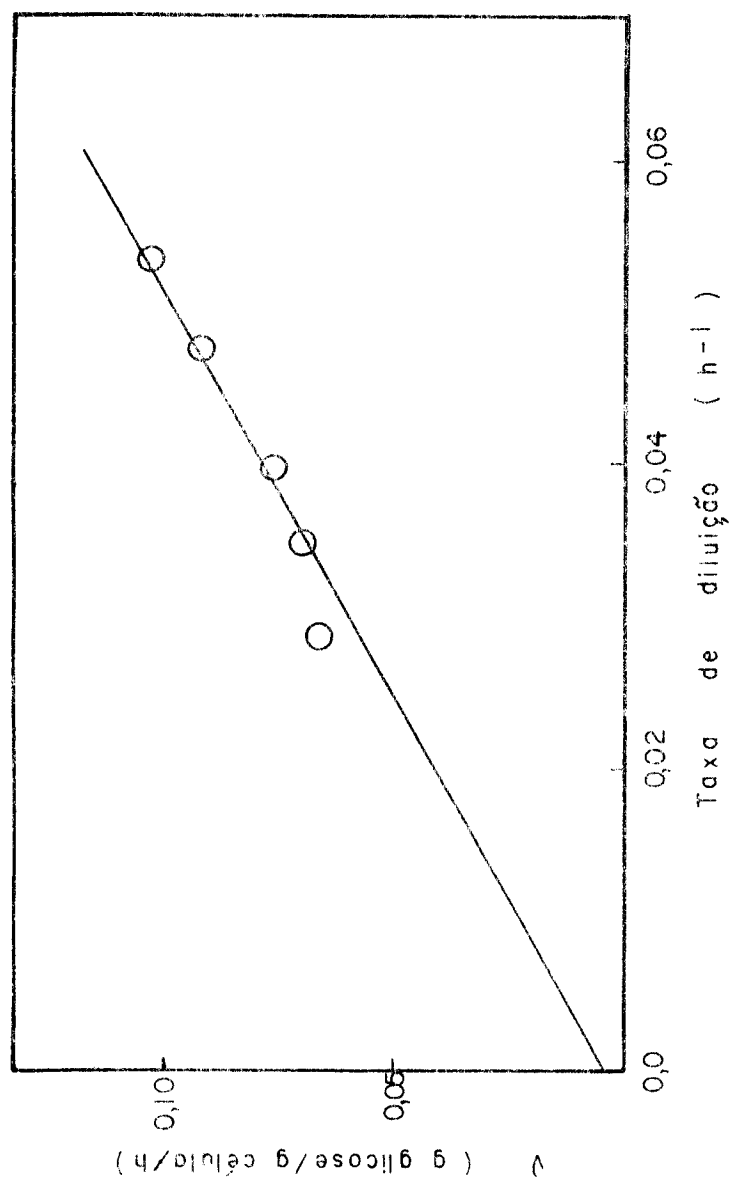


Fig. 16. Correlação entre taxa de diluição e velocidade específica de consumo de glicose por *A. usami* ($AT_0 = 7,4 \text{ g/l}$)
 $Y_G = 0,54 \text{ g célula/g glicose}$, $m = 0,006 \text{ g glicose/g célula/h}$

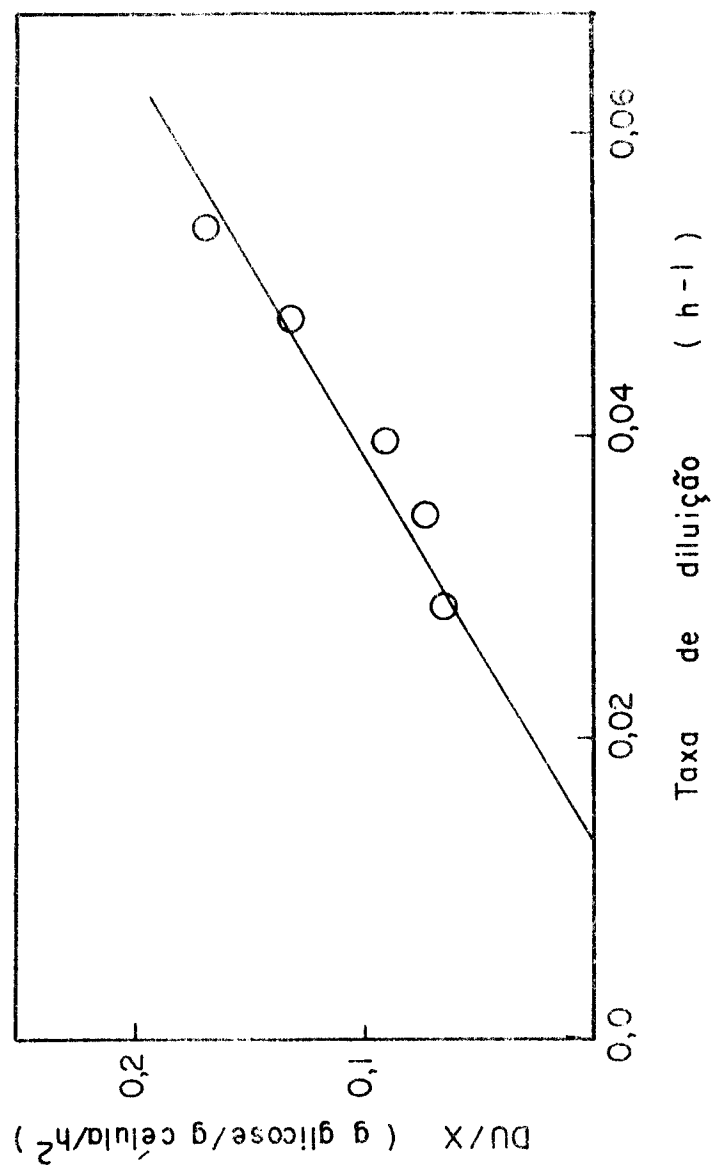


Fig. 17. Correlação entre taxa de diluição e atividade específica de enzima amilolítica ($AT_0 = 7,4 \text{ g/l}$)
 $c/k = -0,044 \text{ g glicose/g célula/h}^2$
 $b/k = 3,584 \text{ g glicose / g célula/h}$

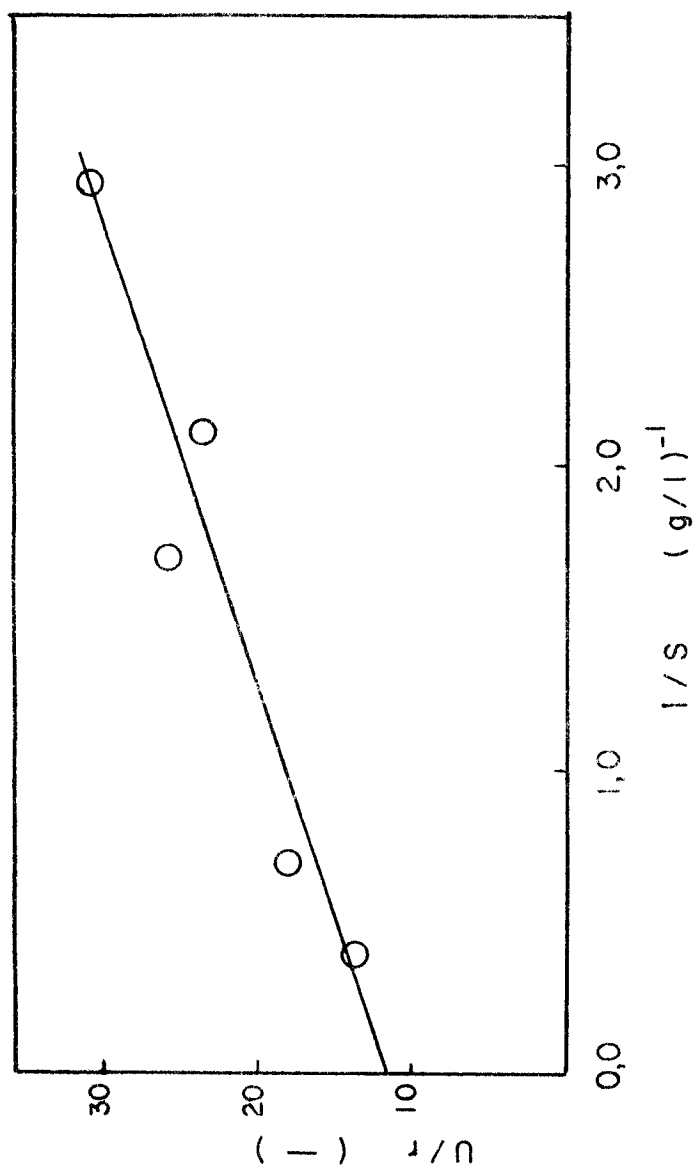


Fig. 18. Gráfico de U/r vs $1/S$ ($AT_0 = 7,4 \text{ g/l}$)
 r_m $k = 0,09$ (—) $k_m = 0,6 \text{ g/l}$

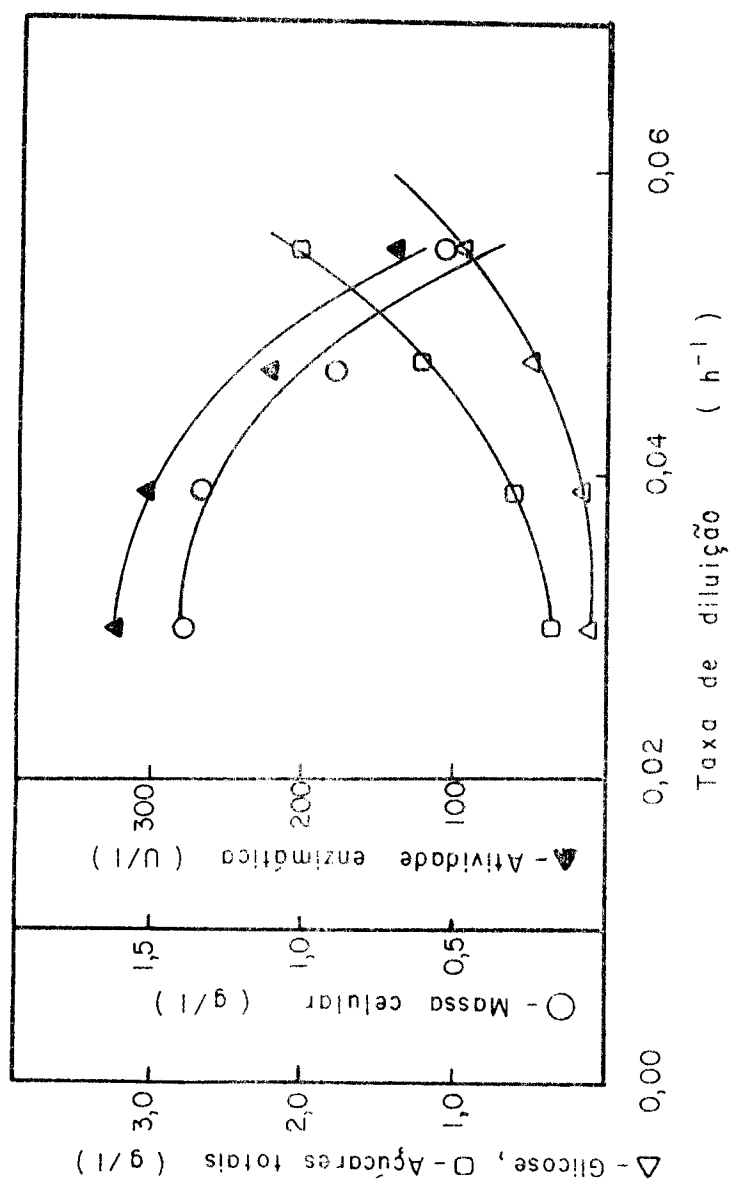


Fig. 19. Fermentação contínua de farinha de mandioca ($AT_0 = 3,6 \text{ g/l}$), com *A. usamii* (Meio B)

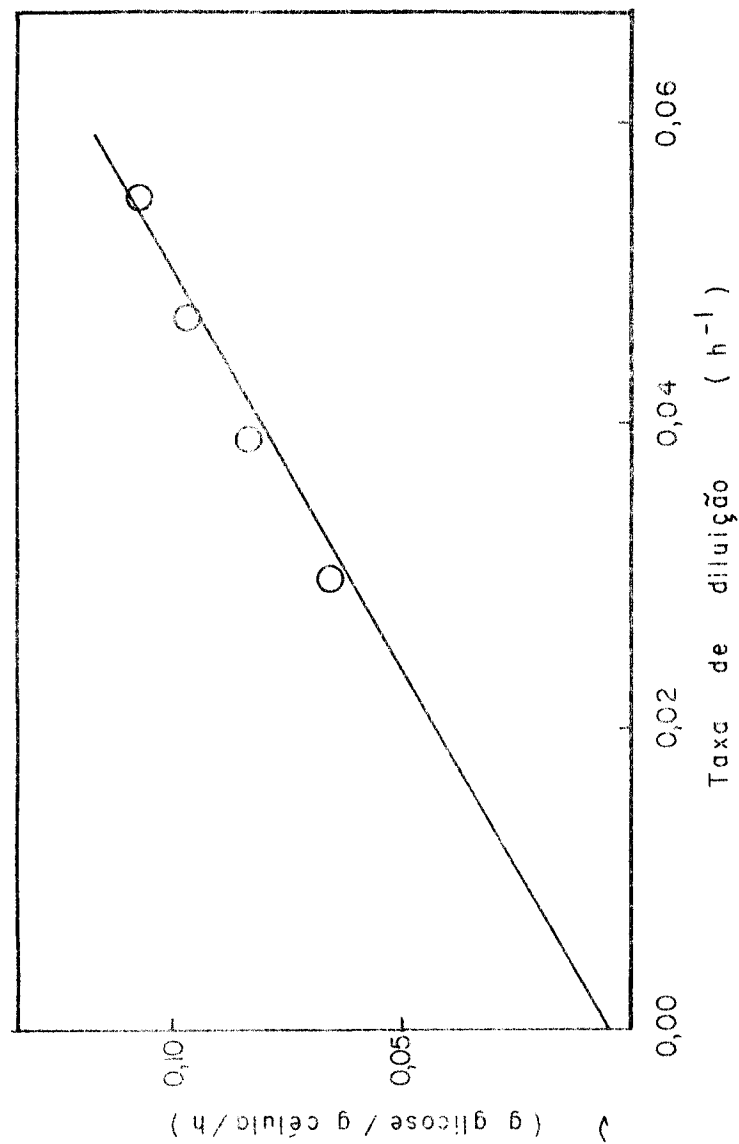


Fig. 20. Correlação entre taxa de diluição e velocidade específica de consumo de glicose por *A. usamii* ($AT_0 = 3,6 \text{ g/l}$)
 $Y_G = 0,54 \text{ g célula/g glicose}$, $m = 0,006 \text{ g glicose/g célula/h}$

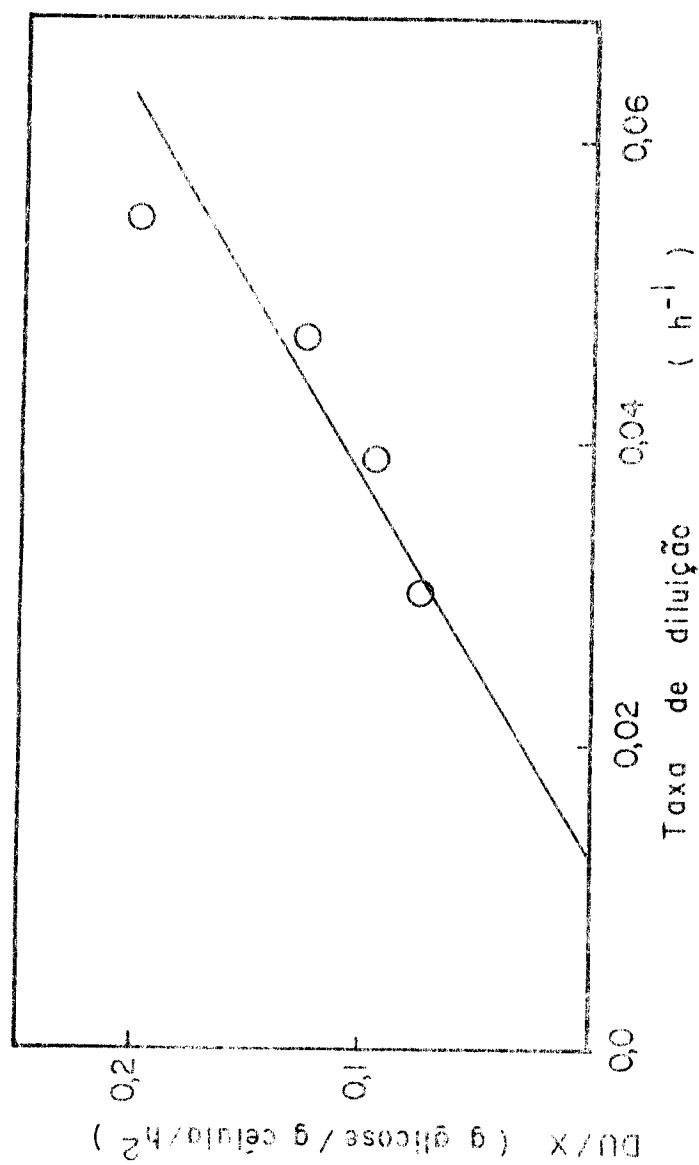


Fig. 21. Correlação entre taxa de diluição e atividade específica de enzima amilolítica ($AT_0 = 3,6 \text{ g/l}$)
 $a/k = -0,031 \text{ g glucose / g célula / } h^2$
 $b/k = 3,38 \text{ g glucose / g célula / } h$

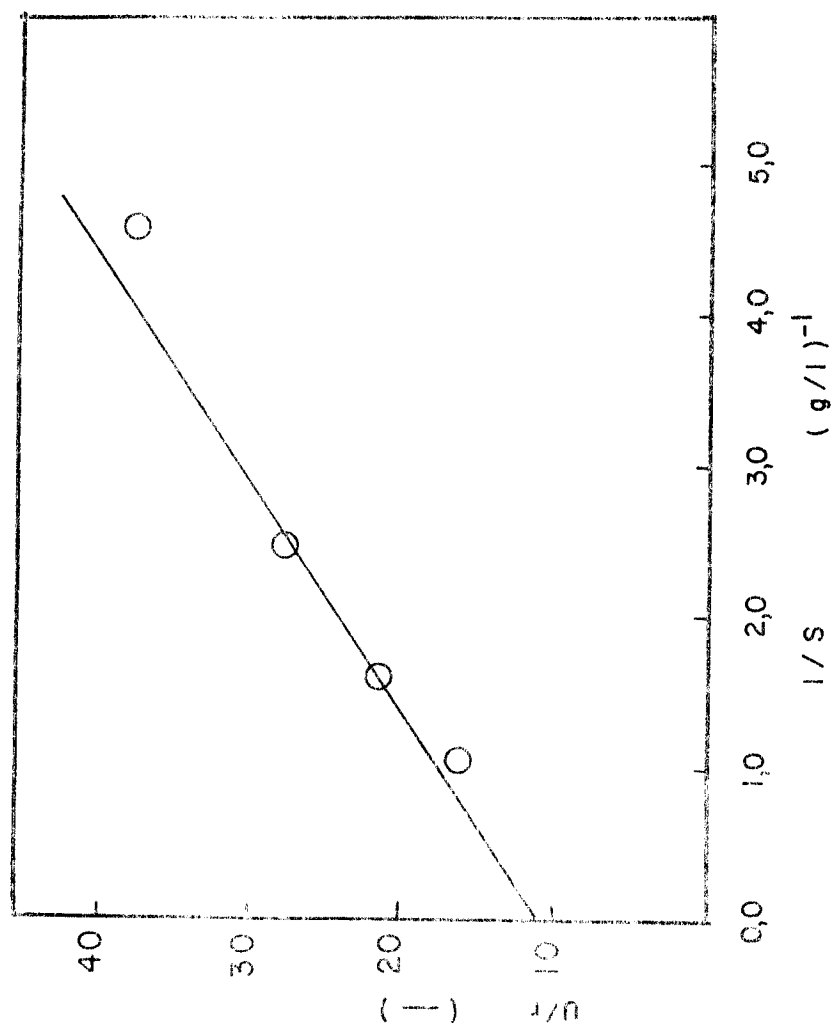


Fig. 22. Gráfico de U/r vs $1/S$ ($ATC = 3,6$ g/l)
 $r_m k = 0,09$ (—) $K_m = 0,6$ g/l

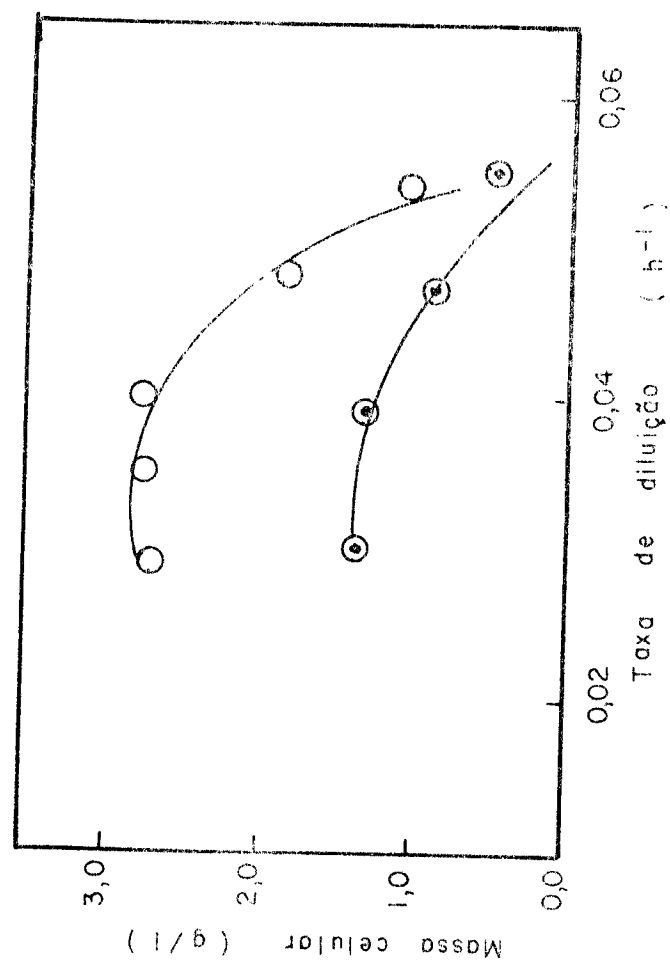


Fig. 23. Fermentação contínua de farinha de mandioca com *A. usamii*, usando-se concentração diferente de açúcares totais na alimentação
 ○, 7,4 g/l ⊙, 3,6 g/l

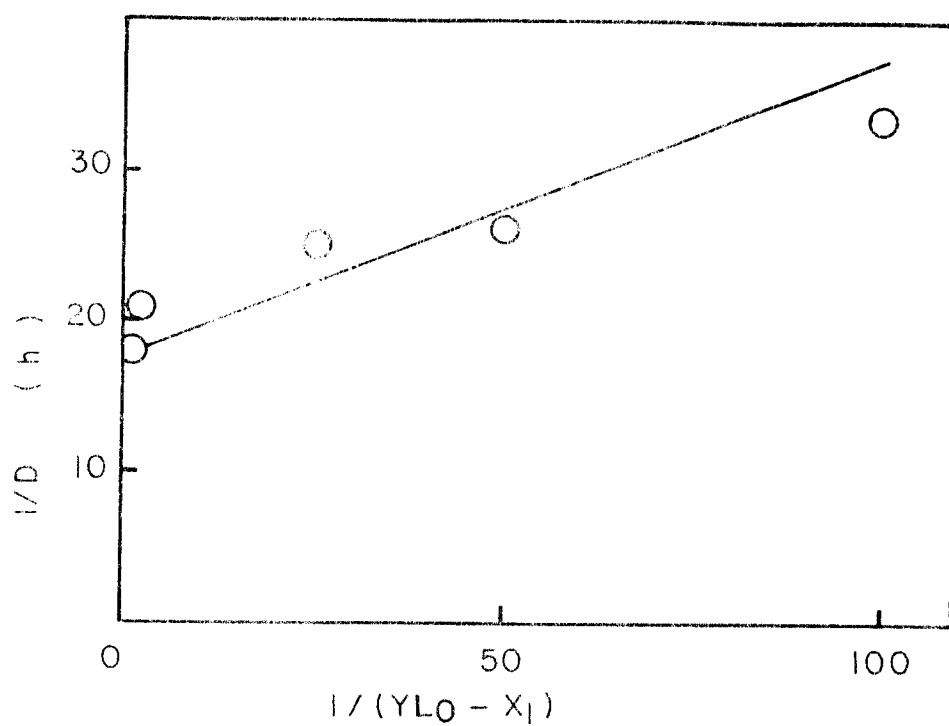


Fig. 24. Gráfico de I/D vs $I/(Y_{L0} - X_I)$

$$\mu_m = 0,057 \text{ h}^{-1}$$

$$YK_S = 0,012 \text{ g/l}$$

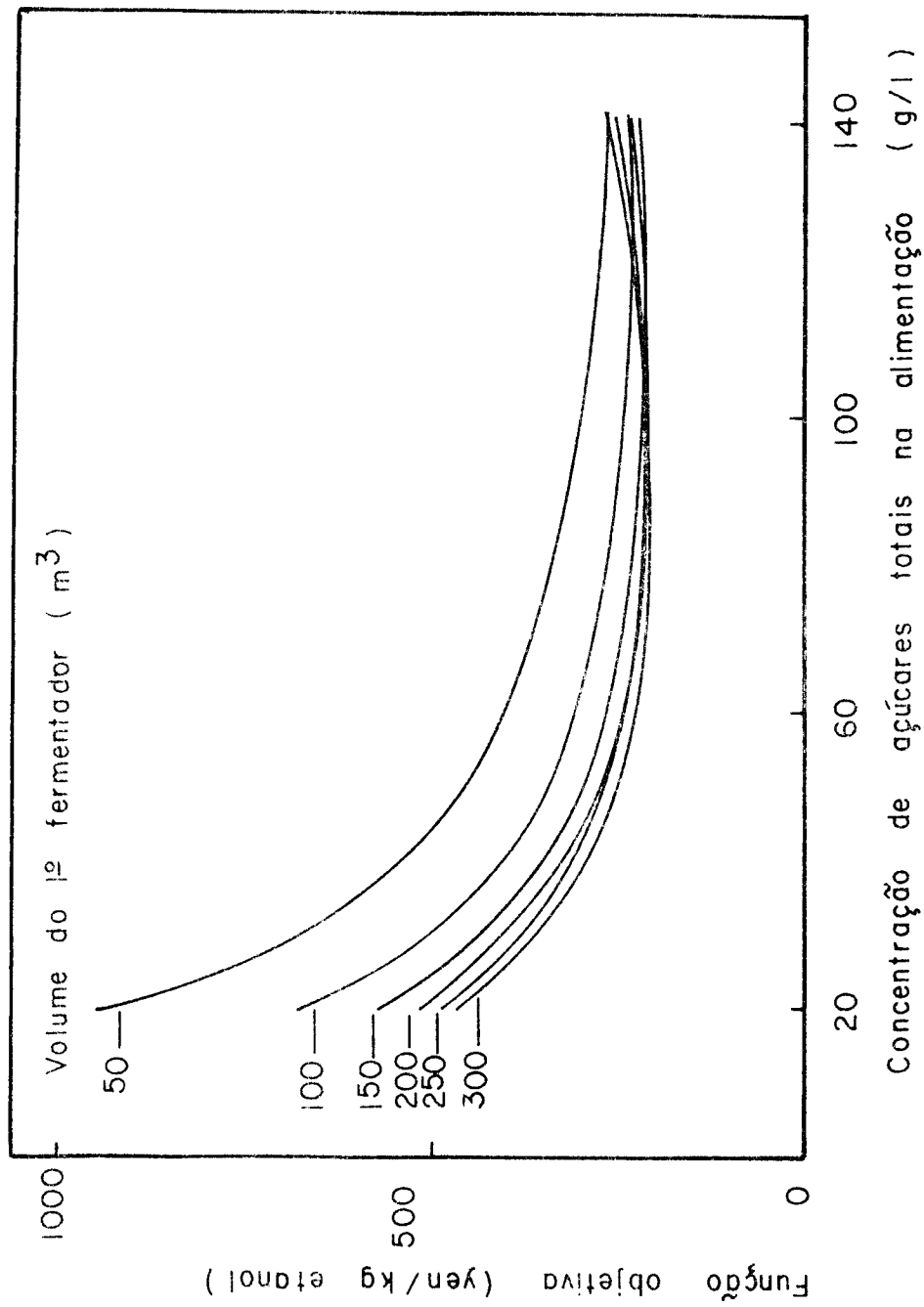


Fig. 25. Efeito da concentração de açúcares totais na alimentação sobre função objetiva, considerando o volume do segundo fermentador = 300 m^3

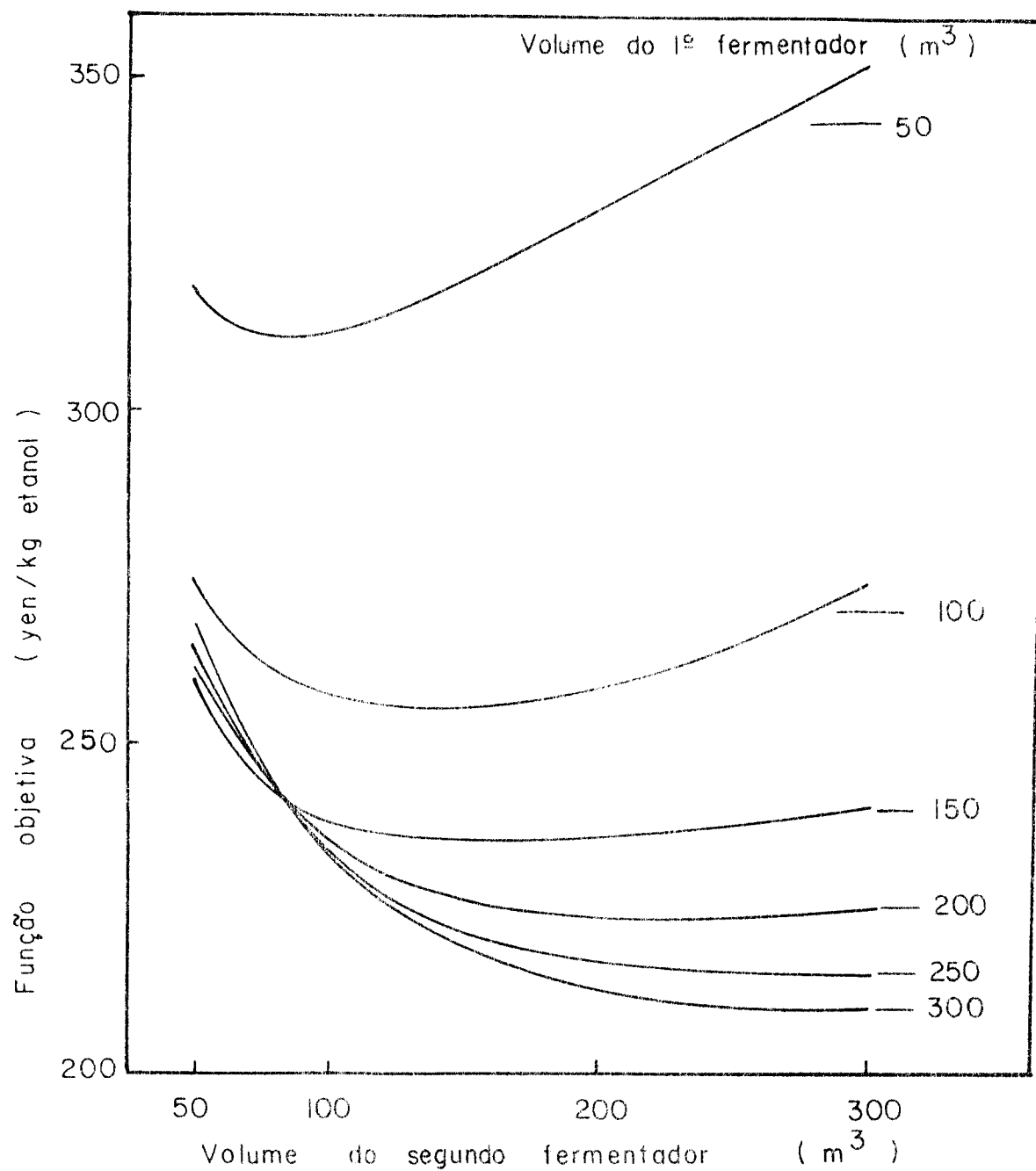


Fig. 26. Efeito do volume de fermentadores sobre a função objetiva. Açúcares totais na alimentação = 80 g/l

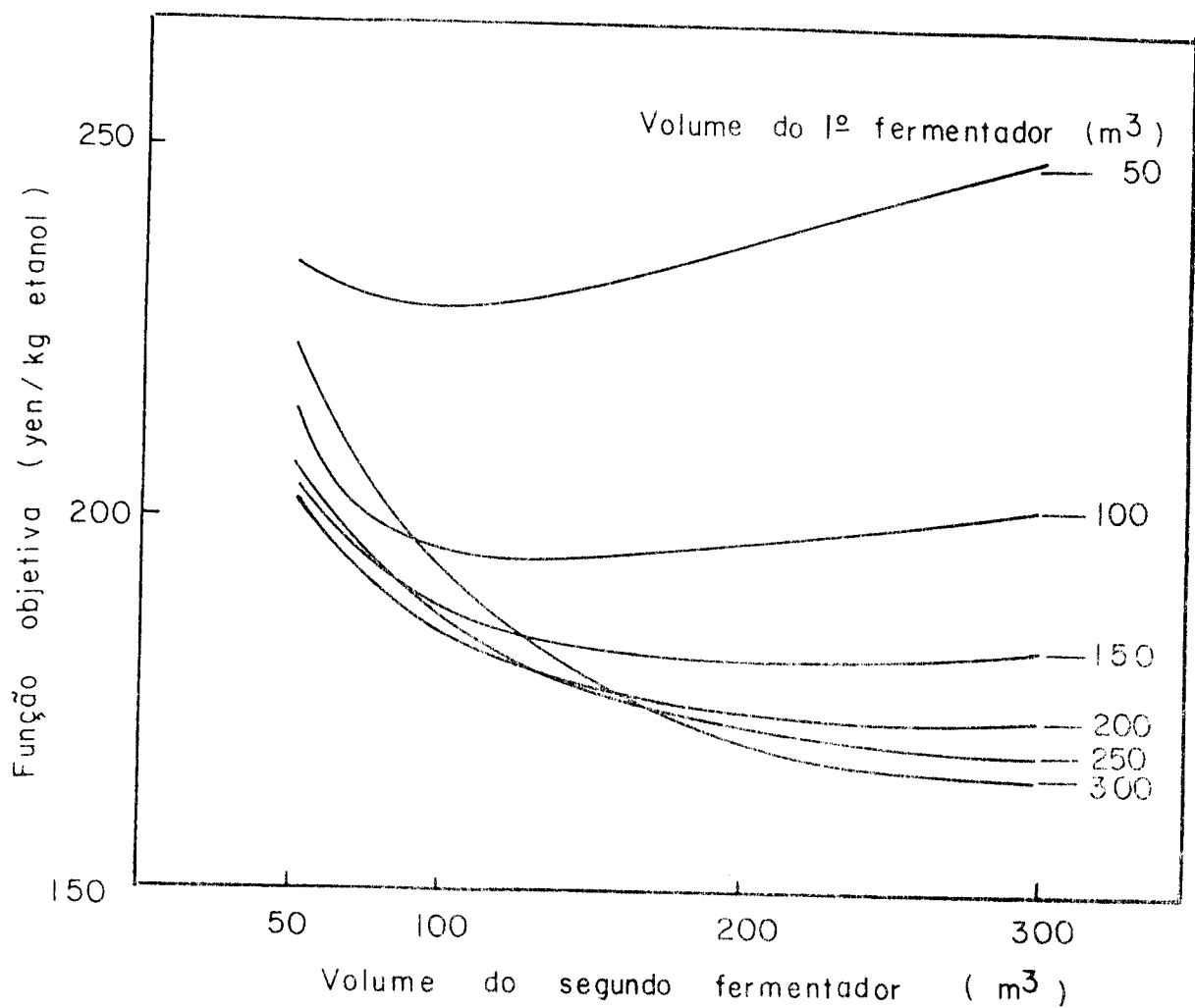


Fig. 27. Efeito do volume de fermentadores sobre a função objetiva, ao assumir a atividade enzimática duas vezes maior, Açúcares totais na alimentação = 80 g/l

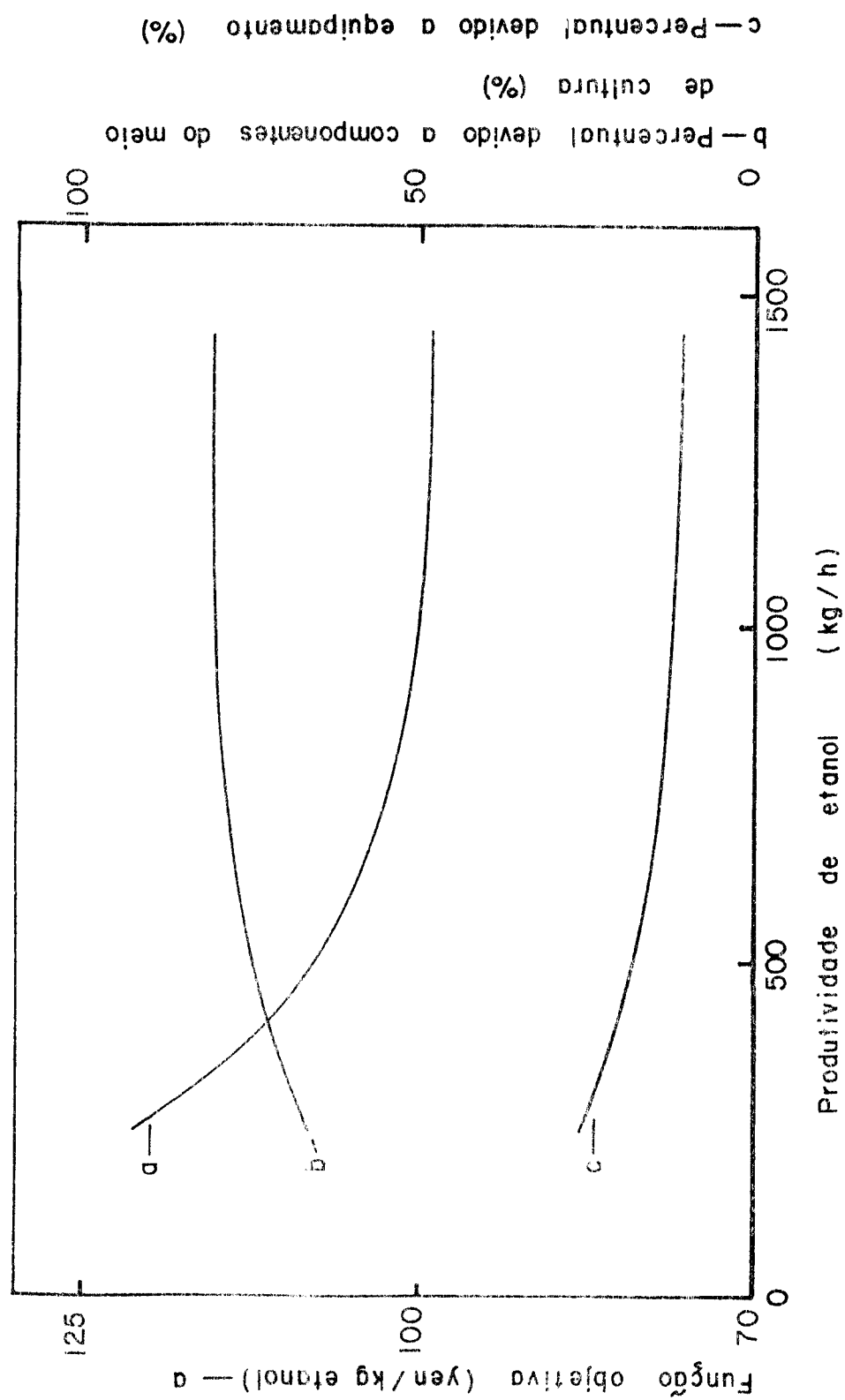


Fig. 28. Influência da produtividade de etanol sobre o custo total de processo e sua distribuição

5. CONCLUSÕES

5.A. Experimentalmente concluiu-se que:

- 1) Tecnicamente é viável a utilização da mandioca como matéria-prima para produção de etanol por fermentação contínua.
- 2) A hidrólise do amido de farinha de mandioca, pela aplicação de enzimas comerciais, é praticável em sistema contínuo.
- 3) Há uma faixa ótima para tempo de residência do substrato no tanque de liquefação contínua. Quando o tempo de residência é curto, a dextrinização é insuficiente e a exposição excessiva ao tratamento causa formação de insolúveis e/ou inativação enzimática.
- 4) O amido de mandioca pode ser transformado em açúcares fermentescíveis pela ação de enzimas produzidas pelos fungos, quando estes são cultivados no próprio substrato, em sistema contínuo.
- 5) Para as condições estudadas, o processo utilizando enzimas comerciais apresentou-se mais promissor, tanto do ponto de vista operacional, quanto econômico.
- 6) A taxa de utilização de açúcares redutores, em termos de glicose, por *S. cerevisiae* Haken-1, é relativamente baixa, acarretando baixo rendimento em álcool.

7) A linhagem de levedura estudada é suscetível a altas concentrações de etanol, que inibe o crescimento da levedura e a própria produção do etanol.

8) A produtividade de etanol é um fator que influi na viabilidade econômica do processo.

5.B. Teoricamente concluiu-se que:

1) A fermentação contínua em um estágio, usando enzimas comerciais, apresentou os seguintes valores como condições operacionais ótimas: $D = 0,131 \text{ h}^{-1}$; $V = 300\text{m}^3$; $E' = 0,03\%$ em relação ao amido; $AT_O = 8-10\%$.

2) A fermentação contínua em dois estágios, dois microrganismos, apresentou as seguintes condições operacionais ótimas: $D_1 = 0,05\text{h}^{-1}$; $D_2 = 0,072 \text{ h}^{-1}$; $V_1 = 300\text{m}^3$; $V_2 = 300\text{m}^3$; $Q_1 = 0,22\text{vvm}$; $n_1 = 195\text{rpm}$; $AT_O = 8-10\%$.

5.C. Sugestões para trabalhos posteriores:

1) A fim de aumentar a produtividade da enzima amilolítica de *A. u-samii*, poderá ser estudada a suplementação dos meios de cultura apresentados com vitamina.

2) Com a mesma finalidade, poderá ser estudada a cultura mista de linhagens produtoras de enzimas amilolíticas.

3) Mais ênfase poderá ser dada na obtenção de mutantes de microrganismos para conseguir linhagens com capacidade maior de produção de amilases e estudar seu comportamento em cultura contínua.

4) O rendimento em álcool, devido à lenta utilização de açúcar por *S. cerevisiae* Hakken-1, poderá ser aumentado pela realização da fermentação alcoólica em multiestágio.

5) Uma alternativa, para contornar o custo do produto, poderá ser a utilização do açúcar remanescente da fermentação alcoólica, para produção de proteína por microrganismo.

6) Merece ser estudada a aplicação de vácuo ao processo fermentativo para retirada do etanol obtido, visando diminuir sua concentração inibitória.

7) O modelo matemático proposto deverá ser verificado, executando-se os experimentos nas condições estabelecidas.

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado	Dimensão
a	constante experimental	g enzima/g célula/l/h
b	constante experimental	g enzima/g célula/l/h
A, B	múltiplos de L_0 na alimentação	
AT	concentração de açúcares totais	g/l
D	taxa de diluição	h^{-1}
E	concentração de enzima	g/l
E'	(para amiloglicosidase comercial)	
F	fluxo de meio de cultura	l/h
f_c	fator de conversão amido-glicose	g/g
G	concentração de glicose	g/l
k	fator de correlação	g enzima.h/g glicose
K_m	constante de Michaelis-Menten	g/l
K_s	constante de saturação	g/l
K_v	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	mol O_2 /l/h/atm
K_{vcr}	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio crítico	mol O_2 /l/h/atm
L	concentração de substrato limitante no cultivo contínuo de <i>A. usami</i>	g/l
m	coeficiente de manutenção	g glicose/g célula/h
n	velocidade de rotação do agitador	rpm, min^{-1}

N_a	número de aeração	
P	concentração de etanol	g/l
P_g	potência consumida para agitação em sistema aerado	HP
Q	taxa de aeração	vvm, min^{-1}
r	velocidade de hidrólise do amido	g glicose/l/h
r_m	máxima velocidade específica de hidrólise de amido	g glicose/g enzima/h
S	concentração de amido	
U	atividade enzimática	g glicose/l/h
V	capacidade ou volume de operação do fermentador	m^3
V_S	velocidade nominal de ar	m/h
X	concentração celular	g/l
Y	coeficiente de rendimento relativo ao crescimento, para substrato limitante L	g célula/g L
Y_{ap}	coeficiente de rendimento aparente, relativo ao crescimento	g célula/g glicose
Y_G	coeficiente de rendimento relativo ao crescimento, para substrato limitante glicose	g célula/ g glicose
μ	velocidade específica de crescimento	h^{-1}
μ_m	máxima velocidade específica de crescimento	h^{-1}
v	velocidade específica de consumo de glicose	g glicose/g célula/h
η	velocidade específica de produção de etanol	g etanol/g célula/h

q_m máxima velocidade específica de produção de etanol g etanol/g célula/h
 μ'_m, q'_m (sob influência de alta concentração de etanol)

Índices:

- o - meio de alimentação
- 1 - primeiro fermentador
- 2 - segundo fermentador } no processo com dois estágios
- A - *A. usami*
- B - *S. cerevisiae*

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. AIBA, S.; SHODA, M. & NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotech. Bioeng.*, 10, 845-864, (1968).
2. _____ & _____. Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation. *J. Ferm. Technol.*, 47(12), 790-794, (1969).
3. AIKAWA, T.; OOTE, S. & TAKAHARA, Y. Studies on the maintenance of the activity of microorganisms. (I) The selection of strains in amylo mold. *J. Ferm. Technol.*, 42, 539-543, (1964). (Jap).
4. _____; _____ & _____ Studies on the maintenance of the activity of microorganisms. (II) Relation between the age of spore and its saccharifying power in amylo mold. *J. Ferm. Technol.*, 42, 544-547, (1964). (Jap).
5. AKIBA, T. & FUKINBARA, T. Kinetics of growing yeast in grain alcohol fermentation. *J. Ferm. Technol.*, 42, 239-243, (1964). (Jap).
6. _____ & _____ Kinetics of yeast growth in alcohol fermentation using grain. (II) On continuous fermentation. *J. Ferm. Technol.*, 43, 553-557, (1965). (Jap).
7. AKINRELE, I.A. Further studies on the fermentation of cassava. *Federal Institute of Industrial Research, Nigeria, Report n° 20*, November, 1963.
8. ALBUQUERQUE, M. A mandioca na Amazônia. Belém, PA, Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia. Ministério do Interior, 1969. 277p.

9. ARAÚJO, N.Q.; CASTRO, I.E.; REIS, R.F.; FERREIRA, T.B.C.; CASTRO, H.F.; BARBOSA, J.O.; SUZZI, P. & COSTA, F.A. Hidrólise enzimática da mandioca. *Informativo do Instituto de Tecnologia*, ano 8, nº9, 43-52, (1975).
10. ASAI, T.; UEDA, K. & KOJIMA, T. Studies on the continuous fermentation. Part 2. Fundamental studies of continuous alcohol fermentation of molasses. *Boqucikagakuikaishi*, 27, 586-591, (1953). (Jap).
11. AYRES, J.C. Manioc. The potential exists for increased use of this tropical plant and its products. *Food Technology*, 26, (4), 128-138, (1972).
12. BANKS, G.T.; BINNS, P. & CUTCLIFFE, R.L. Recent development in the production and industrial applications of amylolytic enzymes derived from filamentous fungi. *Progress in Industrial Microbiology*. Volume 6, 95-139, London Heywood Books, 1967.
13. BAZIN, M.J.; SAUNDERS, P.T. & PROSSER, J.I. Models of microbial interactions in the soil. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 4, 463-499, (1976).
14. BAZUA, C.D. & WILKE, C.R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Sacch. cerevisiae*. *Biotech. and Bioeng. Symposium*, 7, 105-118, (1977).
15. BIANCO, V.D.; ARAÚJO, N.Q.; MICELI, A.; SILVA, P.C.S. & BURLE, J.A.S. Alcool de mandioca por fermentação contínua. *Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia*, ano 9, nº10, 21-26, (1976).
16. BLANCH, H.W. & DUNN, I.J. Modelling and simulation in Biochemical Engineering. *Advances in Biochemical Engineering*, vol.

- 3, 127-165, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin , 1974.
17. BORZANI, W. Fermentação alcoólica contínua de mosto de melaço. *Tese de Concurso à Docência Livre*, da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1952.
18. _____; BONOMI, A.M.F.L.J.; VENOSA, C.M.S. & LESER, E.W. Cultivo de microrganismos em meios contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. II. Modelo cinético para o cultivo de *Asp. niger* NRRL 377 em frascos agitados. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 6, 125-132, (1975).
19. _____. Fermentação alcoólica contínua. Fermentações industriais, biodegradação e transformações microbianas no solo. *Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 12-17, 1978.
20. BOSE, K. & GHOSE, T.K. Studies on continuous fermentation of indian cane sugar molasses by yeast. *Process Biochemistry*, 8 (2), 23-33, (1973).
21. COLLARD, P. & LEVI, S. A two-stage fermentation of cassava. *Nature*, 183, 620-621, (1959).
22. CYSEWSKI, G.R. & WILKE, C.R. Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis. I. Fermentation of hydrolysate to ethanol and single-cell protein. *Biotech. and Bioeng.*, 18, 1297-1313, (1976).
23. _____ & _____. Utilization of cellulosic through enzymatic hydrolysis. II. Preliminary assesment of an integrated processing scheme. *Biotech. and Bioeng.*, 18, 1315-1323, (1976).
24. _____ & _____. Rapid ethanol fermentation using

- vacuum and cell recycle. *Biotech. and Bioeng.*, 19, 1125-1143, (1977).
25. DEMAİN, A.L. & COONEY, C.L. Continuous culture - 1971. *Process Biochemistry*, 7 (7), 21-23, (1972).
 26. DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.P. & SMITH, F. *Anal. Chem.*, 28, 350, (1956), in *Methods in Enzymology*, 9, 37. Academic Press, New York, 1966.
 27. EDWARDS, D. The industrial manufacture of cassava products: an economic study. *Tropical Products Institute, London, Report G*, 88, May, 1974.
 28. FENCL, Z. & NOVÁK, M. Prediction of the product formation in continuous cultivation of microorganisms. *Recent Advances in Microbiology*, 427-433. México, DF, 1971.
 29. FUKIMBARA, T. Submerged culture of mold. *Simpósio do Instituto de Microbiologia Aplicada*, 1, 78-92. Tokyo, 1960 (Jap).
 30. _____ & IDE, T. The action of mold amylase on alcohol fermentation. 2. Correlation between residual dextrin value of mold amylase and alcohol yield. *Nogakagaku*, 29, 62-66, (1955). (Jap).
 31. HAEHN, H. Teoría de la fermentación alcohólica. *Biología de las fermentaciones*, 310-329, Aguilar - Madrid, 1956.
 32. HIMMELBLAU, D.M. Process analysis by statistical methods. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1960.
 33. HODGE, H.M. & HILDEBRANT, F.M. Alcoholic fermentation of molasses. *Industrial Fermentations*, Volume 1, 73-94. Chemical Publishing Co., Inc., New York, 1954.

34. HOLZBERG, I.; FINN, R.K. & STEINKRAUS, K.H. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. *Biotech. and Bioeng.*, 9, 413-427, (1967).
35. HORII, J. Problemas especiais de fermentação alcoólica. Fermentações industriais, biodegradação e transformações microbianas no solo. *Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 70-74, 1978.
36. JACKSON, E.A. Brazil's national alcohol programme. *Process Biochemistry*, 11 (5), 29-30, (1976).
37. JAIN, V.K. Relationship between energy metabolism and growth rate of *Sacch. cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 72, 252-259, (1970).
38. KINOSHITA, S.; OKADA, H. & FERNI, G. Kinetic studies on enzyme production by microbes. (II) - Process kinetics of α -amylase production by *Bacillus subtilis*. *J. Perm. Technol.* 45, 504-510, (1967).
39. KOMAKI, T. Studies on enzymatic liquefaction and saccharification of starch. IV. Preparation and properties of insoluble starch particle remained in saccharified liquid of starch after treatment with bacterial α -amylase and glucoamylase. *Agr. Biol. Chem.*, 32 (2), 123-129, (1968).
40. LEUENBERGER, H.G.W. Cultivation of *Sacch. cerevisiae* in continuous culture. I. Growth kinetics of a respiratory deficient yeasts strain grown in continuous culture. *Arch. Microbiol.*, 79, 176-186, (1971).
41. LIMA, O.G. Identificação e estudo dos mofos sacarificantes do amido na elaboração da aguardente tiquira, uma bebida regional do Maranhão. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco*, IV (1), 1943.

42. LIMA, U.A. Produção do etanol. *Bioteecnologia*. Vol. 1, 48-69, Edgard Blücher Ltda., 1975.
43. LUEDEKING, R. Fermentation process kinetics. *Biochemical and Biological Engineering Science*. Volume 1, 181-243, Academic Press, London, 1967.
44. MÁLEK, I. & FENCL, Z. Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms. Academic Press, New York, 1966.
45. MARGARITIS, A. & WILKE, C.R. The rotorfermentor. II. Application to ethanol fermentation. *Biotech. and Bioeng.*, 20, 727-753, (1978).
46. MENEZES, T.J.B. Saccharification of cassava for ethyl alcohol production. *Process Biochemistry*, 13 (9), 24-26, (1978).
47. MIYOSHI, T. & TERUI, G. Studies on the activity balance of enzymes in submerged fungal culture fluid used as a substitute for koji in saké-brewing (I). *J. Ferm. Technol.*, 43, 311-324, (1965). (Jap).
48. NAKAMURA, I.M. Contribuição ao estudo da fécula de mandioca fermentada. *Tese de Mestrado*, apresentada na Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 1975.
49. NEISH, A.C. Analytical methods for bacterial fermentations. Report n°46 - 8 - 3, *National Research Council of Canada*, 47-48, (1952).
50. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380, (1944).

51. NISHIYAMA, S.; IRIE, Y. & IMAI, T. Studies on continuous alcohol fermentation. (I) On a few conditions for continuous fermentation. *J. Ferm. Technol.*, 44, 902-909, (1966). (Jap).
52. _____ ; _____ & _____ Studies on continuous alcohol fermentation. (II) On the fermentation conditions for obtaining high levels of viable yeasts. *J. Ferm. Technol.*, 45, 125-136, (1967). (Jap).
53. NOJIRI, M. SCP production process from tapioca. Paper presented for GIAM V - Bangkok, November, 1977. 26p.
54. OKAZAKI, H. Mold amylase system. *Proceedings of International Symposium of Enzyme Chemistry*, 494-498. Kyoto, 1957.
55. _____ ; TERUI, G. & KONNO, N. An inquiry into the physiology of preferential synthesis of glucamylase in relation to multistage continuous culture (I). *J. Ferm. Technol.*, 41, 266-275, (1963). (Jap).
56. _____ ; SHINMYO, A. & TERUI, G. Studies on the physiological age of mycelia in the glucamylase producing culture of *Aspergillus niger* and the phenomenon of over-ageing in relation to multistage continuous culture. *J. Ferm. Technol.*, 43, 581-589, (1965). (Jap).
57. PARK, Y.K. & PAPINI, R.S. Produção de xarope de glicose de amilo de mandioca pelo método enzima-enzima. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 1 (1), 13-16, (1970).
58. _____ ; _____ ; BAR, W.H. & VITTI, P. Produção de amilase fúngica por fermentação submersa, por cultura em meio semi-sólido e seu uso em panificação. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 2 (4), 181-192, (1971).

59. PARK, Y.K. & LIMA, D.C. Produção de amiloglucosidase fúngica por fermentação submersa e sua purificação. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 3 (2), 67-74, (1972).
60. PERINGER, P.; BLACHERE, H.; CORRIEU, G. & LANE, A.G. Mathematical model of the kinetics of growth of *Sacch. cerevisiae*. *Biotech. and Bioeng. Symposium*, 4, 27-42, (1973).
61. _____; _____; _____ & _____ A generalized mathematical model for the growth kinetics of *Sacch. cerevisiae* with experimental determination of parameters. *Biotech. and Bioeng.*, 16, 431-454, (1974).
62. PIRT, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. 1st. Edition. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1975.
63. PROCESSOS. Alcool de mandioca, segundo a Nordon. *Química e derivados*, maio, 56-57, (1976).
64. PROGNÓSTICO 77/78. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria da Agricultura, Instituto de Economia Agrícola, 117-119, 1977.
65. READE, A.E. & GREGORY, K.F. High-temperature production of protein-enriched feed from cassava by fungi. *Appl. Microbiol.*, 30, 897-904, (1975).
66. REPORTAGENS. Alcool, resposta ao desafio do petróleo. *Indústria e Desenvolvimento*, julho, 2-11, (1977).
67. ROSE, D. Yeasts for molasses alcohol. *Process Biochemistry*, 11 (3), 10-36, (1976).
68. ROSÉN, K. Continuous production of alcohol. *Process Biochemistry*, 13 (5), 25-26, (1978).

69. ROSENTHAL, F.R.T. A cultura da mandioca. *Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia*, ano 9, nº10, 27-36, (1976).
70. SAWADA, H. Otimização de um processo de produção de proteína unicelular por fermentação contínua, utilizando amido de mandioca como substrato. *Tese de Mestrado*, apresentada na Faculdade de Engenharia, Universidade de Osaka. Osaka, 1978, (Jap).
71. SHICHIJI, S. Continuous alcohol fermentation with reuse process. *Simpósio do Instituto de Microbiologia Aplicada*, 5, 279-314, (1963). (Jap).
72. SOMOGYI, M. Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.* 160, 69-73, (1945).
73. SPIEGEL, M.R. (Tradução de Pedro Cosentino) Ajustamento de curvas e o método dos mínimos quadrados. *Estatística*, 362-400. Editora McGraw-Hill do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, 1970.
74. STARK, W.H. Alcoholic fermentation of grain. *Industrial Fermentations*. Volume 1, 17-71. Chemical Publishing Co., Inc. New York, 1954.
75. STUPIELLO, J.P. Matérias-primas para obtenção do álcool. Fermentações industriais, biodegradação e transformações microbianas no solo. *Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 66-69, 1978.
76. TEIXEIRA, C.; ANDREASEN, A.A. & KOLACHOV, P. Ethyl alcohol from cassava. *Industrial and Engineering Chemistry*, 42, 1781-1783, (1950).
77. TEMPEST, D.W. The continuous cultivation of microorganisms.I.

Theory of the Chemostat. Methods in Microbiology. Vol. 2, 259-276. Academic Press, London and New York, 1970.

78. UEDA, K.; KOJIMA, T.; MIYASAKA, T. & ASAI, T. Studies on the continuous fermentation. Part 3. Continuous alcoholic fermentation of molasses by laboratory scale equipment. *Nogoei kagakukaishi*, 28, 62-66, (1954). (Jap).
79. _____. Studies on the continuous fermentation. Part 7. Continuous fermentation of molasses with a combined system of agitated vessel and flow pipe. *Nogoei kagakukaishi*, 32, 26-29, (1958). (Jap).
80. UNDERKOFER, L.A.; SEVERSON, G.M. & GOERING, K.J. Saccharification of grain mashes for alcoholic fermentation. *Industrial and Engineering Chemistry*, 38, 980-985, (1946).
81. _____. Fungal amylolytic enzymes. Industrial Fermentations. Volume 2, 97-121. Chemical Publishing Co., Inc. New York, 1954.
82. VENOSA, C.M.S.; LESER, E.W.; MARTINS, V.M.M.C & SCHMIDELL NETTO, W. Cultivo de microrganismos em meios contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. I. Influência de condições experimentais no cultivo de *Asp. niger* NRRL 337 em frascos agitados. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 6, 117-124, (1975).
83. WHITAKER, A. & LONG, P.A. Fungal pelleting. *Process Biochemistry*, 8 (11), 27-31, (1973).
84. YANG, V. & SCIGLIANO FR, A. Etanol e eteno a partir de matérias-primas renováveis. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, 1 (3), 19-24, (1977).

85. YAROVENKO, V.L. & NAKHMANOVICH. Kinetics of product synthesis in continuous alcoholic fermentation. *Microbial Engineering*, 397-405. IUPAC, 1973.
86. ZINES, D.O. & ROGERS, P.L. A chemostat study of ethanol inhibition. *Biotech. and Bioeng.*, 13, 293-308, (1971).

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. *Luizema de Oliveira Moraes*
pela orientação inteligente , amizade e dedicação incansável

Ao Professor Dr. *André Tosello* , DD Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola desta Universidade ,
que dimensionou um profundo equilíbrio técnico-científico ,
na expressão humana de sua personalidade

Ao Professor Dr. *Fumio Yokoya* , Coordenador do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola desta Universidade ,
pela compreensão e incentivo

Aos Professores Dr. *Hisaharu Taguchi* e Dr. *Toshiomi Yoshida*,
do Departamento de Fermentação da Faculdade de Engenharia ,
da Universidade de Osaka , Japão ,
pela constante assistência no laboratório e colaboração na
parte de cálculos computacionais

Aos amigos , professores *Enny T. Martucci* , *M. Amélia Chaib Moraes* e *Carlos Osamu Hokka*
pelo estímulo e companheirismo

A todas as pessoas que contribuíram , direta ou indiretamente,
para a realização deste trabalho

A EXPRESSÃO DO NOSSO PROFUNDO RECONHECIMENTO.