



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Câmpus de São José do Rio Preto

Juliana Ferreira

**PRODUÇÃO DE LEVANA E BIOETANOL UTILIZANDO  
CASCAS DE BANANA POR *ZYMOMONAS MOBILIS***

São José do Rio Preto  
2013

Juliana Ferreira

**PRODUÇÃO DE LEVANA E BIOETANOL UTILIZANDO  
CASCAS DE BANANA POR *ZYMOMONAS MOBILIS***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**Orientador:** Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto  
2013

Ferreira, Juliana

Produção de Levana e Bioetanol utilizando cascas de banana por *Zymomonas mobilis* / Juliana Ferreira. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

93 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Banana. 2. Hidrólise ácida. 3. Hidrólise enzimática. 4. Levana. 5. Etanol. 6. *Zymomonas mobilis* 7. Fermentação I. Garcia Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 620.91

Juliana Ferreira

**PRODUÇÃO DE LEVANA E BIOETANOL UTILIZANDO  
CASCAS DE BANANA POR *ZYMOMONAS MOBILIS***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz – Orientador – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus São José do Rio Preto.

Prof. Dr. Ozair Souza – Departamento de Engenharia Química, da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) – Campus Joinville - SC.

Profa. Dra. Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes - Departamento de Farmácia da Universidade Paulista (UNIP) - Campus São José do Rio Preto.

São José do Rio Preto  
21 de Fevereiro de 2013

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz, pela oportunidade, paciência, confiança, atenção e pelos ensinamentos transmitidos.

A CAPES pela concessão da bolsa para a realização desta pesquisa.

A técnica do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Tânia pelo auxílio e atenção.

Ao estagiário Adriano pela colaboração nas análises.

A Cintia pela amizade, companhia diária e fornecimento de cascas de banana.

A minha amiga Ana Karla e a Família Rebes por todo apoio e amizade dado desde o início do mestrado.

A Michele pela troca de informação, paciência, explicações e amizade.

A todos os doutorandos, mestrandos e estagiários do laboratório de biopolímeros.

Ao meu namorado Nivaldo Junior, pelo amor e pelo incentivo dado durante todo esse período.

Aos membros da banca Profa. Dra. Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes e Prof. Dr. Ozair Souza pelas considerações, sugestões e contribuições feitas em relação a esta pesquisa.

Aos meus familiares, minha eterna gratidão.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Muitos países estão considerando razoável, e necessário, a curto e médio prazo, um constante investimento no estudo de formas, economicamente viáveis, de obtenção de fontes renováveis de energia, com grande destaque para a produção de etanol. O aproveitamento da matéria vegetal desperta grande interesse dos pesquisadores, cientistas e industriais, devido ao fato da mesma ser encontrada em grandes quantidades em vários tipos de resíduos. Por exemplo, só no Brasil, anualmente, tem-se uma geração de 83.537 toneladas de cascas de banana que poderiam ser transformados em etanol. As bactérias alcoólicas da espécie *Zymomonas mobilis* apresentam atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação alcoólica. Entretanto, quando sacarose é empregada na fermentação, o rendimento do etanol diminui devido à formação de subprodutos, como levana. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da hidrólise ácida e enzimática de cascas de banana e das condições de fermentação para a produção de etanol e levana, pelo micro-organismo *Z. mobilis* CCT 4494. Foi avaliado o efeito das variações de pH inicial, temperatura, tempo de incubação e concentração do substrato adicionado aos meios de fermentação (meio sintético e meio com hidrolisado de cascas de banana). Aplicou-se a metodologia de superfície de resposta, seguindo um planejamento fatorial do tipo  $2^{4-1}$ , de acordo com o modelo proposto por Box e Hunter. As cascas de banana secas, submetidas à hidrólise ácida por 15 min a 120°C, seguida de hidrólise enzimática realizada por 24 h, pH 5,5 e temperatura de 50°C, resultaram em maior concentração de açúcares totais (72,8 mg/mL). A síntese de levana e etanol foi proporcional ao aumento da concentração de açúcares totais presente nos meios fermentativos, favorecendo a produção destes na concentração do substrato de 250 g/L. As maiores produções de etanol do meio sintético (90,2 mg/mL) e do meio com o caldo de casca de banana (87,7 mg/mL), foram encontradas com as mesmas condições operacionais: concentração máxima de sacarose ou teor de sólidos totais de 250 g/L, pH 4,5, 35°C e 24 h. A produtividade máxima alcançada na produção de etanol a partir da sacarose foi de 3,76 g/L.h e com as cascas de banana foi de 3,66 g/L.h.

Palavras-Chave: banana, hidrólise ácida, hidrólise enzimática, levana, etanol, *Zymomonas mobilis*, fermentação.

## ABSTRACT

Many countries are considering reasonable and necessary in a short and medium term, a constant investment in the study of ways, economically viable, to obtain renewable energy sources, most notably for the ethanol production. The use of plant material attracts great interest from researchers, scientists and industrialists due to the fact that it is found in large quantities in various types of waste. For example, only in Brazil, annually, there is a generation of 83.537 tons of banana peels that could be converted into ethanol. The alcoholic bacteria of the species *Zymomonas mobilis* present technological attributes that enhance their use in alcoholic fermentation. However, when sucrose is used in the fermentation medium, ethanol yield decreases due to the formation of by-products such as levan. The objective of this work was to study the effect of the acid and enzymatic hydrolysis of banana peels and the fermentation conditions for the production of ethanol and levan by *Z. mobilis* CCT 4494. The effect of pH, temperature, time and substrate concentration added to the fermentation media (synthetic media and media containing banana peels hydrolyzate) was evaluated. The response surface methodology was employed, following a  $2^{4-1}$  factorial planning, according to the model proposed by Box and Hunter. The dried banana peels, subjected to acid hydrolysis by 15 min at 120°C and enzymatic hydrolysis performed for 24 h at pH 5.5 and 50°C showed better performance in total sugars (72,8 mg/mL). The synthesis of levan and ethanol was proportional to the increase in the total sugars concentration present in the fermentation media, and the production of these was favored in substrate concentration of 250 g/L. The highest yields of ethanol in the synthetic medium (90,2 mg/mL) and in the medium with banana peel hydrolyzed (87,7 mg/mL) were found with the same operating conditions: maximum sucrose concentration or total solids content of 250 g/L, pH 4.5 at 35 °C for 24 h. The maximum production achieved for ethanol from sucrose was 3.76 g/L.h and from banana peels was 3.66 g/L.h.

Keywords: banana, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, levan, ethanol, *Zymomonas mobilis*, fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico da produção brasileira de banana por região fisiográfica em 2010. ....	19
Figura 2 - Fluxograma dos principais pontos de perdas na cadeia de produção e comercialização de banana. ....	22
Figura 3 - Estrutura química da celulose .....	27
Figura 4 - Metabolismo dos carboidratos em <i>Z. mobilis</i> . ....	33
Figura 5 - Estrutura $\beta$ - 2,6 da ramificação principal da levana .....	36
Figura 6 - Cascas de banana nanica.....	37
Figura 7 - Principais efeitos na produção de levana.....	58
Figura 8 - Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da temperatura (°C) e concentração de sacarose (g/L) (Levana = $-0,181*y+0,010*x +8,335$ ).....	59
Figura 9 - Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração de sacarose (g/L) e pH do meio de fermentação (Etanol = $1,961*x+0,335*y-0,010*x*y+8,842$ ).....	64
Figura 10 - Produtividade de etanol na fermentação do meio sintético por <i>Z. mobilis</i> .....	66
Figura 11 - Principais efeitos na produção de levana.....	69
Figura 12 - Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da temperatura (°C) e teor de sólidos totais (g/L) do meio de fermentação (Levana = $0,006*x+0,064*y-2,043$ ).....	70
Figura 13 - Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor do teor de sólidos totais (g/L) e temperatura (°C) de fermentação (Etanol = $0,327*x+0,051*y+2,360$ )..	74



Figura 14 - Produtividade de etanol na fermentação de caldo hidrolisado de cascas de banana por *Z. mobilis*.....75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da casca da banana <i>Musa cavendishii</i> madura. ....	23
Tabela 2 - Enzimas e dosagem recomendadas e empregadas nos ensaios de hidrólise enzimática das cascas de banana nanica. ....	39
Tabela 3 - Meio de manutenção do micro-organismo <i>Z. mobilis</i> CCT 4494. ....	40
Tabela 4 - Meio sintético proposto por Rodriguez e Callieri (1986). ....	41
Tabela 5 - Variáveis independentes, codificadas, estudadas para a produção de levana ( $Y_1$ ) e de etanol ( $Y_2$ ), por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494. ....	46
Tabela 6 - Concentrações de açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR) e sólidos totais (ST) obtidos na hidrólise ácida de cascas de banana nanica in natura e desidratadas (secas), a 120°C, durante os tempos de 15 e 30 minutos. ....	49
Tabela 7 - Concentrações de açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR) e sólidos totais (ST) obtidos na hidrólise enzimática, a 50°C, durante os tempos de 0,5; 1,0; 2,0; 24 e 48 h, de cascas secas e trituradas, pré tratadas com ácido sulfúrico a 120°C e 15 min. ....	51
Tabela 8 - Concentração de açúcares totais (AT), sólidos totais (ST) e compostos fenólicos determinados após o tratamento de desintoxicação do hidrolisado das cascas submetidas ao tratamento ácido e enzimático. ....	52
Tabela 9 - Matriz do delineamento fracionado $2^{4-1}$ contemplando as 24 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas levana( $Y_1$ ) e etanol ( $Y_2$ ), utilizando o meio sintético, acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo. ....	54
Tabela 10 - Matriz do delineamento fracionado $2^{4-1}$ contemplando as 24 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas levana ( $Y_1$ ) e etanol ( $Y_2$ ), utilizando caldo hidrolisado de cascas de banana, acrescido de sais	

minerais, fermentado por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, teor de sólidos totais e tempo. ....	55
Tabela 11 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta levana ( $Y_1$ ), utilizando o meio sintético, fermentado por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo. ....	56
Tabela 12 - Coeficiente de rendimento de massa celular, coeficiente de rendimento de levana em relação ao substrato consumido e produtividade total de levana, na fermentação do meio sintético. ....	57
Tabela 13 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta biomassa, utilizando o meio sintético, fermentado por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo. ....	61
Tabela 14 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol ( $Y_2$ ), utilizando o meio sintético, fermentado por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo. ....	63
Tabela 15 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta levana ( $Y_1$ ), utilizando o caldo hidrolisado de cascas de banana, fermentado por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo. ....	67
Tabela 16 – Coeficiente de rendimento de massa celular, coeficiente de rendimento de levana em relação ao substrato consumido e produtividade total de levana, na fermentação do caldo hidrolisado de cascas de banana. ....	68
Tabela 17- Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta biomassa, utilizando o caldo hidrolisado de cascas de banana fermentado por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo. ....	71

Tabela 18 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol ( $Y_2$ ), utilizando o caldo hidrolisado de cascas de banana, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo.....73

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 GERAL .....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
3.1 BANANA .....	18
3.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS .....	20
3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS, NUTRICIONAIS E SENSORIAIS .....	21
3.4 RESÍDUOS DA BANANA .....	22
3.5 ETANOL .....	24
3.6 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS .....	25
<b>3.6.1 Hidrólise ácida .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6.2 Hidrólise enzimática .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6.3 Desintoxicação de hidrolisados lignocelulósicos .....</b>	<b>30</b>
3.7 A BACTÉRIA <i>ZYMOMONAS MOBILIS</i> .....	31
3.8 LEVANA .....	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 MATÉRIA-PRIMA .....	37
<b>4.1.1 Preparo da matéria-prima .....</b>	<b>37</b>
4.2 HIDRÓLISE DA BIOMASSA .....	38
<b>4.2.1 Hidrólise ácida .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.2 Hidrólise enzimática .....</b>	<b>38</b>
4.3 DESINTOXICAÇÃO .....	40
4.4 MICRO-ORGANISMO .....	40
4.5 MEIOS DE CULTURA .....	40
<b>4.5.1 Meio de manutenção.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.2 Meio de fermentação .....</b>	<b>41</b>
4.5.2.1 Meio Sintético .....	41

4.5.2.2 Meio contendo caldo hidrolisado de cascas de banana .....	41
4.6 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO.....	42
<b>4.6.1 Preparo do Pré-Inóculo.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6.2 Pré-Fermentação .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6.3 Fermentação.....</b>	<b>42</b>
4.6.3.1 Padronização do Inóculo .....	42
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	43
<b>4.7.1 Coleta e preparo das amostras .....</b>	<b>43</b>
<b>4.7.2 Determinação do pH final.....</b>	<b>43</b>
<b>4.7.3 Determinação da concentração celular.....</b>	<b>44</b>
<b>4.7.4 Determinação do teor de sólidos totais .....</b>	<b>44</b>
<b>4.7.5 Determinação da concentração de fenóis totais no hidrolisado .....</b>	<b>44</b>
<b>4.7.6 Determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) .....</b>	<b>44</b>
<b>4.7.7 Separação de levana .....</b>	<b>45</b>
<b>4.7.8 Determinação de levana .....</b>	<b>45</b>
<b>4.7.9 Determinação de etanol.....</b>	<b>45</b>
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	46
4.9 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS .....	47
<b>4.9.1 Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido ..</b>	<b>47</b>
<b>4.9.2 Coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido .....</b>	<b>47</b>
<b>4.9.3 Produtividade.....</b>	<b>48</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1 ENSAIOS DE HIDRÓLISES .....	49
<b>5.1.1 Hidrólise ácida .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.2 Hidrólise enzimática .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1.3 Desintoxicação.....</b>	<b>52</b>
5.2 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	53
<b>5.2.1 Produção de levana com o meio sintético .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.2 Produção de biomassa celular com o meio sintético.....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.3 Produção de etanol com o meio sintético.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.4 Produção de levana com caldo hidrolisado de cascas de banana.....</b>	<b>66</b>
<b>5.2.5 Produção de biomassa celular com caldo hidrolisado de cascas de banana .....</b>	<b>71</b>

<b>5.2.6 Produção de etanol com o caldo hidrolisado de cascas de banana .....</b>	<b>72</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A crise do petróleo de 1973 impulsionou a busca de recursos energéticos renováveis, assim como a procura de fontes de recursos orgânicos capazes de substituir os atuais produtos petroquímicos. Muitos países estão considerando razoável, e necessário, a curto e médio prazo, um constante investimento no estudo de formas, economicamente viáveis, de obtenção de fontes renováveis de energia, com grande destaque para a produção de etanol.

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores agrícolas do mundo e, em consequência disto, é capaz de gerar grandes quantidades de resíduos agroindustriais. Dentre os possíveis usos desses resíduos (cascas, folhas e palhas), destacam-se a sua transformação por meio de bioconversão em matéria orgânica para o solo e de alimentos para os ruminantes, ou mesmo a sua utilização como substrato para a produção de biomassa protéica de fungos e de leveduras.

A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo cultivada na maioria dos países tropicais, quase que exclusivamente por pequenos agricultores, possui notável papel socioeconômico. No Brasil, a cultura da banana ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas e a terceira posição em área colhida. A casca da banana representa de 47 a 50% em peso da fruta madura. Anualmente, somente no Brasil, tem-se uma geração de resíduo industrial de 83.537 toneladas de cascas de banana, as quais podem ser fermentadas para produção de vinho e de etanol, como substrato para produção de biogás e como material base para extração de pectina.

A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria gram-negativa, que utiliza sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono e energia, produzindo quantidades equimolares de etanol e CO<sub>2</sub>. É uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta as condições de cultura extremamente peculiares, causando grande interesse no mundo científico biotecnológico e industrial. A habilidade da bactéria em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder a manipulação física e química do ambiente, bem como sua limitada formação de produtos a torna um micro-organismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos microbianos.

Na fermentação alcoólica, as leveduras são os micro-organismos comumente utilizados em nível industrial. Contudo, nos últimos 15 anos, a bactéria *Z. mobilis* vem despertando muito interesse pelo seu potencial na produção de etanol, produzindo 1,9 mol de



etanol por mol de glicose e com velocidade três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, *Z. mobilis* não requer controle adicional de oxigênio para manter sua viabilidade em altas concentrações de células. A capacidade de crescer rapidamente na ausência de oxigênio sugere seu uso em processos de fermentação contínua para a produção comercial de etanol. Porém, na fermentação, em alta concentração inicial de sacarose, a taxa de hidrólise deste dissacarídeo é maior do que o consumo dos seus monossacarídeos. Consequentemente, os monossacarídeos acumulam-se no caldo de fermentação e favorecem a formação de subprodutos, como levana, o que reduz o rendimento em etanol.

Considerando que o Brasil é um grande produtor agrícola, com alta geração de resíduos; a necessidade mundial de novas fontes de substrato para a fermentação alcoólica e pelo fato da bactéria *Z. mobilis* apresentar um metabolismo adequado para produção de etanol e levana, este trabalho objetivou avaliar o rendimento da hidrólise da casca de banana em diferentes condições, para que os açúcares resultantes dessa hidrólise venham a ser utilizados como substrato alternativo na fermentação alcoólica; otimizar as condições de fermentação para a produção de etanol e levana, por *Z. mobilis* CCT 4494, utilizando duas fontes de carbono (sacarose comercial e hidrolisado de casca de banana) em diferentes concentrações, bem como avaliar a influência do pH inicial do meio, o tempo e a temperatura de fermentação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar a produção de etanol e levana utilizando cascas de banana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da hidrólise ácida de cascas de banana a serem utilizadas como substrato na fermentação alcoólica;
- Avaliar o efeito da hidrólise enzimática de cascas de banana a serem utilizadas como substrato na fermentação alcoólica;
- Estudar a produção de etanol e levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, utilizando meio sintético adicionado de sacarose e meio contendo os resíduos hidrolisados das cascas de banana;
- Quantificar os efeitos das variáveis operacionais: pH inicial do meio de fermentação, tempo e temperatura de fermentação e concentração inicial do substrato, sobre a produção de levana e etanol.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BANANA

A banana é uma fruta tropical, cultivada nas regiões quentes do mundo, onde é produzida praticamente o ano todo. A banana (*Musa sapientum*) originária do Continente Asiático, foi cultivada pelas sociedades antigas há vários séculos e disseminada nos países do Oriente Médio e Europa Mediterrânea. Pertencente à família Musaceae, é uma das frutas mais consumidas no mundo.

Na América Latina, foi introduzida em São Domingos em 1516 e, a partir da segunda metade do século XIX, ganhou expressão no comércio mundial com as produções centro-americanas e caribenhas (SOUZA; PEIXOTO; WACHHOLZ, 1995).

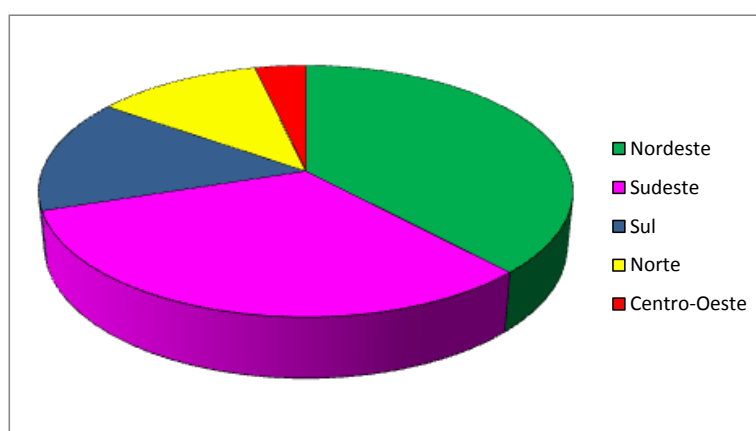
Atualmente seu cultivo é explorado na maioria dos países tropicais, no Brasil é cultivada, desde a faixa litorânea até os planaltos do interior. As regiões produtoras de maior destaque são o Vale do Ribeira no Estado de São Paulo, Jaraguá do Sul em Santa Catarina, Janaúba no Norte de Minas e Petrolina/Juazeiro no Nordeste e as variedades mais difundidas são: Prata, Pacovan, Prata-Anã, Maçã, Mysore, Terra e D' Angola, além da Nanica e Nanicão (OVANDRO-MARTINEZ, 2009). A boa aceitação da banana deve-se aos seus aspectos sensoriais e valor nutricional, consistindo em fonte energética devido à presença de carboidratos, além de minerais, como o potássio, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas (MESQUITA et al., 2009).

As bananeiras estão entre as plantas agrícolas mais importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Elas são cultivadas numa área de cerca de 4,8 milhões de hectares, com uma produtividade média de 19 toneladas/ha/ano. A produção global de bananas quase triplicou em 30 anos. O aumento da produção, de 35 milhões de toneladas em 1979 para 95 milhões de toneladas em 2009, é o resultado da expansão nas áreas de plantio e no ganho de produtividade. Nesse período, o Brasil cultivava 353,6 mil hectares de banana, sendo a maior área cultivada do mundo e era o primeiro produtor mundial de bananas, com 4,52 milhões de toneladas. Atualmente, entre os cinco maiores produtores de banana do mundo, o Brasil é o quinto colocado, com uma produção anual de 7,19 milhões de toneladas, sendo superado pela Índia (26,21 milhões de toneladas), Filipinas (9,01 milhões de toneladas), China (8,20

milhões de toneladas) e Equador (7,03 milhões de toneladas) (SILVA NETO; GUIMARÃES, 2011).

A cultura da banana ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas no Brasil e a quarta posição em área colhida. A produção brasileira de banana está distribuída por todo o território nacional (Figura 1), sendo a região Nordeste a maior produtora (38,05%), seguida das Regiões Sudeste (31,97%), Sul (14,69%), Norte (11,70%) e Centro-Oeste (3,58%) (IBGE, 2012).

Figura 1 - Gráfico da produção brasileira de banana por região fisiográfica em 2010.



FONTE: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2010. Consultado em 10/01/2013.

No comércio mundial, bananas são as frutas que representam o maior volume comercializado. O Brasil é o país que tem o maior consumo per capita, que é cerca de 29,8 kg/habitante.ano, enquanto que o consumo per capita mundial é de 9,0 Kg/habitante.ano.

A maior parte da produção brasileira de banana é consumida *in natura*. São industrializados cerca de 2,5 a 3,0% da produção, sendo 33% desses produtos consumidos no mercado interno. Segundo Mesquita e colaboradores (2009), o processamento da banana apresenta-se como alternativa para o aproveitamento dos frutos excedentes ou fora dos padrões exigidos pelo mercado, possibilitando a redução de perdas pós-colheita e representando uma forma de aumentar a vida de prateleira e agregar valor ao produto.

### 3.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS

Segundo a sistemática botânica de classificação hierárquica, as bananeiras produtoras de frutos comestíveis são plantas da classe das Monocotyledoneae, ordem Scitaminales, família Musaceae, da qual fazem parte as subfamílias Heliconioideae, Strelitzioideae e Musoideae. Esta última inclui, além do gênero *Ensete*, o gênero *Musa*, constituído por quatro séries ou seções: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys e (Eu) Musa. A seção (Eu) Musa é a mais importante, uma vez que, além de ser formada pelo maior número de espécies desse gênero, apresenta ampla distribuição geográfica e abrange as espécies comestíveis. A maioria dos cultivares de banana originou-se no Continente Asiático, evoluindo a partir das espécies diplóides selvagens *Musa acuminata* (Colla) (AA) e *Musa balbisiana* (Colla) (DANTAS; SOARES FILHO, 1997).

A bananeira *Musa* spp. é uma planta monocotiledônea e herbácea, ou seja, a parte aérea é cortada após a colheita. Apresenta caule subterrâneo (rizoma), de onde saem as raízes primárias, em grupos de três ou quatro, totalizando 200 a 500 raízes, com espessura predominante menor que 0,5 mm, podendo atingir até 8 mm, sendo brancas e tenras quando novas e saudáveis, tornando-se amareladas e endurecidas com o tempo. O sistema radicular é fasciculado, podendo atingir horizontalmente até 5 m; no entanto, é mais comum de 1 a 2 m, dependendo da variedade e das condições do solo; é também superficial, com aproximadamente 30% localizadas na profundidade de 0-10 cm e 82% concentrando-se na camada de 0-50 cm. O pseudocaule é formado por bainhas foliares, terminando com uma copa de folhas compridas e largas, com nervura central desenvolvida. Uma planta pode emitir de 30 a 70 folhas, com o aparecimento de uma nova folha entre 7 e 11 dias. A inflorescência sai do centro da copa, apresentando brácteas ovaladas, de coloração geralmente roxo-avermelhada, em cujas axilas nascem as flores. De cada conjunto de flores formam-se as pencas (7 a 15), apresentando número variável de frutos (40 a 220), dependendo da variedade (BORGES; SOUZA, 2004).

A bananeira é uma planta tipicamente tropical, cujo bom desenvolvimento exige calor constante, elevada umidade e boa distribuição de chuvas. Essas condições são registradas na faixa compreendida entre os paralelos de 30° de latitude norte e sul, nas regiões onde as temperaturas situam-se entre os limites de 15 e 35°C. Há, entretanto, a possibilidade de seu

cultivo em latitudes acima de 30° de latitude norte e sul, desde que a temperatura e o regime hídrico sejam adequados.

Os frutos da bananeira resultam do desenvolvimento partenocárpico, ou seja, desenvolve-se sem fecundação. São alongados, de casca mole, com a polpa carnosa de coloração amarelada, variável de acordo com a variedade. Reúnem-se em pencas, coletivamente conhecidas como cachos (LIMA; MENDONÇA, 2005).

### 3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS, NUTRICIONAIS E SENSORIAIS

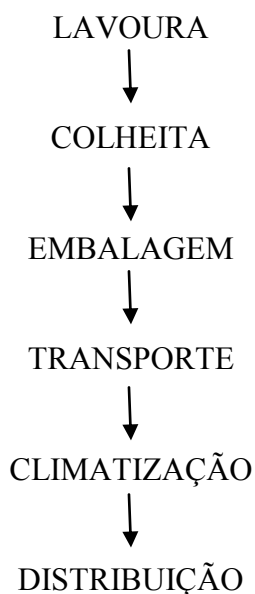
O fruto passa por quatro fases de desenvolvimento, a saber: crescimento, maturação, amadurecimento e senescência. O crescimento é marcado por um período de rápida divisão ou alongamento celular. A maturação é caracterizada por mudanças físicas e químicas que afetam a qualidade sensorial do fruto. É um fruto climatérico cujo início do amadurecimento é marcado por forte aumento da taxa respiratória e da produção de etileno, em seguida ocorre um declínio acentuado que sinaliza o início da senescência. A produção de etileno representa um sinal que dispara rapidamente as modificações que resultam na transformação da banana em um fruto apto para o consumo (VILAS BOAS et al., 2001).

A composição química da banana alterna de acordo com a variedade. No entanto, em todas as cultivares ocorrem transformações semelhantes durante o processo de maturação. É uma fruta com aroma e consistência própria e de grande valor nutritivo. Apresenta cerca de 19 a 25% de sólidos solúveis totais e, dentro deste total, 18 a 20% de carboidratos (amido convertido em açúcares solúveis, tais como sacarose, glicose e frutose). Outros grupos de componentes muito importantes são: os taninos; os lipídios, que têm um valor inferior a 0,5%; as proteínas, com concentração entre 0,8 a 1,5% do conteúdo da polpa; os componentes minerais que representam 0,8 a 1,2%, dominando os sais de fósforo (15 a 30 mg/100g de polpa), potássio, magnésio, cálcio e ferro; as vitaminas A (Retinol), B<sub>1</sub> (Tiamina), B<sub>2</sub> (Riboflavina) e C (Ácido ascórbico). A banana tem um grande aproveitamento sendo o fruto, quando ainda verde, utilizado para fazer farinha ou consumidos depois de cozidos. Os frutos maduros são consumidos ao natural ou fritos. Na indústria são utilizados para o preparo de purê, néctar, banana-passa, banana cristalizada, banana em calda, bananada ou doce de massa, essências, vinho, vinagre, geléia ou aguardente (SILVA JÚNIOR, 2007).

### 3.4 RESÍDUOS DA BANANA

Em geral, as culturas agrícolas produzem uma quantidade de sobras muito maior do que a parte utilizada para fins alimentícios ou industriais (TAGLIARI, 2003). Das bananas que são colhidas nas lavouras, em torno de 40% a 50% chegam efetivamente às mãos dos consumidores (SANCHES et al., 2004). Este fato é causado pelas perdas devido a danos ocorridos nas fases do plantio até a colheita, no momento da colheita, no amontoamento dos cachos, nas embalagens de madeira, no transporte interno e externo e no manuseio das frutas nas feiras e supermercados. Na Figura 2 são apresentados os principais pontos de perdas da banana, desde a produção até a distribuição.

Figura 2 - Fluxograma dos principais pontos de perdas na cadeia de produção e comercialização de banana.



Em conjunto, esses danos promovem alterações no padrão respiratório, na evolução do etileno, na síntese e degradação de pigmentos, na ativação de enzimas, na alteração da firmeza e no aumento da perda de água dos frutos (SOUZA; PEIXOTO; WACHHOLZ, 1995).

Só na América do Sul, os resíduos de banana são estimados em uma média de 25 a 50% da produção total, devido ao fato de que muitos destes frutos não chegam a ter os padrões de qualidade para sua exportação e pelo excesso produzido existente no mercado interno. Souza, Peixoto e Waachholz (1995) determinaram as perdas em diferentes etapas na cadeia da banana no Brasil. Esses autores observaram que na lavoura perde-se mais de 5%; no

processo de embalagem mais de 2%; no atacado de 6% a 10%; no varejo de 10% a 15% e, no consumidor de 5% a 8%. Com a industrialização da fruta, dois resíduos são produzidos: rejeitos de frutas de má qualidade e descarte de cascas devido ao beneficiamento da polpa.

A casca de banana é uma rica fonte de amido, gordura bruta, fibra dietética total, ácidos graxos poliinsaturados, pectina, aminoácidos essenciais e micronutrientes (K, Ca, P, Mg). Uma caracterização completa da composição das cascas de banana *Musa cavendishii*, popularmente conhecida como banana nanica, é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição centesimal da casca da banana *Musa cavendishii* madura.

Parâmetro	100 g de amostra
Umidade (%)	83,5
Proteína (%)	1,8
Lípidios (%)	1,7
Glicose (%)	2,4
Frutose (%)	6,2
Sacarose (%)	2,6
Amido (%)	1,2
Celulose (%)	8,4 – 9,6
Hemicelulose (%)	6,4 – 9,4
Lignina (%)	6,0 – 12,0
Pectina (%)	10,0 – 21,0
Açúcar Total (%)	29,0
Potássio (mg)	78,1
Cálcio (mg)	19,2
Sódio (mg)	24,3
Ferro (mg)	0,61
Manganês (mg)	76,2

Fonte: MOHAPATRA; MISHRA; SUTAR, 2010.

Devido aos diversos nutrientes presentes, as cascas poderiam ser utilizadas na alimentação para os animais. Também podem ser fermentadas para produção de vinhos, produção de etanol, como substrato para produção de biogás e como material base para extração de pectina (MOHAPATRA; MISHRA; SUTAR, 2010).



### 3.5 ETANOL

No Brasil, o uso do álcool combustível teve início por volta de 1900, mas somente com a crise do petróleo de 1973 a produção em larga escala de álcool combustível a partir da cana-de-açúcar foi estimulada.

Em resposta às crises do petróleo nos anos 70 e 80, foram feitas diversas tentativas em todo o mundo para substituir derivados do petróleo por fontes renováveis. A única experiência de grande porte, com êxito, foi o uso energético da cana no Brasil. O país produzia apenas 15% de sua necessidade de petróleo e decidiu desenvolver o álcool como substituto da gasolina.

Em apenas dez anos o álcool já superava a gasolina como combustível automotivo, e reduzia o impacto na balança comercial de dezenas de bilhões de dólares. Isto exigiu transformações radicais do mercado consumidor e do setor produtivo e de logística para introduzir em todo o território um novo combustível líquido. Investimentos em desenvolvimento tecnológico aumentaram a produtividade agrícola e industrial. Melhorou, também, a eficiência de conversão do caldo da cana em álcool, que se aproxima dos limites teoricamente possíveis (HOLLANDA; ERBER, 2007).

O etanol, ou álcool etílico, é uma substância com fórmula molecular  $C_2H_6O$ , que pode ser utilizada como combustível em motores de combustão interna com ignição por centelha. Como consequência de sua composição, comparativamente às gasolinas típicas, a combustão da gasolina com etanol e do etanol puro em motores produz menores emissões de monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre ( $SO_x$ ), hidrocarbonetos e outros compostos poluentes (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008).

A fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica na qual há a degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose) no interior da célula de microorganismos (leveduras ou bactérias) com formação de etanol e  $CO_2$ .

A fermentação alcoólica inicia-se com a glicólise, também chamada de *via Embden-Meyerhof*, na qual ocorre a oxidação da glicose em duas moléculas de ácido pirúvico em duas etapas, podendo ocorrer na presença de oxigênio ou não. Na primeira etapa, duas moléculas de ATP são utilizadas enquanto uma molécula de glicose é fosforilada, reestruturada e quebrada em dois compostos de três carbonos: gliceraldeído 3-fosfato (GP) e diidroxiacetona fosfato (DHAP), que é imediatamente convertida em GP. Na segunda etapa, as duas

moléculas de GP são oxidadas, em muitos passos, em duas moléculas de ácido pirúvico. Nessas reações, duas moléculas de  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) são reduzidas a NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo forma reduzida) e quatro moléculas de ATP (adenosina trifosfato) são formadas pela fosforilação em nível de substrato, com saldo final positivo de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose que é oxidada. Após a glicólise, as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de  $\text{CO}_2$ . As moléculas de acetaldeído são então reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol, o produto final da fermentação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

O micro-organismo que mais se emprega na fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da cana ou da celulose de biomassas residuais (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Dentre as bactérias, a mais promissora é a *Z. mobilis*, que tem alta eficiência energética resultando num alto rendimento de etanol (maior que 90%). Uma das desvantagens do uso desta bactéria na fermentação do caldo de cana e de outros meios com sacarose é a formação de polissacarídeos, que aumentam a viscosidade do meio de fermentação, e de sorbitol, um produto da redução da frutose que diminui a eficiência da conversão de sacarose a etanol (LEE; HUANG, 2000).

### 3.6 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Muitos países estão considerando razoável, e necessário, a curto e médio prazo, investimento no estudo de formas, economicamente viáveis, de obtenção de fontes renováveis de energia, com grande destaque para a produção de etanol.

A produção de etanol combustível a partir da biomassa lignocelulósica está emergindo como uma das mais importantes tecnologias para a produção sustentável de combustíveis renováveis. O etanol tem maior octanagem que a gasolina e produz menos emissões, sendo, portanto amplamente reconhecido como substituto da gasolina. A maior parte do etanol combustível produzido no mundo atualmente é proveniente da biomassa de amido ou de sacarose, mas a tecnologia para a produção de etanol a partir de fontes vegetais não alimentares está sendo desenvolvida, para que a produção em larga escala possa ser uma realidade (SUKUMARAN et al., 2009).

Existe um grande interesse em desenvolver processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, como palha de milho e arroz, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da indústria agrícola, abundantemente gerados nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de segunda geração (VÁSQUEZ et al., 2007).

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Os principais programas de pesquisa e desenvolvimento são conduzidos nos Estados Unidos e na Europa, basicamente em escalas experimentais de produção, mas seu sucesso poderia transformar o bioetanol em um biocombustível passível de ser produzido em quase todas as regiões do mundo, aproveitando a alta disponibilidade de resíduos orgânicos de diversas fontes (NOGUEIRA, 2008).

A produção e utilização de bioetanol tem atraído atenção mundial como uma estratégia para reduzir o aquecimento global e melhorar a segurança energética global. No entanto, as matérias-primas para a produção de bioetanol devem ser derivadas a partir de partes não comestíveis de culturas alimentares, a fim de evitar a competição direta entre produção de bioetanol e alimentos. Desde 2007, a maior produção de bioetanol foi a partir de açúcar ou amido extraído de frutas e grãos. O etanol pode ser produzido a partir de grande número de recursos renováveis, tais como materiais lignocelulósicos. Estes são pesquisados como uma fonte de açúcares fermentescíveis para a produção de biocombustíveis, devido a sua grande disponibilidade. Entretanto, a eficiente conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis é essencial para a produção de etanol economicamente viável (WALEED et al., 2011).

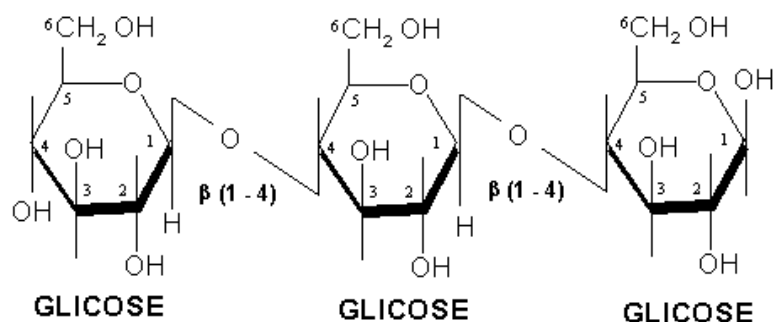
A celulose é uma das substâncias renováveis mais abundantes no globo terrestre, motivo pelo qual a mesma tem sido extensivamente estudada como fonte de energia sustentável para uso industrial. Os estudos iniciais remontam as primeiras décadas do século passado, todavia, apesar dos esforços já efetuados para o desenvolvimento do aproveitamento desta matéria prima, o único processo que pode ser considerado, na atualidade, como tecnologicamente dominado e economicamente viável, é a queima direta da matéria vegetal.

O aproveitamento da matéria vegetal desperta grande interesse dos pesquisadores, cientistas e industriais, devido ao fato de a mesma ser encontrada em grandes quantidades em vários tipos de resíduos (SOARES; ROSSELL, 2007).

A biomassa vegetal tem como principais componentes a celulose, a hemicelulose e a lignina. Em resíduos agrícolas, resíduos de madeiras e plantações os valores percentuais desses componentes (em base de massa seca) variam de 30 a 50% para a celulose, 20 a 30% para a hemicelulose e 20 a 25% para a lignina. Entre 1% e 8% da massa seca do resíduo corresponde ao conteúdo de minerais (MONSALVE; PEREZ; COLORADO, 2006).

A fração celulósica (40% - 60% da matéria seca), representada na Figura 3, é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose), rígido e difícil de ser quebrado; sua hidrólise gera glicose, um açúcar de seis carbonos, cuja fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* já é bem conhecida.

Figura 3 - Estrutura química da celulose



Fonte: LEHNINGER; NELSON; COX, 1995.

Por sua vez, a fração hemicelulósica (20% - 40%), em geral, é constituída de uma cadeia principal de xilose (ligação  $\beta$ -1,4) com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glicurônico, etc. A hemicelulose é muito mais fácil de ser hidrolisada do que a celulose, mas a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose.

Já a estrutura bioquímica da fração de lignina (10% - 25%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise. Sua presença representa um importante problema para o processo de conversão da biomassa, porque a estrutura física de lignocelulose é intrinsecamente resistente

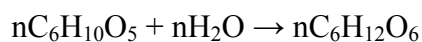
ao ataque enzimático, especialmente celulose, a qual é protegida pela matriz circundante de lignina, hemicelulose e pectina.

As tecnologias para a obtenção de bioetanol com base em materiais lignocelulósicos envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação para a produção do bioetanol. Para executar essa tarefa, a hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina (NOGUEIRA, 2008).

### 3.6.1 Hidrólise ácida

De uma forma geral as tecnologias para a obtenção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica envolvem a hidrólise dos carboidratos hemicelulose e celulose, produzindo os seus respectivos açúcares fermentescíveis pentoses e hexoses, e posterior fermentação alcoólica dos açúcares livres para produção do bioetanol (ALVIRA et al., 2010).

Na etapa de hidrólise propriamente dita, a celulose é convertida em glicose, segundo a seguinte reação, que pode ser catalisada por ácido diluído, ácido concentrado ou enzimas (celulase):



Para obter os açúcares da celulose, principalmente a glicose, e da hemicelulose, principalmente a xilose, é preciso um pré-tratamento do material lignocelulósico para remoção da lignina (ALZATE; TORO, 2006).

A hidrólise ácida é utilizada no pré-tratamento da biomassa tanto para a quebra da celulose em glicose, como para proporcionar um tratamento inicial, facilitando uma posterior hidrólise enzimática da hemicelulose em hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose).

O pré-tratamento de qualquer biomassa lignocelulósica é fundamental antes da hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é diminuir a cristalinidade da celulose, aumentando a eficiência da hidrólise enzimática.

A hidrólise com  $H_2SO_4$  em diferentes concentrações é um pré-tratamento químico, que pode alcançar altas taxas de rendimento e melhorar significativamente a hidrólise da celulose. O processo com ácido diluído utiliza altas temperaturas e pressões, com tempos de reação de segundos a alguns minutos, o que facilita o uso de processos contínuos. Já os processos com

ácido concentrado são conduzidos em condições mais brandas de temperatura e pressão, mas com tempos de reação tipicamente mais longos (NOGUEIRA, 2008).

Propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial, a conformação molecular e a cristalinidade são fatores que influenciam na hidrólise da celulose, sendo que estes dependerão da origem e dos processos a que esse polissacarídeo for submetido (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

Durante a hidrólise com ácidos diluídos, o material lignocelulósico é misturado com um ácido ( $H_2SO_4$ , tipicamente) diluído em água - catalisador - e aquecido por certo tempo. Os grupos acetil ligados à hemicelulose são clivados e também atuam como catalisadores da hidrólise. Grande parte da hemicelulose é removida. Por outro lado, a remoção da lignina ocorre de maneira bastante limitada. Embora haja fusão e despolimerização desta fração durante o pré-tratamento, também há repolimerização e redistribuição superficial intensa. Estas reações acarretam em alterações radicais na estrutura da parede celular vegetal, favorecendo a acessibilidade das enzimas para a hidrólise subsequente da celulose (SCHELL et al., 2004; LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007).

### **3.6.2 Hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática é uma das rotas utilizadas para aumentar a eficiência da hidrólise ácida. Enzimas tais como celulases, sintetizadas por fungos e bactéria trabalham em conjunto para degradar a celulose e outros polissacarídeos estruturais na biomassa.

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulases (SUN; CHENG, 2002).

Quando comparada com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática da celulose geralmente é conduzida em condições mais brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45° e 50°C), não causa problemas de corrosão e permite maiores rendimentos (75% - 85%). Devido seu grande potencial de evolução, muitos especialistas veem a hidrólise enzimática como a chave para a produção de bioetanol de segunda geração a um custo competitivo em longo prazo (LYND et al., 2002).

### 3.6.3 Desintoxicação de hidrolisados lignocelulósicos

A principal dificuldade associada ao processo de hidrólise é que subprodutos da degradação de açúcares e lignina são tóxicos para os micro-organismos da fermentação posterior, inibindo seu metabolismo. Por exemplo, em altas temperaturas e pressões, glicose e xilose podem ser degradadas em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente. Esses compostos, por sua vez, podem ser degradados formando ácido fórmico. Ácido levulínico é formado pela degradação de hidroximetilfurfural e compostos fenólicos são formados pela quebra parcial da lignina.

Os furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) são compostos que afetam os micro-organismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, quebram o DNA e inibem a síntese de RNA e proteínas (MODING; LIDEN; TAHERZADEH, 2002).

Os tipos de compostos tóxicos e a sua concentração no caldo hidrolisado dependem da matéria-prima e das condições operacionais empregadas na hidrólise. Dessa forma, é interessante que o processo de hidrólise seja otimizado para minimizar a formação de inibidores e que se usem processos de purificação do caldo hidrolisado antes da fermentação. Em geral, a fermentação de hidrolisados não tratados é caracterizada por cinética lenta, e rendimento e produtividade limitados. Vários tipos de processos de purificação do hidrolisado já foram propostos, como por exemplo, o tratamento do hidrolisado com carvão ativado (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Quando se mistura um sólido finamente moído em uma solução diluída corada, observa-se que a intensidade da coloração decresce pronunciadamente. O corante é adsorvido sobre a superfície do sólido. A intensidade do efeito depende da temperatura, da natureza da substância adsorvida, da natureza e agregação do adsorvente (o sólido finamente dividido) e da concentração do corante (CASTELLAN, 1999).

O tratamento do hidrolisado lignocelulósico utilizando carvão ativo baseia-se na capacidade deste material poroso, de origem vegetal, de adsorver sobre a superfície diferentes tipos de moléculas, as quais são retidas na superfície do carvão através de interações físicas fracas denominadas de van der Waals. Estas interações são resultantes de uma atração intermolecular de tal modo que seu potencial é, basicamente, uma função da área superficial do material. Dentre vários materiais comumente usados em processos de adsorção física, o carvão ativo apresenta a maior área superficial, podendo variar entre 600 e 1600 m<sup>2</sup>/g,

dependendo da matéria-prima empregada para sua fabricação (CONSIDINE, 1974 apud CARVALHO, 2005).

O carvão vegetal produzido por madeiras tratadas a partir de temperaturas superiores a 600°C tem se mostrado muito eficiente, conseguindo aumentar a fermentação dos hidrolisados, pois ocorre uma eliminação seletiva dos compostos tóxicos tais como o furfural, hidroximetilfurfural e os derivados de fenólicos, sem afetar a concentração de açúcares fermentáveis (LEE, 1997).

### 3.7 A BACTÉRIA *ZYMOMONAS MOBILIS*

No Brasil o processo para obtenção do álcool etílico é realizado através da fermentação empregando-se leveduras, sendo a *S. cerevisiae* o micro-organismo de escolha das indústrias sucroalcooleiras. Contudo, nos últimos 15 anos, a bactéria *Z. mobilis* vem despertado grande interesse, por seu metabolismo peculiar e por seu potencial no processo fermentativo para a produção de etanol, produzindo etanol com velocidade três a quatro vezes maior que *S. cerevisiae* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009a).

A bactéria *Z. mobilis* é Gram-negativa, não esporulante e móvel, anaeróbia facultativa. Morfologicamente, apresenta-se na forma de bastonete curto, medindo de 2,0 a 6,0 µm de comprimento e 1,0 a 1,4 µm de largura. Quando apresenta mobilidade, possui de um a quatro flagelos polares (FALCÃO DE MORAIS, 1983).

Em meios com altas concentrações de açúcar, estas bactérias ocorrem como longos filamentos de extremidades dilatadas. Em meio sólido a base de glicose, as colônias apresentam-se lenticulares de bordas regulares, de coloração branca ou creme e com 1,0 a 2,0 mm de diâmetro após 2 dias de incubação a 30°C.

As condições ideais para o crescimento desta bactéria são intervalos de temperatura de 30 a 36°C e intervalos de pH entre 5 e 7. Quando cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose presente em etanol, CO<sub>2</sub>, lactato e outros, seguindo um balanço metabólico simples (SWINGS; DE LEY, 1977).

As bactérias *Z. mobilis* são quimioorganotróficas e necessitam de fontes de nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes para manutenção do metabolismo. Um dos importantes componentes para o “pool” enzimático e proteico das células, o nitrogênio, pode ser adicionado na forma de aminoácidos, peptona, sais de amônia e peptídeos.

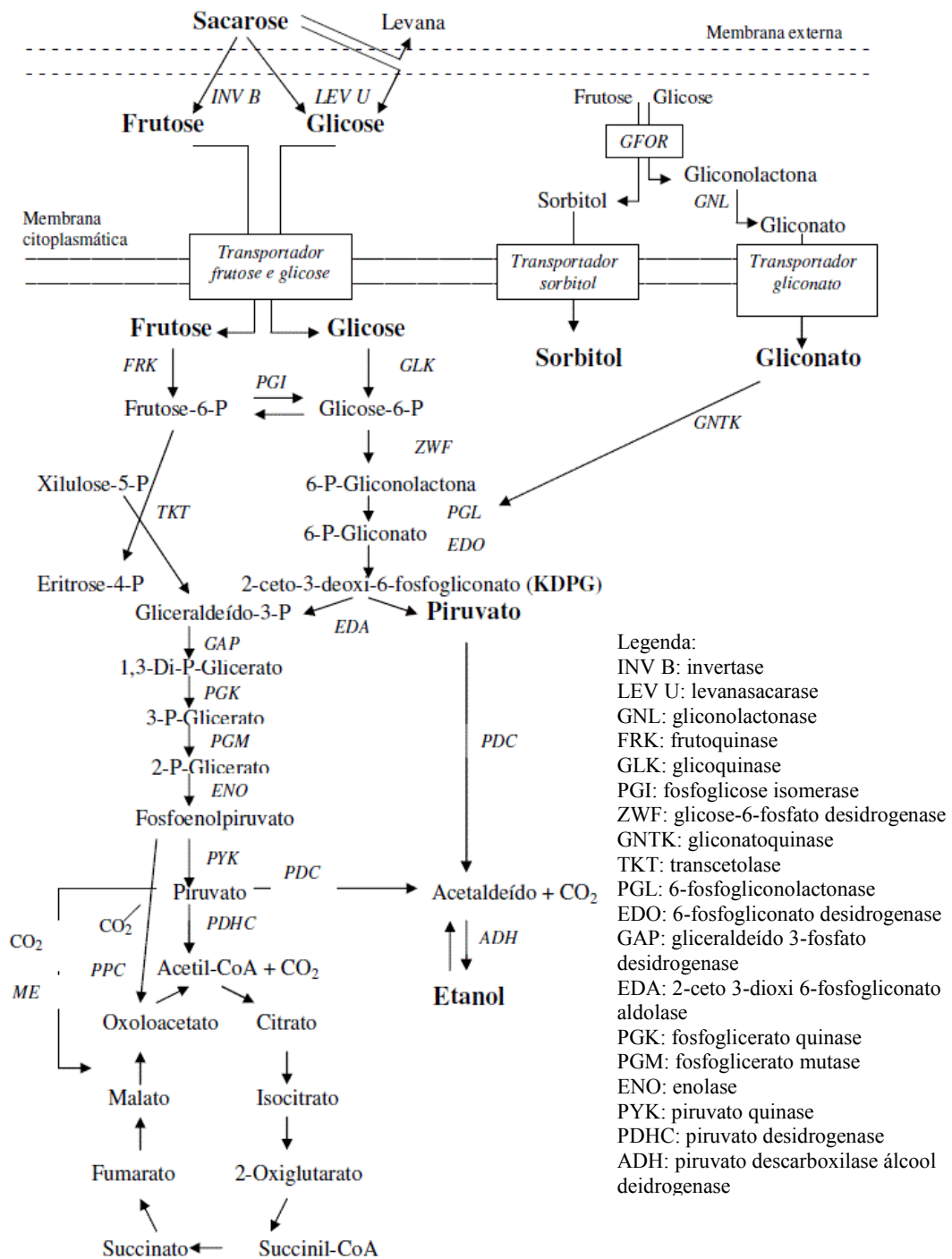


No trabalho de Sprenger (1996), foi observado que a hidrólise da sacarose é extracelular e os açúcares resultantes, glicose e frutose são transportadas para o interior da célula por difusão facilitada. A hidrólise ocorre pela ação das enzimas levanasacarase e invertase, e o produto formado depende do aceptor de elétrons utilizado. No caso do aceptor ser a água, ocorre a hidrólise da sacarose, mas se o aceptor for a frutose, a levana é formada (DOELLE, 1982).

A bactéria possui uma rota catabólica comparativamente simples e não tem a variedade de alternativas metabólicas encontradas em outros micro-organismos. De forma a gerar energia suficiente para o crescimento, *Z. mobilis* deve catabolizar substratos com altas taxas específicas de carbono, resultando em baixos rendimentos de biomassa, pois a maior parte deste substrato é incorporado no catabolismo do produto final, o etanol.

A bactéria *Z. mobilis* emprega a via de Entner-Duodoroff para a glicólise, que produz 1 mol de ATP/mol glicose, oposto a via de Embden-Meyerhoff-Parnas em *S. Cerevisiae* que produz 2 mol de ATP/mol glicose. A diminuição da produção de ATP permite mais energia para ser usada na produção de etanol (WILKINS, 2009). Além disso, *Z. mobilis* não requer controle adicional de oxigênio para manter sua viabilidade em altas concentrações de células. A capacidade de crescer rapidamente na ausência de oxigênio sugere seu uso em processos de fermentação contínua para a produção comercial de etanol.

O metabolismo de açúcares de *Z. mobilis*, ilustrado na Figura 4, aparece como uma “via metabólica” com algumas ramificações. A sacarose é hidrolisada a glicose e frutose pela ação das enzimas invertase (INV B) e levanasacarase (LEV U). As duas hexoses entram na célula via sistema de difusão facilitada (GLF) ou são convertidas pela GFOR (glicose-frutose oxirredutase), uma enzima contendo NADP (nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato) que existe na bactéria *Z. mobilis*. A enzima GFOR, que está localizada no periplasma, oxida glicose a gliconolactona e reduz frutose a sorbitol. Gliconolactona é, então, convertida pela gliconolactonase (GL), outra enzima periplasmática, em ácido glicônico (gliconato). Ambas as enzimas (GL e GFOR) são os principais constituintes do periplasma, formando aproximadamente 20 a 30% das proteínas deste compartimento. O ácido glicônico é consumido pelas células e pode ser completamente degradado (como um co-substrato) a etanol e ácido acético. O sorbitol é produzido para neutralizar o efeito prejudicial de estresse osmótico (SPRENGER, 1996).

Figura 4 - Metabolismo dos carboidratos em *Z. mobilis*.

Fonte: SPRENGER (1996).

A bactéria pode produzir mais que 1,9 mol de etanol por mol de glicose com velocidade entre três a quatro vezes superior a *S. cerevisiae*, sendo, portanto avaliada em

atributos tecnológicos como uma ótima opção para a realização do processo fermentativo no setor sucroalcooleiro. Além da produção de etanol é obtido também 1,8 mol de CO<sub>2</sub> e 0,053 mol de lactato. A eficiência na conversão de glicose em etanol por este micro-organismo é maior que 95% do valor teórico máximo, resultado este devido a uma modificação em sua via metabólica Entner Doudoroff (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009a).

Segundo Doelle e colaboradores (1993), *Z. mobilis* é uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta as condições de cultura extremamente peculiares, causando grande interesse no mundo científico biotecnológico e industrial. Os autores afirmam que a habilidade da bactéria em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder a manipulação física e química do ambiente, bem como sua limitada formação de produtos a torna um micro-organismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos microbianos.

A membrana plasmática de *Z. mobilis* é rica em lipídeos e essa riqueza está relacionada com sua resistência acentuada à concentração de etanol. Atribuem-se dois mecanismos para explicar esta resistência, onde o primeiro está envolvido com os altos níveis de lipídeos cíclicos da membrana desta bactéria e, o segundo, relacionado com a associação dos fosfolipídeos da membrana a elevada quantidade de ácido cis-vacênico (TANO; BUZATO; CELLIGOI, 2000).

A viabilidade de utilização de *Z. mobilis* para a produção de bioetanol a partir de fontes ricas em materiais lignocelulósicos, como resíduos da agricultura, vem sendo muito pesquisada e relatada. O problema em utilizar esse tipo de substrato encontra-se no fato da toxicidade natural dos hidrolisados de lignocelulose resultar em altos custos de processo para desintoxicação do meio reacional. Linhagens recombinantes de *Escherichia coli* e *Z. mobilis* tem apresentado viabilidade para utilização neste tipo de substrato, por apresentarem menor fator inibitório de crescimento na presença dos componentes tóxicos característicos destes meios (FRANDEN; PIENKOS; ZHANG, 2009).

As cepas de *Z. mobilis* possuem características incomuns como sobreviver a pH muito ácido, situados entre 3,5 a 4 e a capacidade em sobreviver em meios contendo até 10% de etanol e temperaturas em torno de 30°C, características essas que são incomuns entre as bactérias. As bactérias do gênero *Zymomonas* tem alta tolerância a concentrações de glicose, crescendo em meio com 20% de glicose e outras em até 40%. Ressalta-se que bactérias

acéticas são capazes a crescer em pH 4 e 4,5 e meios com 20% de glicose, apresentando crescimento rápido em meio com 50% de glicose (SEVERO JR, 2008).

Com a intensificação nas pesquisas que visam transformar os resíduos agroindustriais em etanol de segunda geração, *Z. mobilis* parece ser um micro-organismo viável para a fermentação do hidrolisado obtido desses resíduos. A sacarificação enzimática ou ácida libera os substratos necessários para a realização da fermentação por este micro-organismo.

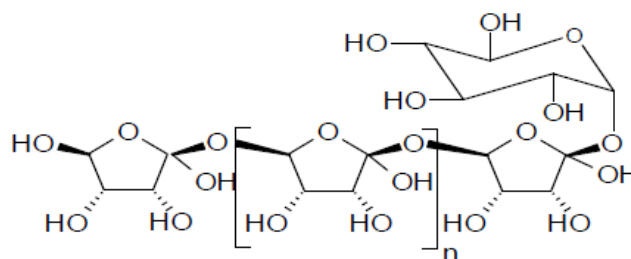
Viikari (1988) ressaltou que utilizando glicose como fonte de carbono, a produção de etanol representava 95% do valor máximo teórico, havendo a formação de outros produtos como acetoina, acetaldeído, glicerol, ácido acético e ácido láctico, porém em pequenas concentrações. Com a utilização de sacarose ou frutose como fonte de carbono o rendimento de etanol diminui. O mesmo autor destacou que utilizando frutose como substrato o rendimento fica em aproximadamente 90% do valor máximo teórico, havendo a formação dos mesmos subprodutos observados na utilização da glicose, além de formar também diidroxiacetona e manitol. Com o uso de sacarose o rendimento diminui ainda mais ficando por volta de 75- 80% do valor máximo teórico. Porém, com o uso de sacarose são formados como subprodutos principalmente sorbitol e levana.

### 3.8 LEVANA

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos que podem ser amplamente produzidos por diferentes micro-organismos. Os polissacarídeos extracelulares, ou exopolissacarídeos, podem ser excretados diretamente para o meio de cultura sob a forma de muco, ou então encontrar-se na forma de camada aderente à volta da parede celular a qual se denomina cápsula (SUTHERLAND, 1972).

O termo levana (Figura 5) refere-se a um exopolissacarídeo obtido pela reação de transfrutoseilação durante a fermentação de culturas crescidas em meios ricos em sacarose.

Figura 5 - Estrutura  $\beta$  - 2,6 da ramificação principal da levana



Fonte: ERNANDES, 2009.

A levana é formada através das reações de transfrutossilacção catalisadas pela levanasacarase (sacarose: 2,6 –  $\beta$  D frutana: 6  $\beta$  D frutossil transferase: EC. 2.4.1.10). Os resíduos frutofuranosil, da sacarose, são transferidos para uma frutose como acceptor. Esta transferência ocorre por meio da formação de ligações entre o carbono 2 do resíduo frutofuranosil e o carbono 6 da frutose (YAMAMOTO et al., 1985).

Quando a bactéria *Z. mobilis* cresce em meio de sacarose, consome preferencialmente glicose, fazendo com que ocorram acúmulos significativos de frutose no meio de fermentação que levam à conversão da frutose em levana através da levanasacarase (PARKER et al., 1997).

A levana provavelmente funciona como fonte de armazenamento de carboidratos para os micro-organismos, quando as fontes de carboidratos intracelulares e extracelulares tornam-se baixas e inadequadas para a célula bacteriana, a enzima levanasase pode hidrolisar a levana presente no meio, formando frutose e frutooligossacarídeo (MIASNIKOV, 1997) que são utilizados para obtenção de energia pela célula bacteriana (BERGERON; MOROUBERMEDEZ; BURNE, 2000).

Na indústria de alimentos a levana é utilizada como fixador de cores e sabores, espessante e estabilizante em géis para sobremesas, em temperos prontos para salada, pudins, sorvetes e derivados do leite, além de atuar como agente hipocolesterolêmico e anticarcinogênico no organismo humano (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

O interesse na produção industrial de levana tem aumentado, sendo que novas metodologias de produção estão sendo pesquisadas e desenvolvidas (AMMAR et al., 2002). Levana pode ser produzida como subproduto de valor agregado, nas destilarias de álcool utilizando a sacarose como substrato (BEKERS et al., 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizados como biomassa, cascas da banana madura *Musa cavendishii*, popularmente conhecida como banana nanica (Figura 6). As frutas foram coletadas no mercado municipal de São José do Rio Preto – SP. As bananas em alto estado de maturação (pintas pretas e textura mole) foram levadas para o laboratório de biopolímeros da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. Em seguida as cascas foram separadas da polpa e as polpas foram descartadas, sendo utilizadas somente cascas.

Figura 6 - Cascas de banana nanica



#### 4.1.1 Preparo da matéria-prima

Foram realizados dois ensaios de hidrólise, um com cascas in natura e outro com cascas desidratadas. As cascas in natura foram hidrolisadas logo após sua obtenção e as cascas desidratadas foram destinadas ao processo de secagem. Para isto as cascas foram cortadas em pedaços menores que 5 cm e trituradas em moedor de facas.

Para a hidrólise das cascas secas, estas foram cortadas manualmente com auxílio de uma faca inox em pedaços menores que 3 cm, foram distribuídas em bandejas de inox e expostas ao sol, durante aproximadamente 24 h, até que as cascas ficassem duras e quebradiças. A seguir, o tamanho de partícula foi reduzido, peneiradas, acondicionadas e armazenadas em frascos de vidro a temperatura ambiente, em quantidade suficiente para realização de todos os ensaios.

Para todos os ensaios de hidrólise ácida e enzimática, bem como de fermentação descontínua, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL.

## 4.2 HIDRÓLISE DA BIOMASSA

### 4.2.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida das cascas in natura foi realizada de acordo com o método proposto por Monsalve, Perez e Colorado (2006), adicionando 50 ml de ácido sulfúrico (5%) para cada 100 g de substrato de banana (casca). E na hidrólise das cascas secas, foram adicionados 50 ml de ácido sulfúrico (5%) para cada 10 g de substrato de banana (casca moída).

Para os dois ensaios foram avaliados dois tempos, 15 minutos e 30 minutos, a 120°C, utilizando autoclave Phoenix Lufanco - AV. Os ensaios foram realizados em duplicata. Após a hidrólise a solução foi neutralizada com NaOH (5N) e filtrada em papel filtro, para separação dos sólidos.

Depois de realizada a hidrólise ácida, escolheu-se aquela com melhor rendimento em açúcares totais e teor sólidos totais para realizar hidrólise enzimática.

### 4.2.2 Hidrólise enzimática

Foram empregadas enzimas comerciais (Tabela 2), gentilmente fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda. Todas as enzimas foram utilizadas de uma só vez empregando as doses máximas recomendadas pelo fornecedor.

As dosagens enzimáticas utilizadas, assim como o pH inicial (5,5) e a temperatura de reação (50°C) foram definidas de modo que os seus valores estivessem dentro das faixas

recomendadas pelo fornecedor das enzimas (ANEXO A). A hidrólise enzimática foi realizada em incubadora de movimento giratório (Shaker) com agitação de 100 rpm.

Tabela 2 - Enzimas e dosagem recomendadas e empregadas nos ensaios de hidrólise enzimática das cascas de banana nanica.

Enzima	Descrição	Dosagem (% m/m)
NS22086 Celulase-complexo	Os principais produtos da reação são a celobiose e a glicose	5,0
NS22083 Xilanase	É um purificado de endo-xilanase com alta especificidade para pentosanas	0,25
NS22118 $\beta$ -glicosidase	Hidrolisa a celobiose, um dímero de glicose. Também conhecida como celobiase	0,6
NS22119 Complexo enzimático	Contém arabinase, $\beta$ -glucanase, celulase, hemicelulase, pectinase e xilanase	0,4
NS22002 $\beta$ -glucanase Xilanase	Contém uma mistura de enzimas com atividade $\beta$ -glucanase e xilanase	2,0

\*% m/m: porcentagem em massa.

A solução enzimática foi preparada em solução tampão Citrato 0,1 M, pH 5,5. A massa de cada uma das enzimas utilizadas na solução foi calculada de forma que 10 mL desta solução resultassem nas concentrações apresentadas na Tabela 2.

Antes da adição da solução enzimática no substrato, previamente hidrolisado por ácido, foi empregado NaOH 5N para a correção do pH inicial para um valor igual a 5,5.

Como reatores, foram empregados frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 90 mL de substrato (hidrolisado por ácido) e 10 mL de solução enzimática. Os tempos de reação avaliados foram de: 0,5; 1,0; 2,0; 24 e 48 h.

No final de cada tempo de reação foram retiradas amostras, as quais foram filtradas em papel filtro, para separação dos sólidos. O líquido obtido foi então utilizado para as determinações das concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e teor de sólidos



totais, conforme descrito no item 4.7.6. Para cada tempo de reação foi utilizado um reator (Erlenmeyer), em triplicata.

### 4.3 DESINTOXICAÇÃO

Ao caldo hidrolisado (cascas hidrolisadas por ácido e enzimas, filtradas) foi adicionado carvão ativo na proporção de 1g de carvão para 40g de hidrolisado, com posterior agitação em incubadora de movimento giratório (Shaker) a 200rpm e 30°C por 1h. Após este tempo, o hidrolisado foi centrifugado a 6941g por 30min, para remoção de sólidos. O hidrolisado desintoxicado foi caracterizado quanto à concentração de açúcares totais (AT) e concentração de fenóis totais.

### 4.4 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado em todos os ensaios foi a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP.

### 4.5 MEIOS DE CULTURA

#### 4.5.1 Meio de manutenção

A linhagem bacteriana foi mantida em geladeira a 4°C, após o crescimento em estufa a 30°C por 24 h em meio composto por: glicose, peptona de carne e extrato de levedura, pH 6,5, sendo reativada mensalmente. A Tabela 3 ilustra a composição do meio de manutenção de *Z. mobilis* CCT 4494.

Tabela 3 - Meio de manutenção do micro-organismo *Z. mobilis* CCT 4494.

Composto	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	10,0
Peptona de carne	10,0

## 4.5.2 Meio de fermentação

Para a produção de etanol e levana foram utilizados os meios de fermentação especificados a seguir:

### 4.5.2.1 Meio Sintético

O meio sintético utilizado foi semelhante ao definido por Rodriguez e Callieri (1986), conforme mostrado na Tabela 4, com algumas modificações, sendo composto por: extrato de levedura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e sacarose. Foram avaliadas três concentrações diferentes de sacarose, 5, 15 e 25%. A solução de sacarose, foi esterilizada separadamente a  $121^\circ\text{C}$ , por 20 minutos, e depois de resfriada até a temperatura ambiente, foi misturada asépticamente no momento do preparo do meio de produção contendo os demais constituintes que foram previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados. O pH inicial do meio de crescimento também foi ajustado para diferentes valores (4,5; 5,5 e 6,5).

Tabela 4 - Meio sintético proposto por Rodriguez e Callieri (1986).

Composto	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	5,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0

### 4.5.2.2 Meio contendo caldo hidrolisado de cascas de banana

O Teor de Sólidos Totais (TST) do caldo hidrolisado da biomassa foi ajustado, utilizando um refratômetro, para as seguintes concentrações: 5, 15 e 25 %, com água destilada estéril. Os frascos de Erlenmeyer, contendo o caldo hidrolisado das cascas de banana com a concentração de sólidos totais adequada, foram esterilizados separadamente a  $121^\circ\text{C}$ , por 20 minutos, logo após foi adicionado o meio sintético (sem a fonte de carbono) até completar o volume desejado. O pH inicial desse meio também foi ajustado para diferentes valores (4,5; 5,5 e 6,5).

## 4.6 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

### 4.6.1 Preparo do Pré-Inóculo

A partir da cultura de *Z. mobilis* armazenada em geladeira, em meio de manutenção, foi feito o pré-inóculo para a reativação das células. A cepa foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de manutenção do micro-organismo *Z. mobilis*, conforme descrito no item 4.5.1 e estes foram incubados em estufa a 30°C, por 24 h.

### 4.6.2 Pré-Fermentação

Após a incubação, como descrito em 4.6.1, 10 tubos de ensaio com crescimento celular foram transferidos para frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de manutenção previamente esterilizados. O pré-inóculo para as fermentações descontínuas foi obtido em agitador orbital rotatório mantido a 30°C, por 24 h, sem agitação.

### 4.6.3 Fermentação

As fermentações descontínuas foram realizadas em agitador orbital “Shaker”, com agitação de 200 rpm. O pH inicial do meio de fermentação foi ajustado no valor de 4,5; 5,5 ou 6,5 com NaOH. Foram avaliadas três temperaturas de fermentação 25; 30 e 35°C, durante 72 horas de fermentação, de acordo com o planejamento estatístico apresentado na Tabela 5, item 4.8.

Para todos os ensaios de fermentação foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de volume de trabalho.

#### 4.6.3.1 Padronização do Inóculo

A padronização do inóculo foi feita de acordo com Vignoli (2003) para garantir que a concentração de inóculo inicial fosse igual para todos os ensaios de fermentação.

A suspensão celular obtida na pré-fermentação (item 4.6.2) foi centrifugada e re-suspendida em água destilada estéril de forma a se obter uma suspensão com absorvância da ordem de 0,400 em 570 nm.

Separadamente foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações da suspensão celular de *Z. mobilis* CCT 4494 (APÊNDICE A), que relaciona a absorvância com concentração celular, com a qual foi possível calcular o inóculo inicial de células transferido nos frascos de Erlenmeyer contendo o meio de fermentação.

Para as determinações fotométricas foi utilizado o espectrofotômetro Biochrom modelo: Libra 22.

## 4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

Após o processo fermentativo, foram determinados os valores do pH final, da concentração celular, levana, etanol e Açúcares Totais (AT).

### 4.7.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras de cada ensaio foram coletadas a aproximadamente 25°C. Inicialmente, foi determinado o valor de pH final do caldo de fermentação e uma alíquota de 5 mL foi retirada para a medição da concentração celular em espectrofotômetro. O restante do caldo obtido da fermentação foi centrifugado a 6941g, 4°C, durante 15 minutos e o sobrenadante foi separado e congelado para as análises posteriores (determinação dos produtos da fermentação, de açúcares totais e açúcares redutores).

### 4.7.2 Determinação do pH final

O pH final foi determinado diretamente no caldo fermentado por potenciometria com pHmetro Digmed modelo DM20.

#### **4.7.3 Determinação da concentração celular**

A concentração celular foi monitorada através da absorbância no espectrofotômetro Biochrom modelo: Libra 22, de suspensões diluídas do meio de fermentação, num comprimento de onda de 570 nm. A conversão da suspensão em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) foi obtida através curva de calibração da concentração celular de suspensões de *Z. mobilis* CCT 4494 (APÊNDICE A).

#### **4.7.4 Determinação do teor de sólidos totais**

O teor de sólidos totais foi determinado utilizando um refratômetro Quimis.

#### **4.7.5 Determinação da concentração de fenóis totais no hidrolisado**

A concentração de fenóis totais foi determinada pelo do método de Folin-Ciocalteu modificado, descrito por Chaovanalikit e Wrolstad (2004). Uma amostra de 0,5 mL de hidrolisado foi misturada com 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso por 10 min, à temperatura ambiente. Depois foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio (20%), as amostras foram deixadas em repouso novamente, por 20 min, à temperatura ambiente.

Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 755 nm tendo como base amostras de ácido vanílico com concentrações conhecidas e, posteriormente, foi construída uma curva de calibração (APÊNDICE B). O resultado foi expresso em concentração de polifenóis correspondente a ácido vanílico.

#### **4.7.6 Determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT)**

Os Açúcares Redutores (AR) foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1952) e Nelson (1944) e os Açúcares Totais (AT) pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois, Gilles e Hamilton (1956). Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda desejado para cada método utilizado, tendo

como base amostras de açúcares com concentrações conhecidas e, posteriormente, construiu-se as curvas de calibração (APÊNDICE C e D, respectivamente).

#### **4.7.7 Separação de levana**

A determinação da levana foi realizada adotando-se a técnica de Viikari (1984), com algumas modificações. A separação de levana foi realizada pela adição de etanol anidro em baixa temperatura (4°C) com a relação álcool:sobrenadante 3:1 (v/v). As amostras foram resfriadas por 24 h, a 4°C para precipitação do biopolímero. Após esse período, procedeu-se a centrifugação (6941g, durante 30 min), o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente o mesmo volume de etanol para aumentar o grau de pureza do material isolado. Repetiu-se o procedimento e após a nova centrifugação o sobrenadante foi descartado.

#### **4.7.8 Determinação de levana**

A levana precipitada foi hidrolisada em frutose, com HCl 0,5% à 100°C por 60 minutos. Neutralizou-se o material hidrolisado com NaOH 2M por 20 min e a pureza da levana foi estimada indiretamente como unidades de frutose (em mg/mL) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 540 nm tendo como base amostras de frutose com concentrações conhecidas e, posteriormente, foi construída uma curva de calibração utilizando o método Somogyi (1952) e Nelson (1944) (APÊNDICE C).

#### **4.7.9 Determinação de etanol**

A concentração do etanol foi determinada pelo método do dicromato de potássio, descrito por Mendonça et al. (2009). O método utilizado é baseado na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional à concentração de etanol na amostra.

As amostras a serem analisadas foram diluídas na proporção de 1:25 em balão volumétrico com água destilada. Em tubos de ensaio foram adicionados 5 mL da amostra

diluída, acrescentavam-se 2 mL de água destilada em cada tubo, juntamente com 2 mL do reagente dicromato de potássio. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 60°C durante 30 min e resfriados a temperatura ambiente. Foram realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. Foi construída uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas de etanol (APÊNDICE E).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado nos ensaios de fermentação o planejamento experimental utilizando o software Minitab 16, a partir de um delineamento do tipo  $2^{4-1}$  (BOX; HUNTER, 1978), sendo necessários 24 experimentos, com 3 repetições no ponto central (pc), para cada meio fermentativo. As variáveis independentes estudadas foram:  $X_1$  = pH inicial do meio de cultivo;  $X_2$  = temperatura em °C;  $X_3$  = concentração inicial de sacarose ou Teor de Sólidos Totais (TST) em g/L e  $X_4$  = tempo (h). As respostas analisadas foram produção de levana ( $Y_1$ ) e etanol ( $Y_2$ ) em mg/mL. Na Tabela 5, estão as variáveis independentes, codificadas, estudadas para a obtenção dos produtos de fermentação por *Z. mobilis* CCT 4494.

Tabela 5 - Variáveis independentes, codificadas, estudadas para a produção de levana ( $Y_1$ ) e de etanol ( $Y_2$ ), por *Z. mobilis* CCT 4494.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
$X_1$ - pH	4,5	5,5	6,5
$X_2$ - Temperatura (°C)	25	30	35
$X_3$ - Sacarose ou TST (g/L)	50	150	250
$X_4$ - tempo (h)	24	48	72

A análise dos resultados, dos efeitos principais e interações entre as variáveis do planejamento fatorial foram realizadas utilizando o programa computacional *Minitab* 16, considerando o nível de significância de 5% de probabilidade.

## 4.9 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos foram determinados de acordo com as equações descritas nos subitens 4.9.1, 4.9.2 e 4.9.3 empregando os resultados obtidos em cada uma das fermentações.

### 4.9.1 Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido

Os valores de rendimento da massa celular, representados pelo fator de conversão de açúcares totais em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) foram calculados de acordo com a Equação 1.

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_o)}{(S_o - S_f)} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$Y_{x/s}$  = coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido (%);

$X_o$  = massa celular seca inicial (g/L);

$X_f$  = massa celular seca final (g/L);

$S_o$  = concentração inicial de substrato (g/L);

$S_f$  = concentração final de substrato (g/L);

### 4.9.2 Coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido

Os valores de rendimento das fermentações, representados pelo fator de conversão de açúcares totais em levana ( $Y_{p/s}$ ) foram calculados de acordo com a Equação 2.

$$Y_{p/s} = \frac{(P_f - P_o)}{(S_o - S_f)} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

$Y_{p/s}$  = coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido (%);

$P_o$  = massa produto inicial (g/L);

$P_f$  = massa de produto final (g/L);

$S_o$  = concentração inicial de substrato (g/L);

$S_f$  = concentração final de substrato (g/L);



### 4.9.3 Produtividade

Os valores de produtividade total em levana e etanol de cada processo, expressos em massa do produto formado por unidade de tempo e por unidade de volume (g/L.h), foram obtidos por meio da Equação 3.

$$P = \frac{(P_f - P_o)}{(t_f - t_o)} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

P = produtividade (g/L.h);

P<sub>o</sub> = massa produto inicial (g/L);

P<sub>f</sub> = massa de produto final (g/L);

t<sub>f</sub> = tempo final de fermentação (h);

t<sub>o</sub> = tempo inicial de fermentação (h);

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ENSAIOS DE HIDRÓLISES

#### 5.1.1 Hidrólise ácida

O estudo das melhores condições de hidrólise ácida tanto da casca de banana in natura, quanto das cascas desidratadas foi realizado testando dois tempos diferentes de hidrólise, 15 e 30 minutos, a 120°C. A Tabela 6 apresenta os valores de açúcares totais e redutores e concentração de sólidos totais obtidos com a hidrólise ácida das cascas.

Tabela 6 - Concentrações de açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR) e sólidos totais (ST) obtidos na hidrólise ácida de cascas de banana nanica in natura e desidratadas (secas), a 120°C, durante os tempos de 15 e 30 minutos.

Ensaio	Produtos da Hidrólise		
	AT	AR	ST
Casca in natura/15'	27,8 ± 1,6 <sup>a</sup>	21,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	8,0
Casca in natura/30'	33,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	17,6 ± 1,8 <sup>a</sup>	8,0
Casca seca/15'	46,7 ± 5,2 <sup>b</sup>	29,5 ± 1,9 <sup>b</sup>	14,5
Casca seca/30'	44,8 ± 3,5 <sup>b</sup>	27,4 ± 1,2 <sup>b</sup>	14,5

\*Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias são iguais estatisticamente ao nível de 5% de significância.

(AT) açúcares totais (mg/mL), (AR) açúcares redutores (mg/mL) e ST: sólidos totais (%).

Conforme pode ser observado na Tabela 6, não houve diferença significativa no tratamento das cascas in natura em relação ao tempo de hidrólise, o valor máximo de açúcar total, nas cascas in natura hidrolisadas, foi encontrado com o tratamento de 30 minutos (33,12 mg/mL). Esse valor é três vezes maior que o obtido por Souza et al. (2011) no mesmo tipo de tratamento, esta discrepância pode ser devida as diferentes concentrações de ácido sulfúrico empregado, a concentração máxima utilizada pelo autor foi de 2%, enquanto nesta dissertação a concentração de ácido utilizada foi de 5%. Para os pesquisadores Saha et al. (2005) e Campo et al. (2006) a concentração de ácido parece ser o fator mais importante na formação de açúcares. El-Zawawy et al. (2011), por exemplo, avaliaram diferentes concentrações (4, 5 e

10%) de ácido sulfúrico para converter biomassa lignocelulósica (palha de arroz, resíduos de banana e sabugo de milho) em açúcares encontrando 0,4; 1,8 e 1,6 g/L de açúcares totais, nas concentrações de 4; 5 e 10 % de ácido, respectivamente, sendo portanto 5 % a concentração adequada.

Valores semelhantes foram encontrados por Monsalve, Perez e Colorado (2006), ao hidrolisar a casca de banana in natura, nas mesmas condições empregadas neste trabalho (120°C e 15min.), obtiveram um xarope com concentração máxima de 20 g/L de açúcares redutores.

Os valores máximos de açúcares totais e redutores, 46,7 e 29,5 mg/mL, respectivamente, foram alcançados com o uso de cascas secas, submetidas a hidrólise a 120°C e 15 minutos. Houve também um incremento de 6,5% de sólidos totais no hidrolisado das cascas secas em relação às cascas in natura (Tabela 6).

A hidrólise ácida preparou as biomassas lignocelulósicas para posterior hidrólise enzimática, ou seja, o tratamento com ácido foi o pré-tratamento para a despolimerização enzimática. Sendo assim, foram selecionadas as cascas secas submetidas à hidrólise ácida na temperatura de 120°C durante 15 minutos para a hidrólise enzimática.

### **5.1.2 Hidrólise enzimática**

Cascas secas e trituradas, tratadas com ácido sulfúrico a 120°C e 15 minutos foram selecionadas como substrato com maior concentração em açúcares e sólidos totais para a hidrólise enzimática. Foram usadas as enzimas descritas no item 4.2.2, Tabela 2, avaliando tempos diferentes (0,5; 1,0; 2,0; 24 e 48 h). No final de cada tempo uma alíquota de amostra foi retirada para determinação de açúcares totais e redutores e teor de sólidos totais presentes na amostra. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações de açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR) e sólidos totais (ST) obtidos na hidrólise enzimática, a 50°C, durante os tempos de 0,5; 1,0; 2,0; 24 e 48 h, de cascas secas e trituradas, pré tratadas com ácido sulfúrico a 120°C e 15 min.

Ensaio (h)	Produtos da Hidrólise Enzimática		
	AT	AR	ST
0,5	57,2 ± 2,9 <sup>a</sup>	41,9 ± 9,2 <sup>a</sup>	14,0
1,0	64,6 ± 15,0 <sup>a</sup>	43,5 ± 5,0 <sup>a</sup>	14,0
2,0	65,9 ± 6,4 <sup>a</sup>	43,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	14,0
24	72,8 ± 3,8 <sup>a</sup>	52,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	14,0
48	60,1 ± 6,8 <sup>a</sup>	46,3 ± 1,6 <sup>a</sup>	14,0

\*Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias são iguais estatisticamente ao nível de 5% de significância.

(AT) açúcares totais (mg/mL); (AR) açúcares redutores (mg/mL); (ST) sólidos totais (%).

A concentração inicial de açúcar total do substrato antes da hidrólise enzimática era de 46,7 mg/mL. Após a hidrólise enzimática a maior concentração em açúcar foi obtida com tempo de reação de 24 h, apresentando 72,8 mg/mL de açúcares totais, tendo um aumento de 26 mg/mL no teor de açúcar total do caldo hidrolisado.

Analisando os dados apresentados na Tabela 7 observamos que para todos os ensaios o teor de açúcares redutores foi alto. Inicialmente a concentração de açúcar redutor era de 29,5 mg/mL, observa-se que o melhor resultado foi de 52,9 mg/mL, também obtido em 24 h de hidrólise.

Não houve diferença estatística entre os tempos avaliados, entretanto para os ensaios realizados nesse trabalho, foi selecionado o tempo de 24 h como o melhor para realizar a hidrólise enzimática das cascas de banana, pois os maiores valores de açúcar total e redutor foram determinados nesse tempo testado.

De acordo com Sun e Cheng (2002), para a hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos, o pré-tratamento dos materiais para remoção da hemicelulose por hidrólise ácida têm o propósito de reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material. Com isto, maior eficiência da hidrólise enzimática pode ser esperada, comprovando o resultado encontrado nesse trabalho, com bons rendimentos em açúcares totais e redutores, aliando a hidrólise ácida à enzimática (Tabela 7).

### 5.1.3 Desintoxicação

Os hidrolisados submetidos ao tratamento com ácido, tanto cascas in natura quanto cascas secas, passaram pelo processo de desintoxicação como descrito no item 4.3. O hidrolisado tratado foi caracterizado quanto à concentração de açúcares totais; quanto à concentração de sólidos totais; e quanto à concentração de compostos fenólicos.

As concentrações dos açúcares totais, teor de sólidos totais e compostos fenólicos presentes nos hidrolisados, avaliadas após o tratamento com carvão ativo, estão apresentadas na Tabela 8. Observa-se que a remoção dos açúcares presentes no hidrolisado após o tratamento apresentou diferença estatística apenas no ensaio das cascas in natura hidrolisadas durante 30 minutos.

Tabela 8 - Concentração de açúcares totais (AT), sólidos totais (ST) e compostos fenólicos determinados após o tratamento de desintoxicação do hidrolisado das cascas submetidas ao tratamento ácido e enzimático.

Ensaio	Produtos da Hidrólise					
	AT <sub>o</sub>	AT <sub>f</sub>	ST <sub>o</sub>	ST <sub>f</sub>	CF <sub>o</sub>	CF <sub>f</sub>
Casca in natura/15'	27,8 ± 1,6 <sup>a</sup>	26,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	8,0	7,5	1,4±0,1 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>b</sup>
Casca in natura/30'	33,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	30,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	8,0	7,0	1,3±0,5 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>b</sup>
Casca seca/15'	46,7 ± 5,2 <sup>a</sup>	41,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	14,5	14,0	1,0±0,4 <sup>a</sup>	0,2±0,0 <sup>b</sup>
Casca seca/30'	44,8 ± 3,5 <sup>a</sup>	41,5 ± 2,8 <sup>a</sup>	14,5	14,0	1,7±0,2 <sup>a</sup>	0,2±0,0 <sup>b</sup>

\*Letras iguais na mesma linha indicam que as médias são iguais estatisticamente ao nível de 5% de significância.

(AT<sub>o</sub>) açúcares totais (mg/mL) antes da desintoxicação; (AT<sub>f</sub>) açúcares totais (mg/mL) após a desintoxicação; (ST<sub>o</sub>) sólidos Totais (%) antes da desintoxicação; (ST<sub>f</sub>) sólidos Totais (%) após a desintoxicação; (CF<sub>o</sub>) compostos fenólicos (g/L) antes da desintoxicação; (CF<sub>f</sub>) compostos fenólicos (g/L) após a desintoxicação.

Pode ser observado na Tabela 8, nos resultados referentes à remoção dos compostos fenólicos, que houve diferença estatística entre todos os tratamentos, com alta redução na concentração desses compostos.

De acordo com Fein et al. (1983) a presença de compostos orgânicos voláteis no meio de fermentação, tais como os ácidos acético, fórmico ou propiônico; furfural, fenol, indol, nitratos, clorofenolatos, ácidos alifáticos, aromáticos e etc., podem ser responsáveis pela inibição da fermentação. E esses compostos podem ser formados durante a hidrólise, por isso

torna-se interessante realizar uma desintoxicação do hidrolisado antes da fermentação, visando maior rendimento na obtenção dos produtos desejados, no caso dessa pesquisa, etanol e levana.

Foi determinada a melhor condição de hidrólise do substrato (química e enzimática), sendo utilizadas cascas secas e trituradas, tratadas com ácido por 15 min, a 120°C e hidrolisadas enzimaticamente durante 24 h a 50°C.

## 5.2 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Foram realizadas fermentações descontínuas em triplicata, com o meio sintético e com meio hidrolisado de cascas de banana (com a melhor condição) de acordo com o planejamento fatorial  $2^{4-1}$  (Tabela 9 e 10). De todos dos ensaios foram retiradas amostras para determinação do pH final, açúcares totais, biomassa, levana e etanol.

A matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , contemplando as 24 combinações e com 3 repetições no ponto central (pc), indicadas pelas corridas 6, 18 e 26, e os resultados dos experimentos visando a produção de levana ( $Y_1$ ) e etanol ( $Y_2$ ), pela bactéria *Z. mobilis* CCT 4494, utilizando o meio sintético e o meio com caldo hidrolisado de cascas de banana estão apresentados na Tabela 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 - Matriz do delineamento fracionado  $2^{4+1}$  contemplando as 24 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas levana ( $Y_1$ ) e etanol ( $Y_2$ ), utilizando o meio sintético, acrescido de sais minerais, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo.

Ensaio	Variáveis independentes				pH <sub>final</sub>	Resultados			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>		Biomassa (mg/mL)	Levana (mg/mL)	Etanol (mg/mL)	AT <sub>f</sub> (mg/mL)
1	-1	1	-1	1	3,6	0,6	2,2	24,7	11,3
2	1	-1	1	-1	4,0	0,9	4,0	86,1	172,9
3	1	-1	-1	1	3,5	0,8	4,1	36,1	16,3
4	1	-1	1	-1	3,9	0,9	7,6	86,4	162,9
5	-1	1	-1	1	3,6	0,7	5,6	26,7	15,2
6*	0	0	0	0	3,4	1,6	2,1	80,2	53,2
7	-1	-1	-1	-1	3,7	0,8	2,9	38,9	21,0
8	1	1	-1	-1	4,2	2,0	1,8	27,9	13,8
9	1	-1	1	-1	3,9	0,9	8,4	89,7	167,9
10	1	1	-1	-1	4,2	1,9	4,5	26,7	14,0
11	-1	-1	1	1	3,3	0,7	8,5	86,8	156,7
12	-1	1	1	-1	3,5	1,9	8,2	85,0	152,6
13	-1	-1	1	1	3,3	0,6	9,9	86,2	138,8
14	-1	-1	-1	-1	3,6	0,8	4,0	37,9	30,2
15	-1	1	1	-1	3,5	1,7	3,4	87,6	169,4
16	1	-1	-1	1	3,6	0,7	2,5	38,2	22,0
17	1	1	1	1	3,4	1,4	5,3	84,3	101,1
18*	0	0	0	0	3,4	1,2	4,8	87,2	72,4
19	-1	-1	1	1	3,5	1,7	4,3	87,5	178,6
20	-1	1	1	-1	3,5	2,3	1,5	90,2	147,5
21	-1	-1	-1	-1	3,6	0,8	2,4	19,7	16,6
22	-1	1	-1	1	3,6	0,6	3,9	27,7	18,2
23	1	-1	-1	1	3,6	0,6	5,7	35,0	14,0
24	1	1	1	1	3,3	1,3	1,4	84,9	152,8
25	1	1	-1	-1	4,2	1,8	1,6	28,9	13,1
26*	0	0	0	0	3,5	1,3	5,1	85,2	62,5
27	1	1	1	1	3,5	1,4	3,3	85,1	132,9

X<sub>1</sub> (pH<sub>inicial</sub>); X<sub>2</sub> (Temperatura (°C)); X<sub>3</sub> (Sacarose (g/L)); X<sub>4</sub> (tempo (h)).

AT<sub>f</sub> (Concentração final de Açúcares Totais ).

\*Pontos Centrais

Tabela 10 - Matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$  contemplando as 24 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas levana ( $Y_1$ ) e etanol ( $Y_2$ ), utilizando caldo hidrolisado de cascas de banana, acrescido de sais minerais, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, teor de sólidos totais e tempo.

Ensaio	Variáveis independentes				pH <sub>final</sub>	Respostas			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>		Biomassa (mg/mL)	Levana (mg/mL)	Etanol (mg/mL)	AT <sub>f</sub> (mg/mL)
1	-1	1	-1	1	4,3	0,4	0,1	21,6	12,1
2	1	-1	1	-1	6,0	0,1	2,6	77,9	86,8
3	1	-1	-1	1	5,4	0,2	0,2	17,6	8,5
4	1	-1	1	-1	6,0	0,1	0,7	85,0	78,1
5	-1	1	-1	1	4,4	0,4	0,1	19,8	25,7
6*	0	0	0	0	5,5	1,1	0,9	69,9	119,9
7	-1	-1	-1	-1	4,5	0,4	0,1	20,7	23,8
8	1	1	-1	-1	5,6	0,2	0,1	15,6	20,5
9	1	-1	1	-1	6,0	0,1	1,0	83,8	79,6
10	1	1	-1	-1	5,8	0,2	0,1	16,7	20,5
11	-1	-1	1	1	4,6	1,6	0,1	85,5	126,9
12	-1	1	1	-1	4,5	2,1	1,2	87,7	151,5
13	-1	-1	1	1	4,5	2,1	0,2	86,2	137,7
14	-1	-1	-1	-1	4,5	0,3	0,2	21,6	16,7
15	-1	1	1	-1	4,5	2,2	1,6	87,6	124,9
16	1	-1	-1	1	5,4	0,2	0,4	17,7	21,3
17	1	1	1	1	5,7	2,0	2,2	82,6	77,9
18*	0	0	0	0	5,4	1,0	2,0	64,1	119,0
19	-1	-1	1	1	4,5	1,7	0,2	76,5	179,5
20	-1	1	1	-1	4,5	2,1	2,8	86,5	84,2
21	-1	-1	-1	-1	4,5	0,4	0,2	21,2	24,8
22	-1	1	-1	1	4,3	0,4	0,2	14,7	19,1
23	1	-1	-1	1	5,4	0,2	0,1	18,9	24,6
24	1	1	1	1	5,7	1,9	2,3	84,2	75,2
25	1	1	-1	-1	5,6	0,2	0,1	16,7	27,5
26*	0	0	0	0	5,5	1,0	1,3	65,5	132,6
27	1	1	1	1	5,7	2,0	2,4	85,2	75,2

X<sub>1</sub> (pH<sub>inicial</sub>); X<sub>2</sub> (Temperatura (°C)); X<sub>3</sub> (TST (g/L)); X<sub>4</sub> (tempo (h)).

AT<sub>f</sub> (Concentração final de Açúcares Totais).

\*Pontos Centrais



### 5.2.1 Produção de levana com o meio sintético

As estimativas dos efeitos, o nível de significância ( $p$ ), as correlações entre as variáveis e os coeficientes de regressão foram calculados pelo modelo estatístico proposto conforme demonstrado na Tabela 11 para a resposta Levana ( $Y_1$ ).

Tabela 11 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística ( $p$ ) para a resposta levana ( $Y_1$ ), utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo.

Variáveis	$Y_1$		
	Efeitos	Coefficientes	$p$
Intercepto	5,754	4,473	0,000
pH	-0,549	-0,275	0,537
T*	-1,81	-0,904	0,048
[ ] Sacarose*	2,017	1,008	0,033
tempo	0,542	0,271	0,542
pH T	-0,611	-0,306	0,493
pH [ ] Sacarose	-0,413	-0,207	0,642
pH tempo	-1,472	-0,736	0,109

\*variável que influenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que, para a produção de levana ( $Y_1$ ), as variáveis independentes: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de sacarose foram significativas ( $p < 0,05$ ); e apenas as variáveis concentração de sacarose e tempo influenciaram de maneira positiva (Coeficiente  $> 0$ ), tornando-se os principais fatores para a obtenção de melhores rendimentos do produto desejado na fermentação por *Z. mobilis* CCT 4494.

A produção de levana por *Z. mobilis* ocorre quando esta bactéria cresce em altas concentrações de sacarose. Segundo Bekers e colaboradores (2002) para a produção de levana a concentração de sacarose do meio de fermentação e a temperatura do processo fermentativo são os dois fatores mais importantes que regulam a atividade da levanasacarase e consequentemente a síntese de levana.

A maior produção de levana (9,91 mg/mL) foi obtida nas condições de cultivo do ensaio 13: pH 4,5; temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ , concentração de sacarose 250 g/L e tempo de fermentação de 72 h (Tabela 9). Já o maior rendimento (20,20%) foi o do ensaio 14, no pH

4,5, temperatura 25°C, 24 h de fermentação e concentração de sacarose de 50 g/L. E a maior produtividade (0,35g/L.h) foi nas condições: pH 6,5, temperatura de 25°C, 24 h de fermentação e concentração de sacarose de 250 g/L (Tabela 12).

Tabela 12 - Coeficiente de rendimento de massa celular, coeficiente de rendimento de levana em relação ao substrato consumido e produtividade total de levana, na fermentação do meio sintético.

Ensaio	$Y_{x/s}$ (%)	$Y_{L/s}$ (%)	$P_L$ (g/L.h)
1	1,55	5,68	0,03
2	1,16	5,19	0,17
3	2,37	12,17	0,06
4	1,03	8,72	0,32
5	2,01	16,09	0,08
6	1,65	2,17	0,04
7	2,75	10,00	0,12
8	5,52	4,97	0,08
9	1,09	10,23	0,35
10	5,27	12,50	0,19
11	0,75	9,11	0,12
12	1,95	9,74	0,34
13	0,53	8,41	0,14
14	4,04	20,20	0,17
15	2,10	4,21	0,14
16	2,50	8,93	0,04
17	0,94	3,55	0,07
18	1,54	6,18	0,10
19	2,38	6,02	0,06
20	2,24	1,46	0,06
21	2,39	7,18	0,10
22	1,88	12,26	0,05
23	1,66	15,83	0,08
24	1,33	1,44	0,02
25	4,87	4,33	0,07
26	1,48	5,82	0,11
27	1,19	2,81	0,05

$Y_{x/s}$  (coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido);

$Y_{L/s}$  (coeficiente de rendimento do produto (Levana) em relação ao substrato consumido) e

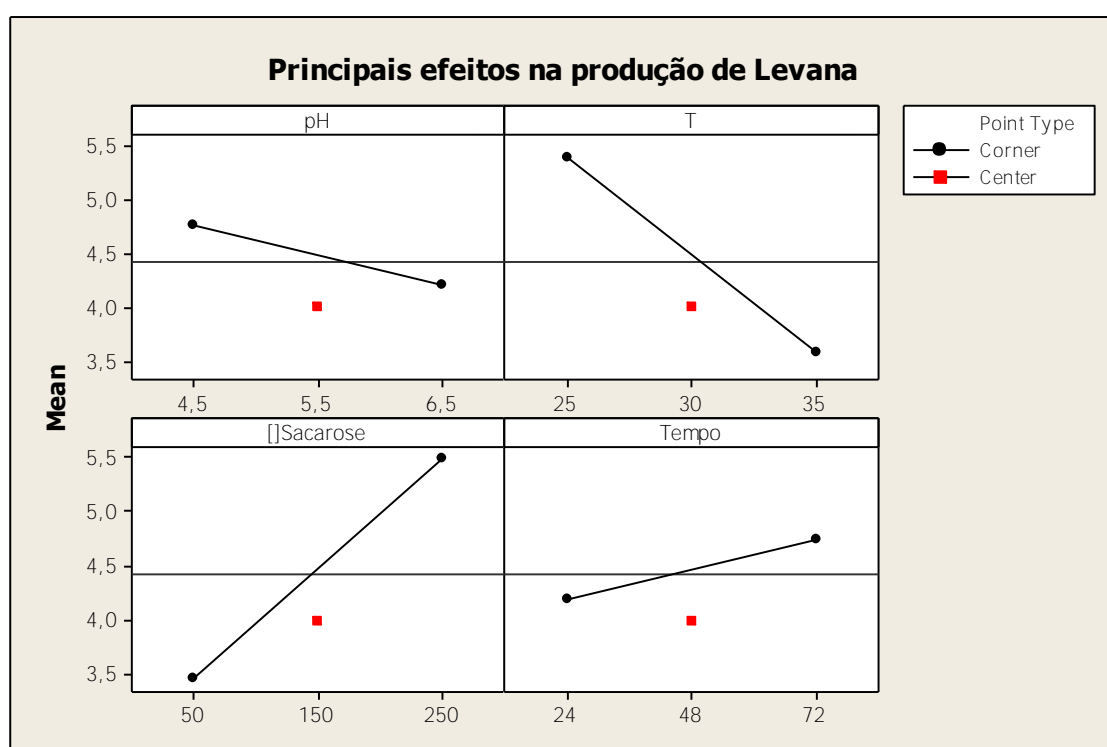
$P_L$  (produtividade).

Oliveira (2005), em seu trabalho visando otimizar a produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821 utilizando meio de fermentação de sacarose, variando as concentrações de sacarose em 150, 250 e 350 g/L e tempo de fermentação em 12, 18 e 24 h, a 25°C, atingiu a maior produção (21,7 mg/mL) com concentração de sacarose de 250 g/L e 24 h de fermentação. O autor observou nesse mesmo trabalho que um aumento no tempo de

fermentação provocou um aumento na produção de levana em todas as concentrações de sacarose testadas.

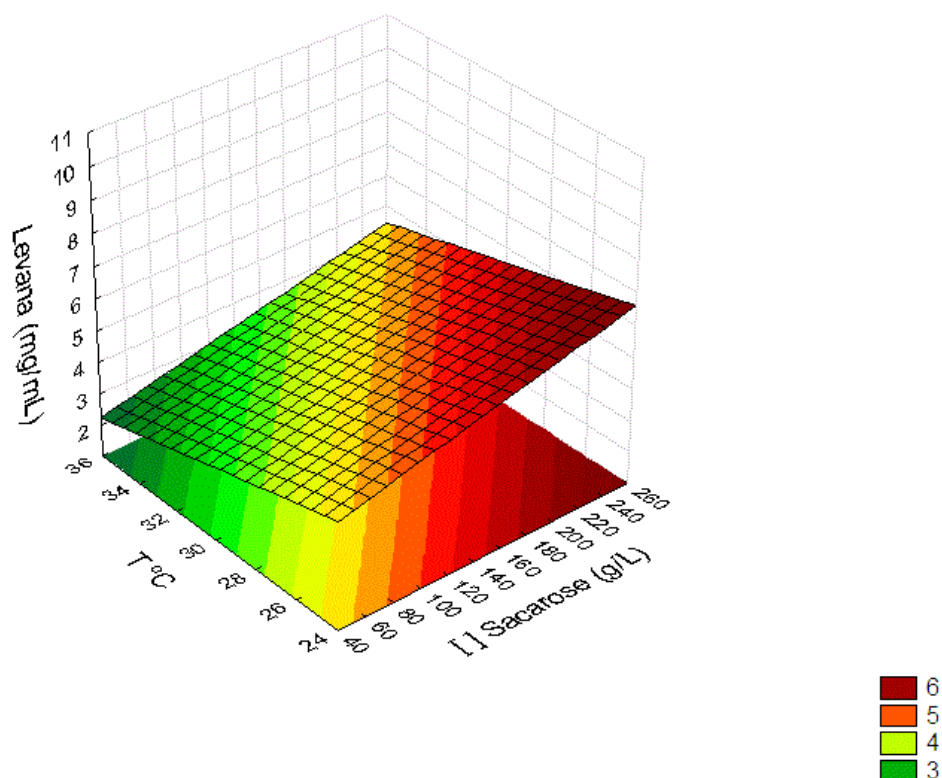
Na Figura 7 são apresentados os principais efeitos na produção de levana, cada efeito é demonstrado separadamente. As variáveis que foram significativas ( $p < 0,05$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de sacarose, apresentam uma variação extrema, confirmando sua importância no processo de fermentação para produção de levana. Também pode ser observado nessa figura a influência negativa (Coeficiente  $< 0$ ) das variáveis pH e temperatura.

Figura 7 - Principais efeitos na produção de levana.



Analisando a superfície de resposta para levana ( $Y_1$ ) ao redor da temperatura de fermentação e da concentração sacarose (Figura 8) dentro das condições operacionais empregadas, os melhores resultados obtidos para levana ocorreram nas maiores concentrações de sacarose. A produção de levana aumentou proporcionalmente ao aumento da fonte de carbono, obtendo maior produtividade ( $0,35\text{g/L.h}$ ) com  $250\text{g/L}$  de sacarose. O fator temperatura atuou de forma inversa à formação do produto, com decréscimo de produção de levana proporcional ao aumento da temperatura.

Figura 8 - Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da temperatura (°C) e concentração de sacarose (g/L) ( $Levana = -0,181*y+0,010*x +8,335$ ).



A massa do biopolímero reduziu aproximadamente 34% quando a temperatura de fermentação passou de 25°C para 35°C. Observando a Tabela 9, nota-se que a maior produção de levana (9,91 mg/mL) foi obtida na temperatura de 25°C e a menor (1,38 mg/mL), na temperatura de 35°C. E pelos valores de produtividade da Tabela 12, a maior produtividade (0,35 g/L.h) foi em temperatura baixa, 25°C, e a 35° foi encontrada a menor produtividade (0,02 g/L.h).

Conforme relatado por Crittenden e Doelle (1994), a temperatura é um fator muito importante na produção de levana devido à baixa estabilidade térmica da enzima levanasacarase, temperaturas de 35°C provocam uma perda irreversível na atividade dessa enzima.

Outros autores, empregando diferentes cepas de *Z. mobilis* verificaram que a produção de levana foi bastante diversificada. Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999a) testaram concentrações diferentes de sacarose (50 – 250 g/L) e alcançaram valores de 12,6 g/L com *Z. mobilis* B-4286 em 150 g/L de sacarose, a 25°C e 16 h de fermentação. Eles observaram também que nas temperaturas entre 35°C e 40°C não ocorreu produção de levana.

Porém, houve pouca alteração em relação ao tempo de fermentação, pode ser observado na Tabela 9 que a maior produção de levana (9,91 mg/mL) e a menor (1,38 mg/mL), ambas ocorreram com 72 h de fermentação. Com relação aos valores de produtividade, a maior produtividade (0,35 g/L.h) foi encontrada nos menores tempos de fermentação e a menor (0,02 g/L.h) foi determinada em 72 h de fermentação.

Masucci, Buzato e Celligoi (2003) realizaram um estudo cinético durante 24 h de fermentação, empregando diferentes valores de concentração de sacarose (15-35%) e temperatura (20 - 35°C), sendo que a maior produção de levana foi de 18,45 g/L com produtividade de 1,16g/L.h<sup>-1</sup>, em meio de sacarose a 25% após 16 h de fermentação a 25°C. Com a mesma concentração de sacarose (25%) e mesma temperatura (25°C), a produção e produtividade máximas de levana encontradas nesta dissertação foram menores, 9,91 mg/mL e 0,35 g/L.h, respectivamente.

De acordo com Oliveira (2005), um aumento do tempo de fermentação leva a um aumento no consumo de açúcares presentes no meio e a um aumento da produção de levana, entretanto esta não foi uma variável significativa na produção do polissacarídeo neste trabalho.

Analisando a Tabela 12, pode ser verificado que o maior rendimento foi obtido com 24 h de fermentação (20,20%), em meio sintético com adição de 5 % de sacarose. Esse rendimento foi inferior aos encontrados por Ernandes e Garcia-Cruz (2009b), os quais observaram que o biopolímero foi sintetizado em maior quantidade após 24 h de fermentação (31,6% de rendimento) em meio sintético com a adição de 20% de sacarose como fonte de carbono. Depois desse período, houve acréscimo no rendimento de levana de 3,5; 8,8 e 10,7 pontos percentuais, com 48; 72 e 96 h de fermentação, contrário a esse trabalho que com o aumento do tempo de fermentação, teve menores rendimentos de levana.

Em relação ao pH, Tano e Buzato (2002) relataram que existe uma relação direta entre a taxa de formação de levana e o seu valor. Porém neste trabalho esta variável estudada não apresentou efeito significativo sobre a sua produção. Pode ser observado na Figura 7 que na faixa do pH inicial do meio de fermentação (4,5 – 6,5), as concentrações de levana produzidas ficaram em torno de 3,0 a 5,0 mg/mL. Vale ressaltar que a faixa de pH testada neste trabalho está entre os valores recomendados de pH ótimo para produção de levana. Doelle e colaboradores (1993) relataram que o pH ótimo para produção de levana é 5,0, com pouca formação em pH 6,5 quando a taxa de hidrólise da sacarose é alta.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999b) avaliaram o efeito do pH inicial do meio de fermentação na produção de levana por *Z. mobilis* B-4286, esses autores testaram quatro valores de pH (4,0; 5,0; 6,0 e 7,0). A concentração máxima de levana produzida (14.5 g/l) foi em pH 5,0 a 25° C.

### 5.2.2 Produção de biomassa celular com o meio sintético

Para produção de biomassa celular, as estimativas dos efeitos, o nível de significância ( $p$ ), as correlações entre as variáveis e os coeficientes de regressão foram calculados pelo modelo estatístico proposto conforme demonstrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística ( $p$ ) para a resposta biomassa, utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo.

Variáveis	Biomassa		
	Efeitos	Coefficientes	P
Intercepto	1,2002	5,973	0,000
pH	0,1053	0,0527	0,489
T*	0,6241	0,3121	0,000
[ ]Sacarose*	0,3139	0,1570	0,048
tempo*	-0,4648	-0,2324	0,005
pH T*	0,2368	0,1184	0,028
pH [ ]Sacarose*	-0,4778	-0,2389	0,000
pH tempo	0,1267	0,0634	0,218

\*variável que influenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Tabela 13 mostram que, para o crescimento de *Z. mobilis* CCT 4494, as variáveis independentes: temperatura (°C), concentração de sacarose e tempo, e as interações pH e temperatura e pH e concentração de sacarose foram significativas ( $p < 0,05$ ).

O pH foi a única variável independente que não influenciou no crescimento da bactéria. Entretanto a interação do pH e temperatura e pH e tempo ocasionaram efeito positivo sobre a produção de biomassa (coeficiente > 0), e somente a interação pH e concentração de sacarose causaram efeito negativo para o crescimento da bactéria.

Dadds e Martin (1973) consideram que o desenvolvimento total do micro-organismo depende da natureza dos fatores limitantes, e que o pH é um dos fatores mais comuns juntamente com a exaustão dos nutrientes e do acúmulo de produtos tóxicos. Dentro de certos limites (6,5 a 8,0), o pH tem pouca influência na taxa de desenvolvimento, mas pode influenciar o número total de bactérias. No entanto, valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5) podem levar o micro-organismo rapidamente à morte.

Com relação às variáveis temperatura e concentração de sacarose, o crescimento da biomassa foi proporcional ao aumento dessas variáveis, a maior concentração de células 2,36 mg/mL foi determinada a 35°C e concentração máxima de sacarose de 250 g/L. Esses valores estão de acordo com os citados na literatura, segundo Swings e De Ley (1977), as condições ideais para o crescimento desta bactéria são intervalos de temperatura de 30 a 36°C.

Pode ser observado também que a maior concentração de células (2,3 mg/mL), está relacionada a uma das menores produções do biopolímero levana (1,5 mg/mL), como foi discutido anteriormente, a temperatura de 35°C, temperatura ótima de crescimento celular, não favorece a ação da enzima levanasacarase, responsável pela síntese de levana.

E com relação ao tempo, o crescimento da biomassa celular foi maior nas primeiras horas de fermentação. A maior concentração de células 2,3 g/L foi determinada em 24 h de fermentação. A redução no crescimento com o tempo de fermentação pode ser explicada devido ao baixo pH final, tornando o meio impróprio ao crescimento da *Z. mobilis*. A bactéria pode fermentar pequena quantidade de outros subprodutos como lactato, acetaldeído, ácido acético e outros, sendo compostos que podem atuar na diminuição do pH do meio. Segundo os autores Swings e De Ley (1977), não há crescimento de *Zymomonas* na faixa de pH de 2,5 a 3,4, e as vezes tem crescimento na faixa de 3,5 a 3,6. E o menor pH final encontrado na fermentação do meio sintético (3,3), está entre a faixa onde não há crescimento.

Como o pH do meio de cultivo não foi controlado ao longo da fermentação houve uma redução com o consumo da fonte de carbono e energia. Analisando os valores do pH final do caldo de fermentação obtidos após o processo fermentativo com o meio sintético, observa-se que o pH final variou na faixa de 3,3 a 4,2 (Tabela 9), sendo os menores valores encontrados ao final de 72 h de fermentação. As duas maiores reduções de pH ocorreram após 72 h de fermentação, o pH variou de 6,5 para 3,4 a 35°C e de 6,5 para 3,5 a 25°C.

Ernandes e Garcia-Cruz (2009b) também obtiveram valores semelhantes, após os processos fermentativos, o pH final determinado no caldo de fermentação variou na faixa de

3,9 a 4,4. Esta redução deve-se à formação de ácidos e, mesmo assim a bactéria continua crescendo, mostrando grande tolerância deste micro-organismo a pH baixo.

### 5.2.3 Produção de etanol com o meio sintético

As estimativas dos efeitos, o nível de significância ( $p$ ), as correlações entre as variáveis e os coeficientes de regressão foram calculados pelo modelo estatístico proposto conforme demonstrado na Tabela 14, para a resposta Etanol ( $Y_2$ ).

Tabela 14 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística ( $p$ ) para a resposta etanol ( $Y_2$ ), utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo.

Variáveis	$Y_2$		
	Efeitos	Coefficientes	$p$
Intercepto	61,527	61,527	0,000
pH	0,874	0,437	0,838
T	-4,029	-2,014	0,352
[ ]Sacarose*	55,939	27,969	0,000
tempo	-0,160	-0,080	0,970
pH T	-1,539	-0,769	0,719
pH [ ]Sacarose	-2,020	-1,010	0,637
pH tempo	3,139	1,569	0,466

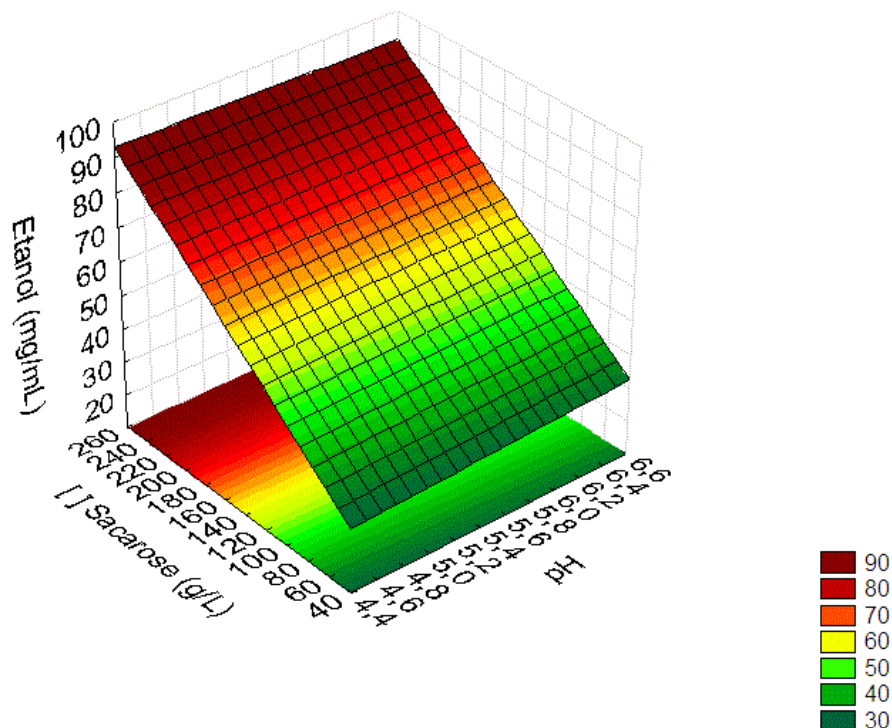
\*variável que influenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Tabela 14 mostram que, dentro das condições operacionais avaliadas, somente a variável independente concentração de sacarose foi significativa ( $p < 0,05$ ) para a produção de etanol.

Analisando a superfície de resposta ao redor da variável significativa concentração de sacarose e pH inicial (Figura 9), pode ser verificado que a produção de etanol foi proporcional ao aumento da concentração de sacarose. E em relação ao pH, a variação de 4,5 a 6,5 não apresentou significância sobre a resposta. Também, pode ser verificada no gráfico a influência positiva dessas variáveis na síntese do produto.



Figura 9 - Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração de sacarose (g/L) e pH do meio de fermentação (Etanol =  $1,961*x+0,335*y-0,010*x*y+8,842$ ).



O conhecimento do metabolismo celular e das necessidades nutricionais fundamentais das células são fatores importantes para a elaboração de meios de cultura que assegurem a sobrevivência e crescimento das células microbianas e promovam a formação de produtos com interesse biotecnológico (ANDRADE, 2000 apud OLIVEIRA, 2005). De modo geral, na literatura consta que a produção de etanol é favorecida em valores de pH entre 4,5 e 7,0 e que o controle do pH inicial é importante para que se possa maximizar a produção de etanol e reduzir a formação de outros subprodutos, como levana e sorbitol (KANNAN; SANGILYANDI; GUNASEKARAN, 1997).

A maior produção (90,2 mg/mL) e produtividade (3,76 g/L.h) de etanol foram encontradas no ensaio 20, com concentração máxima de sacarose (250 g/L), pH 4,5, temperatura de 35°C em 24 h de fermentação. Ernandes (2009) também encontrou maior produção de etanol na maior concentração de sacarose testada, na fermentação por *Z. mobilis*, com valor máximo de 76,6 mg/mL, com 250 g/L de sacarose comercial, agitação de 200 rpm e 24 h de fermentação.

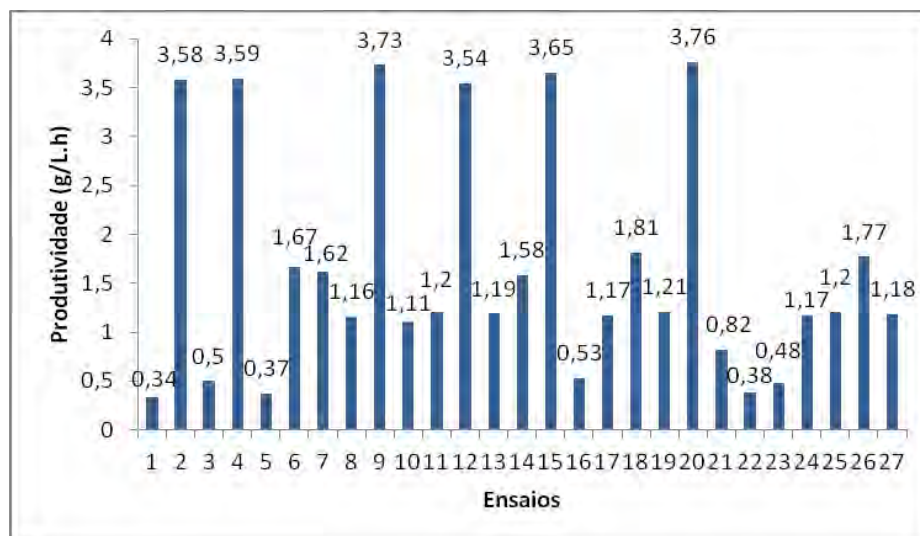
Valores menores foram determinados por Melo et al. (2007), no estudo da influência da temperatura (20, 25 e 30°), de agitação (50, 75 e 100 rpm), concentrações iniciais tanto de extrato de levedura (2,0; 3,5 e 5,0 g/L), quanto de sacarose (150, 200 e 250 g/L) na produção de levana e etanol por *Z. mobilis* ZAG estirpe-12. Para produção de etanol, as melhores condições foram: 150 g/L de sacarose, a 30°C, 5,0 g/L de extrato de levedura e agitação de 50 rpm, com produção de 44.76 g/L de etanol. Os resultados obtidos nesta dissertação foram superiores aos obtidos por esses autores, com a utilização de 150 g/L de sacarose foi determinado praticamente o dobro de etanol, em média 84 mg/mL.

As temperaturas testadas neste trabalho foram na faixa de 25 a 35°C, com maior produção de etanol a 35°C, os níveis escolhidos estão entre os valores citados na literatura. Para Swings e De Ley (1977) as condições ideais para o crescimento desta bactéria são intervalos de temperatura de 30 a 36°C.

O efeito da temperatura também foi avaliado por outros autores, Calazans, Rios e Falcão de Moraes (1990) avaliaram um meio sintético com glicose para produção de etanol por *Z. mobilis* ZAP, na faixa de temperatura entre 30°C a 38°C, a produção de etanol permaneceu relativamente inalterada, mostrando uma variação elevada entre 25-30°C. E em temperatura superior a 35°C o crescimento celular foi reduzido.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 10 calculou-se os valores de produtividade em etanol, relacionando a velocidade de formação do produto pelo tempo de fermentação, conforme Equação 3 (Apêndice F). Na Figura 10 pode ser observado que os maiores valores de produtividade em etanol foram obtidos nas fermentações utilizando concentração máxima de sacarose (250 g/L). As produtividades abaixo de 0,53 g/L.h foram obtidas nas concentrações mínimas de sacarose testadas, 50 g/L. Já com relação ao tempo, o nível menor (24 h), foi o melhor.

Figura 10 - Produtividade de etanol na fermentação do meio sintético por *Z. mobilis*.



Kannan, Sangiliyandi e Gunasekaran (1997) estudaram a influência da enzima sacarase intra e extracelular de *Z. mobilis* na produção de etanol e de formação de produtos secundários. As fermentações foram conduzidas por 18 h a 30°C, com concentração de sacarose de 100 g/L, com a bactéria *Z. mobilis* B-806 e dois mutantes *Z. mobilis* LS1A e *Z. mobilis* LS1. As produtividades encontradas para cada bactéria utilizada foram, 2,08 g/L.h com *Z. mobilis* B-806, 2,45 g/L.h com a mutante LS1A e 2,45 g/L.h com a mutante LS1. Esses autores encontraram resultados melhores que os desta dissertação. Uma justificativa para esse aumento de produção é a cepa utilizada por esses autores, com capacidade de consumir toda a sacarose presente no meio de fermentação e não desviar o metabolismo para formação de subprodutos, como levana e sorbitol.

Valores semelhantes foram obtidos por Santana et al. (2009), na fermentação de glicose, com células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*, encontraram produtividade de 3,76 g/L.h, com concentração máxima de glicose de 15%, pH inicial 4,5 a 32°C. Quando foi testada concentração menor de glicose, 3%, a produtividade encontrada foi menor, 1,65 g/L.h.

#### 5.2.4 Produção de levana com caldo hidrolisado de cascas de banana

Diversos autores têm dado ênfase à produção de metabólitos biotecnológicos utilizando fontes alternativas de substratos procurando reduzir custos de produção e impactos ambientais (ERNANDES, 2009; OLIVEIRA, 2005; BORSARI et al., 2006). Caldo de cana-

de-açúcar (HAN; WATSON, 1992), melão de cana-de-açúcar (CAZETTA et al., 2005), açúcar de beterraba (BEKERS et al., 2001), soro de leite (MACEDO et al., 2002) e farelo de trigo (JAVAD; BAZZAZ; ZOHREH, 2003), foram utilizados na tentativa de reduzir os custos de produção, utilizando substratos de fontes alternativas. Neste trabalho foram utilizadas cascas de banana como substrato alternativo para produção de levana.

Para a resposta levana ( $Y_1$ ), as estimativas dos efeitos, o nível de significância ( $p$ ), as correlações entre as variáveis e os coeficientes de regressão foram calculados pelo modelo estatístico proposto conforme demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística ( $p$ ) para a resposta levana ( $Y_1$ ), utilizando o caldo hidrolisado de cascas de banana, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo.

Variáveis	$Y_1$		
	Efeitos	Coefficientes	$p$
Intercepto	0,791	0,791	0,000
pH	0,407	0,204	0,059
T*	0,640	0,320	0,005
TST*	1,312	0,656	0,000
Tempo	-0,222	-0,111	0,287
pH T	-0,205	-0,102	0,324
pH TST*	0,444	0,222	0,041
pH tempo*	0,673	0,336	0,003

\*variável que influenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que, para a produção de levana ( $Y_1$ ), as variáveis independentes, Temperatura e Teor de Sólidos Totais, e as interações pH e Teor de Sólidos Totais e pH e tempo foram significativas ( $p < 0,05$ ); e apenas a variável tempo e a interação pH e Temperatura influenciaram de maneira negativa ( $Coefficiente < 0$ ), sobre a produção do biopolímero.

A maior produção de levana (2,8 mg/mL) foi obtida nas condições de cultivo do ensaio 20: pH 4,5; temperatura 35°C, Teor de Sólidos Totais 250 g/L e tempo de fermentação de 24 h (Tabela 10). Analisando a Tabela 16, pode ser verificado que o maior rendimento (7,47%) foi o do ensaio 26, com pH 5,5, temperatura 30°C, 48 h de fermentação e

concentração do substrato de 150 g/L. E a maior produtividade (0,30g/L.h) foi nas condições: pH 6,5, temperatura de 25°C, 24 h de fermentação e Teor de Sólidos Totais de 250 g/L.

Tabela 16 – Coeficiente de rendimento de massa celular, coeficiente de rendimento de levana em relação ao substrato consumido e produtividade total de levana, na fermentação do caldo hidrolisado de cascas de banana.

Ensaio	$Y_{x/s}$ (%)	$Y_{L/s}$ (%)	$P_L$ (g/L.h)
1	1,11	0,26	0,00
2	0,08	1,59	0,11
3	0,53	0,48	0,00
4	0,06	0,40	0,03
5	1,74	0,41	0,00
6	3,68	2,99	0,02
7	1,43	0,38	0,01
8	0,81	0,34	0,00
9	0,09	0,58	0,30
10	0,78	0,34	0,01
11	1,30	0,08	0,00
12	2,29	1,21	0,05
13	2,08	0,17	0,00
14	1,05	0,60	0,01
15	1,77	1,27	0,07
16	0,79	1,39	0,00
17	1,17	1,28	0,03
18	3,09	6,45	0,04
19	2,39	0,28	0,00
20	1,24	1,68	0,12
21	1,53	0,79	0,01
22	1,35	0,64	0,00
23	0,85	0,39	0,00
24	1,08	1,31	0,03
25	1,03	0,44	0,01
26	5,46	7,47	0,03
27	1,16	1,37	0,03

$Y_{x/s}$  (coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido);

$Y_{L/s}$  (coeficiente de rendimento do produto (Levana) em relação ao substrato consumido) e

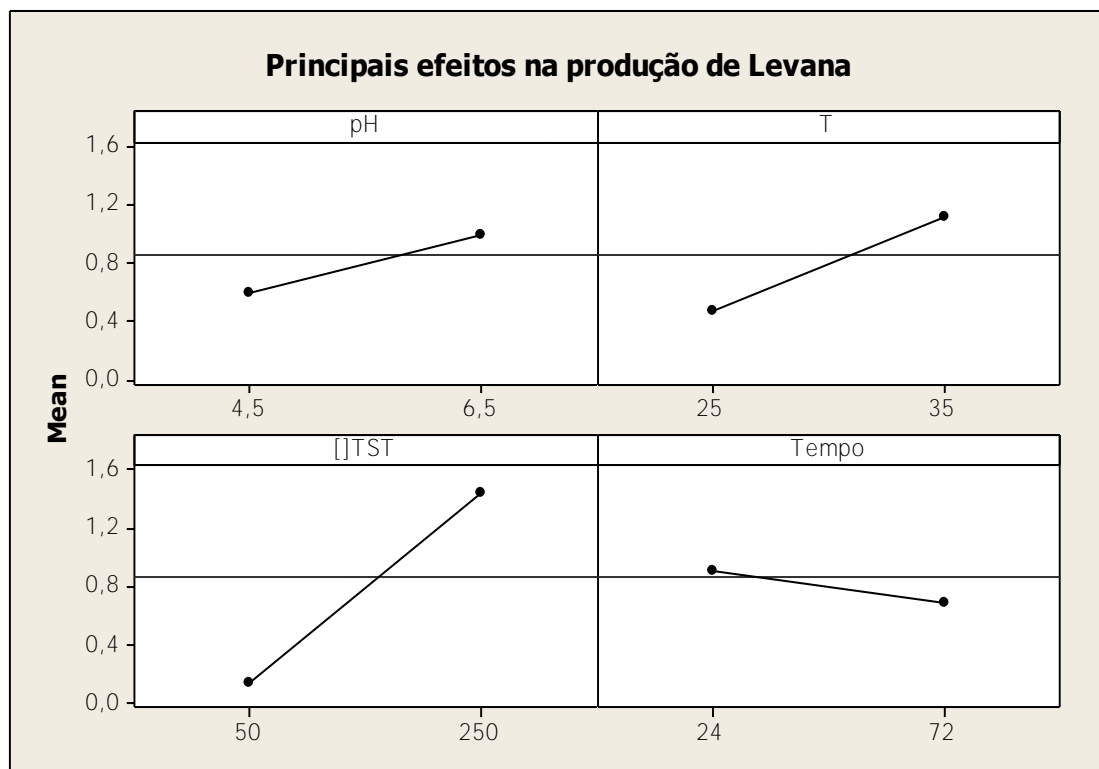
$P_L$  (produtividade).

Outros autores testaram substratos alternativos para a produção de levana, no trabalho de Ernandes (2009), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas, também obteve valores baixos de levana (0,1 a 0,5 mg/mL) em concentrações inferiores a 180,0 g/L do substrato.

No trabalho de Oliveira (2005) foi avaliada a produção de levana por *Z. mobilis* utilizando melaço de cana-de-açúcar (fonte de carbono complexa) na concentração de açúcar fixada em 250 g/L e tempo de fermentação de 24 h, ele também encontrou valores baixos de levana na faixa de 0,395 a 5,234 g/L. Esse autor concluiu que o melaço inibiu os parâmetros observados por ele.

Na Figura 11 são apresentados os principais efeitos na produção de levana, cada efeito é demonstrado separadamente. O tempo teve efeito negativo na produção de levana e as variáveis que foram significativas ( $p < 0,05$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e Teor de Sólidos Totais, apresentam uma variação extrema, confirmando sua importância no processo de fermentação para produção de levana.

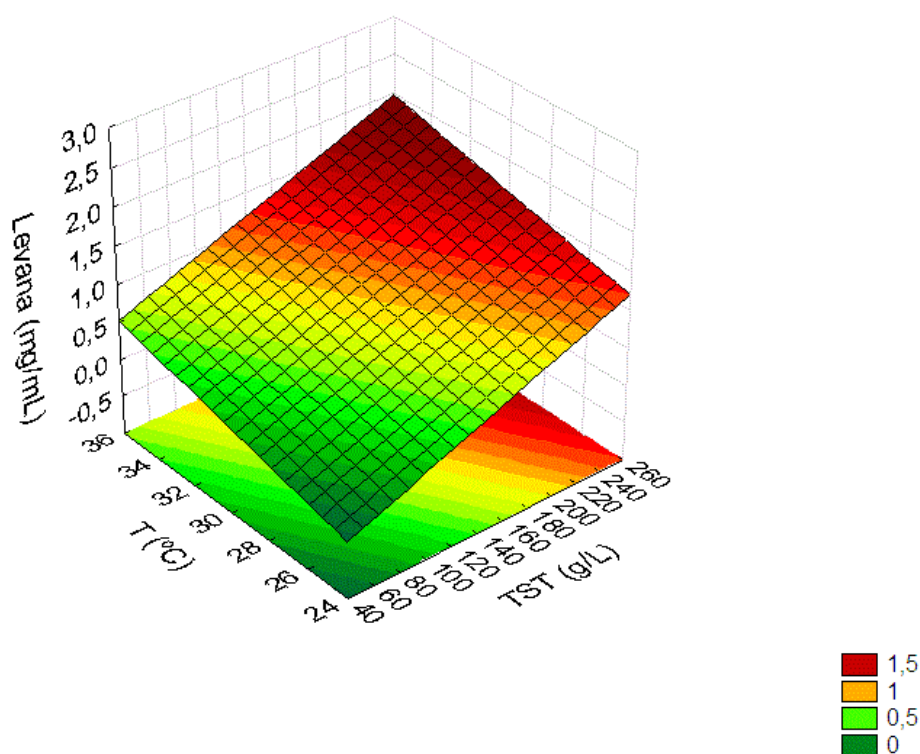
Figura 11 - Principais efeitos na produção de levana.



Analisando a superfície de resposta para produção de levana ao redor das variáveis significativas temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e Teor de Sólidos Totais (g/L) (Figura 12), pode ser observado que a síntese do polissacarídeo aumenta proporcionalmente ao aumento das variáveis testadas. A maior massa de levana (2,8 mg/mL) foi sintetizada na maior concentração de sólidos totais e maior temperatura.

Essa concentração foi próxima à obtida por Ernandes (2009), que estudou as fontes de carbono, melão de cana-de-açúcar de alta qualidade (HTM) e melão de cana-de-açúcar para produção de levana por *Z. mobilis*, a concentração do exopolissacarídeo obtido foi de 2,83 mg/mL e de 1,96 mg/mL respectivamente.

Figura 12 - Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da temperatura (°C) e teor de sólidos totais (g/L) do meio de fermentação (Levana =  $0,006*x+0,064*y-2,043$ ).



Oliveira (2005), em sua pesquisa com fontes de carboidratos regionais e de baixo custo, encontrou a melhor produção, 5,23 g/L de levana utilizando melão de cana-de-açúcar, com concentração fixa de 250 g/L e 24 h de fermentação.

Sutherland (1999) relatou que vários fatores podem influenciar na síntese do produto desejado e, dependendo das condições de fermentação empregadas no processo, como por exemplo, a fonte de carbono, o rendimento do biopolímero poderá reduzir ou aumentar. O relato citado pôde ser confirmado nesta pesquisa, pois a bactéria *Z. mobilis* apresentou um comportamento diferenciado para cada meio testado no processo fermentativo, o que ocasionou uma variação no rendimento de levana.

Comparando o meio sintético com o meio contendo o caldo hidrolisado de casca de banana na produção de levana, o meio sintético proporcionou maior rendimento (20,20%), que o encontrado com o meio das cascas hidrolisadas (7,47%). De acordo com Mohapatra, Mishra e Sutar (2010), o conteúdo de sacarose da casca é de aproximadamente 2,6g/100g. Isso explica o baixo rendimento na síntese do biopolímero pois, mesmo concentrando o caldo, este não alcançou valores altos de sacarose, além de que esse conteúdo pode não estar totalmente disponível para a bactéria.

### 5.2.5 Produção de biomassa celular com caldo hidrolisado de cascas de banana

Para a biomassa, as estimativas dos efeitos, o nível de significância ( $p$ ), as correlações entre as variáveis e os coeficientes de regressão foram calculados pelo modelo estatístico proposto, conforme demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17- Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística ( $p$ ) para a resposta biomassa, utilizando o caldo hidrolisado de cascas de banana fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo.

Variáveis	Biomassa		
	Efeitos	Coefficientes	$p$
Intercepto	0,935	1,005	0,000
pH*	-0,568	-0,284	0,000
T*	0,554	0,277	0,000
TST*	1,229	0,614	0,000
tempo*	0,396	0,198	0,000
pH T*	0,376	0,188	0,000
pH TST*	-0,400	-0,200	0,000
pH tempo*	0,523	0,261	0,000

\*variável que influenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Tabela 17 mostram que, para o crescimento de *Z. mobilis* CCT 4494, as variáveis independentes: pH inicial, temperatura, Teor de Sólidos Totais e tempo, e as interações pH e temperatura e pH e Teor de Sólidos Totais e pH e tempo foram significativas ( $p < 0,05$ ). E a variável pH e a interação pH e Teor de Sólidos Totais apresentaram efeito negativo para crescimento da bactéria (coeficiente  $< 0$ ).



A maior massa celular foi de 2,2 mg/mL (Tabela 10), valor muito próximo a massa formada no meio sintético 2,3 mg/mL (Tabela 9), e foram determinadas na concentração máxima de substrato testado (250g/L). É importante salientar que *Z. mobilis* CCT 4494 apresenta alta tolerância às elevadas concentrações de substrato, devido à sua elevada capacidade de regulação osmótica e ao eficiente sistema de transporte de glicose (STRUCH et al., 1991).

A maior massa celular encontrada foi igual à observada por Borsari et al. (2006), na avaliação do caldo de cana-de-açúcar como substratos para fermentação por *Z. mobilis*, esses autores observaram que o crescimento celular foi de 2,20 g/L, na concentração de 150 g/L do substrato testado.

O pH é um dos fatores significativo para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle de algumas bactérias contaminantes quanto ao seu efeito sobre o crescimento do micro-organismo, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009).

Nesta pesquisa o pH final do meio de fermentação variou de 4,3 a 6,0 nos meios analisados. Observando o comportamento da bactéria no meio sintético, pode ser verificado que quando o pH inicial do meio estava em 4,5, ao final da fermentação, o pH diminuía até valores mais extremos, as corridas com pH inicial de 4,5; 5,5 e 6,5 tiveram seu pH reduzido para 3,3. Já no meio com caldo hidrolisado de cascas de banana, houve redução nos ensaios cujo pH inicial era 6,5, reduzindo o pH para 5,4 (Tabela 10), para os ensaios com pH inicial de 4,5 e 5,5, quase não apresentou variação.

### **5.2.6 Produção de etanol com o caldo hidrolisado de cascas de banana**

As estimativas dos efeitos, o nível de significância ( $p$ ), as correlações entre as variáveis e os coeficientes de regressão foram calculados pelo modelo estatístico proposto conforme demonstrado na Tabela 18, para a resposta etanol ( $Y_2$ ).

Tabela 18 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística ( $p$ ) para a resposta etanol ( $Y_2$ ), utilizando o caldo hidrolisado de cascas de banana, fermentado por *Z. mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, temperatura, concentração de sacarose e tempo.

Variáveis	$Y_2$		
	Efeitos	Coefficientes	$p$
Intercepto	53,012	53,012	0,000
pH	-2,307	-1,153	0,056
T	0,511	0,255	0,656
TST*	65,492	32,746	0,000
tempo	-0,882	-0,441	0,444
pH T	-0,527	-0,263	0,646
pH TST	0,444	0,222	0,698
pH tempo*	2,645	1,322	0,031

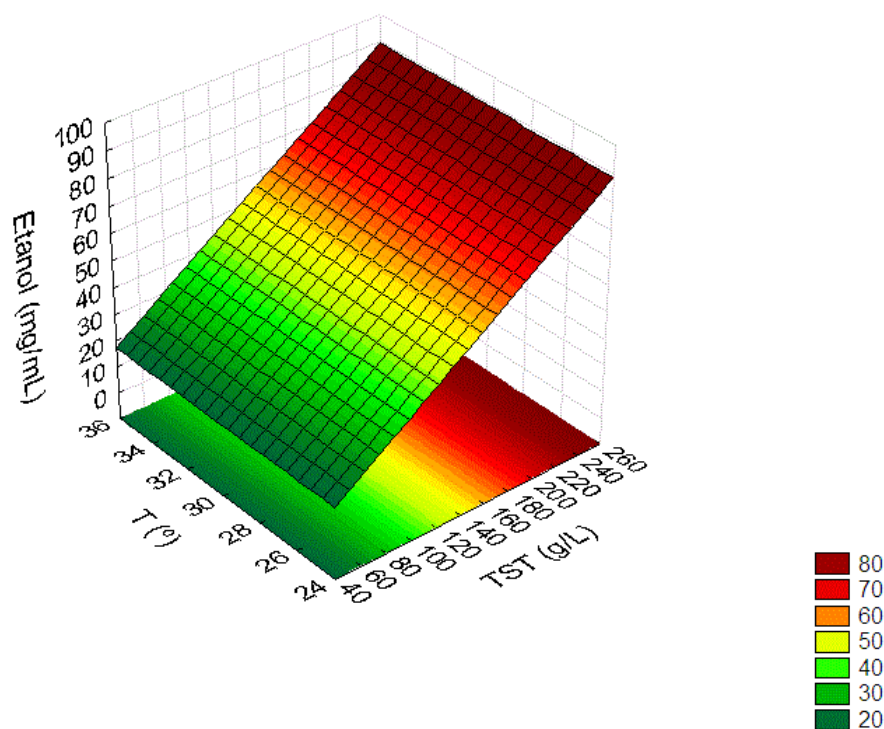
\*variável que influenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Tabela 18 mostram que a variável independente Teor de Sólidos Totais e a interação pH e tempo foram significativas ( $p < 0,05$ ) para a produção de etanol. E as variáveis, temperatura e Teor de Sólidos Totais, e as interações pH e Teor de Sólidos Totais e pH e tempo influenciaram de maneira positiva ( $coeficiente > 0$ ) na produção de etanol.

Observando a Tabela 10, as maiores produções de etanol, 87 mg/mL, foram determinadas nas condições experimentais dos ensaios 15 e 12, respectivamente, com pH inicial de 4,5, teor de sólidos totais de 250 g/L, temperatura de 35°C e 24 h de fermentação. E a menor produção, 14,7 mg/mL de etanol, foi determinada nas condições da corrida 22, pH inicial de 4,5, teor de sólidos totais de 50 g/L, temperatura de 35°C e 72 h de fermentação. Esses resultados são evidenciados na Figura 20.

Pode ser visualizada na Figura 13 a concentração de etanol obtido no meio contendo diferentes teores de sólidos totais em relação à temperatura testada. Observou-se que a síntese do produto (20,0 – 80,0 mg/mL) foi proporcional ao aumento do teor de sólidos totais (50,0 – 250,0 g/L) e que a variação de temperatura (25 – 35°C) não apresentou significância.

Figura 13 - Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor do teor de sólidos totais (g/L) e temperatura (°C) de fermentação (Etanol =  $0,327*x+0,051*y+2,360$ ).



Outros substratos alternativos foram testados para a produção de etanol por vários autores. Letti et al. (2012) avaliaram a produção de etanol utilizando melaço de soja por *Z. mobilis*; foram avaliadas três concentrações de melaço, 100, 200 e 300 g/L, foi obtida maior produção de etanol 29,72 g/L com 200 g/L de melaço e, concluíram também que um aumento na concentração do substrato provocou inibição do metabolismo bacteriano.

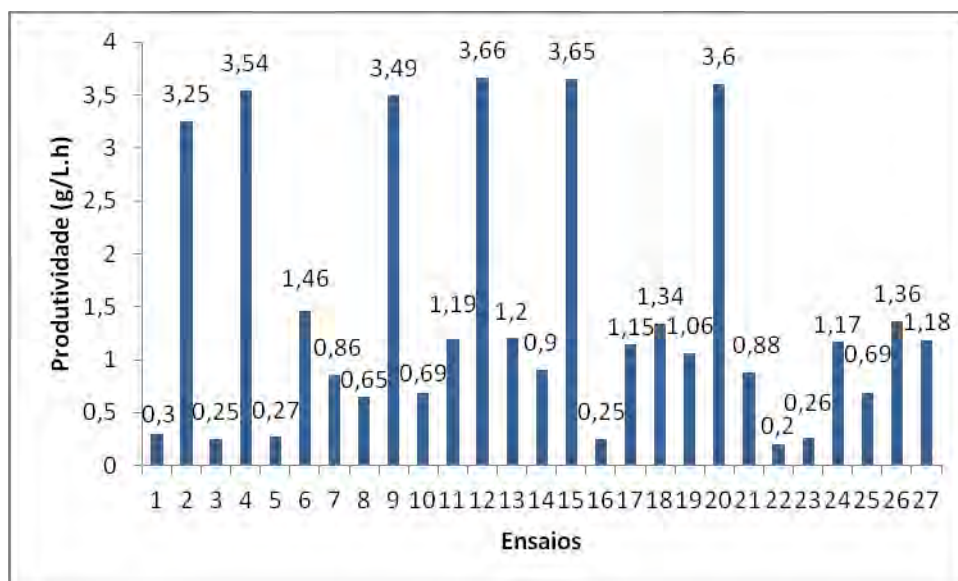
Ernandes, Boscolo e Garcia Cruz (2010) utilizaram caldo de cana-de-açúcar como substrato de baixo custo para produção de etanol, a maior produção de etanol encontrada foi de 8,89 mg/mL, com teor de sólidos totais de 250 g/L, pH inicial de 4,0, por 24 h de fermentação.

Cazetta e colaboradores (2005) estudaram a fermentação do melaço de cana-de-açúcar para produção de etanol por *Z. mobilis*, testando três concentrações de açúcares redutores totais (TRS), 200, 250 e 300 g/L. A melhor condição de fermentação foi 200 g/L de TRS, a 30°C, por 48 h de fermentação, atingindo concentração máxima de 54,83 g/L de etanol. Nas condições de 250 g/L de concentração de melaço e temperatura de 35°C, a produção média de etanol reduziu para 31,15 g/L. Os autores justificaram a diminuição da produção de etanol devido ao aumento da pressão osmótica, dificultando o metabolismo do micro-organismo.

Entretanto, na fermentação do hidrolisado de casca de banana os resultados foram diferentes, pois com o aumento da concentração houve aumento de produção, diversos fatores influenciam no rendimento da fermentação, e um dos principais é a composição do meio.

Analisando a Figura 14, as maiores produtividades, entre 3,25 e 3,66 g/L.h, foram encontradas nas fermentações utilizando a máxima concentração de teor de sólidos totais, 250 g/L. E as menores produtividades foram as das fermentações utilizando concentração de 50 g/L do caldo hidrolisado. A produtividade de etanol utilizando as cascas de banana hidrolisadas foi muito próxima à obtida na fermentação do meio sintético. Comparando os maiores valores, no meio sintético foi de 3,76 g/L.h e no meio com o caldo hidrolisado foi de 3,66 g/L.h. O meio utilizando as cascas de banana pode ser utilizado em substituição a sacarose, como substrato alternativo, podendo reduzir os custos de produção e dando um novo destino aos resíduos da banana. Os valores calculados de produtividade estão no Apêndice F, Tabela 1F.

Figura 14 - Produtividade de etanol na fermentação de caldo hidrolisado de cascas de banana por *Z. mobilis*.



Produtividade alta também foi encontrada por outros pesquisadores, Davis et al. (2006) avaliaram a produção de etanol por *Z. mobilis* ZM4 com resíduo de amido hidrolisado, a produtividade máxima, 3,9 g/L.h, foi determinada na fermentação do caldo hidrolisado com

concentração de 80 g/L, temperatura de 30°C e pH 5,0. Esse valor foi pouco superior ao encontrado na fermentação do caldo hidrolisado de casca de banana.

Camílios Neto et al. (2005) também encontraram produtividade alta em sua pesquisa, na fermentação do melaço de cana-de-açúcar por *Z. mobilis* CP4. Esses autores encontraram produtividade máxima de 2,76 g/L.h, com concentração de 100g/L de melaço. E a menor produtividade encontrada foi de 0,2 g/L.h, no nível mínimo de concentração de melaço testada, 10 g/L.

## 6 CONCLUSÕES

- O pré-tratamento com ácido das cascas secas (120 °C e 15min) forneceu um caldo de cultura contendo 46,6 mg/mL de açúcares totais e 29,5 mg/mL de açúcares redutores.

- A hidrólise enzimática das cascas secas (hidrolisadas com ácido a 120°C e 15 min.) realizada em 24 h a pH 5,5 e temperatura de 50°C, apresentou maior concentração de açúcares totais (72,8 mg/mL).

- A síntese de levana e etanol foi proporcional ao aumento da concentração da fonte de carbono presente nos meios fermentativos (meio sintético e meio contendo o caldo hidrolisado de casca de banana). Nas condições operacionais de fermentação utilizadas neste trabalho, o aumento da concentração inicial do substrato, de 50 g/L para 250 g/L conduziu a um incremento na produção de etanol e levana.

- As melhores condições para produção máxima de levana (9,9 mg/mL) foram alcançadas utilizando meio sintético com pH 4,5, temperatura 25°C, concentração de sacarose 250 g/L e tempo de fermentação de 72 h.

- Na fermentação do caldo hidrolisado de casca de banana a maior produção de levana (2,8 mg/mL) foi obtida com pH 4,5, temperatura 35°C, Teor de Sólidos Totais 250 g/L e tempo de fermentação de 24 h.

- As cascas de banana hidrolisadas não são indicadas para produção de levana, fazem-se necessários novos estudos para a utilização desse substrato de forma a aumentar a concentração do polissacarídeo.

- As maiores produções de etanol, tanto do meio sintético (90,2 mg/mL), quanto do meio com o caldo de casca de banana (87,7 mg/mL) foram encontradas com as mesmas condições, concentração máxima de sacarose ou teor de sólidos totais (250 g/L), pH 4,5, temperatura de 35°C em 24 h de fermentação.

- As cascas de banana podem ser utilizadas como substrato alternativo na produção de etanol, apresentando bons resultados na formação do produto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-61, 2010.
- ALZATE, C. A. C.; TORO, O. J. S. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass, **Energy**, v. 31, n. 13, p. 2447-2459, 2006.
- AMMAR, Y. B. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p.111-119, 2002.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 214-217, 1999a.
- ANANTHALAKSHMY, V. K; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian archives of biology technology**, v. 42, n. 3, 1999b.
- ANDRADE, I. D. Monitorização de um processo de fermentação alcoólica em contínuo. Universidade de Coimbra – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Departamento de Engenharia Química, 2000 apud OLIVEIRA, M. R. **Avaliação estatística da produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 utilizando fontes de carboidratos regionais e de baixo custo**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.
- BEKERS, M. et al. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 701-706, 2002.
- BEKERS, M. et al. Sugar beet juice fermentation by *Zymomonas mobilis* attached to stainless steel wire spheres, **Acta Biotechnologica**, v. 21, p. 89–96, 2001.
- BERGERON, L. J.; MOROU-BERMUDEZ, E.; BURNE, R. A. Characterization of the Fructosyltransferase Gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3649-3654, 2000.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004.
- BORSARI, R. R. J. et al. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 604-609, 2006.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley, 1978.

CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; FALCÃO DE MORAIS, J. O. Efeito da concentração de glicose, do pH inicial e da temperatura na fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis* ZAP. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, 439-455, 1990.

CAMILIOS NETO, D. et al. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melão de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, v. 26, p. 17-22, 2005.

CAMPO, I. D. et al. Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production, **Industrial Crops and Products**, v. 24, p. 214–221, 2006.

CASTELLAN, G. **Fundamento de Físico-química**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos S.A, 1999.

CAZETTA, M. L. et al. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses, **Process Biochemistry**, v. 40, p. 747–751, 2005.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1-9, p. 5-37, 2000.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total abthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. **Journal Food Chemistry and Toxicology**. v. 69, p. 67-72, 2004.

CONSIDINE, D. M. **Chemical and process technology encyclopedia**. New York: McGraw-Hill, 1974 apud CARVALHO, G. B. M. de. **Utilização de carvão ativo, resinas e terra diatomácea para o tratamento do hidrolisado de eucalipto na produção biotecnológica de xilitol**. 2005. 110f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

CRITTENDEN, R.G. E DOELLE, H.W. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). **Applied Microbiology Biotechnology**, v.41, p. 302-308, 1994.

DADDS, M. J.; MARTIN, P. A. The genus *Zymomonas*: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, n. 5, p. 386-391, 1973.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. S. Classificação botânica, origem e evolução. In: \_\_\_\_\_. **Banana para exportação: aspectos técnicos da produção**. 2. ed. Brasília: Embrapa/SPI, p. 9-12., 1997.

DAVIS, L. et al. Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 809–814, 2006.

DOELLE, H. W. Kinetic Characteristics and Regulatory Mechanisms of Glucokinase and Fructokinase from *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 241-246, 1982.



DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. *Zymomonas mobilis* – Science an industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 57-98, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EL-ZAWAWY, W. K. et al. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 865–871, 2011.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 2009. 147f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2009.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Ciências Agrárias**, v.26, n.1, 2005.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009a.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 31, n. 1, p. 35-41, 2009b.

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Influência da composição do meio para a produção de etanol, por *Zymomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p. 21-26, 2010.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações industriais. **Revista de Microbiologia**, v. 14, p. 6-10, 1983.

FEIN, J. E. et al. Development of a simple defined medium for continus ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 1-6, 1983.

FRANDEN, M. A.; PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Development of a high-throughput method to evaluate the impact of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates on the growth of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 259–267, 2009.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086-2097, 2008.

HAN, Y. W.; WATSON, M. A. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses, **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 257–260, 1992.

HOLLANDA, J. B.; ERBER, P. **Cana de açúcar: Usando todo seu potencial energético**, São Paulo: NAIPPE/USP, v. 5, p.20, 2007.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/default\\_pdf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/default_pdf.shtm). Acesso em: 10 jan. 2013.

JAVAD, B.; BAZZAZ, B. S. F.; ZOHREH, S. Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 38, p. 267–269, 2003.

KANNAN, T. R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Influence of intra and extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by-product formation. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 661-664, 1997.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEE, W. G.; HUANG, C. T. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATTC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 217-227, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LETTI, L. A. J. et al. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and bioenergy**, v. 44, p. 80-86, 2012.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3061–3068, 2007.

LIMA, J. D.; MENDONÇA, J. C. Fisiologia e manuseio de frutos em pós-colheita. Reunião itinerante de fitossanidade do Instituto Biológico, 13., São Paulo. Anais...São Paulo: Instituto Biotecnológico, 2005, p. 95-101.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66. n. 3, p. 506-577, 2002.

MACEDO, M. G. et al. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate, **International Dairy Journal**, v. 12, p. 419–426, 2002.

MASUCCI, M. M.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. C. Avaliação do tempo, temperatura e concentração de sacarose na produção de levana por *Zymomonas mobilis*. In: Simpósio Nacional de Fermentação, XIV, 2003, Florianópolis, **Trabalhos completos**, Santa Catarina: SINAFERM, 2003, p. 1-4.

MELO, I. R. et al. Application of fractional factorial design to levana production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 1, Mar. 2007.

MENDONÇA, J. C. M. et al. Contribuição ao estudo da fermentação alcoólica em altas concentrações iniciais de sacarose. In: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 8ª, 2009, Uberlândia.

MESQUITA, K. S. et al. Elaboração, Caracterização Química e Avaliação Sensorial de Néctares de Bananas das variedades Prata, Nanica e Marmelo. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n.3, p. 451-455, 2009.

MIASNIKOV, A. N. Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp. L7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, p. 23-28, 1997.

MODING, T., LIDEN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemistry Journal**, v.363, p.769 - 776, 2002.

MOHAPATRA, D.; MISHRA, S.; SUTAR, N. Banana and its by-product utilization: an overview. **Journal of Scientific & Industrial Research**. v. 69, p. 323-329, 2010.

MONSALVE, J. F.; PEREZ, V. I. M.; COLORADO, A. A. R. Producción de etanol a partir de La cáscara de banano y almidón de yuca. **Dyna**, ano 73, n. 150, p. 21-27, 2006.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Optimal Experimental Condition for Hemicellulosic Hydrolyzate Treatment with Activated Charcoal for Xylitol Production. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 134-139, 2004.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v.153, p.375-380, 1944.

NOGUEIRA, L. A. H. **Bioálcool de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**, Banco Nacional de Desenvolvimento e Economia Social- BNDES e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE, Rio de Janeiro, 2008.

OLIVEIRA, M. R. **Avaliação estatística da produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 utilizando fontes de carboidratos regionais e de baixo custo**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

OVANDRO-MARTINEZ, M. et al., Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrate of pasta. **Food Chemistry**, v. 113, p.121-126, 2009.

PARKER et al. Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3519-3525, 1997.

RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas* sp. isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 10, p. 745-748, 1986.

SAHA, C. B. I. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol, **Process Biochemistry**, n°40, p. 3693–3700, 2005.

SANCHES, J. et al. Avaliação de danos mecânicos causados em banana "Nanicão" durante as etapas de beneficiamento, transporte e embalagem". **Engenharia Agrícola**, v. 24, n. 1, Abr. 2004.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANTANA, L. N. S. Estudo cinético da produção de etanol por *saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de sódio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8, 2009, Uberlândia. Anais... Uberlândia, 2009.

SEVERO JR, J. B. **Síntese biocatalítica do sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea por eletrodialise**. 2008. 133f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

SCHELL, D.J. et al. A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 179–188, 2004.

SILVA JÚNIOR, G. S. e. **Respostas biométricas, ecofisiológicas e nutricionais em genótipos diplóides de bananeira (*Musa spp*) submetidos à salinidade**. 2007. 106 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

SILVA NETO, S. P.; GUIMARÃES, T. G. Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. O Setor Sucroalcooleiro e o domínio tecnológico, São Paulo: NAIPE/USP, vol. 2, 29 p., 2007.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19, 1952.

SOUZA, A. T.; PEIXOTO, A. N.; WAACHHOLZ, D. **Banana**. Florianópolis: Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina, 1995. 103 p.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 2009. 155p. Tese (Doutorado) – Instituto Butantan – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2009.

SOUZA, O. et al. Bioetanol de bananas, polpa e cascas. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, II SIGERA, 15 a 17 março, 2011, Foz do Iguaçu, PR.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate Metabolism in *Zymomonas mobilis*: A Catabolic Highway With Some Scenic Routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p 301- 307, 1996.

STRUCH, T. et al. Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.518-523, 1991.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 319–328, 1999.

SUTHERLAND, I. W.. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in Microbiology and Physiology**, v. 8, p.143-213, 1972.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 1-46, 1977.

TAGLIARI, C. V. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de cafeína e teofilina demetilase por *Rhizopus delemar* em fermentação no estado sólido usando casca de café como substrato.** 2003. 125f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Influência do pH inicial do caldo de cana-de-açúcar na produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821. **Ciências Exatas e Tecnológica**, v.23, n.1, dez., 2002.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 43, n. 4, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VÁSQUEZ, M. P. et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, p. 141-153, 2007.

VIGNOLI, J. A. **Efeito da osmolalidade do meio, permeabilização e imobilização de *Zymomonas mobilis* na produção de sorbitol.** 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

VIIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 252-255, 1984.

VIIKARI, L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.7, n.3, 1988.

VILAS BOAS, E. V. de B. et al. Características da fruta. In: MATSUURA, F. C. A. U., FOLEGATTI, I. S. **Banana: Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, p.15- 19.

WALEED, K. E. et al. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 865–871, 2011.

WILKINS, M. R. Effect of Orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 538-54, 2009.

YAMAMOTO, S. et al.. The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 343-349, 1985.

## ANEXOS

## ANEXO A – Tabela com informações sobre as enzimas fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda.

Tabela 1A - Classificação e densidade das enzimas fornecidas pela Novozymes® e faixas de pH, temperatura e dose recomendadas pela empresa.

Classificação da enzima	Densidade <sup>1</sup>	pH	Temperatura (°C)	Dosagem <sup>2</sup> (% m/m (TS))
NS22086 Cellulase-complexo	1,15	5,0–5,5	45–50	1,0–5,0
NS22083 Xilanase	1,09	4,5–6,0	35–55	0,05–0,25
NS22118 $\beta$ -glicosidase	1,2	2,5–6,5	45–70	0,2–0,6
NS22119 Complexo enzimático	1,19	4,5–6,0	25–55	0,05–0,4
NS22002 $\beta$ -glucanase Xilanase	1,20	5,0–6,5	40–60	0,4–2,0

<sup>1</sup> Valores aproximados de densidade.

<sup>2</sup> Dosagem requerida é fortemente dependente do tipo de substrato, dos pré-tratamentos e das condições operacionais empregadas.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494

Para a construção da curva de calibração da concentração celular, foi utilizada suspensão de *Z. mobilis* CCT 4494 obtida após o processo de pré-fermentação.

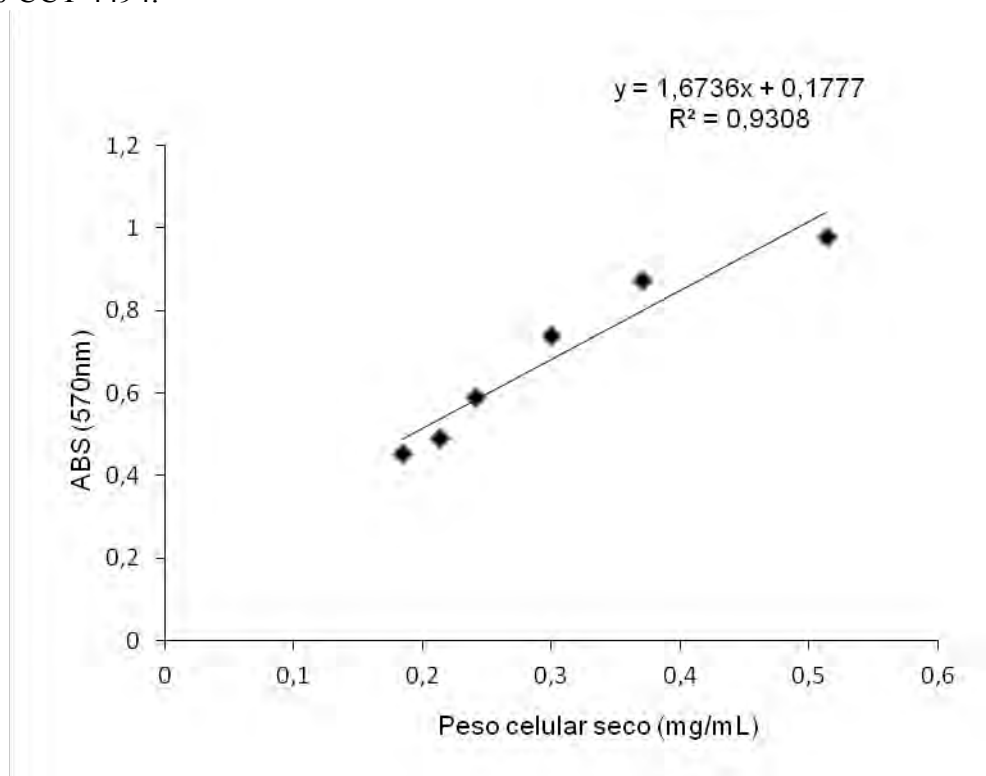
A construção da reta de calibração foi executada da seguinte forma:

- Um volume de 50,0 mL de cultura de células de *Z. mobilis*, obtido nas condições de pré-fermentação, foi centrifugado a 6941g a 4°C, durante 15 minutos, e lavado duas vezes com água destilada;
- A massa celular úmida foi, então, ressuspensa em 50,0 mL de água destilada (suspensão original) e posteriormente foram preparadas diferentes diluições;
- Um volume de 5,0 mL da suspensão celular original e de cada diluição de suspensão de células foram colocados em cadinhos de porcelana, previamente secos em estufa a 90°C, e pesados em balança analítica;
- Os cadinhos, contendo a suspensão celular original e as diferentes diluições, foram levados em estufa a 102-105°C, por 24 h;
- Os cadinhos foram transferidos para um dessecador, contendo cristais de sílica, e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos para resfriamento;
- Os cadinhos foram pesados em balança analítica;
- Uma vez conhecidos o volume e a massa de células, esta última obtida pela subtração do peso dos cadinhos vazios e do peso dos cadinhos com células, foi determinada a concentração celular da suspensão celular original e a das amostras que foram diluídas;
- Paralelamente, foram feitas leituras de absorbância em 570 nm com a amostra da suspensão celular original e com as diluídas em espectrofotômetro Biochrom modelo: Libra 22;
- Com base nas absorbâncias das amostras diluídas e da suspensão original, foi construída a reta de calibração, relacionando a absorbância com a concentração celular.



Tabela 1A. Valores de absorvância de suspensões de *Z. mobilis* CCT 4494 em 570 nm.

Peso celular seco (mg/mL)	ABS (570nm)
0,51	0,979
0,37	0,871
0,30	0,739
0,24	0,590
0,21	0,490
0,18	0,453

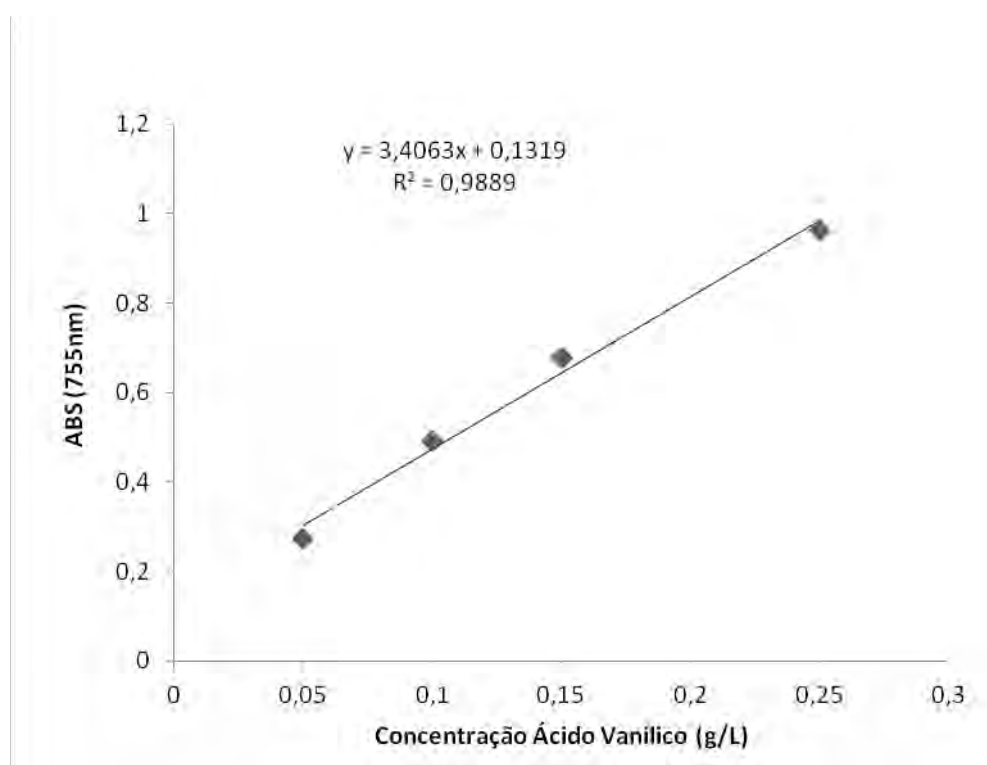
Figura 1 A. Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de *Z. mobilis* CCT 4494.

**APÊNDICE B – Curva de calibração da Concentração de Ácido Vanílico.**

Tabela 1B. Valores de absorvância em 755 nm obtidas de amostras contendo diferentes concentrações de Ácido Vanílico (g/L) para a construção da curva de calibração pelo método Folin-Ciocalteu.

Concentração de Ácido Vanílico (g/L)	ABS (755nm)
0,05	0,272
0,1	0,490
0,15	0,677
0,25	0,962

Figura 1B. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de Ácido Vanílico (g/L) pelo método Folin-Ciocalteu.

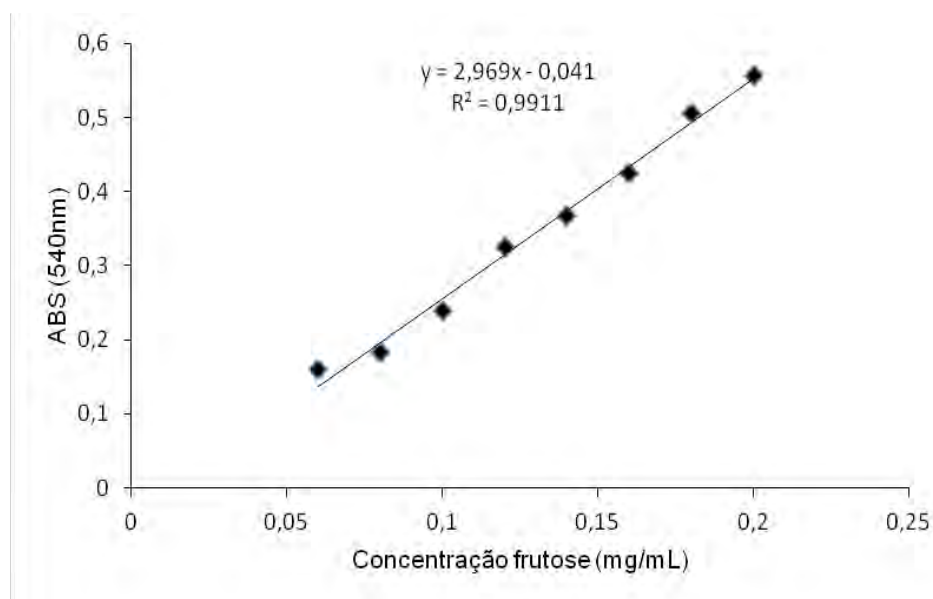


**APÊNDICE C – Curva de calibração da Concentração de Açúcares Redutores.**

Tabela 1C. Valores de absorvância em 540 nm obtidas de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (mg/mL) para a confecção da curva de calibração pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

Concentração de frutose (mg/mL)	ABS (540nm)
0,06	0,159
0,08	0,184
0,10	0,239
0,12	0,325
0,14	0,367
0,16	0,424
0,18	0,505
0,20	0,557

Figura 1C. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de frutose (mg/mL) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

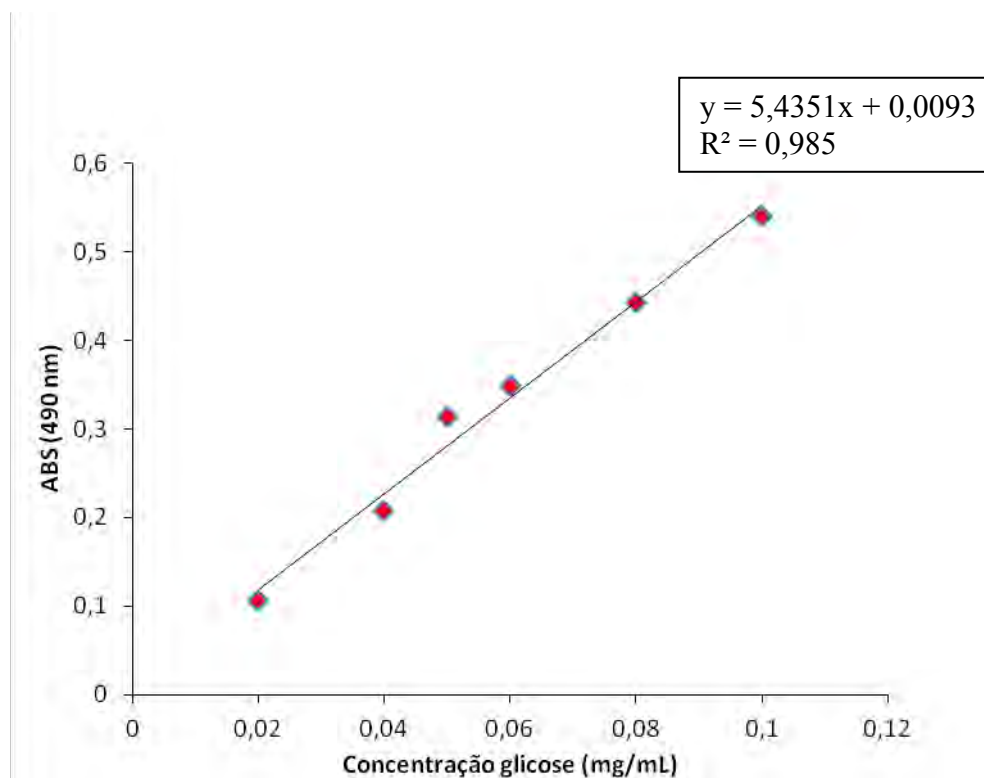


**APÊNDICE D – Curva de calibração da Concentração de Açúcares Totais.**

Tabela 1D. Valores de absorbância em 490 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (mg/mL) para a confecção da curva de calibração pelo método Dubois e colaboradores (1956).

Concentração de glicose (mg/mL)	ABS (490nm)
0,02	0,106
0,04	0,208
0,05	0,313
0,06	0,348
0,08	0,443
0,1	0,540

Figura 1D. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (mg/mL) pelo método Dubois e colaboradores (1956).

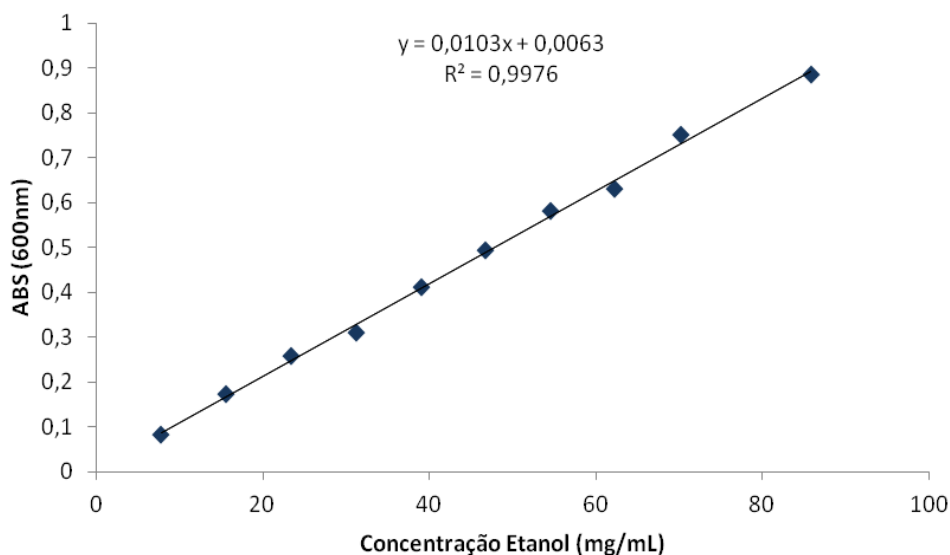


### APÊNDICE E – Curva de calibração da Concentração de Etanol.

Tabela 1E. Valores de absorvância em 600 nm de amostras contendo diferentes concentrações de etanol (mg/mL) para a confecção da curva de calibração pelo método Dicromato de Potássio.

Concentração de Etanol (mg/mL)	ABS (600nm)
7,8	0,082
15,6	0,172
23,4	0,258
31,2	0,310
39,0	0,412
46,8	0,492
54,6	0,580
62,3	0,630
70,2	0,751
85,8	0,884

Figura 1E. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de Etanol (mg/mL) pelo método Dicromato de Potássio.



APÊNDICE F – Valores calculados de produtividade de Etanol.

Tabela 1F - Valores de produtividade de etanol na fermentação do meio sintético (P<sub>1</sub>) e do caldo hidrolisado de casca de banana (P<sub>2</sub>).

Ensaio	P <sub>1</sub> (g/L.h)	P <sub>2</sub> (g/L.h)
1	0,34	0,30
2	3,58	3,25
3	0,50	0,25
4	3,59	3,54
5	0,37	0,27
6	1,67	1,46
7	1,62	0,86
8	1,16	0,65
9	3,73	3,49
10	1,11	0,69
11	1,20	1,19
12	3,54	3,66
13	1,19	1,20
14	1,58	0,90
15	3,65	3,65
16	0,53	0,25
17	1,17	1,15
18	1,81	1,34
19	1,21	1,06
20	3,76	3,60
21	0,82	0,88
22	0,38	0,20
23	0,48	0,26
24	1,17	1,17
25	1,20	0,69
26	1,77	1,36
27	1,18	1,18