



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Crislen Daniele dos Santos Rodrigues da Silva

Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol
por fermentação pelo consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e
Pachysolen tannophilus CCT1891

São José do Rio Preto
2014

Crislen Daniele dos Santos Rodrigues da Silva

Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol
por fermentação pelo consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e
Pachysolen tannophilus CCT1891

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 “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto
2014

Silva, Crislen Daniele dos Santos Rodrigues da.

Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol por fermentação pelo consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT1891 / Crislen Daniele dos Santos Rodrigues da Silva. -- São José do Rio Preto, 2014
107 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia. 2. Bioetanol – Indústria. 3. Hidrólise ácida.
4. Bagaço de cana. 5. *Zymomonas mobilis*. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 661.722

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Crislen Daniele dos Santos Rodrigues da Silva

Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol
por fermentação pelo consórcio *Zymomonas mobilis* CCT4494 e
Pachysolen tannophilus CCT1891

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 “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

Comissão 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. Vanildo Luiz Del Bianchi
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus São José do Rio Preto.

Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes
Departamento de Farmácia da Universidade Paulista (UNIP) - Campus São José do Rio Preto.

São José do Rio Preto
24 de Junho 2014

DEDICO este trabalho ao meu marido Carlos, o qual, por diversas vezes, se privou de minha companhia, mesmo assim sempre com seu amor e compreensão me apoiou.

Com carinho aos meus pais, minha mãe Edileusa, meu pai José (*in memoriam*), meu padrasto Horácio e ao meu irmão Kevelen.

De forma especial, à minha grande família, avós, tios, tias, primos e primas, que sempre acreditaram e almejaram esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** por ter me propiciado chegar à consecução do presente trabalho.

Um agradecimento distinto ao meu marido, que me estimulou e incentivou, inclusive me incitando ao trabalho, nos momentos de desânimo.

Um exclusivo reconhecimento e profundo agradecimento ao meu orientador, prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz, pela oportunidade, paciência, atenção, pelos ensinamentos, trazendo sempre direção e prumo a este trabalho.

Aos professores Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, que participou das bancas de qualificação e avaliação, Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado, que participou da banca de qualificação e Dr^a. Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes, que participou da banca de avaliação, pelas sugestões apontadas, contribuindo, assim, para o aprimoramento e melhoria do trabalho.

Ao Programa de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, pela oportunidade de realizar um Mestrado. Através da seção de pós-graduação, pela responsabilidade, cordialidade e alegria com que sempre nos atendeu.

Aos Professores do Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela transmissão de novos e importantes conhecimentos.

Aos amigos Sirlene do Nascimento Senna, Marco Antônio Costa da Silva e Telma Duarte Vaz, pelo constante incentivo e apoio. Aos colegas de mestrado, através das pessoas de Juliana Ferreira e Michelle Cardoso Coimbra, pela amizade, companheirismo e pelas diversas formas de apoio no transcorrer do curso.

À técnica do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Tânia pelo auxílio, atenção e por estar sempre disposta a ajudar.

Quero agradecer àqueles parceiros aqui anônimos (alunos, colegas de laboratório e amigos) que de forma direta (após leitura ou apenas com comentários acerca deste trabalho efetuaram sugestões ou críticas) ou indireta (com comentários que me levavam a refletir sobre aspectos influenciadores acerca deste trabalho), me ajudaram a rematar o presente.

RESUMO

A produção de biocombustíveis é uma necessidade e existe a procura de processos economicamente viáveis de obtenção a partir de fontes renováveis de energia, destacando-se a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. O objetivo deste trabalho foi obter etanol a partir do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar por fermentação pelo consórcio formado por *Pachysolen tannophilus* e *Zymomonas mobilis*. Os métodos para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, foram variações da concentração de H₂SO₄ de 0 a 5% v/v, tempo de 15 e 30 min a 121°C e 12 e 24 h a temperatura ambiente e aplicação de desintoxicação com carvão ativado. Para as fermentações até 72 h realizou-se um planejamento experimental com as variáveis independentes: pH inicial (4,5; 5,5 e 6,5), temperatura (25; 30 e 35 °C), agitação (0; 75 e 150 rpm), tempo de incubação (24; 48 e 72 h) e concentração do substrato (5; 10 e 15% m/v) utilizando três meios de fermentação (glicose, hidrolisado sem desintoxicar e hidrolisado desintoxicado). Para analisar a cinética, a fermentação foi monitorada a cada 2 h no período de 24 h em pH 5,5 a 30°C, sem agitação com 15% m/v de substrato para cada micro-organismo nos três meios testados. Para a fermentação com o consórcio os micro-organismos foram inoculados juntos ao início da fermentação dividida em dois grupos um foi em pH 4,5 com 5% de substrato e outro em pH 6,5 com 15% de substrato, sem agitação a 30°C em 24 h monitorada a cada 2 h. Os resultados para a hidrólise o resultado de açúcares totais para o padrão escolhido (2% de H₂SO₄ em 15 min a 121 °C) foi de 78,7 mg/mL. A desintoxicação apresentou redução de 26,2 % de compostos fenólicos totais. A maior produção de etanol por *Z. mobilis* foi de 36,6 mg/mL no tempo de fermentação de 6 h. Por *P. tannophilus* foi de 39,8 mg/mL no ensaio com 72 h, 35 °C, 150 rpm, pH 6,5 e 15% m/v com meio hidrolisado sem desintoxicar e de 38,7 mg/mL no meio com hidrolisado desintoxicado, no tempo de 6 h. O consórcio obteve 42 mg/mL de etanol nas condições de pH 6,5 com 15% m/v do hidrolisado desintoxicado no tempo de 6 h com produtividade de 5,4 g/L.h⁻¹. O consórcio mostrou ter potencial para obter maior produção de etanol em pouco tempo de fermentação.

Palavras-chave: Bioetanol. Consórcio de micro-organismos. Hidrólise ácida. *Pachysolen tannophilus*. *Zymomonas mobilis*.

ABSTRACT

The biofuel production is necessary and there are searches for economically viable processes for the production from renewable energy sources, stands out ethanol production from lignocellulosic materials. The aim of this study was to obtain ethanol from sugarcane bagasse hydrolyzate with fermentation by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus* consortium. The methods for sugarcane bagasse hydrolysis were variations in the concentration of H₂SO₄ from 0 to 5% v/v, time 15 to 30 min at 121 °C, 12 and 24 h at ambient temperature and submission of detoxification with activated charcoal. For up to 72 h fermentations made experimental planning with independent variables: initial pH (4,5; 5,5 and 6,5), temperature (25, 30 and 35 ° C), agitation (0; 75 and 150 rpm), incubation time (24; 48 and 72 h) and substrate concentration (5; 10 and 15% w/v) using three fermentation media (glucose, hydrolyzed without detoxify and detoxified hydrolyzate). To evaluate kinetics, the fermentation was monitored every 2 h during 24 h at pH 5,5 at 30 °C without shaking with 15% w/v substrate, for each micro-organism. The consortium fermentation, micro-organisms were inoculated together at the beginning of fermentation and was divided into two groups one was at pH 4,5 with 5% and another substrate at pH 6,5 with 15% substrate without shaking at 30 °C 24 h monitored every 2 h. The results for hydrolysis to total sugars of chosen standard (2% H₂SO₄ for 15 min at 121 °C) were 78,7 mg/mL. The detoxification decreased 26, 2% of total phenolic compounds. The higher ethanol production by *Z. mobilis* was 36,6 mg/mL in 6 h of fermentation. For *P.tannophilus* was 39,8 mg/mL in 72 h, 35 °C, 150 rpm, pH 6,5 and 15% w/v with without detoxify hydrolyzate medium and 38,7 mg/mL in detoxified hydrolyzate medium at 6 h. The consortium obtained 42 mg/mL of ethanol under pH 6,5 with 15% w/v detoxified hydrolyzate medium at 6 h with productivity of 5,4 g/L.h⁻¹. The consortium was shown to have potential for higher ethanol production under short fermentation time.

Keywords: Acid hydrolysis. Bioethanol. Micro-organisms' consortium. *Pachysolen tannophilus*. *Zymomonas mobilis*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Processo de produção de etanol de segunda geração. | 24 |
| Figura 2. | Esquema da estrutura da parede celular vegetal. | 26 |
| Figura 3. | Estruturas parciais dos componentes lignocelulósicos. | 27 |
| Figura 4. | Exemplo da cana de açúcar <i>in natura</i> e seu respectivo bagaço. | 28 |
| Figura 5. | Estrutura da biomassa lignocelulósica. | 29 |
| Figura 6. | Esquema de hidrólise ácida da celulose. | 31 |
| Figura 7. | Compostos formados durante a hidrólise ácida da biomassa vegetal. | 32 |
| Figura 8. | Rota metabólica empregada por <i>Zymomonas mobilis</i> no metabolismo da glicose. Representa a via da Glicólise e a via Entner-Doudoroff. | 36 |
| Figura 9. | Rota metabólica empregada por <i>P. tannophilus</i> no metabolismo de pentoses. Representa a via das pentoses fosfato e a via Embden-Meyerhoff. | 39 |
| Figura 10. | Rota metabólica empregada por <i>P. tannophilus</i> no metabolismo de pentoses. Representa a via das pentoses fosfato e a via Embden-Meyerhoff. | 40 |
| Figura 11. | AT liberados por hidrólise em diferentes concentrações de ácido, tempo e temperatura. | 51 |
| Figura 12. | Superfície de resposta para liberação de Açúcares totais pela hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar utilizando as variáveis temperatura de 121°C e ambiente (~30°C) e concentrações de ácido (0-5%). | 52 |

- Figura 13.** AR com diferentes concentrações de ácido, tempo e temperatura. 53
- Figura 14.** Superfície de resposta para liberação de AR pela hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar utilizando as variáveis temperaturas de 121°C e ambiente (~30°C) e concentrações de ácido (0-5%)..... 54
- Figura 15.** CFT com diferentes concentrações de ácido, tempo e temperaturas. 55
- Figura 16.** Superfície de resposta para produção de Compostos fenólicos totais pela hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar utilizando as variáveis temperatura de 121°C e ambiente (~30°C) e concentrações de ácido (0-5%)..... 56
- Figura 17.** Superfície de resposta para produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando as variáveis Tempo (24, 48 e 72 horas) e Substrato (5, 10 e 15%) no meio com glicose. 63
- Figura 18.** Superfície de resposta para produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando as variáveis Temperatura (25, 30 e 35 °C) e Agitação (0, 75 e 150 rpm) no meio com glicose. 64
- Figura 19.** Superfície de resposta para produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando as variáveis Substrato (5, 10 e 15 %) e pH (4,5; 5,5 e 6,5) no meio com hidrolisado sem desintoxicar..... 66
- Figura 20.** Superfície de resposta para produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando as variáveis Substrato (5, 10 e 15 %) e agitação (40, 75 e 150 rpm) no meio com hidrolisado desintoxicado. 68
- Figura 21.** Cinética do pH final da fermentação por *Z. mobilis* durante o período de 24 horas determinado cada 2 horas nos meios MG, MHSD e MHD..... 69
- Figura 22.** Cinética do crescimento da biomassa celular de *Z. mobilis* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 70

- Figura 23.** Cinética da produção de etanol na fermentação por *Z. mobilis* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 71
- Figura 24.** Produtividade do etanol na fermentação por *Z. mobilis* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 73
- Figura 25.** Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis Agitação (0, 75 e 150 rpm) e pH (4,5; 5,5 e 6,5) no meio com glicose..... 76
- Figura 26.** Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis pH (4,5; 5,5 e 6,5) e Substrato (5, 10 e 15%) no meio com glicose..... 76
- Figura 27.** Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis Tempo (24, 48 e 72 h) e Agitação (0, 75 e 150 rpm) no meio com glicose. 77
- Figura 28.** Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis Substrato (5, 10 e 15%) e Agitação (0,75 e 150 rpm) no meio com hidrolisado sem desintoxicar. 79
- Figura 29.** Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis pH (4,5, 5,5 e 6,5) e Temperatura (25, 30 e 35°C) no meio com hidrolisado sem desintoxicar..... 80
- Figura 30.** Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis Tempo (24, 48 e 72 h) e pH (4,5, 5,5, 6,5) no meio com hidrolisado desintoxicado..... 82
- Figura 31.** Cinética do pH da fermentação por *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 83
- Figura 32.** Cinética de crescimento da biomassa de *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 84
- Figura 33.** Cinética da produção de etanol na fermentação por *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 85

- Figura 34.** Produtividade do etanol na fermentação por *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 87
- Figura 35.** Cinética do pH da fermentação pelo consórcio de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas. 88
- Figura 36.** Cinética do crescimento da biomassa celular de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas. 89
- Figura 37.** Cinética da produção de etanol na fermentação pelo consórcio de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 90
- Figura 38.** Produtividade do etanol na fermentação pelo consórcio de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas..... 92

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Delineamento experimental, contendo as variáveis independentes, estudadas para a produção de etanol, por *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Zymomonas mobilis* CCT 4494.....46
- Tabela 2** – Valores de significância estatística (*p*) para AT, AR e CFT relacionados com a temperatura de 121°C e ambiente, tempo de 15, 30 minutos, 12 e 24 horas a temperatura ambiente e as diferentes concentrações de ácido sulfúrico testadas.50
- Tabela 3** – AT (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de ácido sulfúrico, tempos de autoclave e temperatura ambiente.52
- Tabela 4** – AR (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de ácido sulfúrico e tempos de autoclave.53
- Tabela 5** – CFT (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de ácido sulfúrico e tempos em temperatura ambiente.55
- Tabela 6** – Valores de AR, AT e CFT (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar com 2% de H₂SO₄ em diferentes tempos de autoclavagem.56
- Tabela 7** – Comparação de AR, AT e CFT (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar antes e depois da desintoxicação e concentração.59
- Tabela 8** – Médias para a produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *Z. mobilis* CCT 4494 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de glicose.61

- Tabela 9** – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis*, em diferentes valores das variáveis.62
- Tabela 10** – Médias para produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de hidrolisado sem desintoxicar.64
- Tabela 11** – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis*, em diferentes valores das variáveis.65
- Tabela 12** – Médias para produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de hidrolisado desintoxicado.66
- Tabela 13** – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis*, em diferentes valores das variáveis.67
- Tabela 14** – Valores das médias da Produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *P. tannophilus* CCT 1891 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de glicose.74
- Tabela 15** – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *P. tannophilus*, em diferentes valores das variáveis.74
- Tabela 16** – Valores das médias para a produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *P. tannophilus* CCT 1891 determinadas em

diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de Hidrolisado sem desintoxicar.....77

Tabela 17 – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta Etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *P. tannophilus*, em diferentes valores das variáveis.78

Tabela 18 – Valores das médias da produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *P. tannophilus* CCT 1891 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de Hidrolisado desintoxicado.....80

Tabela 19 – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *P. tannophilus*, em diferentes valores das variáveis.81

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 19 |
| 2 OBJETIVOS..... | 21 |
| 2.1.1 Objetivo geral | 21 |
| 2.1.1.1 Objetivos específicos..... | 21 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 22 |
| 3.1 Etanol..... | 22 |
| 3.1.1 Etanol de segunda geração..... | 23 |
| 3.2 Materiais lignocelulósicos | 24 |
| 3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar..... | 27 |
| 3.3 Hidrólise do material lignocelulósico | 30 |
| 3.3.1 Formação de compostos fenólicos | 31 |
| 3.3.2 Desintoxicação | 33 |
| 3.4 Micro-organismos produtores de etanol..... | 34 |
| 3.4.1 <i>Zymomonas mobilis</i> | 35 |
| 3.4.2 <i>Pachysolen tannophilus</i> | 37 |
| 3.5 Consórcio de micro-organismos | 40 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 4.1 Hidrólise do Bagaço de cana-de-açúcar | 42 |
| 4.2 Desintoxicação..... | 43 |
| 4.3 Meio de manutenção | 43 |
| 4.3.1 <i>Zymomonas mobilis</i> | 43 |
| 4.3.2 <i>Pachysolen tannophilus</i> | 43 |
| 4.3.3 Consórcio | 43 |
| 4.4 Condições de fermentação | 44 |
| 4.4.1 Pré-fermentação..... | 44 |
| 4.4.2 Fermentação | 44 |
| 4.4.2.1 Padronização do inóculo | 44 |
| 4.5 Meio de fermentação | 45 |
| 4.5.1 Meio glicose (MG)..... | 45 |
| 4.5.2 Meio contendo o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar | 45 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.5.2.1 | Meio hidrolisado sem desintoxicação (MHSD) | 45 |
| 4.5.2.2 | Meio hidrolisado desintoxicado (MHD) | 45 |
| 4.5.3 | Planejamento estatístico para fermentação..... | 46 |
| 4.5.4 | Cinética das fermentações | 46 |
| 4.6 | Métodos analíticos | 47 |
| 4.6.1 | Determinação de umidade..... | 47 |
| 4.6.2 | Granulometria..... | 47 |
| 4.6.3 | Coleta e preparo das amostras | 47 |
| 4.6.4 | Determinação do pH final | 47 |
| 4.6.5 | Determinação da concentração celular | 47 |
| 4.6.6 | Determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) | 48 |
| 4.6.7 | Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) | 48 |
| 4.6.8 | Determinação de etanol..... | 48 |
| 4.6.9 | Cálculo de produtividade | 48 |
| 4.6.10 | Análise estatística..... | 49 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 50 |
| 5.1 | Hidrólise do bagaço de cana | 50 |
| 5.1.1 | Determinação de açúcares totais, redutores e compostos fenólicos totais | 51 |
| 5.2 | Desintoxicação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar..... | 58 |
| 5.3 | Ensaio de Fermentação | 60 |
| 5.3.1 | <i>Zymomonas mobilis</i> | 61 |
| 5.3.1.1 | Produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> utilizando o meio contendo glicose. | 61 |
| 5.3.1.2 | Produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> utilizando meio com hidrolisado sem desintoxicação..... | 64 |
| 5.3.1.3 | Produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> utilizando meio com hidrolisado desintoxicado. | 66 |
| 5.3.2 | Cinética das fermentações com <i>Z. mobilis</i> até 24 horas | 68 |
| 5.3.2.1 | pH final | 68 |
| 5.3.2.2 | Crescimento celular (Biomassa)..... | 70 |
| 5.3.2.3 | Produção de etanol | 71 |
| 5.3.2.4 | Produtividade..... | 73 |
| 5.3.3 | <i>Pachysolen tannophilus</i> | 74 |
| 5.3.3.1 | Produção de etanol por <i>P. tannophilus</i> utilizando meio com glicose. | 74 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.3.3.2 | Produção de etanol por <i>P. tannophilus</i> utilizando meio com hidrolisado sem desintoxicar. | 77 |
| 5.3.3.3 | Produção de etanol por <i>P. tannophilus</i> utilizando meio com hidrolisado desintoxicado. | 80 |
| 5.3.4 | Cinética das fermentações com a levedura até 24 horas | 82 |
| 5.3.4.1 | pH..... | 82 |
| 5.3.4.2 | Crescimento celular (Biomassa)..... | 83 |
| 5.3.4.3 | Produção de etanol | 85 |
| 5.3.4.4 | Produtividade..... | 86 |
| 5.4 | Consórcio..... | 87 |
| 5.4.1 | pH final | 88 |
| 5.4.2 | Crescimento celular (Biomassa)..... | 88 |
| 5.4.3 | Produção de etanol..... | 89 |
| 5.4.4 | Produtividade..... | 91 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 93 |
| | REFERÊNCIAS..... | 94 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Sistemas de produção que buscam a sustentabilidade têm sido cada vez mais frequentes em todas as partes do planeta. A produção de biocombustíveis é uma necessidade por estes serem fontes renováveis de energia ao contrário dos derivados de petróleo. Além disso, no Brasil e no mundo existe a procura de alternativas e novas tecnologias, que permitam o reaproveitamento do que seria descartado como resíduos. No caso de indústrias que utilizam frutas como matéria-prima, há grande descarte das cascas, nas agroindústrias há o descarte de palhas e bagaços. Portanto, o aproveitamento destes materiais poderia propiciar um aumento na produção de etanol, produto importante como combustível ecologicamente correto.

A produção de etanol lignocelulósico, conhecido como etanol de segunda geração, é uma fonte com muito potencial que utiliza materiais de baixo custo, tais como resíduos da própria indústria sucroalcooleira e outras culturas, gramíneas, serragem, lascas de madeira e cascas de frutas (SUN; CHENG, 2002). Os recursos renováveis que podem ser usados para a produção de etanol, tais como os lignocelulósicos, incluindo resíduos industriais e agrícolas, são a mais abundante matéria-prima renovável na natureza (FU; PEIRIS, 2008; YU; ZHANG, 2004).

Dentre os materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial abundante em vários países e pode ser utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento de processos biotecnológicos de interesse industrial (PAL et al., 1995). Os pré-tratamentos são ferramentas importantes e necessários nos processos de conversão da celulose, pois irão modificar e fracionar sua estrutura para converter o polímero em açúcares fermentáveis quebrando sua estrutura cristalina.

A produção de etanol realizada pelas usinas de açúcar e álcool é um processo fermentativo. Que tem como subprodutos o dióxido de carbono e pequenas quantidades de metanol e glicerol. Assim, a fermentação de açúcares obtidos a partir da estrutura da biomassa celulósica pode ser um processo realizado pela maioria das bactérias e leveduras (ANTUNES; SILVA, 2011).

Porém não há um único micro-organismo que possa converter eficientemente os açúcares provenientes do hidrolisado de materiais lignocelulósicos em etanol. Há alguns micro-organismos recombinantes que podem realizar parcialmente essa conversão. Desta maneira, para que uma conversão completa e eficiente destes açúcares possa ser alcançada, deve-se recorrer a aplicação de consórcios entre micro-organismos (NAN; PEIRIS, 2008).

A partir disso, este trabalho propôs a produção de etanol de segunda geração pelo consórcio da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494 e pela levedura *Pachysolen tannophilus* CCT1891 tendo como substrato o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar sem a desintoxicação e desintoxicado, testando diferentes variáveis independentes, além da cinética realizada com ambos os micro-organismos e a aplicação do consórcio.

2 OBJETIVOS

2.1.1 OBJETIVO GERAL

Obter etanol a partir do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar sem desintoxicação e desintoxicado por fermentação pelo consórcio formado por *Pachysolen tannophilus* CCT1891 e *Zymomonas mobilis* CCT4494.

2.1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as condições de hidrólise ácida que permitam maior liberação de açúcares totais e redutores de forma eficiente para padronização. Analisando os seguintes parâmetros: tempo, temperatura (15 e 30 min sob 121 °C; 12 e 24 h em temperatura ambiente ~30 °C) e concentração de ácido sulfúrico (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 %)(v/v).
2. Estudo da desintoxicação para redução de compostos fenólicos.
3. Analisar cada fermentação individualmente, ou seja, só com *Pachysolen tannophilus* CCT1891 e outra com *Zymomonas mobilis* CCT4494. Utilizando planejamento fatorial para ambos com as variáveis independentes: tempo (24, 48 e 72 horas); temperatura (25, 30 e 35 °C); agitação (0, 75, 150 rpm); pH (4,5, 5,5, 6,5) e concentração do substrato (5, 10 e 15 %)(v/v). Utilizando três meios de fermentação (glicose, hidrolisado sem desintoxicar e hidrolisado desintoxicado) para produção de etanol.
4. Determinar qual temperatura, tempo, pH, agitação e concentração do substrato adequado para obter a melhor produção e sua respectiva produtividade para etanol;
5. Observar a cinética das fermentações no período de 24 h, monitoradas a cada 2h.
6. Determinar as condições adequadas para utilizar o consórcio entre *Zymomonas mobilis* CCT4494 e a *Pachysolen tannophilus* CCT1891 para produção de etanol com o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 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 (SCHULZ, 2010).

Nos anos 1970, a preocupação com a qualidade do ar nas grandes cidades e com os efeitos negativos das emissões veiculares nessa qualidade renovou o interesse pelos biocombustíveis. Os grandes produtores e usuários de álcool, Estados Unidos e Brasil, passaram a focar neste aspecto de uma forma séria e intensa, enquanto outros países, como o Japão e os da União Europeia, mantiveram um interesse mais reduzido pelo assunto (LEITE; LEAL, 2007).

No mercado brasileiro, a obrigatoriedade de adicionar componentes oxigenados na gasolina para reduzir as emissões de monóxido de carbono e hidrocarbonetos abriu mercado para o álcool, permitindo-lhe competir com outros oxigenados como o MTBE (Éter de terbutilmetila), (LEITE; LEAL, 2007). A partir da década de 1980 os cientistas alertaram os governos sobre o fenômeno do aquecimento global, mostrando evidências, cada vez mais convincentes, de que a temperatura da terra estava subindo a uma taxa maior do que a projeção indicada pelos registros históricos, devido à ações do homem, das quais, a queima de combustíveis fósseis seria a principal causa desse fenômeno, (LEITE; LEAL, 2007; YU; ZHANG, 2004).

O advento do Pró-Álcool, criado pelo decreto-lei 76.593 de 14 de novembro de 1975, possibilitou definir claramente seu papel para longo prazo, permitindo que o setor privado investisse maciçamente no aumento da produção.

Em 1979 houve uma segunda crise do preço do petróleo que agravou a situação; então o Programa Pró-Álcool foi expandido. No ano de 1984, 94,4% dos carros novos brasileiros já eram vendidos com incentivos e créditos baratos e movidos a etanol, substituindo assim a gasolina. Desde 1975, registrou-se enorme expansão de áreas cultivadas com cana-de-açúcar e conseqüente aumento de

produção. Isso principalmente nas regiões de São Paulo com forte expansão até 1987. Em alguns municípios a área plantada com cana-de-açúcar ocupava mais de 60% da área cultivada. Não somente se observaram crescentes monoculturas e o avanço das poderosas fazendas na acirrada concorrência pelo uso do solo, como também a ocupação das melhores terras de plantio, melhorando a produtividade. As usinas e destilarias aumentaram consideravelmente suas propriedades, enquanto o fornecimento dos pequenos e médios produtores diminuiu (KOHLHEPP, 2010).

O etanol, ou álcool etílico, é uma substância formada por carbono, hidrogênio e oxigênio (C_2H_6O), e a sua combustão em motores, quando comparada com os combustíveis fósseis como a gasolina ou da mistura gasolina com etanol emite menores emissões de monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SO_x), hidrocarbonetos e outros compostos poluentes (FERREIRA, 2013).

A demanda mundial por etanol combustível é muito grande e a tendência é se expandir ainda mais e rapidamente, principalmente nos países mais desenvolvidos e nos de maior consumo de combustíveis automotivos (PIACENTE, 2005; WALTER, 2006). No Brasil a produção de etanol estimada para a safra 2014/15 é de 28,37 bilhões de litros mantendo a média da safra anterior que foi 1,47% menor (CONAB, 2014).

3.1.1 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

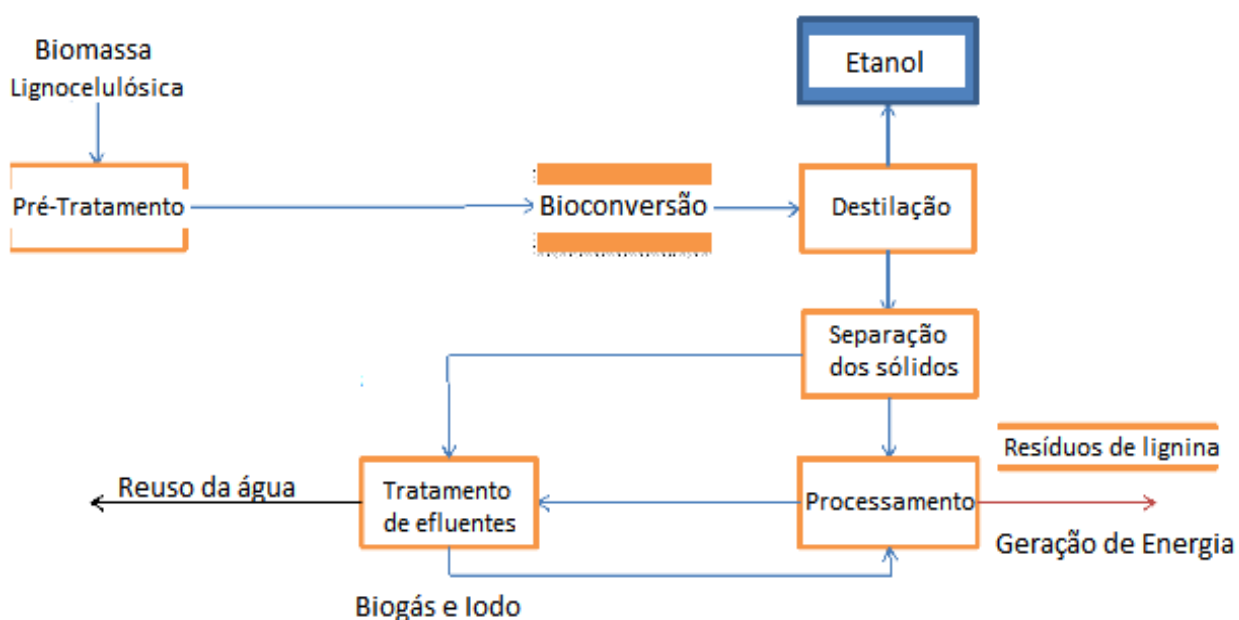
A comunidade científica tem se esforçado para o desenvolvimento de novos processos economicamente viáveis para o aproveitamento do componente lignocelulósico da biomassa, que é o caso dos resíduos agrícolas (palha e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e resíduos de milho) e resíduos florestais (pó e restos de madeira), assim como o capim elefante, além de resíduos industriais (cascas de frutas) para produção de etanol de segunda geração como combustível (SANTOS et al., 2012).

Por meio do *Energy Independence and Security Act* de 2007, o governo dos Estados Unidos definiu como meta, a partir de 2022, uma produção anual de 136 bilhões de litros de biocombustíveis alternativos ao petróleo (fonte de energia não-renovável e de alto potencial poluidor). Como uma das alternativas para atingir esse objetivo, o Departamento de Energia dos Estados Unidos estimula a produção de 60 bilhões de litros de bioetanol por ano (MAICHE; HUBER, 2010).

No processo de obtenção de etanol celulósico, o objetivo é desestruturar a parede celular vegetal para utilizar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis. No entanto, a estrutura da parede celular vegetal é complexa e delicada. O processo de desestruturação deve preservar intactos os monossacarídeos que serão usados para fermentação. Utiliza-se um processo denominado hidrólise ácida para desmontar a parede celular e é um processo funcional (BUCKERIDGE et al., 2010).

Na Figura 1 observa-se um esquema simplificado de como seria o processo de geração do etanol de segunda geração em uma escala industrial.

Figura 1. Processo de produção de etanol de segunda geração.



Fonte: Adaptado de Maiche e Huber (2010).

3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O custo relativamente baixo e a abundância de materiais lignocelulósicos os tornam atraentes como matéria-prima para a produção de quantidades suficientes de etanol a partir de recursos considerados como fontes renováveis a um custo razoável. Resíduos de produtos de baixo custo da indústria florestal e resíduos agrícolas podem ser utilizados como matérias-primas (SASSNER et al., 2008).

Os recursos renováveis que podem ser usados para a produção de etanol, tais como lignocelulósicos estão atraindo muito interesse. A lignocelulose, incluindo

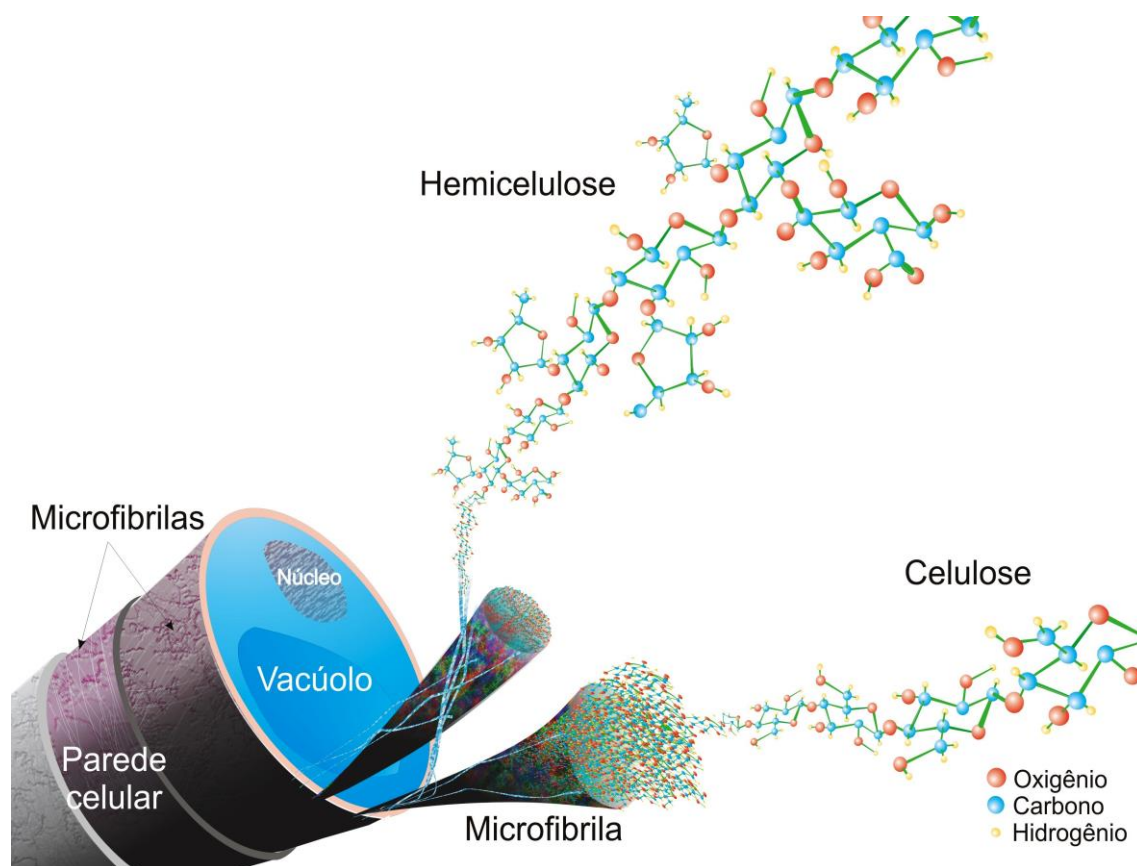
resíduos industriais e agrícolas, é a matéria-prima mais abundante e renovável na natureza, desta maneira pode ser considerada uma matéria-prima ideal. A composição da lignocelulose é a celulose, hemicelulose e lignina. Destas, a celulose e a hemicelulose são polímeros de hidratos de carbono, geralmente glicose e podem ser hidrolisados em monossacarídeos. O hidrolisado da celulose é a glicose, enquanto que a hemicelulose é heterogênea e seu hidrolisado inclui pentoses e hexoses (FU; PEIRIS, 2008; YU; ZHANG, 2004).

Assim como em toda célula vegetal, a parede celular da palha de cana-de-açúcar é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (Figuras 2 e 3). A reatividade da celulose é determinada tanto pelos grupos funcionais presentes em sua estrutura, como pelas interações físico-química existentes entre as macromoléculas.

A parede celular vegetal é composta por uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Os polissacarídeos representam cerca de 90% do peso seco da parede e consistem em celulose, que compõe de 20 a 40% da parede celular, hemiceluloses de 15 a 25% e pectinas, aproximadamente 30%. Essa matriz é altamente ordenada e dinâmica podendo tornar-se mais rígida ou mais frouxa conforme as necessidades da planta (BUCKERIDGE *et al.*, 2010).

O principal componente da biomassa é a celulose o polímero mais abundante da Terra. Sendo formado por uma cadeia linear de moléculas de glicose ligadas entre si na posição beta (β) -1,4. Tais ligações guardam energia livre e podem ser quebradas para liberar açúcares fermentáveis. Essas ligações resultam na formação de uma extensa e rígida estrutura na qual cada molécula de D-glicose está posicionada a 180° em relação à molécula vizinha. Entretanto, a celulose é muito bem protegida pelas plantas, a fim de que não seja facilmente utilizada por predadores (MAYCHE; HUBER, 2010; BUCKERIDGE *et al.*, 2010).

Figura 2. Esquema da estrutura da parede celular vegetal.



Fonte: Buckeridge et al. (2010).

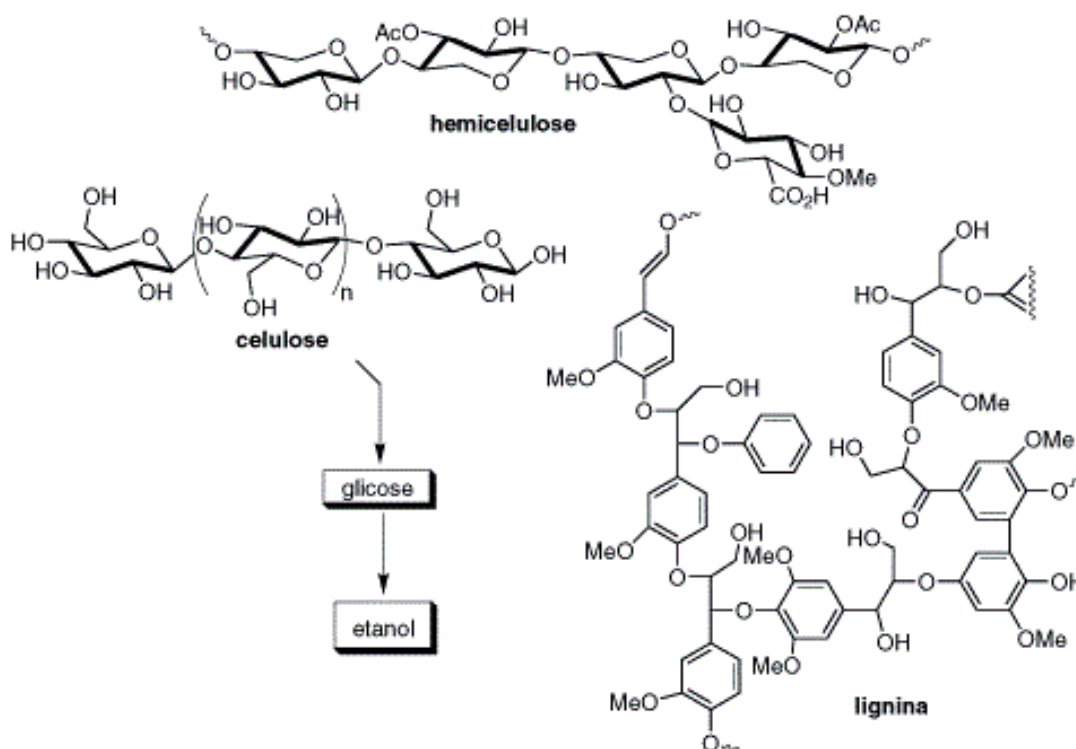
A Figura 2 mostra a estrutura de uma microfibrila, que contém 36 moléculas de celulose depositadas umas sobre as outras. Uma das moléculas de celulose se apresenta aumentada e prolongada, mostrando as unidades de glicose ligadas entre si por ligações do tipo 1,4. Uma das hemiceluloses a partir de cana-de-açúcar (glucurono-arabinoxilana) também aparece em detalhe com sua cadeia de xilana longa ramificada com arabinofuranose e algumas unidades de ácido glucurônico ligados (BUCKERIDGE et al., 2010).

A hemicelulose é o segundo componente mais abundante da parede celular. Essa molécula é composta por um conjunto de xilose e glicose, mas principalmente por D-xilose. Fornece proteção às fibras de celulose por formar ligações de hidrogênio formando um complexo com as microfibras da celulose (BUCKERIDGE et al., 2010) e elasticidade impedindo que elas se toquem. As hemiceluloses variam nas estruturas e nas composições dependendo da fonte natural (FERREIRA et al., 2009).

A lignina é composta por unidades de fenilpropanóides. Confere rigidez e

revestimento às fibras de celulose, interliga-se com a camada de celulose-hemicelulose por contato superficial e/ou ligações covalentes (MAYCHE; HUBER, 2010). Na Figura 3 é possível observar um esquema das estruturas parciais da celulose, hemicelulose e lignina e seus derivados.

Figura 3. Estruturas parciais dos componentes lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2009).

3.2.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) tem sido conhecida pelo homem desde 8000 a.C. e é uma das seis espécies do gênero *Saccharum*, são gramíneas de porte alto, originárias do Sul e Sudeste Asiático. É um complexo híbrido encontrado em regiões tropicais e subtropicais. Os talos maduros têm mais valor industrial, porque eles são usados para produzir tanto o suco quanto o bagaço. Pois o bagaço e a palha da cana-de-açúcar pode desempenhar um importante papel na geração de energia ou na produção de biocombustíveis (BIZZO et al., 2014).

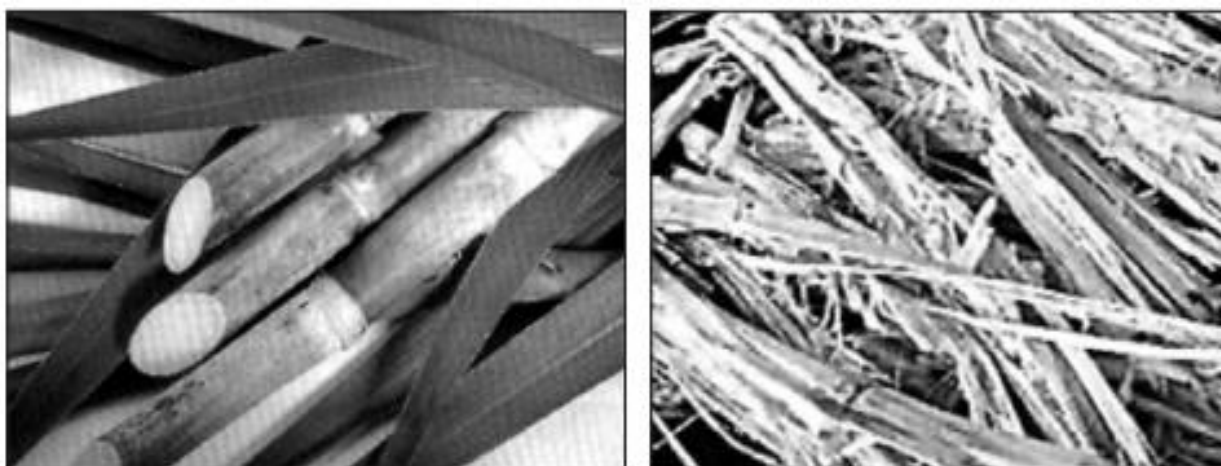
O bagaço é o principal resíduo da indústria da cana e representa

aproximadamente 30% da cana integral moída (THIAGO; VIEIRA, 2002). Ao longo dos anos o bagaço deixou de ser um resíduo e tornou-se uma importante fonte de energia e pode ser utilizado de forma eficiente na geração de vapor, gaseificação, pirólise ou mesmo como matéria prima para a hidrólise ácida ou enzimática (BIZZO et al., 2014).

A maioria dos países tropicais tem o bagaço de cana-de-açúcar como um dos principais materiais lignocelulósicos que poderiam ser utilizados para a bioconversão em etanol, uma vez que apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, de transporte e de armazenagem. Os materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar (Figura 4), são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono na forma de biomassa de vegetais e consistem principalmente de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (SANTOS; GOUVEIA, 2009).

A produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil está estimada para a safra de 2014/15 em 73.569 Kg/ha. Sendo que a produção de cana-de-açúcar moída nesta mesma safra é estimada em 671,69 milhões de toneladas, com aumento de 2% em relação a safra anterior, apenas 362,1 milhões de toneladas são destinadas para a produção de etanol (CONAB, 2014).

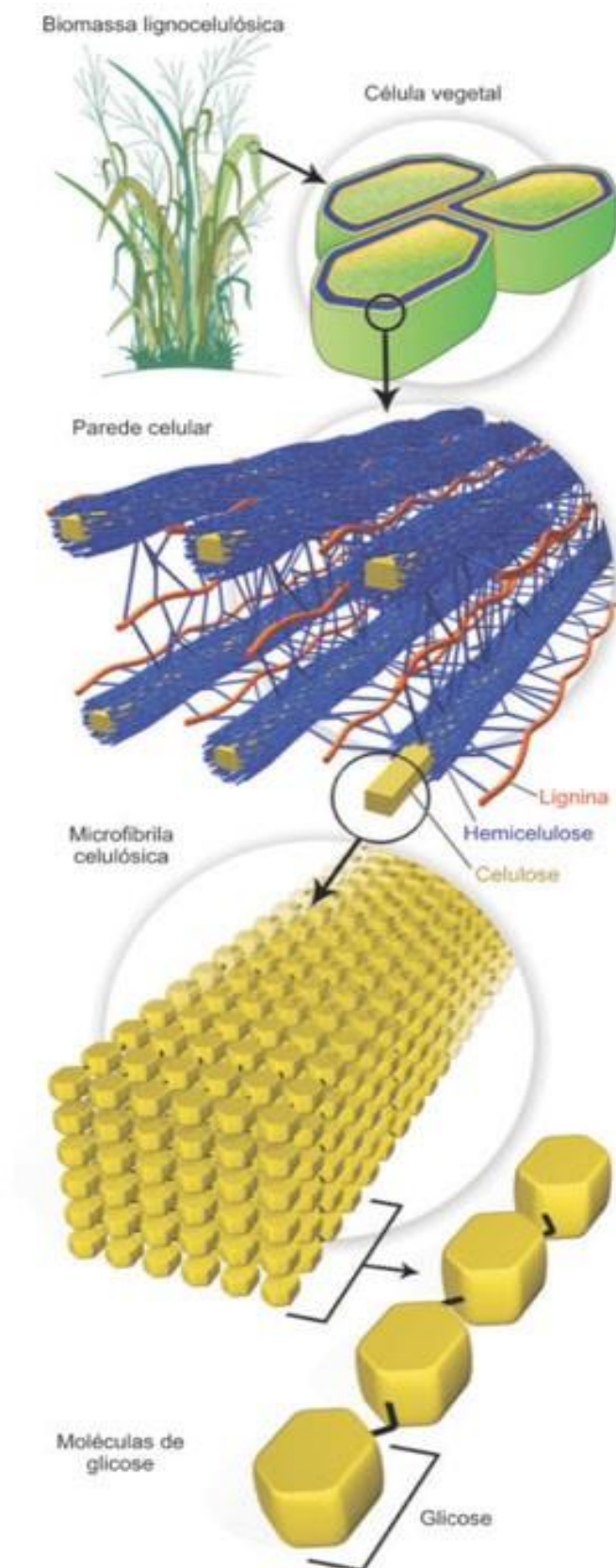
Figura 4. Exemplo da cana de açúcar *in natura* e seu respectivo bagaço.



Fonte: Battistelle, Marcilio e Lahr (2009).

A Figuras 5 mostra a estrutura do bagaço de cana-de-açúcar externa e internamente.

Figura 5. Estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Santos et al. (2012).

3.3 HIDRÓLISE DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

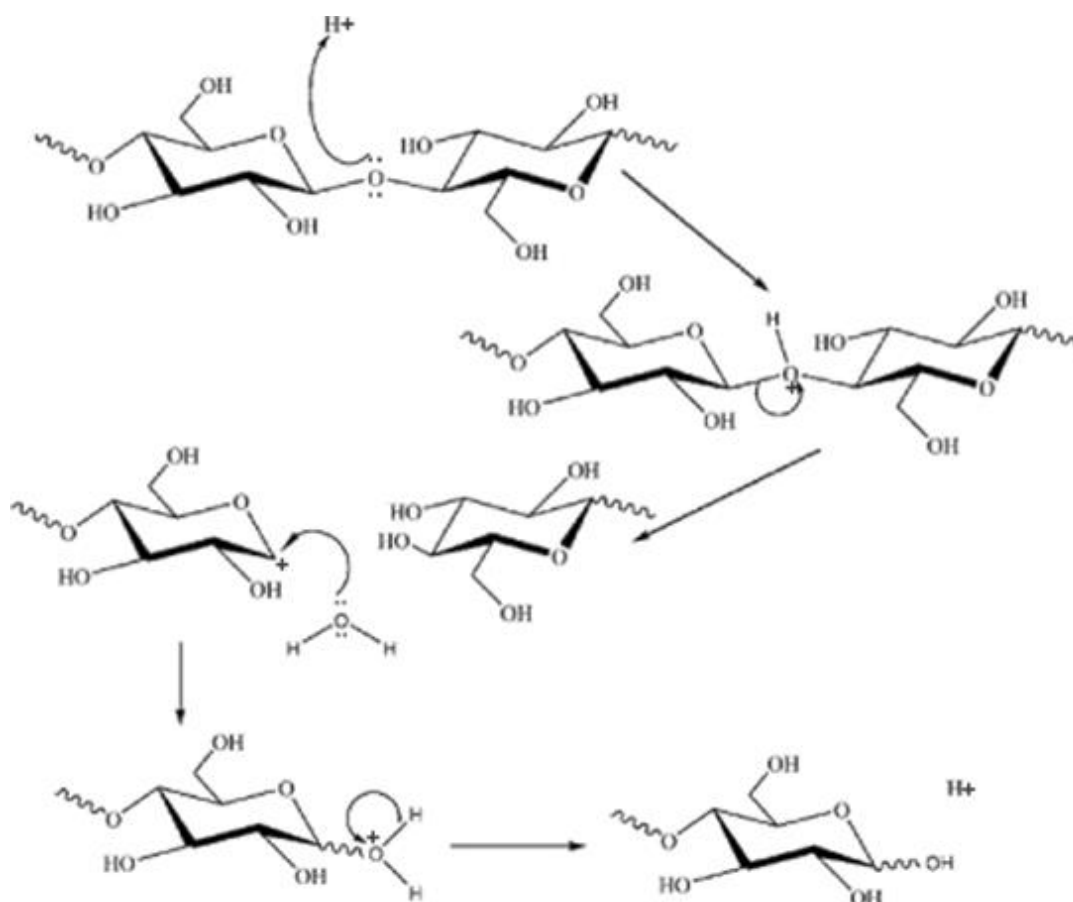
Os carboidratos presentes no bagaço da cana-de-açúcar podem ser utilizados como matéria-prima por micro-organismos capazes de realizar a fermentação transformando-os em outros produtos, mas antes é necessária a hidrólise desses carboidratos, até seus monômeros constituintes (SANTOS; GOUVEIA, 2009).

O processo de hidrólise tem potencial para converter os hidratos de carbono de materiais lignocelulósicos, liberando açúcares fermentecíveis. Portanto, tratar a biomassa com vapor de alta pressão, especialmente com a adição de uma pequena quantidade de um catalisador ácido, tal como ácido sulfúrico ou o dióxido de enxofre, tem demonstrado ser um método eficaz de pré-tratamento para vários materiais lignocelulósicos (SASSNER et al., 2008; ZHAO; XIA, 2010). A aplicação de calor, microondas, bem como ultra-sons, também contribuem para a degradação e/ou despolimerização material lignocelulósico (HYVARINEN et al., 2014).

Existem alguns tipos de hidrólises, como a hidrólise ácida, que é realizada com os ácidos sulfúrico, clorídrico ou nítrico, concentrados ou diluídos, em que o rendimento médio em xilose (base seca) é de 75% a 90%, podendo considerar-se um efeito vantajoso, pelo fato de apresentar menor custo. A hidrólise alcalina realizada pelo uso de bases, como os hidróxidos de sódio ou cálcio, tem rendimento de 60% a 75%, também é muito vantajosa para esta aplicação. Enquanto a hidrólise por ação biológica com a utilização de fungos para solubilizar a lignina geralmente, é utilizada em combinação com outros processos (SCHULS, 2010).

Os pré-tratamentos são ferramentas importantes nos processos de conversão da celulose. Estes processos são necessários para modificar a estrutura da biomassa celulósica possibilitando a conversão do polímero em açúcares fermentáveis quebrando sua estrutura cristalina (Figura 6).

Figura 6. Esquema de hidrólise ácida da celulose.



Fonte: Ogeda e Petri (2010).

A hidrólise utilizando diferentes ácidos tem sido usada com sucesso para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Destes o ácido sulfúrico, em concentrações inferiores a 4% em peso, é o mais usado nos estudos, por ser barato e eficaz, além de promover velocidades de reação elevadas e melhorar significativamente a hidrólise da celulose (KUMAR et al., 2009).

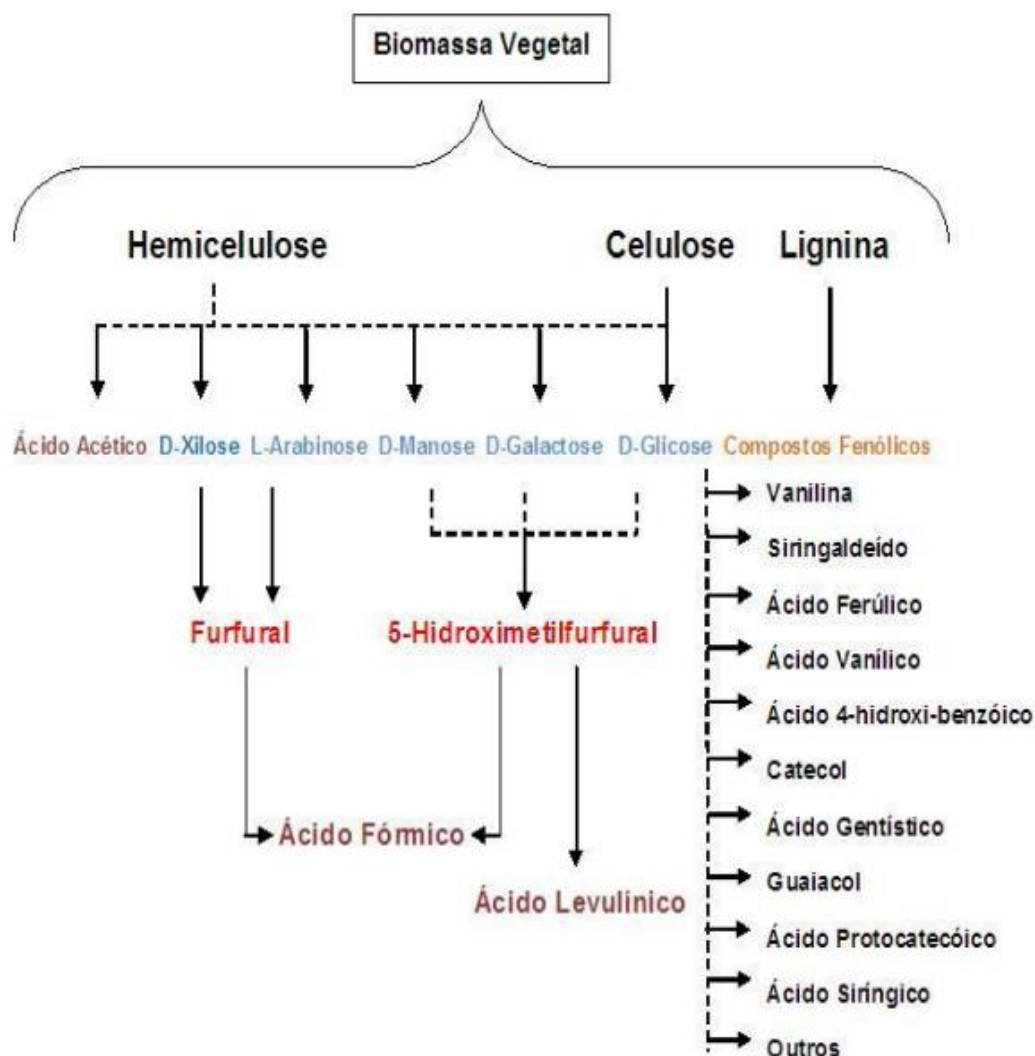
3.3.1 FORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Com a aplicação do pré-tratamento, ocorre a degradação de carboidratos e a formação de compostos inibidores da fermentação alcoólica o que torna necessária a desintoxicação para remoção dos compostos inibidores antes da fermentação (MAGALHÃES, 2011).

Os subprodutos tóxicos do pré-tratamento provêm basicamente de quatro fontes: compostos da degradação dos polissacarídeos, compostos da degradação

da lignina que são os principais compostos derivados da degradação de componentes estruturais da parede celular e íons de metais pesados (MAICHE; HUBER, 2010) (Figura 7).

Figura 7. Compostos formados durante a hidrólise ácida da biomassa vegetal.



Fonte: Fonseca (2009).

A hidrólise com ácido diluído é um método fácil e rápido de executar, mas é dificultada pela não seletividade e a formação de subprodutos. Durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, além dos açúcares, ácidos alifáticos (ácido acético, ácido fórmico e levulínico), os derivados de furano furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos são formados. Estes compostos são conhecidos por prejudicar o desempenho fermentativo de etanol (MAICHE; HUBER, 2010; CHANDEL et al., 2007).

3.3.2 DESINTOXICAÇÃO

A etapa de desintoxicação é de extrema importância uma vez que quanto menor o teor destes compostos, maiores as chances de ocorrer uma boa fermentação, já que esses são inibidores do metabolismo microbiano, prejudicando a conversão dos açúcares presentes no hidrolisado em produtos de interesse, como o etanol (MONTESI et al., 2013).

Há vários métodos de desintoxicação, como neutralização, supercalagem com hidróxido de cálcio (PURWADI et al., 2004), carvão ativado, íons de troca (CARVALHEIRO et al., 2005) e desintoxicação enzimática utilizando lacase (CHANDEL et al., 2007).

Montesi et al. (2013) avaliaram o desempenho fermentativo da levedura *Sheffersomyces stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (condições: 1% ácido sulfúrico (m/v) a 121°C por 20 minutos), tratado com membrana de fibras ocas. Eles conseguiram a remoção de ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis no máximo de 56,9; 83,3; 50,0; 22,8 (%), respectivamente. Apesar dos ótimos resultados que conseguiram com a desintoxicação, não obtiveram a produção de etanol pela levedura durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar desintoxicado com membrana de fibras ocas.

Chandel et al. (2007) testaram a desintoxicação com resina de troca iônica, com carvão ativado, tratamento de lacase, supercalagem e neutralizando o hidrolisado, com o bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com 2,5% (v/v) de HCl e rendeu 30,29 g/L de açúcares redutores totais e vários inibidores da fermentação, tais como furanos, compostos fenólicos e ácido acético. Após os tratamentos houve reduções máximas em furanos de 63,4% e compostos fenólicos totais de 75,8%, com carvão ativado reduziu 38,7% e 57,5% de furanos e fenólicos totais, respectivamente. A lacase reduziu os compostos fenólicos totais em 77,5% sem furanos e teor de ácido acético no hidrolisado. A fermentação destes hidrolisados foram realizados com *Candida shehatae* NCIM 3501, que produziu etanol com o hidrolisado tratado com troca iônica teve rendimento máximo de etanol (8,67 g/L), com carvão ativado (7,43 g/L), tratamento de lacase (6,50 g/L), supercalagem (5,19 g/L) e com o hidrolisado neutralizado (3,46 g/L).

Purwadi et al. (2004) utilizaram a desintoxicação de hidrolisados de resíduos

florestais suecos com ácido diluído com adição de Ca(OH)_2 (supercalagem) e cultivo dos hidrolisados desintoxicados por *Saccharomyces cerevisiae*. A supercalagem aumentou o pH dos hidrolisados para 9, 10, 11 ou 12 e foi mantido durante 90 min, a diferentes temperaturas de 30, 45 e 60 °C , seguido do reajuste do pH para 5. Aumentar o pH, tempo e/ou temperatura promoveu uma degradação mais eficaz de furanos e resultou em uma melhor capacidade de fermentação para ambos os hidrolisados testados, mas também foi observada uma maior perda de açúcares. A supercalagem de glicose e a solução de furfural a pH 12 promoveu uma redução rápida na concentração destes produtos, seguida por um processo de degradação lenta.

No trabalho de Mussato e Roberto (2004) foram testados tratamentos com cinco tipos de carvão ativado (pó e granulado) para a desintoxicação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com o objetivo de remover, por adsorção, compostos tóxicos que podem agir como inibidores no processo de bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*, atingindo os melhores rendimentos em xilitol quando o hidrolisado foi tratado com carvão ativo em pó de partículas de tamanho pequeno (0,043mm), com baixa granulometria e grande área superficial, características que favoreceram a adsorção dos compostos tóxicos.

3.4 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL

Tanto as bactérias quanto os bolores, actinomicetos e leveduras são micro-organismos largamente utilizados em processos fermentativos (NITZKE; BIEDRZYCKI, 2012).

Tradicionalmente, utilizam-se leveduras como agentes da fermentação alcoólica. Elas crescem bem em meio ácido e são anaeróbias facultativas. Os sucos de frutas são ótimos meios de crescimento de leveduras, favorecendo sua predominância no desenvolvimento de fermentações espontâneas (RABÊLO; OLIVEIRA, 2007). A levedura geralmente empregada em grande escala na indústria para a realização da fermentação, tanto do mosto de cana-de-açúcar, mosto de uva e fermentação de pães é a ascomicética gemulante, *Saccharomyces cerevisiae* (OMORI et al., 2011).

Pinheiro et al. (2009) realizaram um estudo sobre diversos micro-organismos produtores de álcool. Selecionaram-se apenas os capazes de utilizar glicerol como

principal fonte de carbono, os quais são: *Saccharomyces cerevisiae*, *Klebsiella pneumonia* e *Escherichia coli*.

3.4.1 ZYMOMONAS MOBILIS

A bactéria *Zymomonas mobilis* nos últimos 30 anos vem sendo muito estudada, pois apresenta um alto potencial para o desenvolvimento de processos alternativos que aumentem a rentabilidade e possui um alto rendimento da produção microbiológica de etanol, além de apresentar alta tolerância a elevadas concentrações de glicose e etanol (CAMÊLO, 2009).

Fisiologicamente a bactéria *Z. mobilis* é Gram-negativa, móvel e não esporulante também anaeróbia facultativa, com temperatura ideal de desenvolvimento entre 25 e 30 °C e valores de pH entre 5 e 7, sendo algumas linhagens obrigatoriamente anaeróbias. Apresenta-se na forma de bastonete curto e grosso medindo de 2,0 a 6,0 µm de comprimento e 1,0 a 1,4 µm de largura. Quando apresentam mobilidade possui de 1 a 4 flagelos polares (MADIGAN et al., 2010; ERNANDES, 2006; CAMILIOS NETO et al., 2005).

As bactérias alcoólicas da espécie *Z. mobilis* apresentam habilidades de transformar açúcares em etanol e gás carbônico, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras podendo produzir 1,9 mol de etanol por mol de glicose fermentada (ERNANDES; BOSCOLO; GARCIA-CRUZ, 2010).

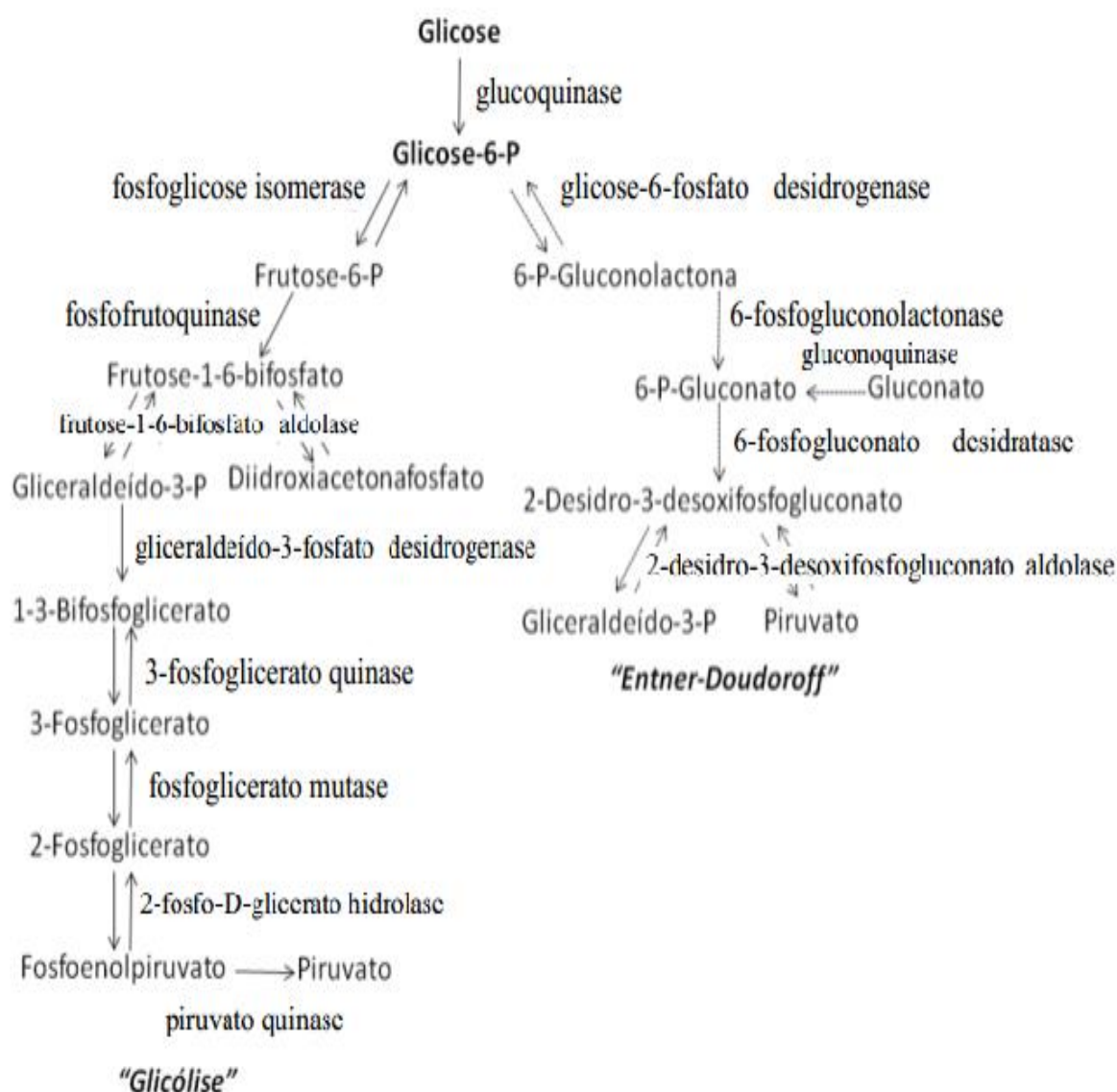
Z. mobilis é um micro-organismo obrigatoriamente fermentativo. Fermenta glicose, frutose e sacarose através de modificações na via de Entner-Doudoroff (ED) (Figura 8) (KALNENIEKS, 2006). Vários autores consideram *Z. mobilis* um excelente produtor de etanol, uma vez que apresenta um ciclo de fermentação rápida e com elevada eficiência; apresenta tolerância a elevadas concentrações de glicose, de sacarose e de etanol; apresenta bom rendimento em etanol tolerando pH entre 2,5 e 7,5. Esta produção de etanol é favorecida numa faixa de pH entre 4,5 e 7,0, pois o pH ideal varia de acordo com a cepa utilizada (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2009).

As *Z. mobilis* apresentam atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação alcoólica em escala industrial, por possuírem habilidades de transformar açúcares em etanol e gás carbônico, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras. Possuem, ainda, produtividade em etanol a partir de glicose acima de 97% do valor teórico máximo (ERNANDES; BOSCOLO;

GARCIA-CRUZ, 2010).

Para o crescimento desta bactéria as condições ideais são intervalos de temperatura de 30 a 36°C e intervalos de pH entre 5 e 7. Cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose presente em etanol, CO₂, lactato e outros, seguindo um balanço metabólico simples. Apenas 2% da glicose são utilizados para formar biomassa (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

Figura 8. Rota metabólica empregada por *Zymomonas mobilis* no metabolismo da glicose. Representa a via da Glicólise e a via Entner-Doudoroff.



Fonte: Omori et al. (2011).

Neto et al. (2005) estudaram a otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP4, durante a fermentação do melaço de cana-de-açúcar. Para a otimização do processo, aplicaram uma metodologia de superfície de resposta, sendo as variáveis independentes: concentração de açúcar redutor no melaço de 10,0, 55,0 e 100,0 g/L; concentração de extrato de levedura de 2,0, 11,0 e 20,0 g/L e tempo de fermentação de 6, 15 e 24 horas. Nos níveis estudados, a melhor condição para produção de etanol foi com 100 g/L de açúcar redutor no melaço, 2,0 g/L de extrato de levedura e com tempo de fermentação entre 20 e 24 horas que produziu 30 g/L de etanol.

Pinilla et al. (2011) isolaram duas cepas selvagens de *Zymomonas mobilis*, a partir do melaço de cana-de-açúcar. Selecionaram as melhores linhagens produtoras de etanol, utilizando parâmetros de produção de etanol obtidos com uma cepa de *Z. mobilis* comercial DSM 3580. Três estirpes isoladas foram cultivadas num meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona, glicose e sais, a um pH de 6 com temperatura de 32 °C com agitação de 65 rpm durante 62 h. Os melhores resultados que conseguiram para produção de etanol foi uma concentração máxima de 79,8 g/L. Identificaram as cepas isoladas como *Z. mobilis*, de acordo com a morfologia, testes bioquímicos e caracterização por PCR de sequências específicas de DNA de *Z. mobilis*. Avaliaram também o efeito de diferentes fontes para produção de etanol, os melhores resultados foram obtidos utilizando ureia com 0,7 g/L, a concentração máxima de etanol foi de 83,8 g/L, mostrando que a *Z. mobilis* é um excelente produtor de etanol.

3.4.2 PACHYSOLEN TANNOPHILUS

A levedura *Pachysolen tannophilus* foi a primeira levedura identificada por sua capacidade significativa para converter xilose em etanol (Figura 9). A *P. tannophilus* pode fermentar todos os açúcares comuns, exceto a L-arabinose. Do ponto de vista taxonômico, foi conhecida pela ciência há quase 50 anos, seguindo sua descrição por Boidin e Adzet em 1957. A sua relação com outros gêneros ascomiceto levedura é incerto (SLININGER; BOLEN; KURTZMAN, 1987).

No entanto, para ser empregada na fermentação e obter bons resultados, é necessário conhecer os parâmetros que podem melhorar sua fermentação, antes de aplicações industriais. Apesar de apresentarem rendimentos elevados com

concentrações baixas de D-xilose, diminuem com altas concentrações de açúcares tanto pentoses como hexoses. Além disso, vários subprodutos podem ser produzidos em detrimento do etanol, como xilitol, arabinol e ácido acético (MALESZKA; JAMES; SCHNEIDER, 1983). Temperaturas de incubação acima de 34 °C levam a uma diminuição significativa nos níveis de xilitol quando xilose for utilizada como substrato, sendo desviados principalmente à produção de etanol (HARNER et al., 2014).

Saharan e Sharma (2011) testaram três conjuntos de experimentos para observar a tolerância da *P. tannophilus* ao etanol, o primeiro grupo de culturas sem tratamento e serviu como controle. O segundo grupo foi tratado com etanol com concentrações de 10% durante 60 min. Um terceiro grupo foi tratado com concentrações de etanol de 10% durante 120 minutos. Observaram que etanol causa efeitos multifatoriais sobre a célula da levedura, suprimindo a biossíntese de macromoléculas, podendo causar desnaturação da proteína citoplasmática e redução na atividade de enzimas glicolíticas.

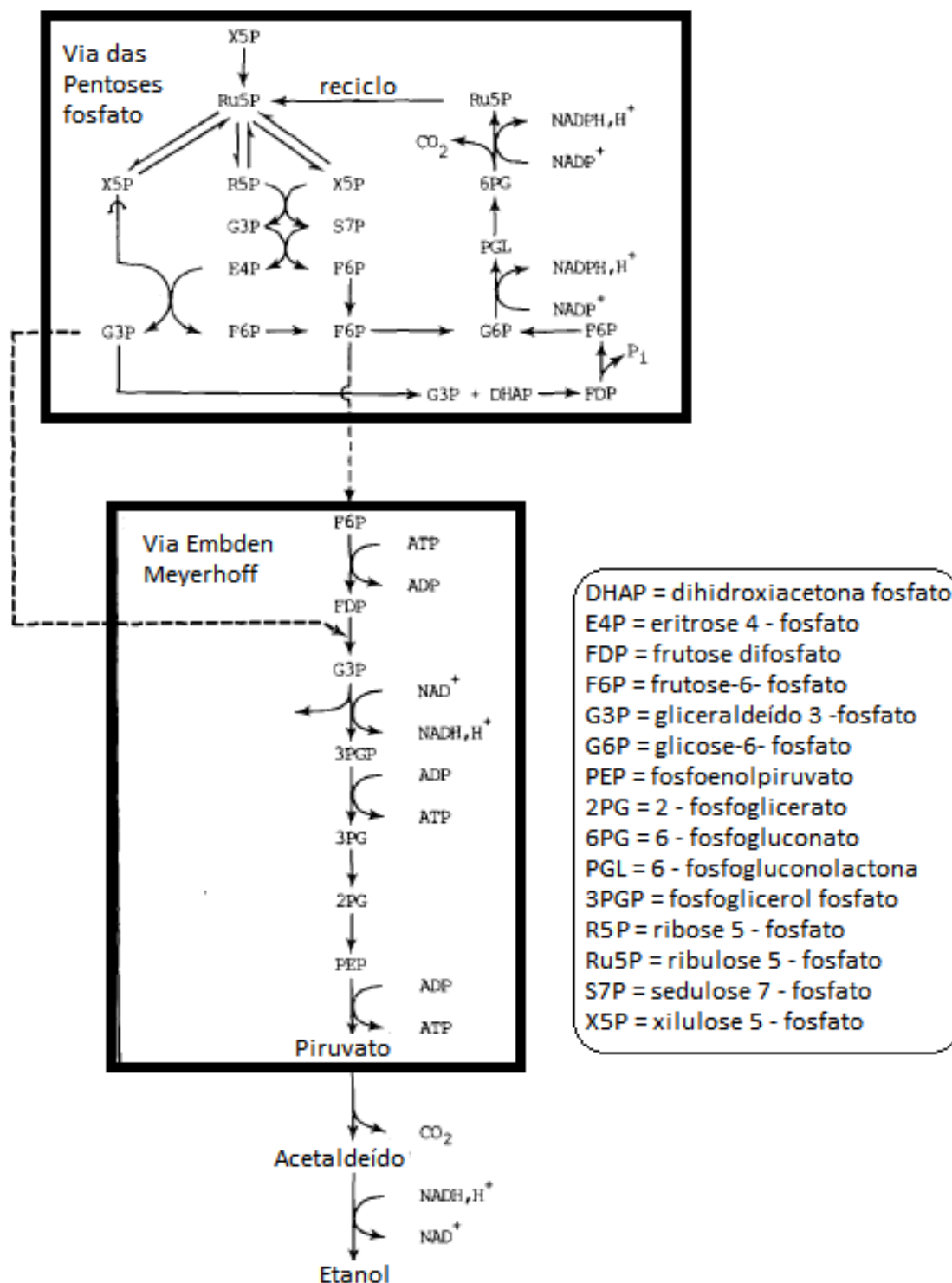
Sánchez et al. (2004) testaram a influência da temperatura na fermentação de D-xilose por *P. tannophilus* para produção de etanol e xilitol. Realizaram todos os experimentos em um reator mantendo constante o nível de arejamento e o pH do meio de cultura a 4,5. Os maiores valores para produção de etanol, 0,39 kg/kg de D-xilose, foi obtido nas fermentações realizadas na temperatura de 30°C.

Cheng et al. (2008) utilizaram o hidrolizado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido para fermentação pela cultura *Pachysolen tannophilus* DW06 e obtiveram 19 g/L de etanol.

A *P. tannophilus* provou ser um micro-organismo particularmente versátil, cujo metabolismo pode ser orientado para xilitol ou para a produção de etanol, de acordo com as condições das técnicas e pré-tratamentos para obtenção do hidrolizado (CONVERTI; PEREGO; DOMINGUEZ, 1999).

O metabolismo de xilose em *P. tannophilus* produz uma variedade de outros produtos, que incluem a massa celular, carbono, dióxido de carbono, etanol, ácido acético e polissacarídeos. Os rendimentos dos produtos são dependentes da regulação do fluxo de carbono disponíveis através das rotas metabólicas.

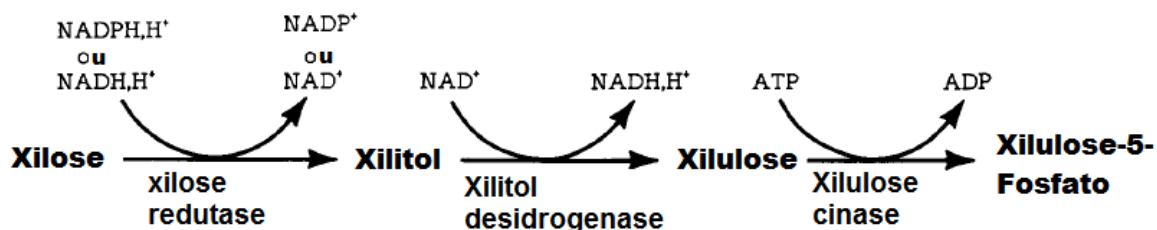
Figura 9. Rota metabólica empregada por *P. tannophilus* no metabolismo de pentoses. Representa a via das pentoses fosfato e a via Embden-Meyerhoff.



Fonte: Adaptado de Slininger et al. (1987).

Uma vez que a xilulose-5-fosfato é formada a partir de xilose (Figura 10), seu metabolismo envolve três grandes sistemas enzimáticos, incluindo a fosfato pentose, a Via Embden-Meyerhoff (Figura 9) e a Via dos ácidos tricarboxílicos (SLININGER et al., 1987).

Figura 10. Rota metabólica empregada por *P. tannophilus* no metabolismo de pentoses. Representa a via das pentoses fosfato e a via Embden-Meyerhoff.



Fonte: Adaptado de Slininger et al. (1987).

3.5 CONSÓRCIO DE MICRO-ORGANISMOS

O consórcio é um bioprocesso com muito potencial, se não houver interações cruzadas entre os micro-organismos e se cada micro-organismo estiver metabolizando o substrato correspondente, a fermentação não é afetada pela presença de outros micro-organismos (PARK et al., 2012).

Em um consórcio, dois ou mais micro-organismos, um para a glicose e um para a xilose, são cultivados em conjunto para se desenvolverem simultaneamente no mesmo meio. A utilização de consórcios para a produção de etanol parece ser vantajosa, em relação às culturas com apenas um micro-organismo, uma vez que existe potencial para a ação sinérgica dos caminhos metabólicos de todas as cepas envolvidas (DHABHAI et al., 2013).

O sistema de consórcio ou co-cultura pode ser considerado como uma alternativa mais econômica para produzir etanol de segunda geração, uma vez que possibilita a fermentação de hexoses e pentoses, usando micro-organismos diferentes no mesmo meio de cultura em lugar de apenas um (TRAN et al., 2013).

Singh et al. (2014) investigaram a produção de bioetanol a partir do hidrolisado da biomassa lignocelulósica de grama holandesa (*Saccharum spontaneum*) utilizando o consórcio de *Pichia stipitis* e *Zymomonas mobilis*. As células de *P. stipitis* foram inoculadas nos meios de fermentação (rico em xilose) e

após as células *Z. mobilis* no mesmo recipiente. Eles compararam a cinética dos meios sintético e com o hidrolisado. Foi observado um melhor aproveitamento destes açúcares (> 95%) e encontraram bom rendimento em etanol.

No trabalho de Park et al. (2012) em que realizaram um consórcio com *Acremonium cellulolyticus* e *Saccharomyces cerevisiae*, observaram que as células de *A. cellulolyticus* produziram celulase utilizando *Solka - Floc* (SF) na forma de um substrato indutor de celulase. A celulase produzida sacarificou o SF, liberando açúcares redutores que foram convertidos em etanol por *S. cerevisiae*. Estas fermentações foram realizadas com os dois micro-organismos diferentes num único reator, sem adição de celulase, nem qualquer tratamento prévio de celulose. Eles consideraram que o processo de produção de bioetanol com dois micro-organismos diferentes poderia ser uma estratégia alternativa para a produção de bioetanol utilizando biomassa de forma prática.

Fu e Peiris (2008) utilizaram uma mistura de açúcares glicose e xilose (simulando um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar) e aplicaram o consórcio *Pachysolen tannophilus* e *Zymomonas mobilis* para produção de etanol. A produtividade volumétrica de etanol de *Z. mobilis* foi de 98% do valor teórico. *P. tannophilus* proporcionou uma produtividade volumétrica de 29% do valor teórico. Durante a otimização do consórcio com a mistura de açúcares, o consórcio aumentou o rendimento de etanol a partir da xilose. A glicose e xilose foram completamente utilizadas e não foi encontrado açúcar residual no meio final da fermentação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biopolímeros, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE – UNESP, Campus de São José do Rio Preto/SP.

4.1 HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-ÁÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) foi cedido pela empresa Bunge - Açúcar Cristal. O bagaço foi seco em estufa a 60°C por um dia e depois triturado em liquidificador doméstico, para melhorar a eficiência da hidrólise ácida e posteriormente foi peneirado para homogeneização do tamanho de partícula. Para todos os ensaios de hidrólise ácida, bem como de fermentação, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL da diluição correspondente do ácido sulfúrico e 10 g de bagaço triturado, adaptado de Sun e Cheng (2002) seguiu-se a mesma proporção de 50 mL de ácido diluído para 10 g da amostra, pois ao obter o resultado pela curva de calibração multiplicou-se pela diluição que foi aplicada 1:2, devido a característica do bagaço.

Para a hidrólise foram utilizados 30 frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 10 g de bagaço de cana-de-açúcar e 100 mL de ácido sulfúrico. As concentrações utilizadas foram 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0%, aquecidas durante 15 e 30 minutos em autoclave a 121°C. O mesmo experimento foi realizado à temperatura ambiente por 12 e 24 horas. O pH foi ajustado para 5 e após centrifugação 3600 g por 15 min foram coletadas alíquotas de 5 mL para análise. Os tratamentos foram realizados em triplicata.

O hidrolisado obtido foi submetido a 70°C em banho maria até atingir a concentração necessária para utilização como substrato para fermentação nas concentrações de 5, 10 e 15% (equação 1).

4.2 DESINTOXICAÇÃO

Após a hidrólise, ao hidrolisado foi adicionado 1 g de carvão ativado para cada 40 g do hidrolisado e agitado a 200 rpm por uma hora a 30°C. Em seguida foi centrifugado com 2000g por 30 min. e filtrado em papel filtro watman N° 4, de acordo com o método proposto por Mussato e Roberto, (2004). Após a desintoxicação o hidrolisado passou por processo de concentração, em banho maria a 70 °C.

4.3 MEIO DE MANUTENÇÃO

4.3.1 ZYMOMONAS MOBILIS

A bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP. A linhagem bacteriana foi mantida em geladeira a 4°C, após o crescimento em estufa a 30°C por 24 horas em meio de manutenção composto por: 20 g/L de glicose, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona, em pH 6. Foi repicada mensalmente.

4.3.2 PACHYSOLEN TANNOPHILUS

A levedura *Pachysolen tannophilus* CCT1891 foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP. A levedura foi mantida em geladeira a 4°C, após o crescimento em estufa a 28°C por 48 horas em meio de manutenção composto por: 3 g/L de malte, 10 g/L de dextrose, 3 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona, 20 g/L de ágar em pH 5,0. Foi repicada mensalmente para sua manutenção.

4.3.3 CONSÓRCIO

A pré-fermentação para o consórcio foi realizada com os micro-organismos separados, como especificado nos itens 4.3.1 e 4.3.2. Então os micro-organismos foram inoculados, ao mesmo tempo, para a fermentação etanólica ao início desta.

4.4 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.4.1 PRÉ-FERMENTAÇÃO

A partir das culturas de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* armazenadas em geladeira, em meio de manutenção, foi feito o pré-inóculo para a reativação das células. Uma alçada de cada cepa foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de manutenção, descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2 sem a adição de ágar. Estes foram incubados em estufa a 30°C, por 24 horas, o mesmo foi feito para o consórcio. Após a etapa de reativação das células, estas foram transferidas para frascos erlenmeyer de 250 mL com volume de trabalho de 50 mL e incubados em shaker rotatório com temperatura controlada de 30°C e agitação de 200 rpm por 24 h.

4.4.2 FERMENTAÇÃO

4.4.2.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

As suspensões celulares de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* obtidas na pré-fermentação (item 4.4.1) foram diluídas com água destilada estéril de forma a se obter uma suspensão com absorvância da ordem de 0,300 a 570 nm, para cada micro-organismo. Separadamente, foi construída uma curva de calibração relacionando a absorvância com diferentes concentrações da suspensão celular de *Z. mobilis* e *P. tannophilus*. Assim, foi possível calcular o inóculo inicial de células a ser transferida para os frascos de fermentação (0,1 mg/mL de células de cada micro-organismo e total de 0,2 mg/mL inoculado para o consórcio, 0,1 mg/mL de cada micro-organismo). 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.

4.5 MEIO DE FERMENTAÇÃO

4.5.1 MEIO GLICOSE (MG)

O meio contendo glicose (sintético) foi semelhante ao definido por Rodriguez e Callieri (1986), com algumas modificações, cuja composição, foi: 50, 100 e 150 g/L (5, 10 e 15%) de glicose, 5 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Foram previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL com volume de trabalho de 25 mL.

4.5.2 MEIO CONTENDO O HIDROLISADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.5.2.1 MEIO HIDROLISADO SEM DESINTOXICAÇÃO (MHSD)

O meio com o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar sem a desintoxicação, após a determinação dos teores de açúcares totais do caldo da biomassa foram ajustados para 5, 10 e 15% com água destilada, utilizando um refratômetro modelo Carl Zeiss.

Os frascos de Erlenmeyer de 125 mL com volume de trabalho de 25 mL, contendo o caldo das biomassas com a concentração de sólidos totais adequada foram esterilizados separadamente do meio de sais, a 121°C em autoclave, por 20 minutos. Logo após foi adicionado o meio com sais estéril, (sem a fonte de carbono), de composição semelhante à apresentada no item 4.5.1, até completar o volume desejado. O pH inicial do meio foi ajustado para 4,5; 5,5 e 6,5 com NaOH, respectivamente.

4.5.2.2 MEIO HIDROLISADO DESINTOXICADO (MHD)

Após o processo de desintoxicação foi determinado o teor de sólidos totais do hidrolisado e ajustado para 5, 10 e 15%, respectivamente, com adição de água destilada, utilizando um refratômetro modelo Carl Zeiss, seguindo com os procedimentos apresentados no item 4.5.2.1.

Para calcular a concentração do hidrolisado, aplicou-se a equação 1:

Concentração

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

(Equação 1)

Onde:

C_i = Concentração inicial (% e/ou °Brix); C_f = Concentração final (% e/ou °Brix); V_i = Volume inicial (mL); V_f = Volume final (mL).

4.5.3 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA FERMENTAÇÃO

A matriz do delineamento experimental, que contemplou as 9 combinações em triplicata, para cada fermentação, como proposto por Box *et al.* (1978) e os resultados experimentais para análise da produção etanol, por *P. tannophilus* e *Z. mobilis*, estão representados pela tabela 1.

Tabela 1 – Delineamento experimental, contendo as variáveis independentes, estudadas para a produção de etanol, por *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

| Fator | Níveis | | |
|-------------------|--------|----|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| Tempo (h) | 24 | 48 | 72 |
| Temperatura (°C) | 25 | 30 | 35 |
| Agitação (rpm) | 0 | 75 | 150 |
| [] Substrato (%) | 5 | 10 | 15 |

4.5.4 CINÉTICA DAS FERMENTAÇÕES

A cinética foi realizada com os três meios (MG, MHSD e MHD), aplicando temperatura de 30 °C, pH 5,5, com 15% de concentração do substrato, sem agitação no período de 24 h monitoradas a cada 2 h. Para cada micro-organismo individualmente.

A cinética da fermentação aplicando o consórcio, também foi realizada com os três meios (MG, MHSD e MHD), variando apenas o pH e a concentração do substrato (pH 4,5 com 5% de concentração do substrato e pH 6,5 com 15% de concentração do substrato) incubado em temperatura de 30 °C, sem agitação, tempo de 24 h com monitoramento a cada 2h.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

A determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada segundo as Normas do Instituto Adolfo Lutz (2005), que se fundamentam na perda de peso do produto, submetido ao aquecimento a 105°C.

4.6.2 GRANULOMETRIA

A determinação da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar, foi realizada após a secagem e trituração do bagaço. As partículas utilizadas foram padronizadas com tamanho igual ou inferior a 1,2 mm referente a malha ABNT Tyler nº 16, as partículas maiores foram trituradas novamente até o tamanho desejado.

4.6.3 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de cada ensaio foram colhidas a cada 24 horas de fermentação. Inicialmente, foi determinado o valor de pH final do caldo de fermentação e, em seguida, 10 mL do caldo foi centrifugado a 3600 g, temperatura de 25°C, durante 15 minutos, para a medição da concentração celular em espectrofotômetro.

4.6.4 DETERMINAÇÃO DO PH FINAL

O pH final foi determinado diretamente no caldo fermentado por potenciometria em pHmetro Digimed modelo DM20.

4.6.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular foi monitorada através da absorbância no espectrofotômetro de suspensões diluídas com água destilada após centrifugação (3600 g), num comprimento de onda de 570 nm, para ambos os micro-organismos. A conversão da suspensão em concentração (massa de matéria seca por unidade de

volume) foi obtida por meio de uma curva de calibração da concentração celular de suspensões de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* e para o consórcio por densidade ótica (Apêndices D, E e F, respectivamente) .

4.6.6 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 et al. (1956). Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda desejado para cada método utilizado, tendo como base amostras de açúcares com concentrações conhecidas para construção de uma curva de calibração (Apêndices B e A, respectivamente).

4.6.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado, antes e após o processo de desintoxicação, por espectrofotometria utilizando reagente de Folin-Ciocalteu e curva padrão de ácido vanílico (Apêndice C), conforme método descrito por Chaovanalikit e Wrolstad (2004). Este método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina. A cor azul produzida pela redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos foi medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 755 nm.

4.6.8 DETERMINAÇÃO DE ETANOL

Foi utilizado método proposto por Kaye e Haag (1954), o qual, baseia-se na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido. Foi determinada a absorvância das amostras em espectrofotômetro num comprimento de onda de 600 nm. A concentração de etanol foi determinada utilizando a curva de calibração obtida a partir de soluções de etanol diluído em água destilada, nas concentrações de 7,9 a 71,0 mg/mL (Apêndice G).

4.6.9 CÁLCULO DE PRODUTIVIDADE

A produtividade foi determinada na fase exponencial de crescimento de

acordo com a equação 2 por meio dos dados que foram obtidos nos gráficos de produção de etanol em função do tempo.

Produtividade

$$P = \frac{(P_f - P_0)}{(t_f - t_0)} \quad (\text{g/L.h})$$

(Equação 2)

Onde:

P = produtividade; P₀ = massa produto de inicial (g/L); P_f = massa de produto final (g/L); t_f = tempo (h); t₀ = tempo inicial (h).

4.6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados e os efeitos principais e interações entre as variáveis do planejamento fatorial foram realizados utilizando o programa computacional Minitab 16 Statistical Software e Statistica 7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA

A umidade foi determinada na amostra de bagaço de cana-de-açúcar antes de ser triturada para obtenção do hidrolisado. A umidade total foi de 15,7% aplicando a metodologia do item 4.6.1. A trituração do bagaço foi necessária, uma vez que, resíduos agroindustriais têm de ser triturados pela combinação dos tratamentos mecânicos lascas, triturar e moer para reduzir o tamanho e cristalinidade das fibras de celulose antes de qualquer tratamento (EL-TAYEB *et al.*, 2012). Além disso, tratamentos mecânicos, como a pulverização ou grau de serragem, afetam as cadeias de lignina e auxiliam na solubilização (HYVARINEN *et al.*, 2014).

A hidrólise foi padronizada com ácido sulfúrico diluído na concentração de 2% (v/v) com aquecimento de 15 minutos em autoclave a temperatura de 121°C da solução ácido com bagaço de cana-de-açúcar. Esta escolha foi baseada nos resultados da liberação de AT, AR e CFT. A Tabela 2 mostra os valores de significância estatística ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo, temperatura e concentração de ácido.

Tabela 2 – Valores de significância estatística (p) para AT, AR e CFT relacionados com a temperatura de 121°C e ambiente, tempo de 15, 30 minutos, 12 e 24 horas a temperatura ambiente e as diferentes concentrações de ácido sulfúrico testadas.

| Fatores | valor - p | | |
|---------|-------------|-------------|-----------------------|
| | Tempo | Temperatura | Concentração do ácido |
| AT | 0,000 | 0,000 | 0,130 |
| AR | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| CFT | 0,000 | 0,000 | 1,000 |

(AT)= Açúcares Totais; (AR)= Açúcares Redutores; (CF)= Compostos Fênicos.

As variáveis tempo e temperatura foram significativas, enquanto que a concentração do ácido foi significativa apenas para AR, o que permitiu escolher o tratamento com menor concentração de ácido (2%) considerando a concentração de AT e AR com valores próximos ao maior resultado obtido com maior concentração do ácido (4%).

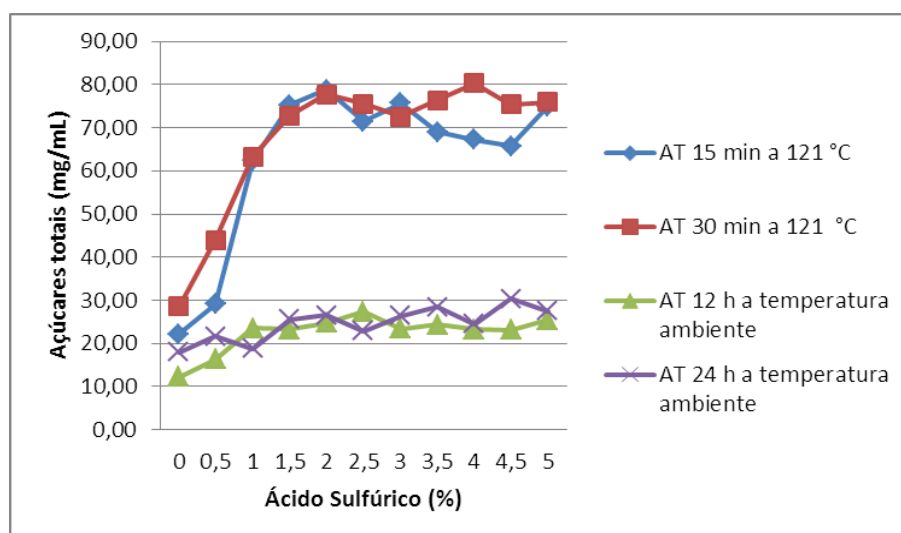
Saha et al. (2005) apontam que o pré-tratamento com ácido diluído em baixa temperatura (121 °C) ajuda a evitar a degradação dos açúcares, formando o furfural e hidroximetilfurfural.

5.1.1 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS, REDUTORES E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para cada tratamento da hidrólise ácida do bagaço foram realizadas as análises para os AR, AT e CFT, de acordo com os métodos descritos no itens 4.6.6. e 4.6.7, respectivamente.

A Figura 11 e a Tabela 3 mostram as quantidades de AT obtidos após a hidrólise especificando todas as concentrações de ácido utilizadas, em todos os tempos e temperaturas. Pode-se observar que a maior liberação de AT foi de 80,3 mg/mL, com concentração de 4% (v/v) de ácido sulfúrico, 30 minutos em autoclave a 121°C. Entretanto para otimizar a hidrólise foi padronizada em 2% (v/v) de ácido sulfúrico e 15 minutos de aquecimento em 121°C, condições em que a liberação de AT foi de 78,7 mg/mL, pois não teve diferença significativa entre estes valores. Além de que serão utilizadas menor concentração de ácido e menor tempo em autoclave.

Figura 11. AT liberados por hidrólise em diferentes concentrações de ácido, tempo e temperatura.



Os menores resultados de AT obtidos a temperatura ambiente foram nos tratamentos com água (0% v/v de H₂SO₄), em 12 horas (12,2 mg/mL) e com o tempo de 24 horas (17,9 mg/mL) (Tabela 3).

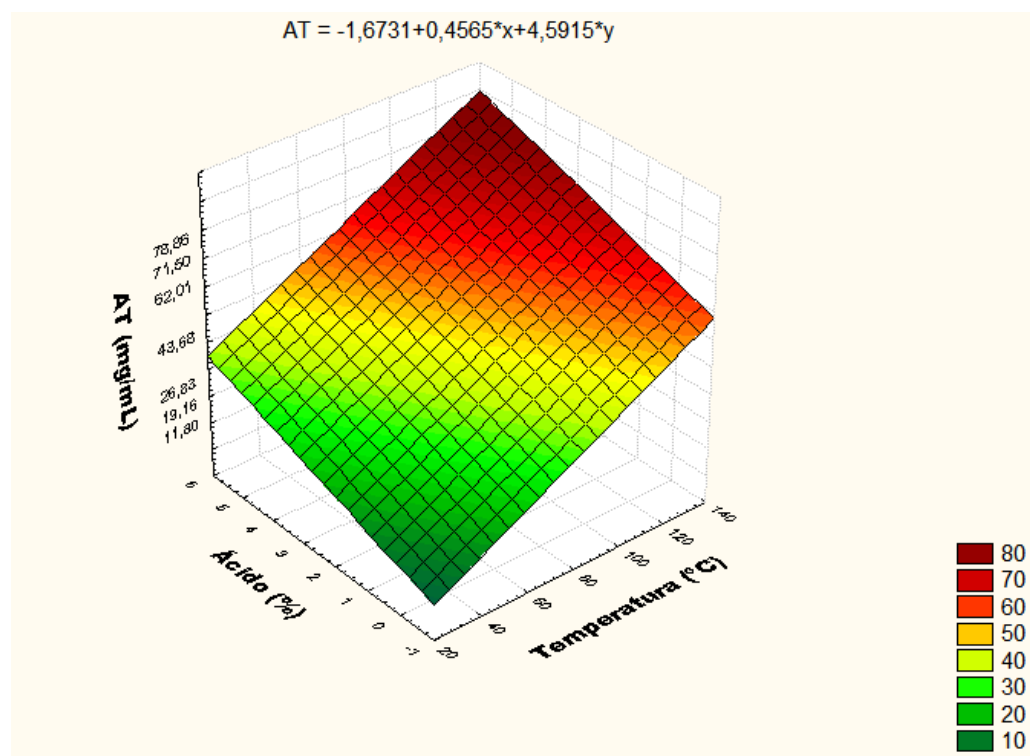
Tabela 3 – AT (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de ácido sulfúrico, tempos de autoclave e temperatura ambiente.

| H ₂ SO ₄ (%) | 15 min/121°C (mg/mL) | DP | 30 min/121°C (mg/mL) | DP | 12 horas (mg/mL) | DP | 24 horas (mg/mL) | DP |
|------------------------------------|----------------------|------|----------------------|------|------------------|------|------------------|------|
| 0 | 22,20 | 0,38 | 28,59 | 1,28 | 12,23 | 0,60 | 17,93 | 1,73 |
| 0,5 | 29,13 | 3,09 | 44,00 | 0,45 | 16,33 | 3,09 | 21,61 | 0,45 |
| 1 | 62,39 | 0,23 | 63,24 | 0,38 | 23,48 | 0,53 | 18,79 | 0,83 |
| 1,5 | 75,23 | 0,60 | 72,83 | 1,88 | 23,21 | 0,60 | 25,56 | 0,90 |
| 2 | 78,86 | 0,60 | 77,74 | 0,38 | 24,76 | 0,98 | 26,57 | 0,38 |
| 2,5 | 71,50 | 3,17 | 75,55 | 1,51 | 27,31 | 0,68 | 22,84 | 0,83 |
| 3 | 75,66 | 0,90 | 72,57 | 0,75 | 23,42 | 0,90 | 26,41 | 1,21 |
| 3,5 | 69,05 | 1,06 | 76,30 | 0,90 | 24,28 | 0,45 | 28,38 | 0,98 |
| 4 | 67,18 | 0,53 | 80,35 | 1,81 | 23,21 | 0,15 | 24,44 | 0,98 |
| 4,5 | 65,69 | 5,20 | 75,34 | 1,51 | 23,05 | 0,83 | 30,35 | 0,60 |
| 5 | 74,96 | 0,98 | 75,98 | 1,96 | 25,4 | 1,28 | 27,47 | 0,30 |

(DP)=Desvio Padrão.

A Figura 12 mostra que a aplicação da temperatura (121 °C) foi necessária para maior liberação de açúcares totais.

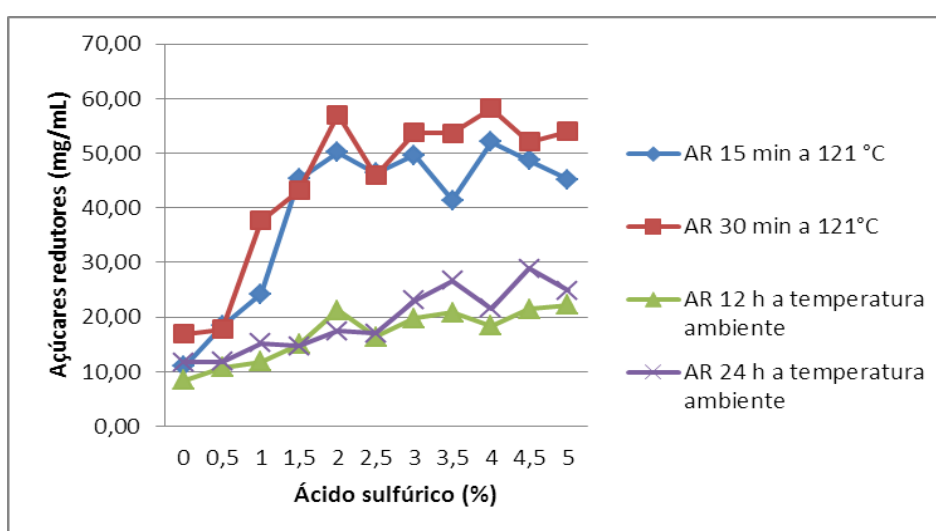
Figura 12. Superfície de resposta para liberação de Açúcares totais pela hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar utilizando as variáveis temperatura de 121°C e ambiente (~30°C) e concentrações de ácido (0-5%).



A determinação de AR está representada na Figura 13 e Tabela 4 observou-se que nas mesmas condições de tempo, temperatura e concentrações de ácido

sulfúrico, a aplicação de temperatura também foi necessária para um melhor rendimento. Porém nos ensaios de 12 e 24 horas em temperatura ambiente com maior concentração de ácido (entre 4 e 5%) houve maior liberação de AR em relação aos ensaios com maior temperatura e menor concentração de ácido (0, 0,5 e 1% v/v) o que não ocorre para os açúcares totais. Na Figura 13 é possível observar que a aplicação de temperatura de 121°C foi mais eficiente para liberar maior quantidade de AR.

Figura 13. AR com diferentes concentrações de ácido, tempo e temperatura.



Nesta mesma Figura 13, a menor liberação de AR também foi com água (0% v/v de H₂SO₄) nos tempos de 12 e 24 horas em temperatura ambiente (Tabela 4).

Tabela 4 – AR (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de ácido sulfúrico e tempos de autoclave.

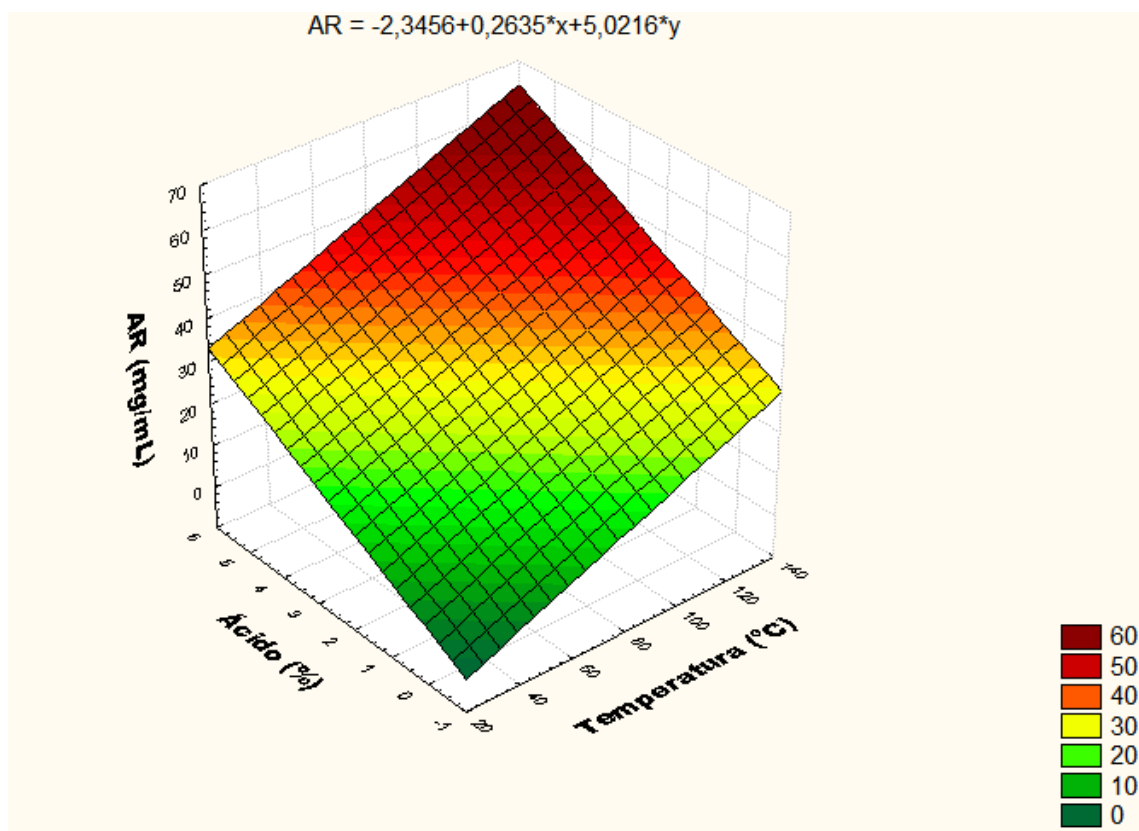
| H ₂ SO ₄ (%) | 15 min (mg/mL) | DP | 30 min (mg/mL) | DP | 12 horas (mg/mL) | DP | 24 horas (mg/mL) | DP |
|------------------------------------|----------------|------|----------------|------|------------------|------|------------------|------|
| 0 | 11,03 | 0,12 | 16,92 | 2,50 | 8,42 | 1,19 | 11,7 | 2,26 |
| 0,5 | 18,36 | 2,38 | 17,77 | 5,12 | 10,78 | 0,24 | 11,87 | 1,55 |
| 1 | 24,25 | 0,95 | 37,72 | 5,95 | 11,87 | 2,50 | 15,24 | 2,98 |
| 1,5 | 45,30 | 1,91 | 43,20 | 2,98 | 14,99 | 0,48 | 14,65 | 0,71 |
| 2 | 50,19 | 0,48 | 57,09 | 4,05 | 21,22 | 2,14 | 17,43 | 1,79 |
| 2,5 | 46,31 | 0,95 | 45,98 | 3,10 | 16,34 | 1,43 | 17,01 | 0,95 |
| 3 | 49,60 | 1,55 | 53,81 | 2,50 | 19,79 | 1,31 | 23,07 | 1,67 |
| 3,5 | 41,43 | 2,14 | 53,64 | 1,79 | 20,88 | 0,71 | 26,69 | 1,79 |
| 4 | 52,12 | 7,74 | 58,18 | 1,07 | 18,44 | 1,79 | 21,56 | 0,95 |
| 4,5 | 48,67 | 2,86 | 52,12 | 1,79 | 21,47 | 0,83 | 28,88 | 3,45 |
| 5 | 45,22 | 3,22 | 53,97 | 6,07 | 22,23 | 0,95 | 24,84 | 1,79 |

(DP)= Desvio Padrão.

A Figura 14 mostra o efeito da temperatura e concentração de ácido ambas

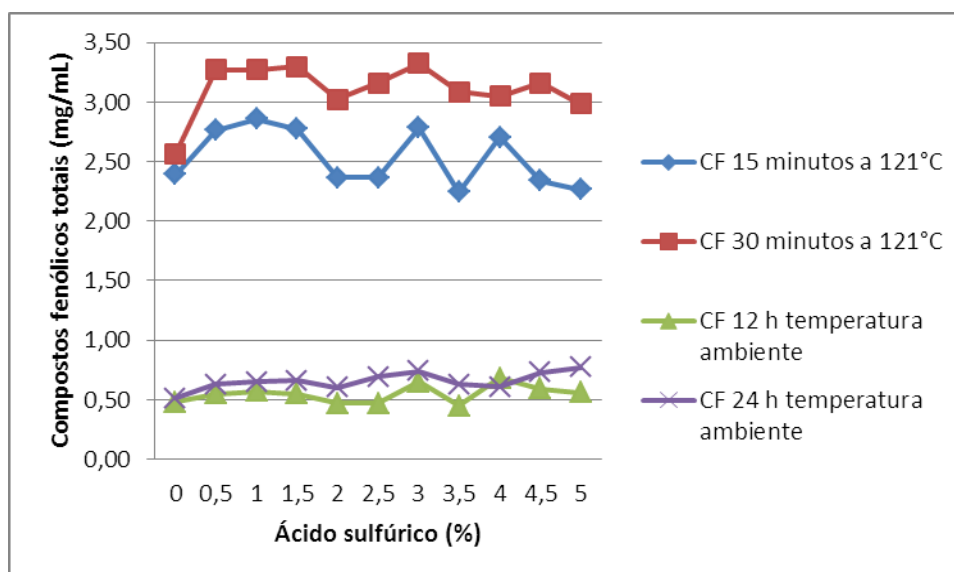
variáveis independentes têm efeitos crescentes nas maiores concentrações de ácido.

Figura 14. Superfície de resposta para liberação de AR pela hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar utilizando as variáveis temperaturas de 121°C e ambiente (~30°C) e concentrações de ácido (0-5%).



A Figura 15 mostra que a liberação de CFT também foi maior na temperatura de 121°C empregando as mesmas condições dos AT e AR. Porém manteve-se estável independente da concentração de ácido, aumentando apenas com o tempo em autoclave. Estes dados foram importantes para a padronização da hidrólise, pois optando por um tempo menor em autoclave liberou-se menor quantidade de compostos fenólicos totais (2,4 mg/mL) (Tabela 5).

Figura 15. CFT com diferentes concentrações de ácido, tempo e temperaturas.



Os resultados de CFT foram maiores (3,3 mg/mL) com o tempo em autoclave (30 minutos a 121°C) e com 3% (v/v) de ácido e menor no tratamento em temperatura ambiente, com água (0% v/v de H₂SO₄) no tempo de 12 horas, porém a diferença entre os resultados obtidos sob as mesmas condições de tempo e temperatura não houve grande variação com a concentração v/v de ácido sulfúrico. (Tabela 5).

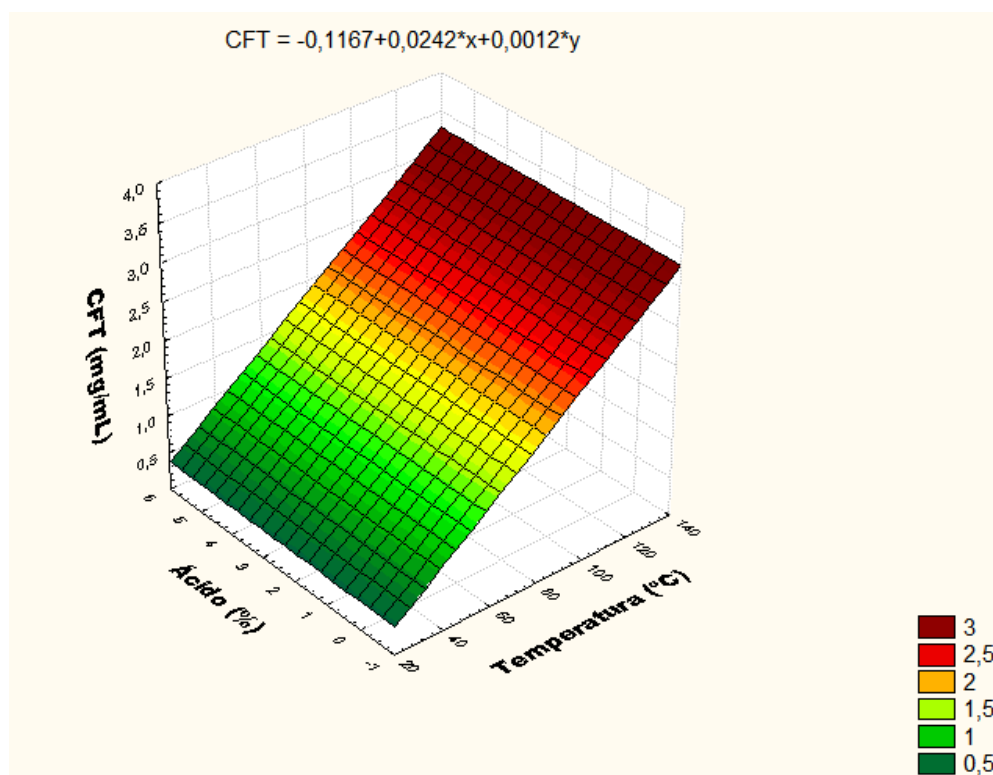
Tabela 5 – CFT (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de ácido sulfúrico e tempos em temperatura ambiente.

| H ₂ SO ₄ (%) | CFT 15 min (mg/mL) | DP | CFT 30 min (mg/mL) | DP | CFT 12 horas (mg/mL) | DP | CFT 24 horas (mg/mL) | DP |
|------------------------------------|--------------------|------|--------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
| 0 | 2,39 | 0,15 | 2,57 | 0,19 | 0,48 | 0,03 | 0,51 | 0,03 |
| 0,5 | 2,76 | 0,07 | 3,27 | 0,42 | 0,55 | 0,01 | 0,63 | 0,02 |
| 1 | 2,86 | 0,10 | 3,27 | 0,27 | 0,57 | 0,02 | 0,65 | 0,01 |
| 1,5 | 2,77 | 0,39 | 3,30 | 0,12 | 0,55 | 0,08 | 0,66 | 0,02 |
| 2 | 2,37 | 0,11 | 3,02 | 0,31 | 0,47 | 0,02 | 0,60 | 0,04 |
| 2,5 | 2,37 | 0,07 | 3,16 | 0,36 | 0,47 | 0,01 | 0,69 | 0,01 |
| 3 | 2,79 | 0,77 | 3,32 | 0,65 | 0,65 | 0,03 | 0,74 | 0,02 |
| 3,5 | 2,24 | 0,15 | 3,09 | 0,34 | 0,45 | 0,03 | 0,93 | 0,03 |
| 4 | 2,71 | 0,03 | 3,05 | 0,23 | 0,68 | 0,01 | 0,61 | 0,03 |
| 4,5 | 2,34 | 0,09 | 3,16 | 0,20 | 0,59 | 0,02 | 0,81 | 0,03 |
| 5 | 2,26 | 0,09 | 2,98 | 0,09 | 0,56 | 0,08 | 0,62 | 0,01 |

(DP)= Desvio Padrão.

A Figura 16 permite observar que a temperatura também foi necessária para o aumento da extração de compostos fenólicos, mas que não houve variações significativas em relação à concentração de ácido.

Figura 16. Superfície de resposta para produção de Compostos fenólicos totais pela hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar utilizando as variáveis temperatura de 121°C e ambiente (~30°C) e concentrações de ácido (0-5%).



Para a padronização do hidrolisado com 2% de ácido sulfúrico (v/v) também foram feitos testes com tempos de 10, 15, 20 e 25 minutos em autoclave a 121 °C e os dados representados na tabela 6 confirmam que a hidrólise em 15 minutos teve maior rendimento para a liberação de açúcares totais e redutores. Esta tabela 6 também mostra os resultados de compostos fenólicos que apresentaram valores semelhantes entre si.

Tabela 6 – Valores de AR, AT e CFT (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar com 2% de H₂SO₄ em diferentes tempos de autoclavagem.

| Tempo (min a 121°C) | AR(mg/mL) | DP | AT(mg/mL) | DP | CFT(mg/mL) | DP |
|---------------------|-----------|------|-----------|------|------------|-----|
| 10 | 49,46 | 0,93 | 76,08 | 0,49 | 2,70 | 0,3 |
| 15 | 56,30 | 1,12 | 81,66 | 0,27 | 2,29 | 0,1 |
| 20 | 47,60 | 0,76 | 76,01 | 0,99 | 2,27 | 0,2 |
| 25 | 55,57 | 1,35 | 75,27 | 0,61 | 2,45 | 0,2 |

(AT)= Açúcares Totais; (AR)= Açúcares Redutores; (CF)= Compostos Fénólicos e (DP)= Desvio Padrão.

Aguilar *et al.* (2002) estudaram a produção de xilose a partir da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar em várias temperaturas (100, 122 e 128 °C) e

concentrações de ácido (2%, 4% e 6%). Analisaram os resultados por modelos cinéticos que foram desenvolvidos para explicar a variação do tempo com relação a concentração de xilose, glicose, ácido acético e furfural gerados na hidrólise. As condições ótimas por eles encontradas foram de 2% (v/v) de H₂SO₄ a 122 °C durante 24 min, o que originou uma concentração de 21,6 g de xilose/L, 3 g/L de glicose, 0,5 g de furfural/L. As condições utilizadas para a hidrólise no presente trabalho foram semelhantes ao trabalho citado com apenas algumas variações de tempo (15 minutos) concentração de AT (81,7 mg/mL) e de compostos fenólicos (2,3 mg/mL), sem a etapa de concentração.

No trabalho de Chiesa e Gnansounou (2014), duas técnicas de pré-tratamento foram testadas, uma utilizando ácido diluído (H₂SO₄) e outra com solução alcalina diluída (NaOH). Estes métodos foram usados para a produção de etanol a partir de cachos de frutas da árvore de óleo de palma (dendê). Observaram o desempenho dos tratamentos sob diferentes condições. O tratamento com ácido a 161,5 °C, 9,4 min e 1,5% de H₂SO₄ (v/v) forneceu 85,5% (m/v) de glicose, ao contrário do tratamento com NaOH diluído com menor desempenho 42,6% (m/v) de glicose (2% v/v, 20 min a 158 °C). Comparando esses resultados com o presente trabalho, que utilizou pré-tratamento com ácido diluído a 2% (v/v) e 15 minutos de aquecimento, alcançou 72,8% (m/v) de açúcares totais com o bagaço de cana-de-açúcar, observa-se uma pequena diferença que pode ser devida à biomassa hidrolisada e a temperatura diferentes entre os trabalhos.

Morais e Broetto (2012) também trabalharam com a hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico e bagaço de cana-de-açúcar. As condições operacionais por eles aplicadas foram tempo de 15, 30, 45 e 60 min e concentração do ácido sulfúrico de 7,0 e 9,0 % (v/v), à temperatura de 121°C em autoclave. Testaram o bagaço *in natura* e pré-lavado. Verificaram que o tratamento para a liberação de AR, após o pré-tratamento do bagaço aos 30 e 45 min, nas concentrações de 7,0% de H₂SO₄, resultaram na liberação de 69,4% (m/v) de AR com bagaço *in natura* e 68,91% (m/v) de AR com o bagaço pré-lavado menor que no presente trabalho, que utilizando menor tempo e concentração de H₂SO₄, obteve 80,4% (m/v) de AR.

Avcı et al. (2013) estudaram uma estratégia de pré-tratamento com H₂SO₄ diluído para hidrolisar a palha de milho, com a finalidade de reduzir a geração de substâncias inibidoras, tais como o furfural e hidroximetil furfural, durante o pré-tratamento, de modo que a etapa de desintoxicação não fosse necessária antes da

fermentação, maximizando o rendimento de açúcar. As condições ideais por eles encontradas para o pré-tratamento da palha de milho (10%, m/v), foram 0,75% de H₂SO₄, 160 °C, e 0-5 min tempo de retenção. As condições foram escolhidas com base na libertação máxima de glicose, após a hidrólise enzimática uma etapa a mais do que a realizada neste trabalho, com perda mínima de pentoses e a formação mínima de produtos de degradação do açúcar.

A palha de milho pré-tratada após a sacarificação enzimática obteve 63,2 e 63,7 g/L de AT em um tempo de retenção de 0 e 5 min, respectivamente, com produção de furfural de 0,45 ± 0,1 ± 0,87 e 0,4 g/L (AVCI *et al.*, 2013). Neste trabalho sem a realizar a hidrólise enzimática e sem desintoxicação do hidrolisado foram obtidos 81,66 g/L de açúcares totais e 2,37 g/L de compostos fenólicos totais. Entretanto, as condições operacionais utilizadas foram diferentes (2% v/v de H₂SO₄, 15 minutos a 121°C). Quando foram utilizadas condições operacionais próximas às do trabalho de Avci *et al.* (2013), 29,1 g/L de açúcares totais e 2,8 g/L de compostos fenólicos totais (0,5% v/v de H₂SO₄, 15 minutos a 121 °C)., As diferenças de tempo (maior 15 minutos), concentração de ácido (maior 2% v/v), permitiram a utilização de uma temperatura menor (121 °C) para uma biomassa diferente, ou seja o bagaço de cana-de-açúcar (33,3% m/v de bagaço triturado).

Wei *et al.* (2012) utilizaram ácido sulfúrico diluído para pré-tratamento de cavacos de eucalipto antes da hidrólise enzimática. O maior valor de açúcares (xilose combinada com glicose, 47,7 g/100 g de matéria-prima, o que representa 82% m/m de açúcares totais na biomassa de eucalipto) foi obtido a 160 °C, concentração de ácido de 0,75% v/v e tempo de 10 min, consideraram ser as melhores condições razoáveis para o pré-tratamento com ácido diluído para hidrólise do eucalipto. As concentrações de ácido acético, de hidroximetilfurfural e furfural foram cerca de 2,0 g/L, 0,1 g/L e 1,4 g/L, respectivamente. As condições ideais deste trabalho foram semelhantes às do trabalho de Avci *et al.* (2013) pode-se observar que a concentração de ácido foi menor do que a do presente trabalho, porém foi necessário aplicar maior temperatura.

5.2 DESINTOXICAÇÃO DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Como consequência da hidrólise ácida com temperatura há a liberação de

compostos fenólicos que podem inibir a fermentação comprometendo a produção de etanol. A desintoxicação serve para reduzir estes compostos, além de outros componentes que podem interferir no desenvolvimento dos micro-organismos fermentadores. Desta forma, foram realizadas análises dos compostos fenólicos no hidrolisado antes de desintoxicar (SD), antes de concentrar o hidrolisado (SC) e depois da desintoxicação (D) e após a etapa de concentração (C). Os resultados para AT e AR e CFT estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação de AR, AT e CFT (mg/mL) liberados na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar antes e depois da desintoxicação e concentração.

| Hidrolisado | AR(mg/mL) | DP | AT(mg/mL) | DP | CF (mg/mL) | DP |
|-------------|-----------|------|-----------|------|---------------|------|
| SD/SC | 21,44 | 1,66 | 47,41 | 0,43 | 2,3 | 0,07 |
| D/ SC | 16,28 | 1,03 | 35,79 | 1,53 | 2,1 | 0,02 |
| SD/ C | 49,46 | 1,45 | 82,59 | 1,89 | 5,43 | 0,05 |
| D/ C | 35,34 | 1,23 | 61,30 | 1,55 | 4,01 | 0,02 |

(AT)= Açúcares Totais; (AR)= Açúcares Redutores; (CF)= Compostos Fénólicos; (DP)= Desvio Padrão; (SD)= Sem Desintoxicar; (SC)= Sem Concentrar; (D)= Desintoxicado e (C)= Concentrado.

Todos os resultados de AT, AR e CFT apresentaram concentração significativa ($p=0,000$) porque as concentrações, de todos, aumentaram na solução do hidrolisado, enquanto que, após a desintoxicação para AT ($p=0,118$), AR ($p=0,226$) e CFT ($p=0,295$), foram reduzidos apresentando $p \geq 0,05$. Para utilização do hidrolisado como substrato nos meios de fermentação foi necessário realizar a etapa de concentração e foram testados sem e com desintoxicação para ambos os micro-organismos utilizados.

A partir do hidrolisado de cavacos de eucalipto da espécie *Eucalyptus grandis*, Carvalho et al. (2005) estudaram uma metodologia de tratamento de desintoxicação visando a redução dos compostos tóxicos provenientes do processo de hidrólise ácida, com a alteração do pH original dos hidrolisados de 1,80 para 7,0 pela adição de CaO com a adsorção em carvão ativo em proporções de 1% ou 5%, considerando as variações de tempo (30 e 60 min) e temperatura (30 e 60 °C). Com a finalidade de remover compostos inibidores do metabolismo microbiano, constataram que as melhores remoções destes compostos foram de 32,2% para o ácido acético, 100% para furfural, 100% para 5-hidroximetilfurfural e 92,2% para os compostos aromáticos derivados da degradação da lignina e dos extrativos da madeira. O presente trabalho teve uma remoção de 26,2% dos compostos fenólicos, provavelmente, devido a mudança do pH que colaborou para eliminar mais

efetivamente estes compostos. As menores reduções encontradas por estes mesmos autores foram de 36,5; 35,4 e 26,5%, respectivamente, nos ensaios em que os hidrolisados foram tratados em pH ácido com a menor porcentagem de carvão ativo (1%), valor um pouco menor do que o encontrado no presente trabalho que utilizou 2,5% de carvão ativo.

Millati et al. (2002) pesquisaram os efeitos de diversas variáveis na desintoxicação de um hidrolisado ácido diluído. A supercalagem foi realizada com o aumento do pH para 10, 11 ou 12, em duas temperaturas diferentes, 25 e 60 °C, mantendo o pH e a temperatura em valores constantes para diferentes períodos de tempo, 0, 1, 20 e 170 h, em seguida ajustaram o pH para 5,5. Observaram que efeito mais significativo da calagem excessiva foi uma diminuição acentuada na concentração de furfural e hidroximetilfurfural, e que a diminuição de compostos fenólicos totais foi inferior a 30%. Porém a diminuição da concentração do açúcar durante supercalagem foi um problema sério, a pH 12, especialmente à temperatura mais elevada, em que até 70% de açúcares foram degradadas. Diferente do presente trabalho que com o tratamento aplicado teve redução de 25,8% de açúcares totais e 28,6% de açúcares redutores. Devido à esta perda de açúcares e a desintoxicação não ser significativa (p 0,118 para AT), caso o carvão ativo não tenha a granulometria adequada pode afetar a qualidade do hidrolisado. Porém para alguns micro-organismos a desintoxicação é importante para que suas atividades metabólicas corram menor risco de serem inibidas.

Mussato e Roberto (2001) aplicaram carvão ativado (40 g/g) e observaram uma remoção de 27% de compostos fenólicos com desintoxicação a 30°C. Posteriormente estes mesmos autores testaram cinco tipos de carvão ativo em pó e granulado com diferente granulometria, para desintoxicação de hidrolisado de palha de arroz. Na remoção de CFT, os carvões ativos em pó mostraram-se mais eficientes que os granulados, independente da área superficial específica. A remoção destes compostos variou de 7% (carvão granulado) a 31% (carvão em pó), o tempo de contato com o hidrolisado também influenciou na eficácia do carvão ativo (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

5.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Nestes experimentos foram realizadas 9 combinações com uma repetição no

ponto central, em triplicata, totalizando 27 corridas para cada meio, em fermentações descontínuas. As Tabelas 8, 10 e 12 mostram os resultados das médias dos experimentos visando a produção de biomassa celular, etanol e produtividade de etanol, pela bactéria *Z. mobilis*, a partir do meio sintético com glicose (Tabela 8), meio com hidrolisado (Tabela 10) e com o meio com hidrolisado desintoxicado (Tabela 12). As médias dos resultados obtidos para a levedura *P. tannophilus*, nas mesmas condições operacionais, estão respectivamente apresentados nas tabelas 14, 16 e 18. Foram geradas superfície de resposta para as variáveis que foram significativas ($p \leq 0,05$).

5.3.1 ZYMOMONAS MOBILIS

5.3.1.1 PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Z. MOBILIS* UTILIZANDO O MEIO CONTENDO GLICOSE.

Tabela 8 – Médias para a produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *Z. mobilis* CCT 4494 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de glicose.

| Ensaio | Tempo (h) | Temperatura (°C) | Agitação (rpm) | pH | Substrato (%) | Biomassa (mg/mL) | Etanol (mg/mL) | Produtividade (g/L.h) |
|--------|-----------|------------------|----------------|-----|---------------|------------------|----------------|-----------------------|
| 1 | 24 | 25 | 0 | 6,5 | 15 | 0,29 | 22,9 | 0,96 |
| 2 | 24 | 25 | 150 | 6,5 | 5 | 1,81 | 21,16 | 0,88 |
| 3 | 24 | 35 | 0 | 4,5 | 15 | 0,09 | 19,28 | 0,8 |
| 4 | 72 | 35 | 150 | 6,5 | 15 | 5,02 | 0 | 0 |
| 5* | 48 | 30 | 75 | 5,5 | 10 | 1,01 | 19,76 | 0,41 |
| 6 | 24 | 35 | 150 | 4,5 | 5 | 1,96 | 12,73 | 0,53 |
| 7 | 72 | 25 | 0 | 4,5 | 5 | 0,02 | 16,96 | 0,35 |
| 8 | 72 | 25 | 150 | 4,5 | 15 | 2,26 | 15,95 | 0,33 |
| 9 | 72 | 35 | 0 | 6,5 | 5 | 0,69 | 15,62 | 0,33 |

Para a produção de etanol, as estimativas dos efeitos, o nível de significância (p), as correlações entre as variáveis e os coeficientes de regressão foram calculadas pelo modelo estatístico proposto mostrado na Tabela 9.

Tabela 9 – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis*, em diferentes valores das variáveis.

| Variáveis | Etanol | | |
|------------------|---------|---------------|-------|
| | Efeitos | Coefficientes | p |
| Tempo (h) | -6,903 | -3,452 | 0,000 |
| Temperatura (°C) | -7,350 | -3,675 | 0,000 |
| Agitação (rpm) | -6,249 | -3,125 | 0,000 |
| pH | -1,293 | -0,647 | 0,099 |
| Glicose (%) | -2,066 | -1,033 | 0,012 |

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que, para a produção de etanol, as variáveis independentes: tempo (h), temperatura (°C), agitação (rpm) e concentração do substrato (%) foram significativas ($p \leq 0,05$). Todas as variáveis influenciaram de maneira negativa (menor nível testado), pois apresentaram coeficiente <0 , nestes ensaios com a glicose como substrato tornaram-se os principais fatores para obtenção do etanol com melhor produtividade.

Analizando individualmente cada ensaio, a produção de etanol 22,9 mg/mL foi obtida no ensaio 1 da fermentação com a bactéria *Z. mobilis* e a glicose como substrato, em que foram utilizadas as condições de temperatura 25 °C, concentração de glicose 15 % (m/v) e o tempo de fermentação de 24 h. A produtividade foi de 0,96 g/L.h (Tabela 8). A maior biomassa (5 mg/mL) foi obtida no ensaio 4 no qual, as condições foram todas com os níveis máximo das variáveis (tempo 72 h, temperatura 35 °C, agitação 150 rpm, pH 6,5 e concentração da glicose de 15% m/v) neste ensaio não houve produção de etanol, pode ter ocorrido a produção de levana, não quantificada neste trabalho (Tabela 10).

É notável a resistência etanol de *Z. mobilis* e sua tolerância à altas concentrações de açúcar. Em taxas de consumo de oxigênio mais elevadas (com agitação elevada), frações dos equivalentes de açúcares redutores necessários na reação de álcool desidrogenase são re-oxidados na respiração, levando à formação de acetaldeído, acetoina, ou etilo, em detrimento da síntese de etanol (PENTJUSS et al., 2013).

Melo et al. (2007) realizaram um planejamento experimental com *Z. mobilis* para produção de levana, mas quantificaram também etanol, para o planejamento analisaram a influência das variáveis independentes de temperatura (20, 25 e 30

°C), agitação (50, 75 e 100 rpm) e as concentrações iniciais de sacarose (150, 200 e 250 g/L) e extracto de levedura (2,0, 3,5 e 5.0g/L) e observaram que a maior produção de etanol (44,7 g/L) foi no ensaio com menor agitação (50 rpm), maior temperatura (30 °C), maior concentração de extrato de levedura (5 g/L) e menor concentração de sacarose (150 g/L). Influência da pouca agitação semelhante ao presente trabalho que obteve melhores valores de etanol nos ensaios sem agitação.

Analisando a superfície de resposta para etanol ao redor do tempo e temperatura (Figura 17), considerando as condições aplicadas, os melhores resultados para etanol ocorreram inversamente proporcionais, sendo a melhor produção na menor concentração de glicose. A superfície de resposta em torno da temperatura e agitação (Figura 18) mostra o mesmo comportamento.

Figura 17. Superfície de resposta para produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando as variáveis Tempo (24, 48 e 72 horas) e Substrato (5, 10 e 15%) no meio com glicose.

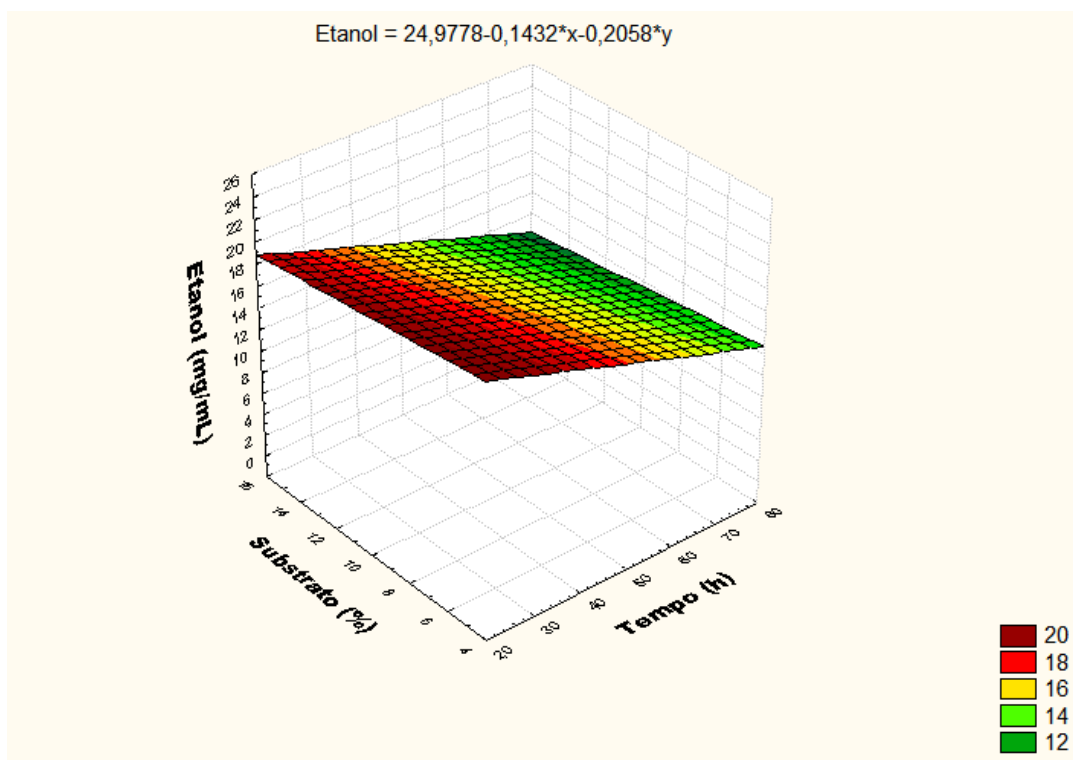
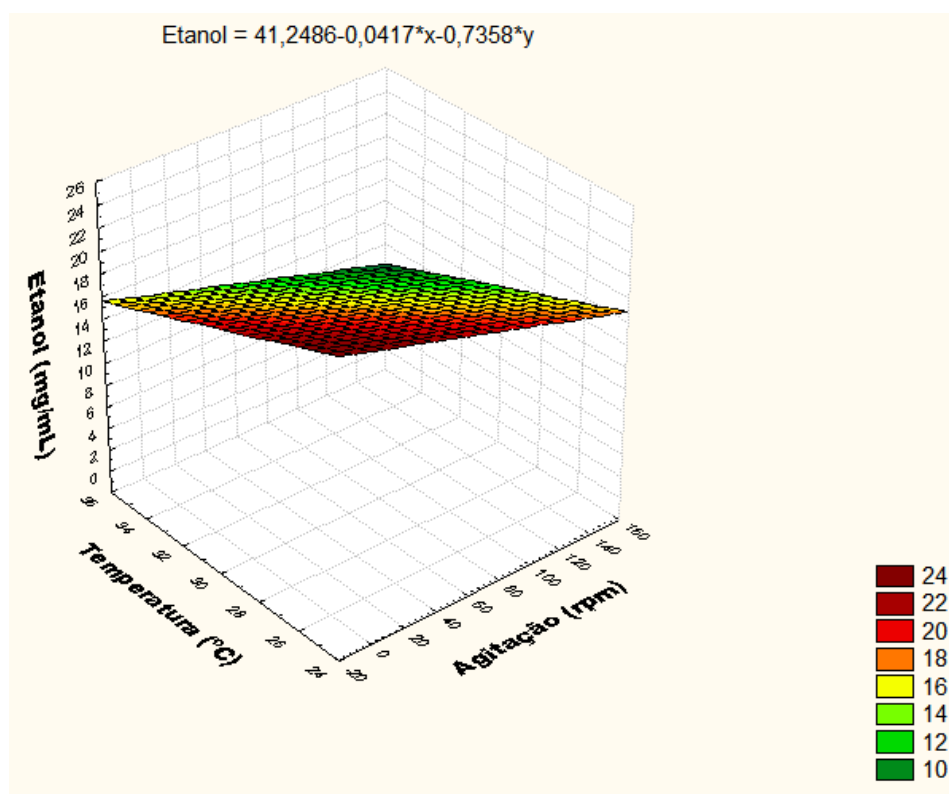


Figura 18. Superfície de resposta para produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando as variáveis Temperatura (25, 30 e 35 °C) e Agitação (0, 75 e 150 rpm) no meio com glicose.



5.3.1.2 PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Z. MOBILIS* UTILIZANDO MEIO COM HIDROLISADO SEM DESINTOXICAÇÃO.

Tabela 10 – Médias para produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de hidrolisado sem desintoxicar.

| Ensaio | Tempo (h) | Temperatura (°C) | Agitação (rpm) | pH | Substrato (%) | Biomassa (mg/mL) | Etanol (mg/mL) | Produtividade (g/L.h) |
|--------|-----------|------------------|----------------|-----|---------------|------------------|----------------|-----------------------|
| 1 | 24 | 25 | 0 | 6,5 | 15 | 1,45 | 4,97 | 0,21 |
| 2 | 24 | 25 | 150 | 6,5 | 5 | 0,69 | 10,57 | 0,44 |
| 3 | 24 | 35 | 0 | 4,5 | 15 | 1,57 | 12,27 | 0,51 |
| 4 | 72 | 35 | 150 | 6,5 | 15 | 1,39 | 3,97 | 0,06 |
| 5* | 48 | 30 | 75 | 5,5 | 10 | 1,51 | 1,5 | 0,03 |
| 6 | 24 | 35 | 150 | 4,5 | 5 | 0,65 | 12,07 | 0,5 |
| 7 | 72 | 25 | 0 | 4,5 | 5 | 0,45 | 14,33 | 0,3 |
| 8 | 72 | 25 | 150 | 4,5 | 15 | 1,00 | 13,07 | 0,27 |
| 9 | 72 | 35 | 0 | 6,5 | 5 | 0,54 | 10,63 | 0,22 |

Para a produção de etanol, 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 e estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis*, em diferentes valores das variáveis.

| Variáveis | Etanol | | |
|------------------|---------|---------------|-------|
| | Efeitos | Coefficientes | p |
| Tempo (h) | 0,533 | 0,267 | 0,677 |
| Temperatura (°C) | -1,000 | -0,500 | 0,438 |
| Agitação (rpm) | -0,633 | -0,317 | 0,622 |
| pH | -5,400 | -2,700 | 0,000 |
| HSD (%) | 6,667 | 3,333 | 0,000 |

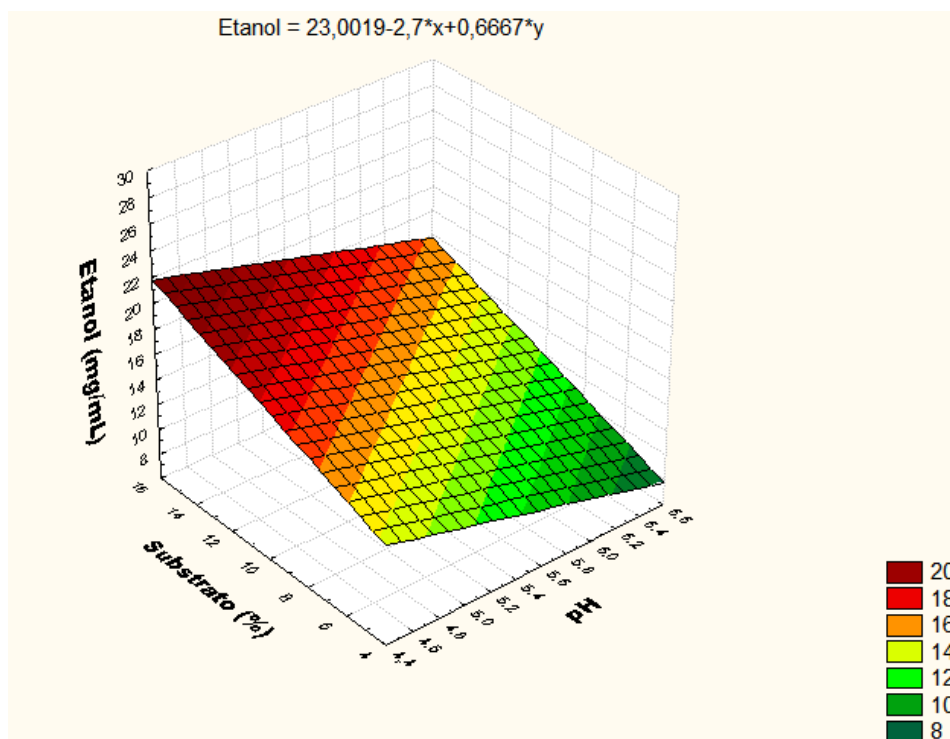
Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que, para produção de etanol, as variáveis independentes: pH e concentração do substrato foram significativas ($p \leq 0,05$). As variáveis temperatura, agitação e pH influenciaram de maneira negativa (menor nível testado), pois apresentaram coeficiente <0 , enquanto que as outras duas variáveis tempo e concentração de substrato influenciaram de forma positiva (coeficiente > 0), nestes ensaios com o hidrolisado sem desintoxicar o pH e a concentração do substrato foram os principais fatores para obtenção do etanol.

Analisando individualmente cada ensaio, a maior produção de etanol (14,3 mg/mL) foi obtida no ensaio 7 da fermentação com a bactéria *Z. mobilis* e o hidrolisado sem desintoxicar como substrato, em que foram utilizadas as condições de temperatura 25 °C, concentração de hidrolisado sem desintoxicar de 50 g/L e o tempo de fermentação de 72 h. Mas a maior produtividade foi de 0,51 g/L.h no ensaio 3 (Tabela 10) em que foram utilizadas as condições de temperatura 35 °C, concentração de hidrolisado sem desintoxicar de 15% m/v e o tempo de fermentação de 24 h. A maior biomassa (1,6 mg/mL) foi obtida no ensaio 3 e os ensaios 1, 4, 5 e 8 apresentaram valores próximos mantendo uma média de 7,2 mg/mL de etanol. A variável em comum que mais afetou o crescimento foi a concentração do substrato de 10 e 15% m/v (Tabela 10).

Analisando a superfície de resposta para etanol ao redor do substrato e pH (Figura 19), dentro das condições operacionais aplicadas, os melhores resultados para etanol ocorreram proporcionais ao aumento da fonte de carbono, sendo os maiores resultados obtidos na maior concentração do substrato e inversamente

proporcional para o pH (menor pH). Apenas estas duas variáveis foram significativas ($p \leq 0,05$).

Figura 19. Superfície de resposta para produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando as variáveis Substrato (5, 10 e 15 %) e pH (4,5; 5,5 e 6,5) no meio com hidrolisado sem desintoxicar.



5.3.1.3 PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Z. MOBILIS* UTILIZANDO MEIO COM HIDROLISADO DESINTOXICADO.

Tabela 12 – Médias para produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de hidrolisado desintoxicado.

| Ensaio | Tempo (h) | Temperatura (°C) | Agitação (rpm) | pH | Substrato (%) | Biomassa (mg/mL) | Etanol (mg/mL) | Produtividade (g/L.h) |
|--------|-----------|------------------|----------------|-----|---------------|------------------|----------------|-----------------------|
| 1 | 24 | 25 | 0 | 6,5 | 15 | 1,52 | 28,40 | 1,23 |
| 2 | 24 | 25 | 150 | 6,5 | 5 | 4,31 | 6,34 | 0,26 |
| 3 | 24 | 35 | 0 | 4,5 | 15 | 1,82 | 26,44 | 1,05 |
| 4 | 72 | 35 | 150 | 6,5 | 15 | 0,05 | 24,00 | 0,33 |
| 5* | 48 | 30 | 75 | 5,5 | 10 | 2,46 | 19,09 | 0,4 |
| 6 | 24 | 35 | 150 | 4,5 | 5 | 2,43 | 10,25 | 0,43 |
| 7 | 72 | 25 | 0 | 4,5 | 5 | 0,03 | 13,95 | 0,29 |
| 8 | 72 | 25 | 150 | 4,5 | 15 | 0,4 | 26,42 | 0,55 |
| 9 | 72 | 35 | 0 | 6,5 | 5 | 0,24 | 11,88 | 0,25 |

Para a produção de etanol, 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 mostrado na Tabela 13.

Tabela 13 – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *Z. mobilis*, em diferentes valores das variáveis.

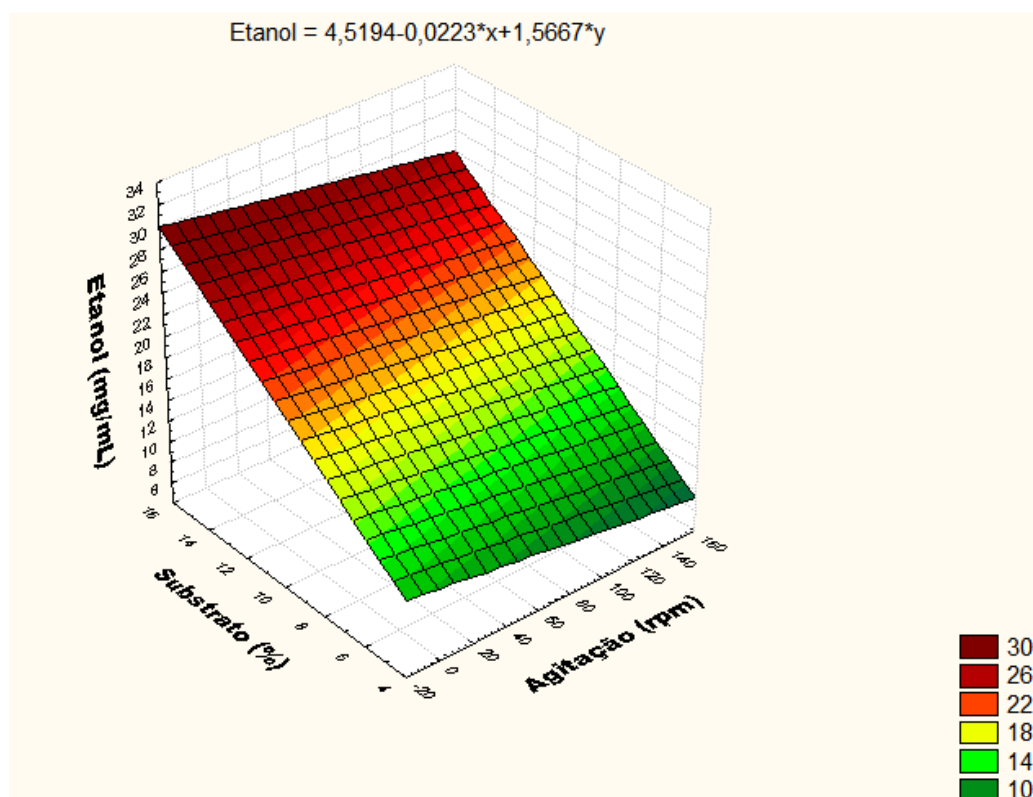
| Variáveis | Etanol | | |
|------------------|---------|---------------|-------|
| | Efeitos | Coefficientes | p |
| Tempo (h) | 1,259 | 0,630 | 0,331 |
| Temperatura (°C) | -1,241 | -0,620 | 0,338 |
| Agitação (rpm) | -3,361 | -1,680 | 0,016 |
| pH | -1,005 | -0,503 | 0,436 |
| HD (%) | 15,655 | 7,827 | 0,000 |

Os resultados apresentados na Tabela 13 mostram que, para produção de etanol, as variáveis independentes: agitação (rpm) e concentração do substrato foram significativas ($p \leq 0,05$). O hidrolisado desintoxicado também apresentou as variáveis de temperatura, agitação e pH com influencia negativa (menor nível testado), por apresentar coeficiente <0 , as duas variáveis de tempo e concentração de substrato influenciaram de forma positiva (coeficiente >0). Nestes ensaios, com o hidrolisado desintoxicado, a agitação e a concentração do substrato foram os principais fatores que influenciaram a produção de etanol.

Analizando individualmente cada ensaio, a maior produção de etanol (28,4 mg/mL) foi obtida no ensaio 1 da fermentação com a bactéria *Z. mobilis* e o hidrolisado sem desintoxicar como substrato, em que foram utilizadas as condições de temperatura 25 °C, concentração de hidrolisado sem desintoxicar de 150 g/L e o tempo de fermentação de 24 h com produtividade de 1,2 g/L.h. Enquanto que a maior biomassa (4,3 mg/mL) foi obtida no ensaio 2 o qual apresentou o menor resultado para etanol (6,3 mg/mL) (Tabela 14).

Observando a superfície de resposta para etanol ao redor do substrato e agitação (Figura 20) apenas estas duas variáveis foram significativas ($p \leq 0,05$), dentro das condições operacionais aplicadas, e os melhores resultados para etanol também foram proporcionais ao aumento da fonte de carbono e inversamente proporcional para a agitação, pois quanto menor a agitação melhor o resultado para etanol.

Figura 20. Superfície de resposta para produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando as variáveis Substrato (5, 10 e 15 %) e agitação (40, 75 e 150 rpm) no meio com hidrolisado desintoxicado.



5.3.2 CINÉTICA DAS FERMENTAÇÕES COM *Z. MOBILIS* ATÉ 24 HORAS

5.3.2.1 PH FINAL

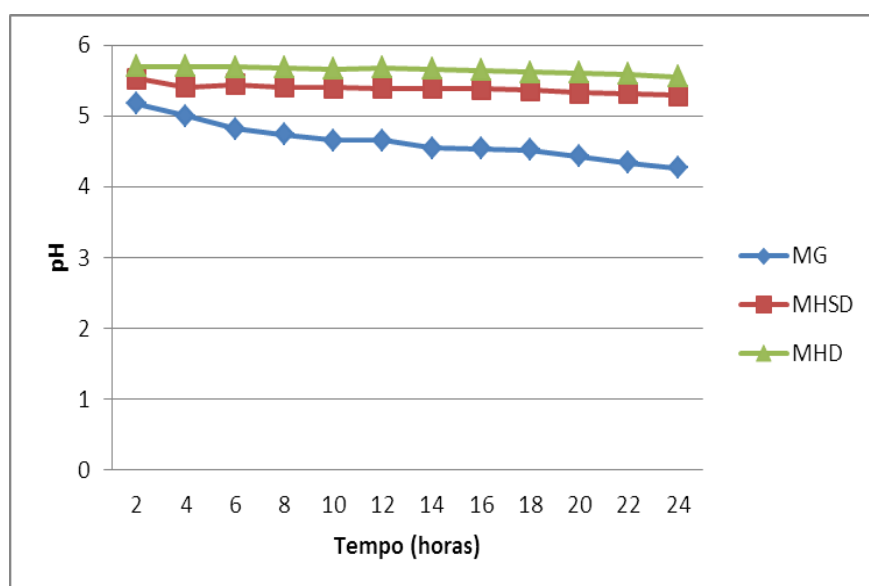
Os meios para fermentação tiveram como pH inicial 5,5 como representado na Figura 21. A faixa de pH inicial entre 5,5 e 6,0, nas fermentações com controle de pH e/ou contendo solução tampão, ocasionou uma maior eficiência bioquímica de produção de etanol e pequena formação de levana precipitável (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). O presente trabalho não utilizou solução tampão nem controle de pH, mas o pH inicial foi de 5,5 o qual se manteve estável nos meios com o hidrolisado principalmente no hidrolisado desintoxicado. Entretanto, valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5) podem levar o microrganismo rapidamente à morte (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2011).

Neste trabalho o pH final variou entre 3,8 e 4,7 na fermentação com o meio contendo glicose, no meio com hidrolisado sem desintoxicar foi entre 4,8 e 5,1 e com o meio contendo o hidrolisado desintoxicado foi entre 5,4 e 6,4 nas fermentações até

72 horas (planejamento fatorial). Nos meios com os hidrolisados sem ou com desintoxicação o pH manteve-se estável e em alguns ensaios houve aumento de até 17% em relação ao pH inicial.

Enquanto que para a fermentação até 24 horas o pH final ficou entre 4,3 e 5,2 no meio contendo glicose, 4,7 e 5,4; no meio com hidrolisado sem desintoxicação e entre 5,5 e 5,8 no meio com o hidrolisado desintoxicado o único que o pH não diminuiu gradativamente como nos outros meios (Figura 21). Efeito semelhante ao ocorrido no trabalho de Cazetta et al. (2007) que na fermentação utilizando melaço de cana de açúcar o pH do meio manteve-se constante durante os ensaios, mostrando que assim como o melaço o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar também apresenta um efeito de tamponamento.

Figura 21. Cinética do pH final da fermentação por *Z. mobilis* durante o período de 24 horas determinado cada 2 horas nos meios MG, MHSD e MHD.



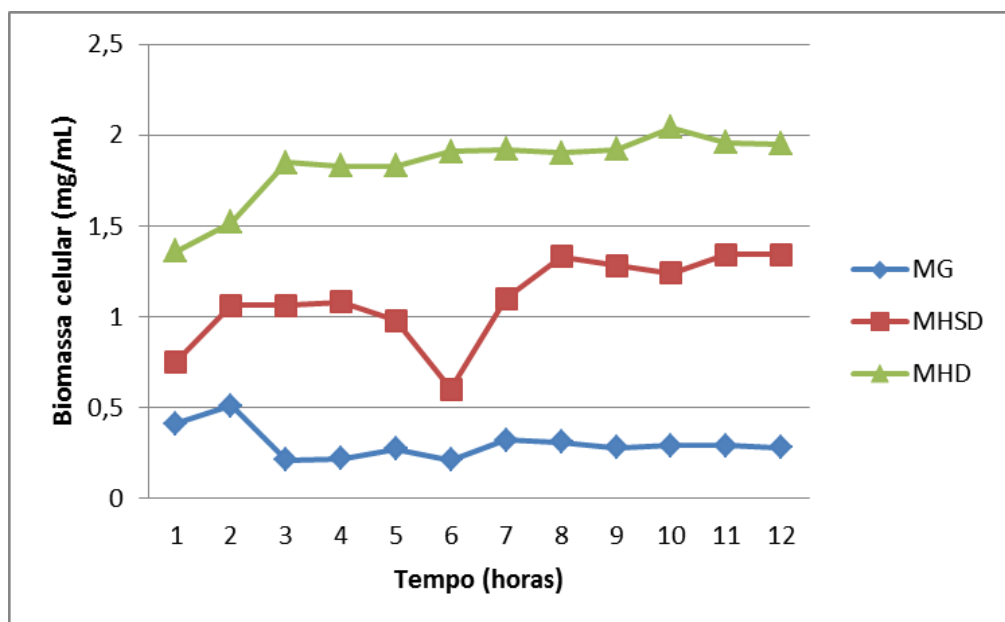
No trabalho de Ma et al. (2012) testaram uma mistura de glicose e xilose para produção de etanol por *Z. mobilis*. E o melhor resultado por eles encontrado (20,5 g/L) foi no pH 5,5 com temperatura entre 30 e 34 °C em 48 h. Resultado menor do obtido no presente trabalho que foi de 31,4 mg/mL no MG, 25,8 no MHSD e 36,6 no MHD, no tempo de 6 h de fermentação (Figura 24) também com o pH inicial de 5,5. Durante as primeiras 4 h de fermentação há maior produtividade no MG, justificando os menores valores de pH, mas isso afeta a biomassa de *Z. mobilis* não cresce ou cresce pouco nesses valores de pH baixos.

5.3.2.2 CRESCIMENTO CELULAR (BIOMASSA)

O inóculo inicial da bactéria *Z. mobilis* nos meios fermentativos foi de 0,1 mg/mL. A Figura 22 mostra o crescimento celular da *Z. mobilis* durante a fermentação de 24 h, observou-se que houve um aumento com o tempo (pouca variação), o maior crescimento foi no MHD 2,04 mg/mL na fermentação até 24 h, o meio de fermentação apresentava pouca turbidez no MG e maior turbidez nos MHSD e MHD.

O crescimento com os meios MG e MHSD foram menores tendo crescimento entre 0,21 a 0,51 e 0,6 a 1,34, respectivamente.

Figura 22. Cinética do crescimento da biomassa celular de *Z. mobilis* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



Franden et al. (2013) em seu trabalho utilizando meio contendo glicose e xilose, testaram diferentes concentrações de compostos inibidores, formados pela hidrólise de materiais lignocelulósicos, que prejudicam a fermentação, no período de 24 h e 48 h de fermentação e os classificaram por ordem de toxicidade, $\text{Ca}^{++} \gg \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ \text{HMF}$ (5- hidroximetilfurfural), furfural e etilo e observaram que o etanol apresentou menor toxicidade, pois *Z. mobilis* demonstrou sua alta tolerância as elevadas concentrações. Todos os compostos testados provocaram diminuição no crescimento celular de *Z. mobilis*, sendo os aldeídos (principalmente o vanílico) os mais tóxicos. No meio contendo glicose teve baixo e/ou não teve crescimento, com a

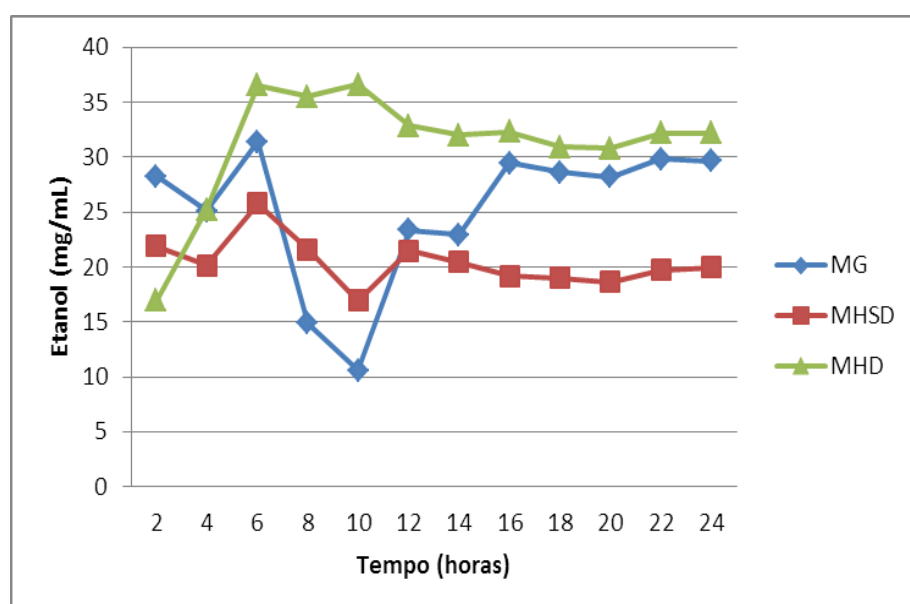
xilose como única fonte de carbono o grau de crescimento e de massa celular foi ainda mais reduzido, mesmo sem a presença dos inibidores. Menos do que uma metade da densidade celular obtida a partir de culturas de glicose. A produção de etanol no meio com glicose teve produção menor que 50% do etanol teórico, enquanto que no meio com xilose teve 95% da xilose consumida e produção de 83 % do etanol teórico. Também notaram que *Z. mobilis* foi capaz de consumir alguns destes compostos tóxicos e converter em etanol. O comportamento de crescimento no presente trabalho está condizente ao observado por estes pesquisadores, pois o crescimento celular em glicose não foi tão expressivo quanto no hidrolisado desintoxicado, que possui uma mistura rica em hexoses e pentoses, com a concentração dos compostos inibidores reduzida pelo processo de desintoxicação o que favoreceu seu melhor desempenho, tanto para o crescimento quanto para a produção de etanol.

5.3.2.3 PRODUÇÃO DE ETANOL

Na Figura 23 estão apresentados os resultados da produção de etanol durante a fermentação de 24 h em intervalos de 2 h de fermentação.

Os valores máximos obtidos foram 31,4 mg/mL, 25,8 mg/mL e 36,5 mg/mL nos meios MG, MHSD e MHD, respectivamente. As maiores concentrações de etanol dos meios MG e MHSD foram obtidos em 6 h de fermentação.

Figura 23. Cinética da produção de etanol na fermentação por *Z. mobilis* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



Conforme o tempo as células vão crescendo e a produção de etanol aumentando na faixa de 6 a 10 h de fermentação. Porém após 2 h de fermentação já houve produção de etanol.

Cazetta et al. (2007) analisaram a produção de etanol a partir de melaço de cana de açúcar, sob diferentes condições de cultivo utilizando *Z. mobilis*. Os efeitos das concentrações dos açúcares redutores totais do melaço, temperatura, agitação e tempo de cultura foram estudados simultaneamente através de planejamento fatorial. Observaram que as melhores condições para a produção de etanol foram concentração do substrato de 20% m/v (Açúcares presentes no melaço), a temperatura de 30 °C, em cultura estática e tempo de fermentação de 48 horas, obtendo 55,8 g/L. O resultado foi maior do que no presente trabalho, o que pode ser devido a que a concentração do substrato utilizado foi maior e com menor teor de compostos inibidores por não ter sofrido pré-tratamento ácido. Uma vez que, a produção do presente trabalho foi 34,5 % menor no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar desintoxicado.

Guilman et al. (2000) estudaram a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em melaço de cana-de-açúcar e melaço pré-tratado com invertase. Os cultivos foram realizados com pH 6,0 por 0, 24 e 48 horas, em melaço a 12% m/v e temperatura constante de 30°C sem agitação. A produção de etanol e consumo de açúcares foram determinados. A melhor produção de etanol foi 39,5 g/L no cultivo em melaço pré-tratado com e 1 mL de invertase por 30 minutos o que representou um aumento de 52,8% em relação ao cultivo sem adição de invertase. No presente trabalho o melhor resultado foi próximo (no meio MHD) sem aplicar invertase.

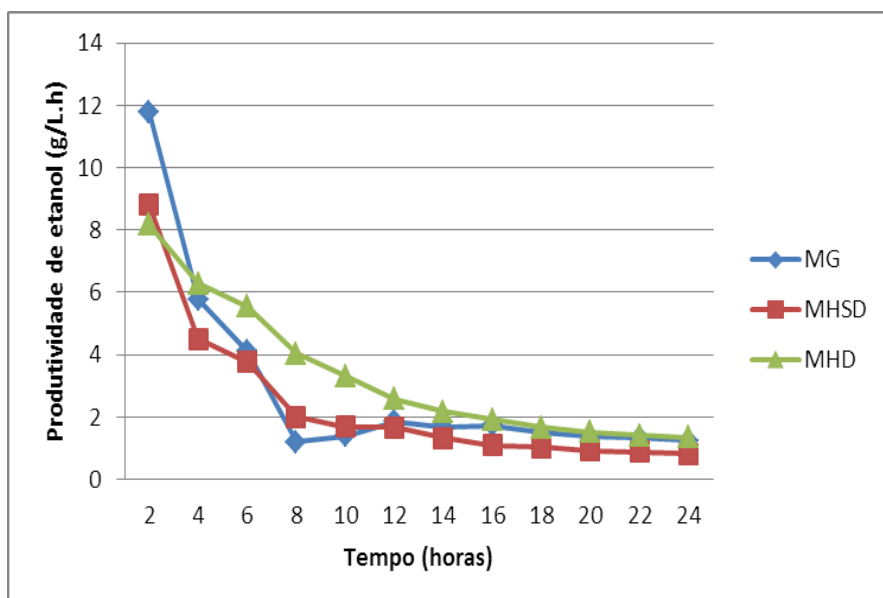
Neto et al. (2005) também utilizaram para fermentação com *Z. mobilis* as variáveis concentração de açúcares no melaço de cana-de-açúcar de 10, 55 e 100 g/L; concentração de extrato de levedura de 2, 11 e 20 g/L e tempo de fermentação de 6, 15 e 24 horas. A melhor produção de etanol (30 g/L) foi nas condições 10% m/v de açúcares no melaço, 2,0 g/L de extrato de levedura e com tempo de fermentação entre 20 e 24 horas. Apesar do substrato ter sido o mesmo que o utilizado no trabalho de Cazetta et al. (2007), a produção de etanol foi menor, principalmente porque as condições operacionais foram bem diferentes, no presente trabalho este resultado foi 21,9 % maior com o MHD pH 5,5 tempo de até 10 h.

5.3.2.4 PRODUTIVIDADE

A produtividade do etanol nos diferentes meios esta apresentada na Figura 24, é possível observar que a maior produtividade foi no MG (11,8 g/L.h⁻¹), apesar deste não ter apresentado a maior produção para etanol, mas foi o meio que iniciou a produção de etanol com rapidez, provavelmente pelo fato da glicose estar disponível de forma livre o que facilita a assimilação pela *Z. mobilis*, e também pelo fato de a pré-fermentação foi com glicose como substrato. Portanto, o micro-organismo já estava preparado para este substrato antes de iniciar a fermentação com os sais. Diferente do hidrolisado que exigiu um período de Lag (fase de adaptação ao meio) maior, pois se tratava de uma fonte de carbono com características diferentes.

Com o transcorrer do tempo a produtividade foi diminuindo, pois a produção de etanol já tinha alcançado seu pico nas primeiras 10 horas e depois manteve se com poucas variações na concentração podendo ter dado início a produção de outros subprodutos como a levana e o sorbitol, pois a concentração de substrato foi elevada (15% m/v) (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

Figura 24. Produtividade do etanol na fermentação por *Z. mobilis* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



Ao final das 24 h de fermentação a produtividade foi semelhante para todos os meios utilizados.

5.3.3 PACHYSOLEN TANNOPHILUS

5.3.3.1 PRODUÇÃO DE ETANOL POR *P. TANNOPHILUS* UTILIZANDO MEIO COM GLICOSE.

Tabela 14 – Valores das médias da Produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *P. tannophilus* CCT 1891 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de glicose.

| Ensaio | Tempo (h) | Temperatura (°C) | Agitação (rpm) | pH | Substrato (%) | Biomassa (mg/mL) | Etanol (mg/mL) | Produtividade (g/L.h) |
|--------|-----------|------------------|----------------|-----|---------------|------------------|----------------|-----------------------|
| 1 | 24 | 25 | 0 | 6,5 | 15 | 0,32 | 23,85 | 0,99 |
| 2 | 24 | 25 | 150 | 6,5 | 5 | 7,23 | 2,18 | 0,09 |
| 3 | 24 | 35 | 0 | 4,5 | 15 | 1,28 | 8,83 | 0,37 |
| 4 | 72 | 35 | 150 | 6,5 | 15 | 6,82 | 17,75 | 0,25 |
| 5* | 48 | 30 | 75 | 5,5 | 10 | 9,48 | 1,6 | 0,21 |
| 6 | 24 | 35 | 150 | 4,5 | 5 | 7,21 | 1,7 | 0,07 |
| 7 | 72 | 25 | 0 | 4,5 | 5 | 2,99 | 4,25 | 0,09 |
| 8 | 72 | 25 | 150 | 4,5 | 15 | 10,35 | 0 | 0 |
| 9 | 72 | 35 | 0 | 6,5 | 5 | 2,43 | 8,4 | 0,17 |

Para a produção de etanol, 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 mostrado na Tabela 15.

Tabela 15 – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *P. tannophilus*, em diferentes valores das variáveis.

| Variáveis | Etanol | | |
|------------------|---------|---------------|-------|
| | Efeitos | Coefficientes | p |
| Tempo (h) | -1,628 | -0,814 | 0,039 |
| Temperatura (°C) | 1,508 | 0,754 | 0,054 |
| Agitação (rpm) | -5,835 | -2,918 | 0,000 |
| pH | 9,259 | 4,630 | 0,000 |
| Glicose (%) | 8,563 | 4,281 | 0,000 |

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que, para produção de etanol, as variáveis independentes: tempo (horas), agitação (rpm), pH e concentração do substrato foram significativas ($p \leq 0,05$). As variáveis tempo e agitação influenciaram de maneira negativa (menor nível testado), apresentando coeficiente <0 , as demais variáveis temperatura, pH e concentração do substrato

influenciaram positivamente (maiores níveis testados) com coeficiente >0 , nestes ensaios com a glicose como substrato o pH e a concentração do substrato são os principais fatores que influenciaram a produção do etanol.

Analizando individualmente cada ensaio, a maior produção de etanol (23,9 mg/mL) foi obtida no ensaio 1 da fermentação com a levedura *P. tannophilus* e a glicose como substrato, em que foram utilizadas as condições de temperatura 25 °C, concentração de glicose 150 g/L e o tempo de fermentação de 24 h. A produtividade foi de 0,99 g/L.h. A maior biomassa (10,4 mg/mL) foi obtida no ensaio 8, no qual as condições foram tempo 72 h, temperatura 25 °C, agitação 150 rpm, pH 4,5 e concentração da glicose de 15% m/v. Neste ensaio não se obteve produção de etanol (Tabela 14).

Analizando a superfície de resposta para etanol ao redor da agitação e pH (Figura 25), dentro das condições operacionais aplicadas, os melhores resultados para etanol ocorreram inversamente proporcional para a agitação (0 rpm). Enquanto que para o pH o aumento da produção de etanol foi proporcional ao aumento do pH. Para a superfície de resposta em torno do pH e do substrato (Figura 26), ambos foram proporcionais para produção de etanol ao aumento destas variáveis (maiores níveis). Enquanto que para a superfície de resposta da Figura 27 em torno do tempo e agitação, ambos foram inversamente proporcionais apresentando os melhores resultados para etanol em seus menores níveis.

Figura 25. Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis Agitação (0, 75 e 150 rpm) e pH (4,5; 5,5 e 6,5) no meio com glicose.

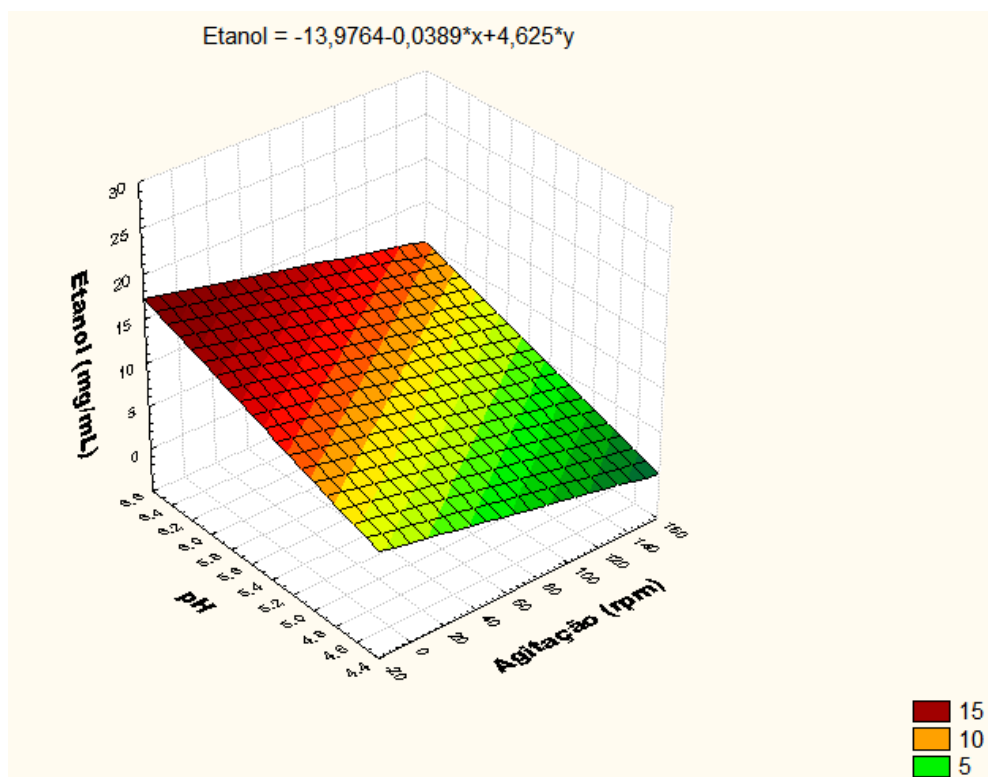


Figura 26. Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis pH (4,5; 5,5 e 6,5) e Substrato (5, 10 e 15%) no meio com glicose.

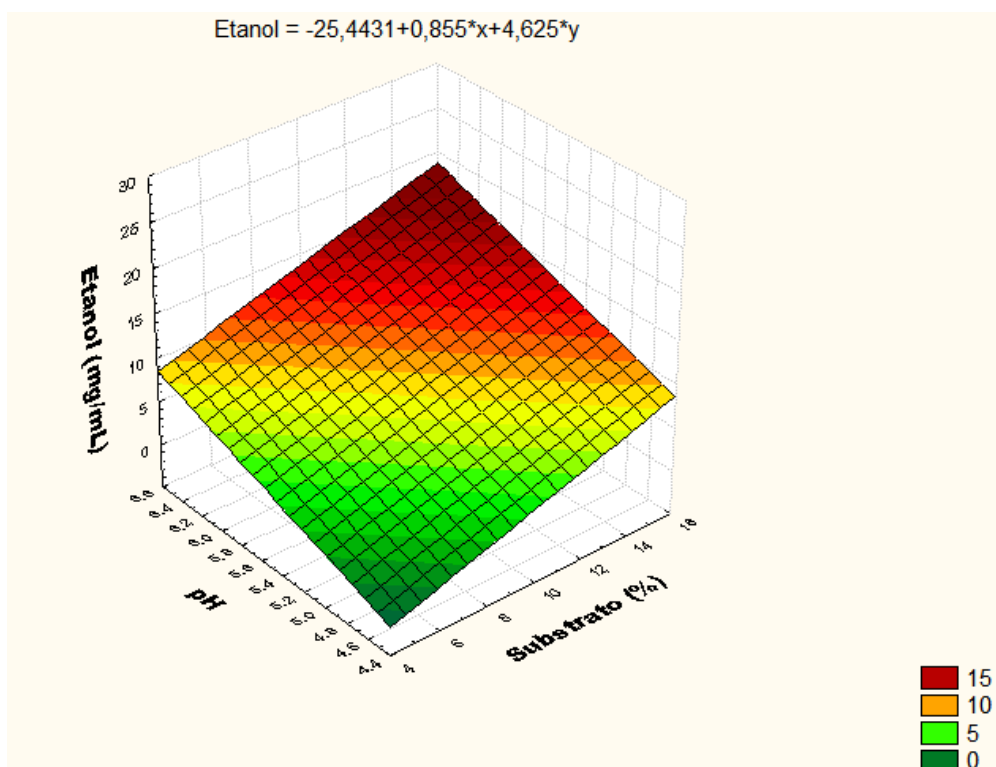
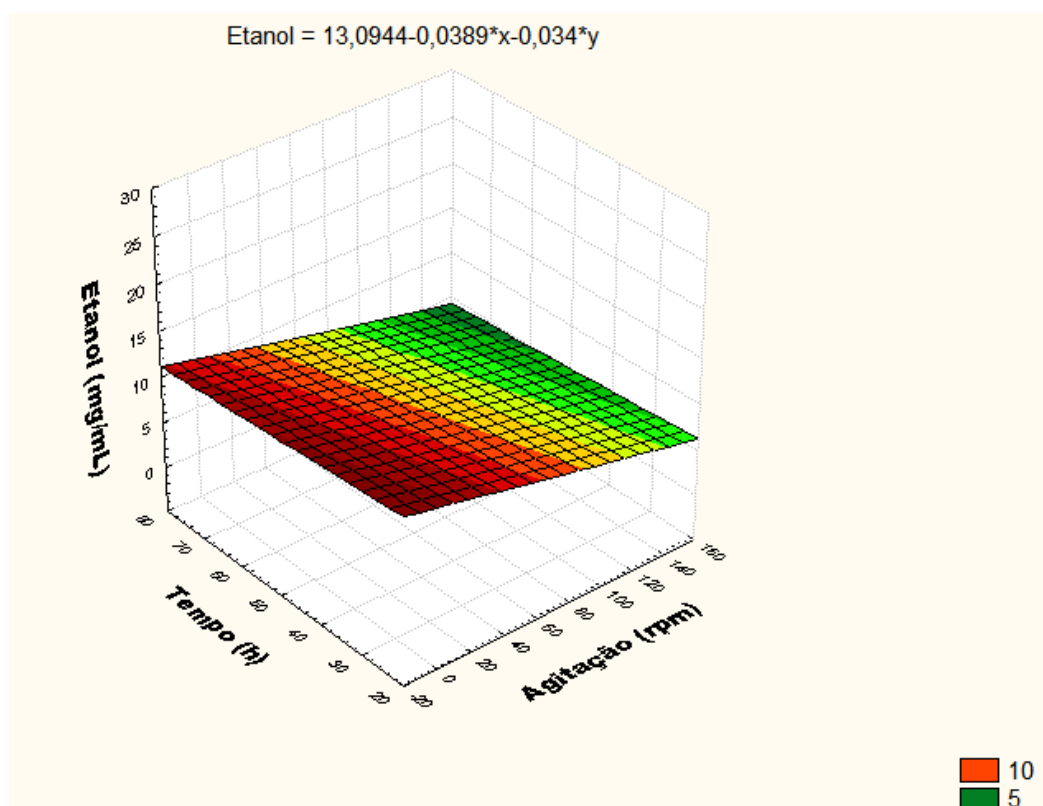


Figura 27. Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis Tempo (24, 48 e 72 h) e Agitação (0, 75 e 150 rpm) no meio com glicose.



5.3.3.2 PRODUÇÃO DE ETANOL POR *P. TANNOPHILUS* UTILIZANDO MEIO COM HIDROLISADO SEM DESINTOXICAR.

Tabela 16 – Valores das médias para a produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *P. tannophilus* CCT 1891 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de Hidrolisado sem desintoxicar.

| Ensaio | Tempo (h) | Temperatura (°C) | Agitação (rpm) | pH | Substrato (%) | Biomassa (mg/mL) | Etanol (mg/mL) | Produtividade (g/L.h) |
|--------|-----------|------------------|----------------|-----|---------------|------------------|----------------|-----------------------|
| 1 | 24 | 25 | 0 | 6,5 | 15 | 2,3 | 35,56 | 1,34 |
| 2 | 24 | 25 | 150 | 6,5 | 5 | 0,7 | 18,09 | 0,75 |
| 3 | 24 | 35 | 0 | 4,5 | 15 | 2,5 | 38,60 | 1,61 |
| 4 | 72 | 35 | 150 | 6,5 | 15 | 2,5 | 39,8 | 0,55 |
| 5* | 48 | 30 | 75 | 5,5 | 10 | 1,5 | 30,3 | 0,63 |
| 6 | 24 | 35 | 150 | 4,5 | 5 | 0,8 | 25,79 | 1,07 |
| 7 | 72 | 25 | 0 | 4,5 | 5 | 0,9 | 25,83 | 0,54 |
| 8 | 72 | 25 | 150 | 4,5 | 15 | 2,3 | 34,94 | 0,87 |
| 9 | 72 | 35 | 0 | 6,5 | 5 | 0,7 | 27,22 | 0,57 |

Para a produção de etanol, 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 – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (*p*) para a resposta Etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *P. tannophilus*, em diferentes valores das variáveis.

| Variáveis | Etanol | | |
|------------------|---------|--------------|----------|
| | Efeitos | Coeficientes | <i>P</i> |
| Tempo (h) | 0,769 | 0,384 | 0,405 |
| Temperatura (°C) | -3,811 | -1,905 | 0,010 |
| Agitação (rpm) | -3,811 | -1,905 | 0,001 |
| pH | -2,791 | -1,396 | 0,006 |
| HSD (%) | 11,325 | 5,663 | 0,000 |

Os resultados apresentados na Tabela 17 mostra que, para produção de etanol, as variáveis independentes: temperatura (°C), agitação (rpm), pH e concentração do substrato foram significativas ($p \leq 0,05$). As variáveis temperatura, agitação e pH influenciaram de forma negativa (menor nível testado), apresentando coeficiente <0 , as variáveis de tempo e concentração do substrato influenciaram positivamente (maiores níveis testados) com coeficiente >0 , nestes ensaios com o hidrolisado sem desintoxicar, mostrou que a concentração foi o principal efeito de influencia para a produção do etanol.

A maior produção de etanol (39,8 mg.mL⁻¹) foi obtida no ensaio 4, em que foram utilizadas as condições de temperatura 35°C, concentração do hidrolisado desintoxicado 15% e o tempo de fermentação de 72 h. Porém a maior produtividade foi de 1,61 g/L.h⁻¹ no ensaio 3 em que as condições utilizadas foram tempo de 24 horas, temperatura de 35 °C, sem agitação com pH 4,5 e concentração do hidrolisado desintoxicado de 15%. A maior biomassa (2,5 mg/mL) foi obtida nos ensaios 3 e 4 que apresentam temperatura (35 °C) e concentração do substrato (15%) em comum. Para produção de etanol, as variáveis independentes: temperatura (°C), agitação (rpm), pH e concentração do substrato foram significativas ($p \leq 0,05$). As variáveis temperatura, agitação e pH influenciaram de forma negativa (menor nível testado) (Tabela 16).

As superfícies de resposta para etanol ao redor da concentração de substrato e agitação (Figura 28), considerando as condições operacionais aplicadas, os melhores resultados para etanol ocorreram inversamente proporcionais para a

agitação (0 rpm). Enquanto que, para a concentração do substrato o aumento da produção de etanol foi proporcional ao aumento do da fonte de carbono. Na Figura 29 mostra a superfície de resposta em torno do pH e da temperatura, observa-se que, em ambos foram proporcionais para produção de etanol com a aplicação dos maiores níveis testados.

Figura 28. Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis Substrato (5, 10 e 15%) e Agitação (0,75 e 150 rpm) no meio com hidrolisado sem desintoxicar.

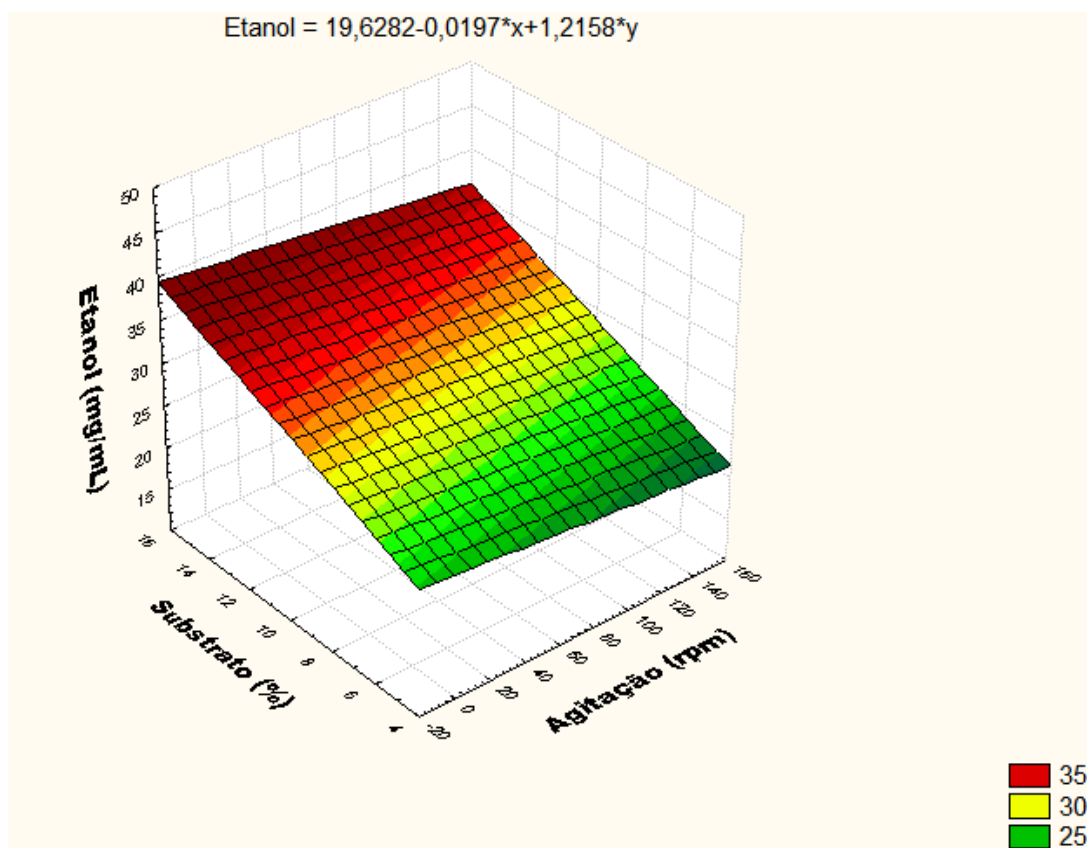
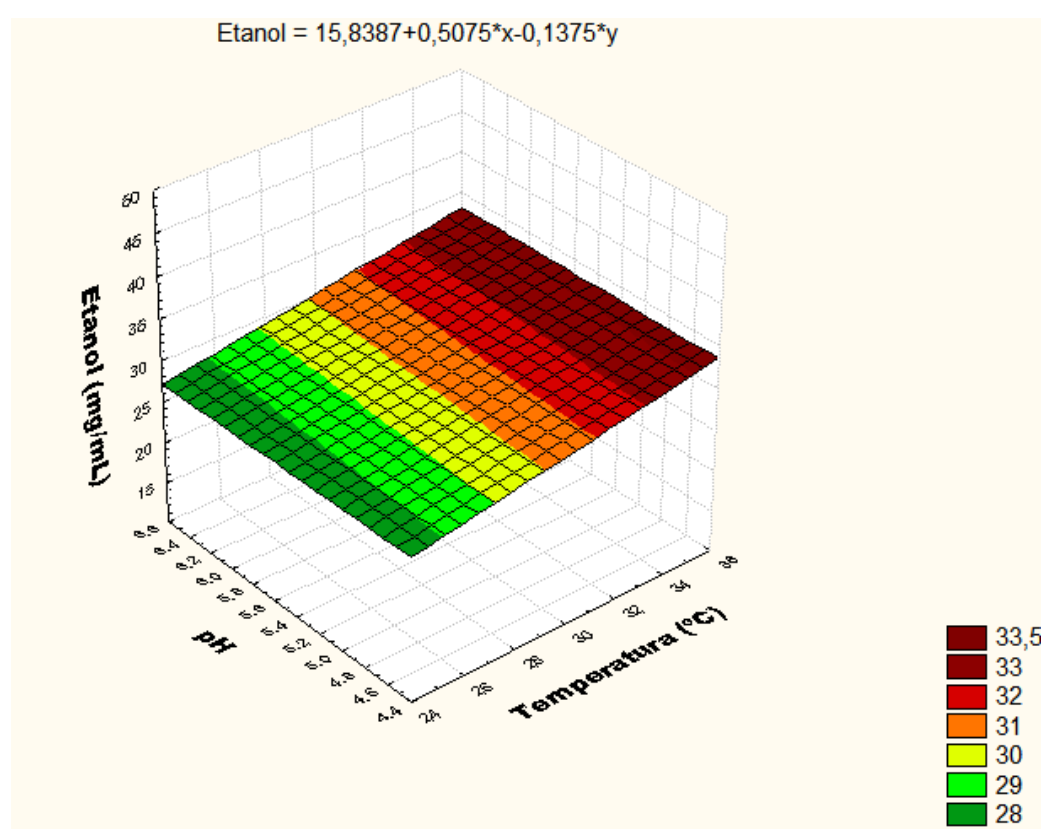


Figura 29. Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis pH (4,5, 5,5 e 6,5) e Temperatura (25, 30 e 35°C) no meio com hidrolisado sem desintoxicar.



5.3.3.3 PRODUÇÃO DE ETANOL POR *P. TANNOPHILUS* UTILIZANDO MEIO COM HIDROLISADO DESINTOXICADO.

Tabela 18 – Valores das médias da produção de Biomassa, Etanol e Produtividade, por *P. tannophilus* CCT 1891 determinadas em diferentes valores de temperatura, tempo, agitação e concentração de Hidrolisado desintoxicado.

| Ensaio | Tempo (h) | Temperatura (°C) | Agitação (rpm) | pH | Substrato (%) | Biomassa (mg/mL) | Etanol (mg/mL) | Produtividade (g/L.h) |
|--------|-----------|------------------|----------------|-----|---------------|------------------|----------------|-----------------------|
| 1 | 24 | 25 | 0 | 6,5 | 15 | 1,75 | 23,13 | 0,92 |
| 2 | 24 | 25 | 150 | 6,5 | 5 | 2,55 | 9,71 | 0,37 |
| 3 | 24 | 35 | 0 | 4,5 | 15 | 1,84 | 25,73 | 1,01 |
| 4 | 72 | 35 | 150 | 6,5 | 15 | 3,69 | 25,25 | 0,33 |
| 5* | 48 | 30 | 75 | 5,5 | 10 | 3,16 | 21,45 | 0,5 |
| 6 | 24 | 35 | 150 | 4,5 | 5 | 7,55 | 3,51 | 0,23 |
| 7 | 72 | 25 | 0 | 4,5 | 5 | 1,62 | 8,3 | 0,23 |
| 8 | 72 | 25 | 150 | 4,5 | 15 | 4,43 | 26,17 | 0,52 |
| 9 | 72 | 35 | 0 | 6,5 | 5 | 1,94 | 11,01 | 0,25 |

Para a produção de etanol, 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 19.

Tabela 19 – ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, os coeficientes de regressão e significância estatística (p) para a resposta etanol, utilizando o meio sintético, fermentado por *P. tannophilus*, em diferentes valores das variáveis.

| Variáveis | Etanol | | |
|------------------|---------|--------------|-------|
| | Efeitos | Coeficientes | p |
| Tempo (h) | -6,297 | -3,149 | 0,005 |
| Temperatura (°C) | 2,056 | 1,028 | 0,308 |
| Agitação (rpm) | 1,712 | 0,856 | 0,394 |
| pH | 14,278 | 7,139 | 0,000 |
| HD (%) | 0,842 | 0,421 | 0,672 |

Os resultados apresentados na Tabela 19 mostram que, para produção de etanol, as variáveis independentes: tempo (h) e pH foram significativas ($p \leq 0,05$). A variável tempo foi a única que influenciou negativamente (menor nível testado), apresentando coeficiente <0 , as demais variáveis influenciaram positivamente (maiores níveis testados) com coeficiente >0 , nestes ensaios com o hidrolisado sem desintoxicar como substrato mostrou que a concentração foi o principal fator de influencia para a produção do etanol.

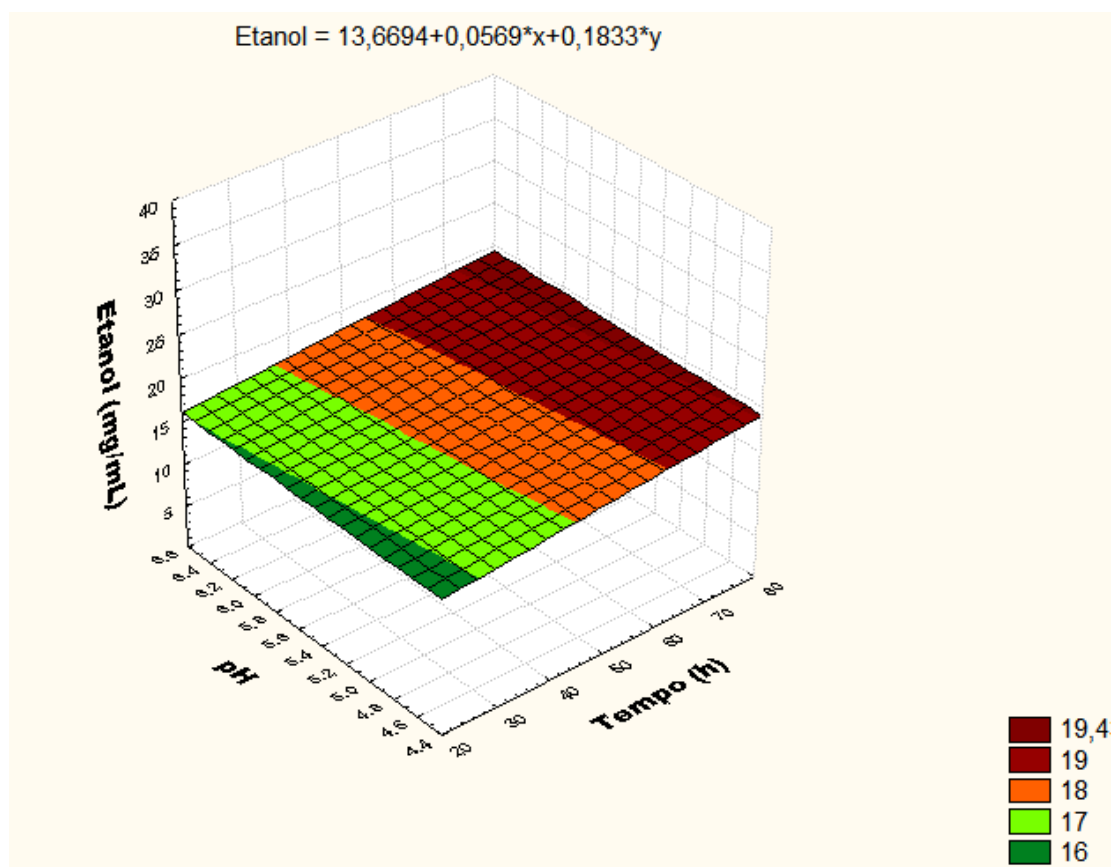
Analizando cada ensaio individualmente, a maior produção de etanol (26,2 mg/mL) foi obtida no ensaio 8 da fermentação com a levedura *P.tannophilus* e o hidrolisado desintoxicado como substrato, em que foram utilizadas as condições de temperatura 25 °C, concentração do hidrolisado desintoxicado 150 g/L e o tempo de fermentação de 24 h. Porém a maior produtividade foi de 1,0 g/L.h no ensaio 3 em que as condições utilizadas foram tempo de 24 horas, temperatura de 35 °C, sem agitação com pH 4,5 e concentração do hidrolisado desintoxicado de 150 g/L (Tabela 18).

A maior biomassa (7,6 mg/mL) foi obtida no ensaio 6 que utilizou tempo 24 h, temperatura 35 °C, agitação 150 rpm, pH 4,5 e concentração da glicose de 5% m/v. Neste ensaio obteve-se a menor produção de etanol 3,5 mg/mL (Tabela 14).

Analizando a superfície de resposta para etanol ao redor do tempo e pH as duas únicas variáveis que foram significativas (Figura 30), os melhores resultados para etanol ocorreram proporcionalmente, tanto para o tempo de incubação como para o pH. Os maiores níveis testados destas variáveis independentes apresentaram

maiores efeitos para a produção de etanol.

Figura 30. Superfície de resposta para produção de etanol por *P. tannophilus* utilizando as variáveis Tempo (24, 48 e 72 h) e pH (4,5, 5,5, 6,5) no meio com hidrolisado desintoxicado.

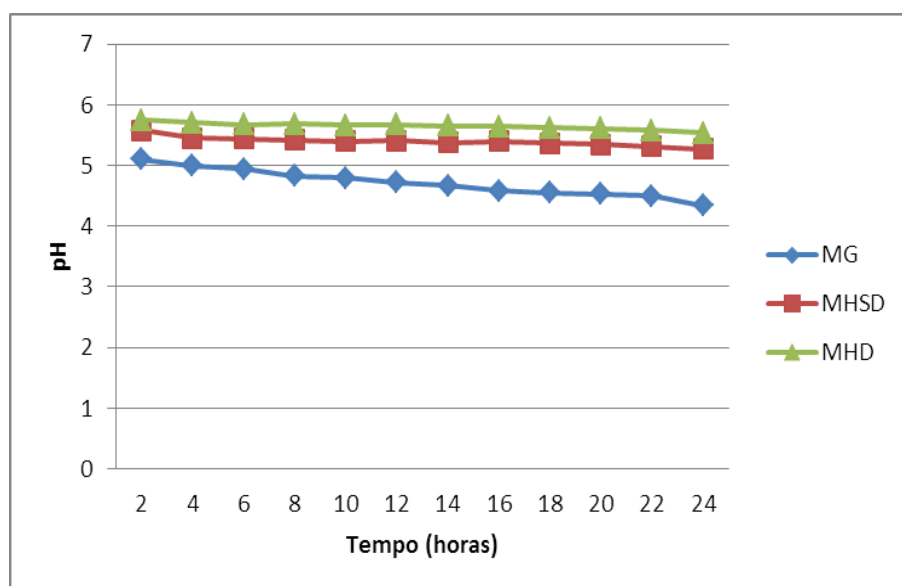


5.3.4 CINÉTICA DAS FERMENTAÇÕES COM A LEVEDURA ATÉ 24 HORAS

5.3.4.1 pH

As condições de fermentação para *P. tannophilus* foram as mesmas aplicadas a *Z. mobilis*, para analisar o comportamento das duas em condições idênticas, mas separadamente, sendo então o pH inicial de 5,5. A Figura 31 mostra que, assim como ocorreu com *Z. mobilis*, o pH diminuiu gradativamente com o tempo, mas com pouca variação com os meios MHSD e HD o que demonstrou o comportamento tamponante destes meios contendo o hidrolisado.

Figura 31. Cinética do pH da fermentação por *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



O trabalho de Rodríguez et al. (1990), apresentou resultados para crescimento celular nos ensaios com diferentes variáveis de pH inicial (2,5; 3,5; 4,5 e 5,5) no meio contendo xilose, mostram que no pH inicial de 1,5 teve o menor crescimento de 0,02 a 0,04 g/L. Estes autores analisaram também a variação do pH com o tempo e no pH inicial de 1,5; não foram constatadas variações e não teve consumo da xilose nem produção de etanol. Nos demais pH testados notaram que houve um declínio do pH com o tempo, e ao final da fase exponencial o pH estabiliza com o consumo de até 80% da xilose presente no meio; observaram, ainda que o declínio do pH está ligado ao crescimento celular e produção de ácidos orgânicos em conjunto com o etanol.

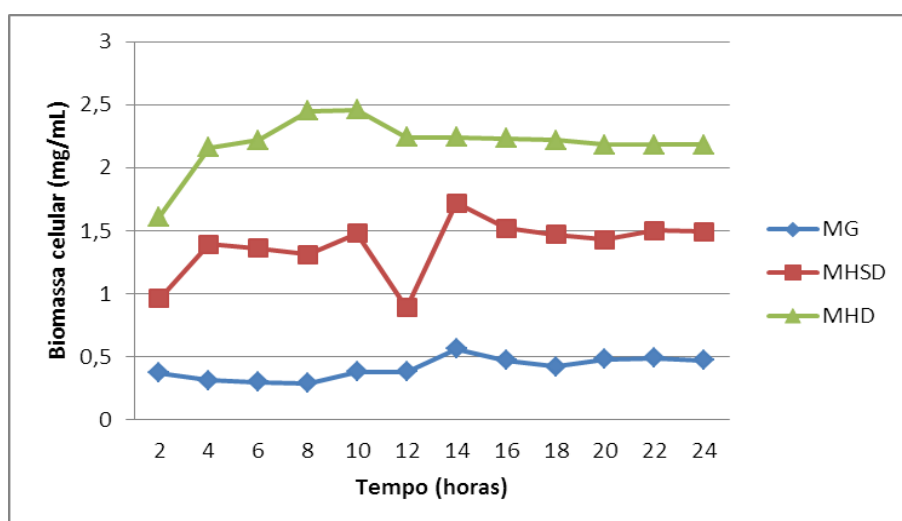
Neste presente trabalho os pH finais variaram de 4,3 a 5,1 de 5,3 a 5,6 e de 5,5 a 5,8 nos meios MG, MHSD e MHD, respectivamente. O meio com hidrolisado desintoxicado apresentou um aumento no pH inicial e, a partir das 4 h de fermentação o pH declinou com pouca variação. O meio com glicose foi o que teve o maior declínio do pH, em comparação com os meios contendo hidrolisado desintoxicado ou não desintoxicado, comportamento semelhante ao que ocorreu na fermentação com a *Z. mobilis*.

5.3.4.2 CRESCIMENTO CELULAR (BIOMASSA)

O inóculo inicial foi de 0,1 mg/mL de *P. tannophilus*. A Figura 32 mostra o

crescimento celular da *P. tannophilus* durante a fermentação de 24 h. Observa-se que houve um aumento com o tempo até as primeiras 10 h, nas duas horas posteriores teve um declínio, e voltou a ter crescimento a partir das 14 h de fermentação estabilizando-se até as 24 h. O maior crescimento foi no MHD 2,5 mg/mL na fermentação até 24 h no tempo de 10 h de fermentação e o menor crescimento da biomassa celular foi no MG 0,3 mg/mL e 0,6 mg/mL, respectivamente. O crescimento da biomassa celular no MHSD permaneceu entre 0,9 mg/mL (no tempo de 12 h) a 1,7 mg/mL (no tempo de 14 h).

Figura 32. Cinética de crescimento da biomassa de *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



Na figura 32 observa-se, que inicialmente teve a adaptação ao meio e então o crescimento e produção de etanol, posteriormente uma queda no crescimento, pois as células de *P. tannophilus* apresentam pouca tolerância a quantidades elevadas de etanol (ZHAO et al., 2010). Então as células que remanescentes, provavelmente entraram em homeostase e as funções celulares (internas) adaptaram-se para aquelas condições externas do meio; voltaram a se desenvolver e manter o crescimento celular com os níveis de produção de etanol estabilizados (Figura 34). Schneider et al. (1981) Identificaram a *P. tannophilus* como uma levedura capaz de converter xilose a etanol, aumentando a conversão em meio aeróbio e determinaram rendimentos de aproximadamente 0,3 g de etanol/ g de xilose a 30°C.

Sánchez et al. (2004) testaram a influência da temperatura na produção de etanol as condições por eles testadas foram pH 4,5, concentração inicial de D-xilose de 25 g/L e aeração de 500 rpm. Nestas experiências alteraram a temperatura de 10

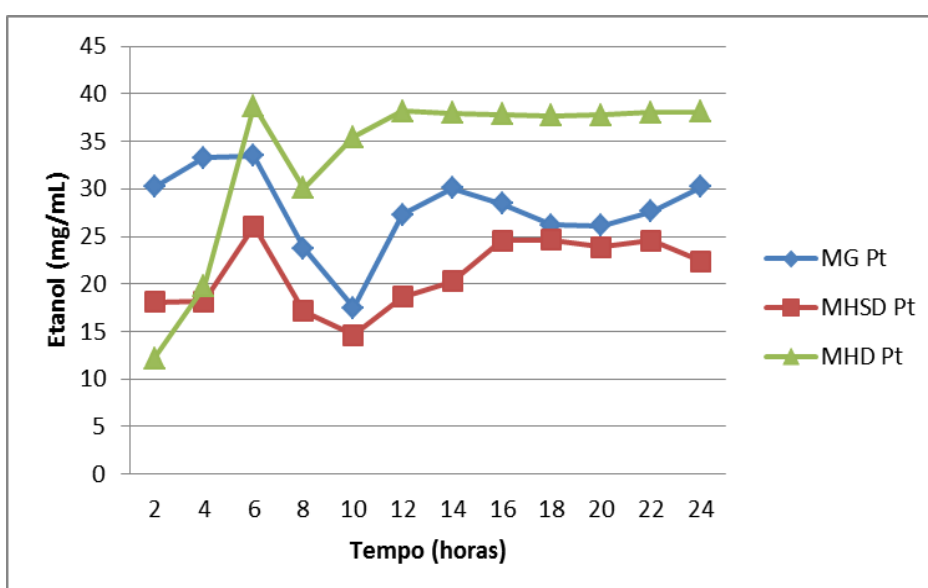
a 40 °C. Eles observaram que somente essas culturas cultivadas entre 10 e 15 °C passaram por uma fase lag considerável. À temperatura mais baixas o período foi de cerca de 7 h, enquanto em temperaturas acima de 20 °C foi com menos de 2 h. Após isso, houve o período da fase de crescimento exponencial curto de entre 3 e 48 h para temperaturas de entre 40 e 10°C, respectivamente. Posteriormente houve um período consideravelmente entre 75 e 314 h, durante o qual o crescimento se manteve razoavelmente linear. O crescimento finalmente entrou em uma fase estacionária coincidindo com o consumo total do substrato. No presente trabalho, esta fermentação utilizou a temperatura de 30°C que está no período que apresentou maior crescimento exponencial e a partir de 14 h o crescimento entrou em fase linear; nesta fase estacionária a produção de etanol também se estabilizou.

5.3.4.3 PRODUÇÃO DE ETANOL

Na Figura 33 estão apresentados os resultados da produção de etanol durante a fermentação de 24 h, determinada em intervalos de 2 h de fermentação pela levedura *P. tannophilus*.

Os valores máximos obtidos foram de 33,5 mg/mL, 26,1 mg/mL e 38,7 mg/mL nos meios MG, MHSD e HD, respectivamente. Todos os resultados foram obtidos em 6 h de fermentação. A levedura teve um desempenho 6,3, 1,0 e 5,5% maior que *Z. mobilis* nos meios MG, MHSD e MHD, respectivamente.

Figura 33. Cinética da produção de etanol na fermentação por *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



O trabalho de Sánchez et al. (2004) apresentou o valor mais alto para a taxa específica de produção de etanol (0.4 kg de etanol/kg de D-xilose), a 30°C e este valor diminuiu consideravelmente a temperaturas mais baixas. Portanto, esta foi a temperatura escolhida no presente trabalho para a fermentação até 24 h.

Ramon et al. (2011) realizaram experimentos com o objetivo de estudar a capacidade fermentativa da levedura *Pachysolen tannophilus*, A fermentação foi usando apenas a levedura na sua forma natural, capaz de fermentar pentoses, tais como xilose, no período de 24 horas. Para a análise de misturas de açúcares utilizaram várias relações de concentrações deste açúcares, tais como: 25% xilosa/75% de glicose, 50% de xilose/ 50% de glicose e 75% xilosa/ 25% de glicose a uma concentração inicial de 20 g/L destas misturas de açúcar, com agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. O tempo de amostragem foi de 48 h. Obtiveram uma concentração de 4,5 g/L a 50% de xilose/50% de glucose em 48 horas de amostragem. Observaram que quando utilizaram os açúcares isolados não obtiveram resultados significativos; a levedura inicia a fermentação utilizando glicose, mas logo em seguida utiliza a xilose como fonte de carbono. O presente trabalho obteve resultados de, na condições operacionais aplicadas, 88,4%.

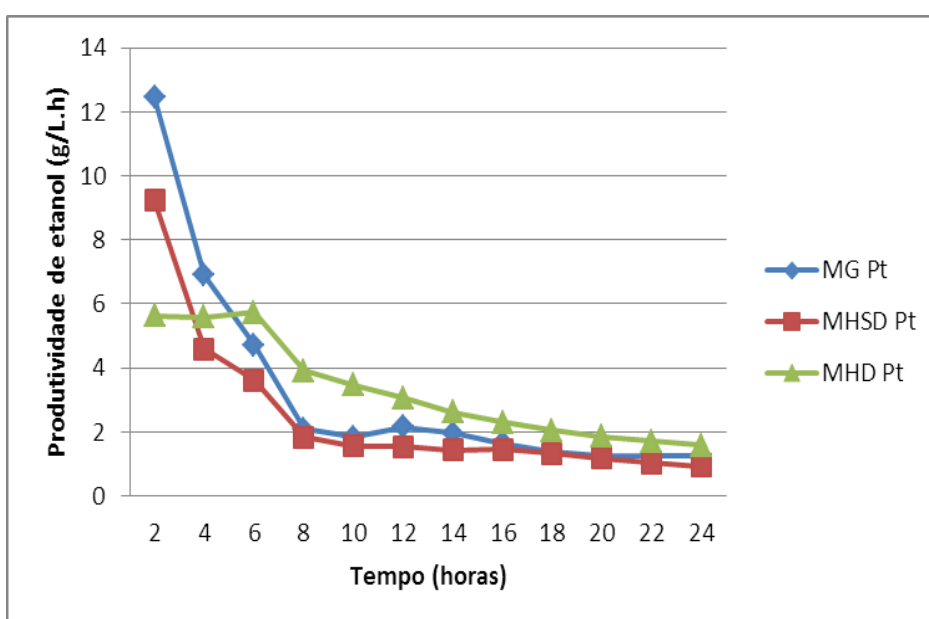
5.3.4.4 PRODUTIVIDADE

A produtividade do etanol por *P. tannophilus* foi semelhante a por *Z. mobilis* com exceção do MHD em que a levedura teve um período maior para produzir o etanol em relação a *Z. mobilis*, todos os meios estão apresentados na Figura 34, observa-se que a maior produtividade foi também no MG (12,4 g/L.h⁻¹), apesar deste também não ter apresentado a maior produção para etanol, mas foi o meio que proporcionou o rápido início da fermentação, pelo fato da glicose estar disponível de forma livre, facilitando sua assimilação pela *P. tannophilus*. Esta levedura também foi mantida previamente no meio contendo glicose como fonte de carbono e precisou de uma fase maior de adaptação ao meio com o hidrolisado. Porém no tempo de 6 h a produtividade foi maior no meio com o hidrolisado desintoxicado 5,7 g/L.h⁻¹ e manteve-se com a maior produtividade até o final às 24 h de fermentação, em comparação com os outros meios (MG e MHSD).

Cheng et al. (2008) utilizaram o hidrolizado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido para fermentação pela cultura *Pachysolen tannophilus* DW06

foram incubados a 30 °C durante 14 h e posteriormente inoculada em bioreactor de 5% (v/v). Controlaram o pH a 5 e todas as experiências de fermentação foram realizadas a 30 °C e 150 rpm. Obtendo 19 g/L de etanol e produtividade de 0,6 g/L.h⁻¹. Resultados menores dos apresentados no presente trabalho que teve produção de etanol 50,1% maior no tempo de 6 h com produtividade de 5,7 g/L.h⁻¹.

Figura 34. Produtividade do etanol na fermentação por *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



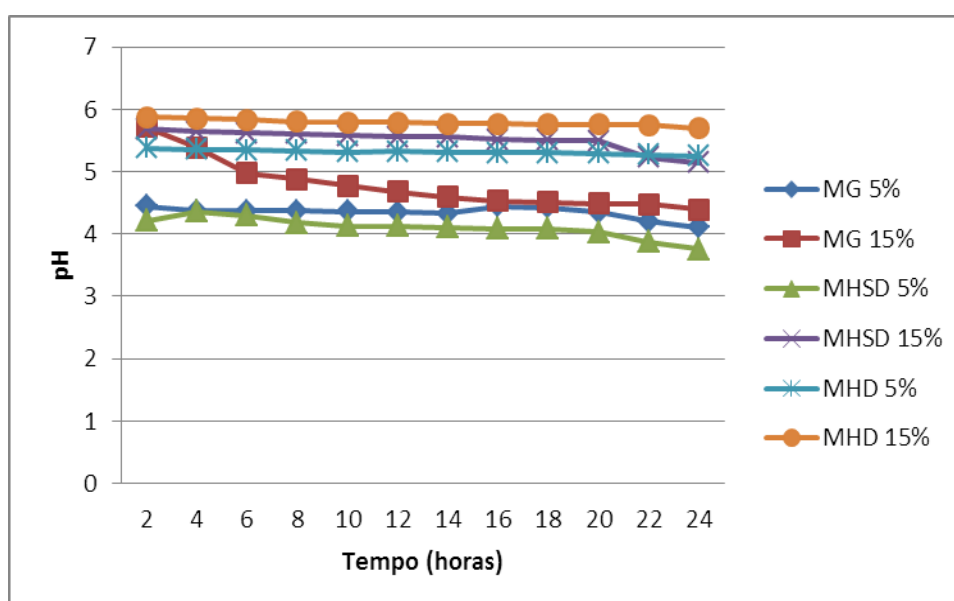
5.4 CONSÓRCIO

Para o consórcio com *Z. mobilis* e *P. tannophilus* foram testadas duas condições diferentes. Estas condições foram escolhidas a partir das variáveis que mais afetaram ambos os micro-organismos nos ensaios realizados com o planejamento experimental que para *Z. mobilis*. Estas, foram pH 4,5 e concentração baixa de substrato 5% m/v e para a *P. tannophilus* foram pH 6,5 e concentração elevada de substrato 15% m/v. Foram inoculados 0,1 mg/mL de cada micro-organismo juntos ao início da fermentação nos meios MG, MHSD e MHD, incubados sem agitação em temperatura de 30°C, e foram analisados a cada 2 h o pH final, a biomassa celular e a produção de etanol.

5.4.1 PH FINAL

O pH do meio MG 15% (pH inicial de 6,5) foi o que apresentou maior declínio com o tempo, nos demais meios testados houve pouco declínio de pH mantendo-se linear, mostrando que, principalmente nos meios com o hidrolisado como substrato tiveram comportamento tamponante. Isto mesmo que ocorreu nas fermentação com os micro-organismos individualmente (Figura 35).

Figura 35. Cinética do pH da fermentação pelo consórcio de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



As fermentações de cada micro-organismo com pH 5,5 tiveram resultados para a produção de etanol próximos aos obtidos com o consórcio e, o pH inicial pode ser tanto 5,5 quanto 6,5, mostraram influência positiva para etanol. Fu e Peiris (2008) notaram que houve uma correlação entre pH e utilização do substrato. A diminuição do pH é provavelmente devido para a produção de dióxido de carbono durante a fermentação de etanol. O dióxido de carbono produz ácido carbônico no meio que, em seguida, diminui o pH.

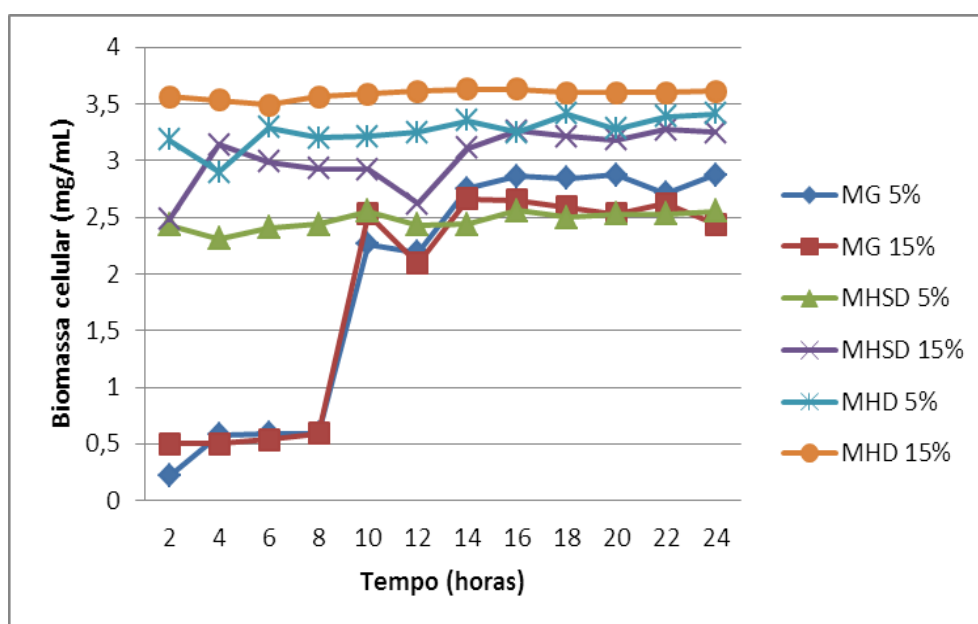
5.4.2 CRESCIMENTO CELULAR (BIOMASSA)

O inóculo inicial foi de 0,1 mg/mL de cada micro-organismo totalizando 0,2 mg/mL para a co-cultura. A Figura 36 apresenta o crescimento celular nos meios testados. Nesta, é visível que o meio MG (5 e 15%) iniciou o crescimento

exponencial a partir de 8 h de fermentação. O melhor resultado de biomassa (entre 3,56 mg/mL e 3,61 mg/mL) foi no meio MHD 15% m/v (pH 6,5) e no meio MHD 5% (entre 3,18 mg/mL e 3,41 mg/mL) o crescimento foi de forma linear. Nos meios MHSD o crescimento foi intermediário entre os outros dois meios ficando entre 2,43 a 2,55 mg/mL no MHSD 5% e 2,48 a 3,25 mg/mL, somente a partir de 14 h de fermentação o crescimento em MHSD 5% se igualou ao meio MG 15%. Os dois micro-organismos tiveram boa interação juntos; não afetando o crescimento, aparentemente se favoreceram. O crescimento foi exponencial em relação ao tempo.

Fu e Peiris (2008) observaram que no tempo que atingiram a máxima produção de etanol a biomassa mostrou um aumento constante, indicando que a produção de etanol atingiu o pico na fase log de crescimento celular. No presente trabalho, crescimento permaneceu linear (3,6 mg/mL) no meio que obteve a melhor produção de etanol.

Figura 36. Cinética do crescimento da biomassa celular de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



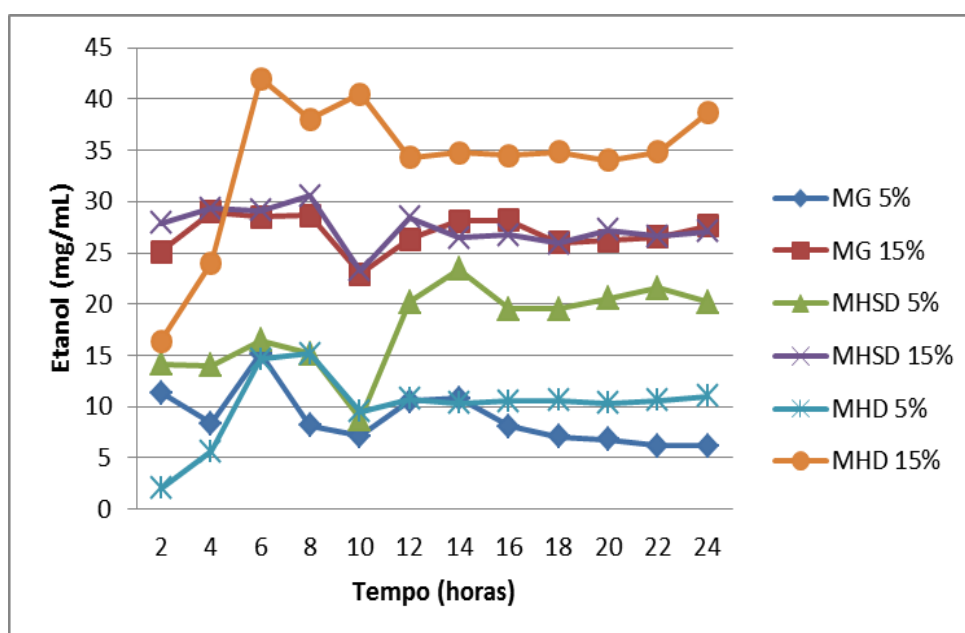
5.4.3 PRODUÇÃO DE ETANOL

Os valores máximos de concentração de etanol obtidos foram de 29,0 mg/mL, 30,6 mg/mL e 42,0 mg/mL nos meios MG, MHSD e MHD (15%) tempos de 4, 8 e 6 h, respectivamente, para os meios MG, MHSD e MHD (5%) foram 15,2 mg/mL, 23,4 mg/mL e 15,2 mg/mL, respectivamente. O maior resultado obtido em menor tempo

foi no meio MHD 15% em 6h de fermentação este foi o maior resultado de produção de etanol alcançado neste trabalho. Os resultados com os meios MG, MHSD e MHD 5% foram menores 45,2, 23,5 e 63,9%, respectivamente (Figura 37).

Singh et al. (2014) utilizando a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* para fermentar um hidrolisado de grama holandesa obtiveram a concentração máxima de etanol de 57,8 g/L. Resultado maior que a do presente trabalho, entretanto, eles utilizaram outras condições operacionais separando a fermentação em duas fases diferentes.

Figura 37. Cinética da produção de etanol na fermentação pelo consórcio de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



Fu e Peiris (2008) realizaram um pesquisa para maximizar a produção de etanol a partir de uma mistura de açúcar glicose e xilose por co-fermentação com os mesmos micro-organismos utilizados neste trabalho, *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus*. Na otimização da co-fermentação com a mistura de açúcar (60 g de glicose/L e 40 g de xilose/L) obtiveram um total de 23,5 g/L de etanol em 8 h. A co-fermentação aumentou o rendimento de etanol a partir de xilose. Observaram que a glicose e a xilose foram completamente utilizada e não encontraram açúcar residual no meio ao final da fermentação. As condições ótimas estavam a uma temperatura de 30 °C, a inoculação inicial com *Z. mobilis* e incubação sem aeração e, inativação de bactéria após a utilização da glicose,

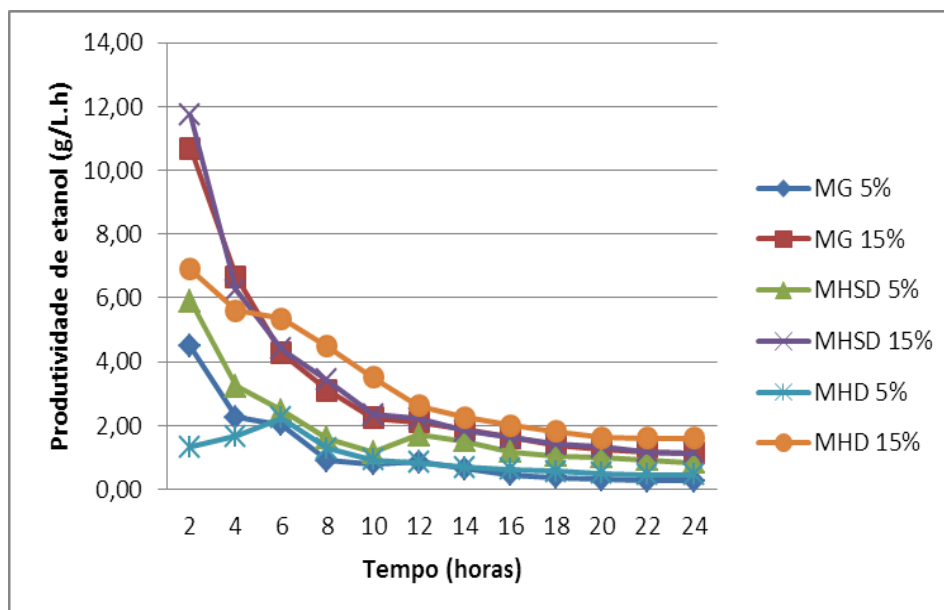
seguido pela inoculação com *P. tannophilus* e incubação com arejamento limitado. As condições de temperatura e agitação inicial foram as mesmas condições otimizadas para o consórcio no presente trabalho, mas os micro-organismos foram inoculados juntos, ao mesmo tempo, para iniciar a fermentação e utilizando o hidrolisado sem desintoxicar e desintoxicado.

Thongdumyu et al. (2014) analisaram a conversão completa de açúcares (hexoses e pentoses) nos hidrolisados de resíduos alimentares para o etanol, com objetivo de maximizar a rentabilidade de um processo industrial para a produção de bioetanol por co-cultura de *Z. mobilis* e *Candida shehatae* em condições não estéril. A produção de etanol de 77,6 g/L, obtido sob condições otimizadas, foi de 56% de aumento em comparação com o uso de resíduos alimentares cru (34 g/L). A produção de etanol de hidrolisado de resíduos por co-cultura foi de 77,6 g/L, enquanto que, apenas com *Z. mobilis* rendeu 54,2 g/L e *C. shehatae* rendeu 48 g/L. A produção de etanol em fermentador de 1 L por co-cultura também obtiveram um rendimento de etanol de 78,8 g/L. A produção de etanol no presente trabalho foi menor, mas semelhante ao ocorrido na pesquisa deles. Quer dizer, o consórcio teve maior produção de etanol do que na fermentação de cada micro-organismo separadamente. Diferente do trabalho de Taniguchi et al. (1997) que com o consórcio entre *P. stipitis* e *S. Cerevisiae* em que a produção de etanol com cultura única de *P. stipitis* foi maior do que com o consórcio.

5.4.4 PRODUTIVIDADE

A produtividade do etanol pelo consórcio de *P. tannophilus* e *Z. mobilis* está apresentado na Figura 38. Observa-se que a maior produtividade foi no MHSD 15% (11,7 g/L.h⁻¹) seguida da produtividade nos meios MG 15% (10,7 g/L.h⁻¹) e MHD 15%(6,9 g/L.h⁻¹) no tempo de 2 h de fermentação. Porém, a partir de 6 h de fermentação o MHD 15% (pH 6,5) apresentou a maior produtividade (5,4 g/L.h⁻¹ em 6 h de fermentação), em comparação a todos os outros meios testados.

Figura 38. Produtividade do etanol na fermentação pelo consórcio de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* durante o período de 24 horas determinado a cada 2 horas.



Singh et al (2014) utilizando a co-cultura *Z. mobilis* e *P. stipitis*, tiveram com o melhor resultado de etanol, no meio com hidrolisado de grama holandesa, uma produtividade de $0,7 \text{ g/L.h}^{-1}$ e com o meio sintético tiveram uma produtividade de $2,9 \text{ g/L.h}^{-1}$. Foi menor que no presente trabalho que obteve produtividade de $5,4 \text{ g/L.h}^{-1}$.

No trabalho de Fu et al. (2009) realizaram uma co-cultura com células imobilizada de *Zymomonas mobilis* e células livres de *Pichia stipitis*, em um fermentador modificado para fermentação da glicose e da xilose, respectivamente. Utilizaram uma mistura de açúcar 30 g/L de glicose e 20 g/L de xilose e observaram que foram completamente convertido em etanol dentro de 19 h. Com rendimento de etanol de 0,49-0,50 g/g, isto deu uma produtividade de etanol de $1,3 \text{ g/L.h}^{-1}$. Produtividade menor que no presente trabalho que foi de $5,4 \text{ g/L.h}^{-1}$ em 6 h de fermentação como MHD 15% (42,0 mg/mL etanol).

6 CONCLUSÕES

O pré-tratamento com ácido sulfúrico utilizando concentração de 2% mostrou ser eficaz na liberação de açúcares fermentescíveis a partir do bagaço de cana-de-açúcar mostrando ser um substrato com potencial para ser utilizado em fermentações etanólicas. A desintoxicação aplicada reduziu 26,2% de compostos fenólicos totais e mostrou ser necessária para o desempenho fermentativo dos micro-organismos inoculados.

O planejamento fatorial utilizado foi importante para conhecer melhor o comportamento dos micro-organismos com relação as diferentes variáveis independentes utilizadas, com os três meios testados. Proporcionando escolher as melhores condições para a cinética das fermentações realizadas com até 24 horas, pois as melhores produtividades de etanol foram neste tempo.

Foi possível constatar que *Z. mobilis* e *P. tannophilus* são micro-organismos com grande potencial para a produção de etanol, mesmo individualmente.

Porém, o consórcio entre os micro-organismos mostrou ser promissor, principalmente para a utilização de hidrolisados a partir de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar, que são encontrados em abundância e tem baixo custo econômico, podendo ampliar ainda mais a produção de etanol nas usinas que já produzem o etanol a partir da cana-de-açúcar.

Ainda são necessários estudos mais específicos e abrangentes, para conseguir resultados mais eficientes. Entretanto este trabalho contribuiu para o conhecimento da interação destes micro-organismos na converção do hidrolisado de um material lignocelulósico, uma sugestão para futuros trabalhos seria, estudo da cinética de fermentações com tempo menor que 2h, com monitoramento a cada 15 min em batelada alimentada, uma vez que, é um processo sustentável e poderá ampliar a produção de combustível ecologicamente aceitável, o que pode diminuir desperdícios nas usinas sucroalcooleiras.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R.; IREZ, J.A.R.; GARROTE, G.; AZQUEZ, M. V. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**. v. 55, p. 309-318. 2002.
- ANTUNES, R.; SILVA, I. C. O Papel dos Micro-organismos no Futuro dos Biocombustíveis. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial-Inpe**. Nov. 2011.
- AVCI, A.; SAHA, B. C.; KENNEDY, G. J.; COTTA, M. A. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. **Bioresource Technology** . v. 142, p. 312-319. 2013.
- BATTISTELLE, R. A. G.; MARCILIO, C.; LAHR, F. A. R. Emprego do bagaço da cana-de-açúcar (*saccharum officinarum*) e das folhas caulinares do bambu da espécie *dendrocalamus giganteus* na produção de chapas de partículas. **Pesquisa e tecnologia Minerva**. v. 5(3), p. 297-305. 2009.
- BIZZO, W. A., LENÇO, P. C., CARVALHO, D. J., VEIGA, J. P. S. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 29, p. 589-603. 2014.
- BOIDIN, J.; ADZET, J. M. Deux curieuses levures isolées d'extraits tannants d'origine végétale: *Pachysolen* (nov. gen.) *tannophilus* nov. sp. et *P. pelliculatus* nov. sp. **Bulletin de la Société Mycologique de France**. v. 73, p. 332-342. 1957.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building. New York: **John Wiley and Sons**, 1978.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. **Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability**, Chapter 7: Routes for cellulosic ethanol in Brazil (book). Ed. Edgard Blucher Ltda. 994 p. 2010.
- CAMÊLO, A.C. R. **Investigação do Comportamento Dinâmico na Produção Contínua de Etanol por *Zymomonas mobilis***. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2009.
- CAMILIOS NETO, D.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; OLIVEIRA, M. R. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melão de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**. Londrina. v. 26. n. 1. p. 17-22. jan/jun. 2005.
- CARVALHO, G. B. M.; GINORIS, Y. P.; SILVA, C. C.; CÂNDIDO, E. J.; SILVA, J. B.

A. Avaliação preliminar do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para fins biotecnológicos. **Revista Analytica**. n. 17, p. 33-37 jun/jul. 2005.

CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.C., LOPES, S., PARAJÓ, J.C., PEREIRA, H., GÍRIO, FM. Evaluation of the detoxication of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Proc. Biochem.** 40, p. 1215-1223. 2005.

CAZETTA, M.L.; CELLIGOI, M.A.P.C.; BUZATO, J.B.; SCARMINO I.S. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 2824-2828. 2007.

CHANDEL, A. K.; RAJEEV, K.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 69, n. 1, p.67-72. 2004.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J. A.; LING, H. Z.; ZHOU, Y. J.; GE, J. P. J. M. XU. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**. v. 38, p. 105-109. 2008.

CHIESA, S.; GNANSOUNOU, E. Use of Empty Fruit Bunches from the Oil Palm for bioethanol production: A thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. **Bioresource Technology**. v. 159, p. 355-364. 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar safra de 2014/2015, primeiro levantamento**. abril 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_15_15_44_37_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_14.pdf> Acessado em: 30 abr. 2014.

CONVERTI, A. PEREGO, P. e DOMINGUEZ, J. M. Microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus* at different pH values. **Biotechnology Letters**. v. 21. p. 719-723. 1999.

DHABHAI, R.; CHAURASIA, S. P.; SINGH, K.; DALAI, A. K. Kinetics of Bioethanol Production Employing Mono- and Co-Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipites*. **Chem. Eng. Technol**, v. 36, n. 10, p. 1651-1657. 2013.

DUBOIS, M. Colorimétric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, St. Paul, v. 28, n. 3, p. 350-356. 1956.

EL-TAYEB, T.S.; ABDELHAFEZ, A.A.; ALI, S.H.; RAMADAN, E.M. Effect of acid hydrolysis and fungal biotreatment on agro-industrial wastes for obtainment of free sugars for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 1523-1535. 2012.

ERNANDES, F. M. P. G. **Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo** (caldo de

cana-de-açúcar). 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2006.

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**. Maringá, v. 32. n. 1. p. 21-26. 2010.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção Bacterial Levan: technological aspects, characteristics and production. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 69-80. jan./mar. 2005.

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

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Uso de caldo de cana-de-açúcar para produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT4494. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 35, n. 2, p. 354-360. mar./abr., 2011.

FERREIRA, J. **Produção de levana e bioetanol utilizando cascas de banana por *Zymomonas mobilis***. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2013.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Quím. Nova**. v. 32, n. 3, São Paulo. 2009.

FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo. Lorena. 2009.

FRANDEN, M. A.; PILATH, H. M.; MOHAGHEGHI, A.; PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 99. p. 1-15. 2013.

FU, N. e PEIRIS, P. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. **World J Microbiol Biotechnol**. 24, 1091-1097. 2008.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 45, p. 210-217. 2009.

GUILMAN, F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Comparação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em meio de melaço de cana-de-açúcar puro e pré-tratado com invertase. **Semina: Cio Biol. Saúde**. Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 39-43. Jun. 1999/2000.

HARNER, N. K.; BAJWA, P. K.; HABASH, M. B.; TREVORS, J. T.; AUSTIN, G. D.; LEE, H. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus* tolerant to hardwood spent sulfite liquor and acetic acid. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 105, p. 29-43. 2014.

HYVARINEN, S.; MIKKOLA, J.P.; MURZIN, D. YU.; VAHER, M.; KALJURAND, M.; KOEL, M. Sugars and sugar derivatives in ionic liquid media obtained from lignocellulosic biomass: Comparison of capillary electrophoresis and chromatographic analysis. **Catalysis Today**. v. 223. p. 18-24. 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: O Instituto, 2005.

KALNENIEKS, U. Physiology of *Zymomonas mobilis*: Some Unanswered Questions. **Advances in Microbial Physiology**. v. 51. p. 73-115. 2006.

KAYE, S.; HAAG, H. B. Determination of ethyl alcohol in blood. **Journal of Forensic Medicine**, v. 1, p. 373, 1954.

KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J., STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 48, p. 3713-3729. 2009.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. O Biocombustível no Brasil. **Novos Estudos-CEBRAP**, 78, p. 15-21, jul., 2007.

MA, Y.; DONG, H.; ZOU, S.; HONG, J.; ZHANG, M. Comparison of glucose/xylose co-fermentation by recombinant *Zymomonas mobilis* under different genetic and environmental conditions. **Biotechnology Letters**. v. 34, n. 7, p. 1297-1304. July 2012.

MALESZKA, R., JAMES, A. P., SCHNEIDER, H. Ethanol Production from Various Sugars by Strains of *Pachysolen tannophilus* Bearing Different Numbers of Chromosomes. **Journal of General Microbiology**, v. 129. p. 2495-2500. 1983.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Tradução Andrea Queiroz Maranhão. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAGALHÃES, T. S. **Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto. 2011.

MAICHE, R.; HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. **Revista Thema**. 19 f. 2010.

MARTINEZ, A., RODRIGUEZ, M. E., YORK, S. W., PRESTON, J. F., INGRAM, L. O. Effects of Ca(OH)₂ treatment ("Overliming") on the composition and toxicity of Bagasse Hemicellulose Hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 5, p. 526-536. 2000.

MELO, I.R.; PIMENTEL, M.F.; LOPES, C.E.; CALAZANS, G.M.T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian**

Journal of Microbiology. v. 38. p.45-51. 2007.

MILLATI, R.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry.** v. 38 p. 515-522. 2002.

MONTESI, E. A.; CANILHA, L.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Utilização de membrana de fibras ocas na destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de açúcar visando à produção de etanol. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports** - ISSN 2316-5200. v. 2, n. 3, p. 29-33, 2013.

MORAIS, A. P. S.; BROETTO, F. Pré-hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química. **Energ. Agric., Botucatu**, v. 27, n.4, p. 01-12. out./dez., 2012.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz na produção de xilitol. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 24, n. 11, p. 94-100. 2004.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology letters.** v. 23, p. 1681-1684. 2001.

NITZKE, J. A., BIEDRZYCKI, A. **Micro-organismos na Fermentação.** ICTA, UFRGS. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/alimentus/pao/fermentacao/fer_tipos_de_mos.htm>. Acessado em: 31 maio 2012.

NELSON, N. A. photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, n. 2, p. 375-380. 1944.

NETO; D. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; OLIVEIRA, M. R. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melaço de cana-de-Açúcar. **Semina: Ciências exatas e tecnológica**, Londrina. v. 26, n. 1, p. 17-22. jan/jun, 2005.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OMORI, W. P., PIRES, R. T., OGASSAVARA, F. O., FRIGIERI, M. C. Emprego de cepas de *Zymomonas mobilis* em processos fermentativos. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v. 3, n. 1, p. 28-49, 2011.

PAL, M., CALVO, A. M., TERRÓN, M. C., GONZÁLEZ, A. E. Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 541-545. 1995.

PARK, E. Y; NARUSE, K.; KATO, T. One-pot bioethanol production from cellulose byco-culture of *Acremonium cellulolyticus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels.** 2012.

PENTJUSS, A.; ODZINA, I.; KOSTROMINS, A.; FELL, D. A.; STALIDZANS, E.; KALNENIEKS, U. Biotechnological potential of respiring *Zymomonas mobilis*: A stoichiometric analysis of its central metabolism. **Journal of Biotechnology**. v. 165, p. 1-10. 2013.

PIACENTE, E. A. **Perspectivas do Brasil no Mercado Internacional de Etanol**. Dissertação (Mestrado em Planejamento de Sistemas Energéticos). Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2005.

PINHEIRO, R. S., MENDES, J. S., SILVA, A. L. O. Estudo da produção microbiana de álcool utilizando glicerol como substrato. **Anais: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Uberlândia, Minas Gerais. jul. 2009.

PINILLA, L.; TORRES, R.; ORTIZ, C. Bioethanol production in batch mode by a native strain of *Zymomonas mobilis*. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 27, p. 2521-2528. 2011.

RABÊLO, T. C. B., OLIVEIRA, E. G., FERREIRA, A. L. O. Isolamento de leveduras potencialmente produtoras de etanol à partir de suco de caju e extrato de algaroba. In **anais: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia-SP. maio/jun. de 2007.

RAMON, Y. A.; GARRIGA, L. M.; SUÁREZ, E. G. Estudio de la fermentación alcohólica de mezclas de glucosa y xilosa usando *Pachysolen tannophilus*. **Centro Azúcar**. v. 38, n. 4, p. 36-41. out./dez., 2011.

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.

RODRÍGUEZ, V. B.; RUBIO, F. C.; SANCHO, E. M.; GÓMEZ, P. S. Crecimiento lineal em la fermentación etanólica de xilosa com *Pachysolen tannophilus*. **Afinidad XLVII**. v. 429. set./out. 1990.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnol Prog**. v. 21, p. 816-822. 2005.

SAHARAN, R. K.; SHARMA, S. C. FTIR spectroscopy and biochemical investigation of ethanol stressed yeast *Pachysolen tannophilus*. **Vibrational Spectroscopy**. v. 55, p. 85-89. 2011.

SÁNCHEZ, S.; BRAVOB, V.; MOYA, A.J.; CASTRO, E.; CAMACHO, F. Influence of temperature on the fermentation of d-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. **Process Biochemistry**. v. 39, p.673-679. 2004.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, E. S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim. Nova**. v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, M. L.; LIMA, O. J.; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J.; CALEFI, P. S. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Quím.**

Nova. v. 34 n. 3. São Paulo. 2011.

SANTOS, J. R. A., GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais.** Campina Grande. v. 11. n. 1. p. 27-33. 2009.

SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy.** ed. Elsevier. v. 32. p. 422-430. 2008.

SCHULZ, M. A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana.** 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE). Joinville. 2010.

SCHNEIDER, H.; WANG, P.Y.; CHAN, Y.K.; MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnol. Letters.** v. 3, n. 89. 1981.

SLININGER, P. J.; BOLEN, P. L.; KURTZMAN C. P. *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. **Enzyme Microb. Technol.** v. 9, jan., 1987.

SINGH, L. K.; MAJUMDERB, C. B.; GHOSHA, S. Development of sequential-co-culture system (*Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*) for bioethanol production from Kans grass biomass. **Biochemical Engineering Journal.** v. 82. 150-157. 2014.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry.** v. 195, n. 1, p. 19-22. 1952.

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

TANIGUCHI, M.; ITAYA, T.; TOHMA, T.; FUJII, M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by a novel co-culture system with two fermentors and two microfiltration modules. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** v. 84, n. 1, p. 59-64. 1997.

THIAGO, L. R. L. S.; VIEIRA, J. M. Cana-de-açúcar: uma alternativa de alimento para a seca. **Embrapa: Gado de corte/comunicado técnico.** n. 73. dez., 2002.

THONGDUMYU, P.; INTRASUNGKHA, N.; O-THONG, S. Optimization of ethanol production from food waste hydrolysate by co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Candida shehatae* under non-sterile condition. **African Journal of Biotechnology.** v. 13, n. 7, p. 866-873. 2014.

TRAN, D.T.; I, Y. P.; LIN, C.W. Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus sp.* THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiella oxytoca* THLC0409 for enhancing ethanol production from lignocellulosic materials. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.** v. 44, p. 762-769. 2013.

VIGNOLI, J. A. **Efeito da osmolalidade do meio, permeabilização e imobilização**

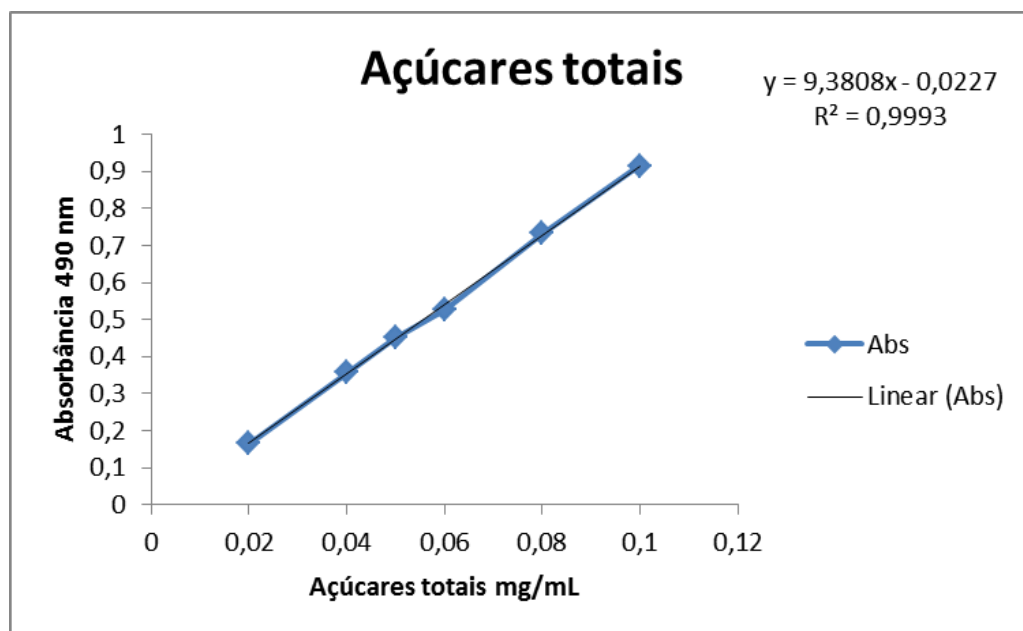
de *Zymomonas mobilis* na producao de sorbitol. 2003. 52 f. Dissertacao (Mestrado em Ciencias e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

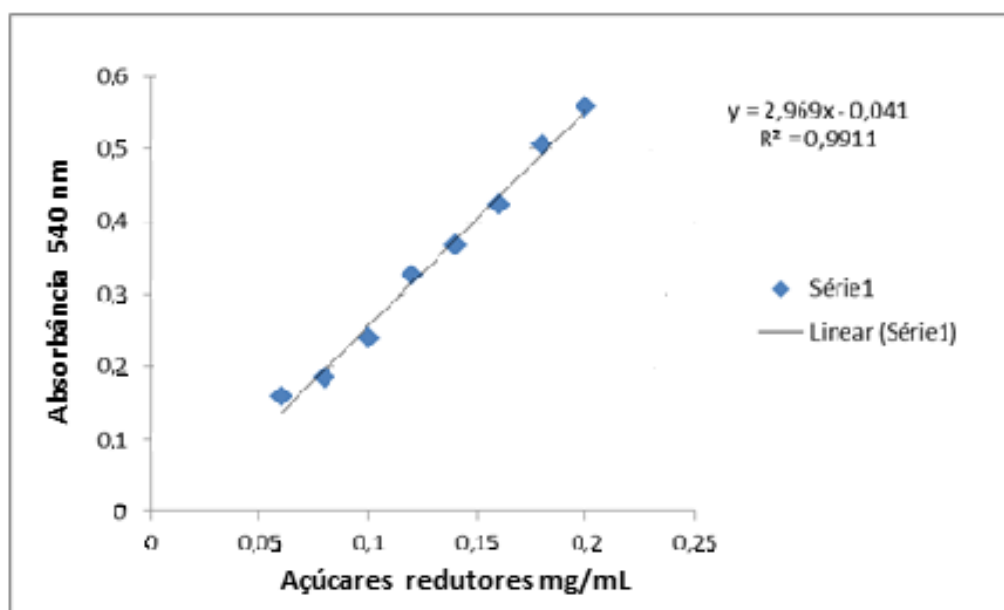
WEI, W.; WUA, S.; LIU, L. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. **Bioresource Technology.** v. 110, p. 302-307. 2012.

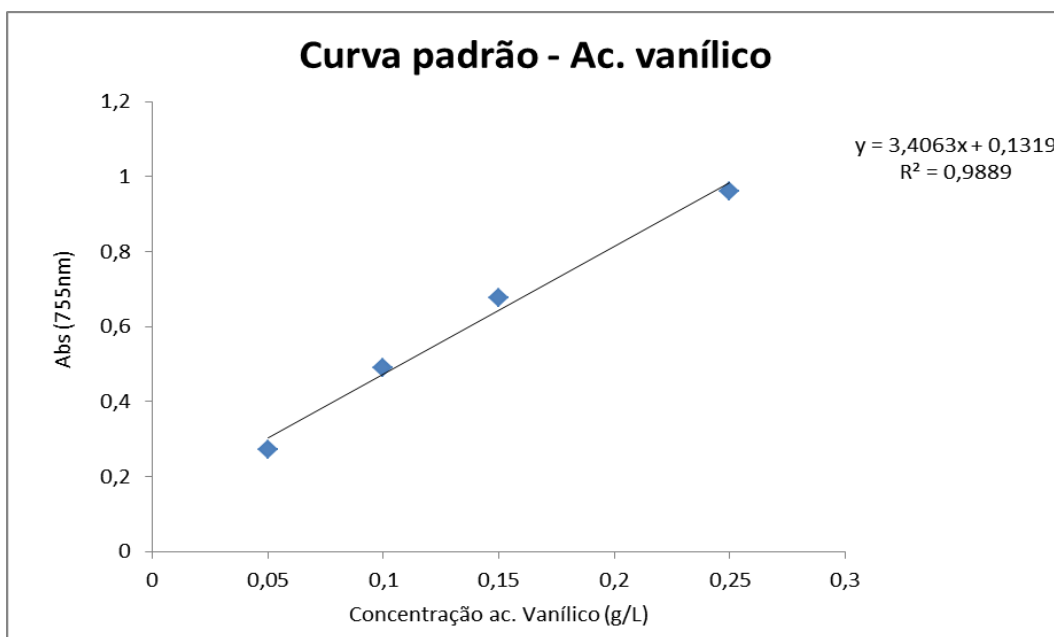
YU,Z.; ZHANG, H. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology.** Elsevier. v. 93. p. 199-204. 2004.

ZHAO, J.; XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal.** Elsevier. v. 49. p. 28-32. 2010.

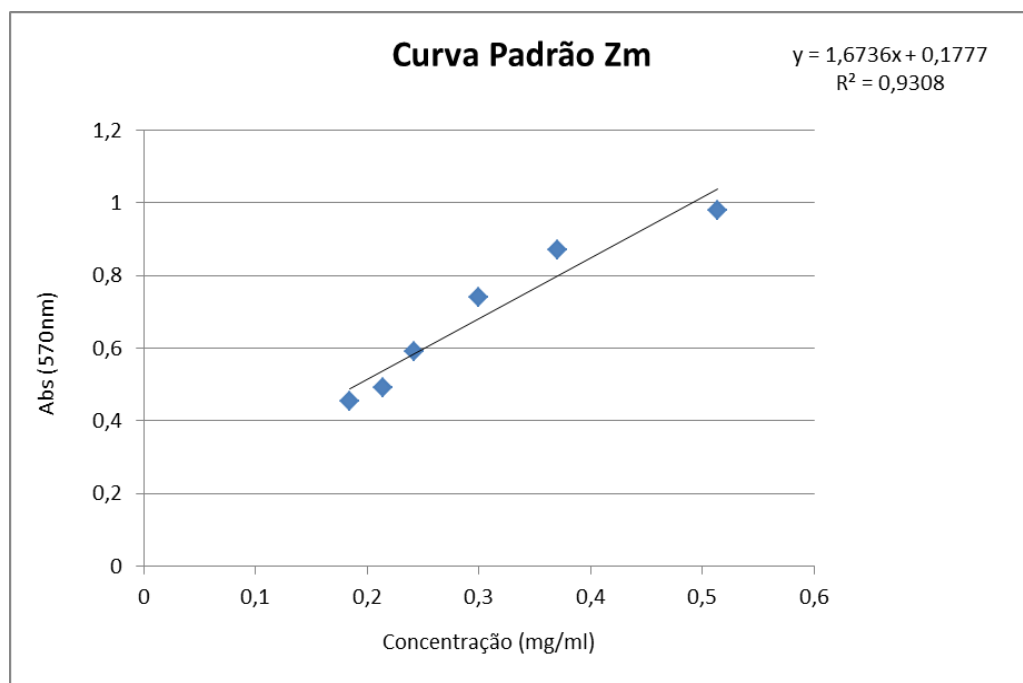
APÊNDICE

APÊNDICE A – Curva Padrão para determinação de AT.

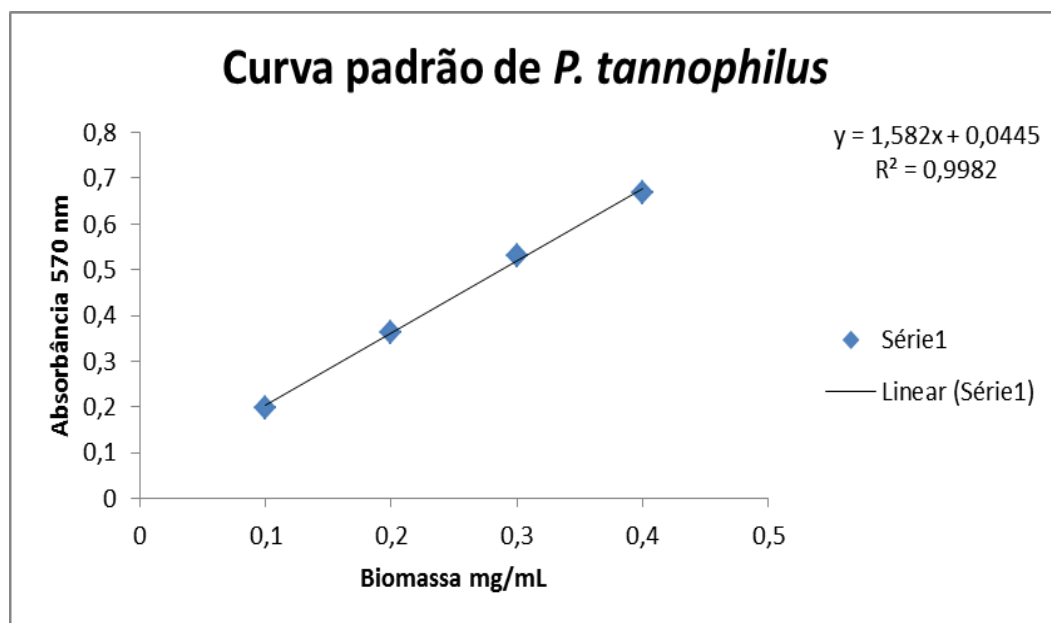
APÊNDICE B – Curva Padrão para determinação de AR.

APÊNDICE C – Curva Padrão para determinação de CFT.

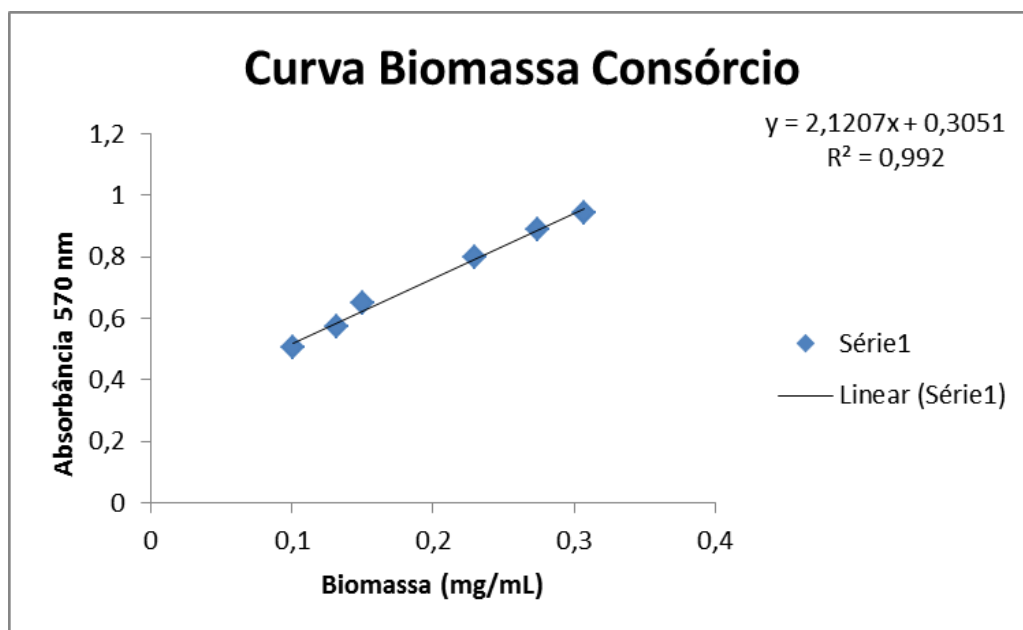
APÊNDICE D – Curva Padrão para determinação de biomassa da *Zymomonas mobilis*.

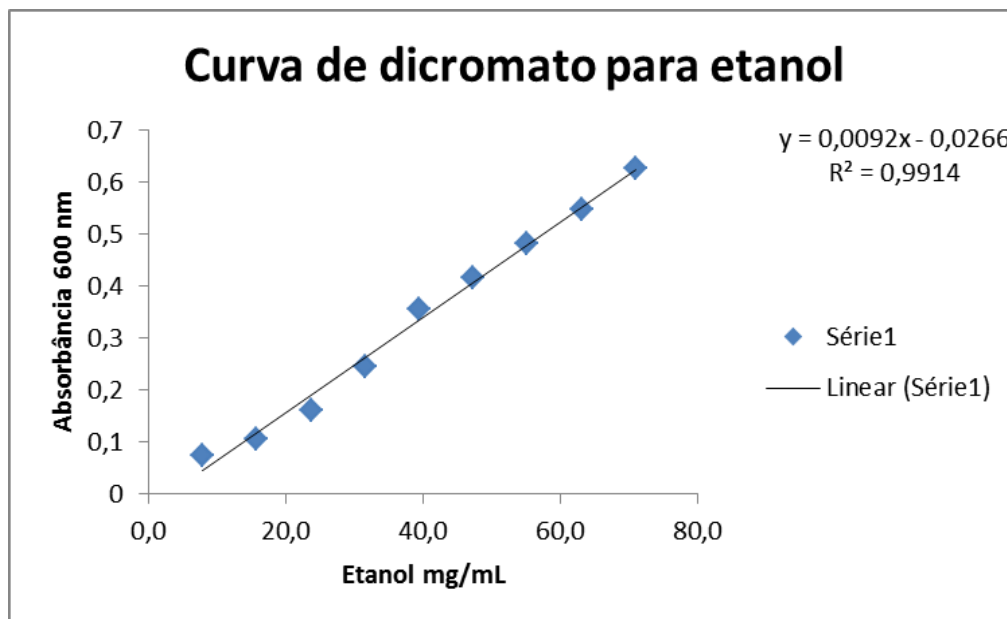


**APÊNDICE E – Curva Padrão para determinação de biomassa da
Pachysolen tannophilus.**



APÊNDICE F – Curva Padrão para determinação de biomassa do consórcio.



APÊNDICE G – Curva Padrão para determinação de Etanol.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 21 / 07 / 2014

Cristen Daniele S.R. da Silva

Assinatura