



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

Natália Righetti Rocha Trinca

Produção de bioetanol pelo consórcio com *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis* em
hidrolisado ácido da casca de soja (*Glycine max*)

São José do Rio Preto

2014

Natália Righetti Rocha Trinca

Produção de bioetanol pelo consórcio com *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis* em hidrolisado ácido da casca de soja (*Glycine max*)

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^o Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz.

São José do Rio Preto/SP

2014

Trinca, Natália Righetti Rocha.

Produção de bioetanol pelo consórcio com *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis* em hidrolisado ácido da casca de soja (*Glycine max*) / Natália Righetti Rocha Trinca. -- São José do Rio Preto, 2014
108 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. Tecnologia de alimentos. 2. Técnicas de co-cultura. 3. Hidrólise. 4. Bioetanol. 5. Fenóis. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664

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

Natália Righetti Rocha Trinca

Produção de bioetanol pelo consórcio com *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis* em hidrolisado ácido da casca de soja (*Glycine max*).

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

Banca Examinadora

Prof^o Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP – São José do Rio Preto/SP
Orientador

Prof^a Dr^a. Raquel Guttierres Gomes
UEM – Maringá/PR

Prof^o Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto

20 de fevereiro de 2014

Dedico este trabalho aos meus anjos da guarda
avó Elza e avô João que sempre me inspiraram
a crescer e batalhar na vida. Amo vocês.

In memoriam

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela vida, por me dar forças sempre que precisei e por ser meu porto seguro. Sem Ele nada seria.

Aos meus pais Simone e Fernando e à minha irmã Michelle, por todo apoio, dedicação, carinho, amor e principalmente pela paciência de todas as vezes que chegava estressada em casa e pela minha ausência sempre que precisava estudar. Vocês são minha vida, minha alegria e meu orgulho. Muito obrigada por tudo, sem vocês não teria chegado a lugar algum. Pai, subi mais um degrau.

Ao Diego, meu amor, amigo e fortaleza. Obrigada por sempre me salvar no laboratório, por ser meu companheiro em mais uma fase da minha vida e por sempre estar por perto me ajudando nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Dr. Crispin, pela oportunidade, confiança e dedicação. Obrigada pelos ensinamentos, por me fazer estudar, me dedicar cada dia mais, por me fazer manter a calma e me fazer rir sempre que eu queria chorar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

À banca examinadora da qualificação e da defesa por todas as sugestões e críticas para tornar meu trabalho melhor.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos por todo ensinamento, principalmente à técnica Tânia por toda atenção e paciência.

Ao meu cunhado William, por ter me socorrido todas as vezes que precisei de uma tradução em inglês.

Às minhas amigas Heloisa, Daiane, Samara, Bruna, Letícia, Marina e Melissa por todos os momentos de diversão, em especial à Heloisa, parceira de quarto/casa que aturou meus dias de estresse e mau humor.

À Daiane, minha vizinha de laboratório. Obrigada por me ouvir quando precisei desabafar e por enfrentarmos juntas as fases difíceis do mestrado.

A todos do laboratório de Biopolímeros que me ajudaram e passaram seus conhecimentos, principalmente à Marina por ter me acolhido quando mais precisei.

Às alunas da graduação em Engenharia de Alimentos Carolzinha, Carol, Mel e Thaís, pela ajuda na execução da parte prática.

E por último e não menos importante, ao Padre Sidnei por sempre me dar benção em todas as viagens que fiz e orar para que meu mestrado ocorresse tudo bem.

A todos, muito obrigada por tudo.

RESUMO

A produção de bioetanol de segunda geração vem sendo muito estudada, uma vez que além de poder substituir combustíveis fósseis, este biocombustível auxilia na redução de resíduos industriais, agrícolas e florestais que são descartados inadequadamente no ambiente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir bioetanol utilizando o hidrolisado ácido de casca de soja pelo consórcio formado por *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis*. Foram realizados experimentos de hidrólise com ácido sulfúrico na concentrações de 0,5 a 5% (v/v). Como padronização para a hidrólise foi aplicada 1,5% (v/v) e 15 minutos de aquecimento. A maior produção de bioetanol para a bactéria *Z. mobilis* foi em meio de cultura utilizando-se glicose tanto na fermentação com 24 horas quanto na fermentação com 72 horas. Esta produção foi de 25,7 mg/mL e 25,4 mg/mL, respectivamente. Para a levedura *C. tropicalis* a maior produção foi de 38,1 mg/mL em meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação. Para fermentação de 24 horas a maior produção de bioetanol foi de 30,3 mg/mL em meio de cultura semissintético. Com a aplicação do consórcio, pode-se obter maiores produções de bioetanol quando comparado com a produção da bactéria e da levedura separadamente. Esta produção foi de 47,7 mg/mL em meio de cultura com hidrolisado desintoxicado. O consórcio forneceu melhores resultados de produção de bioetanol em um tempo menor.

Palavras-chave: Hidrólise ácida; Consórcio; Compostos Fenólicos, Xilose.

ABSTRACT

The production of second generation bioethanol has been extensively studied, since besides being able to replace fossil fuels, biofuel helps reduce industrial, agricultural and forestry wastes that are improperly disposed of in the environment. Therefore, the aim of this work was to produce bioethanol using the acid hydrolyzate of soybean hulls by the consortium formed by *Zymomonas mobilis* and *Candida tropicalis*. Hydrolysis experiments were performed with sulfuric acid in concentrations of 0,5 to 5% (v/v). To standardize the hydrolysis was applied to 1,5% (v/v) and 15 minutes of heating. The highest production of bioethanol for the bacterium *Z. mobilis* was fermentation in the culture media with glucose for 24 and 72 hours. This production was 25,7 mg/mL and 25,4 mg/mL, respectively. For yeast *C. tropicalis* the highest production was 38,1 mg/mL in culture media hydrolyzate without detoxification. For 24 hour fermentation the highest bioethanol production was 30,3 mg/mL in semisynthetic culture media. With the application of the consortium can be obtained in higher yields when compared with the bioethanol production of bacteria and yeast separately. This production was 47,7 mg/mL in culture media with detoxified hydrolyzate. The consortium has provided better results for bioethanol production in a shorter time.

Keywords: Acid Hydrolysis, Consortium, Phenolics Compounds, Xylose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura linear da celulose.....	23
Figura 2	Classificação dos componentes da hemicelulose.....	24
Figura 3	Estrutura da lignina proposta por Adler.....	25
Figura 4	Estrutura de um material lignocelulósico.....	26
Figura 5	Interação do ácido com uma cadeia de celulose.....	27
Figura 6	Degradação da biomassa lignocelulósica.....	31
Figura 7	Compostos tóxicos liberados por diferentes tratamentos.....	31
Figura 8	Via Entner-Doudoroff utilizada por <i>Zymomonas mobilis</i> para incorporação das fontes de energia.....	36
Figura 9	Esquema proposto do ciclo do etanol, explicando o papel de ADH II na respiração.....	36
Figura 10	Açúcares totais (AT) (g/L) liberados durante a hidrólise ácida com aquecimento e sem aquecimento nos tempos de 15 e 30 minutos; 12 e 24 horas.....	49
Figura 11	Açúcares redutores (AR) (g/L) liberados durante a hidrólise ácida com aquecimento e sem aquecimento nos tempos de 15 e 30 minutos.....	50
Figura 12	Compostos fenólicos (CF) (mg/g de casca de soja) liberados durante a hidrólise ácida com aquecimento e sem aquecimento nos tempos de 15 e 30 minutos.....	51
Figura 13	pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas incubados a 30°C.....	55
Figura 14	pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30°C.....	56
Figura 15	Crescimento celular (biomassa) da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas incubados a 30 °C.....	57
Figura 16	Crescimento celular durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30 °C.....	57

Figura 17	Produção de bioetanol pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas incubados a 30 °C.....	59
Figura 18	Produção de bioetanol pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação, nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30 °C.....	59
Figura 19	Produtividade de bioetanol da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> nos tempos de 24, 48 e 72 horas nos meios semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação.....	61
Figura 20	Produtividade de bioetanol da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> nos tempos de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas nos meios semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação.....	62
Figura 21	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis temperatura e concentração de substrato em meio semissintético incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	66
Figura 22	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis pH e concentração de substrato em meio semissintético incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	66
Figura 23	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis agitação e concentração de substrato em meio semissintético incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	67
Figura 24	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis tempo e concentração de substrato em meio semissintético incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	67
Figura 25	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis agitação e concentração de substrato em meio com hidrolisado desintoxicado incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	68
Figura 26	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis tempo e concentração de substrato em meio com hidrolisado desintoxicado incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	69

Figura 27	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis tempo e agitação em meio com hidrolisado desintoxicado incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	69
Figura 28	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis agitação e concentração de substrato em meio com hidrolisado sem desintoxicação incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	70
Figura 29	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis pH e concentração de substrato em meio com hidrolisado sem desintoxicação incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	71
Figura 30	Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> utilizando as variáveis pH e agitação em meio com hidrolisado sem desintoxicação incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas.....	71
Figura 31	pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30°C.....	74
Figura 32	Crescimento celular (biomassa) da levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30 °C.....	76
Figura 33	Produção de bioetanol pela levedura <i>Candida tropicalis</i> em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação, nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30 °C.....	77
Figura 34	Produtividade de bioetanol da levedura <i>Candida tropicalis</i> nos tempos de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas nos meios semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação.....	78
Figura 35	pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 5 % (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20, e 24 horas incubados a 30 °C.....	79
Figura 36	pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 10 % (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20, e 24 horas incubados a 30 °C.....	79
Figura 37	Crescimento celular (biomassa) do consórcio durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem	

	desintoxicar com 5 % (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30 °C.....	80
Figura 38	Crescimento celular (biomassa) do consórcio durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar com 10 % (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30 °C.....	81
Figura 39	Produção de bioetanol pelo consórcio em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 5% (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30 °C.....	82
Figura 40	Produção de bioetanol pelo consórcio em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 10% (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30 °C.....	82
Figura 41	Produtividade de bioetanol do consórcio nos tempos de 8, 12, 16, 20, e 24 horas nos meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 5 % (m/v) de concentração de substrato.....	84
Figura 42	Produtividade de bioetanol do consórcio nos tempos de 8, 12, 16, 20, e 24 horas nos meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 10 % (m/v) de concentração de substrato.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis utilizadas nas fermentações para <i>Candida tropicalis</i>	44
Tabela 2	Cruzamento de dados entre os fatores utilizados na hidrólise (tempo, temperatura e concentração de ácido) versus açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR) e compostos fenólicos (CF).....	48
Tabela 3	Compostos fenólicos dos hidrolisados, antes e depois do processo de concentração (SC e C, respectivamente) e após o processo de desintoxicação (HD).....	53
Tabela 4	Redução de açúcares totais posterior processo de desintoxicação.....	54
Tabela 5	Médias de biomassa, bioetanol e produtividade dos experimentos realizados em triplicata e suas variáveis em meio semissintético com xilose.....	63
Tabela 6	Médias de biomassa, bioetanol e produtividade dos experimentos realizados em triplicata e suas variáveis em meio com hidrolisado desintoxicado.....	64
Tabela 7	Médias de biomassa, bioetanol e produtividade dos experimentos realizados em triplicata e suas variáveis em meio com hidrolisado sem desintoxicação.....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Geral.....	20
2.2. Específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. Bioetanol	21
3.2. Resíduos Lignocelulósicos	22
3.3. Hidrólise de Resíduos Lignocelulósicos	27
3.3.1. Hipóteses de Inibição por Compostos Tóxicos	31
3.3.1.1. Furanos	31
3.3.1.2. Compostos Fenólicos	31
3.3.1.3. Ácidos Carboxílicos	31
3.3.2. Desintoxicação	32
3.4. Casca de Soja (<i>Glycine max</i>)	32
3.5. Micro-organismos Produtores de Bioetanol.	33
3.5.1. <i>Zymomonas mobilis</i>	34
3.5.2. <i>Candida tropicalis</i>	37
3.5.3. Consórcio de Micro-organismos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Casca de Soja	40
4.2. Hidrólise da Casca de Soja	40
4.2.1. Padronização da Hidrólise.....	40
4.2.2. Desintoxicação	41
4.3. Micro-organismos e Meios de Cultura	41
4.3.1. <i>Zymomonas mobilis</i>	41
4.3.1.1. Meio para Armazenamento, Enriquecimento e Pré-fermentação	41
4.3.2. <i>Candida tropicalis</i>	41

4.3.2.1. Meio para Armazenamento; Enriquecimento e Pré-fermentação	41
4.3.3. Meio para Fermentação	42
4.3.3.1. <i>Z. mobilis</i>	42
4.3.3.2. <i>C. tropicalis</i>	42
4.4. Fermentação	42
4.4.1. Experimento I – <i>Z. mobilis</i>	42
4.4.1.1. Padronização do Inóculo	43
4.4.1.2. Meio Semissintético	43
4.4.1.3. Meio com Hidrolisado Desintoxicado.....	43
4.4.1.4. Meio com Hidrolisado sem Desintoxicar	43
4.4.1.5. Experimento I.I.....	44
4.4.2. Experimento II – <i>C. tropicalis</i>	44
4.4.2.1. Padronização do Inóculo	44
4.4.2.2. Meio Semissintético	44
4.4.2.3. Meio com Hidrolisado Desintoxicado.....	45
4.4.2.4. Meio com Hidrolisado sem Desintoxicar	45
4.4.2.5. Experimento II.I	45
4.4.3. Experimento III – Consórcio (<i>Z. Mobilis</i> + <i>C. Tropicalis</i>)	45
4.5. Métodos Analíticos	45
4.5.1. Determinação de Açúcar Total (AT).....	45
4.5.2. Determinação de Açúcares Redutores (AR)	46
4.5.3. Determinação de Compostos Fenólicos (CF).....	46
4.5.4. Determinação de Etanol	46
4.5.4.1. Produtividade de Bioetanol	46
4.6. Análise Estatística.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Padronização da Hidrólise da Casca de soja.....	48
5.2. Desintoxicação do Hidrolisado	53
5.3. Fermentação	55
5.3.1. <i>Zymomonas mobilis</i>	55

5.3.1.1. pH.....	55
5.3.1.2. Crescimento Celular (Biomassa).....	56
5.3.1.3. Produção de Bioetanol	58
5.3.1.3.1. Produtividade	61
5.3.2. <i>Candida tropicalis</i> – Fermentação em 72 horas – Planejamento Fatorial	62
5.3.2.1. Crescimento Celular (Biomassa).....	64
5.3.2.2. Produção de Bioetanol	65
5.3.2.3. Produtividade	73
5.3.3. <i>Candida tropicalis</i> - Fermentação em 24 horas	74
5.3.3.1. pH.....	74
5.3.3.2. Crescimento Celular (Biomassa).....	75
5.3.3.3. Produção de Bioetanol	76
5.3.3.4. Produtividade	77
5.4. Consórcio	78
5.4.1. pH.....	78
5.4.2. Crescimento Celular (Biomassa).....	79
5.4.3. Produção de Bioetanol	81
5.4.3.1. Produtividade	84
6. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICES	98

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A tentativa de reduzir os danos causados ao meio ambiente como a emissão de dióxido de carbono, por exemplo, fez com que aumentasse a utilização de bioetanol, bem como biodiesel, substituindo combustíveis de origem fóssil como a gasolina e o diesel.

O aumento do uso do bioetanol promoveu um aumento nas pesquisas em busca de outras fontes para produzir bioetanol. Surgiu então, o bioetanol de segunda geração, no qual se utiliza resíduos industriais, agrícolas e florestais, que são chamados de materiais lignocelulósicos; estes são fontes de açúcares que podem ser consumidos pelos micro-organismos como substrato. Além de possuir açúcares fermentescíveis, este tipo de resíduo possui custo reduzido, o que auxilia na produção com custo reduzido do bioetanol e diminui a quantidade de resíduos descartados no meio ambiente.

Paralela à busca por novos substratos, pesquisas também vem procurando micro-organismos capazes de fermentar monossacarídeos provindos dos materiais lignocelulósicos para produzir bioetanol, bem como micro-organismos que consigam fermentar em conjunto estes substratos sem que haja competição entre os mesmos.

A fermentação com mais de um micro-organismo é conhecida por consórcio ou co-cultura. Podem-se utilizar dois ou mais micro-organismos (bactérias e/ou fungos). Para o melhor aproveitamento da fermentação, é importante que os micro-organismos consumam os diferentes açúcares que possam estar disponíveis no meio de cultura.

Os açúcares estão presentes nos resíduos lignocelulósicos em forma complexa, portanto, os micro-organismos não conseguem ter acesso a eles. Para isso é necessário fazer um tratamento prévio para liberar os açúcares fermentescíveis. A hidrólise é um dos tratamentos que vem sendo muito empregado podendo ser ácido, alcalino ou enzimático.

Na hidrólise ácida faz-se uso de ácidos como o sulfúrico, nítrico, fosfórico, entre outros, no qual o primeiro é o mais empregado. O hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio são as bases utilizadas na hidrólise alcalina e podem ser utilizadas em conjunto com a hidrólise ácida. Já na enzimática é empregado um conjunto de enzimas entre elas endo e exoglucanases, celobiasas, entre outras.

Portanto o presente trabalho visa produzir bioetanol de segunda geração aplicando o consórcio formado pela bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Candida tropicalis* utilizando como substrato os açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise ácida da casca de soja.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Produzir bioetanol pela fermentação do hidrolisado ácido de casca de soja, com o consórcio de *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis*.

2.2. Específicos

→ Padronizar hidrólise ácida, variando-se:

- Tempo: 15 e 30 minutos e 12 e 24 horas;
- Temperatura: 25 °C (temperatura ambiente) e 121 °C;
- Concentração de ácido sulfúrico: 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% e 5% (v/v).

→ Determinar as condições para produção de bioetanol da *C. tropicalis*, variando-se:

- Tempo: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 48 e 72 horas;
- Temperatura: 25, 30 e 35 °C;
- pH: 5,5; 6 e 6,5;
- Concentração do substrato: 5, 7,5 e 10 %;
- Velocidade de agitação: 0, 75 e 150 rpm.

→ Determinar as melhores condições para produção de bioetanol com aplicação do consócio (*Z. mobilis* + *C. tropicalis*).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Bioetanol

O uso exacerbado de combustíveis de origem fóssil fez aumentar a emissão de CO₂ na atmosfera, acarretando mudança no clima global. Pela fonte de energia fóssil ser finita, busca-se alternativas de energia renovável como energia eólica, geotérmica, hidrogênio e biomassa (BAYRAKCI; KOÇAR, 2014).

A produção de etanol é uma alternativa de combustível considerada menos poluente ao meio ambiente quando comparado à gasolina e ao diesel. O bioetanol de segunda geração tem um apelo maior em relação às questões ambientais, uma vez que é produzido a partir de resíduos industriais, agrícolas e florestais. Além disto, este bioetanol não compete com a produção de alimentação humana (OFORI-BOATENG; LEE, 2014).

O bioetanol de segunda geração pode ser produzido em locais que já fabricam etanol de primeira geração, uma vez que operações como fermentação e destilação podem ser compartilhadas na mesma planta. Este é o caso da produção de bioetanol a partir da cana de açúcar, que é de primeira geração, podendo ser obtido bioetanol de segunda geração utilizando-se o bagaço remanescente do processo anterior, tornando o processo com custo reduzido (DIAS et al, 2012).

Para que seja vantajosa a utilização destes materiais na elaboração de bioetanol, estes devem proporcionar alta produtividade, alta concentração de bioetanol durante o processo de destilação e redução na demanda de energia (ALVIRA et al, 2010; SOCCOL et al, 2011). Para obtenção deste tipo de produto, é mais utilizada a hidrólise ácida, principalmente, quando o material lignocelulósico provém de palha de milho, bagaço de cana de açúcar e palha de arroz (GUO et al, 2008).

O etanol celulósico reduz em 85 % a emissão de CO₂ quando comparado com a queima da gasolina, diminuindo assim a ocorrência de chuva ácida. No Brasil, 15 % dos automóveis são movidos por etanol puro (WEI et al, 2014).

De 2000 para 2010 houve um aumento de mais de 80 milhões de m³ no volume da produção mundial de etanol. O Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol, ficando

atrás dos Estados Unidos e juntos foram responsáveis por 87,1% da produção mundial em 2011 (IYE; BILSBORROW, 2013). Os três estados que mais produzem no Brasil, em ordem decrescente, são: São Paulo, Minas Gerais e Paraná com produção de 16.722.478m³, 2.167.616m³ e 2.048.752m³, respectivamente (PAIXÃO; FONSECA, 2011). Grande parte da produção (cerca de 90%) é a partir da fermentação da sacarose, provinda da cana de açúcar, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CASSALES, 2010).

O Energy Policy Act de 2005 dos Estados Unidos estabeleceu o Renewable Fuel Standard, que atualmente prevê uma produção de 57 bilhões de litros de etanol de primeira geração em 2015 e 60,5 bilhões de etanol celulósico em 2022 (IYE; BILSBORROW, 2013).

O bioetanol de segunda geração é possível, uma vez que os resíduos utilizados são compostos em grande parte por celulose, hemicelulose e lignina, que quando rompidos, os dois primeiros liberam açúcares fermentescíveis, principalmente a glicose e a xilose. Uma forma de liberar estes açúcares é a hidrólise ácida, a qual se podem empregar ácidos como sulfúrico (SUN et al, 2011; BAMUFLEH; ALHAMED; DAOUS, 2013), nítrico (RODRÍGUEZ-CHONG et al, 2004; KIM et al, 2014) e fosfórico (ROMERO et al, 2007; MARTÍNEZ; SÁNCHEZ; BRAVO, 2012; VASCONCELOS et al, 2013).

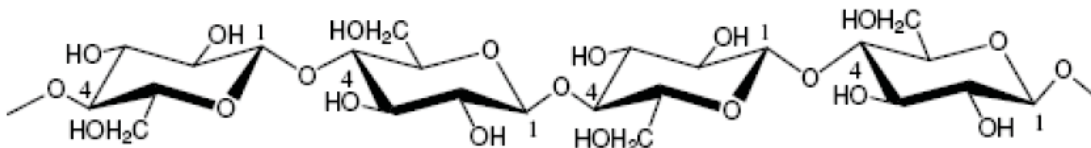
3.2. Resíduos Lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos são materiais provenientes de resíduos agrícolas, florestais e de indústrias alimentícias. Possuem uma estrutura rígida por conter lignina. Juntamente com a lignina, a celulose e a hemicelulose formam a estrutura lignocelulósica (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; WANG et al, 2012). Pode-se citar como resíduos lignocelulósicos o bagaço de cana, palha de milho, casca de soja, farelo de trigo, casca de arroz, entre outros (BURANOV; MAZZA, 2008).

A celulose é a molécula mais abundante do mundo e é encontrada em madeiras e parede celular de plantas (PÉREZ; SAMAIN, 2010). Na estrutura da planta a celulose se localiza na parte central, rodeada pela hemicelulose que por sua vez é rodeada pela lignina. É considerada uma fonte rica de glicose e é o composto com maior facilidade para a quebra de suas ligações e liberação deste carboidrato (TAMANINI; HAULY, 2004; CASSALES,

2010). A celulose é um polímero linear formado apenas por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β (1-4). Duas unidades de glicose formam a celobiose que é a união de duas moléculas de glicose com perda de água (ALBANO, 2012).

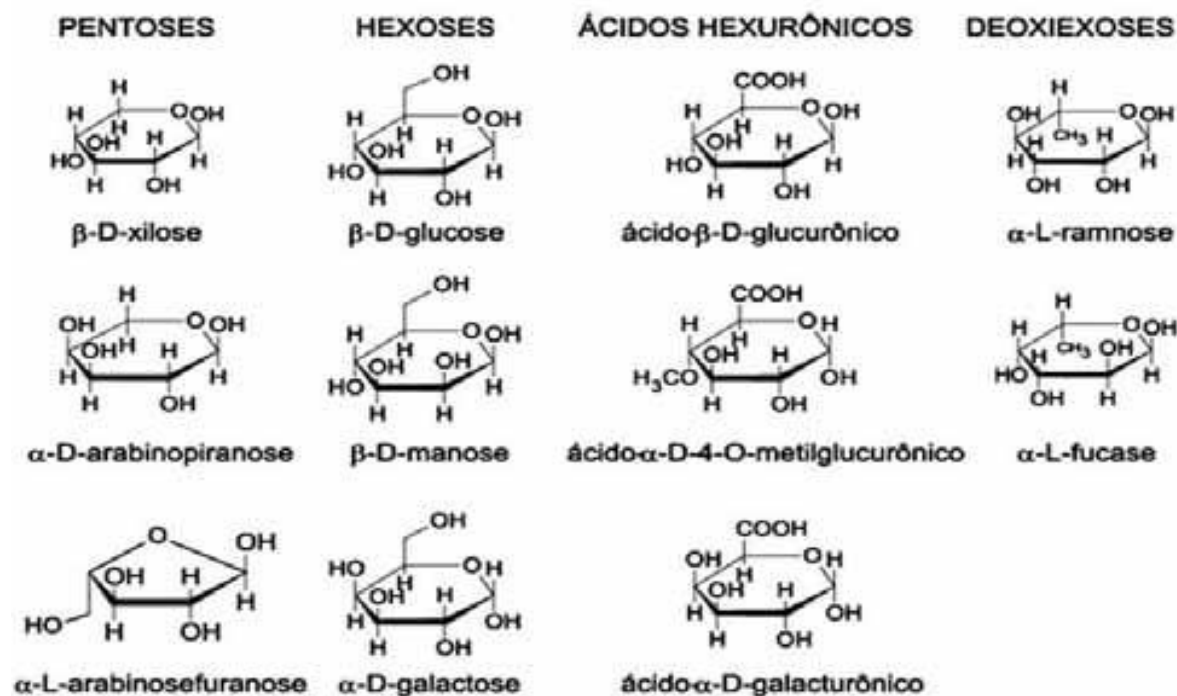
Figura 1: Estrutura linear da celulose (ALBANO, 2012)



A hemicelulose possui baixo peso molecular e apresenta cadeia ramificada. Localiza-se entre a celulose e a lignina. É constituída por xilose e arabinose (pentoses) e glicose, galactose e manose (hexoses) (LIU et al, 2011). A xilose é o segundo açúcar mais abundante, atrás da glicose, presente no material lignocelulósico e alguns micro-organismos, principalmente leveduras, metabolizam este carboidrato para produção de bioetanol, xilitol e outros produtos (ZHOU et al, 2012).

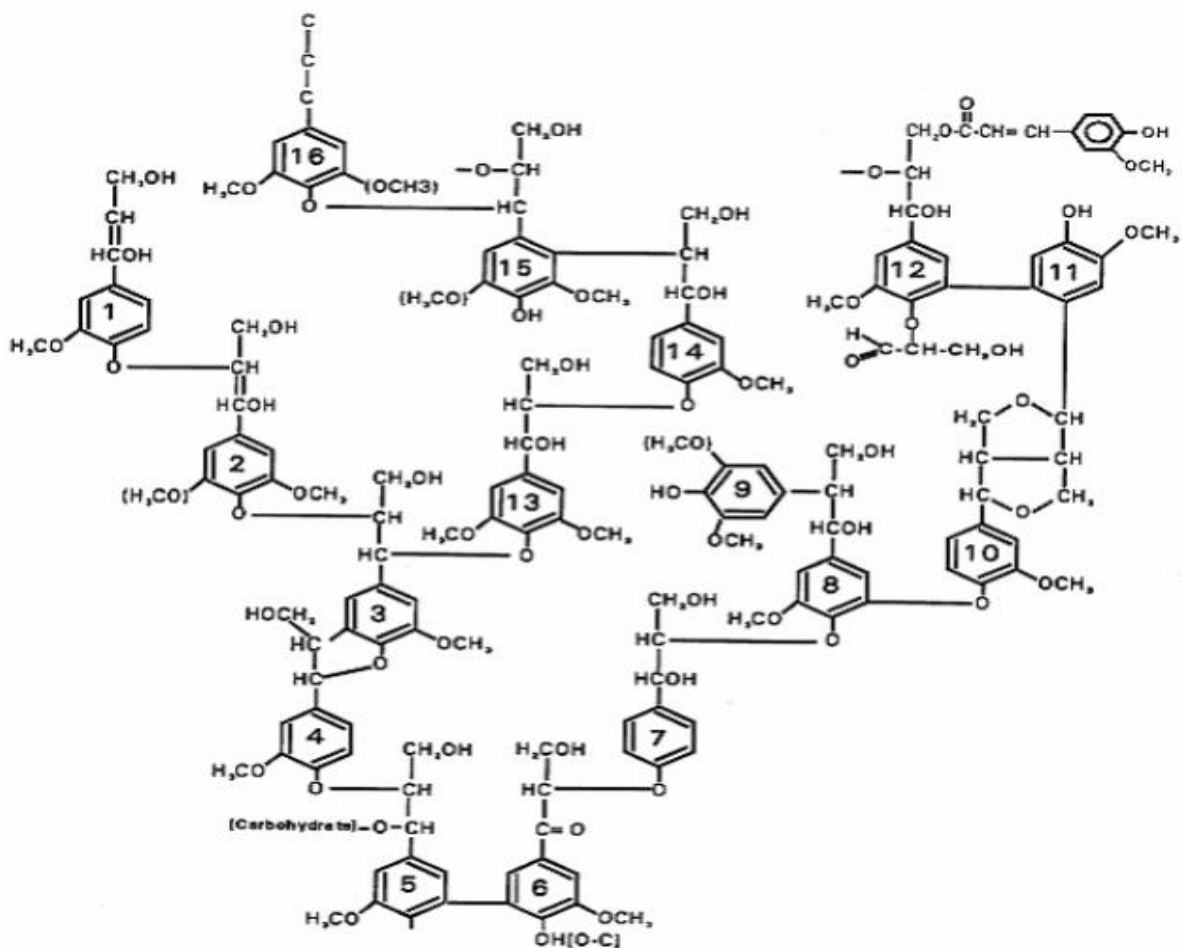
A hemicelulose também pode ser chamada de poliose e está associada à celulose na parede vegetal. Além das pentoses e hexoses citadas anteriormente, a hemicelulose pode apresentar ácidos urônicos e desoxi-hexoses (figura 2). A composição e quantidade de cada açúcar variam de acordo com o material celulósico. Pode ser classificado como homopolímero, quando é formado apenas por um componente, por exemplo a xilana que é formado apenas por xilose; ou heteropolímero, quando possui dois ou mais componentes (RABELO, 2007).

Figura 2: Classificação dos componentes da hemicelulose (ALBANO, 2012)



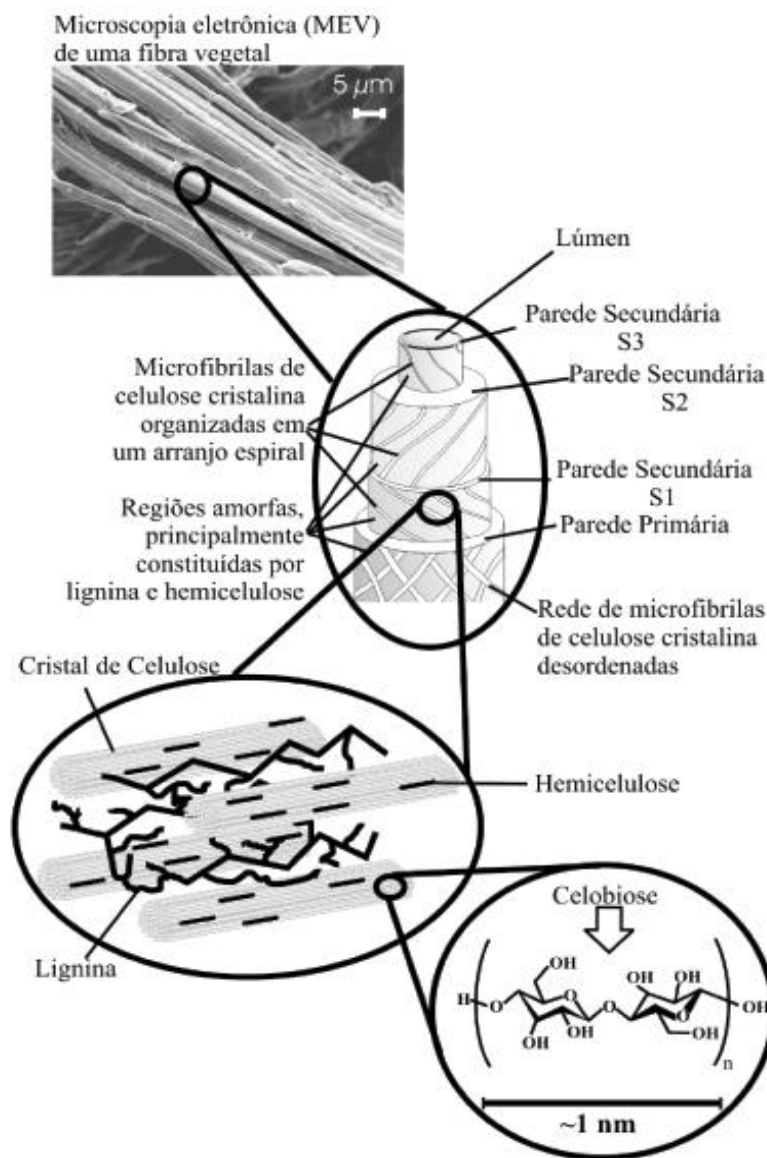
A lignina é o composto mais abundante, seguido da celulose. Tem presença significativa nos resíduos que são descartados no meio ambiente, chegando a aproximadamente 20% do total (THEVENOT; DIGNAC; RUMPEL, 2010). Sua estrutura rígida serve como proteção para a planta contra micro-organismos (BURANOV; MAZZA, 2008). Este composto é incorporado à parede celular, conforme o crescimento da planta. É constituído basicamente por unidades de fenilpropano (anéis aromáticos), o qual forma uma estrutura amorfa (RABELO, 2007). Anualmente a produção mundial de lignina é cerca de 50 milhões de toneladas. O descarte deste componente torna-se difícil para a indústria de papel e celulose (MALDHURE; EHLE, 2013). A figura 3 mostra a estrutura da lignina proposta por Adler.

Figura 3: Estrutura da lignina proposta por Adler (FENGEL; WEGENER, 1989, apud RABELO, 2007)



A figura 4 mostra detalhadamente a parte que a celulose, hemicelulose e lignina se localizam na célula da planta.

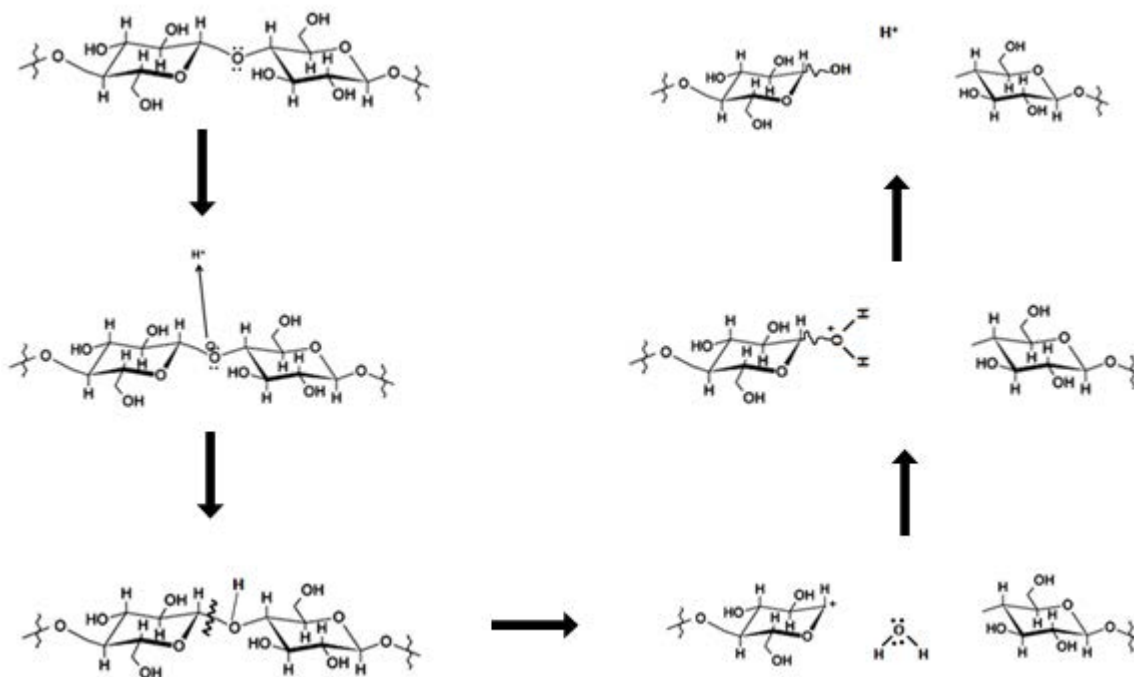
Figura 4: Estrutura de um material lignocelulósico (SILVA et al, 2009)



A figura 5 mostra como poderia ocorrer a interação do ácido sulfúrico utilizado na hidrólise com a celulose. Nesta pode-se observar que o oxigênio da ligação glicosídica possui elétrons livres. Com a adição de ácido ocorre a protonação do meio, no qual o hidrogênio irá se ligar ao oxigênio da ligação glicosídica. Com isto, a ligação do oxigênio com o carbono é rompida e há a formação de uma molécula de água. Por sua vez o oxigênio da molécula de água é atraído pela carga positiva do carbono e este liga-se novamente ao carbono, o qual libera um hidrogênio e forma-se uma hidroxila ligada ao

carbono. Quando esta interação hidrogênio do ácido com o oxigênio ocorre na extremidade da celulose libera-se uma unidade de glicose e quando ao meio da cadeia de celulose geram-se novos terminais ou há produção de glicose, quando ocorre hidrólise diretamente nestes terminais (OGEDA; PETRI, 2010).

Figura 5: Interação do ácido com uma cadeia de celulose (Adaptado de OGEDA; PETRI, 2010)



3.3. Hidrólise de Resíduos Lignocelulósicos

Existem tratamentos químico, físicos, físico-químicos e biológicos para liberação dos açúcares fermentescíveis presentes nos resíduos lignocelulósicos. Como tratamento químico, pode-se citar a hidrólise ácida, hidrólise alcalina, hidrólise enzimática, a aplicação de ozônio, organosolventes e deslignificação oxidativa. As hidrólises ácida e alcalina podem ser empregadas como hidrólise e pré-tratamento separadamente ou em conjunto para a hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002).

A hidrólise alcalina é mais empregada como pré-tratamento para a hidrólise enzimática, uma vez que com a aplicação de bases, ocorre um aumento na liberação da celulose, por romper a lignina e parte da hemicelulose, e também uma redução na cristalinidade da celulose o que vai auxiliar na ação enzimática (MOU; HEIKKILÄ; FARDIM, 2013). As bases que são mais utilizadas para este tipo de tratamento são hidróxido de cálcio (RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2009); cloreto férrico (LÓPEZ-LINARES et al, 2013); hidróxido de sódio (CHEN; ZHAO; XIA, 2008; MOU et al, 2013).

A hidrólise enzimática normalmente é feita com um mix de enzimas, ou seja, utiliza-se mais de uma enzima para que a hidrólise seja mais rápida e com maior liberação dos açúcares. Podem-se utilizar micro-organismos que produzam enzimas para hidrolisar o material lignocelulósico utilizado e que fermente este meio resultando em produtos, porém a temperatura utilizada nem sempre é a temperatura ótima para a enzima e para o micro-organismo (DYK; PLETSCHE, 2012; VASCONCELOS et al, 2012). As enzimas mais empregadas são celulasas, β -glucosidade e endo-hidrolases (endo-1,4- β -glucanase, endo-1,4- β -xilanase e endo-1,4- β -mananase), entre outras (WILLÖR et al, 2009).

Existem fatores que limitam a hidrólise enzimática. São estes: teor de lignina; superfície de contato; cristalinidade e grau de polimerização da celulose (DAGNINO et al, 2013); porosidade; aspereza e espessura da parede celular. Outro fator limitante é a utilização adequada de complexos enzimáticos para a completa sacarificação do material lignocelulósico (ALVIRA et al, 2010; VIRUNANON et al, 2013).

A hidrólise ácida pode utilizar ácidos concentrados ou diluídos. O ácido mais utilizado é o sulfúrico, entretanto outros ácidos como o clorídrico, o fosfórico e o nítrico vêm sendo estudados (MENON; RAO, 2012). O uso da hidrólise ácida junto com a hidrólise alcalina resulta em uma celulose mais pura, uma vez que no tratamento ácido ocorre remoção da hemicelulose e no tratamento básico remove-se a lignina (LACERDA; ZAMBON; FROLLINI, 2012).

Quanto mais diluído o ácido utilizado na hidrólise, maior é a dificuldade de se romper a lignina e hemicelulose. A celulose é mais fácil de ser quebrada, portanto podem-se usar ácidos com concentrações mais baixas. O uso de ácido concentrado ou com menor

diluição rompe facilmente as ligações de lignina e hemicelulose, entretanto resulta em grande quantidade de compostos tóxicos (BAMUFLEH; ALHAMED; DAOUS, 2013).

Estes compostos tóxicos impedem parcial ou totalmente, dependendo da quantidade dos compostos, a fermentação pelos micro-organismos. Estes compostos podem ser furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e compostos aromáticos (fenólicos). A maior preocupação se dá com o furfural (degradação de pentose) e hidroximetilfurfural (desidratação de hexose) (HUANG et al, 2011). Outros compostos que podem ser tóxicos aos micro-organismos são ácido acético, presente na hemicelulose; ácido levulínico, oriundo da degradação do HMF; e o ácido fórmico provindo da degradação tanto do furfural quanto do HMF (PALMVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Estes ácidos podem ser classificados como ácidos carboxílicos (TOMÁS-PEJÓ et al, 2011) ou ácidos alifáticos (LUO; BRINK; BLANCH, 2002).

Cassales et al. (2011) fizeram hidrólise ácida com ácido sulfúrico em casca de soja e verificaram a concentração do ácido, o tempo de reação e temperatura de hidrólise bem como o rendimento máximo da hidrólise sem formação de compostos inibidores. As melhores condições encontradas foram: 1,7% de ácido sulfúrico a 153°C por 60 minutos com eficiência de hidrólise de 87% na liberação de açúcares fermentescíveis. A maior concentração de ácido sulfúrico utilizado, sem a formação de compostos tóxicos foi de 2,7% a uma temperatura de 118°C por 40 minutos, entretanto houve uma queda de 28% na liberação destes açúcares. A Figura 6 mostra a fonte a partir da qual são liberados os compostos tóxicos e a figura 7 mostra os tipos de tratamento/pré-tratamento de onde podem ser formados.

Figura 6: Degradação da biomassa lignocelulósica (Adaptado de FONSECA, 2009)

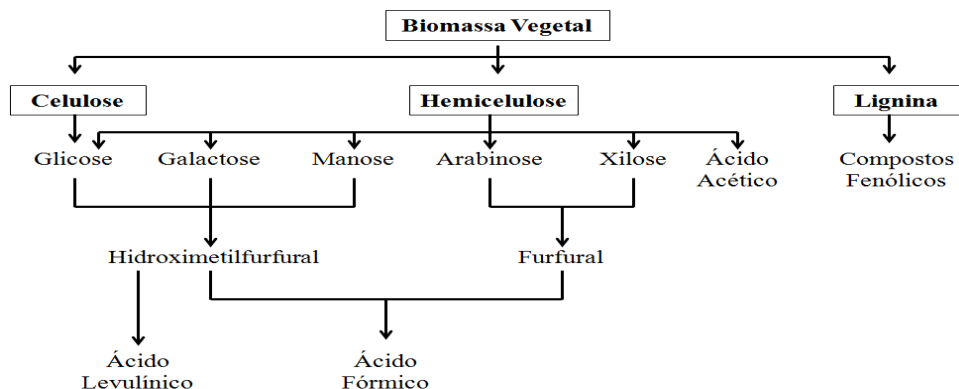
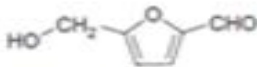
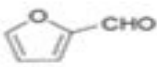
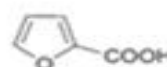
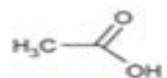
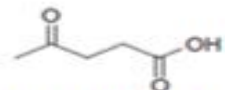
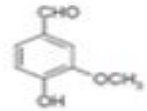
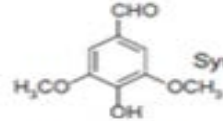
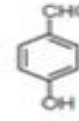
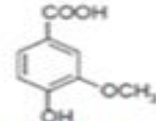
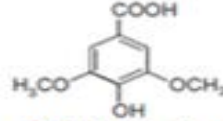
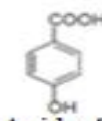
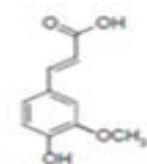
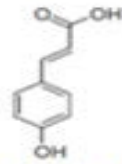
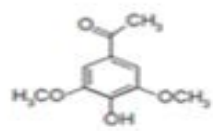


Figura 7: Compostos tóxicos liberados por diferentes tratamentos (Adaptado de TOMÁS-PEJÓ et al, 2011)

Furano			Pré-tratamento
 5-Hidroximetilfurfural	 Furfural	 Ácido 2-Furóico (*)	-Pré-tratamento ácido; - (*) Oxidação úmida; - Explosão a vapor.
Ácidos Carboxílicos			
 Ácido Acético	 Ácido Fórmico	 Ácido Levulinico	- Explosão a vapor; - Oxidação úmida.
Compostos Fenólicos			
 Vanilina	 Seringaldeido	 Hidroxibenzaldeído	-Pré-tratamento ácido; - Ozonólise; - Explosão a vapor; - (*) Oxidação úmida.
 Ácido Vanílico (*)	 Ácido Seringico	 Ácido 4-Hidrocibenzóico	
 Ácido Cumárico (*)	 Ácido Ferúlico	 Acetoceringona	

3.3.1. Hipóteses de Inibição por Compostos Tóxicos

Não se sabe ao certo como ocorre a inibição dos micro-organismos pelos compostos formados na hidrólise ácida. Apenas existem hipóteses de como pode ocorrer esta inibição.

3.3.1.1. Furanos

Os furanos (furfural e HMF) são aldeídos altamente reativos, que podem reagir com moléculas biológicas e, por fim, ocasionar danos à membrana celular (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). Outra hipótese é que o acúmulo do produto da degradação do furfural (acetaldeído) nas células dos micro-organismos pode aumentar a fase *lag* do crescimento, afetando principalmente as leveduras fermentativas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

O furfural é o furano de maior preocupação, uma vez que o HMF é considerado menos tóxico, quando comparado ao furfural, por estar presente em menores concentrações nos hidrolisados (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Apesar do furfural ser tóxicos para alguns micro-organismos, existem alguns que o consomem, como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis*, *Hyphozyma roseoniger*, entre outros (FONSECA, 2009).

3.3.1.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos podem interagir com as zonas hidrofóbicas da célula, acarretando perda da integridade da membrana (DUARTE et al, 2005). Os compostos com baixo peso molecular são considerados mais tóxicos. Durante a ação destes compostos, considera-se que, na membrana celular, pode aumentar a permeabilidade, a inativação das enzimas que são essenciais para a célula e/ou alteração do material genético da célula (FONSECA, 2009).

3.3.1.3. Ácidos Carboxílicos

Os ácidos carboxílicos possuem pKa entre 3 e 4 e quando estão em pH abaixo de seu respectivo pKa encontram-se de forma não dissociada. Quando passam para um meio com pH maior, como o caso do citoplasma (pH próximo de 7,4), se dissociam e reduzem o

pH abaixo do limite fisiológico da célula, podendo ocorrer redução da ação da ATPase e consequentemente redução na formação de energia para célula (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998).

3.3.2. Desintoxicação

Uma forma de minimizar os compostos no hidrolisado é o emprego de carvão ativo em pó, ajuste no pH (supercalagem), uso de resina de troca iônica e redução biológica (SCORDIA et al, 2012). Entretanto, além de aumentar mais uma etapa no processo de produção do bioetanol de segunda geração, pode-se reduzir a quantidade de açúcar presente no hidrolisado (HUANG et al, 2011).

A calagem excessiva tem se mostrado como o método de desintoxicação com custo reduzido em escala industrial (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), entretanto é necessário implantar um sistema para a retirada do precipitado formado, acarretando em maiores custos para a empresa, além de gerar um novo resíduo (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Schirmer-Michel et al. (2008) empregaram ácido sulfúrico nas concentrações de 0.2; 0.8 e 1.4 % (v/v) para liberação de açúcares da casca de soja. Para cada concentração foi aplicado calor nas temperaturas de 100, 120 e 125 °C, todos os testes com duração de uma hora. Para a melhor condição de hidrólise (1.4 % (v/v) de ácido sulfúrico e 125 °C) concentraram sob pressão e 70 °C e após fizeram a desintoxicação com carvão ativo nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 % (m/v). Neste trabalho os autores obtiveram uma redução de 95 % de furfural e 76 % de compostos fenólicos. Para os açúcares, a redução tanto de glicose como de xilose houve redução de 8 %.

3.4. Casca de Soja (*Glycine max*)

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa rica em proteínas e óleo, é originária do leste Asiático e foi introduzida no Brasil em torno de 1882. O grão é composto por 9% de casca, 90% de cotilédone (que corresponde a 40,7% de proteína, 22,7% de óleo, 5,8% de cinzas e 30,8% de carboidratos, em base seca) e cerca de 1% de hipocólito (VIEIRA;

CABRAL; PAULA, 1999; LIMA, 2010). A produção de soja no Brasil é cerca de 68 milhões de toneladas por ano, destinada principalmente para consumo humano, extração de óleos, proteínas texturizadas e ração animal. Estima-se que a produção brasileira de soja em 2020 será de aproximadamente 86 milhões de toneladas e, portanto, haverá um aumento nas quantidades de resíduos gerados (DOSSA et al., 2011).

A casca do grão de soja é o envoltório do grão e pode ser obtida por meio do processamento durante extração do óleo; uma tonelada deste grão proporciona 7 a 8 % de resíduos o que equivale entre 70 e 80 kg (MIRANDA et al, 2013). A casca de soja é destinada principalmente a produção de rações para consumo animal por possuir nutrientes de fácil digestão e ter alto teor de proteínas (TURINO, 2003). Apesar de ser muito utilizada para ração animal, este resíduo tem se mostrado promissor para produção de etanol, já que possui um teor de açúcares fermentescíveis em torno de 65% (CASSALES, 2010).

De acordo com o trabalho de Cassales (2010) os principais componentes da casca de soja são glicose e xilose o que corresponde a 39,7 e 19,6 % do total, respectivamente. Além destes dois componentes, a casca de soja é composta, em menores quantidades, por ácido glucurônico, arabinose, ácido acético, cinzas, proteínas, lignina, minerais entre outros. Os componentes presentes na casca de soja e as quantidades variam de acordo com o tipo de soja (condições de crescimento) e o processamento submetido.

Boeira (2010), em seus estudos com fermentação a partir de casca de soja para produção de etanol, obteve bons resultados, principalmente quando utilizou 90% da casca de soja hidrolisada com ácido sulfúrico no meio de fermentação. Cassales et al. (2011) concluíram que a casca de soja é um substrato de grande potencial para utilização em bioprocessos quando tratada por hidrólise ácida com ácido sulfúrico, uma vez que a casca de soja apresenta baixo teor de lignina e quanto menor a concentração de lignina, melhor é a ação do ácido para liberação de açúcares fermentescíveis.

3.5. Micro-organismos Produtores de Bioetanol.

Existem muitos gêneros de micro-organismos que são produtores de bioetanol. Podem-se citar os gêneros de levedura: *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pachysolen*; fungos filamentosos: *Fusarium*, *Mucor*, *Monilia* e

Paecilomyces; e bactérias: *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteróides*, *Thermoanaerobacter*, *Klebsiella*, *Cellulomonas* e *Zymomonas* (SILVA, 2007; LIMA; RODRIGUES, 2007; ERNANDES, 2009; CADETE et al., 2009).

Um exemplo da utilização de resíduos para produção de bioetanol por micro-organismos é o estudo de Silva (2007) que utilizou *Pichia stipitis* para fermentar o hidrolisado da palha de arroz para produção de etanol. Neste trabalho o autor alterou o meio de fermentação e teve aumento de 14% na produtividade. Quando inseriu agitação/aeração nos frascos de fermentação, obteve um aumento de 63% na produtividade e 24% na conversão em etanol.

Scordia et al. (2012) verificaram a produção de bioetanol no hidrolisado ácido de biomassa da cana gigante em pH de 5; 5,5; 6 e 6,5 utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis*. Os autores observaram que o aumento do pH proporcionou melhor produção de bioetanol. Em pH 5,5 a maior produção foi de 6,7 mg/mL em 72 horas de fermentação, já para pH 6 a produção foi de 8,2 mg/mL em 48 horas de fermentação. Em pH 6,5 não houve produção significativamente maior que em pH 6. No pH 5 não houve produção de bioetanol.

Saravanakumar; Senthilraja e Kathiresan (2013) utilizaram serragem de madeira hidrolisada para produzir bioetanol com *Saccharomyces cerevisiae*. O rendimento máximo de produção de etanol foi de 69,58 %. As condições empregadas para obter este rendimento foi 30 °C, 6,84 mg/L de concentração de serragem, agitação de 360 rpm e 89 horas de fermentação.

3.5.1. *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, de grande interesse biotecnológico, uma vez que produz vários bioprodutos como etanol, levana, sorbitol, ácido glucônico e fruto-oligossacarídeo (SILBIR et al, 2014). Como fonte de energia, esta bactéria pode utilizar glicose, frutose ou sacarose. Para produção de etanol o pH varia entre 4,5 e 7 em temperatura de 30 a 35 °C. Em temperaturas próximas de 40 °C ocorre redução de crescimento e inibição da produção de etanol (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

As três fontes de energia utilizada por esta bactéria são degradadas, por uma versão da via anaeróbica (via Entner-Doudoroff), em uma mistura equimolar de etanol e CO₂ (SPRENGER, 1996). O etanol é o metabólito primário da *Z. mobilis*, uma vez que é produzido simultaneamente com seu crescimento celular na fase exponencial (MADIGAN et al, 2010). Esta bactéria se torna interessante na produção de etanol já que fornece algumas vantagens em relação à *Saccharomyces cerevisiae* como: produtividade teórica superior, maior tolerância ao etanol e capacidade de crescer em condições anaeróbicas (LETTI et al, 2012).

A *Z. mobilis* utiliza a via Entner-Doudoroff para quebra da glicose (MADIGAN et al, 2010), conforme mostrado na figura 8.

Kalnenieks et al. (2002) propuseram a sequência de reações que ocorrem após a via Entner-Doudoroff mostrando o momento em que o etanol é produzido (figura 9).

Sreekumar; Chand; Basappa (1999) verificaram a produção de bioetanol pela bactéria *Z. mobilis* em meio de cultura semissintético contendo extrato de levedura, glicose, sulfato de amônio e fosfato de potássio. A produção máxima de bioetanol foi 23,7% maior em 30 °C do que em 42 °C num período de 20 horas de fermentação. Além da produção de bioetanol ter sido maior, a temperatura de 30 °C favoreceu em pouco mais de 34 % na produção de biomassa.

Figura 8: Via Entner-Doudoroff utilizada por *Zymomonas mobilis* para incorporação das fontes de energia (Adaptado de MANDIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004)

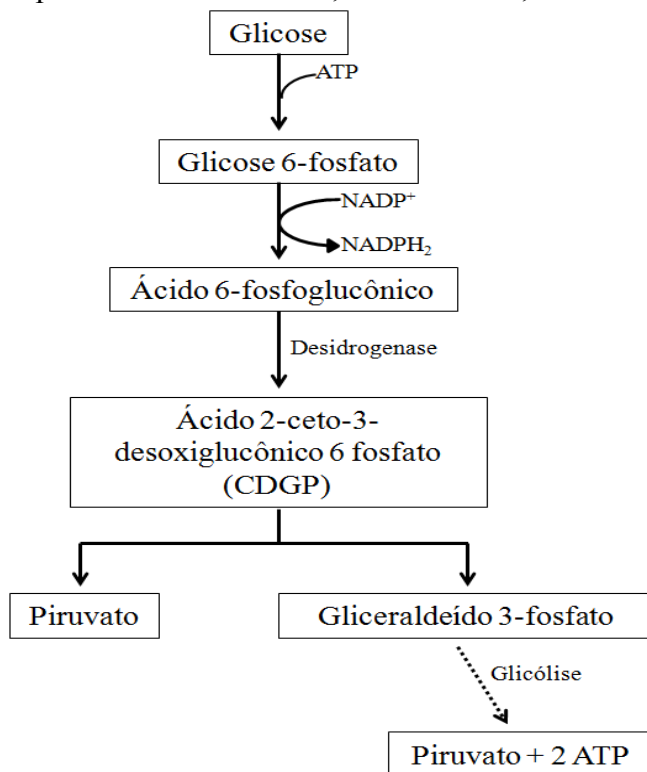
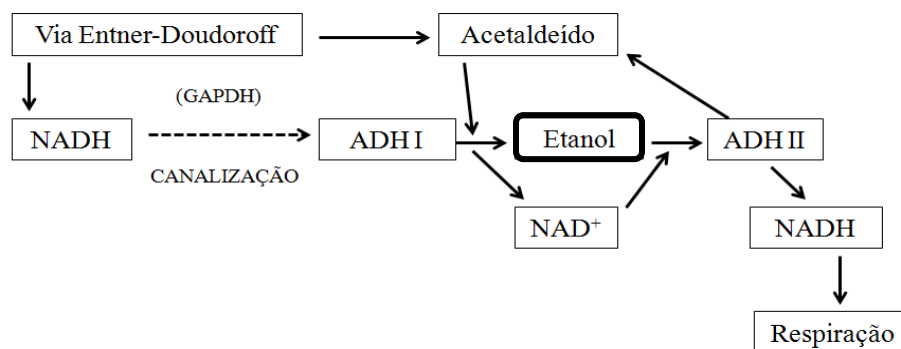


Figura 9: Esquema proposto do ciclo do etanol, explicando o papel de ADH II na respiração (Adaptado de KALNENIEKS et al, 2002)



NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina - reduzido); GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase); ADH I (isoenzima alcooldesidrogenase I); NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida e adenina - oxidado); ADH II (isoenzima alcooldesidrogenase II).

Torres e Baratti (1987) averiguaram a influência da concentração de substrato inicial para produção de bioetanol a 30 °C com *Z. mobilis*. As concentrações testadas foram de 100, 120, 140 e 160 mg/mL de glicose + frutose inicial. Os autores observaram que a produção de bioetanol reduziu conforme o aumento da concentração de substrato. Com 100 mg/mL a produção foi de 48,2 mg/mL e para 160 mg/mL a produção caiu para 36,2 mg/mL. Comparando-se o consumo de glicose e frutose para 100 e 160 mg/mL, a redução foi de 7 e 29,7 % de glicose e frutose, respectivamente.

Ferreira (2013) utilizou *Z. mobilis* para produção de bioetanol a partir de hidrolisado de casca de banana. Obteve produção máxima de bioetanol de 87,7 mg/mL, e suas melhores condições foram pH 4,5, 35 °C, 250 mg/mL de teor de sólidos totais em 24 horas de fermentação. Neste mesmo trabalho foi observado que com o aumento da produção de bioetanol foi proporcional ao aumento do teor de sólidos totais.

3.5.2. *Candida tropicalis*

As leveduras são mais utilizadas para produção de bioetanol por serem consideradas melhores produtoras. A *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada por ser resistente ao bioetanol, entretanto leveduras do gênero *Candida* estão entre as maiores produtoras, podendo-se citar a *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. mogii*, entre outras espécies deste gênero (CASSALES, 2010).

A *C. tropicalis* é uma levedura diploide ásporogênica, que é capaz de consumir diferentes substratos como dissacarídeos, fenóis, alcanos, derivados de alcanos e ácidos graxos. Esta levedura consegue crescer mesmo que haja apenas uma fonte de carbono, tendo altos rendimentos de biomassa. É uma levedura considerada termotolerante e com tolerância ao etanol necessária para produção deste a partir de biomassa lignocelulósica (JAMAI et al, 2001).

Contudo, o bioetanol não é o produto principal produzido por *C. tropicalis* e sim o xilitol. Entretanto quando se alteram algumas condições de fermentação esta deixa de produzir xilitol e passa a produzir bioetanol (OBEROI et al, 2010).

A *C. tropicalis* pode ser utilizada para produção de bioetanol de segunda geração. Para isto, é necessário utilizar hidrólise ácida para que promova a liberação de açúcares

fermentescíveis, uma vez que esta levedura metaboliza os compostos liberados na degradação da lignina, os quais podem inibir outros micro-organismos (MARTÍN et al, 2010).

Rattanachomsri et al. (2009), utilizaram hidrolisado enzimático de polpa de mandioca para produção de bioetanol. A produção máxima de etanol foi de 14,3 mg/mL em 30 horas. Utilizaram pH entre 4,5 e 5 incubado a 40 °C, já que a *C. tropicalis* é considerada uma levedura termotolerante.

Martín et al. (2010) verificaram a produção de etanol e xilitol por *C. tropicalis* em podas de oliveira em diversas condições. Quando empregaram pH entre 5 e 6,5, temperatura de 30 °C e agitação de 500 rpm, ocorreu maior produção de etanol do que de xilitol.

Além de converter pentoses e hexoses em xilitol e etanol, esta levedura é empregada na biodegradação de fenol ou compostos aromáticos, uma vez que a *C. tropicalis* consegue assimilar estes compostos (VARMA; GAIKWAD, 2009). O fato desta levedura não ser inibida por esse tipo de compostos presentes no hidrolisado ácido, a tornam uma alternativa desejada para produção de etanol em hidrolisados lignocelulósicos, além de não ser necessária a etapa de desintoxicação do hidrolisado (HUANG et al, 2011).

3.5.3. Consórcio de Micro-organismos

O consórcio pode ser formado pela combinação de dois ou mais micro-organismos, sejam estes bactéria, leveduras ou fungos filamentosos (CASSALES, 2010). Este processo também é conhecido como cocultura ou co-fermentação (LIN et al, 2011; AELING et al, 2012).

Em geral, para a formação do consórcio são empregadas basicamente duas estratégias: utilização de dois micro-organismos, um é responsável pela sacarificação do resíduo e o outro pela síntese do produto em si; e pelo processo conhecido como Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Neste último, o microrganismo além de ser capaz de produzir bioetanol ou outro produto ou subproduto, também é apto para sintetizar celulasas ou ainda estas

enzimas podem ser adicionadas ao sistema durante o cultivo (LIMA; RODRIGUES, 2007; KUHAD et al, 2011).

O consórcio de micro-organismos tem mostrado maior eficiência quando comparado aos experimentos que utilizam apenas um tipo de micro-organismos (CASSALES, 2010). No estudo realizado por Patle e Lal (2008) o consórcio empregado foi *Z. mobilis* e *C. tropicalis* no hidrolisado do resíduo de thippi (produto com alto teor de amido), eles observaram que, além de produzir maior quantidade de bioetanol, o tempo de fermentação foi menor.

Das et al. (2013) utilizaram hidrolisado enzimático de palha de arroz para fermentação com *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. A maior produção de bioetanol foi de 41,1 mg/mL em pH 6 e temperatura de 30 °C. Os autores concluíram que o emprego deste consórcio foi uma alternativa apropriada para suprir a demanda de biocombustíveis e redução de resíduos descartados no meio ambiente.

Hickert et al. (2013) empregaram o consórcio com *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida shehatae* no hidrolisado ácido da casca de arroz. Observaram que com o consórcio houve maior bioconversão de hexoses e pentoses (glicose e xilose, respectivamente) em bioetanol. Para o trabalho de Singh, Majumder e Ghosh (2014) o controle de oxigênio para o consórcio com *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis* favoreceu a produção máxima de bioetanol no hidrolisado ácido de biomassa de grama.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casca de Soja

A casca de soja foi fornecida pelo Laboratório de Processamento de Alimentos da Faculdade de Tecnologia "Estudante Rafael Almeida Camarinha" - Marília/SP.

As cascas foram trituradas em liquidificador adaptado, a fim de aumentar a superfície de contato, e armazenadas em um recipiente plástico. Utilizou-se tamizador da marca Produtest para homogeneizar o tamanho de partícula em $\leq 0,84$ mm.

4.2. Hidrólise da Casca de Soja

4.2.1. Padronização da Hidrólise

Foram testadas hidrólises nas concentrações 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% e 5% (v/v) de ácido sulfúrico, em triplicata. Para isto, pesaram-se 10g da soja previamente triturada em Erlenmeyer de 250 mL e adicionaram-se 50 mL do respectivo ácido. Os hidrolisados foram tratados com e sem aquecimento. Com aquecimento, os Erlenmeyers foram colocados em autoclave a 121 °C 1kgf/cm² nos tempos de 15 e 30 minutos. Os Erlenmeyers que não foram aquecidos permaneceram em temperatura ambiente (25 °C) nos tempos de 15 e 30 minutos e 12 e 24 horas.

Ao final da hidrólise com aquecimento, os Erlenmeyers foram deixados em temperatura ambiente até resfriamento, e ajustou-se o pH para 6 com hidróxido de sódio 50% (m/m). Cada hidrolisado foi centrifugado a 3600 rpm por 20 minutos, para separação das cascas remanescentes. Após centrifugação, filtrou-se o hidrolisado em papel de filtro Whatman nº 1 para remoção completa da casca de soja.

Todos os filtrados foram armazenados em frasco com tampa abaixo de 0°C. em cada hidrolisado foram determinados açúcares totais (DUBOIS et al, 1956); açúcares redutores (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952) e compostos fenólicos (CHAOVANALIKIT, WROLSTAD, 2004).

4.2.2. Desintoxicação

O hidrolisado foi concentrado em banho-maria a 70 °C, até redução de 50% do volume inicial. Após, foi adicionado carvão ativado em pó na proporção de 1 g de carvão para 40 g de hidrolisado. Foram agitados em incubadora orbital refrigerada durante 1 hora a 200 rpm e 30 °C, centrifugados a 2000g por 30 minutos e filtrados em papel de filtro Whatman nº 1.25 O sobrenadante obtido foi armazenado em temperatura menor que 0 °C.

4.3. Micro-organismos e Meios de Cultura

4.3.1. *Zymomonas mobilis*

A bactéria *Z. mobilis* foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, Estado de São Paulo.

4.3.1.1. Meio para Armazenamento, Enriquecimento e Pré-fermentação

O meio utilizado para armazenamento da bactéria foi chamado de ágar *Zymomonas mobilis* (AZM). Este meio foi composto por (g/L): peptona, 10; extrato de levedura, 10; glicose, 20; e ágar, 15. As células foram armazenadas em temperatura de 4 °C. O meio utilizado para enriquecimento da bactéria foi chamado de caldo *Zymomonas mobilis* (CZM). Este meio continha os mesmos reagentes que o AZM, exceto ágar, obtendo assim um meio líquido (caldo).

4.3.2. *Candida tropicalis*

A levedura *C. tropicalis* foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, Estado de São Paulo.

4.3.2.1. Meio para Armazenamento; Enriquecimento e Pré-fermentação

O meio utilizado para armazenamento da levedura foi chamado de ágar *Candida tropicalis* (ACT). Este meio era composto por (g/L): extrato de malte, 3; extrato de levedura, 3; peptona, 5; xilose, 10; e ágar, 20. As células foram armazenadas em temperatura de 4 °C. O meio utilizado para enriquecimento da levedura foi chamado de caldo *Candida tropicalis* (CCT). Este meio continha os mesmos reagentes que o ACT,

ágar, obtendo-se um caldo.

4.3.3. Meio para Fermentação

4.3.3.1. *Z. mobilis*

O meio utilizado para fermentação da bactéria, foi constituído por (g/L): MgSO₄, 1; (NH₄)₂SO₄, 1; KH₂PO₄, 1; Extrato de levedura, 5, proposto por Rodriguez e Callieri (1986) com modificações. Este meio foi adicionado de glicose, hidrolisado desintoxicado ou hidrolisado sem desintoxicação. Os meios de cultura foram chamados de semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente.

4.3.3.2. *C. tropicalis*

O meio utilizado para fermentação da levedura, foi constituído por (g/L): MgSO₄, 1; (NH₄)₂SO₄, 1; KH₂PO₄, 1; Extrato de levedura, 5, proposto por Patle e Lal (2008), com modificações. Este meio foi adicionado de xilose, hidrolisado desintoxicado ou hidrolisado sem desintoxicação. Os meios de cultura foram chamados de semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente.

4.4. Fermentação

Todas as fermentações foram realizadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL dos meios de cultura.

4.4.1. Experimento I – *Z. mobilis*

Os fatores testados para *Z. mobilis*, foram baseados em trabalhos realizados com o mesmo micro-organismo (ERNANDES, 2009; MORO, 2012; FERREIRA, 2013). Assim, as condições utilizadas para a bactéria foram: temperatura de 30°C; concentração de substrato de 5% (m/v); pH 6; sem agitação e tempo de 24, 48 e 72 horas. O pH dos meios de cultura foram ajustados, quando necessário, com NaOH 50% (m/m) e H₂SO₄ 30% (v/v).

4.4.1.1. Padronização do Inóculo

Para padronizar o inóculo repetiu-se as etapas para crescimento descritas no Apêndice 5A. Posteriormente, em uma cubeta de espectrofotômetro contendo 3 mL de água destilada, gotejou-se a suspensão contendo bactéria até atingir absorvância de 0,300 (570 nm). Por meio de uma regra de três foi quantificado o peso inicial da bactéria em cada erlenmeyer para fermentação.

Cálculo:

$\begin{array}{ccc} 3 \text{ mL} & \text{-----} & x \\ y & \text{-----} & z \end{array}$
--

(Equação 1)

Onde:

x = volume utilizado de suspensão na cubeta;

y = volume final de meio da fermentação;

z = volume de suspensão com a bactéria utilizada para fermentação.

4.4.1.2. Meio Semissintético

Nesta fermentação, o substrato utilizado foi a glicose. As condições usadas foram citados no item 4.4.1. Todas as amostras foram incubadas em estufa B.O.D. Após cada tempo de fermentação, determinou-se a absorvância (570 nm), para verificar crescimento e determinou-se o pH. O restante do meio foi centrifugado a 3600 rpm por 15 min para separar as células do meio e também foi separada uma alíquota para análise de etanol (item 4.6.4.).

4.4.1.3. Meio com Hidrolisado Desintoxicado

Nesta fermentação, o substrato utilizado foi o meio hidrolisado desintoxicado. Repetiu-se as etapas descritas no item 4.4.1.2.

4.4.1.4. Meio com Hidrolisado sem Desintoxicar

Nesta fermentação, o substrato utilizado foi o meio hidrolisado sem desintoxicar.

Repetiu-se as etapas descritas no item 4.4.1.2.

4.4.1.5. Experimento I.I

Foram realizados experimentos apenas para observar a produção de bioetanol pela bactéria *Z. mobilis*, utilizando-se os mesmos meios e nas mesmas condições citadas no item 4.4.1., porém nos tempos de incubação foram 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 horas.

4.4.2. Experimento II – *C. tropicalis*

A determinação das variáveis que podem afetar a produção de etanol pela levedura *C. Tropicalis* foi realizada por meio de um planejamento fatorial com 8 experimentos, em triplicata, com 3 repetições no ponto central, resultando em 27 corridas de acordo com o delineamento experimental do tipo 2^{5-2} . As condições empregadas foram temperatura de 25, 30 e 35°C; concentração de substrato 5, 7,5 e 10% (m/v); pH 5,5, 6 e 6,5; agitação 0, 75 e 150 rpm e 24, 48 e 72 horas, conforme tabela 1.

Tabela 1: Variáveis utilizadas nas fermentações para *Candida tropicalis*

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
X_1 - Temperatura (°C)	25	30	35
X_2 - pH	5,5	6	6,5
X_3 - Agitação (rpm)	0	75	150
X_4 - Concentração de substrato (%)	5	7,5	10
X_5 - Tempo (h)	24	48	72

4.4.2.1. Padronização do Inóculo

Para padronizar o inóculo repetiram-se as etapas descritas no Apêndice 6A e as mesmas etapas descritas no item 4.4.1.1.

4.4.2.2. Meio Semissintético

Na fermentação realizada utilizando meio semissintético, o substrato utilizado foi a

xilose. As variáveis usadas são as da tabela 1. Todas as amostras sem agitação foram incubadas em estufa B.O.D. e as amostras com agitação foram incubadas em incubadora horizontal com agitação e temperatura controlada. Após cada período de fermentação, determinou-se o crescimento por absorbância 570 nm, bem como o pH. O restante do meio foi centrifugado a 3600 rpm por 15 min para separar as células do meio e também foi separada uma alíquota para análise de etanol (item 4.6.4.).

4.4.2.3. Meio com Hidrolisado Desintoxicado

Nesta fermentação, o substrato utilizado foi o meio hidrolisado desintoxicado. Realizou-se as etapas descritas no item 4.4.2.2.

4.4.2.4. Meio com Hidrolisado sem Desintoxicar

Nesta fermentação, o substrato utilizado foi o meio hidrolisado sem desintoxicar. Realizou-se as etapas descritas no item 4.4.2.2.

4.4.2.5. Experimento II.I

Foram realizados experimentos apenas para observar a produção de bioetanol pela levedura *C. tropicalis*, utilizando-se os mesmos meios e nas mesmas condições citadas no item 4.4.1., porém nos tempos de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 horas.

4.4.3. Experimento III – Consórcio (*Z. Mobilis* + *C. Tropicalis*)

Após todas as fermentações com a bactéria e com a levedura separadamente, foram selecionadas as melhores condições para produção de bioetanol e foi inoculado o consórcio nos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação.

4.5. Métodos Analíticos

4.5.1. Determinação de Açúcar Total (AT)

Em tubo de ensaio, foram colocados 0,5 mL do hidrolisado (diluído em água destilada quando necessário), 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deixou-se reagir esta mistura por 20 minutos à temperatura ambiente e determinou-se a

concentração de açúcares totais a 490 nm (DUBOIS et al, 1956).

4.5.2. Determinação de Açúcares Redutores (AR)

Em tubo de ensaio, foram colocados 0,5 mL do hidrolisado (diluído em água destilada quando necessário), 0,5 mL do reagente de Somogyi e deixou-se em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 0,5 mL do reagente de Nelson e 3,5 mL de água destilada e determina-se a concentração a 540 nm (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952).

4.5.3. Determinação de Compostos Fenólicos (CF)

Em tubo de ensaio, foram colocados 0,5 mL do hidrolisado (diluído em água destilada quando necessário), 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. O tubo de ensaio, foi deixado reagir por 10 minutos ao abrigo de luz. Após, adicionaram-se 1,5 mL de carbonato de sódio a 20% (m/m) e foi colocado em banho-maria por 20 minutos a 40°C. Posteriormente, os compostos fenólicos foram determinados por espectrofotometria a 755 nm (CHAOVANALIKIT, WROLSTAD, 2004).

4.5.4. Determinação de Etanol

A determinação de etanol foi realizada pelo método espectrofotométrico utilizando-se dicromato de potássio. Este método quantifica etanol indiretamente pela redução do Cr^{6+} , quando em contato com etanol, para Cr^{3+} , no qual a coloração muda de laranja para verde. Para isto, colocaram-se 200 μL da amostra em tubo de ensaio, adicionaram-se 6,8 mL de água destilada e 2 mL de dicromato de potássio. Aqueceu-se, em banho-maria, à temperatura de 60 °C por 30 minutos. Passado este período, resfriaram-se as amostras de cada tubo e determinou-se a concentração de etanol a 600 nm (KAYE; HAAG, 1954).

4.5.4.1. Produtividade de Bioetanol

A produtividade (P) foi determinada por meio da equação 2, a qual relaciona o n° em gramas de bioetanol produzido pelo n° em horas do tempo de fermentação.

Cálculo:

$$\frac{P = (P_f - P_0)}{(t_f - t_0)}$$

(Equação 2)

Onde:

P = produtividade (g/L.h)

P₀ = massa em gramas inicial de produto

P_f = massa em gramas final de produto

t₀ = tempo em horas inicial

t_f = tempo em horas final

4.6. Análise Estatística

O planejamento fatorial e as diferentes produções de bioetanol, biomassa e produtividade foram avaliados estatisticamente para cada experimento, com significância de 5% (p < 0,05).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização da Hidrólise da Casca de soja

Foram utilizadas apenas as partículas com tamanho $\leq$ que 0,84 mm, as partículas maiores foram trituradas novamente até atingirem o tamanho desejado. A hidrólise foi padronizada com ácido sulfúrico na concentração de 1,5 % (v/v) (64,7 mg/mL de açúcares totais e 30,4 mg/mL de açúcares redutores) com aquecimento de 15 minutos de contato do ácido com a casca de soja. Esta escolha foi feita a partir dos resultados de liberação de açúcares (totais e redutores) e compostos fenólicos. Como pode ser observado na tabela 2, o único fator que foi significativo no cruzamento de dados foi a aplicação de calor, no qual tanto em açúcares totais, quanto em açúcares redutores e compostos fenólicos o p-valor < 0,05.

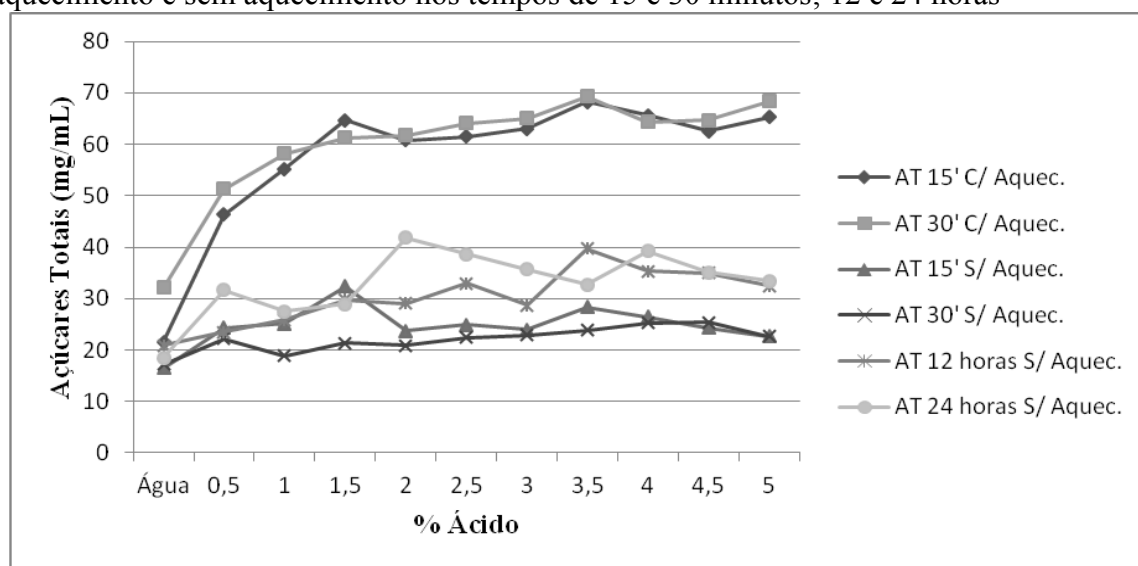
O uso de concentrações mais baixas de ácido sulfúrico reduz o risco de corrosão dos fermentadores, libera menores quantidades de compostos tóxicos, além de reduzir custos pela menor quantidade a ser utilizada deste reagente. Temperaturas mais baixas diminuem os gastos com energia, tornando o processo com menor custo (TOMÁS-PEJÓ et al, 2011).

Tabela 2: Cruzamento de dados entre os fatores utilizados na hidrólise (tempo, temperatura e concentração de ácido) e açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR) e compostos fenólicos (CF)

Fator	p-valor
AT x Tempo	0,645
AT x Temperatura	0,000
AT x [Ácido]	0,888
AR x Tempo	0,077
AR x Temperatura	0,000
AR x [Ácido]	0,438
CF x Tempo	0,194
CF x Temperatura	0,020
CF x [Ácido]	0,656

A figura 10 mostra a quantidade de açúcares totais liberados em todas as concentrações de ácido utilizadas, em todos os tempos de reação, com e sem aquecimento. Nesta figura pode-se observar que a maior liberação de açúcares totais foi de 69,3 mg/mL com concentração de 3,5 % (v/v) de ácido e 30 minutos de aquecimento. Entretanto padronizou-se a hidrólise com 1,5 % (v/v) de concentração de ácido sulfúrico e 15 minutos de aquecimento, uma vez que a diferença entre as condições citadas não teve diferença significativa e as condições empregadas como padrão utiliza concentração menor de ácido sulfúrico. Na figura 10 também pode-se observar que a aplicação de calor foi necessária para que houvesse maior liberação dos açúcares totais e que com água a liberação foi menor.

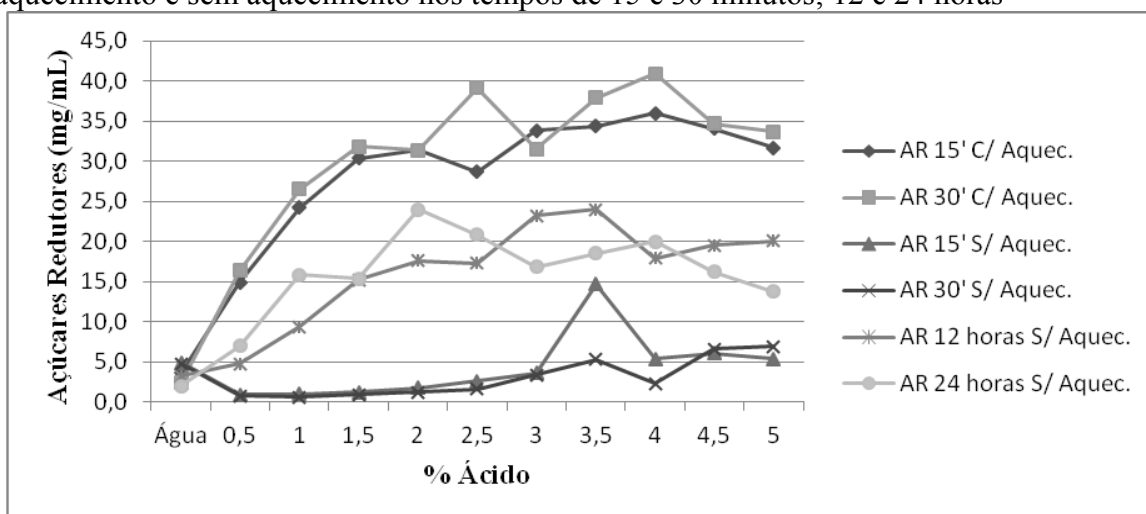
Figura 10: Açúcares totais (AT) (mg/mL) liberados durante a hidrólise ácida com aquecimento e sem aquecimento nos tempos de 15 e 30 minutos; 12 e 24 horas



A figura 11 mostra as quantidades liberadas de açúcares redutores nas mesmas condições dos açúcares totais (figura 10). Nesta figura 11 pode-se observar que a aplicação de calor também foi necessária para melhor liberação de açúcares redutores. Entretanto nos tempos de 12 e 24 horas sem aquecimento a liberação foi maior quando comparada com os tempos de 15 e 30 minutos sem aquecimento, o qual não ocorreu para liberação de açúcares totais (figura 10). Com exceção dos experimentos com 15 e 30

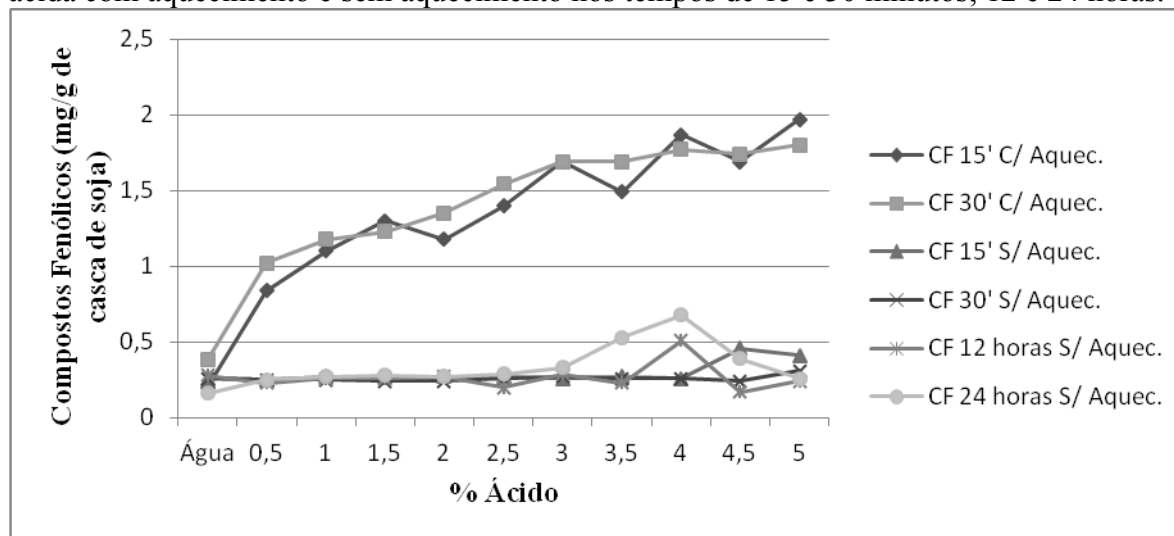
minutos sem aquecimento, a liberação de açúcares redutores foi baixa quando utilizou-se água para a hidrólise. A hidrólise utilizando-se apenas água é espontânea, entretanto este processo é lento, por isso o uso de ácidos, bases e enzimas atuam como catalisadores da hidrólise (OGEDA; PETRI, 2010). Isto pode ser observado no presente trabalho, o qual houve liberação de açúcares totais e redutores, bem como de compostos fenólicos, quando empregado apenas água.

Figura 11: Açúcares redutores (AR) (mg/mL) liberados durante a hidrólise ácida com aquecimento e sem aquecimento nos tempos de 15 e 30 minutos; 12 e 24 horas



A figura 12 mostra as quantidades de compostos fenólicos liberados na hidrólise nas mesmas condições dos açúcares totais e redutores (figuras 10 e 11, respectivamente). Na figura 12 pode-se observar que a aplicação de calor aumentou a liberação de compostos fenólicos. Nos experimentos com aquecimento, conforme aumentou a concentração de ácido, aumentou a liberação dos compostos fenólicos, entretanto a liberação dos açúcares foi significativamente maior com aplicação de calor, por isso padronizou-se a hidrólise com aquecimento, mesmo que haja maior liberação dos compostos fenólicos. Para os testes sem aplicação de calor houve uma maior liberação de compostos fenólicos a partir de 3,5 % (v/v) de concentração de ácido sulfúrico, em concentrações de ácido baixa, a liberação foi menor.

Figura 12: Compostos fenólicos (CF) (mg/g de casca de soja) liberados durante a hidrólise ácida com aquecimento e sem aquecimento nos tempos de 15 e 30 minutos; 12 e 24 horas.



Cara et al. (2008) utilizaram ácido sulfúrico nas concentrações de 0,2; 0,6; 1 e 1,4 % e temperaturas de 170, 180, 190, 200 e 210°C, todos com 10 minutos de duração, em resíduos de oliveira. Estes pesquisadores observaram que a maior quantidade de açúcares totais liberados foi de 24,3 g/100g de resíduo a 170°C e 1 % de ácido sulfúrico. Eles também observaram que conforme a temperatura aumentava, a liberação destes açúcares diminuía. O presente trabalho liberou 32,75 g/100g de casca de soja, quantidade esta superior ao estudo citado. Esta diferença entre os trabalhos pode ser devida tanto ao resíduo quanto à temperatura utilizada. A temperatura de 170°C ou maior pode ter ocasionado degradação dos açúcares e formação de furfural e hidroximetilfurfural, entre outros compostos que podem prejudicar os micro-organismos (HUANG et al, 2011).

No estudo de Cassales et al. (2011) foi realizada a hidrólise ácida da casca de soja com ácido sulfúrico e os autores verificaram que com concentração de 1,7 % do ácido, o tempo de 60 minutos e a temperatura de 153 °C, a eficiência de hidrólise foi de 87% na liberação de açúcares fermentescíveis, sem formação de compostos inibidores. Eles também verificaram que a maior concentração de ácido sulfúrico utilizado, sem a formação de compostos tóxicos foi de 2,7% a uma temperatura de 118°C por 40 minutos, entretanto houve uma queda de 28% na liberação destes açúcares. No presente trabalho, a menor liberação de compostos fenólicos ocorreu em 2,5 % (v/v) de ácido sulfúrico, sem

aquecimento e 12 horas de tempo de contato com a casca de soja. Porém, nestas condições houve redução de 55 % na liberação de AT e 71 % na liberação de AR.

No trabalho de Scordia et al. (2012) realizaram hidrólise da biomassa de cana gigante com ácido sulfúrico na concentração de 4 % (v/v) e aquecimento à 121 °C por uma hora e obtiveram 15 e 78 % de glicose e xilose, respectivamente. Entretanto, neste hidrolisado, houve liberação de compostos fenólicos (4,8 g/L) que, juntamente com o ácido acético, foram responsáveis por 44,3 % do total de compostos inibidores formados. No presente trabalho foram liberados 1,87 e 1,77 mg/g CF quando foi utilizada a concentração de 4 % (v/v) de ácido sulfúrico nos tempos de 15 e 30 minutos de aquecimento. Portanto no presente trabalho a liberação de CF foi menor. Esta diferença pode ser explicada pelo menor tempo de permanência na autoclave do que o estudo citado e também ao fato dos resíduos utilizados serem diferente.

No estudo realizado por Noronha et al. (2010) utilizaram ácido sulfúrico concentrado em bagaço de cana de açúcar com aquecimento a 121 °C por 10 minutos. Os resultados obtidos foram semelhantes aos do trabalho de Scordia et al. (2012). Isto é, liberaram maiores quantidades de xilose (15,76 g/L) do que glicose (1,34 g/L). Dentre os compostos tóxicos os CFs tiveram maior liberação, (4,25 g/L) o que corresponde a 23 % a mais da quantidade de ácido acético liberado e 99 % a mais que o furfural e hidroximetilfurfural. Esta quantidade de CF do trabalho de Noronha et al. (2010) foi próxima aos resultados obtidos por Scordia et al. (2012). Ambos pesquisadores utilizaram ácido sulfúrico e aquecimento de 121 °C para a hidrólise, entretanto o tempo e a concentração de ácido sulfúrico foram diferentes, mostrando que a concentração de ácido pode ser inversamente proporcional ao tempo de contato do ácido com o resíduo. No presente trabalho a maior liberação dos compostos fenólicos foi na maior concentração de ácido sulfúrico e em 15 minutos de permanência em autoclave.

Estudos de López et al, empregaram hidrólise ácida em diferentes tempos, temperaturas e concentrações de ácido sulfúrico em resíduos de eucalipto. Quantificaram, entre outros açúcares, glicose e xilose e os furanos furfural e hidroximetilfurfural. Os autores observaram que para liberar maiores quantidades de glicose, foi necessário utilizar condições mais severas e conseqüentemente houve maior formação de furanos. Para maior

liberação de xilose não foram necessárias condições extremas, entretanto também foram liberadas altas quantidades de furanos. Utilizando-se condições mais amenas a formação de furanos foi de no máximo 0,03 %, contudo, a liberação dos açúcares foi reduzida em 50 %. No presente trabalho sob condições amenas (0,5% de concentração de ácido sulfúrico, 15 minutos e sem aquecimento), houve redução de 67 % na liberação de AT; 98 % de AR e 88 % de CF (Figuras 10, 11 e 12, respectivamente).

5.2. Desintoxicação do Hidrolisado

A desintoxicação do hidrolisado serve para reduzir compostos inibidores e outros fatores que possam interferir no desenvolvimento dos micro-organismos. Para isto, foram realizadas análises dos compostos fenólicos no hidrolisado antes do processo de concentração (SC), após o processo de concentração (C) e após o processo de desintoxicação (HD). A tabela 3 mostra a quantidade de compostos fenólicos de cada meio. Pode-se observar que quando se compara a quantidade de compostos fenólicos para cada meio, a diferença entre estes é significativa ($p = 0,002$).

Entretanto, quando se compara os dois meios utilizados neste trabalho para fermentação (C e HD) a diferença não é significativa ($p = 0,141$). Portanto, como a diferença entre os hidrolisados C e HD não foi significativa, pode-se utilizar tanto o C quanto o HD, uma vez que se ocorrer inibição pela presença de compostos fenólicos, irá ocorrer nos dois hidrolisados.

Tabela 3: Compostos fenólicos dos hidrolisados, antes e depois do processo de concentração (SC e C, respectivamente) e após o processo de desintoxicação (HD)

Meio	Compostos Fenólicos (mg/g de casca de soja)	Desvio Padrão	p-valor
SC	1,30	0,05	0,002
C	2,13	0,06	
HD	1,98	0,02	

No trabalho de Hodge et al. (2009) aplicaram carvão ativado na concentração de 5% para reduzir compostos fenólicos no hidrolisado de madeira. Obtiveram uma redução de

98% dos compostos fenólicos, na qual a redução foi maior que o presente trabalho (8% de redução). Esta diferença pode ser devida ao processo de desintoxicação e granulometria do carvão ativo utilizado. Mateo et al. (2013) também empregaram carvão ativo para redução de compostos fenólicos no hidrolisado ácido de resíduos de oliveira. Obtiveram uma redução de 15,9% dos compostos fenólicos. Mussatto e Roberto (2004) testaram cinco marcas diferentes de carvão ativo em pó para desintoxicação do hidrolisado de palha de arroz. Cada carvão ativo utilizado se comportou de uma forma, contudo os que possuem menor granulometria são mais eficazes. O tempo de contato com o hidrolisado também influencia na eficácia do carvão ativo.

No estudo de Schirmer-Michel et al. (2008) empregaram ácido sulfúrico nas concentrações de 0.2; 0.8 e 1.4 % (v/v) para liberação de açúcares da casca de soja. Para cada concentração foi aplicado calor nas temperaturas de 100, 120 e 125 °C, todos os experimentos tiveram duração de uma hora. A melhor condição de hidrólise (1.4 % (v/v) de ácido sulfúrico e 125 °C) foi concentrada sob pressão e 70 °C e desintoxicada com carvão ativado nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 % (m/v). Neste trabalho os autores obtiveram uma redução de 95 % de furfural e 76 % de compostos fenólicos. Para os açúcares, a redução tanto de glicose como de xilose foi de 8 %. No presente trabalho a redução de AT posterior etapa de desintoxicação foi de 20 % (tabela 4). Devido ao fato de que a diferença na redução dos compostos fenólicos não ter sido significativa ($p = 0,058$) e por ocorrer 20 % de perda de AT, utilizar a desintoxicação poderá, sem a utilização do carvão ativado na granulometria adequada, não ser vantajoso para empregar o hidrolisado como meio fermentativo, entretanto para alguns micro-organismos a redução dos compostos fenólicos é necessária.

Tabela 4: Redução de açúcares totais posterior processo de desintoxicação

Meio	Açúcares Totais (mg/mL)	Desvio Padrão	p-valor
C	108,2	0,8	0,058
HD	86,0	7,8	

5.3. Fermentação

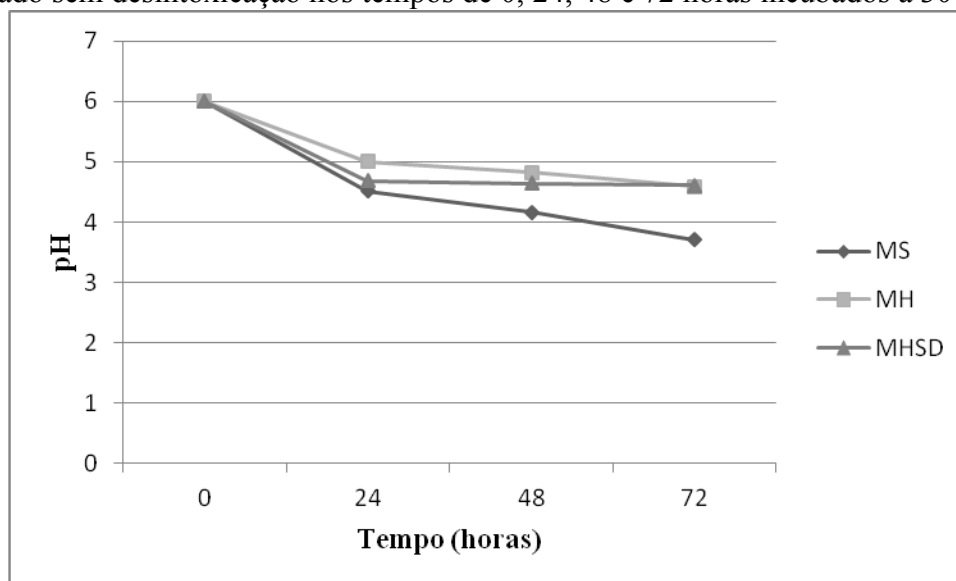
5.3.1. *Zymomonas mobilis*

Neste experimento foram realizados testes com os três meios de cultura, semissintético; com hidrolisado desintoxicado; e com hidrolisado sem desintoxicação. As condições testadas foram 30 °C; pH inicial 6; 5 % (m/v) de concentração de substrato; e foram retiradas alíquotas nos tempos de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 48 e 72 horas de fermentação.

5.3.1.1. pH

O meio de cultura para fermentação teve pH inicial de 6. As figuras 13 e 14 mostram a redução do pH após as fermentações com os meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar. Com os resultados, pode-se observar que o pH de todos os meios reduziu conforme o tempo de fermentação. O mesmo ocorreu com Moro (2012), que iniciou sua fermentação com pH 5,7 e com o decorrer do tempo o pH reduziu para 3,9 em 72 horas.

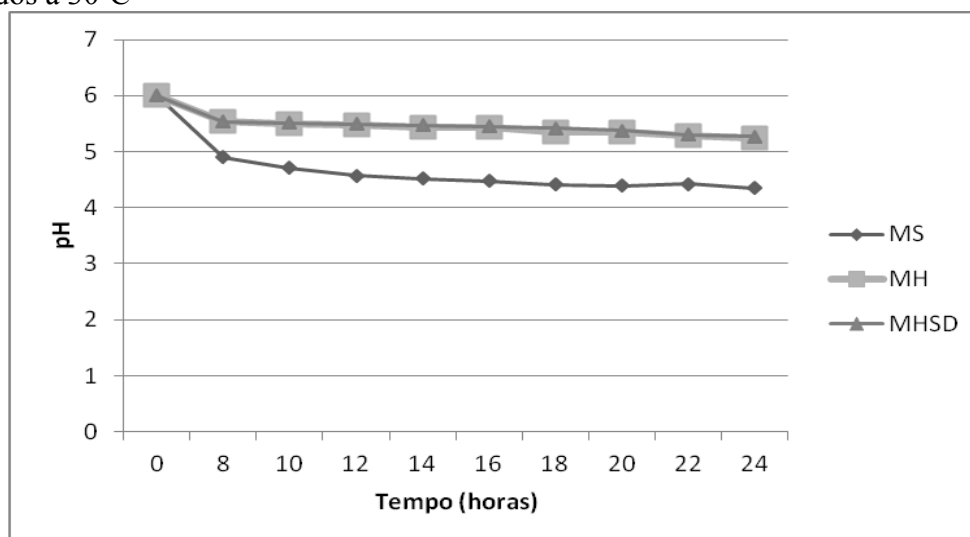
Figura 13: pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas incubados a 30°C



Na fermentação de 8 a 24 horas, pode-se observar que a redução do pH com os dois meios de cultura contendo o hidrolisado, tiveram redução próxima com o decorrer do

tempo como é mostrado na figura 14. A redução do pH pode ser devido a formação de produtos como o etanol.

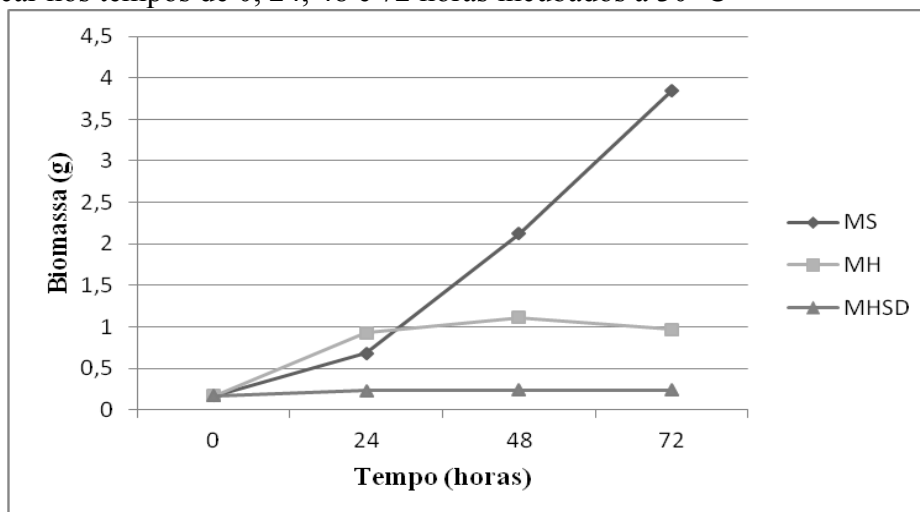
Figura 14: pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30°C



5.3.1.2. Crescimento Celular (Biomassa)

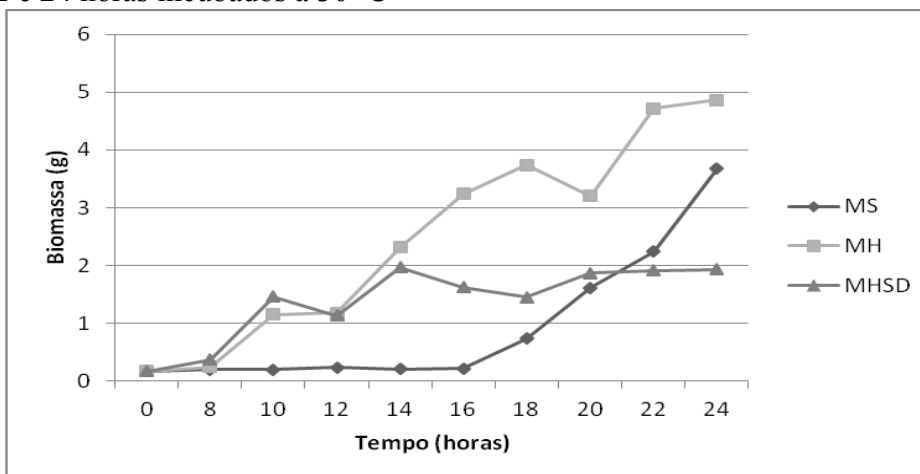
O inóculo inicial de cada fermentação foi de 0,17 g. A figura 15 e a figura 16 mostram os resultados obtidos nas fermentações com os tempos de 24 a 72 horas e 8 a 24 horas, respectivamente. Na figura 15 pode ser observado que conforme transcorre o tempo de incubação ocorre um incremento da biomassa para o meio semissintético e para o meio com hidrolisado sem desintoxicar. Já para o meio com hidrolisado desintoxicado este aumento ocorreu somente até 48 horas e depois a quantidade de biomassa diminuiu. O que provavelmente se deve pela quantidade de compostos tóxico presentes, mesmo que em menor quantidade, por falta de nutrientes e substrato ou pela formação de produto. A maior produção de biomassa foi de 3,85 g em 72 horas; 1,11 g em 48 horas e 0,24 g em 72 horas nos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente.

Figura 15: Crescimento celular (biomassa) da bactéria *Zymomonas mobilis* durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas incubados a 30 °C



Na figura 16 pode-se observar que o maior crescimento foi em meio de cultura com hidrolisado desintoxicado e, com exceção do tempo de 20 horas, a concentração celular foi aumentando conforme o decorrer do tempo. A maior produção de biomassa foi de 3,67 g e 4,86 g em 24 horas e 1,97 g em 14 horas nos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente.

Figura 16: Crescimento celular durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30 °C



Pode-se observar nas figuras 13 e 14 que houve uma queda no pH conforme o transcorrer do tempo. Esta queda pode ter ocorrido devido ao aumento na concentração celular (figuras 15 e 16), o qual libera-se ácidos orgânicos, acarretando na redução do pH do meio de cultura.

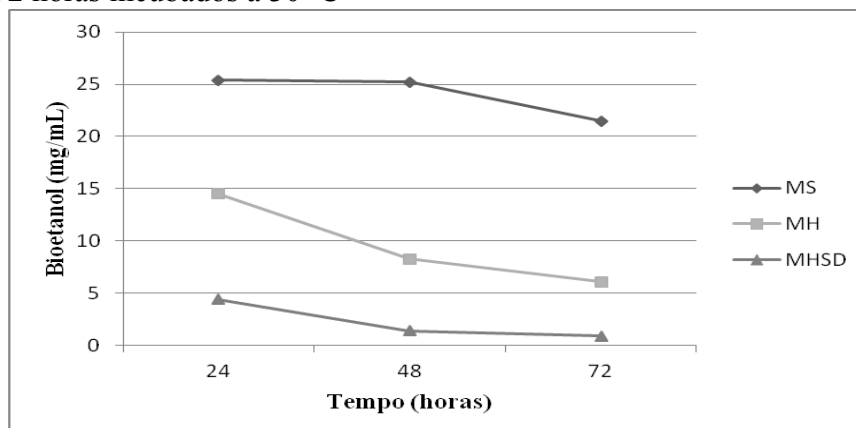
No meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação houve aumento de biomassa, entretanto, quando comparado com os outros meios, este aumento foi menor. A maior concentração de compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes no meio pode ser a razão pela baixa formação de biomassa (ERNANDES, 2009).

Franden; Pienkos; Zhang (2009) avaliaram o impacto no crescimento de *Z. mobilis* na presença de alguns compostos tóxicos, liberados na hidrólise ácida em palha de milho, como o furfural, hidroximetilfurfural e acetato. As análises dos compostos individuais não tiveram efeito significativo no crescimento celular. Entretanto o furfural, mesmo que em baixa concentração, afetou mais o crescimento do que quando comparado ao hidroximetilfurfural. O acetato influenciou fortemente o crescimento celular.

5.3.1.3. Produção de Bioetanol

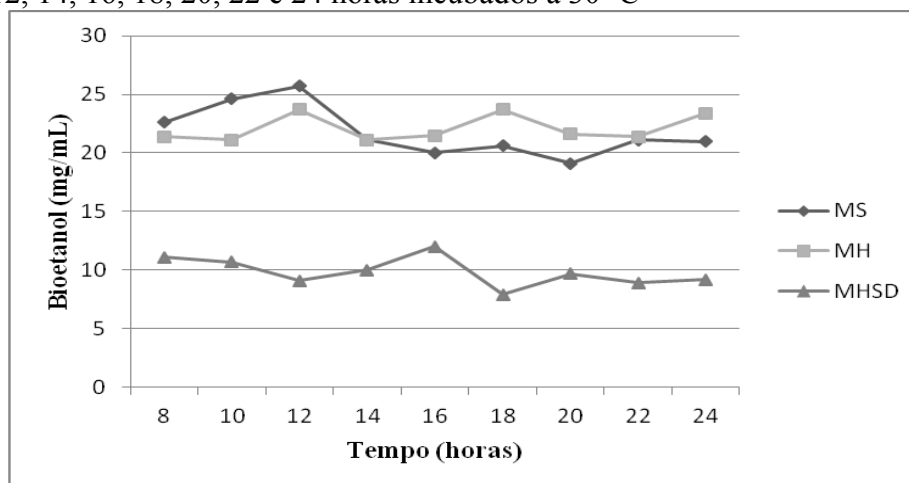
As figuras 17 e 18 mostram a produção de bioetanol em relação com o tempo de fermentação e o meio utilizado. Na figura 17 pode ser observado que os valores máximos obtidos foram 25,4 mg/mL; 14,5 mg/mL e 4,4 mg/mL nos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente, todos em 24 horas.

Figura 17: Produção de bioetanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas incubados a 30 °C



Na figura 18 pode-se observar que a produção de bioetanol nos meios de cultura semissintético e com hidrolisado desintoxicado foi muito próxima, obtendo-se maiores produções de 25,7 e 23,7 mg/mL, respectivamente, ambos em 12 horas de fermentação. Já para o meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação a maior produção de bioetanol foi em 16 horas (12,0 mg/mL), contudo no tempo de 8 horas a produção foi de 11,1mg/mL, mostrando uma produção próxima à maior produção, todavia com a metade do tempo de processo fermentativo.

Figura 18: Produção de bioetanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação, nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30 °C



A inibição que os compostos tóxicos causam no crescimento dos micro-organismos vai depender da quantidade destes compostos no meio utilizado e também do tipo de micro-organismo empregado (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Destes, as bactérias demonstram ser mais sensíveis a estes compostos em relação ao crescimento (HODGE et al, 2009). No presente trabalho esta inibição pode ser observada nas figuras 17 e 18, uma vez que a produção de bioetanol no meio hidrolisado com desintoxicação foi maior que o meio sem desintoxicação.

No estudo de Letti et al. (2012), utilizando melaço de soja, um resíduo do processo da extração de proteína de soja, produziram 24,2 g/L de bioetanol com *Z. mobilis*. As condições testadas foram pH 6, temperatura de 30 °C e concentração de açúcares totais de 15%, o triplo do utilizado no presente trabalho (5%). Mazaheri et al. (2012) utilizaram vagem de alfarroba, sem hidrólise, para produção de bioetanol com esta mesma bactéria. A produção máxima foi de 15,9g/L em 5% de açúcares totais a 31°C em 43 horas. Este resultado e as condições utilizadas foram parecidas às do presente trabalho obtidas com o hidrolisado desintoxicado.

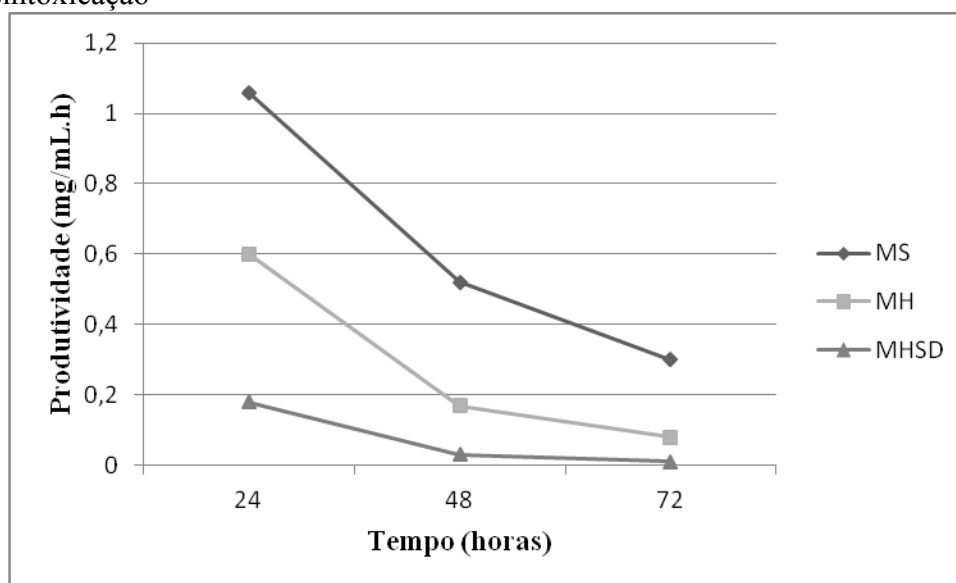
No trabalho de Ernandes (2009) a produção máxima de bioetanol foi de 76,6 g/L com 25% de sacarose em condições de 40 °C, pH 8 e agitação de 200 rpm. A quantidade de sacarose deste trabalho foi 5 vezes maior que o presente trabalho, que apresentou maior produção de 18,2 g/L com a sacarose como fonte de carbono. Baixas concentrações de substrato para produção de bioetanol por *Z. mobilis* são desejadas, já que não ocorre perdas de fonte de carbono para a produção de subprodutos (levana e sorbitol) (KIRK; DOELLE, 1993) e ocorre maior eficiência de conversão do açúcar em produto final e menor quantidade de açúcar residual (DOELLE; GREENFIELD, 1985)

Os resultados apresentados da literatura foram maiores que o presente trabalho, quando se trata da produção de bioetanol com hidrolisados lignocelulósicos. Esta diferença pode ter ocorrido pelas condições de experimentação utilizadas serem diferentes, bem como, o tipo de análise aplicada para quantificação de etanol. Utilizando o mesmo método de determinação de etanol ao utilizado neste trabalho, Camilios Neto et al. (2005) obtiveram 30 mg/mL de bioetanol na fermentação com o mesmo micro-organismo e 10% de melaço de cana.

5.3.1.3.1. Produtividade

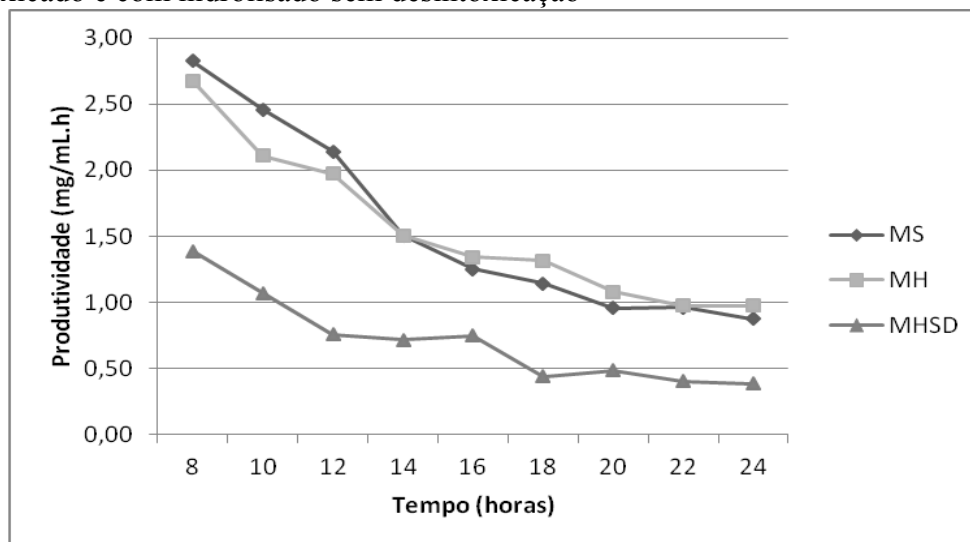
De acordo com a figura 19, em todos os meios utilizados a produtividade de bioetanol foi maior nas primeiras 24 horas. Tanto o meio de cultura quanto o tempo tiveram influência significativa na produtividade ($p = 0,005$ e $0,000$, respectivamente), no qual o tempo de 24 horas teve maior produtividade. Esta redução de produção e produtividade de bioetanol pode ter ocorrido devido à produção de outros compostos, como levana e sorbitol (ERNANDES, 2009). As maiores produtividades foram 1,06; 0,6 e 0,18, nos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente.

Figura 19: Produtividade de bioetanol da bactéria *Zymomonas mobilis* nos tempos de 24, 48 e 72 horas nos meios semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação



A figura 20 mostra a produtividade de bioetanol no experimento com 24 horas de fermentação. Pode-se observar que a produtividade foi maior em 8 horas para todos os meios de cultivo utilizados e com o decorrer do tempo a produtividade reduziu. As maiores produtividades foram 2,83; 2,68 e 1,39 nos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente.

Figura 20: Produtividade de bioetanol da bactéria *Zymomonas mobilis* nos tempos de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas nos meios semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação



Behera, Mohanty, Ray (2010), compararam produção de bioetanol entre *Z. mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em hidrolisado de flor de mahula. As condições utilizadas foram pH 6,5, temperatura de 30°C por 96 horas de fermentação. A produtividade apresentada neste trabalho foi de 0,25 e 0,21 g/L.h para *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, respectivamente, mostrando que foi maior que o presente trabalho. Esta diferença pode ser pela quantidade de substrato utilizado que foi o dobro do presente trabalho.

No estudo de Davis et al. (2006) observaram que utilizando-se resíduo industrial de milho no meio de cultivo, a bactéria *Z. mobilis* teve maior produtividade, produção de bioetanol e rendimento quando comparado com a *S. cerevisiae*. Além disto quando utilizaram uma cepa de *Z. mobilis* mutante a produtividade aumentou de 3,8 para 13,4 mg/mL.h.

5.3.2. *Candida tropicalis* – Fermentação em 72 horas – Planejamento Fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial para se conhecer melhor o comportamento da levedura *C. tropicalis*, que resultou em 8 experimentos em triplicata e três repetições no ponto central, totalizando 27 experimentos. Neste planejamento variou-se a temperatura (25; 30 e 35 °C); o pH (5,5; 6 e 6,5), a velocidade de agitação (0; 75 e 150 rpm), a

concentração de substrato (5; 7,5 e 10 %) e o tempo (24; 48 e 72 horas). Os resultados obtidos de crescimento celular (biomassa), bioetanol; produtividade de bioetanol e os níveis aplicados para cada corrida nos meios MS, MH e MHSD podem ser observados nas tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5: Médias de biomassa, bioetanol e produtividade dos experimentos realizados em triplicata e suas variáveis em meio semissintético com xilose

Experimento	Níveis					Bioetanol (mg/mL)	Produtividade (mg/mL.h)	Biomassa (g)
	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)	[Substrato] (%)	Tempo (h)			
1	25	6,5	0	5	72	21,2	0,29	0,12
2	25	5,5	0	10	24	9,6	0,40	0,12
3	25	5,5	150	5	72	11,0	0,15	0,81
4	25	6,5	150	10	24	8,7	0,36	0,40
5	35	6,5	0	5	24	21,8	0,91	0,12
6	35	5,5	0	10	72	9,1	0,13	0,32
7	35	5,5	150	5	24	16,6	0,69	0,55
8	35	6,5	150	10	72	9,7	0,13	0,64
9*	30	6	75	7,5	48	21,6	0,45	0,31

*Ponto central.

Tabela 6: Médias de biomassa, bioetanol e produtividade dos experimentos realizados em triplicata e suas variáveis em meio com hidrolisado desintoxicado

Experimento	Níveis					Bioetanol (mg/mL)	Produtividade (mg/mL.h)	Biomassa (g)
	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)	[Substrato] (%)	Tempo (h)			
1	25	6,5	0	5	72	10,8	0,15	1,18
2	25	5,5	0	10	24	30,2	1,26	0,35
3	25	5,5	150	5	72	8,7	0,12	1,77
4	25	6,5	150	10	24	26,4	1,10	1,15
5	35	6,5	0	5	24	16,1	0,67	0,09
6	35	5,5	0	10	72	26,2	0,36	0,12
7	35	5,5	150	5	24	11,8	0,49	0,62
8	35	6,5	150	10	72	18,8	0,26	1,50
9*	30	6	75	7,5	48	12,0	0,25	0,88

*Ponto central.

Tabela 7: Médias de biomassa, bioetanol e produtividade dos experimentos realizados em triplicata e suas variáveis em meio com hidrolisado sem desintoxicação

Experimento	Níveis					Bioetanol (mg/mL)	Produtividade (mg/mL.h)	Biomassa (g)
	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)	[Substrato] (%)	Tempo (h)			
1	25	6,5	0	5	72	12,1	0,17	1,41
2	25	5,5	0	10	24	33,7	1,41	0,68
3	25	5,5	150	5	72	11,9	0,17	2,13
4	25	6,5	150	10	24	29,5	1,23	1,40
5	35	6,5	0	5	24	15,7	0,66	0,14
6	35	5,5	0	10	72	38,1	0,53	0,48
7	35	5,5	150	5	24	12,9	0,54	0,53
8	35	6,5	150	10	72	25,1	0,35	1,30
9*	30	6	75	7,5	48	14,5	0,30	0,82

*Ponto central.

5.3.2.1. Crescimento Celular (Biomassa)

O inóculo inicial para todos os ensaios foi de 0,07 g de células da levedura. As quantidades finais de biomassa de cada fermentação com o meio de cultura semissintético podem ser observadas na tabela 5. Os fatores que influenciaram significativamente na biomassa foram velocidade de agitação ($p = 0,000$), pH ($p = 0,000$) e tempo ($p = 0,000$).

As melhores variáveis para o meio de cultura semissintético foram concentração de substrato 5 % (m/v); agitação 150 rpm, temperatura 35 °C; pH 5,5 e 72 horas de fermentação. A maior produção de biomassa (0,81 g) foi nas mesmas condições citadas anteriormente, com exceção da temperatura. Como pode ser observado na tabela 5 não há esta combinação de variáveis no planejamento fatorial, por isto a temperatura em que ocorreu maior crescimento celular é de 25 °C.

Todas as variáveis independentes tiveram influência significativa, quando se empregou o meio de cultura com hidrolisado desintoxicado, no qual as melhores condições para formação de biomassa foram concentração de substrato 5 % (m/v); agitação 150 rpm, temperatura 25°C; pH 6,5 e 72 horas de fermentação. Contudo, na tabela 6 pode ser observado que o maior crescimento celular (1,77 g) foi em pH 5,5. Esta diferença pode ter a mesma explicação do que ocorreu com o meio de cultura semissintético, uma vez que não há esta combinação no planejamento fatorial.

As variáveis que tiveram influência significativa para o meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação foram velocidade de agitação ($p = 0,000$); tempo ($p = 0,000$); e temperatura ($p = 0,000$). As melhores condições para produção de biomassa neste meio foram as mesmas condições citadas para o meio hidrolisado desintoxicado. Como pode ser observado na tabela 7 o maior crescimento celular foi de 2,13 g.

Em todos os meios de cultura utilizados as maiores produções de biomassa foram no mesmo experimento (experimento 3 das tabelas 5; 6 e 7). No trabalho de Jamaí et al. (2007) observaram que a produção de biomassa da levedura *C. tropicalis* em meio de cultura contendo amido foi próxima à produção de *S. cerevisiae* e de *Shwanniomyces occidentalis*. Neste trabalho as condições utilizadas foram parecidas com o presente trabalho.

No estudo de Martín et al. (2010) determinaram a taxa de crescimento específico da levedura *C. tropicalis* em auto-hidrolisado de podas de oliveira. Obtiveram que a produção de biomassa foi 51 % maior em meio de cultura com pH 5,5 quando comparado em pH 6,5. O mesmo ocorreu no presente trabalho, o qual o crescimento celular foi maior em meio de cultura com pH inicial 5,5.

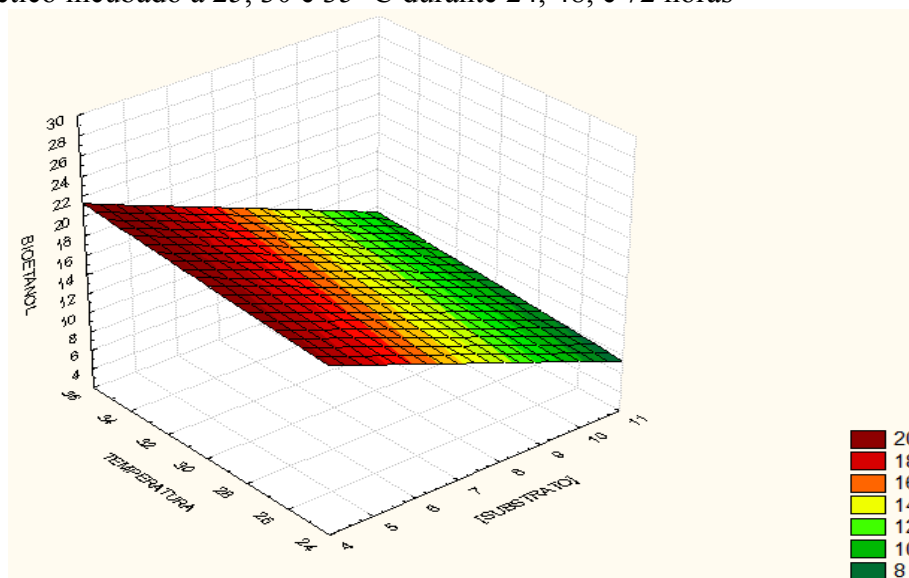
5.3.2.2. Produção de Bioetanol

As produções de bioetanol de cada experimento do planejamento fatorial dos meios de cultura semissintético; com hidrolisado desintoxicado; e com hidrolisado sem desintoxicação podem ser observados nas tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

A maior produção de bioetanol com a levedura *C. tropicalis* no meio de cultura semissintético foi de 21,8 mg/mL (experimento 5) nas condições de 35 °C; pH 6,5; sem agitação; 5 % (m/v) de concentração de substrato em 24 horas de fermentação. Com exceção do tempo e do pH que foram os mesmos, para a menor produção de bioetanol (8,7 mg/mL – experimento 4) as condições foram 25 °C, 150 rpm e 10 % (m/v) de concentração de substrato. A concentração de substrato foi a única variável independente que obteve diferença significativa ($p = 0,000$) na produção de bioetanol em meio de cultura semissintético. As interações desta variável com as outras variáveis temperatura; pH; velocidade de agitação e tempo podem ser observadas nas superfícies de respostas

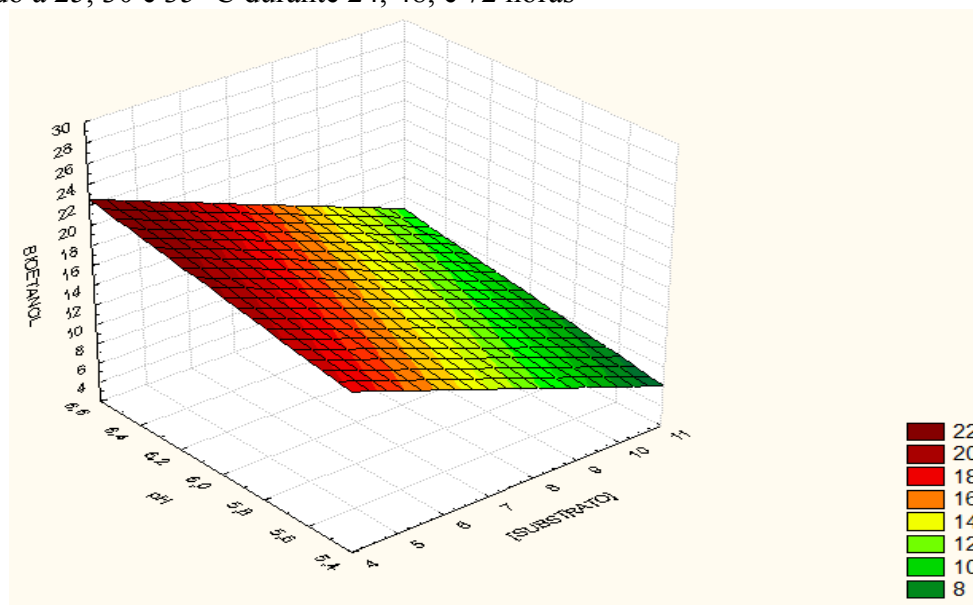
representadas pelas figuras 21; 22; 23 e 24, respectivamente.

Figura 21: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis temperatura e concentração de substrato em meio semissintético incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



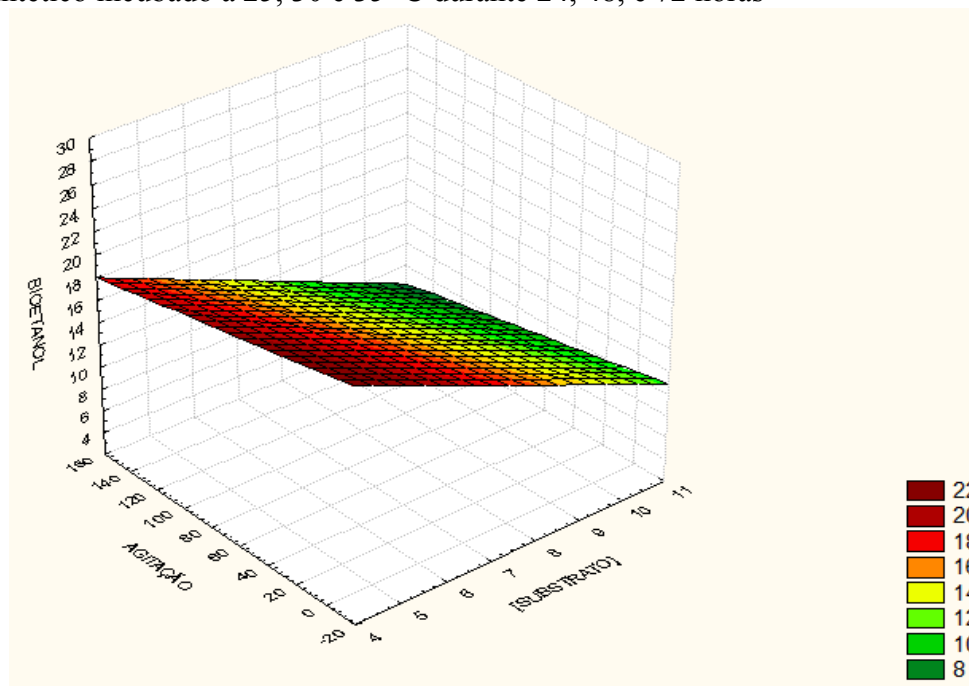
Bioetanol - mg/mL; Temperatura - °C; Concentração de Substrato - % (m/v)

Figura 22: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis pH e concentração de substrato em meio semissintético incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



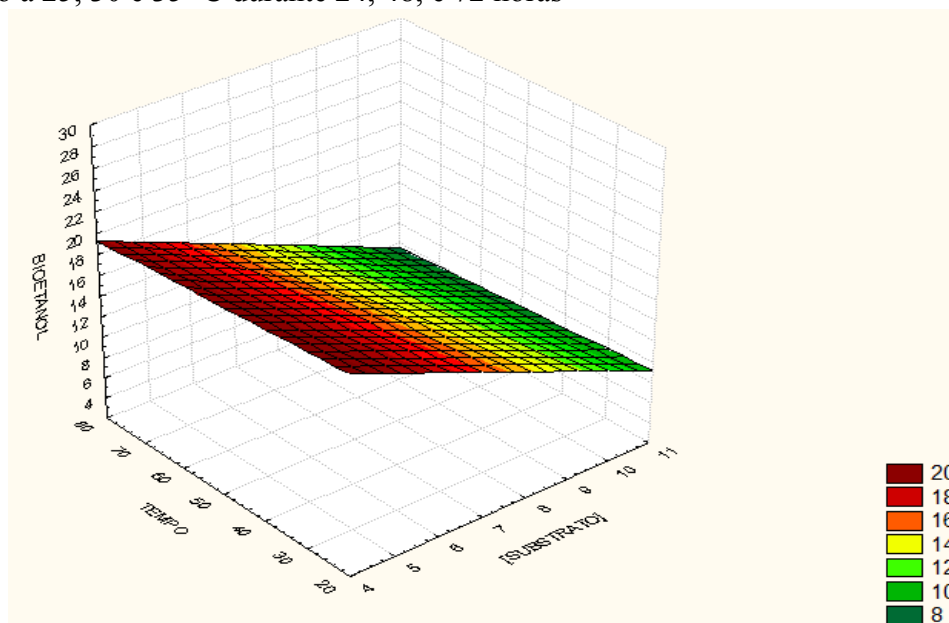
Bioetanol - mg/mL; Concentração de Substrato - % (m/v)

Figura 23: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis agitação e concentração de substrato em meio semissintético incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



Bioetanol - mg/mL; Agitação – rpm; Concentração de Substrato - % (m/v)

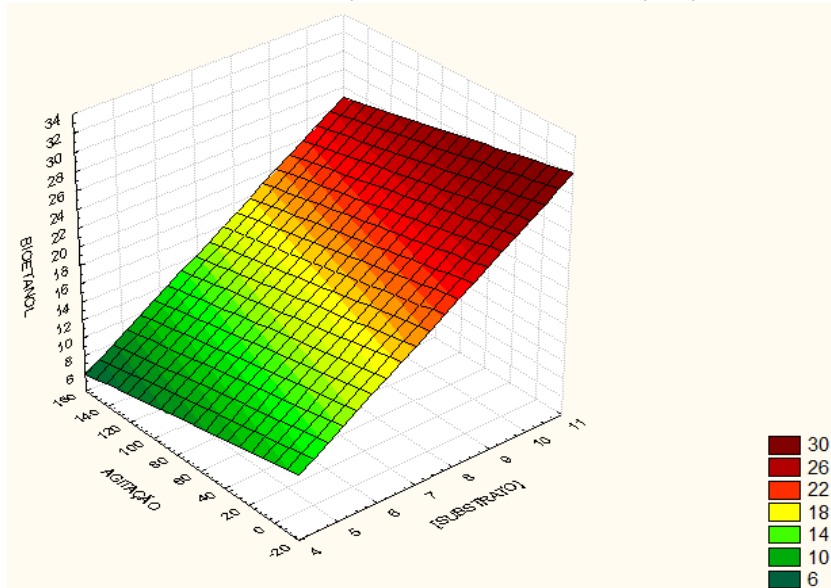
Figura 24: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis tempo e concentração de substrato em meio semissintético incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



Bioetanol - mg/mL; Tempo – horas; Concentração de Substrato - % (m/v)

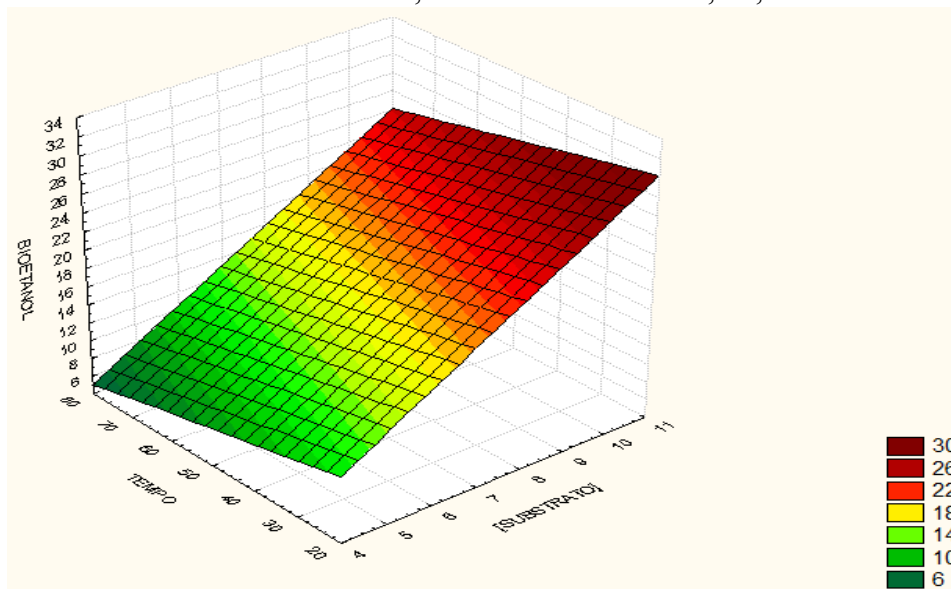
A maior produção de bioetanol com a levedura *C. tropicalis* em meio de cultura com hidrolisado desintoxicado foi de 30,2 mg/mL (experimento 2) nas condições de 25 °C; pH 5,5; sem agitação; 10 % (m/v) de concentração de substrato em 24 horas de fermentação. Com exceção da e do pH, a menor produção de bioetanol (8,7 mg/mL – experimento 3) foi com velocidade de agitação de 150 rpm, 5 % de concentração de substrato em 72 horas de fermentação. As variáveis independentes que influenciaram significativamente na produção de bioetanol foram concentração de substrato ($p = 0,000$); velocidade de agitação ($p = 0,000$); e tempo ($p = 0,000$). As interações entre as variáveis que tiveram influência significativa podem ser observadas nas superfícies de respostas representadas pelas figuras 25; 26 e 27.

Figura 25: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis agitação e concentração de substrato em meio com hidrolisado desintoxicado incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



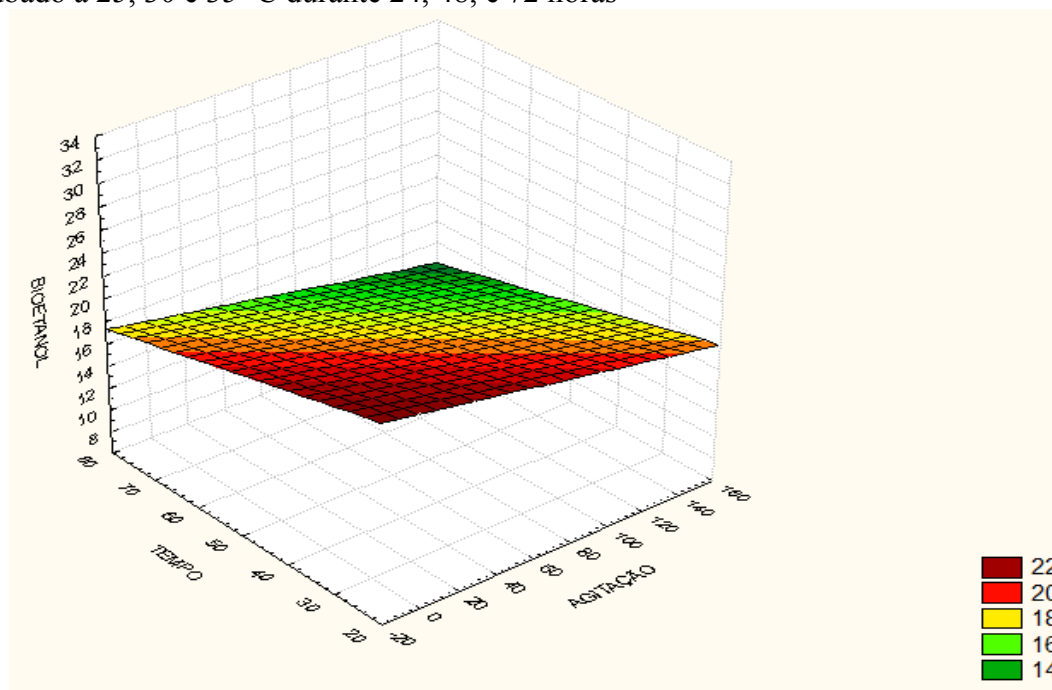
Bioetanol - mg/mL; Agitação – rpm; Concentração de Substrato - % (m/v)

Figura 26: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis tempo e concentração de substrato em meio com hidrolisado desintoxicado incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



Bioetanol - mg/mL; Tempo - horas; Concentração de Substrato - % (m/v)

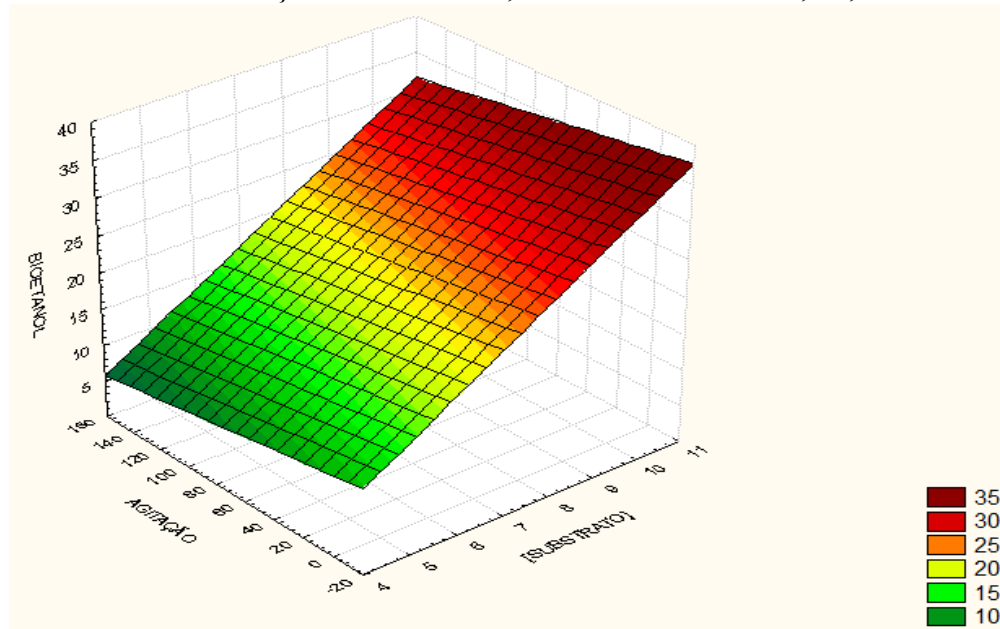
Figura 27: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis tempo e agitação em meio com hidrolisado desintoxicado incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



Bioetanol - mg/mL; Tempo - horas; Agitação - rpm

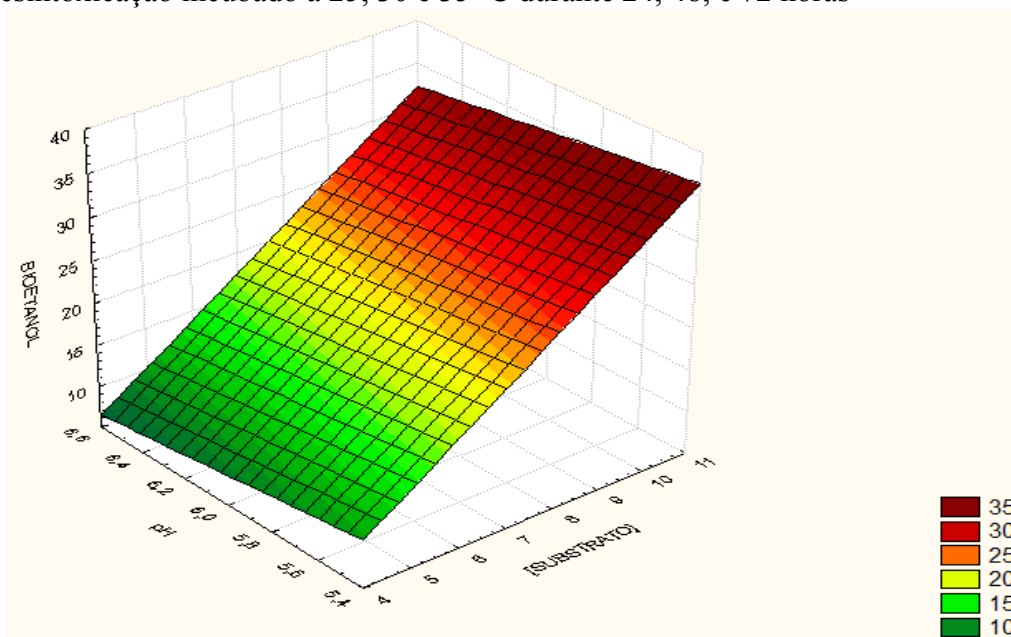
A maior produção de bioetanol com a levedura *C. tropicalis* em meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação foi de 38,1 mg/mL (experimento 6) nas condições de 35 °C; pH 5,5; sem agitação; 10 % (m/v) de concentração de substrato em 72 horas de fermentação. Com exceção da temperatura e do pH, a menor produção de bioetanol (8,7 mg/mL – experimento 3) foi com velocidade de agitação de 150 rpm, 5 % de concentração de substrato em 72 horas de fermentação. Variando-se apenas a temperatura, obteve-se uma produção de 33,7 mg/mL de bioetanol num menor tempo de fermentação (24 horas). As variáveis independentes que influenciaram significativamente na produção de bioetanol foram concentração de substrato ($p = 0,000$); velocidade de agitação ($p = 0,000$); e pH ($p = 0,017$). As interações entre as variáveis que tiveram influência significativa podem ser observadas nas superfícies de respostas representadas pelas figuras 28; 29 e 30.

Figura 28: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis agitação e concentração de substrato em meio com hidrolisado sem desintoxicação incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



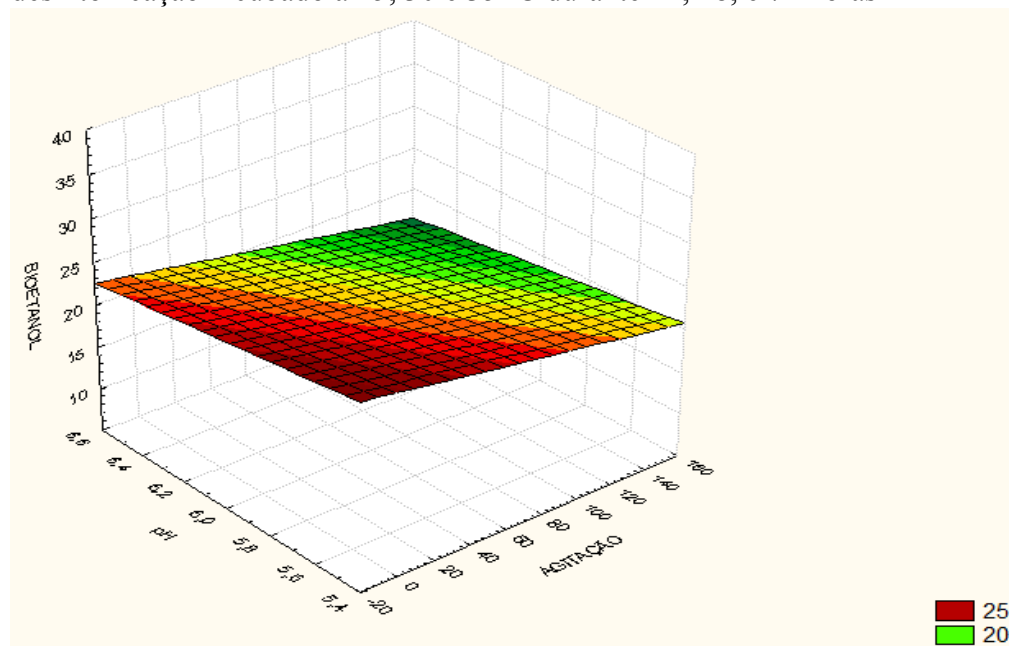
Bioetanol - mg/mL; Temperatura - °C; Concentração de Substrato - % (m/v)

Figura 29: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis pH e concentração de substrato em meio com hidrolisado sem desintoxicação incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



Bioetanol – mg/mL; Concentração de Substrato - % (m/v)

Figura 30: Superfície de resposta para produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* utilizando as variáveis pH e agitação em meio com hidrolisado sem desintoxicação incubado a 25, 30 e 35 °C durante 24, 48, e 72 horas



Bioetanol - mg/mL; Agitação - rpm

A velocidade de agitação foi a única variável que não se alterou para obtenção das maiores produções de bioetanol nos três meios de cultura utilizados no planejamento fatorial, o qual foi melhor em experimento estático. Pode-se observar que quando a velocidade de agitação foi de 150 rpm, para a produção de bioetanol, em todos os meios de cultura esta produção foi a menor de todos os experimentos. Já para o crescimento celular a agitação foi um fator positivo, uma vez que a maior produção de biomassa foi com velocidade de agitação de 150 rpm. Isto indica que quando aplicado agitação, esta levedura prefere crescer e/ou produzir outro bioproduto.

Em estudos de Jamai et al. (2007), a produção de bioetanol em meio contendo amido foi de 16,5 mg/ml. Quando o amido foi hidrolisado esta produção quase dobrou, mostrando que é necessário hidrolisar o substrato para que fique mais acessível ao micro-organismo.

A concentração de substrato teve influência significativa nos três meios de cultura utilizados para a produção de bioetanol. Em meio de cultura semissintético a maior produção de bioetanol foi em concentração de 5 % (m/v), já nos meios utilizando-se os hidrolisados, as maiores produções de bioetanol foram em 10 % (m/v) de concentração de substrato. Provavelmente foi necessário uma concentração maior de hidrolisado para a fermentação, uma vez que o hidrolisado possui outras substâncias além dos açúcares.

Segundo o trabalho de Carrion (2011) a levedura *C. tropicalis* consegue assimilar outros tipos de açúcares presentes nos hidrolisados. Em seu trabalho, o autor obteve consumo quase total dos açúcares presentes em liquor negro em 72 horas de fermentação. Estes açúcares eram xilose, glicose, galactose e arabinose, os quais foram convertidos em xilitol e etanol.

De acordo com Cassales (2010) quando a xilose atinge certo nível de concentração e ocorre aumento de oxigenação, o micro-organismo opta por consumir o etanol já produzido como sua principal fonte de carbono.

Quando o meio de cultivo está em condições aeróbias, alguns micro-organismos preferem converter grande parte da xilose a xilitol (WALFRIDSSON et al, 1995 apud CASSALES, 2010). Isto pode ter ocorrido no presente trabalho, já que para os três meios de cultivo utilizados, a maior produção de bioetanol foi nos experimentos no qual não

aplicou-se agitação. Entretanto não foi confirmado presença de xilitol nas fermentações do presente trabalho.

5.3.2.3. Produtividade

As produtividades de bioetanol de cada experimento do planejamento fatorial dos meios de cultura semissintético; com hidrolisado desintoxicado; e com hidrolisado sem desintoxicação podem ser observados nas tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

A maior produtividade de bioetanol para o meio de cultura semissintético foi de 0,91 mg/mL.h (experimento 5), o qual as melhores condições foram 5 % (m/v) de concentração de substrato; sem agitação; 35°C; pH 6,5 em 24 horas de fermentação. As variáveis que tiveram significância foram concentração de substrato ($p = 0,000$), temperatura ($p = 0,000$) e tempo ($p = 0,000$).

A maior produtividade de bioetanol para o meio de cultura com hidrolisado desintoxicado foi de 1,26 mg/mL.h (experimento 2), o qual as melhores condições foram 10% (m/v) de concentração de substrato; sem agitação; 25°C; pH 5,5 em 24 horas de fermentação. As variáveis que tiveram significância foram tempo ($p = 0,000$) velocidade de agitação ($p = 0,022$); concentração de substrato ($p = 0,000$); e temperatura ($p = 0,000$).

A maior produtividade de bioetanol para o meio de cultura com hidrolisado desintoxicado foi de 1,41 mg/mL.h (experimento 2), o qual as melhores condições foram 10% (m/v) de concentração de substrato; sem agitação; 25°C; pH 5,5 em 24 horas de fermentação. As variáveis que tiveram significância foram tempo ($p = 0,000$) velocidade de agitação ($p = 0,000$); concentração de substrato ($p = 0,000$); e temperatura ($p = 0,000$).

A produtividade encontrada no trabalho de Jamai et al. (2007) com a levedura *C. tropicalis* foi menor que a do presente trabalho, que foi pouco mais de 176 % maior. No trabalho de Oberoi et al. (2010) obtiveram produtividade de bioetanol de 0,57 mg/mL.h em hidrolisado de palha de arroz com a levedura *C. tropicalis*. De acordo com o observado na literatura, a produtividade de bioetanol do presente trabalho com a levedura *C. tropicalis* foi maior nos três meios de cultura utilizados.

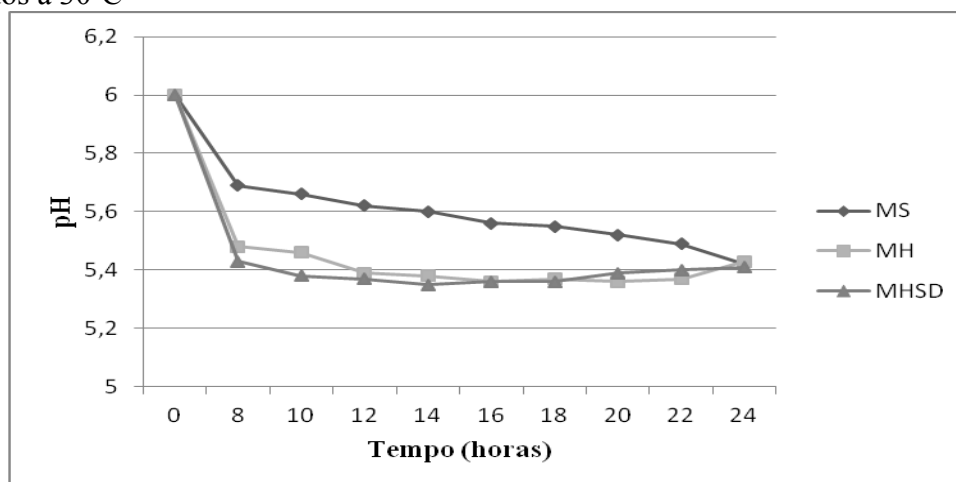
5.3.3. *Candida tropicalis* - Fermentação em 24 horas

Assim como para a bactéria *Z. mobilis*, foram realizados experimentos com a levedura *C. tropicalis* empregando-se as mesmas condições que foram utilizadas para a bactéria, para verificar sua produção de bioetanol, o crescimento celular (biomassa) e a produtividade de bioetanol. As condições aplicadas foram pH inicial 6; 30 °C; 5 % (m/v) de concentração do substrato, sem agitação, nos tempos de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas

5.3.3.1. pH

O pH inicial da fermentação com a levedura *C. tropicalis* foi 6. A figura 31 mostra o declínio do pH com o decorrer do tempo de fermentação dos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação. Pode-se observar que no meio de cultura semissintético, houve um declínio regular, o qual o pH final foi de 5,42. Inicialmente o pH do meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação teve uma maior redução no pH até 12 horas de fermentação, posterior este tempo, os dois meios de cultura utilizando o hidrolisado tiveram variações próximas no pH. Ao final das 24 horas de fermentação o pH final dos meios de cultura com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação foram 5,43 e 5,41, respectivamente.

Figura 31: pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30°C

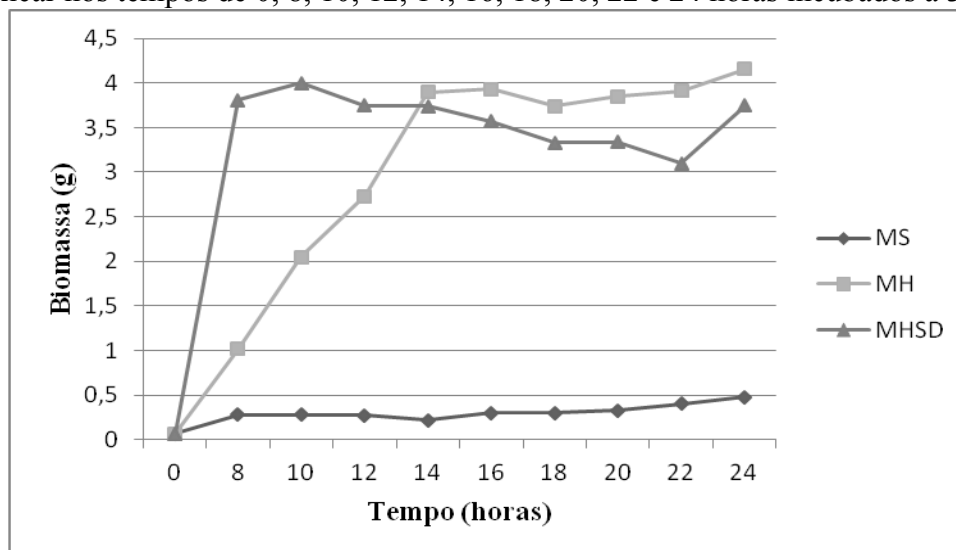


5.3.3.2. Crescimento Celular (Biomassa)

O inóculo inicial da levedura *C. tropicalis* nas fermentações utilizando-se os meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação foi de 0,07 g. A figura 32 mostra o crescimento desta levedura nos três meios utilizados. Como pode ser observado nesta figura, a levedura teve maiores crescimentos nos meios com os dois hidrolisados. Assim como ocorrido com a bactéria *Z. mobilis*, houve uma queda do pH dos meios de cultura juntamente com o aumento de biomassa. No meio de cultura semissintético o crescimento celular foi menor quando comparado com os outros meios de cultura utilizados, assim houve uma menor queda no pH deste meio.

No meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação ocorreu um aumento na concentração da biomassa nas primeiras 8 horas de fermentação e entre 10 e 22 horas houve uma redução na biomassa, o qual voltou a aumentar posterior 22 horas de fermentação. No meio de cultura com hidrolisado desintoxicado houve aumento do crescimento celular até 14 horas de fermentação e depois este tempo houve pequenas variações no crescimento da levedura. No meio de cultura semissintético a produção de biomassa foi baixa e com pouca variação. As quantidades de biomassa final foram de 0,48g; 4,16g; e 3,75 g nos meios semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente.

Figura 32: Crescimento celular (biomassa) da levedura *Candida tropicalis* durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30 °C

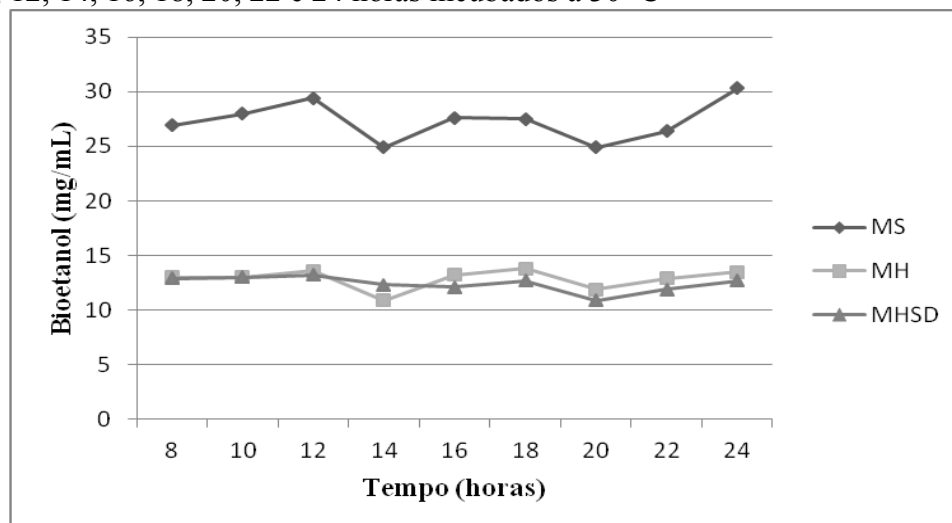


5.3.3.3. Produção de Bioetanol

As produções de bioetanol nos meios de fermentação semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação podem ser observadas na figura 33. Nesta figura mostra que ocorreu o contrário do crescimento celular, já que o a maior produção de bioetanol foi em meio de cultura semissintético. Neste meio a maior produção foi de 30,3 mg/mL em 24 horas de fermentação, entretanto com a metade do tempo (12 horas) houve uma produção de 29,4 mg/mL.

Para o meio de cultura com hidrolisado desintoxicado a maior produção foi de 13,8mg/mL em 18 horas de fermentação. No tempo de 8 horas a produção foi próxima a maior produção neste meio de cultura (13,0 mg/mL). Já para o meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação a maior produção foi de 13,2 mg/mL em 12 horas de fermentação, contudo após 8 horas de fermentação a produção de bioetanol foi de 12,9mg/mL, produção esta, próxima a maior produção deste meio de cultura. A produção de bioetanol para os dois meios com hidrolisado foram próximos no decorrer do tempo de fermentação. Como dito anteriormente, é provável que a levedura *C. tropicalis* preferiu crescer nos meios utilizando os hidrolisados e/ou produzir outro bioproduto.

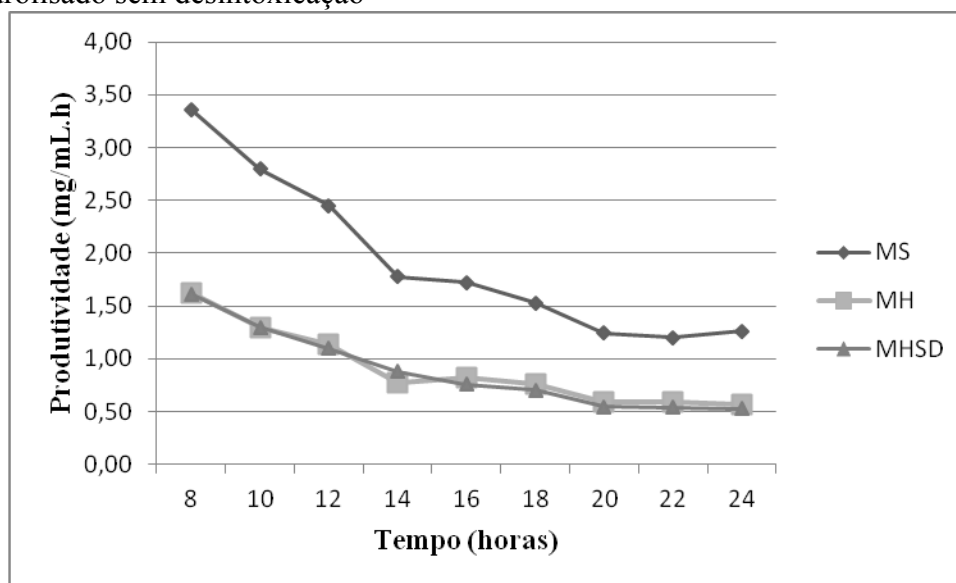
Figura 33: Produção de bioetanol pela levedura *Candida tropicalis* em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação, nos tempos de 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas incubados a 30 °C



5.3.3.4. Produtividade

A figura 34 mostra a produtividade de bioetanol nos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação. Assim como para a produção de bioetanol, a produtividade de bioetanol para os dois meios com o hidrolisado foram próximas. Em todos os meios utilizados houve uma redução gradativa com o decorrer do tempo e para todos os meios a maior produtividade foi em 8 horas de fermentação com 3,36 mg/mL.h; 1,63 mg/mL.h; e 1,61 mg/mL.h nos meios semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação, respectivamente.

Figura 34: Produtividade de bioetanol da levedura *C. tropicalis* nos tempos de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas nos meios semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação



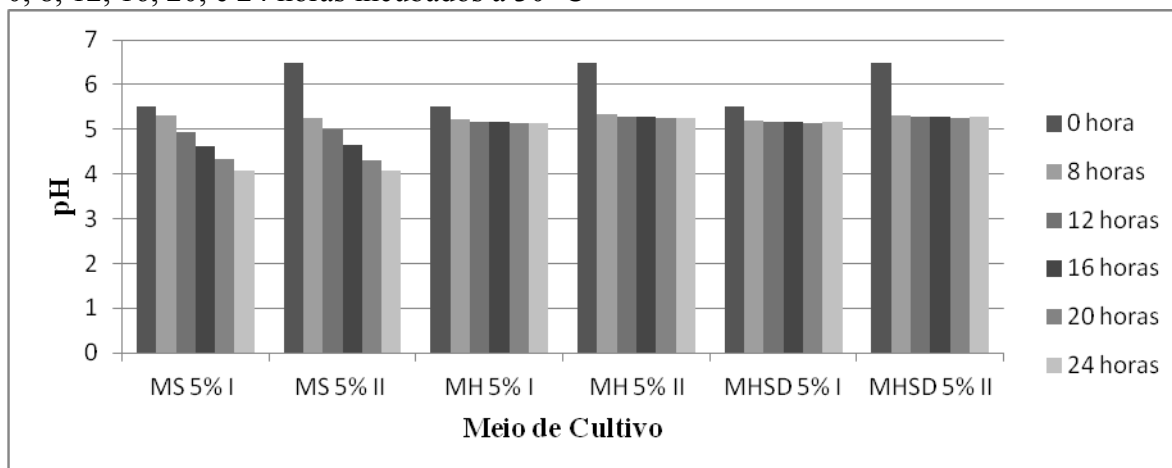
5.4. Consórcio

Neste experimento foram utilizadas as melhores condições observadas nas fermentações com a bactéria *Z. mobilis* e a levedura *C. tropicalis*. Para isto, foram utilizadas condições de 30 °C; 5 e 10 % (m/v) de concentração de substrato; pH 5,5 e 6,5; sem agitação nos tempos de 8, 12, 16, 20 e 24 horas de fermentação.

5.4.1. pH

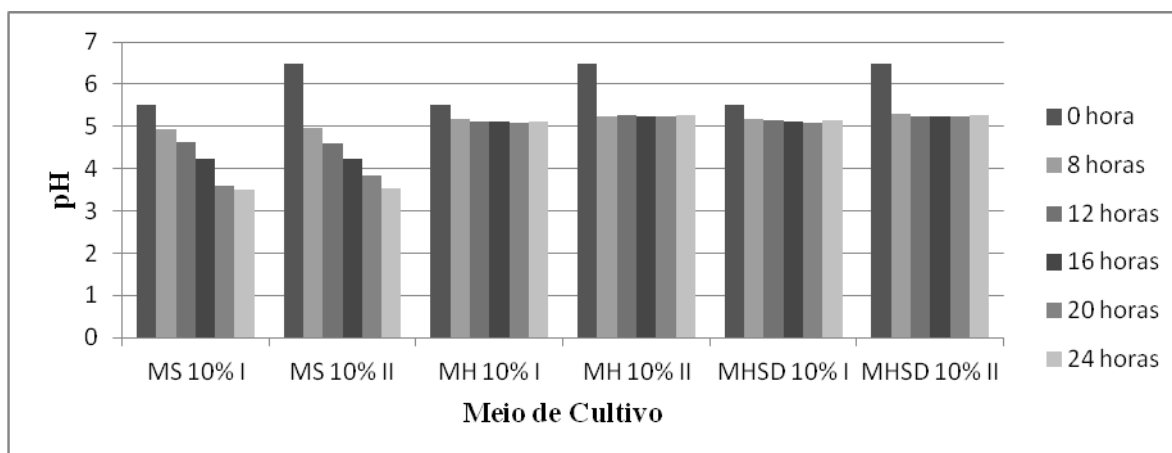
Os pHs iniciais da fermentação do consórcio com a bactéria *Z. mobilis* e a levedura *C. tropicalis* foi 5,5 e 6,5. Nas figuras 35 e 36 pode-se observar a redução do pH dos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação. Para o meio de cultura semissintético houve uma redução gradativa, já para os meios de cultura utilizando-se os hidrolisados, ocorreu uma redução no pH nas primeiras 8 horas de fermentação e com o decorrer do tempo houve pequenas variações. A maior redução de pH (3,51) foi em meio de cultura semissintético com 10 % (m/v) de concentração de substrato em pH 5,5. Esta redução do pH pode ser devido a formação de produtos como o etanol.

Figura 35: pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 5 % (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20, e 24 horas incubados a 30 °C



I - pH 5,5; II- pH 6,5; 5 % (m/v) de concentração de substrato.

Figura 36: pH final dos meios de fermentação semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 10 % (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20, e 24 horas incubados a 30 °C



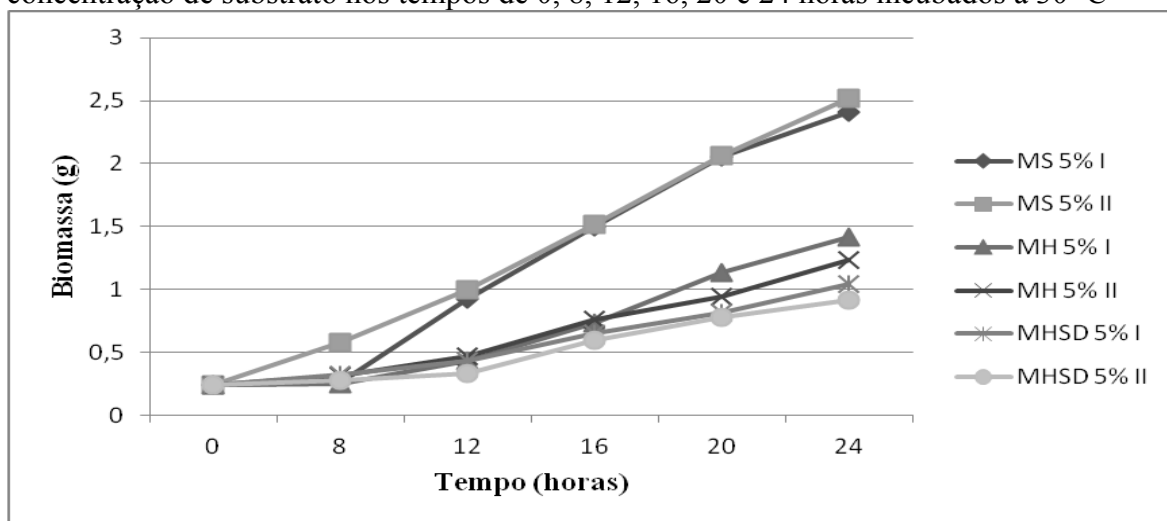
I - pH 5,5; II- pH 6,5; 10 % (m/v) de concentração de substrato.

5.4.2. Crescimento Celular (Biomassa)

O inóculo inicial da fermentação do consórcio com a bactéria *Z. mobilis* e a levedura *C. tropicalis* foi de 0,17 g e 0,07 g, respectivamente, totalizando 0,24 g de inóculo inicial. Pode-se observar nas figuras 37 e 38 que em todos os meios utilizados houve um aumento da biomassa. O maior crescimento celular (4,34 g) foi no meio de cultura

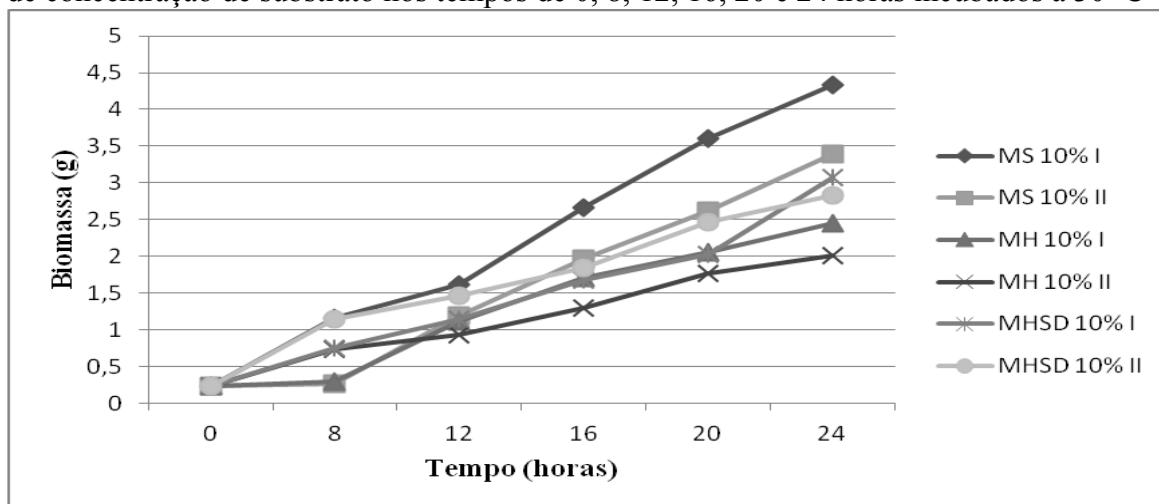
semissintético com 10 % (m/v) de concentração de substrato, pH 5,5 em 24 horas de fermentação. Para o crescimento celular as variáveis que tiveram influência significativa foram concentração de substrato ($p = 0,000$) e o tempo ($p = 0,000$). Isto mostra que para produção de biomassa com o consórcio as melhores condições são 10 % (m/v) de concentração de substrato e em 24 horas de fermentação. Como o pH não teve influência significativa, pode-se utilizar tanto o pH 5,5 quanto o pH 6,5.

Figura 37: Crescimento celular (biomassa) do consórcio durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar com 5 % (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30 °C



I - pH 5,5; II- pH 6,5; 5 % (m/v) de concentração de substrato.

Figura 38: Crescimento celular (biomassa) do consórcio durante a fermentação dos meios semissintético; hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicar com 10 % (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30 °C



I - pH 5,5; II- pH 6,5; 10 % (m/v) de concentração de substrato.

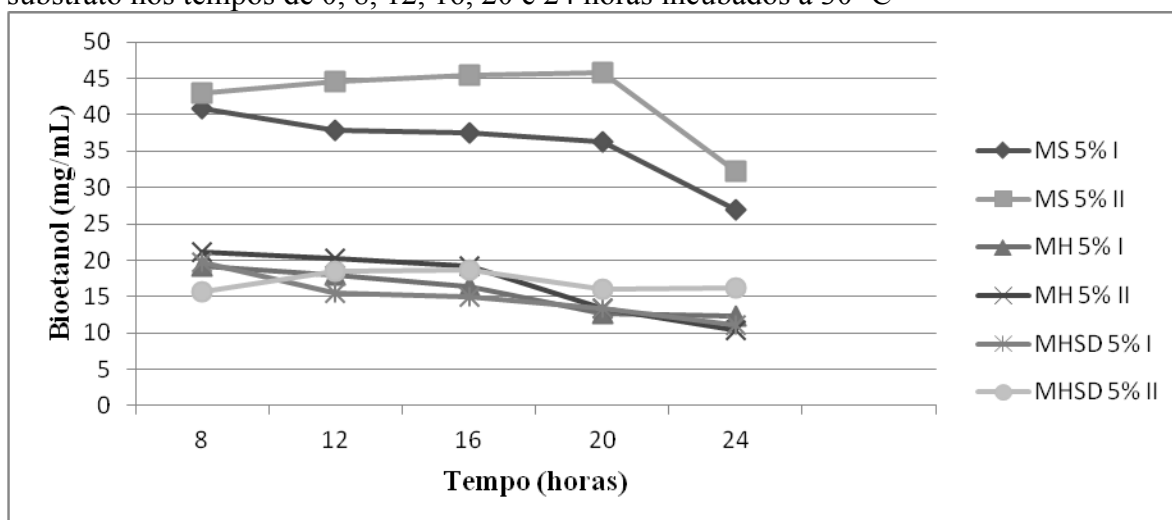
No trabalho de Cassales (2010) utilizando hidrolisado ácido de casca de soja, o crescimento celular dos três consórcios realizados obtiveram crescimentos próximos ao presente trabalho, o qual variou entre 4,3 e 5 g de biomassa. Os consórcios aplicados neste estudo foram utilizando os micro-organismos *S. cerevisiae*; *Z. mobilis* e algumas espécies do gênero *Candida*, dentre elas a *C. tropicalis*.

5.4.3. Produção de Bioetanol

A produção de bioetanol pelo consórcio com *Z. mobilis* e *C. tropicalis* nos meios de cultura semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação pode ser observada nas figuras 39 e 40. A maior produção de bioetanol foi de 47,7mg/mL em meio de cultura com hidrolisado desintoxicado com 10 % (m/v) de concentração de substrato, pH 6,5 em 8 horas de fermentação. A menor produção de 10,3mg/mL em meio de cultura com hidrolisado desintoxicado com 5 % (m/v) de concentração de substrato, pH 6,5 em 24 horas de fermentação. O meio de cultivo com hidrolisado desintoxicado obteve a maior e a menor produção de bioetanol, modificando-se apenas as variáveis concentração de substrato e tempo. Apenas a concentração de substrato teve influência significativa ($p = 0,000$) para a produção de bioetanol. Isto mostra que para

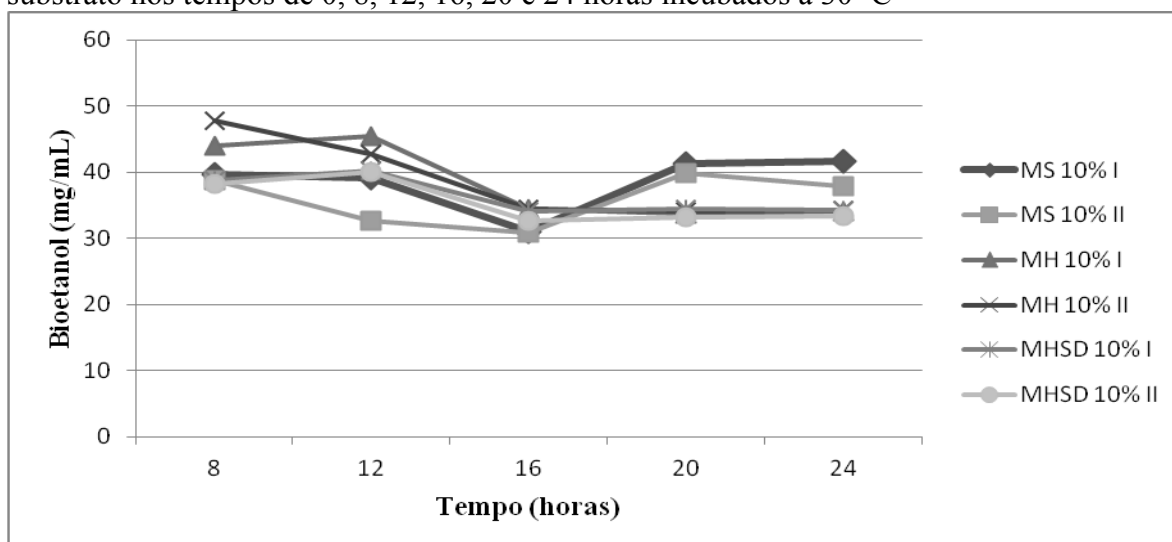
se obter maior produção de bioetanol com o consórcio, deve-se utilizar 10 % (m/v) de concentração de substrato.

Figura 39: Produção de bioetanol pelo consórcio em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 5% (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30 °C



I - pH 5,5; II- pH 6,5; 5 % (m/v) de concentração de substrato

Figura 40: Produção de bioetanol pelo consórcio em meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 10% (m/v) de concentração de substrato nos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 horas incubados a 30 °C



I - pH 5,5; II- pH 6,5; 10 % (m/v) de concentração de substrato

Bem como no estudo de Patle e Lal (2008) que utilizaram os mesmos micro-

organismos que o presente trabalho para produção de bioetanol em hidrolisado ácido de thippi, os autores obtiveram produção maior de bioetanol quando comparado aos micro-organismos isoladamente.

No trabalho de Hichert et al. (2013) o emprego do consórcio com *S. cerevisiae* e *Candida shehatei* proporcionou alta taxa de conversão de xilose e glicose, presentes em hidrolisado ácido de casca de arroz, a bioetanol. Assim como o presente trabalho, os autores obtiveram maior produção de bioetanol em meio de cultura com o hidrolisado de casca de arroz do que em meio de cultura sintético.

No estudo de Suriyachai et al. (2013) empregaram o consórcio com *S. cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis* em hidrolisado enzimático de palha de arroz. A produção máxima de bioetanol obtida com este consórcio foi de 15,2 mg/mL, o qual corresponde 99 % da produção teórica. Quando aumentaram a quantidade de inóculo inicial do consórcio de 4,6 para 10% (m/v), esta produção aumentou para 28,6 mg/mL. As condições utilizadas neste estudo foram próximas ao presente trabalho. Utilizando o mesmo substrato, Das et al. (2013) obtiveram produção máxima de bioetanol próxima ao presente trabalho. Esta produção foi de 40,1 mg/mL com o consórcio com *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*.

Singh, Bajar e Bishnoi (2014), assim como o presente trabalho, verificaram a produção de bioetanol em hidrolisado enzimático de casca de arroz com as leveduras *S. cerevisiae* e *S. stipitis* separadamente e após aplicaram o consórcio. A produção máxima de bioetanol com o consórcio foi de 20,8 mg/mL, resultado menor que o presente trabalho. Esta produção foi 32 % maior que a produção por *S. cerevisiae* e 41 % maior que a produção por *S. stipitis*. Comparando-se as maiores produções do presente trabalho da bactéria *Z. mobilis*, da levedura *C. tropicalis* e do emprego do consórcio em meio de cultura com hidrolisado desintoxicado, a produção de bioetanol foi 55 % maior que a produção com a bactéria e 37 % que a produção com a levedura.

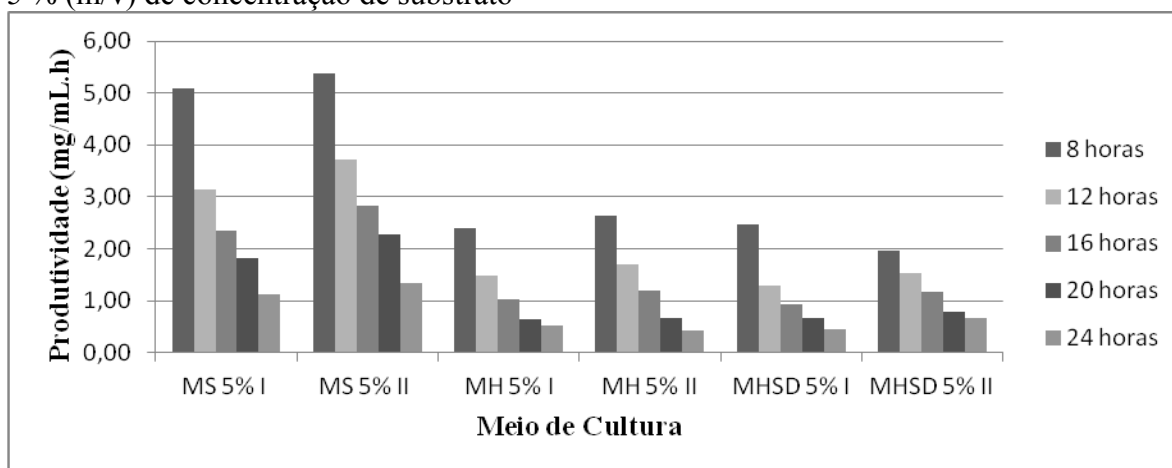
A baixa conversão de xilose a etanol no consórcio pode ser explicada pela baixa tolerância ao etanol das leveduras assimiladoras de xilose, uma vez que ocorre primeiramente o uso da glicose (LAPLACE et al, 1993). Além disto, pode ocorrer formação de mais de um bioproduto na presença de dois ou mais micro-organismos. Isto pode ocorrer, por exemplo, na conversão de xilose a xilitol ao invés de etanol (CASSALES,

2010). No presente trabalho não foi quantificado xilose isoladamente, entretanto em testes realizados com *C. tropicalis* em meio de cultura contendo glicose, mostrou que esta levedura converte glicose em etanol (dados não mostrados).

5.4.3.1. Produtividade

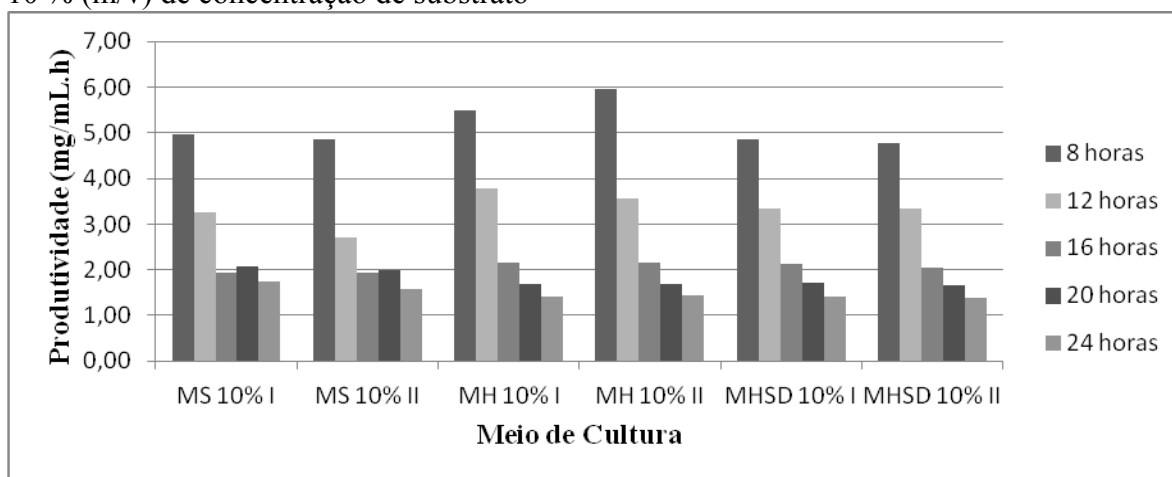
A produtividade de bioetanol nos meios de cultivo semissintético, com hidrolisado desintoxicado e com hidrolisado sem desintoxicação com o consórcio da bactéria *Z. mobilis* e a levedura *C. tropicalis*, pode ser observada nas figuras 41 e 42. Nesta figura pode-se observar que a produtividade de bioetanol em todos os meios e condições empregadas foi maior no tempo de 8 horas. Assim como a produção de bioetanol, a maior produtividade (5,96 mg/mL.h) também foi em meio de cultura com hidrolisado desintoxicado com 10 % (m/v) de concentração de substrato, pH 6,5 em 8 horas de fermentação e a menor produtividade (0,43 mg/mL.h) também foi em meio de cultura com hidrolisado desintoxicado com 5 % (m/v) de concentração de substrato, pH 6,5 em 24 horas de fermentação. As variáveis que tiveram influência significativa foram concentração de substrato ($p = 0,000$) e tempo (0,000). Isto mostra que para obter maior produtividade deve-se utilizar 10 % (m/v) de concentração de substrato em 8 horas de fermentação.

Figura 41: Produtividade de bioetanol do consórcio nos tempos de 8, 12, 16, 20, e 24 horas nos meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 5 % (m/v) de concentração de substrato



I - pH 5,5; II- pH 6,5; 5 % (m/v) de concentração de substrato

Figura 42: Produtividade de bioetanol do consórcio nos tempos de 8, 12, 16, 20, e 24 horas nos meios semissintético, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado sem desintoxicação com 10 % (m/v) de concentração de substrato



I - pH 5,5; II- pH 6,5; 10 % (m/v) de concentração de substrato

Singh, Bajar e Bishnoi (2014) utilizaram 10 % (m/v) de concentração de substrato de hidrolisado enzimático de casca de arroz para produção de bioetanol com *S. cerevisiae* e *S. stipitis*. Em 36 horas de fermentação a produtividade de bioetanol para cada levedura foi de 0,04 mg/mL.h e 0,03 mg/mL.h, respectivamente. Quando os autores empregaram o consórcio com estes dois micro-organismos, a produtividade aumentou para 0,06 mg/mL.h. O mesmo pode ser observado no presente trabalho, no qual houve um aumento de produtividade e esta produtividade foi maior que o trabalho citado.

Singha, Majumder e Ghosh (2014), utilizaram hidrolisado ácido de biomassa de grama para produção de bioetanol com consórcio com a bactéria *Z. mobilis* e a levedura *Pichia stipitis*. Neste trabalho a produtividade em meio de cultura sintético foi maior que o meio de cultura com o hidrolisado. Este resultado foi contrário ao obtido no presente trabalho, o qual a produtividade com o meio de cultura semissintético foi menor que com o meio de cultura com hidrolisado desintoxicado. Neste estudo os autores conseguiram maior produção de bioetanol, quando realizaram o controle da taxa de oxigênio no meio fermentativo.

6. CONCLUSÕES

A hidrólise da casca de soja com 1,5 % (v/v) de ácido sulfúrico foi eficaz na liberação dos açúcares fermentescíveis a serem utilizados como substrato fermentativo.

A desintoxicação mostrou ser necessária para a produção de bioetanol com a bactéria *Z. mobilis*, e foi observado que a presença de compostos tóxicos inibem parcialmente a ação desta bactéria.

Na fermentação de 72 horas com a bactéria as melhores condições para produção de bioetanol foi utilizando-se meio de cultura semissintético em 24 horas. Já na fermentação de 24 horas com a bactéria as melhores foram meio de cultura semissintético em 12 horas.

Na fermentação de 72 horas com a levedura *C. tropicalis*, as melhores condições para produção bioetanol em meio de cultura com hidrolisado sem desintoxicação, 35 °C, pH 5,5, sem agitação, 10 % (m/v) de concentração de substrato em 72 horas de fermentação. Para a fermentação de 24 horas com a levedura as melhores condições foram em meio de cultura semissintético em 24 horas.

O consórcio formado pela bactéria *Z. mobilis* e a levedura *C. tropicalis*, mostrou que as melhores condições para produção de biomassa, bioetanol e produtividade foram meio de cultura semissintético, 10 % (m/v) de concentração de substrato, pH 5,5 em 24 horas; meio de cultura com hidrolisado desintoxicado, 10 % (m/v) de concentração de substrato, pH 6,5 em 8 horas e meio de cultura com hidrolisado desintoxicado, 10 % (m/v) de concentração de substrato, pH 6,5 em 8 horas, respectivamente. O consórcio utilizado foi eficaz no meio de cultura com hidrolisado desintoxicado, obtendo-se maior quantidade de bioetanol em menor tempo.

Sugestões para trabalhos futuros:

1.- Realizar hidrólises com aquecimento nos tempos de 5 e 10 minutos, para verificar se ocorre maiores liberações de açúcares com menor tempo de aquecimento visando redução de custo operacional.

2.- Realizar experimentos com diferentes velocidades de agitação entre 0 e 100 rpm para *C. tropicalis*.

3.- Realizar fermentações com o consórcio inoculando-se no tempo zero a bactéria *Z. mobilis* e após um determinado tempo, inocular a levedura *C. tropicalis*, para que a levedura consuma a xilose ao invés de consumir a glicose, assim não haverá competição do mesmo substrato pelos micro-organismos.

REFERÊNCIAS

AEILING, K.A. et al. Co-fermentation of xylose and celobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **J Ind Microbiol Biotechnol** v. 39, p. 1597–1604, 2012.

ALBANO, M. **Comparação da Produção de Celulases e Xilanases por Fungos Filamentosos em Fermentação Submersa e Estado Sólido**. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2012.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology** v. 101, p. 4851 -4861, 2010.

BAMUFLEH, H. S.; ALHAMED, Y. A.; DAOUS, M. A. Furfural from midribs of date-palm trees by sulfuric acid hydrolysis. **Industrial Crops and Products** v. 42, p. 421 -428, 2013

BAYRAKCI, A. G.; KOÇAR, G. Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 306-316, 2014.

BEHERA, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. **Applied Energy**. v. 87, p. 2352-2355, 2010.

BOEIRA, I. H. N. **Adaptação da levedura *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 ao hidrolisado de casca de soja e avaliação da capacidade de produção de etanol**. 2010. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 237-259, 2008.

CADETE, R. M.; et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS yeast Res.** v. 9, p. 1338-1342, 2009.

CAMILIOS NETO, D. et al. Optimization of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses fermentation. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**. v. 26, n. 1, p. 17-22, 2005.

CARA, C. et al. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 1869-

1876, 2008.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

CARRION, L. M. **Isolamento de leveduras fermentadoras de pentoses e suas aplicações na produção de xilitol e etanol a partir do licor negro proveniente do processo kraft de extração da celulose**. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

CASSALES, A. R. **Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado**. 2010. 138f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4675-4683, 2011.

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.

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 411-415, 2008.

DAGNINO, E. P. et al Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 363-368, 2013.

DAS, A. et al. Bioconversion of rice straw to sugar using multizyme complex of fungal origin and subsequent production of bioethanol by mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173 and *Zymomonas mobilis* MTCC 2428. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 217-225, 2013.

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

DIAS, M.O.S. et al. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy** v. 43, p. 246 -252, 2012.

DOELLE, H. W.; GREENFIELD, P. F. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 22, p. 405-410, 1985.

DOSSA, D.; et al. Brasil projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020/2021. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Assessoria de Gestão Estratégica. 2011.

DUARTE, L. C. et al. Effects of Aliphatic Acids, Furfural, and Phenolic Compounds on *Debaryomyces hansenii* CCM 941. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, 2005.

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

DYK, J. S. V.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1458-1480, 2012.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 2009. 167f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2009.

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

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

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613p. 1989 apud RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré- tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

FERREIRA, J. **Produção de levana e bioetanol utilizando cascas de banana por *Zymomonas mobilis***. 2013. 93f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

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

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

GUERRA-RODRÍGUEZ, E. et al. Modelling of the acid hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*) for fermentative purposes. **Biomass and Bioenergy**, v. 42, p. 59-68, 2012.

GUO, G. et al. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology** v. 99, p. 6046 -6053, 2008.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 10-18, 2009.

HICKER, L. R. et al. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 508-514, 2013.

HODGE, D. B. et al. Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 44, p. 309-316, 2009.

HUANG, C. et al. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource Technology** v. 102, p. 3322 -3329, 2011.

IYE, E.; BILSBORROW, P. Cellulosic ethanol production from agricultural residues in Nigeria. **Energy Policy**, v. 63, p. 207-214, 2013.

JAMAI, L. et al. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 204, p. 375-379, 2001.

JAMAI, L. et al, Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2765-2770, 2007.

KALNENIEKS, U. et al. Ethanol cycle in an ethanogenic bacterium. **FEBS Letters**, v. 522, p. 6-8, 2002.

KAYE, S.; HAAG, H.B. Determination of ethyl alcohol in blood. **Journal of Forensic Medicine**. v. 1, n. 6, p. 373-381, 1954.

KIM, I. et al. Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 563-567, 2014

KIRK, L. A.; DOELLE, H. W. Rapid ethanol production from sucrose without by-product formation. **Biotechnology Letters**. v. 15, n. 9, p. 985-990, 1993.

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugar: Current status and future

prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 12, p. 4950-4962, 2011.

LACERDA, T. M.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E. Effect of acid concentration and pulp properties on hydrolysis reactions of mercerized sisal. **Carbohydrate Polymers**, p. 1 -26, 2012.

LAPLACE, J. M. et al. Ethanol production from glucose and xylose by separated and co-culture processes using high cell density systems. *Process Biochemistry*, v. 28, p. 519-525, 1993.

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

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de Ciências Ambientais** v. 1, n. 2, p. 5-18, 2007.

LIMA, U. A. Matérias-primas dos alimentos – Parte I: origem vegetal; Parte II: origem animal. São Paulo: Blucher; 2010.

LIN, C. et al. Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 489-493, 2011.

LIU, Z. et al. Isolation and cationization of hemicelluloses from pré-hydrolysis liquor of Kraft-based dissolving pulp production process. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, p. 1789-1796, 2011.

LÓPEZ et al. Optimization of furfural production by acid hydrolysis of *Eucalyptus globules* in two stages. **Chemical Engineering Journal**. 2013.

LÓPEZ-LINARES, J. C. et al. Pretreatment of olive tree biomass with FeCl₃ prior enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, n. 128, p. 180-187, 2013.

LOHMEIER-VOGEL, E. M.; SOPHER, C. R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 75-81, 1998.

LUO, C.; BRINK, D. L.; BLANCH, H. W. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 22, p. 125-138, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10ª ed. São Paulo: Person Prentice Hall, 2004.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

- MALDHURE, A. V.; EHLE, J. D. Pyrolysis of purified kraft lignin in the presence of AlCl_3 and ZnCl_2 . *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 1, p. 844-849, 2013.
- MARTÍN, J. F. G. et al. Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. **Renewable Energy**, v. 35, p. 1602-1608, 2010.
- MARTÍNEZ, M. L.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 160-166, 2012.
- MATEO, S. et al. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 196-203, 2013.
- MAZAHARI, D. et al. Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. **Applied Energy**, v. 99, p. 372-378, 2012.
- MENON, V., RAO, M. Trends in bioconversion of lignocelluloses: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522 -550, 2012.
- MIRANDA, M. I. G. et al. Kinetical thermal degradation study of maize straw and soybean hull celluloses by simultaneous DSC–TGA and MDSC techniques. **Thermochimica Acta**, v. 565, p. 65-71, 2013.
- MORO, M. R. **Produção de etanol e levana por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2012.
- MOU, H. Y.; HEIKKILÄ, E.; FARDIM, P. Topochemistry of alkaline, alkaline-peroxide and hydrotropic pretreatments of common reed to enhance enzymatic hydrolysis efficiency. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 36-41, 2013.
- MUSSATTO, 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.
- 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.
- NORONHA, L. L. et al. Utilização de diferentes tipos de policloreto de alumínio para purificação de hidrolisado de bagaço de cana através da técnica de coagulação e floculação. **Química Nova**, v. 33, p. 1698-1702, 2010.

OBEROI, H. S. et al. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. **Process Biochemistry**. v. 45, p. 1299-1306, 2010.

OFORI-BOATENG, C.; LEE, K. T. An oil palm-based biorefinery concept for cellulosic ethanol and phytochemicals production: Sustainability evaluation using exergetic life cycle assessment. **Applied Thermal Engineering**, v. 62, p. 90-104, 2014.

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

PAIXÃO, M. C. S.; FONSECA, M. B. A produção de etanol de cana no Estado da Paraíba: alternativas de sustentabilidade. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. n. 24, p. 171-184. 2011.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 17-24, 2000.

PATLE, S.; LAL, B. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**. v. 32, p. 596-602, 2008.

PÉREZ, S.; SAMAIN, D. Structure and engineering of celluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 64, p. 25-116. 2010.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré- tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 153, p. 139-150, 2009.

RATTANACHOMSRI, U. et al. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, p. 488-493, 2009.

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

RODRÍGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 143-152, 2004.

ROMERO, I.; MOYA, M.; SÁNCHEZ, S.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; BRAVO, V. Ethanolic fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning. **Industrial Crops and Products**, v. 25, p. 160-168, 2007.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfurai and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 10, p. 315-318, 1988.

SARAVANAKUMAR, K.; SENTHILRAJA, P.; KATHIRESAN, K. Bioethanol production by mangrove-derived marine yeast, *Sacchromyces cerevisiae*. **Journal of King Saud University – Science**, v. 25, p. 121-127 2013.

SCHIRMER-MICHEL, A.C. et al. Production of ethanol from soybean hull hydrolysates by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 2898-2904. 2008.

SCORDIA, D. et al. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicelluloses hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054, **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 296-305, 2012.

SILBIR, S.; DAGBAGLI, S.; YEGIN, S.; BAYSAL, T.; GOKSUNGUR, Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 454-461, 2014.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrólise de palha de arroz**. 2007. 146f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. **Fuel**, v. 116, p. 699-702, 2014.

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

SOCOL, C.R. et al. Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**, p. 101- 122, 2011.

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

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letter**, v. 145, n. 3, p. 301-307, 1996.

SREEKUMAR, O.; CHAND, N.; BASAPPA, S. C. Optimization and Interaction of Media Components in Ethanol Production Using *Zymomonas mobilis* by Response Surface Methodology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, p. 334-338, 1999.

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

SUN, Z. et al. Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10929-10935, 2011.

SURIYACHAI, N. et al. Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 171-178, 2013.

TAMANINI, C., HAULY, M.C.O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315 -330, 2004.

THEVENOT, M.; DIGNAC, M.; RUMPEL, C. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology & Biochemistry*. v. 42, p. 1200-1211, 2010.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. In:_____. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Madrid: Elsevier, 2011. p. 149-176.

TORRES, E. F.; BARATTI, J. Continuous Ethanol Production by *Zymomonas mobilis* from an Equimolar Mixture of Glucose and Fructose. **Biomass**, v. 13, p. 75-85, 1987.

TURINO, V. F. **Substituição da fibra em detergente neutro (FDN) do bagaço de cana-de-açúcar in natura pela FDN da casca de soja em dietas contendo alta proporção de concentrado para cordeiros confinados**. 2003. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

VARMA, R. J.; GAIKWAD, B. G. Biodegradation and phenol tolerance by recycled cells of *Candida tropicalis* NCIM 3556. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 539-542, 2009.

VASCONCELOS, S. M. et al. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2012.

VASCONCELOS, S. M. et al. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 46-52, 2013.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesq. agropec. bras.**, v. 34, n. 7, p. 1277-1283. 1999.

VIRUNANON, C. et al. Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. **Journal of Cleaner Production**, v. 39, p. 273-279, 2013.

WALFRIDSSON, M. et al. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Applied Environmental Microbiology*. v. 61, p. 4184-4190, 1995 apud CASSALES, A. R. **Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado**. 2010. 138f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

WANG, Y. et al. Hydrolysis kinetics characteristic of recycled fiber in subcritical water. **Bioresource Technology**. v. 105, 152-159, 2012.

WEI, P. et al. A review of membrane technology for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 388-400, 2014.

WILLÖR, S. et al, Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides– A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 571–580, 2009.

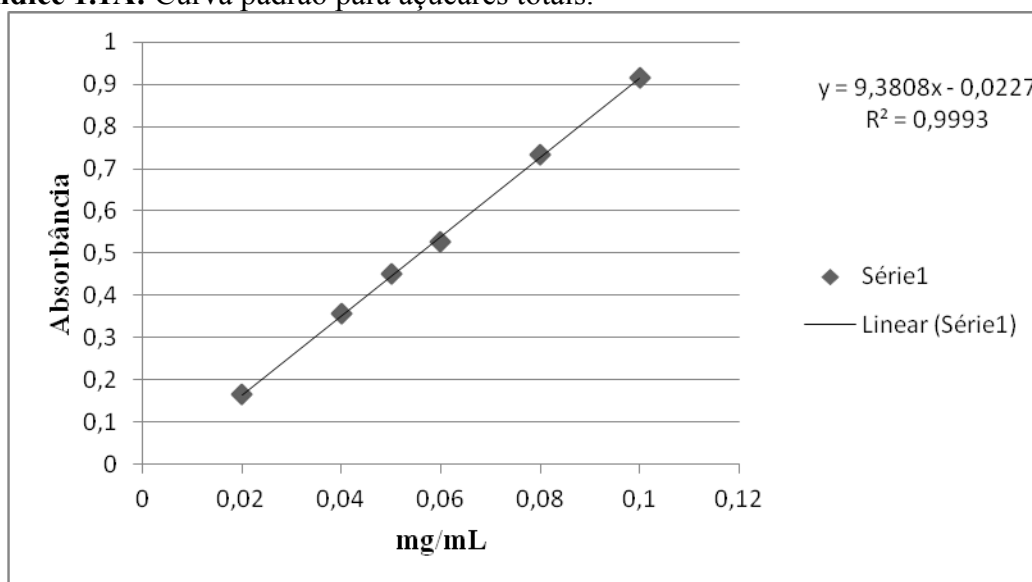
ZHOU, H. et al. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**. v. 14, p. 611-622, p. 2012.

APÊNDICES

Apêndice 1A: Concentração de glicose e absorbância (490 nm) para padronização da curva padrão de açúcares totais.

Concentração de glicose (mg/mL)	Absorbância
0,02	0,165
0,04	0,357
0,05	0,450
0,06	0,526
0,08	0,733
0,1	0,916

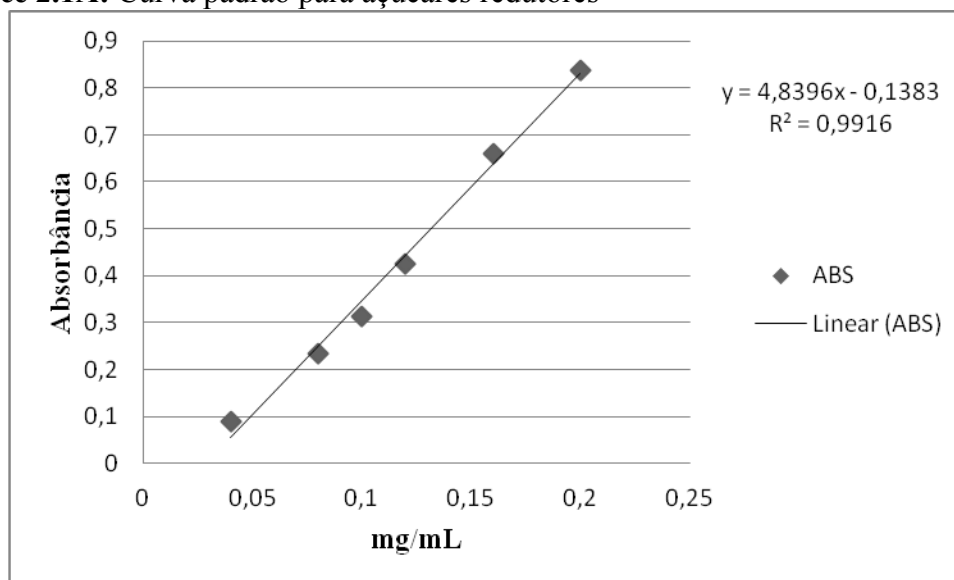
Apêndice 1.1A: Curva padrão para açúcares totais.



Apêndice 2A: Concentração de glicose e absorbância (540 nm) para padronização da curva padrão de açúcares redutores

Concentração de glicose (mg/mL)	Absorbância
0,04	0,089
0,08	0,235
0,10	0,314
0,12	0,424
0,16	0,659
0,20	0,837

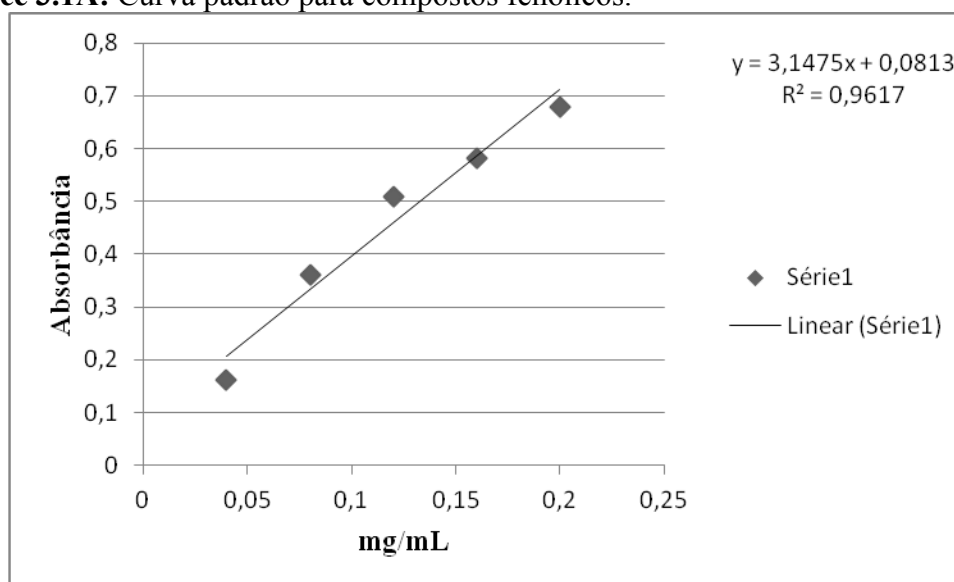
Apêndice 2.1A: Curva padrão para açúcares redutores



Apêndice 3A: Concentração de ácido vanílico e absorbância (755 nm) para padrozinação da curva padrão de compostos fenólicos

Concentração de ácido vanílico (mg/mL)	Absorbância
0,04	0,162
0,08	0,360
0,12	0,510
0,16	0,583
0,20	0,680

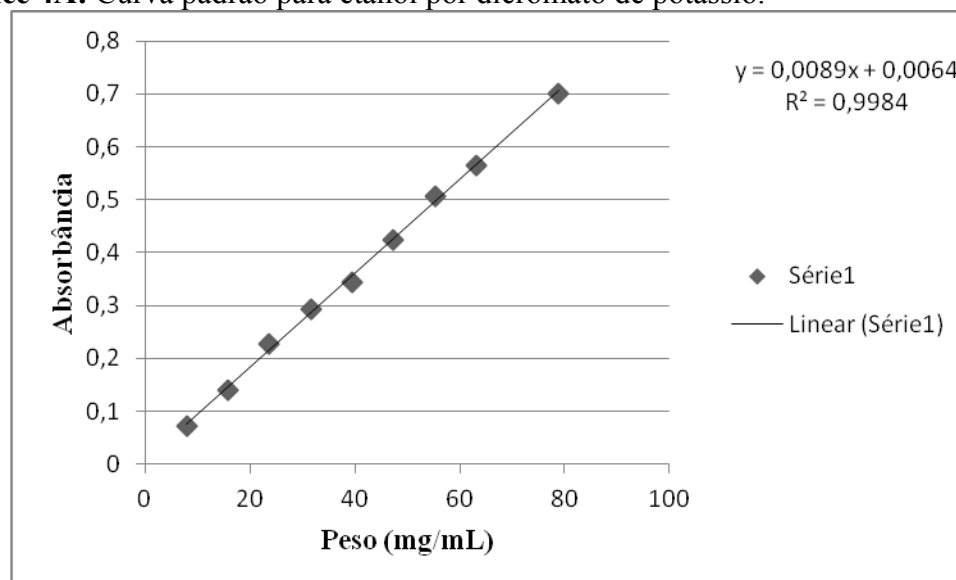
Apêndice 3.1A: Curva padrão para compostos fenólicos.



Apêndice 4.1A: Peso de álcool etílico e absorvância (600 nm) para padrozinação da curva padrão de dicromato de potássio

Álcool Etílico (mg/mL)	Absorvância
7,89	0,073
15,78	0,139
23,67	0,228
31,56	0,294
39,45	0,344
47,34	0,424
55,23	0,506
63,12	0,565
78,9	0,702

Apêndice 4A: Curva padrão para etanol por dicromato de potássio.



Apêndice 5A: Padronização do Inóculo da bactéria *Zymomonas mobilis*

Utilizou-se o meio caldo *Zymomonas mobilis* (CZM) para o crescimento da bactéria. Este procedimento foi realizado em três etapas, com intervalo de 24 horas e incubação a 30°C, que foram:

- Inoculou-se a bactéria em 5 tubos de ensaio contendo 5 mL de CZM cada. A seguir os tubos foram vertidos em um erlenmeyer com 75 mL de CZM e, por último, todo o conteúdo do erlenmeyer foi passado para outro erlenmeyer com 150 mL de CZM.

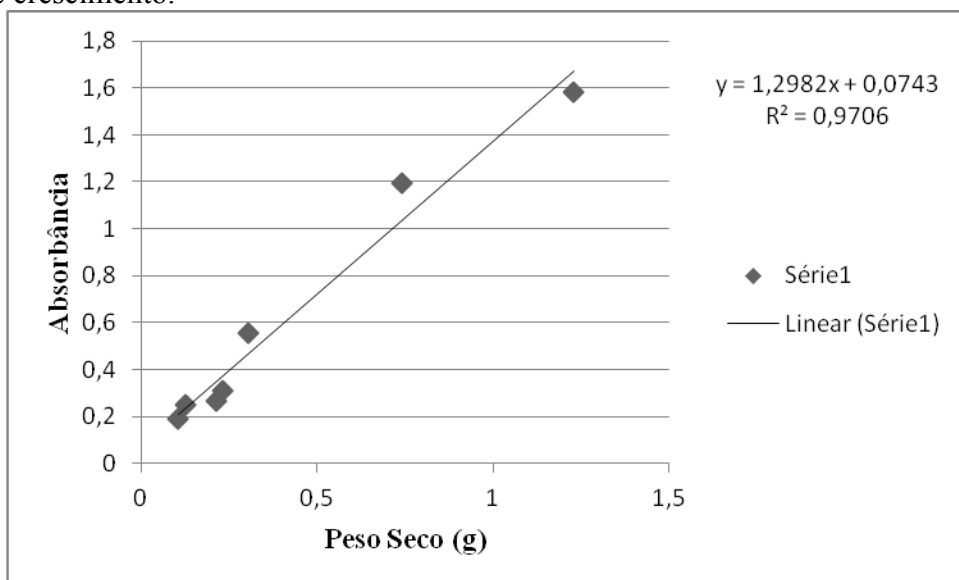
Posterior essas etapas, centrifugou-se o caldo do último erlenmeyer por 15 minutos a 3600 rpm e 25°C, a fim de separar as células do CZM. O caldo foi desprezado; adicionou-se água destilada esterilizada, para lavagem do “pellet” de células e retirar qualquer resíduo do CZM, e centrifugou-se novamente. A água remanescente foi descartada.

O “pellet” de células bacterianas foi resuspendido com água destilada esterilizada e fizeram-se diluições; que por sua vez foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm. Separadamente, colocaram-se 50 mL das diluições em béqueres, previamente tarados em estufa a 105 °C, e o conteúdo foi seco em estufa a 90°C por 24 horas. Foi realizada a pesagem até atingir peso constante no qual o béquer permaneceu em estufa a 90 °C por 1 hora entre as pesagens. Com os resultados de absorbância e peso seco das células foi construída uma curva padrão (apêndice 5.2A). A equação da curva obtida permitiu saber o inóculo inicial de cada fermentação.

Apêndice 5.1A: Peso seco e absorbância (570 nm) de células da bactéria *Zymomonas mobilis* para padronização da curva padrão do crescimento celular

Peso Seco (g)	Absorbância
0,105	0,192
0,125	0,251
0,215	0,265
0,230	0,310
0,305	0,558
0,740	1,193
1,23	1,582

Apêndice 5.2A: Curva padrão da biomassa da bactéria *Zymomonas mobilis*, posterior 72 horas de crescimento.



Apêndice 6A: Padronização do Inóculo da levedura *C. tropicalis*

Utilizou-se o meio caldo *Candida tropicalis* (CCT) para o crescimento da levedura. Este procedimento foi realizado em três etapas, com intervalo de 24 horas e incubação a 30°C a 220 rpm, que foram:

- inoculou-se a levedura em 5 tubos de ensaio contendo 5 mL de CCT cada. A seguir os tubos foram vertidos em um erlenmeyer com 75 mL de CCT e, por último, todo o conteúdo do erlenmeyer foi passado para outro erlenmeyer com 150 mL de CCT.

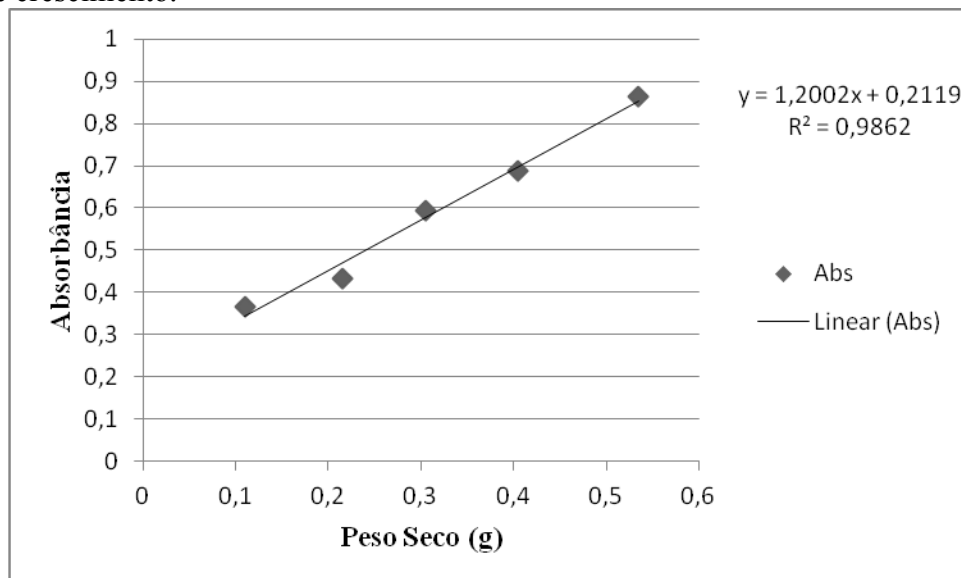
Posterior essas etapas, centrifugou-se o caldo do último erlenmeyer por 15 minutos a 3600 rpm e 25°C, a fim de separar as células do CCT. O caldo foi desprezado; adicionou-se água destilada esterilizada, para lavagem do “pellet” de células e retirar qualquer resíduo do CCT, e centrifugou-se novamente. A água remanescente foi descartada.

O “pellet” de células da levedura foi resuspendido com água destilada esterilizada e fizeram-se diluições; que por sua vez foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm. Separadamente, colocaram-se 50 mL das diluições em béqueres, previamente tarados em estufa a 105 °C, e o conteúdo foi seco em estufa a 90°C por 24 horas. Foi realizada a pesagem até atingir peso constante no qual o béquer permaneceu em estufa a 90 °C por 1 hora entre as pesagens. Com os resultados de absorbância e peso seco das células foi construída uma curva padrão (apêndice 6.2A). A equação da curva obtida permitiu saber o inóculo inicial de cada fermentação.

Apêndice 6.1A: Peso seco e absorbância (570 nm) de células da bactéria *Candida tropicalis* para padronização da curva padrão do crescimento celular

Peso Seco (g)	Absorbância
0,110	0,366
0,215	0,434
0,305	0,593
0,405	0,434
0,535	0,863

Apêndice 6.2A: Curva padrão da biomassa da levedura *Candida tropicalis*, posterior 72 horas de crescimento.



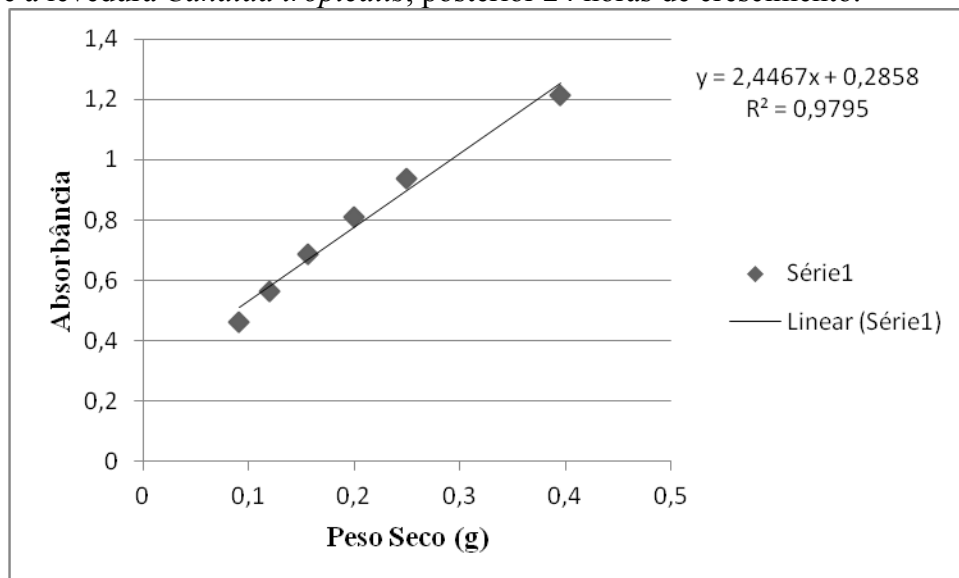
Apêndice 7A: Padronização do Inóculo do consórcio

Para construção da curva padrão do consórcio, foram realizadas as etapas de crescimento dos apêndices 5A e 6A. Os inóculos padronizados de cada micro-organismo foram adicionados em meio CZM e foram incubados a 30 °C sem agitação. Posterior este tempo, o caldo foi centrifugado a 3600 rpm por 15 minutos. O caldo foi descartado e resuspendeu-se as células com água destilada esterilizada e centrifugou-se novamente. A água remanescente foi descartada e as células foram novamente resuspendidas com água destilada esterilizada. Foram realizadas diluições, mediu-se a absorbância a 570 nm. 50 mL de cada diluição foi adicionado em béquer previamente tarado em estufa a 105 °C, e o conteúdo foi seco em estufa a 90°C por 24 horas. Foi realizada a pesagem até atingir peso constante no qual o béquer permaneceu em estufa a 90 °C por 1 hora entre as pesagens. Com os resultados de absorbância e peso seco das células foi construída uma curva padrão (apêndice 7.2A). A equação da curva obtida permitiu saber o inóculo inicial de cada fermentação.

Apêndice 7.1A: Peso seco e absorbância (570 nm) de células da bactéria *Zymomonas mobilis* e da levedura *Candida tropicalis* para padronização da curva padrão do crescimento celular

Peso Seco (g)	Absorbância
0,091	0,461
0,120	0,565
0,156	0,688
0,2	0,810
0,249	0,939
0,396	1,215

Apêndice 7.2A: Curva padrão da biomassa do consórcio com a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Candida tropicalis*, posterior 24 horas de crescimento.



Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura