



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Vidiany Aparecida Queiroz Santos

**Avaliação de suportes para a imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 visando à
produção de etanol e levana**

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto, 25 de outubro de 2013.

Vidiany Aparecida Queiroz Santos

Avaliação de suportes para a imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 visando à produção de etanol e levana

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor, 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, linha de pesquisa: microbiologia e Bioprocessos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto - SP.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto, 25 de outubro de 2013.

Santos, Vidiany Aparecida Queiroz

Avaliação de suportes para a imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 visando à produção de etanol e levana/ Vidiany Aparecida Queiroz Santos. -- São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.
118 f. : il., tabs.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia. 2. Álcool-Indústria; 3. *Zymomonas mobilis*; 4. Células imobilizadas; 5. Frutanos. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 661.722

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca do IBILCE – UNESP Campus de São José do Rio Preto.

Vidiany Aparecida Queiroz Santos

Avaliação de suportes para a imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 visando à produção de etanol e levana

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor, 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, linha de pesquisa: microbiologia e Bioprocessos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto - SP.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
Universidade Estadual Paulista - UNESP.
Orientador

Prof. Dr. Mário Antonio Alves da Cunha
Universidade Tecnológica Federal do Paraná:
Campus Pato Branco - PR.

Prof. Dr. Pedro Oliva Neto
Universidade Estadual Paulista - UNESP:
Campus Assis - SP.

Prof. Dr. Ozair Souza
Universidade da região de Joinville:
UNIVILLE - Joinville - SC.

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
Universidade Estadual Paulista - UNESP:
Campus São José do Rio Preto - SP.

São José do Rio Preto, 25 de outubro de 2013.

À minha família, meus pais Antônio e Célia e irmãos Vitor, Vinícius e Vanessa, que sempre me apoiaram na realização deste grande sonho !!!

Com todo meu amor ...

Dedico e Ofereço

Epígrafe

“A fé e a razão caminham juntas, mas a fé vai mais longe”

Santo Agostinho

Agradecimentos

A **Deus** pela oportunidade de chegar tão longe e realizar um dos meus grandes sonhos! Somente por sua graça, pude enfrentar cada barreira e vencer todos os obstáculos encontrados pelo caminho! Agradeço também, por colocar anjos em meu caminho, para me amparar quando já cansada de lutar, vacilei e comecei a duvidar da minha capacidade de seguir em frente.

A minha família, principalmente meus pais Antônio e Célia, meus irmãos Vítor, Vinícius e Vanessa, minha cunhada Cristiane e minha linda sobrinha Valentina, pelo amor incondicional e compreensão nos meus momentos de ausência.

Agradeço especialmente a minha irmã Vanessa, minha companheira e amiga em todos os momentos, obrigada por cuidar de mim e ter paciência nos momentos mais difíceis ... haja o que houver ... estaremos de irmãs!!! te amo muito e vai ser sempre assim !!!

A minha best friend Catharina, irmã que Deus me deu, anjo que além de estar comigo em todas as vitórias e derrotas desta caminhada, me presenteou com o maior de todos os presentes, **Deus** ... nenhuma palavra representaria a gratidão e o carinho que sinto ... apenas digo ... "que bom sua vida em minha vida !!!".

A minha amiga Juliana Guerra, obrigada pela lealdade e companheirismo, e por jamais me deixar desanimar !!! Agradeço especialmente, por tê-la ao meu lado em uma das experiências mais importantes das nossas vidas, onde tivemos a oportunidade, além da experiência profissional, de crescer como pessoa.

A Canção nova, incluindo todas as pessoas envolvidas, missionários e amigos de fé, por me mostrar um novo caminho a seguir e minha razão de viver ... Jesus.

As amigas, Mi (Michelle), Ju Ferreira, Aline, Luaninha, Marina Costa, Denise, Gabi, Bruna, Bruna Lima e Adriana, pela amizade durante estes quatro anos, pelas longas e animadas conversas no laboratório; pelo auxílio nos experimentos executados, discussões científicas e orientações tão necessárias para a conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz, pela orientação e principalmente, pela paciência, amizade e atenção, indispensáveis a realização deste trabalho.

A todos os funcionários e professores da sessão de Pós-Graduação e de todo o departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos, em especial a Tânia, pela atenção, carinho e auxílio na realização deste trabalho. Também agradeço aos amigos do Centro de Investigación y estudios avanzados del IPN – CINVESTAV: México, Dra. Montes, Jesus Vega, Fabiola, Laura e Fernando Cuevas, pela acolhida, orientação e auxílio na realização do estágio.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise do IBILCE/UNESP/S.J. do Rio Preto/SP, a Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi pela captura das imagens no MEV (FAPESP, Proc. 95/06165-1), a bióloga Rosana pela ajuda na preparação das amostras.

A Capes e a Fapesp pelo apoio financeiro, essencial para a execução deste trabalho.

A todos os meus amigos que torceram pelo meu sucesso e a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização deste sonho o meu muito obrigada !

RESUMO

A bactéria *Zymomonas mobilis* é considerada um microrganismo com alto potencial biotecnológico para a produção de etanol e levana, por apresentar baixa produção de biomassa e alta tolerância a elevadas concentrações de etanol. Apesar disso, sua eficiência pode ser prejudicada, devido a exposição das células livres a condições desfavoráveis durante os processos fermentativos convencionais. A utilização de células imobilizadas é uma alternativa para solucionar tais problemas, pois oferece inúmeras vantagens como maior concentração celular, maior estabilidade e conseqüentemente maior produção. Diante disso, o objetivo deste trabalho, foi selecionar um suporte adequado para a imobilização de *Zymomonas mobilis* visando aumentar a produção de etanol e levana empregando sacarose como fonte de carbono. Os suportes avaliados foram: alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana. Os melhores parâmetros para a produção de etanol e levana, foram determinados utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR). O primeiro experimento realizado foi 2⁽⁵⁻²⁾ com as variáveis independentes: concentração de sacarose; pH; tempo de incubação; temperatura e agitação do meio de cultura. Com base nas melhores condições observadas no experimento 2⁽⁵⁻²⁾ foi avaliada a capacidade de reutilização dos suportes em fermentações subseqüentes durante 12 dias. A produção de etanol foi determinada pelo método de microdifusão e a levana foi determinada indiretamente em unidades de frutose após hidrólise ácida. A biomassa foi determinada por densidade ótica a 570 nm e a fixação do microrganismo no suporte foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura. No experimento 2⁽⁵⁻²⁾, verificou-se que o melhor suporte de imobilização foi a bucha vegetal, a qual apresentou os maiores valores de biomassa imobilizada (2,95 g/L); produção de levana (24,9 g/L) e etanol (50,95 g/L). Para os experimentos com reutilização dos suportes, verificou-se que exceto para a quitosana, a microbiota imobilizada em todos os suportes permaneceu viável até o 12º ciclo de reutilização do suporte. Neste experimento, o suporte bagaço de cana foi o que apresentou melhores resultados para a adesão microbiana (3,23 g/L), bem como para a produção de levana (32,13 g/L) e etanol (36,50 g/L). Diante disso, a bucha vegetal e o bagaço de cana foram os suportes mais promissores para produção de etanol e levana por batelada e por batelada sequencial, respectivamente. Tais resultados indicam que o uso destes suportes principalmente em fermentação por batelada seqüencial, constitui uma alternativa interessante que pode contribuir para a redução nos custos de produção de levana e etanol e no aumento de estabilidade do processo.

Palavras-chave: bioetanol, polissacarídeo microbiano, *Zymomonas mobilis*, células imobilizadas, batelada sequencial.

ABSTRACT

Zymomonas mobilis is considered to have high biotechnological potential for ethanol and levan production, because it produces little biomass and shows good tolerance to ethanol concentrations. However, this efficiency can be decreased if the free cells are exposed to unfavorable conditions during conventional fermentations. Cell immobilization is an alternative to solve this problem and offers numerous advantages such as higher cell concentrations, greater stability and improved production. Thus the aim of this work was to select a suitable support for the immobilization of *Zymomonas mobilis* in order to increase the production of ethanol and levan from sucrose as the carbon source. The optimum values for ethanol and levan production were determined using response surface methodology (RSM). The first experiment was a $2^{(5-2)}$ design with the following independent variables: sucrose concentration, pH, incubation time, temperature and agitation of the culture medium. Based on the best conditions observed in the $2^{(5-2)}$ experiment, reuse of the support was evaluated during 12 days of fermentation. Ethanol production was determined by microdiffusion and the levan production on fructose units after acid hydrolysis. The biomass was determined by optical density at 570 nm and microbial growth on the support was verified by scanning electron microscopy. In the $2^{(5-2)}$ experiment the loofa sponge was the best support for immobilization with the highest values for immobilized biomass (2.95 g/L); levan production (24.9 g/L) and ethanol production (50.95 g/L). In the immobilization support reuse experiments in batch fermentations, all the supports evaluated could be reused for 12 cycles, with the exception of chitosan beads. Sugarcane bagasse was shown to be the best substrate for microbial adhesion (3.23 g/L) and for levan (32.13 g/L) and ethanol production (36.50 g/L). Thus the loofa sponge and sugarcane bagasse represented the most promising support and substrate for ethanol and levan production by batch and repeated batch fermentations, respectively. The use of this support mainly in repeated batch fermentation is an interesting alternative for the reduction of production costs and to increase process stability.

Keywords: ethanol, microbial polysaccharide, *Zymomonas mobilis*, immobilization cell, repeated batch fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto macroscópico das colônias (A) e microscópico (1000 x) (B) de <i>Zymomonas mobilis</i>	19
Figura 2. Metabolismo dos carboidratos em <i>Zymomonas mobilis</i>	21
Figura 3. Esquema representativo dos principais suportes utilizados em imobilização celular e enzimática.....	23
Figura 4: Esquema representativo de alguns métodos de imobilização.....	24
Figura 5. Estrutura B (2 – 6) da ramificação principal da levana.....	29
Figura 6. Estrutura química do alginato de sódio.....	31
Figura 7. Estrutura química da quitosana.....	32
Figura 8. Aspecto das esferas de alginato de cálcio após gotejamento em cloreto de cálcio e adição em meio de fermentação (A) e aspecto das esferas de quitosana logo após o gotejamento em solução de NaOH 1 M (B).....	37
Figura 9. Aspecto da bucha vegetal (A) e bagaço de cana (B) após a imobilização.....	39
Figura 10. Superfícies de resposta utilizando alginato como suporte de imobilização para (A) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e temperatura (°C); (C) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e agitação (min ⁻¹).....	51
Figura 11. Superfícies de resposta utilizando a quitosana como suporte de imobilização para (A) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de tempo de fermentação (h) e temperatura (°C); (C) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e agitação (min ⁻¹).....	52
Figura 12. Superfícies de resposta utilizando bucha vegetal como suporte de imobilização para (A) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de agitação (min ⁻¹) e sacarose (g/L); (C) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h).....	53
Figura 13. Superfícies de resposta utilizando bagaço de cana como suporte de imobilização para (A) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de agitação (min ⁻¹) e temperatura (°C); (B) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L).....	54
Figura 14. Superfícies de resposta utilizando o alginato como suporte de imobilização, para (A) produção de levana (g/L), ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e pH; (B) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de levana ao redor dos valores ótimos de tempo de fermentação (h) e agitação (min ⁻¹).....	65
Figura 15. Superfícies de resposta utilizando a quitosana como suporte de imobilização para (A) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e temperatura (°C); (B) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de tempo de fermentação (h) e temperatura (°C); (C) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e agitação (min ⁻¹).....	67
Figura 16. Superfícies de resposta utilizando bucha vegetal como suporte de imobilização para (A) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção	

de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e agitação (min ⁻¹).....	70
Figura 17. Superfícies de resposta utilizando bagaço de cana como suporte de imobilização para (A) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e agitação (min ⁻¹).....	71
Figura 18. Superfícies de resposta utilizando o alginato como suporte de imobilização para (A) produção de etanol (g/L), ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo de fermentação (h); (C) produção de etanol ao redor dos valores ótimos de pH e agitação (min ⁻¹).....	80
Figura 19. Superfícies de resposta utilizando a quitosana como suporte de imobilização para (A) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e agitação (min ⁻¹).....	81
Figura 20. Superfícies de resposta utilizando bucha vegetal como suporte de imobilização para (A) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e agitação (min ⁻¹).....	82
Figura 21. Superfícies de resposta utilizando bagaço de cana como suporte de imobilização para (A) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e agitação (min ⁻¹).....	83
Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura de esferas de alginato com <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 imobilizada (A: superfície externa com o microrganismo imobilizado); (B: interior da esfera destacando o crescimento microbiano); (C e D: interior da esfera em maior aumento, destacando a grande quantidade de biomassa imobilizada).....	86
Figura 23. Aspecto das esferas de alginato no primeiro (A) e último dia de ciclo (B).....	86
Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura de esferas de quitosana com <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 imobilizada (A e C: exterior da esfera com o microrganismo imobilizado); (B: interior da esfera destacando o crescimento microbiano) e (D: superfície externa da esfera também com o microrganismo imobilizado, destacando que a mesma tem estrutura irregular).....	87
Figura 25. Aspecto das esferas de quitosana no primeiro (A) e segundo dia de ciclo (B).....	87
Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura de bucha vegetal com <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 imobilizada (A: estrutura da bucha vegetal com menor aumento, demonstrando as fissuras do suporte); (B: microbiota aderida a estrutura da bucha vegetal logo após a imobilização); (C e E: microbiota aderida a estrutura vegetal, em maior aumento, demonstrando a alta adesão ao suporte e também, as alterações morfológicas após vários ciclos de fermentação); (D: alta densidade celular aderida ao suporte após vários ciclos de fermentação; (E e F: microbiota aderida ao suporte após as fermentações em maior aumento).....	89
Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura de bagaço de cana com <i>Zymomonas mobilis</i>	

CCT 4494 imobilizada (A, B, E e F: estrutura do bagaço de cana com menor aumento, demonstrando a estrutura do suporte com o microrganismo imobilizado); (C: microbiota aderida a estrutura do bagaço de cana em maior aumento); (D: microbiota aderida a estrutura vegetal, em maior aumento, demonstrando a boa adesão ao suporte e após vários ciclos de fermentação).....	90
Figura 28. Aspecto do suporte bucha vegetal antes da imobilização (A) e no último dia de reciclo (B).....	91
Figura 29. Aspecto do suporte bagaço de cana antes da imobilização (A) e no último dia de reciclo (B).....	92
Figura 30. Comportamento do pH final do meio de cultivo, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada em alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana durante os ciclos de reutilização.....	93
Figura 31. Produção de levana por células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana durante os ciclos de reutilização.....	97
Figura 32. Produção de etanol por células de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizadas em alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana durante os ciclos de reutilização.....	100

LISTA DA TABELAS

Tabela 1. Composição do meio basal em g/L.....	35
Tabela 2. Variáveis independentes estudadas no primeiro planejamento experimental 2^{5-2}	40
Tabela 3. Condições ótimas, para a produção de levana e etanol obtidas no experimento 2^{5-2} , utilizando a metodologia de superfície de resposta, para os suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana.....	41
Tabela 4. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a biomassa de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte alginato	45
Tabela 5. Planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$, utilizando o suporte alginato , com duas repetições no ponto central, para biomassa imobilizada no suporte, levana e etanol....	46
Tabela 6. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para biomassa de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte quitosana	47
Tabela 7. Planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$, utilizando o suporte quitosana , com duas repetições no ponto central, para biomassa imobilizada no suporte, levana e etanol.....	47
Tabela 8. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para biomassa de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte bucha vegetal	48
Tabela 9. Planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$, utilizando o suporte bucha vegetal , com duas repetições no ponto central, para biomassa imobilizada, levana e etanol.....	49
Tabela 10. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para biomassa de <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte bagaço de cana	49
Tabela 11. Planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$, utilizando o suporte bagaço de cana , com duas repetições no ponto central, para biomassa imobilizada, levana e etanol.....	50
Tabela 12. Biomassa de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494 desprendida para o meio de fermentação (biomassa livre), nos ensaios utilizando os suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana.....	57
Tabela 13. Comportamento do pH final do meio de cultura utilizando os suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana, para imobilizar a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494.....	60
Tabela 14. Açúcares totais (AT) e consumo de substrato sacarose (CS) utilizando alginato como suporte para imobilizar a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494.....	61
Tabela 15. Açúcares totais (AT) e consumo de substrato sacarose (CS) utilizando quitosana como suporte para imobilizar a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494.....	62
Tabela 16. Açúcares totais (AT) e consumo de substrato sacarose (CS) utilizando bucha vegetal como suporte para imobilizar a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494.....	63
Tabela 17. Açúcares totais (AT) e consumo de substrato sacarose (CS) utilizando bagaço de cana como suporte para imobilizar a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494.....	64
Tabela 18. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de levana , pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte alginato	65
Tabela 19. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de levana pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte quitosana	66

Tabela 20. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de levana pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte bucha vegetal ...	68
Tabela 21. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de levana pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte bagaço de cana	69
Tabela 22. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de etanol pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte alginato	75
Tabela 23. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de etanol pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte quitosana	76
Tabela 24. Tabela ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de etanol pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte bucha vegetal	76
Tabela 25. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de etanol pela bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> imobilizada no suporte bagaço de cana	77
Tabela 26. Delineamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$ para os suportes: alginato, quitosana, bagaço de cana e bucha vegetal.....	84
Tabela 27. Resultados para a produção de levana, etanol, consumo do substrato e biomassa livre produzida por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494 imobilizada em alginato durante os ciclos de reutilização.....	94
Tabela 28. Resultados para a produção de levana, etanol, consumo do substrato e biomassa livre produzida por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494 imobilizada em bucha vegetal durante os ciclos de reutilização.....	96
Tabela 29. Resultados para a produção de levana, etanol, consumo do substrato e biomassa livre produzida por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT4494 imobilizada em bagaço de cana durante os ciclos de reutilização.....	97

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract	9
1. Introdução e justificativa	17
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Revisão bibliográfica	19
3.1. <i>Zymomonas mobilis</i>	19
3.2. Imobilização celular	22
3.2.1. Principais métodos de imobilização celular	23
3.2.1.1. Imobilização por floculação celular	23
3.2.1.2. Imobilização por fixação em superfície sólida	24
3.2.1.3. Imobilização por aprisionamento em matrizes porosas e encapsulamento	25
3.3. Imobilização celular na produção de etanol	26
3.4. Imobilização celular na produção de levana	29
3.5. Alginatos	30
3.6. Quitosana	31
3.7. Bucha vegetal (<i>Luffa cylindrica</i>)	32
3.8. Bagaço de cana	33
4. Material de métodos	34
4.1. Microrganismo	34
4.2. Meio de cultura	34
4.2.1. Meio de manutenção e pré-fermentação	34
4.2.2. Meio de fermentação	34
4.3. Condições de fermentação	35
4.3.1. Pré fermentação	35
4.3.2. Preparo e padronização do inóculo	35
4.3.3. Curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494	36
4.4. Imobilização	36
4.4.1. Imobilização por aprisionamento em alginato	36
4.4.2. Imobilização por aprisionamento em quitosana	37
4.4.3. Imobilização por adsorção em bucha vegetal	38
4.4.4. Imobilização por adsorção em bagaço de cana	38
4.5. Produção de etanol e levana	39
4.6. Ensaio de fermentação com células imobilizadas com reciclo de células	40
4.7. Ensaio de fermentação com células imobilizadas sem reciclo de células	41
4.8. Métodos analíticos	41
4.8.1. Determinação do pH final	41
4.8.2. Determinação da biomassa livre no caldo de fermentação	42

4.8.3. Determinação da biomassa imobilizada nos diferentes suportes	42
4.8.4. Determinação da produção de etanol.....	42
4.8.5. Determinação da produção de levana.....	43
4.8.6. Determinação de açúcares redutores e totais.....	43
4.8.7. Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	44
4.8.8. Microscopia Eletrônica de varredura	44
4.9. Análise estatística	44
5.0. Resultados e discussão	45
5.1. Crescimento da biomassa nos suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana.....	45
5.2. Comportamento do pH final do meio de cultivo e consumo do substrato sacarose utilizando os suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana.....	58
5.3. Produção de levana.....	65
5.4. Produção de etanol.....	74
5.5. Reciclo dos suportes de imobilização.....	84
5.5.1. Biomassa livre e imobilizada aos suportes durante os ciclos de reutilização do suporte	84
5.5.2. Comportamento do pH final do meio de cultivo e consumo do substrato sacarose durante os ciclos de reutilização dos suportes.....	92
5.5.3. Produção de levana durante os ciclos de reutilização dos suportes.....	93
5.5.4. Produção de etanol durante os ciclos de reutilização dos suportes.....	98
6. Conclusões.....	101
7. Referências Bibliográficas	102
8. Anexos	113

1. Introdução e justificativa

A utilização de microrganismos para a produção de biocompostos em escala industrial, como o etanol e a levana, é objeto de intensas pesquisas em todo mundo. Uma das dificuldades encontradas para a produção em escala industrial é o baixo rendimento, comumente obtido pelas técnicas convencionais.

A bactéria *Zymomonas mobilis* apresenta grande potencial para a produção de etanol e levana. Isso se deve a capacidade de tolerar elevadas concentrações de etanol e açúcares; produzir baixa concentração de biomassa; utilizar via metabólica diferenciada e pela capacidade de sintetizar diferentes produtos a partir de mudanças nas condições de cultivo, além de ter crescimento celular independente do consumo de carbono.

Apesar da grande capacidade fermentativa deste microrganismo, sua eficiência pode ser prejudicada devido à exposição das células livres a condições desfavoráveis durante os processos fermentativos convencionais. Para solucionar tais dificuldades, pesquisas têm sido realizadas no sentido de aperfeiçoar esta tecnologia, e dentre as alternativas mais promissoras, pode-se destacar a utilização de microrganismos imobilizados.

A imobilização de microrganismos oferece uma série de vantagens em relação à utilização de células livres. Dentre estas, destacam-se a proteção das células frente à condições ambientais desfavoráveis e maior concentração de biomassa no suporte.

Dentre as diferentes técnicas de imobilização celular, o aprisionamento em géis de alginato e quitosana tem sido apontados como os que são capazes de manter a atividade e viabilidade celular por longos períodos de tempo.

Outro método interessante para a imobilização é a adsorção de células em suportes lignocelulósicos, como a bucha vegetal e o bagaço de cana, os quais apresentam boa estabilidade a diferentes tratamentos químicos e físicos e extensa superfície de adesão celular.

Tomando como base as pesquisas desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do laboratório de biopolímeros, onde foi avaliada a produção de etanol e levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* livre no meio de fermentação e, obteve-se baixo rendimento de produção, este estudo visou aumentar a produção utilizando células imobilizadas em diferentes suportes.

Diante disso e da necessidade em desenvolver tecnologias que possibilitem aumentar o rendimento de produção de etanol e levana, utilizando matérias-primas economicamente viáveis e de fácil manipulação, esta pesquisa teve por objetivo avaliar a eficiência de quatro suportes (alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana), para a imobilização de

Zymomonas mobilis CCT4494 visando aumentar a produção de etanol e levana e ainda, possibilitar a reutilização da biomassa celular imobilizada em fermentação por batelada seqüencial.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência da imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT4494, utilizando as técnicas de aprisionamento em alginato e quitosana e adsorção em bagaço de cana e bucha vegetal, visando melhorar a produção de etanol e levana.

2.1. Objetivos específicos

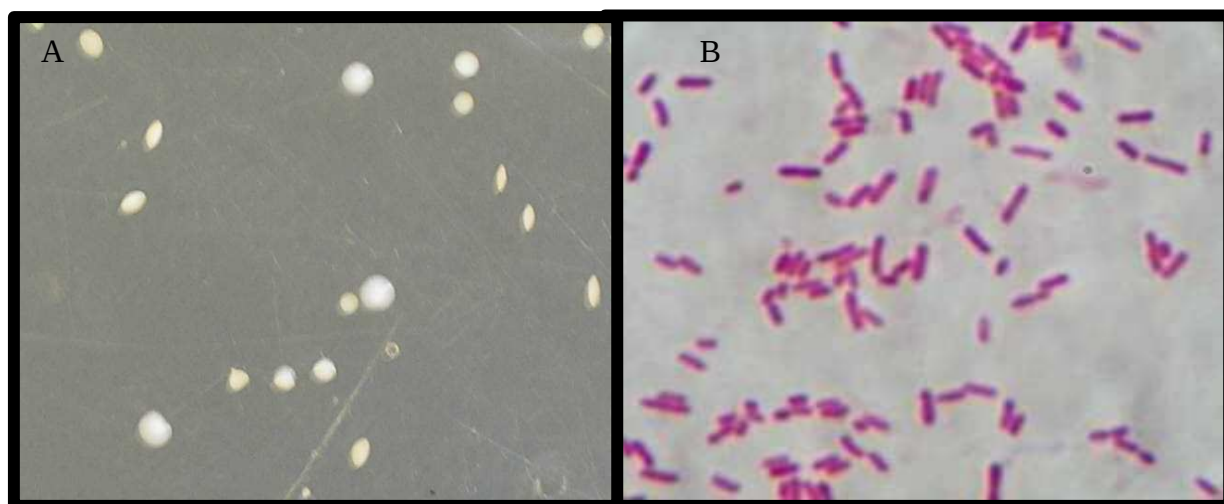
- Imobilizar as células de *Zymomonas mobilis* CCT4494, utilizando as técnicas de aprisionamento em alginato e quitosana, e adsorção em bagaço de cana e bucha vegetal.
- Determinar as condições ótimas para a produção de etanol e levana, utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR), para avaliar o efeito das variáveis independentes: pH inicial do meio de cultivo; concentração de substrato (sacarose); agitação do meio de cultivo; temperatura e tempo de incubação.
- Avaliar a técnica e o suporte mais promissores para a produção de etanol e levana.
- Determinar a capacidade de reutilização do sistema imobilizado por fermentação por batelada seqüencial.

3. Revisão bibliográfica

3.1. *Zymomonas mobilis*

A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram Negativa, pertence à classe Proteobacteria e faz parte da família *Sphingomonadaceae*, a qual foi isolada pela primeira vez de bebidas fermentadas (MADIGAN et al., 2010; SWINGS; DE LEY, 1977). É um microrganismo anaeróbio facultativo, mesófilo com temperatura ótima de desenvolvimento entre 25 e 30 °C, e valores de pH entre 5 e 7. São bastonetes curtos e largos, arranjados aos pares ou de forma isolada (Figura 1B), com flagelos mono ou lofotríquios (HAYASHI et al., 2011; MADIGAN et al., 2010; MESQUITA, 2008; SWINGS; DE LEY, 1977).

Figura 1. Aspecto macroscópico das colônias (A) e microscópico (1000 x) (B) de *Zymomonas mobilis*.



Mesquita (2008).

A *Zymomonas mobilis* apresenta como exigência nutricional a presença de glicose, sacarose ou frutose no meio de cultivo, gerando quantidades praticamente equimolares de etanol e CO₂. Devido a tal exigência, esta bactéria não cresce em meios utilizados rotineiramente em microbiologia, como o caldo nutriente e ágar padrão para contagem, sendo estes meios comumente utilizados para verificar a pureza da cultura (BEKERS et al., 2000; SWINGS; DE LEY, 1977).

Em meio líquido, seu crescimento caracteriza-se pela alta densidade celular dispersa ou pela formação de sedimentos sob a forma de flocos. Já nos meios sólidos, apresenta

crescimento lento com formação de colônias convexas, de cor creme ou esbranquiçadas, com diâmetro de 1 ou 2 mm, após incubação por 48 h à 30°C (Figura 1A). As células de *Zymomonas mobilis* podem sofrer pleomorfismo com o envelhecimento da cultura, originando morfotipos filamentosos e longos com dilatação típica na extremidade (HAYASHI et al., 2011; MESQUITA, 2008; SWINGS; DE LEY, 1977).

Esta bactéria apresenta a rara característica de manter alta eficiência na conversão de glicose, mesmo em elevadas concentrações de etanol e CO₂, onde 1 mol de glicose origina 1,6 mol de etanol e 1,8 mol de CO₂, além de pequenas quantidades de outros subprodutos como o lactato, acetaldeído, ácido acético, glicerol, acetoína, di-hidroxiketona, ácido glicônico, manitol, sorbitol e levana (HAYASHI et al., 2011; MADIGAN et al., 2010; SWINGS; DE LEY, 1977).

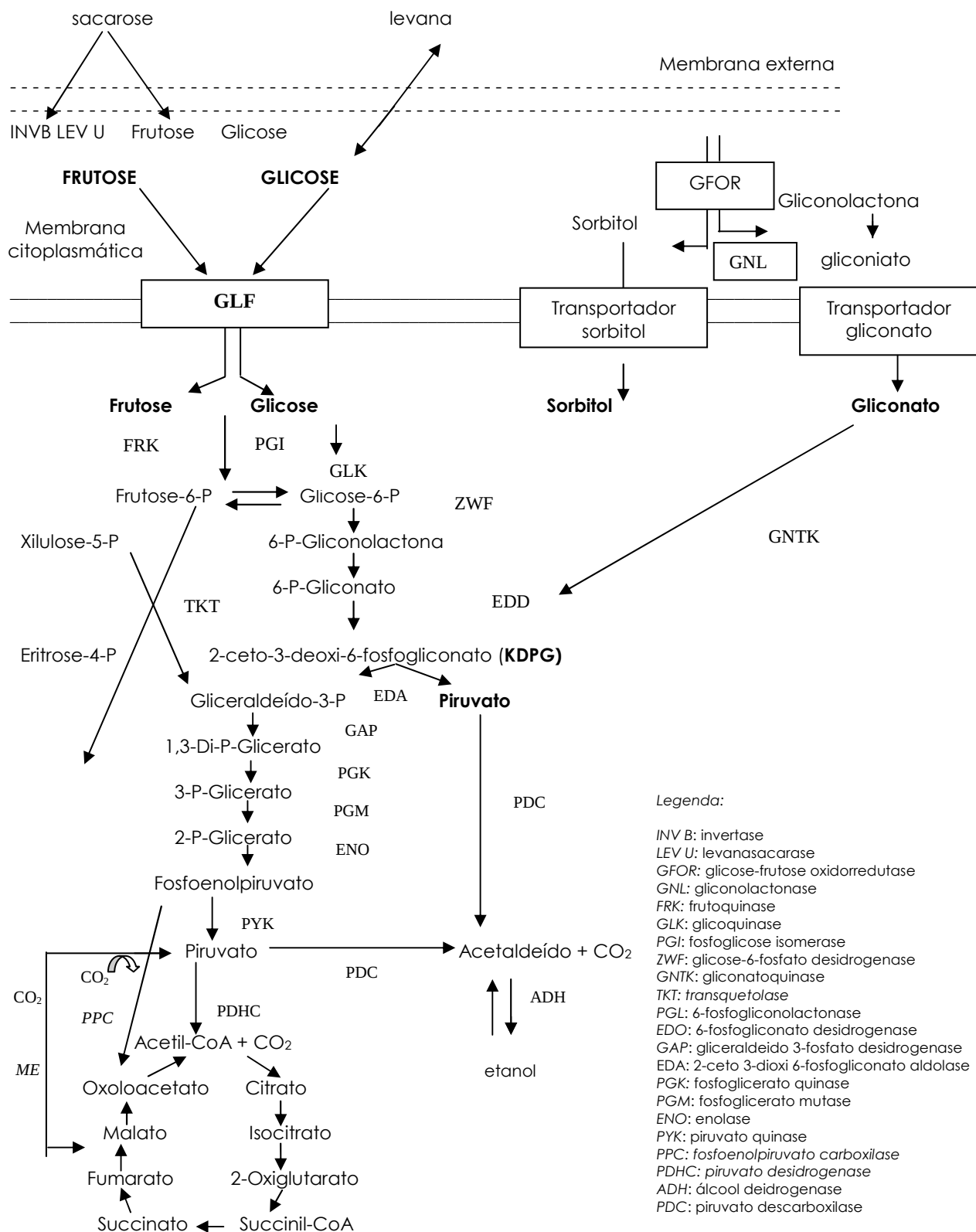
A bactéria *Zymomonas mobilis* utiliza a eficiente via metabólica Entner-Doudoroff, para a degradação de hexoses, seguida da descarboxilação do piruvato, obtendo como produto final etanol e CO₂, porém em meio contendo sacarose o rendimento de etanol é reduzido, devido à formação de subprodutos como a levana e o sorbitol, conforme demonstrado na Figura 2 (PENTJUSS et al., 2013; MADIGAN et al., 2010; BEKERS et al., 2000; VIKARI, 1988).

Segundo Kalnenieks (2006) a *Zymomonas mobilis* é o único microrganismo que utiliza a via Entner Doudoroff anaerobicamente, em vez da via glicolítica Embden Meyerof. Esta via é provavelmente a mais antiga e menos eficiente energeticamente das vias fermentativas, uma vez que produz apenas um mol de ATP para cada molécula de glicose consumida. Por outro lado, esta bactéria utiliza um sistema de difusão facilitada da glicose para o meio intracelular, pela presença de proteínas facilitadoras de transporte, apresentando alto crescimento em meio de cultura rico em açúcares (ROMANO; CONWAY, 1996).

A *Zymomonas mobilis* quando cultivada em meio contendo sacarose como fonte de carbono, tem como subprodutos da síntese de etanol, a produção de levana e sorbitol, sendo que a frutose formada a partir da hidrólise da sacarose, não é primariamente transportada para o interior das células, mas sim utilizada na formação de levana e frutooligosacarídeos pela ação da enzima levanasacarase (LOOS et al., 1994).

Durante a síntese do biopolímero levana, a *Zymomonas mobilis*, utiliza três enzimas distintas, a sacarase intracelular, a levanasacarase extracelular e a sacarase extracelular. Esta última é responsável pela hidrólise da sacarose, e a enzima levanasacarase tem a função de converter a sacarose em frutanas, formando a cadeia da levana (HETTWER et al., 1995).

Figura 2. Metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas mobilis*.



Sprenger (1996).

3.2. Imobilização celular

A maioria dos processos fermentativos convencionais utiliza células livres no meio de cultivo, porém o emprego de microrganismos imobilizados potencializa a produção, devido à elevada concentração de células nos suportes (PHISALAPHONG et al., 2007).

A imobilização é uma estratégia para aumentar a eficiência dos processos fermentativos convencionais, que possibilita a reutilização de biocatalisadores por longos períodos. E ainda, reduz os custos de produção, aumenta a proteção das células contra agentes inibidores e facilita a separação dos biocatalisadores da fase aquosa, onde se encontram os produtos de interesse tecnológico (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006).

A imobilização consiste no confinamento físico de biocatalisadores (células microbianas ou enzimas), em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua, possibilitando a reutilização das mesmas em processos subsequentes (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

Dentre as diversas aplicações de biocatalisadores imobilizados, pode-se destacar sua utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica e médica, também em processos de controle biológico e biorremediação. Além disso, algumas técnicas de imobilização possibilitam estudos com microrganismos capazes de se desenvolverem em ambientes estressantes (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996).

Em se tratando da utilização de células imobilizadas para a biorremediação de áreas contaminadas, verifica-se que já existem diferentes aplicações bem sucedidas desta técnica, como por exemplo, a utilização de células de *Bacillus* spp. imobilizadas em espuma de poliuretano para degradar *o*-ftalato (PATIL et al., 2006) e também, o tratamento de efluentes contaminados com corantes, por células imobilizadas de *Funalia trogii* (PARK et al., 2006).

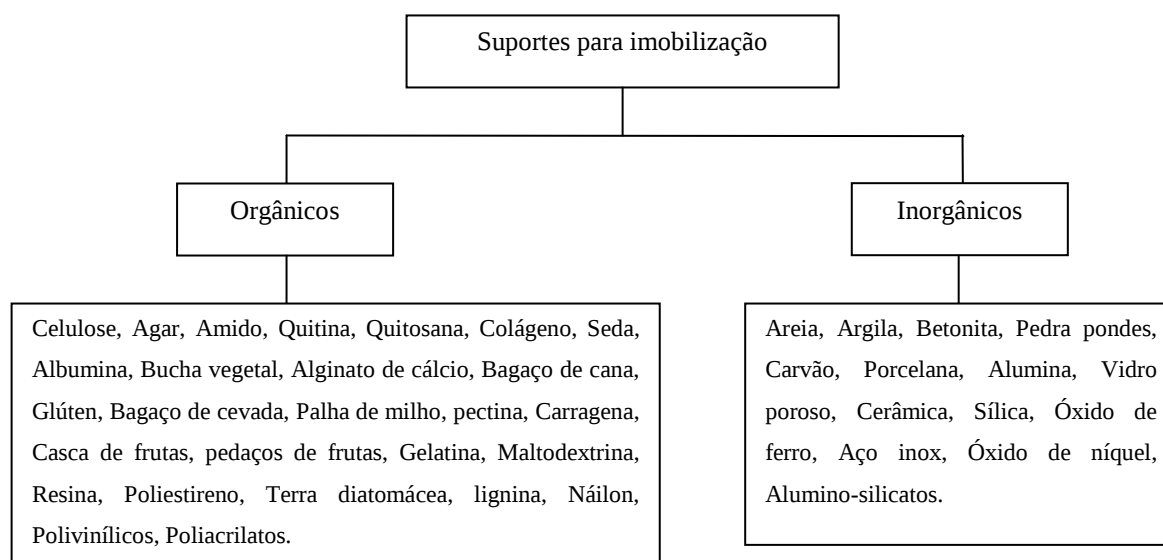
Na indústria de alimentos e sucroalcooleira, dentre as principais aplicações da tecnologia de imobilização, podem-se destacar a utilização de células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol, bem como de vinhos e cervejas (STANISZEWSKI et al., 2009; FERRARO et al., 2000).

Outro exemplo é a produção de xilitol a partir de células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em bagaço de cana de açúcar (SANTOS et al., 2008) e a utilização de células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para a biossíntese de levana e etanol (BEKERS et al., 2001).

Na literatura existem diferentes suportes para imobilizar células e enzimas, conforme destacado na Figura 3. Os principais suportes usados na imobilização por aprisionamento em matrizes e encapsulamento, incluem os alginatos, k-carragena, pectina, ágar-agar, quitosana, gelatina, colágeno e polivinil álcool. (NORTON; D'AMORE, 1994; PARASCANDOLA et al., 2006).

Dentre as diferentes metodologias (Figura 4) para imobilização celular, o aprisionamento em matriz porosa e a adsorção em suportes poliméricos são as mais utilizadas, por apresentarem maior efetividade e facilidade na execução.

Figura 3. Esquema representativo dos principais suportes utilizados em imobilização celular e enzimática.



3.2.1. Principais métodos de imobilização celular

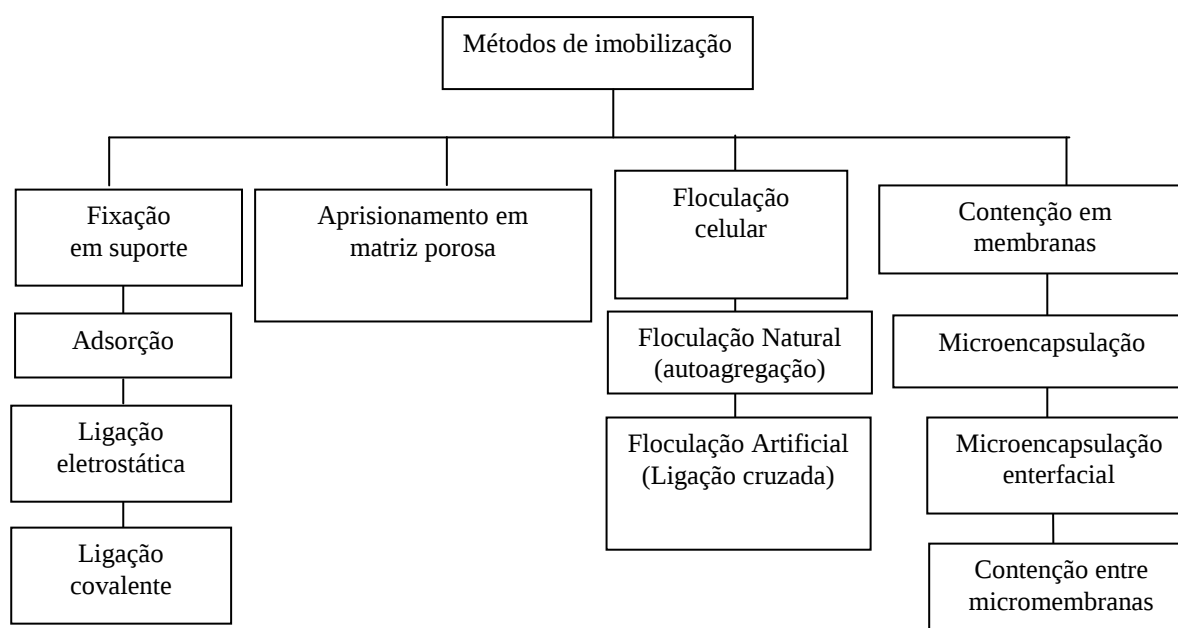
3.2.1.1. Imobilização por floculação celular

Os microrganismos apresentam naturalmente a característica de formar agregados celulares, dependendo das condições do meio de cultivo. Este fenômeno é observado mais comumente em fungos e algas e em menores casos entre bactérias. Pode haver também a formação de agregados celulares entre microrganismos diferentes (co-imobilização), que é bastante utilizada em processos de biorremediação (PENG; BLY, 1998).

A imobilização por floculação celular é definida por vários autores como a agregação de células de maneira natural ou induzida artificialmente por um agente ligante como o glutaraldeído, formando aglomerados celulares que se sedimentam com facilidade, sem a necessidade de utilizar suportes (JIN; SPEERS, 1998).

A floculação é uma técnica muito adotada pelas indústrias de bebidas, principalmente àquelas produtoras de vinho e cerveja, pois a utilização de leveduras floculantes afeta de forma positiva a produtividade e a qualidade dos produtos, além da possibilidade de reutilizar a massa celular em processos subseqüentes, devido a fácil recuperação das mesmas (KOURKOUTAS et al., 2004).

Figura 4: Esquema representativo de alguns métodos de imobilização.



3.2.1.2. Imobilização por fixação em superfície sólida

A técnica de adsorção em superfícies sólidas, pode ser realizada por meio de interações iônicas ou por ligações covalentes entre os grupos reativos do suporte e do biocatalisador. Neste tipo de imobilização os principais suportes utilizados incluem materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana, e a bucha vegetal (DOMINGUEZ et al., 2001; KOURKOUTAS et al., 2004).

A imobilização por adsorção é um método simples, eficiente e de baixo custo, tendo como única desvantagem, o desprendimento de parte dos biocatalisadores para o meio reacional. Uma alternativa para evitar tais perdas, e aumentar a concentração de biocatalisadores imobilizados, é a utilização de suportes porosos, que possibilitem a ligação do biocatalisador também à superfície interna do suporte (GROBOILLOT et al., 1994).

A camada do biofilme microbiano formado na superfície do suporte atinge espessura de aproximadamente 1 mm. Não existe barreira física entre as células em suspensão e as fixas no suporte, e por isso, pode haver desprendimento de células para o meio reacional, resultando em um potencial de equilíbrio entre elas (NORTON; D'AMORE, 1994).

Na literatura existem diferentes aplicações de microrganismos imobilizados por adsorção, como por exemplo, em pesquisa realizada por Vignoli et al. (2006), os quais utilizaram células de *Zymomonas* spp. imobilizadas em bucha vegetal para a produção de sorbitol e obtiveram produção de 50 g/L. Outro exemplo é a utilização de bagaço de cana para imobilizar *Candida guilliermondii* objetivando produzir xilitol (SANTOS et al., 2008).

Phisalaphong et al. (2007) avaliaram a eficiência da imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* M 30 em suporte composto por uma mistura de alginato e bucha vegetal, visando a produção de etanol. Estes autores verificaram produção após 48 h de fermentação de 91,7 g/L de etanol, sendo o suporte eficiente para a imobilização e resistente mecanicamente.

3.2.1.3. Imobilização por aprisionamento em matrizes porosas e encapsulamento

Na imobilização por aprisionamento em matrizes porosas, as células ficam inseridas entre a malha rígida/semi-rígida da matriz, tendo sua difusão para o meio reacional impedida pelo acúmulo celular ou pelo próprio suporte (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006; KOURKOUTAS et al., 2004). Este processo confere às células proteção frente às condições adversas de pH, temperatura e compostos inibidores. E ainda, possibilita a troca de nutrientes, metabólitos e gases, entre as células imobilizadas e o meio reacional (PARK; CHANG, 2000).

A imobilização sob a forma de esferas é a mais utilizada, devido à elevada área superficial que apresenta. A porosidade do material utilizado é essencial para a difusão adequada de oxigênio e nutrientes do meio de fermentação para o interior das esferas. Estudos demonstram que a melhor transferência de oxigênio foi observada utilizando géis de alginato, com 0,1- 0,15 mm (OGBONNA et al., 2000).

Ciani e Ferraro (1996) observaram que a utilização de cultura mista de *Candida stela* e *Saccharomyces cerevisiae*, ambas imobilizadas em alginato, propiciou aumento na eficiência

da fermentação para a produção de vinho, devido à alta concentração da biomassa no suporte e redução na competição entre estes microrganismos. Suzzi et al. (1996), também utilizaram células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato, para a produção de vinho e observaram maior facilidade na separação e reutilização da biomassa em fermentações subsequentes.

Ani e Wahidin (2006) utilizaram a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* imobilizada em esferas de alginato de cálcio para a produção de ácido láctico a partir de resíduos de abacaxi, onde obtiveram resultado satisfatório (30 g/L) após 36 h de fermentação.

No encapsulamento, as células encontram-se envoltas por uma membrana, não havendo a formação de matriz entre a massa celular. Esta técnica consiste na contenção de células em membranas filtrantes microporosas, microencapsulação, ou por interações entre as superfícies de dois líquidos imiscíveis, denominada microencapsulação interfacial (PARK; CHANG, 2000).

Nesta técnica pode-se utilizar membranas pré-formadas ou promover a formação *in situ* da membrana em torno das células. São muito utilizadas em fermentações contínuas, como por exemplo, nas indústrias de vinhos e cervejas (KAREL et al., 1985; CUNHA, 2005).

A encapsulação oferece algumas vantagens em relação ao aprisionamento entre matrizes, como prevenção da perda celular para o meio de fermentação e menor limitação na transferência de massa, pela ausência da formação de gel no núcleo da esfera (PARK; CHANG, 2000; CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006).

Boza et al. (2004) obtiveram aplicação promissora desta técnica para a produção de polissacarídeos, utilizando gel de maltodextrina por culturas liofilizadas de *Beijerinckia* spp.

3.3. Imobilização celular na produção de etanol

O bioetanol é um composto orgânico, obtido pela fermentação de meio de cultivo rico em carboidratos, seguido de destilação. Tem diferentes aplicações em processos industriais, sendo a maioria direcionada à produção de biocombustíveis (UNREAN; SRIENC, 2010; STANISZEWSKI et al., 2009).

A produção de bioetanol surgiu como uma forma de solucionar o problema da crise energética mundial, devido à escassez de combustíveis fósseis. Diante desta realidade, intensas pesquisas têm sido realizadas visando a produção de etanol, por meio da utilização de substratos alternativos como os resíduos agrícolas e industriais (BEHERA; RAY;

MOHANTY, 2010; STANISZEWSKI; KUJAWSKI; LEWANDOWASKA, 2009; YAMASHITA et al., 2008).

O uso deste combustível como fonte alternativa de energia, tem avançado muito no sentido de contribuir para a redução nos índices de poluentes emitidos, menores custos com importação de petróleo, bem como para criação de maiores oportunidades para políticas de desenvolvimento sustentável (BEHERA et al., 2010; NIKOLIC' et al., 2009; MOHAGHEGHI et al., 2006).

Vários pesquisadores têm estudado a obtenção de etanol por via fermentativa com células imobilizadas ou livres, e observaram que esta pode ser realizada utilizando diferentes substratos, como por exemplo, açúcares (glicose, frutose, sacarose), bagaço de cana, soro de queijo, vinhaça, melaço, palha de milho e arroz, dentre outros (GHORBANI et al., 2011; STANISZEWSKI et al., 2009; UNREAN; SRIENC, 2010).

Nikolic' et al. (2009) utilizando farelo de trigo como substrato para a produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* imobilizadas em esferas de alginato, observaram que o suporte foi eficiente para a produção de etanol e promoveu maior tolerância da cultura a alta concentração de etanol, sendo 10,23 % a maior concentração obtida pelo processo com células imobilizadas.

Em estudo realizado por Unrean e Srienc (2010) utilizando linhagens de *Escherichia coli* modificadas geneticamente, em sistema imobilizado, para produzir etanol a partir de mistura de xilose, arabinose e glicose como fonte de carbono, observaram produção durante sucessivos ciclos de fermentação, com máxima produção de 36,7 g/L de etanol em meio com glicose e xilose.

Jamai et al. (2001) avaliaram as diferenças fisiológicas entre *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, para a produção de etanol, utilizando glicose como fonte de carbono. Estes autores obtiveram maior produtividade para *Saccharomyces cerevisiae* com 5,16 g/(L.h), e as duas espécies apresentaram alterações na taxa de crescimento, taxa respiratória e tolerância a altas concentrações de etanol, demonstrando que os microrganismos quando imobilizados em um suporte, apresentam adaptações morfológicas e fisiológicas.

Yu et al. (2007) testaram bagaço de sorgo como suporte para a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* visando a síntese de etanol, e obtiveram maior produção com concentração inicial de sacarose de 20 %, em 16 h de fermentação, com produtividade de 16,68 (g/L.h).

Segundo Kalnenieks (2006), a produção de etanol por *Zymomonas* spp. tem velocidade três a cinco vezes maior do que a observada em leveduras. Esta bactéria apresenta ainda, crescimento celular não associado ao consumo de substrato, fato este importante para processos fermentativos contínuos.

A produção de etanol utilizando cultivo misto, de células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato e células livres de *Pichia stipitis*, foi avaliada por Peiris et al. (2009), utilizando como substrato uma mistura de xilose e glicose e obtiveram fator de conversão de substrato em produto de 0,49-0,50 g/g. Verificaram também, que a bactéria apresentou capacidade em utilizar outras fontes de carbono, quando em co-cultura com a levedura *Pichia stipitis*.

Behera et al. (2010) avaliaram a produção de etanol por células de *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando como substrato flores de *Madhuca latifolia* L., uma planta típica e abundante nas florestas da Índia. Estes autores obtiveram rendimento em etanol, com base na massa seca de substrato, de 154,5 g/kg⁻¹ e 134,55 g/kg⁻¹, respectivamente.

Yamashita et al. (2008) utilizaram lodo residual da indústria de papel, rico em carboidratos, para a produção de etanol com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato, obtendo maior produção de etanol (18 g/L) em 48 h de fermentação. Estes autores observaram ainda, que as células imobilizadas permaneceram viáveis durante 4 ciclos de reutilização, com produção de etanol.

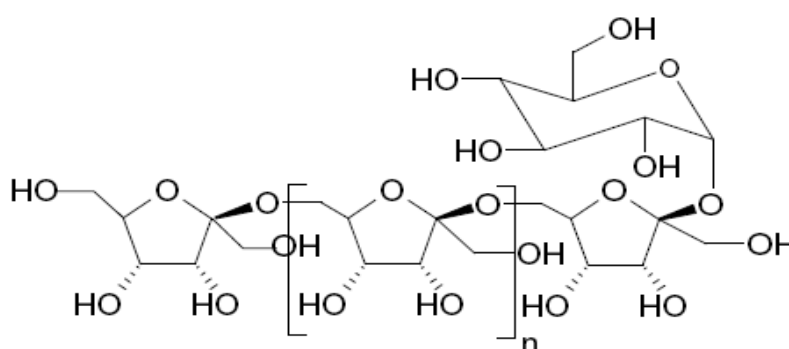
Em pesquisa realizada por Kannan et al. (1998) utilizando linhagem mutante de *Zymomonas mobilis* imobilizada em esferas de alginato, com meio de cultivo a base de sacarose, verificou-se melhor produção de etanol (67,1 g/L) em 25 % de sacarose, durante 15 h de fermentação. Esta melhor produção foi inversamente proporcional à formação dos subprodutos sorbitol e levana.

Bandaru et al. (2006), avaliaram a utilização de amido de sagu, como fonte de carbono para a produção de etanol, utilizando células de *Zymomonas mobilis* co-imobilizadas com amiloglucosidase e obtiveram resultados promissores, uma vez que a co-imobilização potencializou a produção de etanol, em até 55,3 g/L.

3.4. Imobilização celular na produção de levana

A levana é um exopolissacarídeo constituído de unidades de frutose, unidas por ligações β (2-6), sob forma linear ou ramificada em β (2-1) (Figura 5). É sintetizada por vários microrganismos, principalmente pela bactéria *Zymomonas mobilis*, durante a fermentação de meio de cultura à base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais (SWINGS; DE LEY, 1977; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009; CALAZANS et al., 2000).

Figura 5. Estrutura β (2-6) da ramificação principal da levana.



A síntese de levana é realizada pela enzima levanasacarase que utiliza a sacarose como substrato. Hettwer et al. (1995) relataram que a bactéria *Zymomonas mobilis* possui três enzimas distintas: a sacarase intracelular (SacA), a levanasacarase extracelular (SacB) e a sacarase extracelular (SacC). A função da SacA não é bem conhecida; a SacC é responsável pela hidrólise da sacarose e a SacB, também conhecida como levanasacarase, tem a função de converter a sacarose em unidades de frutose unidas por ligações β (2-6), transferindo o radical fructosil da sacarose para o C-6 da frutose no terminal não redutor, formando a cadeia da levana.

De acordo com Ernandes (2009) e Costa et al. (2001) diferentes fatores influenciam a produção de levana, como por exemplo, a fonte de carbono utilizada, variações no pH do meio de fermentação e na temperatura de incubação.

Este polissacarídeo tem aplicações na indústria de alimentos como estabilizante, espessante, fixador de cor e sabor e apresenta elevado potencial edulcorante quando hidrolisada em frutose. Em alimentos funcionais, representa um agente prebiótico eficiente para o crescimento de *Bifidus* spp. No setor farmacêutico, estudos indicam aplicações como

agente hipocolesterolêmico, anticarcinogênico e imunomodulador (TANO; BUZATO, 2002; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005; MURO et al., 2000; CALAZANS et al., 1997).

Segundo Ernandes e Garcia-Cruz (2009) a produção de levana microbiana, em escala industrial, é uma alternativa para substituir gomas como a xantana e dextrana que tem elevado custo de produção. Seu estudo também é voltado para interesses econômicos, uma vez que a levana é um subproduto da fabricação de etanol (BEKERS et al., 1997).

Este biopolímero apresenta características importantes para sua utilização em alimentos, como baixa viscosidade, alta solubilidade em água e ausência de toxicidade. Porém, tem sua utilização limitada devido à baixa produção pelos processos convencionais, que utilizam células livres no meio de fermentação (CALAZANS et al., 1997; BEKERS et al., 2000).

A imobilização de células é uma alternativa para aumentar a eficiência dos processos fermentativos, garantindo maior proteção às células e facilidade em recuperá-las do meio. Em trabalho realizado por Bekers et al. (1997), foi observada a produção de 12,7 g/L de levana com *Z. mobilis* imobilizada em alginato e a utilização de menor biomassa inicial, uma vez que esta apresentou bom crescimento no suporte durante o processo.

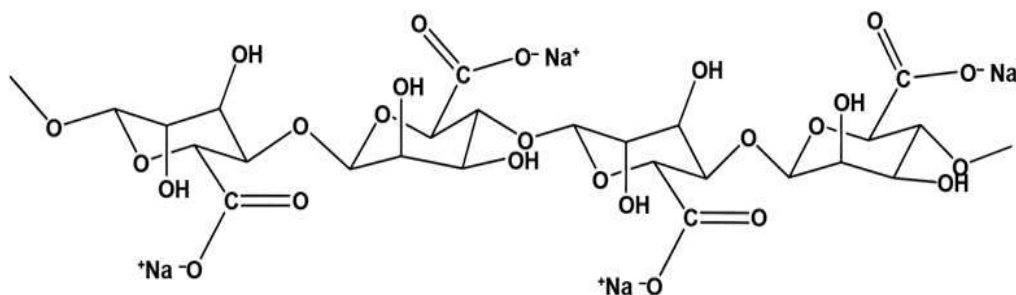
Em estudo realizado por Kannan et al. (1998) utilizando uma linhagem mutante de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em esferas de alginato, sendo o meio de cultivo a base de sacarose, verificaram a produção de 8,10 g/L de levana.

Além da bactéria *Zymomonas mobilis*, têm sido utilizadas outras bactérias, como por exemplo, o *Bacillus subtilis*. Shih et al. (2010) ao testarem este microrganismo imobilizado em esferas de alginato, observaram elevada eficiência na produção de levana (70,6 g/L) em 72 h de fermentação, quando comparada às células livres. Observaram ainda, a manutenção da estabilidade das esferas contendo a biomassa, durante 5 ciclos de reutilização sem perda da atividade catalítica.

3.5. Alginatos

Os alginatos são polímeros lineares constituídos por ligações β (1,4) de ácido D-manurônico e α (1,4)-L-ácido gulurônico (Figura 6), produzidos principalmente por algas marrons, mas também podem ser sintetizados por microrganismos dos gêneros *Pseudomonas* spp. e *Azotobacter* spp. (SABRA et al., 2001; GOMES, 2007).

Figura 6. Estrutura química do alginato de sódio.



A principal alga utilizada para a produção de alginato comercial é a alga gigante denominada *Macrocystis pyrifera*, encontrada abundantemente nas costas da América do Norte e do Sul, Nova Zelândia, Austrália e África (GLICKSMAN, 1987).

O alginato bacteriano é um possível substituto para o alginato obtido a partir de algas marrons, porém, este último ainda é o mais consumido (BRIVONESE e SUTHERLAND, 1989). Segundo Clementi et al. (1999), a produção de alginato por bactérias como polímero industrial, ainda é um assunto controverso.

Este polímero quando exposto a presença de íons cálcio, forma ligações intercruzadas entre seus grupamentos poligalacturônicos, provocando um rearranjo das cadeias lineares, com formação de uma rede tridimensional. Tais cadeias serão mais fortes mecanicamente, quanto maior for a concentração de monômeros α (1,4)-L-ácido gulurônico da cadeia original (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996). Diante desta característica, este suporte é bastante utilizado como suporte para a imobilização de microrganismos e enzimas.

Este polímero apresenta algumas vantagens em sua utilização, como a grande disponibilidade no mercado, possibilidade de ampliação da escala de produção e a aceitação do alginato de sódio e cloreto de cálcio como aditivos na produção de alimentos (CHAMPGNE et al., 2000).

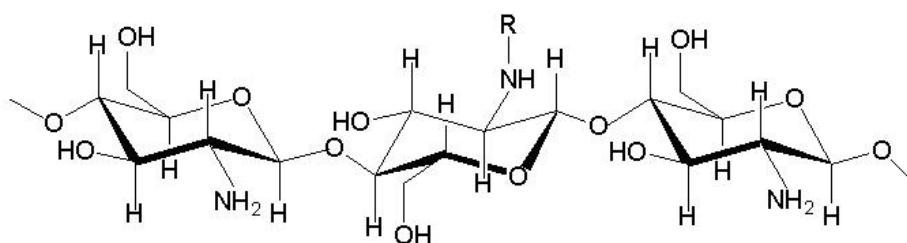
3.6. Quitosana

A quitosana é formada por unidades β (1, 4) 2 amino-2-deoxi-D-glucose, com cadeia polimérica similar à celulose (Figura 7). É um polímero natural derivado da desacetilação da quitina, oriunda de carapaças de crustáceos, sendo considerado o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, atrás somente da celulose (ASSIS; LEONI, 2003).

A diferença da celulose para a quitosana se encontra somente nos grupos funcionais. O grupo hidroxila (OH) está presente na forma geral desses dois polissacarídeos, no entanto, somente a quitosana possui o grupo amino (NH_2) o que lhe confere solubilidade em meio ácido diluído, por meio da protonação do grupo amino que origina o íon NH_3^+ (MENDES et al., 2011).

A quitosana é um polímero natural, de baixo custo, renovável e biodegradável com grande importância econômica e também ambiental, uma vez que sua utilização pode reduzir o impacto ambiental gerado pelo descarte de carapaças de crustáceos pelas indústrias pesqueiras (MENDES et al., 2011).

Figura 7. Estrutura química da quitosana



Na literatura são escassas as pesquisas que utilizam exclusivamente a quitosana como suporte para imobilização, isso porque este polissacarídeo apresenta variações no grau de desacetilação em sua massa molecular, que podem dificultar a formação do suporte e da imobilização, e ainda, apresenta potencial antimicrobiano frente a alguns microrganismos (CRAVEIRO et al., 1999; LIU et al., 2004).

Em metodologias de imobilização utilizando a quitosana, esta funciona como um agente polimerizante, fornecendo maior estabilidade ao arranjo molecular do suporte. Esta pode ser utilizada sob a forma de filmes, membranas e esferas (WEN-TAO et al., 2005).

A imobilização em esferas consiste no gotejamento da solução de quitosana, contendo a enzima ou o microrganismo, em solução alcalina para formação instantânea das esferas por meio de ligações entrecruzadas entre os reagentes (HE et al., 1999).

3.7. Bucha vegetal (*Luffa cylindrica* L.)

A *Luffa cylindrica* L. popularmente conhecida como bucha vegetal, é uma planta subtropical, abundante na China, Japão e em países da América do Sul como, por exemplo, o Brasil onde é comumente encontrada (NAGLIS; ALMEIDA, 1994; ALMEIDA et al., 2005).

Esta planta é bastante conhecida pela produção de frutos leves, cilíndricos e que apresentam naturalmente uma arquitetura entrelaçada e com alta porosidade. Essas características conferem a bucha vegetal, grande potencial para utilização como suporte de imobilização (OGBONNA et al., 1996).

Tais frutos têm composição básica de: 4,2% de proteínas, 37,81% de carboidratos e 55,78% de fibras, sendo esta última, formada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (SAEED; IQBAL, 2013).

A imobilização em bucha vegetal é realizada por adsorção física das células ou enzimas entre a rede de material lignocelulósico que a compõe. Devido a sua composição ser basicamente hemicelulósica, a bucha vegetal é susceptível a degradações por enzimas celulasas, sendo necessários procedimentos de pré-tratamento prévio no suporte quando se utilizam microrganismos celulolíticos (HIDENO et al., 2007).

Em trabalho realizado por Poças et al. (2004), empregando bucha vegetal como suporte para imobilização da enzima invertase, obteve-se altos rendimentos para a produção de xarope de açúcar invertido, quando este suporte foi tratado antes da imobilização.

3.8. Bagaço de cana

O bagaço de cana é um resíduo muito abundante no país, produzido a partir do processamento da cana-de-açúcar, totalizando cerca de 580.000 toneladas de cana moída na safra 2012/13 (CONAB, 2013).

Este resíduo proveniente da moagem da cana de açúcar tem composição média de 50% de umidade, 2% de sólidos solúveis e 46% de fibra, sendo que desta, a celulose ocupa de 32-50%, a hemicelulose de 19-25% e a lignina de 23-32% (HAMELINK et al., 2005).

Devido ao fato de ser composto basicamente por material lignocelulósico, ter elevada porosidade e alta resistência a condições ambientais pode ser empregado para uma infinidade de aplicações industriais, como por exemplo, para a geração de energia, produção de ração animal, produção de papel e celulose, madeira prensada, produção de álcool e enzimas e ainda, como suporte para a imobilização de células em processos fermentativos (SANTOS et al., 2008).

As principais vantagens em utilizar este subproduto agroindustrial para imobilização celular são seu baixo custo e elevada disponibilidade, além de apresentar alta porosidade e grande superfície para a fixação microbiana (YU et al., 2010). Alguns estudos ressaltam a

necessidade de realizar tratamentos prévios à imobilização, objetivando aumentar a afinidade entre a célula e o suporte (CARVALHO et al., 2002).

Santos et al. (2008) avaliaram a utilização deste subproduto como suporte para a imobilização de *Candida guilliermondii* para produzir xilitol. Estes autores obtiveram resultados satisfatórios, indicando o bagaço de cana como alternativa de baixo custo como suporte para a produção de xilitol.

4. Material e métodos

4.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, obtida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” - Campinas - SP.

4.2. Meios de Cultura

4.2.1. Meio de manutenção e pré-fermentação

Este microrganismo foi mantido a temperatura de 4°C em “Caldo *Zymomonas mobilis*” (Caldo ZM), contendo 10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona e 20 g/L de glicose, sendo reativado mensalmente. Para a realização da pré-fermentação foi utilizado este mesmo meio de cultivo.

4.2.2. Meio de fermentação

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio basal, proposto por Rodrigues e Callieri (1986) com algumas modificações, conforme descrito na Tabela 1. A este meio, foram adicionadas diferentes concentrações de sacarose; as quais foram esterilizadas separadamente da solução de sais, a 121°C/15 min.

Tabela 1. Composição do meio basal em g/L.

Reagentes	(g/L)
Extrato de levedura	5
Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	1
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	1
Sulfato de amônia ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1

4. 3. Condições de fermentação

4.3.1. Pré Fermentação

A cultura estoque de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, foi repicada em tubos contendo caldo ZM, e incubada por 24 h. a 30°C para reativação da cultura. Após este período, estes tubos foram vertidos em frascos de pré-fermentação, contendo 50 mL de caldo ZM e incubados sob as mesmas condições da reativação.

4.3.2. Preparo e padronização do inóculo

Para a realização dos ensaios, o conteúdo dos frascos da pré-fermentação (item 4.3.1) foi centrifugado a 3660xg por 15 min., o sobrenadante foi descartado e o “pellet” de células foi re-suspendido em solução salina 0,85% obtendo-se uma suspensão celular concentrada. A partir desta suspensão, a concentração de células adicionadas ao suporte, foi padronizada por espectrofotometria, de acordo com Vignoli (2003), conforme descrito a seguir:

Foram adicionados 2 mL de água destilada em uma cubeta de espectrofotômetro e a suspensão celular foi gotejada de forma a obter uma absorbância de 0,7 a 570 nm. Por meio de uma regra de três, foi calculado o volume de inóculo a ser adicionado ao suporte de imobilização. Utilizando uma curva de calibração (item 4.3.3) que relaciona a concentração celular de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e a absorbância obtida pela suspensão, foi possível calcular a quantidade de inóculo adicionado ao suporte de imobilização.

Para todos os experimentos realizados utilizando todos os suportes de imobilização, o inóculo inicial de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 foi padronizado a 0,85 g de massa seca/L, correspondente a absorbância de 0,7 a 570 nm.

4.3.3. Curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494

A curva de calibração foi realizada conforme Ernandes (2009), com algumas modificações. Para a construção da curva de calibração, inicialmente o microrganismo foi cultivado nas condições de pré-fermentação, em um volume de 50 mL de meio, conforme descrito no item 4.3.1, e centrifugado a 3660g durante 15 min. Após a centrifugação, a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada, a fim de remover o meio de cultura remanescente.

A massa celular úmida foi então re-suspensa em 25 mL de água destilada, que consistiu na suspensão original e posteriormente, foram preparadas diferentes diluições. Um volume de 7 mL da diluição original e de cada diluição da suspensão de células, foi adicionado em cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados em balança analítica. Em paralelo, foram feitas leituras da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm, na amostra da suspensão celular original e nas diluídas.

Estes cadinhos foram levados a estufa a 105°C por 24 h. Após esta etapa, os cadinhos foram transferidos para um dessecador a temperatura ambiente por 30 minutos para o resfriamento, e posteriormente foram pesados em balança analítica. Esta operação foi repetida até a obtenção de peso constante.

A massa celular de *Zymomonas mobilis*, foi calculada pela subtração do peso dos cadinhos contendo as células e o peso dos cadinhos vazios e secos.

Com base nas absorbâncias das amostras e a massa celular seca obtida, foi construída a curva de calibração, relacionando a absorbância com a concentração celular (Anexo: Tabela 1 e Figura 1).

4.4. Imobilização

4.4.1. Imobilização por aprisionamento em alginato

As células de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em concentração pré-estabelecida, como descrito no item 4.3.2, foram adicionadas na solução de alginato a 3%, previamente preparada e esterilizada, sob agitação em agitador magnético por 10 min., e então esta mistura foi

gotejada com auxílio de seringa hipodérmica em solução de cloreto de cálcio a 0,2 M, sob agitação, obtendo-se esferas de aproximadamente 3 mm de diâmetro, conforme descrito por Souza Júnior (2006) com algumas modificações. As esferas foram mantidas sob refrigeração, por 24 h. a 4°C para a maturação. Após este período, as esferas foram lavadas em água destilada esterilizada e 10 g foram adicionados aos frascos de Erlenmeyer contendo 40 mL de meio de fermentação e a fonte de carbono (Figura 8A).

Figura 8. Aspecto das esferas de alginato de cálcio após gotejamento em cloreto de cálcio e adição em meio de fermentação (A) e aspecto das esferas de quitosana logo após o gotejamento em solução de NaOH 1 M (B).



4.4.2. Imobilização por aprisionamento em quitosana

As células de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em concentração pré-estabelecida como descrito no item 4.3.2, foram adicionadas em uma solução de quitosana a 4%, previamente dissolvida em ácido acético 1% e esterilizada por fervura a 100°C por 5 min.

A suspensão célula-quitosana foi mantida sob agitação em agitador magnético por 10 min., e então foi gotejada em solução de NaOH 1 M, com agitação, obtendo-se esferas com diâmetro de aproximadamente 3 mm, conforme Gomes (2007) com adaptações. As esferas foram mantidas em refrigeração, por 24 h. a 4 °C para maturação, e então foram lavadas duas vezes em água destilada esterilizada, para remover o excesso de hidróxido de sódio (Figura

8B), e posteriormente, foram adicionadas aos frascos de Erlenmeyer, contendo o meio de fermentação e a fonte de carbono.

4.4.3. Imobilização por adsorção em bucha vegetal

A imobilização em bucha vegetal foi realizada conforme descrito por Vignoli et al., (2006) com modificações.

A bucha vegetal foi fracionada em pedaços de 2/2 cm, e esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos. A seguir, 0,6 g de bucha foram adicionadas para cada frasco de imobilização (quantidade máxima para que o suporte permanecesse imerso no meio de fermentação), contendo o meio de pré-fermentação descrito no item 4.2.1, e então foram inoculados com a suspensão celular, obtida na pré-fermentação (item 4.3.1). Estes frascos foram incubados em agitador orbital a 150 min⁻¹ na temperatura de 30°C durante 24 h.

Após este procedimento, as peças de bucha foram lavadas em água destilada esterilizada para remover a microbiota não aderida ao suporte, e então foram transferidos, sob condições assépticas, para os respectivos frascos contendo o meio de fermentação e a fonte de carbono (Figura 9A).

4.4.4. Imobilização por adsorção em bagaço de cana

O método de imobilização em bagaço de cana foi realizado conforme descrito por Chandel et al. (2009) com algumas modificações.

O bagaço de cana utilizado como suporte para a adsorção de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 foi previamente lavado com água destilada para a remoção de impurezas, e então foi seco em estufa a 55°C. Em seguida, este suporte foi esterilizado a 121°C por 15 min. A padronização do inóculo foi realizada conforme descrito no item 4.3.2. A seguir, 0,6 g de bagaço estéril foram adicionados para cada frasco de imobilização, contendo o meio de pré-fermentação, descrito no item 4.2.1, e então foram inoculados com a suspensão celular obtida na pré-fermentação (item 4.3.1). Estes frascos foram incubados em agitador orbital a 150 min⁻¹ e temperatura de 30°C durante 24 h. Após este procedimento, o bagaço de cana foi lavado em água destilada esterilizada para remover a microbiota não aderida ao suporte, e então foram transferidos, sob condições assépticas, para os respectivos frascos contendo o meio de fermentação e a fonte de carbono (Figura 9B).

Figura 9. Aspecto da bucha vegetal (A) e bagaço de cana (B) após a imobilização.



4.5. Produção de etanol e levana

Para os suportes bucha vegetal e bagaço de cana, adicionou-se 0,6 g do sistema imobilizado, para cada frasco de fermentação. Para os suportes alginato e quitosana, foram adicionados 10 g de esferas para cada frasco de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL dos meios de fermentação com o pH inicial ajustado, temperatura, agitação e tempo de fermentação predeterminados pelo planejamento experimental (item 4.6).

4.6. Ensaio de fermentação com células imobilizadas sem reciclo do suporte imobilizado

Para definir as melhores condições de produção de etanol e levana utilizando os suportes de imobilização (alginato, quitosana, bagaço de cana e bucha vegetal) foi realizado um planejamento fatorial fracionado $2^{(5-2)}$ (MONTGOMERY, 2001). As variáveis independentes estudadas foram: X_1 : concentração de sacarose em g/L; X_2 : pH inicial; X_3 : temperatura de incubação em °C; X_4 : tempo de incubação em h. e X_5 : influência da agitação do meio em min^{-1} , resultando em 27 experimentos com 2 repetições, incluindo um ponto

central para cada variável, conforme demonstrado nas Tabelas 2 e 3. Após o final das fermentações, foram retiradas amostras para análise de pH final, biomassa livre no caldo de fermentação, biomassa aderida ao suporte, determinação de etanol e levana e determinação de açúcares totais.

Tabela 2. Variáveis independentes estudadas no primeiro planejamento experimental 2⁽⁵⁻²⁾.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X_1 : sacarose (g/L)	150	250	350
X_2 : pH inicial	4,0	5,5	7,0
X_3 : tempo (h)	16	56	96
X_4 : temperatura (°C)	30	35	40
X_5 : frequência de agitação (min ⁻¹)	0	100	200

4.7. Ensaio de fermentação com células imobilizadas com reciclo do suporte imobilizado

Com base nas melhores condições de produção obtidas nos experimentos 2⁽⁵⁻²⁾ utilizando a metodologia de superfície de resposta, realizou-se a reciclagem dos suportes durante 12 dias de fermentação.

Ao final de cada ciclo de fermentação, o caldo fermentado foi removido e adicionado meio fresco para o próximo ciclo de fermentação. Este procedimento foi repetido por 12 vezes com tempo de fermentação de 24 h. Ao final de cada fermentação, foi analisada a produção de levana, etanol, biomassa livre, biomassa imobilizada e açúcares totais.

Tabela 3. Delineamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$ para os suportes: alginato, quitosana, bagaço de cana e bucha vegetal.

Ensaio	Replicata	Sacarose (g/L)	pH inicial	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Agitação (min ⁻¹)
1	1	150	4,0	16,0	40,0	200
2	1	350	4,0	16,0	30,0	0
3	1	150	7,0	16,0	30,0	200
4	1	350	7,0	16,0	40,0	0
5	1	150	4,0	96,0	40,0	0
6	1	350	4,0	96,0	30,0	200
7	1	150	7,0	96,0	30,0	0
8	1	350	7,0	96,0	40,0	200
9C	1	250	5,5	56,0	35,0	100
10	2	150	4,0	16,0	40,0	200
11	2	350	4,0	16,0	30,0	0
12	2	150	7,0	16,0	30,0	200
13	2	350	7,0	16,0	40,0	0
14	2	150	4,0	96,0	40,0	0
15	2	350	4,0	96,0	30,0	200
16	2	150	7,0	96,0	30,0	0
17	2	350	7,0	96,0	40,0	200
18C	2	250	5,5	56,0	35,0	100
19	3	150	4,0	16,0	40,0	200
20	3	350	4,0	16,0	30,0	0
21	3	150	7,0	16,0	30,0	200
22	3	350	7,0	16,0	40,0	0
23	3	15,0	4,0	96,0	40,0	0
24	3	350	4,0	96,0	30,0	200
25	3	150	7,0	96,0	30,0	0
26	3	350	7,0	96,0	40,0	200
27C	3	250	5,5	56,0	35,0	100

(C): ponto central

4.8. Métodos analíticos

4.8.1. Determinação do pH final

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

4.8.2. Determinação da biomassa livre no caldo de fermentação

A biomassa livre no caldo de fermentação foi determinada por espectrofotometria a 570 nm, e correlacionada com a curva padrão como descrito no item 4.3.3. Como branco foi utilizado o mesmo meio de cultura sem a presença do microrganismo.

4.8.3. Determinação da biomassa imobilizada nos diferentes suportes

Para a determinação da biomassa imobilizada nos suportes, as esferas de alginato foram removidas dos frascos de fermentação, e dissolvidas em 10 mL de citrato de sódio 0,3 M com pH ajustado a 5 com ácido cítrico 1 M, conforme Batista (2005) com algumas adaptações. As esferas de quitosana foram dissolvidas em 10 mL de ácido acético 5% e após esta etapa, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm, e correlacionada com a curva padrão como descrito no item 4.3.3. Como branco foram utilizadas as esferas de quitosana e alginato previamente dissolvidas sem a presença do microrganismo.

Para avaliar a biomassa aderida ao bagaço de cana e às peças de bucha, estas foram retiradas do caldo de fermentação, sob condições assépticas, e adicionadas em frascos contendo 50 mL de água destilada. Estes frascos foram incubados em agitador orbital a 240 min⁻¹ durante 2 h, para a retirada das bactérias aderidas ao suporte. Após esta etapa, os suportes foram removidos e a água contendo as células foi centrifugada a 1559 g durante 5 minutos, obtendo-se assim, a massa celular. Esta foi ressuspensa em 50 mL de água destilada. A concentração celular foi determinada pela leitura da absorbância da suspensão celular a 570 nm e correlacionada com a curva padrão como descrito no item 4.3.3. Como branco foi utilizada água destilada.

4.8.4. Determinação da produção de etanol

O etanol foi determinado por microdifusão. Nesta técnica, utilizaram-se dois tubos para cada amostra, sendo um inserido no interior do outro. No tubo maior, adicionou-se 0,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e em seguida, acrescentou-se 0,1 mL da amostra de meio de fermentação sem células, previamente diluída (1:5). No tubo menor, adicionou-se 1 mL de solução de dicromato de potássio 0,145% (0,145 g de dicromato de potássio em 100 mL de ácido sulfúrico 10 N). Em seguida, com auxílio de uma pinça, o tubo

menor com dicromato de potássio, foi adicionado no interior do tubo maior, e fechou-se o mesmo rapidamente, para evitar a evaporação do etanol. Estes tubos foram incubados em banho a 45°C durante 60 min. Após este período, o tubo com dicromato de potássio, foi removido e acrescentou-se ao mesmo 0,5 mL de água destilada. Este tubo foi agitado em agitador orbital e submetido à leitura da absorbância no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Biochrom modelo Libra 22). Para o cálculo dos resultados, foi realizada uma curva de calibração entre a absorbância e diferentes concentrações de etanol (Anexo: Tabela 2 e Figura 2).

4.8.5. Determinação da produção de levana

A determinação da produção de levana foi realizada com base na técnica descrita por Viikari (1984), com algumas modificações, conforme descrito por Moro et al. (2011). Nesta técnica, retirou-se volumetricamente, uma quantidade do sobrenadante obtido após a centrifugação do meio, e adicionou-se etanol anidro gelado, sendo esta solução deixada em repouso por 24 h em temperatura de 4°C.

Após esse período, a solução foi centrifugada a 3267 g a temperatura de 4°C, durante 20 minutos, e a operação de precipitação pelo etanol foi repetida novamente para aumentar o grau de pureza do material isolado. Após esta etapa, realizou-se uma centrifugação com água destilada, sob as mesmas condições citadas anteriormente.

A levana precipitada foi hidrolisada em unidades de frutose, com ácido clorídrico 0,5% a 100°C por 60 minutos. Após a hidrólise, o material foi neutralizado com hidróxido de sódio 2 M e deixado em repouso por 20 minutos, e então a levana foi estimada indiretamente como unidades frutose (em g/L) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

Para o cálculo da concentração de levana, foram realizadas leituras de absorbância em comprimento de onda de 540 nm, tendo como base amostras com concentração de frutose conhecidas e então, foi construída uma curva de calibração Somogyi (1952) e Nelson (1944). (Anexo: Tabela 3 e Figura 3).

4.8.6. Determinação de açúcares redutores e totais

Os açúcares redutores foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1952) e Nelson (1944) e os açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956).

Foram realizadas leituras de absorvância, no comprimento de onda desejado para cada método utilizado, tendo como base amostras de açúcares com concentrações conhecidas e, posteriormente, foi construída uma curva de calibração utilizando o método Somogyi (1952) e Nelson (1944) e Dubois et al. (1956). (Anexo: Tabela 4 e Figuras 4).

4.8.7. Microscopia eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em todos os suportes, conforme a metodologia proposta por Madi-Ravazzi (2009). Os suportes foram submetidos a fixação por 6 h em glutaraldeído 3%, e em seguida, foram tratados com tetróxido de ósmio 1%, durante 1 h e então, foram desidratados com etanol nas concentrações de 30 a 100 %. Posteriormente, as amostras foram secas no ponto crítico por 1 h para a remoção total da umidade. Em seguida, foram metalizadas e submetidas à observação em microscópio eletrônico de varredura (Leo 450vpi, análises em 15v) em sala climatizada.

4.8.8. Cálculo dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados de acordo com as equações descritas abaixo:

- Coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido: $Y_{p/s} = \frac{(P_f - P_0)}{S_0 - S_f} \text{ (g/g)}$

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

Onde:

P = produtividade; P_0 = massa produto de inicial (g/L); P_f = massa de produto final (g/L); S_0 = concentração inicial de substrato (g/L); S_f = concentração final de substrato (g/L); $Y_{p/s}$ = coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido; t_f = tempo (h); t_0 = tempo inicial (h).

4.9. Análise estatística

Para a realização dos experimentos foi utilizado o planejamento estatístico fatorial fracionado (2^{k-p}) descrito por Montgomery (2001), com o auxílio do software *Statistica 6.0*.

Para avaliar os melhores parâmetros para a produção de etanol e levana foi realizada a análise estatística dos dados com a análise de variância (ANOVA) e também com gráficos de contorno da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Os resultados obtidos nas fermentações semicontínuas, durante os 12 dias de reciclo do suporte, foram avaliadas pela análise de variância e teste de Tukey utilizando o software *Minitab 14* (BOX et al., 1978).

5. Resultados e Discussão

5.1. Crescimento da biomassa nos suportes: alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana

Para os experimentos realizados utilizando o alginato como suporte de imobilização, com inóculo inicial de 0,85 g/L, tomando como base a MSR, observou-se que a sacarose e a frequência de agitação do meio de fermentação (Tabelas 4 e 5), influenciaram negativamente para o aumento da biomassa no suporte (2,65 g/L), e por outro lado, o pH inicial em torno de 7,0 apresentou interferência positiva. A temperatura não apresentou interferência no crescimento do microrganismo no suporte, conforme demonstrado na Figura 10. Com base na ANOVA, verificou-se que estes fatores também apresentaram interferência estatística significativa ($p < 0,05$) para o aumento da biomassa nas esferas de alginato (Tabela 4).

Tabela 4. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a **biomassa** de *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **alginato**.

Variáveis	Biomassa imobilizada no suporte	
	Efeito	P
X_1^*	-1,05114	0,000009
X_2^*	1,23883	0,000001
X_3	0,06327	0,730681
X_4	0,00854	0,962902
X_5^*	-1,01661	0,000015

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$).

x_1 : sacarose (g/L); x_2 : pH; x_3 : tempo (h); x_4 : temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e x_5 : frequência de agitação (min^{-1}).

Tabela 5. Planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$, utilizando o suporte **alginato**, com duas repetições no ponto central, para **biomassa imobilizada** no suporte, levana e etanol.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	B	L	YL	PT L	E	YE	PTE
1	150	4,0	16	40	200	0,28	0,4	0,015	0,03	2,5	0,09	0,16
2	350	4,0	16	30	0	0,01	6,7	0,021	0,42	8,1	0,03	0,51
3	150	7,0	16	30	200	2,10	2,6	0,017	0,16	10,2	0,07	0,64
4	350	7,0	16	40	0	2,29	0,4	0,002	0,03	12,9	0,06	0,81
5	150	4,0	96	40	0	1,90	0,7	0,007	0,01	9,1	0,09	0,09
6	350	4,0	96	30	200	0,01	6,0	0,018	0,06	17,6	0,05	0,18
7	150	7,0	96	30	0	2,65	0,1	0,001	0,00	17,8	0,14	0,19
8	350	7,0	96	40	200	0,38	0,5	0,002	0,01	6,8	0,02	0,07
9C	250	5,5	56	35	100	1,50	0,3	0,001	0,01	17,9	0,07	0,32
10	150	4,0	16	40	200	0,33	0,8	0,018	0,05	4,8	0,11	0,30
11	350	4,0	16	30	0	0,15	6,0	0,019	0,38	6,6	0,02	0,42
12	150	7,0	16	30	200	1,90	2,3	0,016	0,14	14,4	0,10	0,90
13	350	7,0	16	40	0	2,42	0,3	0,001	0,02	12,8	0,06	0,80
14	150	4,0	96	40	0	2,05	0,6	0,006	0,01	7,9	0,07	0,08
15	350	4,0	96	30	200	0,01	4,2	0,013	0,04	16,1	0,05	0,17
16	150	7,0	96	30	0	2,56	0,1	0,001	0,00	16,8	0,13	0,17
17	350	7,0	96	40	200	0,28	0,6	0,002	0,01	9,2	0,03	0,10
18C	250	5,5	56	35	100	1,75	0,3	0,001	0,01	17,0	0,07	0,30
19	150	4,0	16	40	200	0,26	0,6	0,041	0,04	2,7	0,18	0,17
20	350	4,0	16	30	0	0,01	6,1	0,019	0,38	6,2	0,02	0,39
21	150	7,0	16	30	200	2,15	2,4	0,016	0,15	14,8	0,10	0,92
22	350	7,0	16	40	0	1,92	0,2	0,001	0,01	13,5	0,06	0,85
23	15,0	4,0	96	40	0	1,74	0,4	0,004	0,00	7,9	0,07	0,08
24	350	4,0	96	30	200	0,01	4,5	0,013	0,05	16,9	0,05	0,18
25	150	7,0	96	30	0	2,59	0,2	0,000	0,00	15,4	0,05	0,16
26	350	7,0	96	40	200	0,40	0,7	0,004	0,01	6,8	0,04	0,07
27C	250	5,5	56	35	100	1,68	0,4	0,002	0,01	17,5	0,11	0,31

(C): ponto central; x₁: sacarose (g/L); x₂: pH; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹); B: biomassa imobilizada (g/L); L: produção de levana (g/L); YL: rendimento de levana (g/g); PTL: produtividade de levana (g/L.h); E: produção de etanol (g/L); YE: rendimento de etanol (g/g); PTE: produtividade de etanol (g/L.h).

Nos ensaios utilizando a quitosana como suporte para a imobilização da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494, com inóculo inicial de 0,85 g/L, segundo a ANOVA, nenhuma das variáveis avaliadas apresentaram interferência estatística significativa ($p < 0,05$) (Tabela 6). Apesar disso, de acordo com os gráficos obtidos pela MSR, o máximo crescimento celular no suporte (0,25 g/L) foi obtido em pH inicial do meio ajustado a 7,0, temperatura de 30°C e durante 96 h de fermentação (Tabela 7). A menor concentração de sacarose inicial (150 g/L) e a ausência de agitação do meio, também foram importantes para o crescimento do microrganismo no suporte, conforme destacado na Figura 11.

Tabela 6. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para **biomassa** de *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **quitosana**.

Variáveis	Biomassa imobilizada no suporte	
	Efeito	p
X_1	-0,004979	0,875967
X_2	0,047134	0,149631
X_3	0,058387	0,078034
X_4	-0,062400	0,060953
X_5	-0,048897	0,135711

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$). x_1 : sacarose (g/L); x_2 : pH; x_3 : tempo (h); x_4 : temperatura (°C); x_5 : frequência de agitação (min^{-1}).

Tabela 7. Planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$, utilizando o suporte **quitosana**, com duas repetições no ponto central, para **biomassa imobilizada** no suporte, levana e etanol.

Ensaio	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	B	L	YL	PT L	E	YE	PT E
1	150	4,0	16	40	200	0,01	1,9	0,02	0,12	1,05	0,01	0,07
2	350	4,0	16	30	0	0,19	2,8	0,02	0,17	1,64	0,01	0,10
3	150	7,0	16	30	200	0,12	2,2	0,04	0,14	1,73	0,03	0,11
4	350	7,0	16	40	0	0,01	2,9	0,01	0,18	1,64	0,01	0,10
5	150	4,0	96	40	0	0,12	1,1	0,02	0,01	1,53	0,03	0,02
6	350	4,0	96	30	200	0,01	5,8	0,11	0,06	1,20	0,02	0,01
7	150	7,0	96	30	0	0,25	1,8	0,03	0,02	1,82	0,03	0,02
8	350	7,0	96	40	200	0,01	8,4	0,03	0,09	1,23	0,00	0,01
9C	250	5,5	56	35	100	0,04	2,5	0,32	0,04	2,75	0,35	0,05
10	150	4,0	16	40	200	0,01	1,4	0,01	0,09	1,35	0,01	0,08
11	350	4,0	16	30	0	0,10	2,4	0,01	0,15	1,56	0,01	0,10
12	150	7,0	16	30	200	0,01	2,5	0,07	0,16	1,65	0,05	0,10
13	350	7,0	16	40	0	0,01	2,7	0,01	0,17	1,14	0,00	0,07
14	150	4,0	96	40	0	0,01	1,4	0,04	0,01	1,40	0,04	0,01
15	350	4,0	96	30	200	0,01	4,1	0,06	0,04	1,34	0,02	0,01
16	150	7,0	96	30	0	0,24	1,9	0,03	0,02	1,13	0,02	0,01
17	350	7,0	96	40	200	0,15	8,0	0,03	0,08	1,47	0,00	0,02
18C	250	5,5	56	35	100	0,01	2,8	0,23	0,05	2,37	0,19	0,04
19	150	4,0	16	40	200	0,03	1,4	0,01	0,09	1,29	0,01	0,08
20	350	4,0	16	30	0	0,01	2,3	0,01	0,14	1,25	0,01	0,08
21	150	7,0	16	30	200	0,01	1,8	0,06	0,11	1,67	0,06	0,10
22	350	7,0	16	40	0	0,11	2,3	0,01	0,14	1,04	0,00	0,06
23	150	4,0	96	40	0	0,01	1,3	0,39	0,01	1,44	0,43	0,02
24	350	4,0	96	30	200	0,18	4,1	0,10	0,04	1,02	0,02	0,01
25	150	7,0	96	30	0	0,17	1,6	0,02	0,02	1,55	0,02	0,02
26	350	7,0	96	40	200	0,13	10,3	0,05	0,11	1,56	0,01	0,02
27C	250	5,5	56	35	100	0,01	2,3	0,13	0,04	2,91	0,16	0,05

(C): ponto central; x_1 : sacarose (g/L); x_2 : pH; x_3 : tempo (h); x_4 : temperatura (°C); x_5 : frequência de agitação (min^{-1}); B: biomassa imobilizada (g/L); L: produção de levana (g/L); YL: rendimento de levana (g/g); PTL:

produtividade de levana (g/L.h); E: produção de etanol (g/L); YE: rendimento de etanol (g/g); PTE: produtividade de etanol (g/L.h).

Com relação ao suporte de imobilização bucha vegetal (inóculo inicial: 0,85 g/L), segundo a ANOVA, nenhum dos parâmetros avaliados apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), conforme Tabela 8. Porém, com base na MSR, os parâmetros onde obteve-se o maior crescimento do microrganismo (2,95 g/L) foram o pH inicial do meio de fermentação de 5,5 e 7,0 em temperatura de 30 e 35°C, durante 56 e 96 h de fermentação, sem submeter o meio a agitação e com 150 e 250 g/L de sacarose inicial, conforme apresentado na Figura 12 e Tabela 9.

Tabela 8. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para **biomassa** de *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **bucha vegetal**.

Variáveis	Biomassa imobilizada no suporte	
	Efeito	p
X ₁	0,771156	0,350489
X ₂	-0,329131	0,070462
X ₃	0,656867	0,068740
X ₄	0,661267	0,103244
X ₅	-0,587126	0,215127

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$).

x₁: sacarose (g/L); x₂: pH; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Utilizando o bagaço de cana como suporte para a imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT4494, com inóculo inicial de 0,85 g/L, tomando como base a MSR, observou-se que a concentração de sacarose, o pH e o tempo de fermentação não influenciaram para o aumento da biomassa no suporte (0,96 g/L), conforme apresentado na Figura 13. De acordo com as Tabelas 10 e 11, apenas a temperatura 30°C apresentou influencia estatística significativa no crescimento do microrganismo imobilizado ($p < 0,05$).

Tabela 9. Planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$, utilizando o suporte **bucha vegetal**, com duas repetições no ponto central, para **biomassa imobilizada**, levana e etanol.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	B	L	Y L	PTL	E	YE	PTE
1	150	4,0	16	40	200	0,02	2,8	0,19	0,18	8,70	0,57	0,54
2	350	4,0	16	30	0	0,35	6,4	0,03	0,40	12,38	0,07	0,77
3	150	7,0	16	30	200	0,36	3,6	0,03	0,23	15,46	0,12	0,97
4	350	7,0	16	40	0	0,13	24,9	0,12	1,55	13,82	0,07	0,86
5	150	4,0	96	40	0	0,16	1,8	0,08	0,02	6,08	0,26	0,06
6	350	4,0	96	30	200	0,34	13,3	0,06	0,14	23,07	0,11	0,24
7	150	7,0	96	30	0	2,68	2,5	0,02	0,03	40,67	0,28	0,42
8	350	7,0	96	40	200	0,38	9,4	0,05	0,10	12,38	0,07	0,13
9 C	250	5,5	56	35	100	2,72	9,8	0,04	0,17	40,97	0,19	0,73
10	150	4,0	16	40	200	0,03	3,5	0,30	0,22	11,03	0,95	0,69
11	350	4,0	16	30	0	0,36	6,5	0,04	0,41	9,38	0,06	0,59
12	150	7,0	16	30	200	0,21	2,8	0,02	0,17	11,03	0,08	0,69
13	350	7,0	16	40	0	0,22	16,0	0,08	1,00	12,53	0,06	0,78
14	150	4,0	96	40	0	0,13	2,6	0,11	0,03	11,11	0,47	0,12
15	350	4,0	96	30	200	0,36	10,9	0,05	0,11	28,52	0,14	0,30
16	150	7,0	96	30	0	2,45	2,3	0,02	0,02	38,52	0,26	0,40
17	350	7,0	96	40	200	0,96	9,4	0,05	0,10	11,48	0,06	0,12
18 C	250	5,5	56	35	100	2,95	10,3	0,05	0,18	50,95	0,24	0,91
19	150	4,0	16	40	200	0,03	2,3	0,14	0,14	12,91	0,80	0,81
20	350	4,0	16	30	0	0,35	6,9	0,04	0,43	11,18	0,07	0,70
21	150	7,0	16	30	200	0,30	2,6	0,02	0,16	9,61	0,08	0,60
22	350	7,0	16	40	0	0,21	16,5	0,10	1,03	19,06	0,11	1,19
23	150	4,0	96	40	0	0,15	2,5	0,05	0,03	12,31	0,25	0,13
24	350	4,0	96	30	200	0,31	10,2	0,06	0,11	14,48	0,08	0,15
25	150	7,0	96	30	0	1,99	3,5	0,02	0,04	40,97	0,28	0,43
26	350	7,0	96	40	200	0,59	8,1	0,05	0,08	11,86	0,07	0,12
27 C	250	5,5	56	35	100	2,08	12,0	0,06	0,21	48,55	0,23	0,87

(C): ponto central;

x₁: sacarose (g/L); x₂: pH; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹); B: biomassa imobilizada (g/L); L: produção de levana (g/L); YL: rendimento de levana (g/g); PTL: produtividade de levana (g/L.h); E: produção de etanol (g/L); YE: rendimento de etanol (g/g); PTE: produtividade de etanol (g/L.h).

Tabela 10. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de *p* para **biomassa de *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte bagaço de cana.**

Variáveis	Biomassa imobilizada no suporte	
	Efeito	<i>p</i>
X ₁	0,067041	0,433826
X ₂	0,164153	0,064169
X ₃	0,041766	0,624264
X ₄ *	-0,176561	0,047840
X ₅	-0,096698	0,262688

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$). x₁: sacarose (g/L); x₂: pH; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Tabela 11. Planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(5-2)}$, utilizando o suporte **bagaço de cana**, com duas repetições no ponto central, para **biomassa imobilizada**, levana e etanol.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	B	L	Y L	PTL	E	YE	PTE
1	150	4,0	16	40	200	0,04	1,27	0,046	0,08	9,46	0,34	0,59
2	350	4,0	16	30	0	0,39	8,76	0,028	0,55	8,55	0,03	0,53
3	150	7,0	16	30	200	0,36	6,41	0,043	0,40	12,46	0,08	0,78
4	350	7,0	16	40	0	0,42	7,34	0,031	0,46	18,31	0,08	1,14
5	150	4,0	96	40	0	0,22	1,33	0,014	0,01	10,43	0,11	0,11
6	350	4,0	96	30	200	0,40	9,19	0,027	0,10	31,59	0,09	0,33
7	150	7,0	96	30	0	0,46	0,81	0,006	0,01	21,76	0,17	0,23
8	350	7,0	96	40	200	0,32	0,64	0,002	0,01	28,44	0,09	0,30
9C	250	5,5	56	35	100	0,83	2,18	0,009	0,04	33,36	0,14	0,60
10	150	4,0	16	40	200	0,08	0,81	0,019	0,05	9,00	0,21	0,56
11	350	4,0	16	30	0	0,34	9,53	0,030	0,60	15,46	0,05	0,97
12	150	7,0	16	30	200	0,44	5,28	0,036	0,33	12,31	0,08	0,77
13	350	7,0	16	40	0	0,47	6,25	0,027	0,39	17,56	0,08	1,10
14	150	4,0	96	40	0	0,15	0,70	0,007	0,01	10,81	0,10	0,11
15	350	4,0	96	30	200	0,30	9,35	0,028	0,10	34,92	0,10	0,36
16	150	7,0	96	30	0	0,56	0,34	0,003	0,00	17,00	0,13	0,18
17	350	7,0	96	40	200	0,35	1,21	0,004	0,01	23,19	0,07	0,24
18C	250	5,5	56	35	100	0,96	2,09	0,009	0,04	32,87	0,14	0,59
19	150	4,0	16	40	200	0,04	0,70	0,046	0,04	9,19	0,61	0,57
20	350	4,0	16	30	0	0,31	7,90	0,025	0,49	10,58	0,03	0,66
21	150	7,0	16	30	200	0,33	5,76	0,039	0,36	10,66	0,07	0,67
22	350	7,0	16	40	0	0,35	6,28	0,029	0,39	12,98	0,06	0,81
23	150	4,0	96	40	0	0,16	0,75	0,007	0,01	13,11	0,12	0,14
24	350	4,0	96	30	200	0,41	11,5	0,035	0,12	41,57	0,12	0,43
25	150	7,0	96	30	0	0,58	0,71	0,002	0,01	25,74	0,08	0,27
26	350	7,0	96	40	200	0,17	0,40	0,002	0,00	21,61	0,12	0,23
27C	250	5,5	56	35	100	0,81	3,91	0,024	0,07	32,87	0,21	0,59

(C): ponto central;

x₁: sacarose (g/L); x₂: pH; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹); B: biomassa imobilizada (g/L); L: produção de levana (g/L); YL: rendimento de levana (g/g); PTL: produtividade de levana (g/L.h); E: produção de etanol (g/L); YE: rendimento de etanol (g/g); PTE: produtividade de etanol (g/L.h).

Figura 10. Superfícies de resposta utilizando **alginato** como suporte de imobilização para (A) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e frequência de agitação (min^{-1}). (C) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e frequência de agitação (min^{-1}).

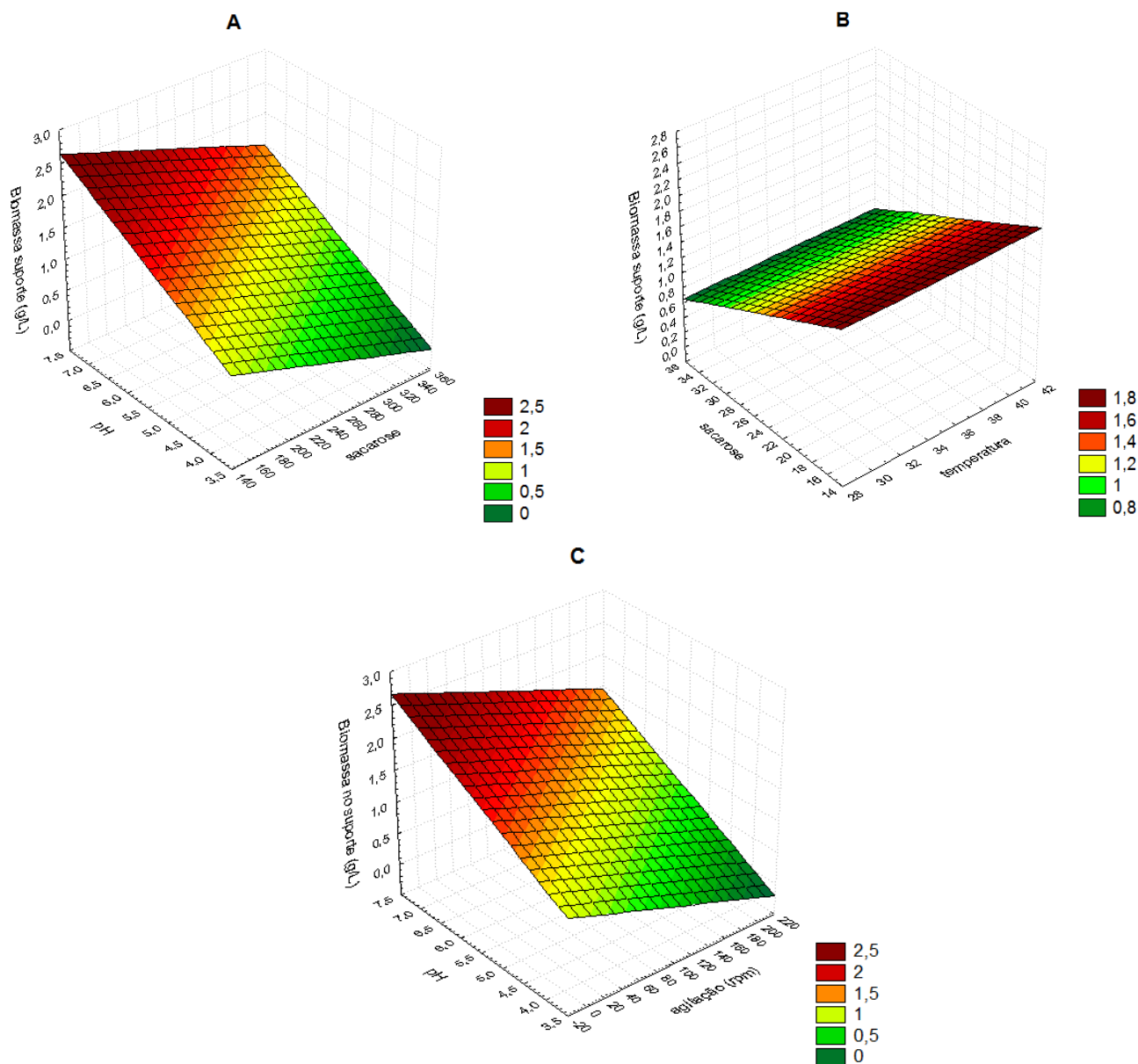


Figura 11. Superfícies de resposta utilizando a **quitosana** como suporte de imobilização para (A) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de tempo de fermentação (h) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$); (C) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e frequência de agitação (min^{-1}).

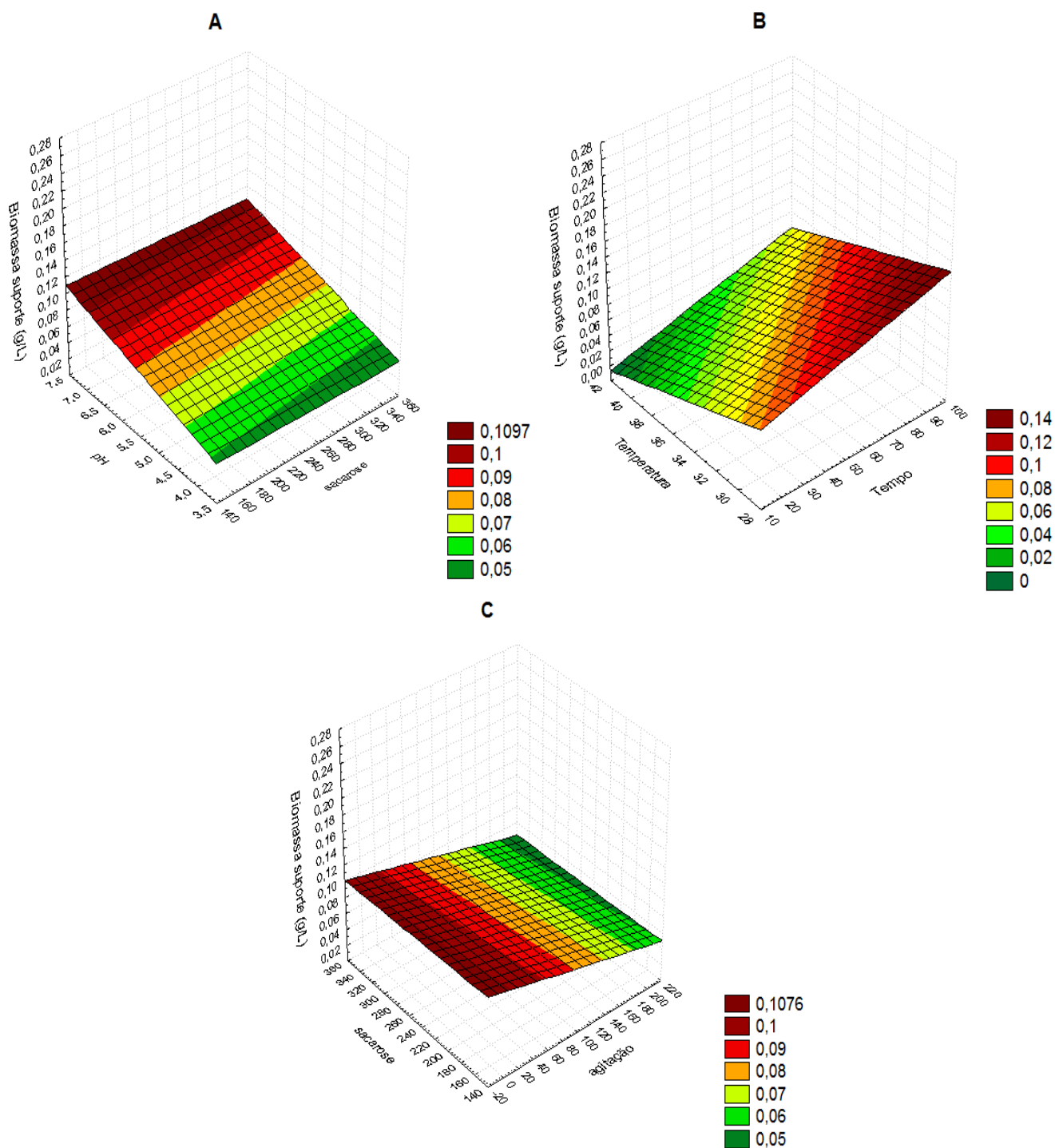


Figura 12. Superfícies de resposta utilizando **bucha vegetal** como suporte de imobilização para (A) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de frequência de agitação (min^{-1}) e sacarose (g/L); (C) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (h).

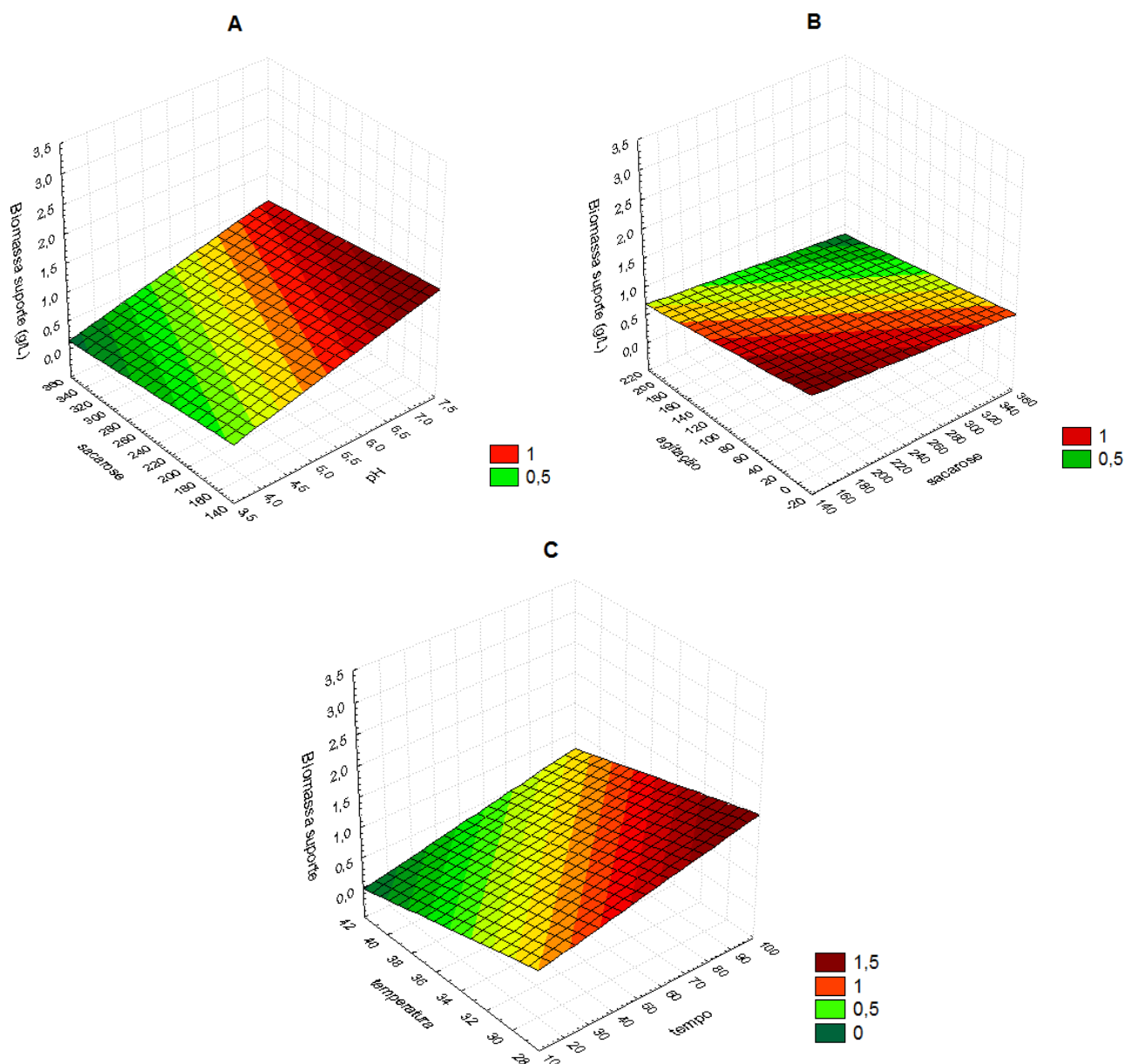
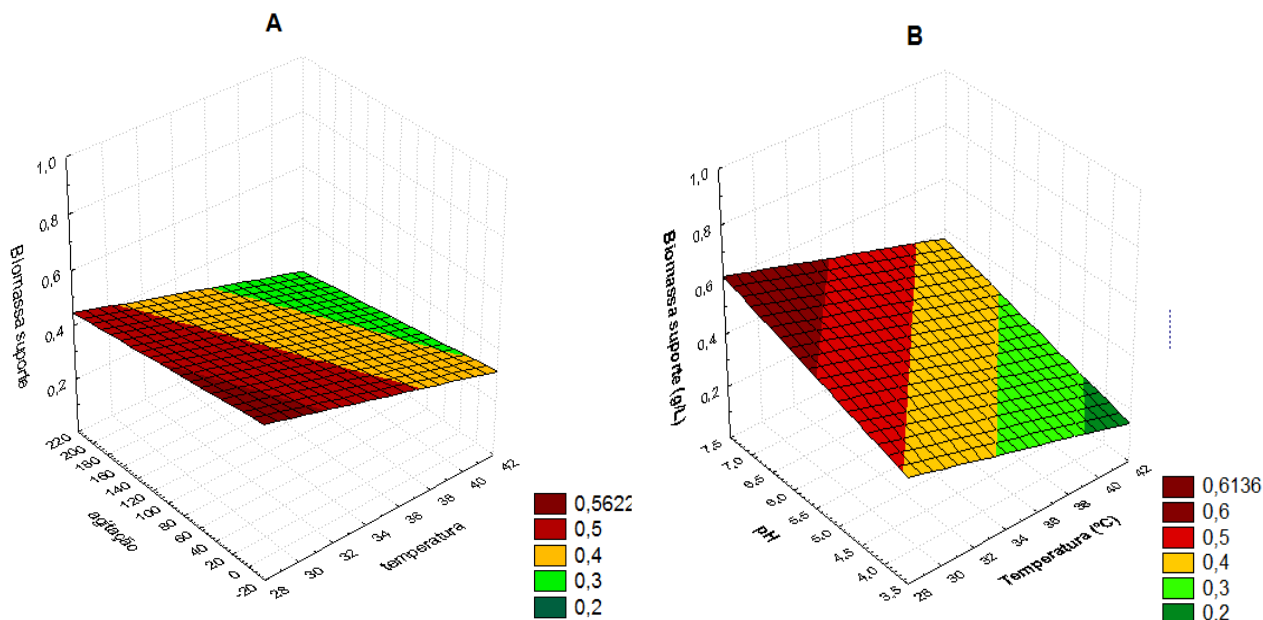


Figura 13. Superfícies de resposta utilizando **bagaço de cana** como suporte de imobilização para (A) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de frequência de agitação (min^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$); (B) biomassa imobilizada no suporte (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L).



Com base nas Figuras de 10 a 13, pode se observar que a concentração de sacarose inicial no meio de cultivo, afetou o crescimento da bactéria, para os ensaios realizados com todos os suportes, exceto para o bagaço de cana. Nestes, verificou-se que o menor valor testado (150 g/L) contribuiu para o crescimento do microrganismo.

De forma similar ao observado no presente trabalho, exceto para o bagaço de cana, Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) cultivando a bactéria *Zymomonas mobilis* livre em meio de cultura contendo 50, 150 e 250 g/L de sacarose, obtiveram maior biomassa em concentração de 150 g/L, e observaram ainda, redução no crescimento deste microrganismo, com o aumento da concentração de sacarose inicial.

Da mesma forma como observado nesse estudo, exceto para bagaço de cana, Oliveira et al. (2004) também obtiveram maior crescimento celular (0,88 g/L) em meio de cultivo contendo menor teor de sacarose, sendo 100 g/L a melhor concentração para crescimento de *Zymomonas mobilis* livre no meio de cultivo.

Por outro lado, de forma oposta ao observado nesse trabalho, Bekers et al. (2001) utilizando este mesmo microrganismo imobilizado em esferas de alginato, obtiveram menores concentrações de células 1,20-1,93 g/L em meio de cultivo contendo 100 g/L de sacarose.

Em relação ao pH inicial do meio de fermentação, conforme demonstrado nas Figuras de 10 a 13, observou-se que este foi um parâmetro importante para a produção de biomassa, em todos os suportes de imobilização utilizados, apesar de apresentar interferência estatística significativa apenas para o alginato, com máximo crescimento celular em pH inicial ajustado a 7,0. Diferentes autores citam o pH inicial do meio de fermentação como um fator importante para o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis*, a qual pode crescer em valores de 3,5 a 7,5, porém o valor ótimo é observado entre 5 e 7 (SWINGS; DE LEY, 1977; FALCÃO, 1983; DOELLE et al., 1993; MESQUITA, 2008).

Conforme observado no presente estudo, Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) ao utilizarem meio de cultivo com pH inicial ajustado para 4, obtiveram baixa produção de biomassa pela *Zymomonas mobilis*, com valor médio de 0,45 g/L, o que resultou em redução na síntese do polissacarídeo levana.

Da mesma forma como observado no presente trabalho, Ernandes (2009) verificou que o pH do meio foi fator importante para a produção de biomassa, sendo o pH 7,5 a melhor condição para crescimento celular com 3,5 g/L. Em outro estudo realizado por Ernandes e Garcia-Cruz (2010), ao avaliarem a produção de biomassa pela bactéria *Zymomonas mobilis* livre em meio de cultivo, observaram que esta teve seu crescimento potencializado em pH em torno de 8,0.

Behera et al. (2010) utilizaram alginato para a imobilização da bactéria *Zymomonas mobilis*, que foi cultivada em meio de cultura com pH ajustado para 6,5 e obtiveram crescimento celular no suporte de 1,57 g/L, resultado este, inferior ao observado no presente estudo para o suporte alginato.

As Figuras de 10 a 13 demonstram que a frequência de agitação do meio de cultivo, foi outro parâmetro importante para os suportes de imobilização, onde a ausência de frequência de agitação contribuiu para o maior crescimento do microrganismo nos quatro suportes avaliados.

Este comportamento adotado pela bactéria *Zymomonas mobilis*, mesmo estando sob a forma imobilizada, pode ser devido à fisiologia do microrganismo, que é tipicamente anaeróbio facultativo, e com a agitação ocorre a incorporação de oxigênio no meio, e este passa a ser um fator limitante ao seu desenvolvimento (SWINGS; DE LEY, 1977).

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, foram encontrados por Kannan et al. (1998), os quais obtiveram maior concentração celular (3,05 g/L) em meio de cultura sem agitação e com 100 g/L de sacarose, utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis* livre no meio de fermentação.

Dessa mesma forma, Cazetta et al. (2007) utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis* em meio de cultivo contendo melaço como fonte de carbono, sem agitação do meio e a 180 min⁻¹, obtiveram maior concentração celular (1,07-1,4 g/L) nos ensaios realizados sem agitação, demonstrando que a agitação é um fator negativo para o crescimento do microrganismo.

Viikari e Gisler (1986) utilizando agitação de 200 min⁻¹ para o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* livre no meio de cultivo, também obtiveram baixa produção de biomassa.

Por outro lado, alguns autores destacam a agitação excessiva como agente potencializador do crescimento do microbiano, por meio da eliminação de agentes inibidores como o CO₂, formado pelo metabolismo típico deste microrganismo (BELAICH; SENEZ, 1965; TOMA et al., 2003).

Toma et al. (2003) avaliaram a influência da agitação vigorosa do meio de cultivo, para a produção de biomassa pela bactéria *Zymomonas mobilis*, cultivada livre em meio de fermentação e observaram maior biomassa em agitação de 700 - 1100 min⁻¹, em fermentador onde não foi utilizada a incorporação de ar, mas apenas a homogeneização.

Conforme observado nas Figuras 12 e 13, a temperatura de fermentação foi um parâmetro importante para o crescimento da biomassa nos suportes bucha vegetal e bagaço de cana, sendo os melhores valores observados em 30 °C. Este comportamento é típico da bactéria estudada, a qual tem temperatura ótima de crescimento a 30°C, podendo tolerar valores de até 40°C (SWINGS; DE LEY, 1977).

Em oposição ao observado no presente estudo, com relação ao tempo de crescimento, Oliveira et al. (2007) trabalhando com a bactéria *Zymomonas mobilis* livre no meio de cultivo, obtiveram maior produção de biomassa em 18 h de fermentação (1,01 g/L).

Ananthalakshmy; Gunasekaran (1999) não observaram diferença estatística entre as temperaturas de 25 e 40 °C para a formação de biomassa por *Zymomonas mobilis*, resultados estes semelhantes aos observados no presente trabalho para os suportes alginato, quitosana e bucha vegetal, conforme demonstrado nas Tabelas 5, 7 e 9.

Da mesma forma como observado no presente trabalho para bucha vegetal e bagaço de cana, Ernandes (2009) utilizando células livres de *Zymomonas mobilis*, observou que a temperatura de fermentação não influenciou no crescimento do microrganismo, porém, obteve valores de biomassa entre 3,50 - 3,98 g/L a 30°C e 24 h de fermentação.

Cazetta et al. (2007) cultivando este mesmo microrganismo em meio contendo melaço, observaram maior produção de biomassa nos ensaios com temperatura inicial de 35

°C e 24 h de fermentação (1,4 g/L). Tais resultados são diferentes dos observados no presente trabalho, para todos os suportes avaliados.

Com relação à eficiência dos suportes de imobilização utilizados, tomando como base a concentração celular aderida ao suporte, conforme demonstrado nas Tabelas 5, 7, 9 e 11 e também pela biomassa livre no meio de cultivo, demonstrada na Tabela 12, pode se considerar que o melhor suporte para a imobilização de *Zymomonas mobilis* foi a bucha vegetal seguida do alginato, bagaço de cana e por último, a quitosana.

É importante destacar que o crescimento de biomassa livre no meio de cultivo para todos os suportes avaliados, demonstrou que ocorre naturalmente o desprendimento de células imobilizadas para o meio, as quais crescem e auxiliam na síntese de produto, levando a um cultivo misto (Tabela 12).

Tabela 12. Biomassa de *Zymomonas mobilis* CCT4494 desprendida para o meio de fermentação (biomassa livre), nos ensaios utilizando os suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana.

Ensaio	Alginato (g/L)	Quitosana (g/L)	Bucha vegetal (g/L)	Bagaço de cana (g/L)
1	0,01	0,39	0,01	0,23
2	0,01	0,01	0,10	1,31
3	0,21	0,22	0,20	1,84
4	0,01	0,01	0,01	1,42
5	0,26	0,03	0,01	0,11
6	0,22	0,01	0,01	1,64
7	0,01	0,01	1,16	2,55
8	0,01	0,01	3,71	0,81
9 (C)	0,09	0,24	1,33	1,97
10	0,01	0,26	0,07	0,23
11	0,01	0,01	0,09	1,42
12	0,13	0,27	0,09	1,08
13	0,01	0,01	0,01	1,68
14	0,28	0,06	0,01	0,22
15	0,28	0,01	0,01	1,79
16	0,01	0,01	0,70	2,77
17	0,01	0,09	5,03	1,29
18 (C)	0,04	0,01	1,40	2,04
19	0,01	0,20	0,01	0,31
20	0,01	0,01	0,14	1,08
21	0,18	0,25	0,31	1,34
22	0,01	0,01	0,01	1,94
23	0,19	0,07	0,01	0,26
24	0,16	0,01	0,01	1,55
25	0,01	0,01	0,72	2,68
26	0,01	0,01	2,86	1,35
27 (C)	0,14	0,18	1,63	1,91

(C): ponto central

5.2. Comportamento do pH final do meio de cultivo e consumo do substrato sacarose utilizando os suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana

Para os experimentos realizados com alginato, bucha vegetal e bagaço de cana, conforme apresentado na Tabela 13, o pH final do meio de cultivo após a fermentação, apresentou comportamento semelhante, com redução para valores entre 3,32 e 5,37.

Essa redução pode ser devido à produção de metabólitos típicos do desenvolvimento desse microrganismo. Segundo Swings e De Ley (1977), a *Zymomonas mobilis* quando em meio rico em sacarose tem a capacidade de produzir além de etanol, subprodutos como a levana e o sorbitol, bem como pequenas quantidades de lactato, acetaldeído, glicerol, acetoína, di-hidroxiketona, manitol, e os ácidos acético e glicônico (DOELLE et al., 1993).

Com relação à quitosana, obteve-se comportamento totalmente oposto, estando o pH do meio entre 7,12 e 10,89 (Tabela 13). Este aumento no pH final, observado para o suporte quitosana, pode ter sido ocasionado pela própria natureza alcalina do suporte, uma vez que a formação das esferas é realizada em solução de NaOH (pH ~ 10). Portanto, quando as esferas são adicionadas ao meio de fermentação (pH 4 e 7) pode haver a liberação do NaOH impregnado nestas, alcalinizando o meio. No entanto, é importante destacar que mesmo nestes valores elevados de pH final, o microrganismo foi capaz de manter-se viável e se desenvolver em menor número, quando comparado aos demais (Tabela 13).

Nas Tabelas de 14 a 17 está descrito o perfil de consumo do substrato pela *Zymomonas mobilis* imobilizada nos diferentes suportes. De maneira geral, os suportes que apresentaram os maiores percentuais de consumo do substrato foram o alginato (98,89 %) seguido da bucha vegetal (98,3 %) e bagaço de cana com 93,2 %, sendo a quitosana (87,9 %) o suporte com os menores índices.

Para o suporte alginato, conforme demonstrado na Tabela 14, a condição com maior percentual de consumo máximo do substrato (máximo de 98,89 %), foi em pH 7, 200 min⁻¹ e 150 g/L de sacarose em 16 h de fermentação, sob temperatura de 30°C. Nos ensaios realizados a 35°C, 100 min⁻¹, 250 g/L de sacarose e pH inicial ajustado para 5,5, durante 56 h de fermentação, verificaram-se também altas taxas de consumo da sacarose, com valores entre 96,03 e 96,85 %.

Nos ensaios utilizando o suporte quitosana, observou-se variação no percentual de consumo do substrato sacarose, sendo as melhores condições observadas utilizando 350 g/L

de sacarose inicial, pH 7 e temperatura de 40 °C, 200 min⁻¹ de agitação, durante 96 h de fermentação (máximo de 87,9 %), conforme destacado na Tabela 15.

Na Tabela 16, pode-se observar que para o suporte bucha vegetal, a maior taxa de conversão da sacarose, foi de 98,3 %, nos ensaios realizados com ausência de agitação, 150 g/L de sacarose inicial, pH 7 a 30°C durante 96 h de fermentação. No entanto, os menores percentuais (7,8 %) foram observados com 150 g/L de sacarose, pH 4, 200 min⁻¹ de agitação a 40 °C e em 16 h de fermentação.

Conforme destacado na Tabela 16, o suporte bagaço de cana apresentou maior consumo da sacarose (93,2%), utilizando 150 g/L de substrato sacarose, pH inicial 7, 30 °C durante 96 h de fermentação. Este comportamento também foi observado para o suporte bucha vegetal.

Em geral, o substrato foi bem consumido pelo microrganismo em todos os suportes de imobilização, porém, este parece não ter sido utilizado totalmente para a síntese de biomassa, levana e etanol, uma vez que estes valores em conjunto são inferiores ao total consumido. Este comportamento sugere a síntese de outros compostos como, por exemplo, a levana não precipitável citada por Viikari (1984) e sorbitol, bem como ácido acético, lactato, acetaldeído, glicerol, acetoína, di-hidroxiketona, manitol e glicônico (DOELLE et al., 1993).

Tabela 13. Comportamento do **pH final** do meio de cultura utilizando os suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana, para imobilizar a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Alginato (pH)	Quitosana (pH)	Bucha vegetal (pH)	Bagaço de cana (pH)
1	150	4,0	16,0	40,0	200	3,99	9,15	4,24	3,81
2	350	4,0	16,0	30,0	0	3,78	10,1	4,37	3,8
3	150	7,0	16,0	30,0	200	3,57	10,8	4,74	3,72
4	350	7,0	16,0	40,0	0	4,08	9,87	4,17	3,53
5	150	4,0	96,0	40,0	0	3,38	10,0	4,26	3,65
6	350	4,0	96,0	30,0	200	3,32	7,15	3,51	3,41
7	150	7,0	96,0	30,0	0	3,93	9,40	3,82	3,69
8	350	7,0	96,0	40,0	200	3,69	9,11	4,40	3,81
9 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	3,38	10,2	3,55	3,7
10	150	4,0	16,0	40,0	200	4,11	9,15	4,17	3,8
11	350	4,0	16,0	30,0	0	3,71	10,0	4,21	3,58
12	150	7,0	16,0	30,0	200	3,62	10,4	4,83	3,97
13	350	7,0	16,0	40,0	0	4,04	9,83	4,81	3,57
14	150	4,0	96,0	40,0	0	3,41	9,97	4,03	3,74
15	350	4,0	96,0	30,0	200	3,30	7,41	3,58	3,45
16	150	7,0	96,0	30,0	0	3,93	9,37	3,90	3,69
17	350	7,0	96,0	40,0	200	3,73	6,83	4,24	3,74
18 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	3,41	10,3	3,50	3,65
19	150	4,0	16,0	40,0	200	4,15	8,14	4,39	3,79
20	350	4,0	16,0	30,0	0	3,72	9,96	4,18	3,97
21	150	7,0	16,0	30,0	200	3,60	10,4	5,37	3,98
22	350	7,0	16,0	40,0	0	4,26	9,93	4,20	3,58
23	150	4,0	96,0	40,0	0	3,43	10,0	4,39	3,79
24	350	4,0	96,0	30,0	200	3,33	7,26	3,74	3,47
25	150	7,0	96,0	30,0	0	3,80	9,29	3,92	3,72
26	350	7,0	96,0	40,0	200	3,73	7,12	4,24	3,82
27 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	3,41	10,3	3,48	3,58

(C): ponto central; x₁: sacarose (g/L); x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Tabela 14. Açúcares totais no final da fermentação (ATf) e consumo de substrato sacarose (CS) utilizando **alginato** como suporte para imobilizar a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	ATf	CS	CS
						(g/L)	(g/L)	(%)
1	150	4,0	16,0	40,0	200	122,27	27,7	18,49
2	350	4,0	16,0	30,0	0	31,59	318,4	90,97
3	150	7,0	16,0	30,0	200	1,67	148,3	98,89
4	350	7,0	16,0	40,0	0	115,95	234,1	66,87
5	150	4,0	96,0	40,0	0	53,06	96,9	64,63
6	350	4,0	96,0	30,0	200	8,60	341,4	97,54
7	150	7,0	96,0	30,0	0	24,94	125,1	83,37
8	350	7,0	96,0	40,0	200	32,33	317,7	90,76
9 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	7,86	242,1	96,85
10	150	4,0	16,0	40,0	200	107,03	43,0	28,65
11	350	4,0	16,0	30,0	0	32,88	317,1	90,61
12	150	7,0	16,0	30,0	200	3,32	146,7	97,78
13	350	7,0	16,0	40,0	0	119,74	230,3	65,79
14	150	4,0	96,0	40,0	0	44,04	106,0	70,64
15	350	4,0	96,0	30,0	200	15,48	334,5	95,58
16	150	7,0	96,0	30,0	0	23,11	126,9	84,59
17	350	7,0	96,0	40,0	200	27,36	322,6	92,18
18 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	8,75	241,3	96,50
19	150	4,0	16,0	40,0	200	134,85	15,2	10,10
20	350	4,0	16,0	30,0	0	33,25	316,8	90,50
21	150	7,0	16,0	30,0	200	2,98	147,0	98,02
22	350	7,0	16,0	40,0	0	134,81	215,2	61,48
23	150	4,0	96,0	40,0	0	41,72	108,3	72,19
24	350	4,0	96,0	30,0	200	16,69	333,3	95,23
25	150	7,0	96,0	30,0	0	14,66	335,3	95,81
26	350	7,0	96,0	40,0	200	167,42	182,6	52,17
27 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	9,93	240,1	96,03

(C): ponto central; x₁: sacarose (g/L); x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Tabela 15. Açúcares totais no final da fermentação (ATf) e consumo de substrato sacarose (CS) utilizando **quitosana** como suporte para imobilizar a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	ATf (g/L)	CS (g/L)	CS (%)
1	150	4,0	16,0	40,0	200	22,6	127,4	84,9
2	350	4,0	16,0	30,0	0	228,8	121,2	34,6
3	150	7,0	16,0	30,0	200	98,5	51,5	34,3
4	350	7,0	16,0	40,0	0	138,6	211,4	60,4
5	150	4,0	96,0	40,0	0	101,5	48,5	32,4
6	350	4,0	96,0	30,0	200	299,3	50,7	14,5
7	150	7,0	96,0	30,0	0	88,0	62,0	41,3
8	350	7,0	96,0	40,0	200	53,7	296,3	84,7
9 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	242,2	7,8	3,1
10	150	4,0	16,0	40,0	200	23,5	126,5	84,3
11	350	4,0	16,0	30,0	0	171,7	178,3	50,9
12	150	7,0	16,0	30,0	200	113,6	36,4	24,3
13	350	7,0	16,0	40,0	0	101,4	248,6	71,0
14	150	4,0	96,0	40,0	0	111,2	38,8	25,9
15	350	4,0	96,0	30,0	200	281,3	68,7	19,6
16	150	7,0	96,0	30,0	0	80,7	69,3	46,2
17	350	7,0	96,0	40,0	200	42,3	307,7	87,9
18 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	237,7	12,3	4,9
19	150	4,0	16,0	40,0	200	21,3	128,7	85,8
20	350	4,0	16,0	30,0	0	193,0	157,0	44,9
21	150	7,0	16,0	30,0	200	120,6	29,4	19,6
22	350	7,0	16,0	40,0	0	134,6	215,4	61,6
23	150	4,0	96,0	40,0	0	146,7	3,3	2,2
24	350	4,0	96,0	30,0	200	307,9	42,1	12,0
25	150	7,0	96,0	30,0	0	84,0	66,0	44,0
26	350	7,0	96,0	40,0	200	46,7	303,3	86,7
27 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	231,6	18,4	7,4

(C): ponto central; x₁: sacarose (g/L); x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Tabela 16. Açúcares totais no final da fermentação (ATf) e consumo de substrato sacarose (CS) utilizando **bucha vegetal** como suporte para imobilizar a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	ATf (g/L)	CS (g/L)	CS (%)
1	150	4,0	16,0	40,0	200	134,8	15,2	10,1
2	350	4,0	16,0	30,0	0	163,4	186,6	53,3
3	150	7,0	16,0	30,0	200	23,9	126,1	84,1
4	350	7,0	16,0	40,0	0	145,9	204,1	58,3
5	150	4,0	96,0	40,0	0	126,2	23,8	15,9
6	350	4,0	96,0	30,0	200	138,3	211,7	60,5
7	150	7,0	96,0	30,0	0	2,7	147,3	98,2
8	350	7,0	96,0	40,0	200	160,9	189,1	54,0
9 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	30,1	219,9	88,0
10	150	4,0	16,0	40,0	200	138,3	11,7	7,8
11	350	4,0	16,0	30,0	0	193,1	156,9	44,8
12	150	7,0	16,0	30,0	200	19,1	130,9	87,3
13	350	7,0	16,0	40,0	0	146,3	203,7	58,2
14	150	4,0	96,0	40,0	0	126,2	23,8	15,9
15	350	4,0	96,0	30,0	200	150,6	199,4	57,0
16	150	7,0	96,0	30,0	0	3,3	146,7	97,8
17	350	7,0	96,0	40,0	200	150,4	199,6	57,0
18 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	34,7	215,3	86,1
19	150	4,0	16,0	40,0	200	133,9	16,1	10,7
20	350	4,0	16,0	30,0	0	187,0	163,0	46,6
21	150	7,0	16,0	30,0	200	27,4	122,6	81,8
22	350	7,0	16,0	40,0	0	183,8	166,2	47,5
23	150	4,0	96,0	40,0	0	100,1	49,9	33,3
24	350	4,0	96,0	30,0	200	166,1	183,9	52,6
25	150	7,0	96,0	30,0	0	2,5	147,5	98,3
26	350	7,0	96,0	40,0	200	188,0	162,0	46,3
27 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	38,7	211,3	84,5

(C): ponto central; x₁: sacarose (g/L); x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Tabela 17. Açúcares totais no final da fermentação (ATf) e consumo de substrato sacarose (CS) utilizando **bagaço de cana** como suporte para imobilizar a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	ATf (g/L)	CS (g/L)	CS (%)
1	150	4,0	16,0	40,0	200	116,0	34,0	22,7
2	350	4,0	16,0	30,0	0	123,7	226,3	64,7
3	150	7,0	16,0	30,0	200	121,2	28,8	19,2
4	350	7,0	16,0	40,0	0	112,7	237,3	67,8
5	150	4,0	96,0	40,0	0	63,6	86,4	57,6
6	350	4,0	96,0	30,0	200	181,8	168,2	48,0
7	150	7,0	96,0	30,0	0	10,3	139,7	93,2
8	350	7,0	96,0	40,0	200	32,7	317,3	90,7
9 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	20,0	230,0	92,0
10	150	4,0	16,0	40,0	200	128,6	21,4	14,3
11	350	4,0	16,0	30,0	0	144,6	205,4	58,7
12	150	7,0	16,0	30,0	200	113,1	36,9	24,6
13	350	7,0	16,0	40,0	0	105,6	244,4	69,8
14	150	4,0	96,0	40,0	0	57,7	92,3	61,5
15	350	4,0	96,0	30,0	200	169,4	180,6	51,6
16	150	7,0	96,0	30,0	0	15,7	134,3	89,5
17	350	7,0	96,0	40,0	200	32,3	317,7	90,8
18 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	24,9	225,1	90,1
19	150	4,0	16,0	40,0	200	112,9	37,1	24,7
20	350	4,0	16,0	30,0	0	133,2	216,8	62,0
21	150	7,0	16,0	30,0	200	123,4	26,6	17,7
22	350	7,0	16,0	40,0	0	106,1	243,9	69,7
23	150	4,0	96,0	40,0	0	47,4	102,6	68,4
24	350	4,0	96,0	30,0	200	168,3	181,7	51,9
25	150	7,0	96,0	30,0	0	10,2	139,8	93,2
26	350	7,0	96,0	40,0	200	36,0	314,0	89,7
27 (C)	250	5,5	56,0	35,0	100	25,2	224,8	89,9

(C): ponto central; x₁: sacarose (g/L); x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

5.3. Produção de levana

Para a produção de levana utilizando o suporte alginato, de acordo com a ANOVA, todos os parâmetros apresentaram interferência estatística significativa ($p < 0,05$), exceto a agitação do meio de cultura, conforme demonstrado na Tabela 18.

Tabela 18. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de levana, pela bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **alginato**.

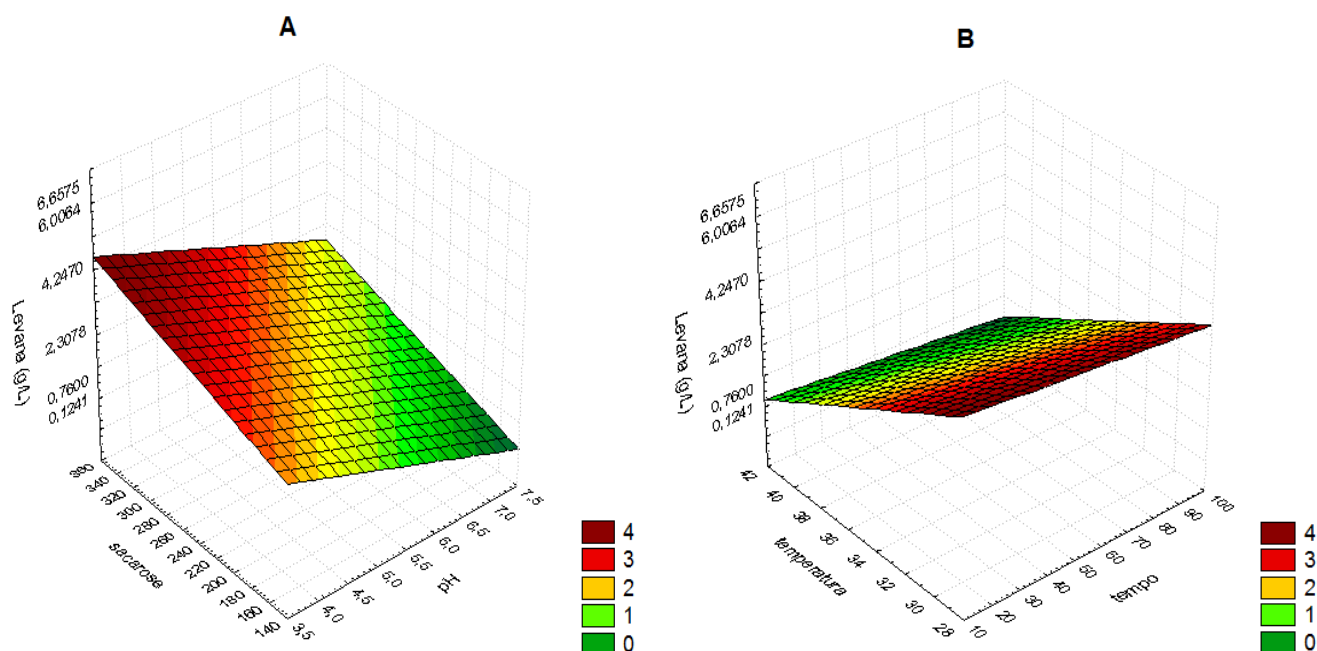
Variáveis	Produção de levana	
	Efeito	p
X_1^*	2,07896	0,000006
X_2^*	-2,20779	0,000003
X_3^*	-0,84850	0,023620
X_4^*	-2,91938	0,000000
X_5	0,31810	0,370630

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$).

x_1 : sacarose; x_2 : pH inicial; x_3 : tempo (h); x_4 : temperatura ($^{\circ}\text{C}$); x_5 : frequência de agitação (min^{-1}).

A maior produção de levana (6,67 g/L) foi obtida quando utilizadas elevadas concentrações de sacarose (350 g/L), pH inicial ajustado para 4; menor tempo de fermentação (16 h) e temperatura de 30°C (Figura 14 e Tabela 5).

Figura 14. Superfícies de resposta utilizando o **alginato** como suporte de imobilização, para (A) produção de levana (g/L), ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e pH; (B) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (h).



Nestas mesmas condições, foram observados os maiores valores de rendimento de produção (0,02 g/g) e produtividade de 0,42 g/L.h (Tabela 7) demonstrando que este suporte apresentou baixa eficiência para a síntese de levana em relação aos demais suportes de imobilização. Foi observado ainda, que o maior consumo do substrato não foi proporcional à maior produção de levana, indicando que o substrato pode ter sido utilizado principalmente para a produção de outros metabolitos, como sorbitol e frutooligossacarídeos (LOOS et al., 1994; SWINGS; DE LEY, 1977).

Nos ensaios utilizando a quitosana como suporte de imobilização, segundo a ANOVA, todos os fatores foram significativos para a síntese de levana, conforme apresentado na Tabela 19. Por meio da MSR, a agitação de 200 min^{-1} , a alta concentração de sacarose (350 g/L) e o tempo de fermentação de 96 h, apresentaram maior influência na produção de levana (10,30 g/L). A temperatura de 40°C e o pH inicial ajustado a 7, apresentaram menor influência na síntese do polissacarídeo, conforme demonstrado na Figura 15. A produtividade por outro lado, foi maior (0,14-0,17 g/L.h) nos ensaios com 350 g/L de sacarose, pH 4, ausência de agitação a 30°C com 16 h de fermentação.

Tabela 19. ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de *p* para a produção de **levana** pela bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **quitosana**.

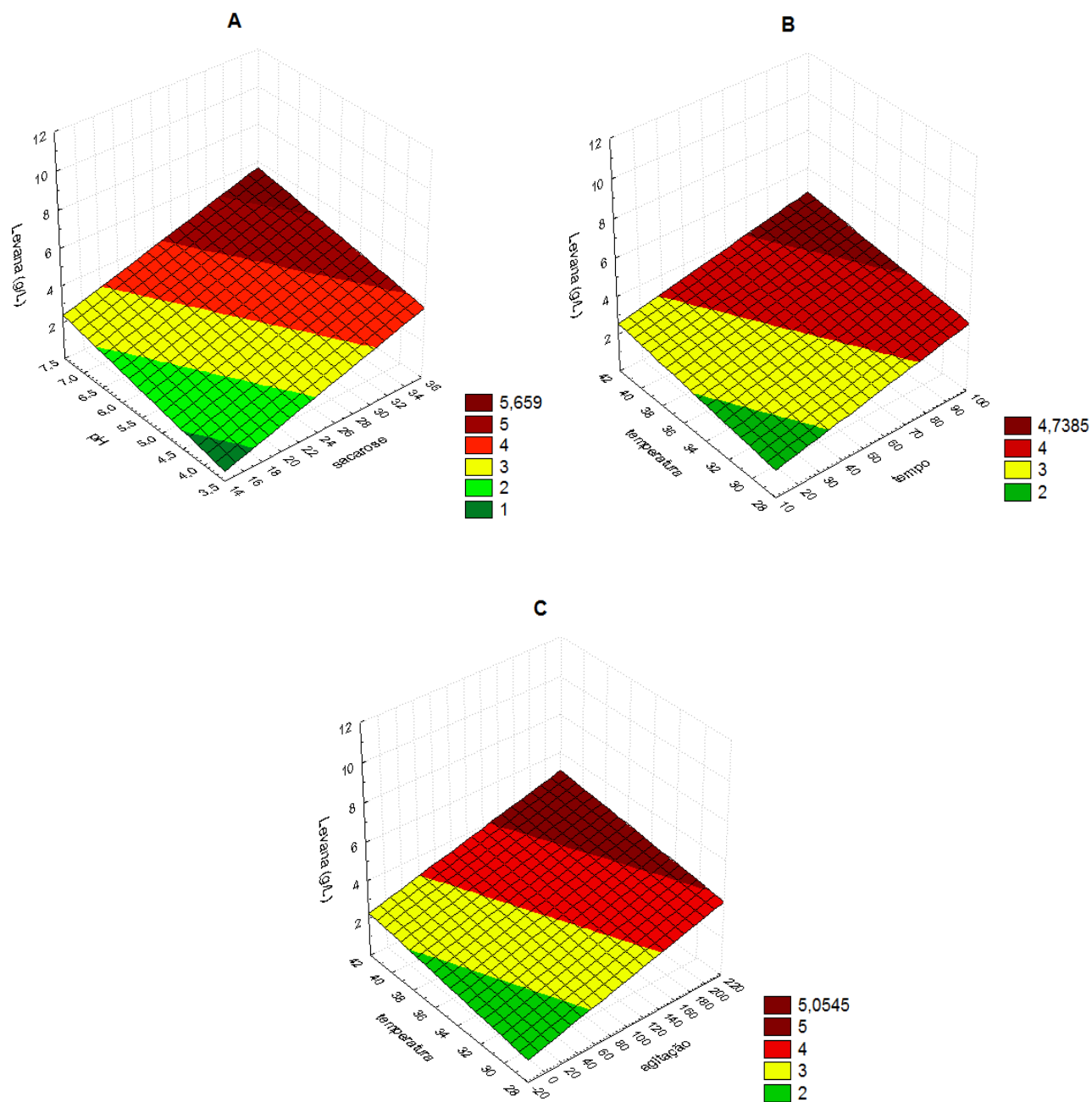
Variáveis	Produção de levana	
	Efeito	<i>p</i>
X ₁ *	2,980232	0,000000
X ₂ *	1,377001	0,001951
X ₃ *	1,936230	0,000064
X ₄ *	0,816787	0,048148
X ₅ *	2,301542	0,000007

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$).

x₁: sacarose; x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min^{-1}).

O rendimento de produção foi maior em relação aos demais suportes, com valor máximo de 0,01-0,39 g/g, porém observou-se que o substrato pode ter sido utilizado para a síntese de subprodutos, uma vez que a produção de levana e biomassa não foram elevadas (LOOS et al., 1994; SWINGS; DE LEY, 1977). Com relação ao consumo de substrato, verificou-se que este foi proporcional a maior produção de levana (Tabelas 7 e 15).

Figura 15. Superfícies de resposta utilizando a **quitosana** como suporte de imobilização para (A) produção de **levana** (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e temperatura (°C); (B) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de tempo de fermentação (h) e temperatura (°C); (C) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e frequência de agitação (min^{-1}).



Com relação ao uso da bucha vegetal como suporte de imobilização para a biossíntese de levana, utilizando a ANOVA, apenas a sacarose apresentou interferência estatística significativa ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 20. Entretanto, utilizando a MSR,

verificou-se que, conforme demonstrado na Tabela 9, todos os parâmetros testados foram importantes para a maior produção de levana (24,9 g/L), sendo estes, a utilização de 350 g/L de sacarose, pH inicial ajustado a 7, durante 16 h de fermentação, ausência de agitação, e o uso de temperatura em torno de 40°C, conforme demonstrado na Figura 16.

Os maiores valores de produtividade, também foram observados nestas condições citadas anteriormente, com máximo de 1,55 g/L.h de levana. Por outro lado, o rendimento de produção apresentou o maior valor (0,30 g/g) nos ensaios utilizando 150 g/L de sacarose, pH 4, 40 °C e 200 min⁻¹ de agitação, durante 16 h de fermentação (Tabela 9). O consumo do substrato sacarose utilizando a bucha vegetal, também não foi proporcional aos maiores valores de produção, rendimento e produtividade, porém foram os mesmos que levaram ao maior crescimento de biomassa (Tabelas 9 e 16).

Tabela 20. ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de *p* para a produção de **levana** pela bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **bucha vegetal**.

Variáveis	Produção de levana	
	Efeito	<i>p</i>
X ₁ *	8,78181	0,000005
X ₂	2,65003	0,082214
X ₃	-1,51937	0,307219
X ₄	2,34300	0,121494
X ₅	-1,12369	0,447569

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$). x₁: sacarose; x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Para a produção de levana utilizando o suporte bagaço de cana, de acordo com a ANOVA, a maior concentração de sacarose, temperatura e o tempo de fermentação, apresentaram interferência estatística significativa ($p < 0,05$), de acordo com a Tabela 21.

Tomando como base a MSR, todos os parâmetros testados foram importantes para a biossíntese de levana (11,52 g/L), obtendo-se maior produção quando utilizadas elevadas concentrações de sacarose (350 g/L), pH inicial ajustado para 4; 16 h de fermentação e temperatura de 30°C. A agitação do meio de cultivo, de maneira similar ao observado para o suporte alginato, não apresentou grande interferência na melhor produção do biopolímero levana, havendo aumento com utilização de 200 min⁻¹ (Figura 17). A maior produtividade (0,6 g/L.h) foi observada nestas mesmas condições anteriores, exceto pela agitação, que foi melhor em ausência de agitação do meio (Tabela 11).

Tabela 21. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **bagaço de cana**.

Variáveis	Produção de levana	
	Efeito	p
X_1^*	4,12600	0,000317
X_2	-0,86341	0,378476
X_3^*	-3,27845	0,002597
X_4^*	-3,65897	0,001016
X_5	-0,17973	0,853235

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$). x_1 : sacarose; x_2 : pH inicial; x_3 : tempo (h); x_4 : temperatura ($^{\circ}\text{C}$); x_5 : frequência de agitação (min^{-1}).

O maior valor de rendimento de levana (0,04 g/g) foi observado em condições similares as utilizadas para a produção e produtividade de levana, apenas para o pH inicial do meio de cultivo em torno de 4, para as demais, observou-se maiores valores com 150 g/L de sacarose, temperatura de 40°C e agitação de 200 min^{-1} , durante 16 h de fermentação. Em relação ao consumo do substrato, da mesma forma como observado para os demais suportes avaliados, este não foi proporcional a maior produção de levana, indicando que o substrato pode ter sido utilizado principalmente, para a produção de outros metabólitos não determinados neste estudo.

Na literatura, há divergências quanto aos parâmetros ótimos para síntese deste polímero, sendo a faixa de temperatura ótima entre $25\text{-}37^{\circ}\text{C}$ e pH entre 3,5 e 7,5. Tem sido demonstrado também que a agitação do meio, concentração de extrato de levedura, nitrogênio e de sais minerais como cloreto de potássio e cloreto de sódio potencializam a síntese de levana (ERNANDES, 2009; HAN; CLARKE, 1990; GARCIA-CRUZ, 1997; BEKERS et al., 1999; JEREZ, 1993).

Figura 16. Superfícies de resposta utilizando **bucha vegetal** como suporte de imobilização para (A) produção de **levana** (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e frequência de agitação (min^{-1}).

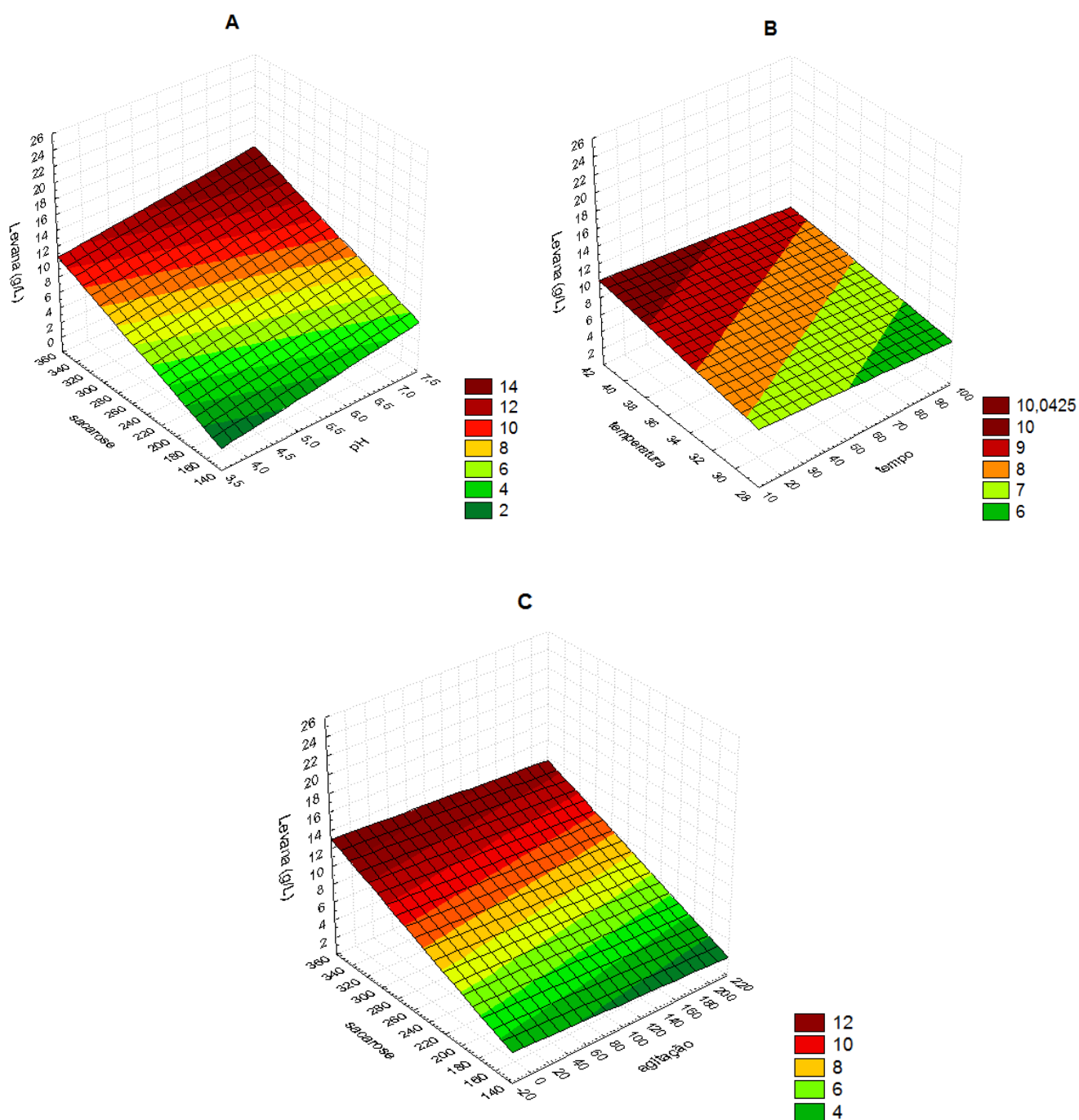
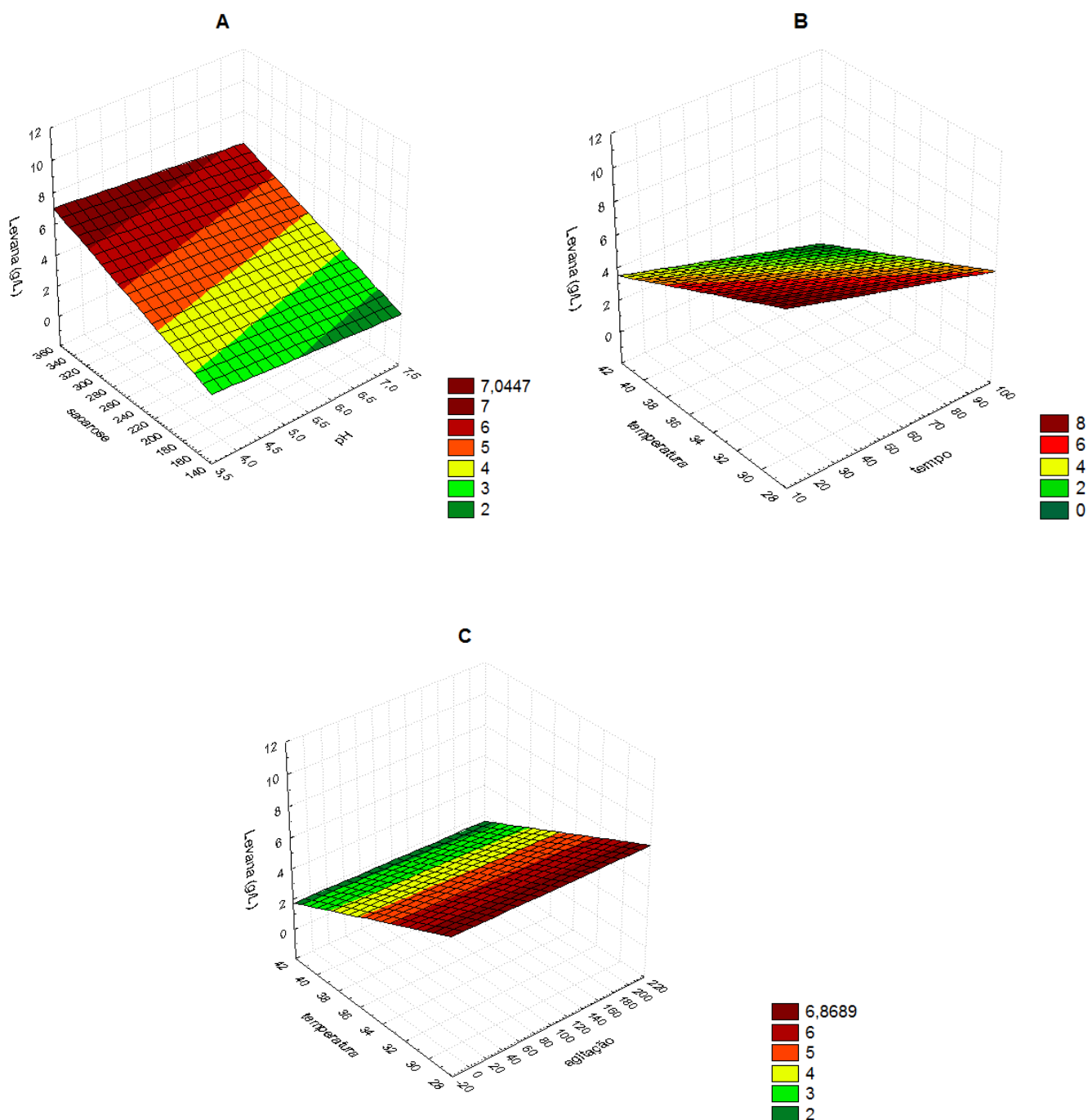


Figura 17. Superfícies de resposta utilizando **bagaço de cana** como suporte de imobilização para (A) produção de **levana** (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L): equação: $0,6252+0,2063*x-0,2878*y$; (B) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h): equação: $19,3011-0,041*x-0,3659*y$; (C) produção de levana (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e frequência de agitação (prm): equação: $17,096-0,0009*x-0,3659*y$.



A produção obtida nos quatro suportes avaliados foi potencializada quando utilizada a maior concentração de sacarose (350 g/L). Esse comportamento foi mencionado por Viikari e Gisler (1986), os quais verificaram a existência de uma relação direta entre a síntese de levana, a concentração de sacarose no meio e a quantidade metabolizada pela célula. Sprenger (1996) também cita que a síntese de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis*, ocorre quando este microrganismo cresce em meio de cultivo com alta concentração de sacarose.

De forma semelhante ao observado no presente estudo, Oliveira et al. (2007) obtiveram os maiores valores de produção de levana (17,2 - 21,68 g/L) utilizando 250 g/L de sacarose durante 24 h de fermentação. Além disso, estes autores também observaram que em valores abaixo de 150 g/L houve redução na produção de levana, conforme observado no presente trabalho (Figuras 14, 15, 16 e 17).

Borsari et al. (2006) utilizando células livres de *Zymomonas mobilis*, verificaram comportamento oposto ao obtido no presente trabalho, conforme demonstrado nas Tabelas 5, 7, 9 e 11, tendo concentração ótima de sacarose para a produção de levana com 150 g/L ao invés de maiores valores. Isto pode ser explicado pela maior resistência das células imobilizadas a altas concentrações de sacarose no meio, uma vez que os suportes podem ter protegido as células contra as condições ambientais desfavoráveis. Segundo Vigants et al. (2001), essa proteção ocorre porque a exposição de células livres do microrganismo a meios com elevada pressão osmótica, ocasiona redução na biossíntese de levana.

Com relação à temperatura ótima de incubação para a produção de levana pelos suportes alginato e bagaço de cana, verificaram-se maiores valores em temperaturas de 30°C ou inferiores. Por outro lado, para os suportes quitosana e bucha vegetal, a temperatura de 40°C ou superior foi melhor para a produção do biopolímero levana. O efeito da agitação também apresentou divergências entre os suportes estudados, sendo que, para os suportes quitosana, alginato e bagaço de cana, a máxima agitação (200 min⁻¹) teve efeito positivo e para a bucha vegetal, a ausência de agitação potencializou a produção.

Com relação ao tempo de fermentação, verificou-se, que para os suportes alginato e bucha vegetal, o melhor tempo de produção foi em 16 h e para quitosana e bagaço de cana em 96 h de fermentação.

Na literatura, há divergências quanto ao melhor tempo de fermentação, porém, a maioria dos trabalhos cita tempos menores ou iguais a 24 e 48 h como os melhores para a síntese deste polissacarídeo, apoiando os resultados observados para alginato, bucha vegetal e contrapondo aos obtidos para bagaço de cana e quitosana (Figuras 14, 15, 16 e 17).

Em oposição ao verificado neste trabalho para alginato e bucha vegetal, em relação ao tempo de fermentação, Muro et al. (2000) avaliaram a produção de levana, pela bactéria *Zymomonas mobilis* sob diferentes temperaturas e observaram que em valores menores que 30 °C, e tempo de fermentação de 5 dias, a síntese de levana é potencializada. Estes autores observaram que, a 7°C houve a maior produção do biopolímero e os menores valores de biomassa.

Por outro lado, Yoshida et al. (1990) utilizaram 150 g/L de sacarose e obtiveram produção de levana de 35 g/L com *Z. mobilis* IN-17-10 e 3,1 g/L com *Z. mobilis* IFO13757, em 72 h. Tais resultados são semelhantes aos observados no presente estudo para o suporte quitosana e bagaço em relação ao tempo de fermentação.

De forma similar ao observado neste estudo para alginato e bucha vegetal, em se tratando do tempo de fermentação, Yokoya e Jerez (1996) verificaram melhor produção de levana em pH inicial ajustado para 5, obtendo maior rendimento nas primeiras 24 h de fermentação, e após 48 h houve redução na síntese de levana, devido a hidrólise do biopolímero durante a fermentação.

Com relação à agitação, alguns autores citam que esta é considerada um fator de inibição ao desenvolvimento de *Zymomonas* spp., uma vez que este microrganismo é anaeróbico facultativo (BARROS; CELLIGOI, 2006; VINHAS, 1999). Por outro lado, bons resultados foram observados por Han e Clarke (1990), ao submeterem a cultura à leve agitação para a produção de levana. Este comportamento também foi verificado neste estudo utilizando os suportes alginato e quitosana (Figuras 14 e 15).

De maneira semelhante ao obtido neste trabalho, para o suporte alginato, com relação ao pH inicial, Bekers et al. (2001) obtiveram produção de levana de 8,5-13,6 g/L, utilizando concentração de sacarose de apenas 100 g/L e pH ajustado a 4,9, com a bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada em esferas de alginato, sem submeter o meio a agitação.

Tano e Buzato (2002) avaliaram o efeito do pH inicial (5,4; 5,9 e 6,3) para a produção de levana, pela *Zymomonas mobilis* utilizando caldo de cana de açúcar (150 g/L) como fonte de carbono. Estes autores verificaram maior produção de levana (3,83 g/L) nos ensaios com pH ajustado a 6,3 e com agitação de 180 min⁻¹. Tais resultados se contrapõem aos observados neste estudo, para quitosana e bucha vegetal, conforme demonstrado nas Figuras 15 e 16.

Outro fator importante para a síntese deste polissacarídeo, utilizando os suportes alginato e bagaço de cana, conforme observado neste trabalho (Figuras 14 e 17), foi o pH inicial do meio de fermentação ajustado a 4, onde obteve-se a melhor produção. Esse pH está

próximo da faixa ótima para a produção de levana citada na literatura, que deve ser entre 4,5 e 6 (DOELLE et al., 1993; YOKOYA; JEREZ, 1996; SWINS; DE LEY, 1977).

Ernandes e Garcia-Cruz (2009) obtiveram maiores valores de produção de levana (83,2 g/L) por *Zymomonas mobilis* livre em meio de cultivo com pH inicial ajustado para 7, concentração de sacarose de 200 g/L em 24 h e com 200 min⁻¹ de agitação. Resultados estes, mais elevados do que os obtidos neste experimento, para o pH inicial do meio de fermentação, conforme observado nas Tabelas 5, 7, 9 e 11.

Em oposição ao observado neste estudo, para alginato e bagaço de cana, Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) avaliaram a produção de levana com pH ajustado para 4,5 e 7 e obtiveram melhor produção de levana (14,5 g/L) em meio de fermentação com pH inicial ajustado a 5. Em pH 7 observaram menor produção e no meio com pH 4 não houve produção do bipolímero, possivelmente devido a baixa taxa de crescimento celular observada.

Alegre; Wendt e Rigo (2005), avaliando a biossíntese de levana por *Zymomonas mobilis* livre, em meio de cultivo com pH inicial ajustado para 6 e 200 min⁻¹, observaram produção de 42,76 g/L com 150 g/L de sacarose em 24 h de fermentação. Resultados estes semelhantes aos obtidos neste estudo para o pH inicial utilizando o suporte quitosana e bucha vegetal (Figura 13 e 14).

A maior produção em pH ácido, conforme observado no presente trabalho (Tabelas 5, 7, 9, e 11), pode ser explicada devido ao pH estar próximo ao valor ótimo para a síntese da enzima levanasacarase (pH 5), uma das enzimas responsáveis pela formação da levana. Além disso, em valores de pH maiores que 5, a síntese de outros oligossacarídeos é estimulada (YANASE et al., 1992; ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999).

Dentre os suportes de imobilização avaliados, de acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 5, 7, 9, e 11, o melhor suporte para a produção de levana foi a bucha vegetal (2,3-24,9 g/L), seguido do bagaço de cana (0,4-11,52 g/L); quitosana (1,1-8,3 g/L) e por último o alginato (0,1-6,7 g/L). É importante destacar, que a concentração celular no suporte não influenciou na síntese de levana nos suportes avaliados, conforme descrito nas Tabelas 5, 7, 9, e 11.

5.4. Produção de etanol

Para a produção de etanol pelo suporte alginato, de acordo com a ANOVA, os parâmetros que apresentaram interferência estatística significativa ($p < 0,05$) foram o pH inicial e a temperatura de fermentação, conforme apresentado na Tabela 22. Por meio da MSR,

verificou-se que não houve efeito significativo dos demais parâmetros para a produção de etanol, como demonstrado na Tabela 4 e Figura 18.

O maior valor de rendimento de produção (0,18 g/g) foi observado em concentração de sacarose (150 g/L), agitação de 200 min⁻¹, pH inicial ajustado a 4, sob temperatura de 40 °C, com 16 h de fermentação (Tabela 4). A máxima produtividade de etanol (0,92 g/L.h) foi observada em pH 7, 16 h, 30°C, 200 min⁻¹ de agitação e 350 g/L de sacarose.

Tabela 22. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de *p* para a produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **alginato**.

Variáveis	Produção de etanol	
	Efeito	<i>P</i>
X ₁	0,78418	0,631605
X ₂ *	3,73831	0,030526
X ₃	3,24053	0,057375
X ₄ *	-5,30667	0,003469
X ₅	-1,01681	0,534909

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$). x₁: sacarose; x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Para os experimentos realizados utilizando a quitosana como suporte de imobilização, de acordo com a ANOVA, verificou-se que nenhum parâmetro avaliado teve interferência estatística significativa ($p < 0,05$) para a produção de etanol, conforme apresentado na Tabela 23.

Com base na MSR, verificou-se este mesmo comportamento, sendo que os parâmetros analisados não afetaram a produção de etanol, a qual foi muito baixa, com produção máxima de 2,91 g/L, nos ensaios com 250 g/L de sacarose, pH 5,5, e temperatura de 30 °C durante 56 h de fermentação a 100 min⁻¹, conforme demonstrado na Figura 19. O maior valor de rendimento de produção (0,43 g/g) foi observado com 150 g/L, pH 4, a temperatura de 40 °C, sem agitação por 96 h de fermentação. A produtividade (0,11 g/L.h), no entanto, foi maior nos ensaios com 150 g/L de sacarose, pH 7, 30°C, 200 min⁻¹ durante 16 h de fermentação (Tabela 7).

Nos ensaios utilizando a bucha vegetal como suporte de imobilização, de acordo com a ANOVA, nenhum dos parâmetros estudados, apresentou interferência estatística significativa ($p < 0,05$), como apresentado na Tabela 24. Com base na MSR, a maior produção de etanol (50,95 g/L) foi observada utilizando o pH inicial ajustado a 5,5 e 7, durante 56 e 96 h de fermentação e com ausência e 100 min⁻¹ de agitação. Além destes, a concentração de

sacarose de 150 e 250 g/L e a temperaturas de 30 e 35°C também influenciaram a síntese de etanol pelo sistema imobilizado (Tabela 8 e Figura 20).

Tabela 23. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **quitosana**.

Variáveis	Produção de etanol	
	Efeito	p
X ₁	-0,126099	0,551200
X ₂	0,128226	0,544566
X ₃	-0,026044	0,901633
X ₄	-0,115984	0,583336
X ₅	-0,046981	0,823641

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$). x₁: sacarose; x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: agitação (min⁻¹).

Por outro lado, a produção de etanol utilizando a bucha vegetal como suporte, apresentou maior rendimento (0,95 g/g) nos ensaios com 150 g/L de sacarose, pH 4, 40°C, durante 16 h de fermentação a 200 min⁻¹, conforme destacado na Tabela 9. A melhor produtividade apresentou o mesmo perfil apenas para o tempo e temperatura, com maiores valores (0,78-1,19 g/L.h) nos ensaios com 350 g/L de sacarose, pH inicial ajustado a 7 e ausência de agitação.

Tabela 24. Tabela ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de p para a produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **bucha vegetal**.

Variáveis	Produção de etanol	
	Efeito	p
X ₁	-3,18705	0,549486
X ₂	6,35294	0,238734
X ₃	8,69608	0,111796
X ₄	-9,33393	0,089276
X ₅	-4,78958	0,370975

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$). x₁: sacarose; x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Para o suporte bagaço de cana, da mesma forma como observado para os demais suportes, nenhuma das variáveis avaliadas apresentaram interferência estatística significativa ($p < 0,05$) de acordo com a ANOVA (Tabela 25). Desta mesma forma, por meio da MRS,

verificou-se que não houve influência dos parâmetros estudados na síntese de etanol. O maior valor de produção observado foi 41,57 g/L, conforme apresentado na Tabela 11 e Figura 21.

O maior resultado para rendimento de produção (0,61 g/g) foi observado nos experimentos realizados com 150 g/L de sacarose, pH 4, 40°C, com 200 min⁻¹ de agitação, durante 16 h de fermentação. A produtividade (1,14 g/L.h) também foi melhor nas mesmas condições citadas para o rendimento, exceto para a sacarose inicial (350 g/L) e ausência de agitação (Tabela 11).

Tabela 25. Tabela da ANOVA referente à estimativa dos efeitos e valores de *p* para a produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada no suporte **bagaço de cana**.

Variáveis	Produção de etanol	
	Efeito	<i>p</i>
X ₁	-3,18705	0,549486
X ₂	6,35294	0,238734
X ₃	8,69608	0,111796
X ₄	-9,33393	0,089276
X ₅	-4,78958	0,370975

*Variáveis com interferência estatística significativa ($p < 0,05$). x₁: sacarose; x₂: pH inicial; x₃: tempo (h); x₄: temperatura (°C); x₅: frequência de agitação (min⁻¹).

Há divergências na literatura quanto às condições ótimas para produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* em sistemas imobilizados. Os parâmetros mais citados são o pH inicial do meio de fermentação, que deve estar entre 4,5 e 7,5; temperatura de 25 a 37°C e concentração de açúcares de 150 a 250 g/L no meio de cultivo (CAZZETA et al., 2007; KANNAN et al., 1998; BANDARU et al., 2006). Estes parâmetros foram avaliados nesse estudo para todos os suportes de imobilização (Tabela 2).

Conforme mencionado por Bandaru et al. (2006), os parâmetros físicos mais importantes para a biossíntese de etanol são a temperatura, o pH inicial e o tempo de fermentação. Este comportamento foi observado neste trabalho apenas para o suporte alginato (Figura 16).

Com relação à influência do pH inicial do meio de fermentação na produção de etanol, observou-se que o pH inicial ajustado a 5,5 foi o melhor valor para todos os suportes avaliados neste estudo (Figuras 16, 17, 18 e 19). Este comportamento também foi observado por Maiti et al. (2011); Bandaru et al. (2006) e Pinilla;Torres e Ortiz (2011).

Resultados semelhantes também foram observados por Vaheed; Shojaosadati e Galip (2011), os quais verificaram máximo rendimento de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* livre em meio de cultivo com pH ajustado a 5,2.

Para todos os suportes avaliados, apesar de não ser uma variável significativa na produção de etanol, nos ensaios com concentração de sacarose inicial de 250 g/L, obteve-se os maiores valores de etanol (Tabelas 5, 7, 9 e 11). Este comportamento também foi observado por Kannan; Sangiliyandi; Gunasekaran (1998); Maiti et al. (2011); Iida et al. (1993).

Letti et al. (2012), avaliando o efeito da concentração de melaço de soja, na síntese de etanol por *Zymomonas mobilis* a temperatura de 30°C e 18 h de fermentação em frascos de Erlenmeyer, também verificaram os maiores valores de produção em 200 g/L de substrato, com respectivamente, 26,0 e 24,2 g/L de etanol, sendo que o maior rendimento (0,4 g/g) foi observado na menor concentração de substrato testada. Compararam também, a produção em frascos de Erlenmeyer com a produção utilizando fermentador, e obtiveram maior produção de etanol quando as fermentações foram realizadas sob condições controladas em fermentador (29,3 g/L), com rendimento de 0,49 g/g de etanol.

Com relação ao tempo de fermentação, apesar da pouca influência na síntese de etanol, verificou-se que para todos os suportes de imobilização, os ensaios realizados com 56 e 96 h apresentaram os maiores valores de produção, conforme destacado nas Tabelas 5, 7, 9 e 11 e Figuras 18, 19, 20 e 21. Resultados semelhantes também foram observados por Behera; Ray e Mohanty (2010).

No presente estudo, a melhor temperatura para a síntese de etanol foi de 30 e 35°C para todos os suportes avaliados, sendo que, para o suporte alginato, esta apresentou influência estatística significativa na produção de etanol. Este comportamento também foi citado por Iida et al. (1993); Sreekumar et al. (1999); Behera; Ray e Mohanty (2010); Kannan; Sangiliyandi e Gunasekaran (1998); Bandaru et al. (2006).

Sreekumar et al. (1999) e Cazetta et al. (2007) citam que em temperaturas acima de 40°C há redução na biossíntese de etanol, comportamento este observado também no presente estudo (Figuras 18, 19, 20 e 21). Por outro lado, Ernandes (2009) obteve valor máximo de 76,6 g/L para a produção de etanol sob temperatura de 40°C, utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis* livre em meio contendo 250 g/L de sacarose, pH inicial ajustado a 8 durante 24 h de fermentação a 200 min⁻¹.

Conforme destacado anteriormente, para todos os suportes, a agitação não influenciou estatisticamente na produção de etanol. Apesar disso, os maiores valores de produção de

etanol foram observados nos ensaios realizados com ausência de agitação e também submetendo as amostras a leve agitação (100 min^{-1}). Resultados semelhantes foram obtidos por Ernandes (2009); Pinilla; Torres e Ortiz (2011) e Kannan; Sangiliyandi e Gunasekaran (1998).

Da mesma forma como observado no presente trabalho, Bandaru et al. (2006), utilizando amido de sagu como substrato para a biossíntese de etanol por co-imobilização de amiloglucosidase e *Zymomonas mobilis*, observaram melhor produção de etanol (55,3 g/L) em pH 4,9 e 32 °C. No presente estudo, foram obtidos valores semelhantes para os ensaios com bucha vegetal e bagaço de cana, utilizando o mesmo microrganismo (Tabelas 9 e 11).

Iida et al. (1993) utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis*, imobilizada em resina gel para a biossíntese de etanol, obtiveram resultados superiores aos obtidos neste estudo (Figuras 18, 19, 20 e 21), com produção de 70-80 g/L de etanol, a temperatura de 30°C e 200 g/L de melaço.

Behera et al. (2010) obtiveram resultados superiores aos obtidos no presente estudo (Tabelas 5, 7, 9 e 11), utilizando células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato e ágar-ágar, com produção de etanol de 148 e 152,8 g/L respectivamente, em 24 h de fermentação, pH 5,5 e temperatura de 30°C.

Maiti et al. (2011) utilizaram melaço de cana para a biossíntese de etanol, por *Zymomonas mobilis* e obtiveram melhor produção (59,59 g/L) em concentração de sacarose de 200 g/L a 30°C, pH 5,13 e 44 h de fermentação. Em 40°C e pH ajustado para 6,5, verificou-se redução na produção de etanol (20,0 g/L). Tais resultados são semelhantes aos observados no presente estudo, uma vez que o aumento da temperatura foi um fator limitante para a síntese de etanol.

Mathew et al. (2013) também obtiveram maior produção de etanol em temperatura de 30°C, utilizando palha de canola como fonte de carbono, com valores de $169,26 \text{ g/kg}^{-1}$ utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato.

Das et al. (2013), utilizando cultivo misto de *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol a partir de palha de arroz como substrato por fermentação em estado sólido, obtiveram máxima produção de etanol de 40,1 g/L, resultados estes inferiores aos observados no presente estudo para bagaço de cana e bucha vegetal.

Dentre os suportes de imobilização avaliados, de acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 5, 7, 9 e 11, a bucha vegetal foi o melhor suporte para a produção de etanol (6,08-50,95 g/L), seguida do bagaço de cana (8,55-41,57 g/L), alginato (2,5-17,9 g/L) e

por último, a quitosana com produção de 1,02-2,91g/L. Da mesma forma como observado para a produção de levana, a concentração celular no suporte não teve influência na síntese de etanol nos suportes testados, conforme demonstrado nas Tabelas 5, 7, 9 e 11. Isso ocorre porque a *Zymomonas mobilis* é um microrganismo com crescimento celular independente da síntese de etanol, e devido a essa particularidade, este microrganismo é considerado um excelente produtor de etanol (BELAICH e SENEZ, 1965; LAWFORDE e STEVNSBORG, 1986; JONES e DOELLE, 1991; KALNEINIEKS, 2006).

Figura 18. Superfícies de resposta utilizando o **alginato** como suporte de imobilização para (A) produção de **etanol** (g/L), ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo de fermentação (h); (C) produção de etanol ao redor dos valores ótimos de pH e frequência de agitação (min^{-1}).

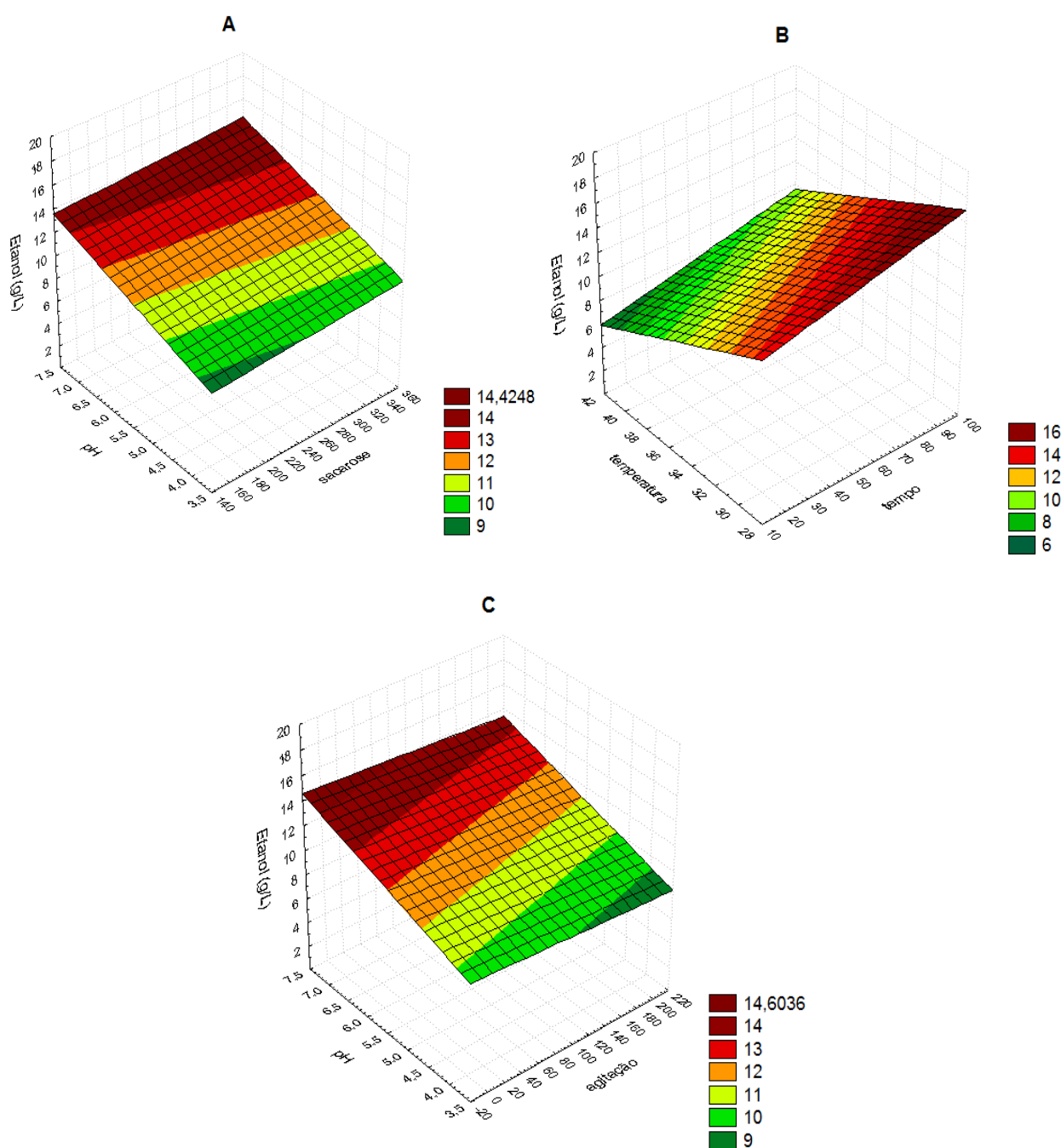


Figura 19. Superfícies de resposta utilizando a **quitosana** como suporte de imobilização para (A) produção de **etanol** (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e frequência de agitação (min^{-1}).

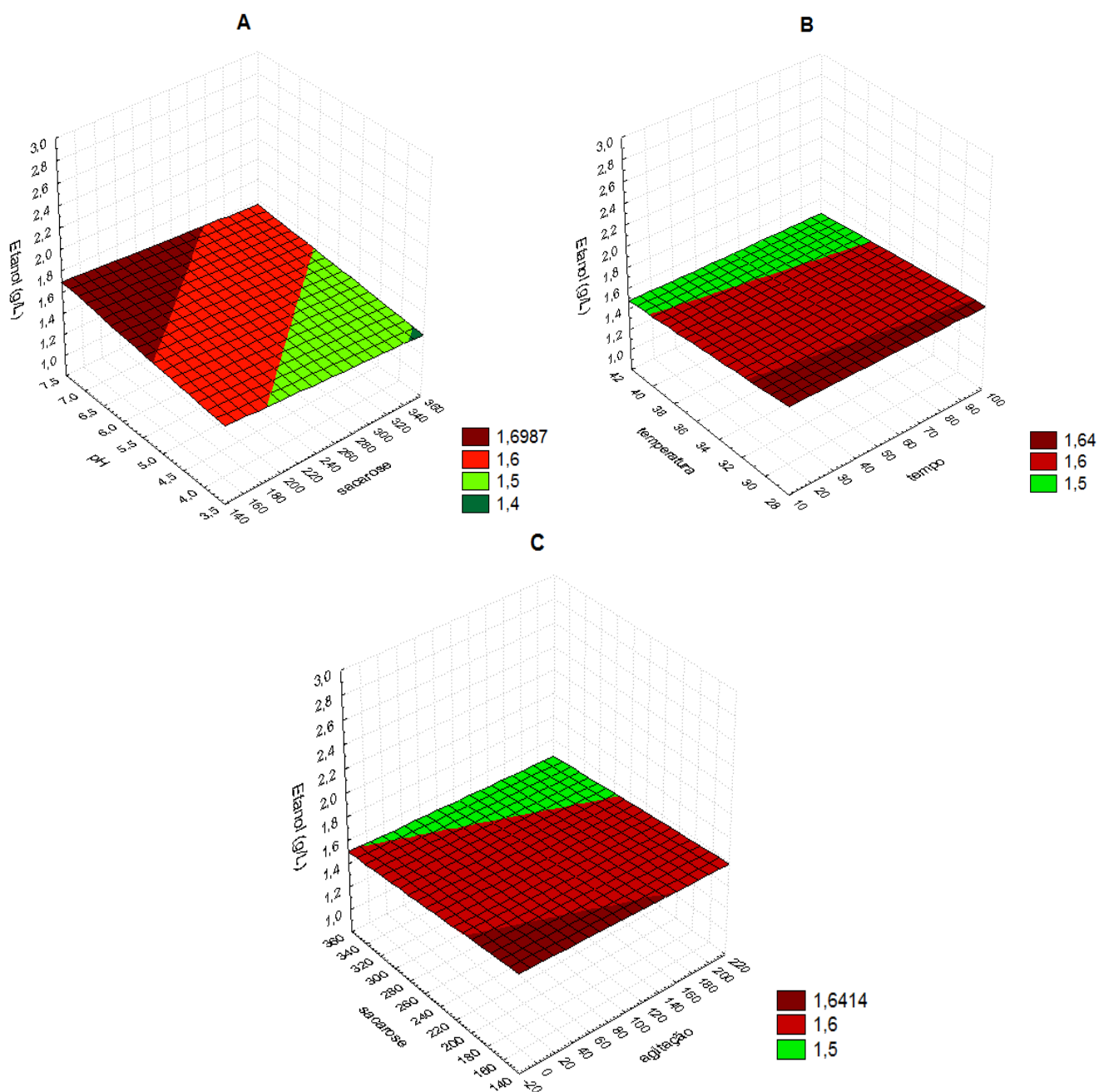


Figura 20. Superfícies de resposta utilizando **bucha vegetal** como suporte de imobilização para (A) produção de **etanol** (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e frequência de agitação (min^{-1}).

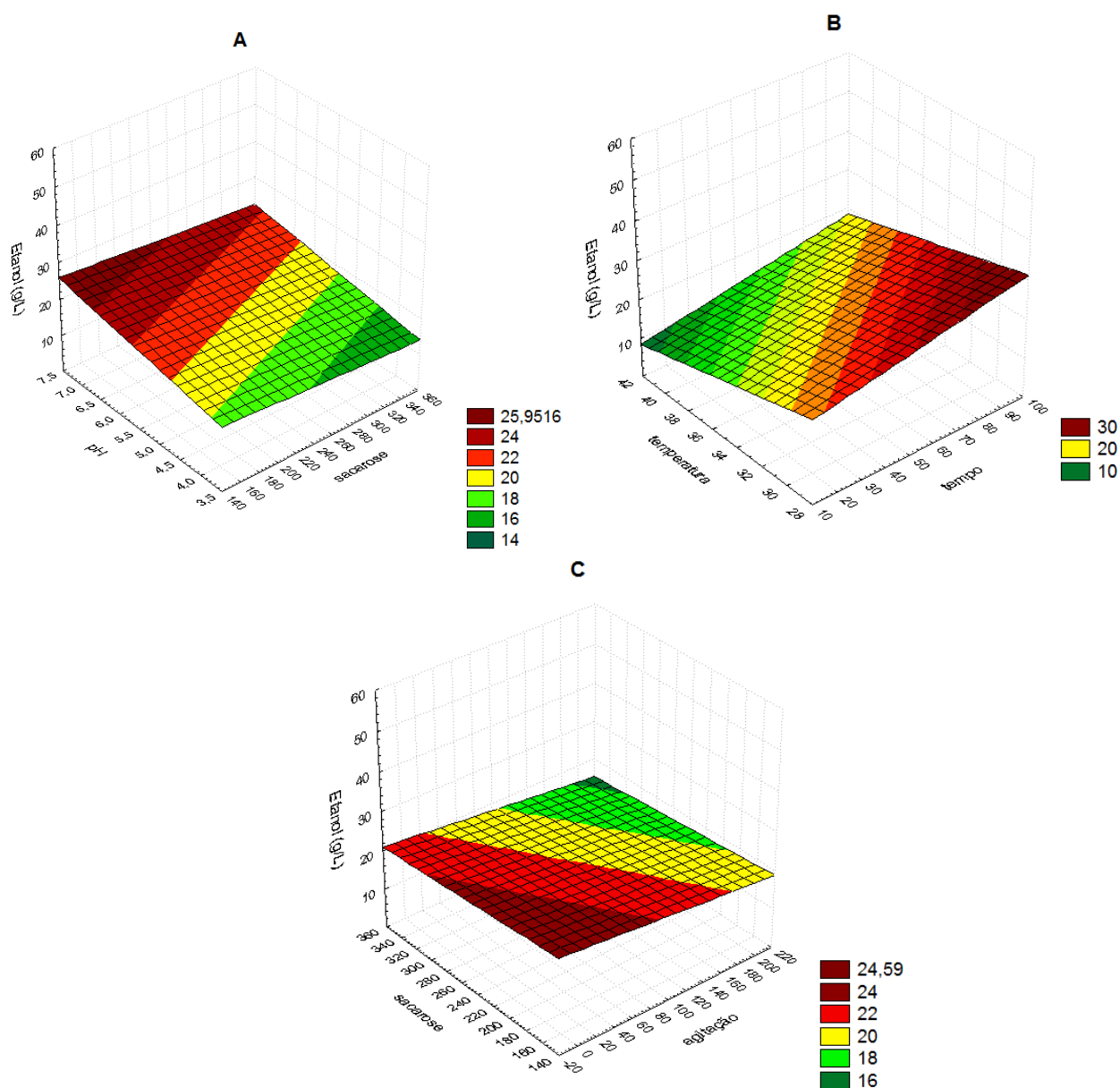
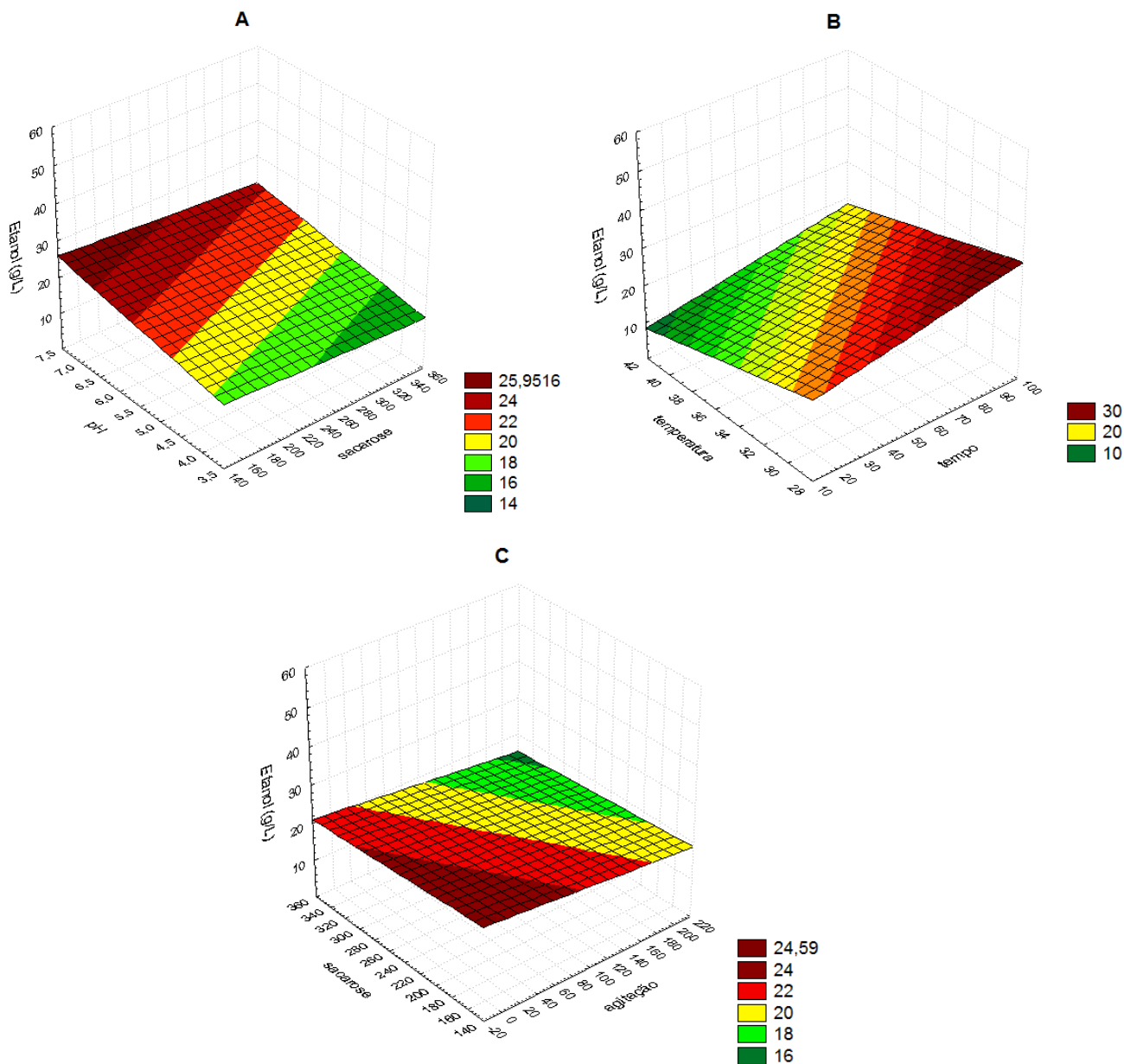


Figura 21. Superfícies de resposta utilizando **bagaço de cana** como suporte de imobilização para (A) produção de **etanol** (g/L) ao redor dos valores ótimos de pH e sacarose (g/L); (B) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo (h); (C) produção de etanol (g/L) ao redor dos valores ótimos de sacarose (g/L) e frequência de agitação (min^{-1}).



5.5. Reciclo dos suportes de imobilização

Com base nas melhores condições de produção obtidas nos experimentos 2⁽⁵⁻²⁾ utilizando a metodologia de superfície de resposta (Tabela 26). Realizou-se a reciclagem dos suportes durante 12 dias de fermentação.

Tabela 26. Condições ótimas, para a produção de levana e etanol obtidas no experimento 2⁵⁻², utilizando a metodologia de superfície de resposta, para os suportes alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana.

	Alginato	Quitosana	Bucha vegetal	Bagaço de cana
Sacarose (g/L)	350	350	350	350
pH	4	7	7	4
Temperatura (°C)	30	30	40	30
Frequência de agitação (min ⁻¹)	200	200	-	-

5.5.1. Biomassa livre e imobilizada aos suportes durante os ciclos de reutilização dos suportes

A biomassa imobilizada em esferas de alginato permaneceu viável, durante todos os ciclos de reutilização, o que indica a alta afinidade do suporte com o microrganismo, conforme demonstrado por microscopia eletrônica de varredura (Figura 22). Nesta Figura, verificou-se a presença de grande quantidade de células imobilizadas, tanto na superfície quanto no interior da esfera. Na superfície interna da esfera observou-se grande crescimento microbiano entre a estrutura do suporte, conforme apresentado na Figura 22 (B, C e D).

A biomassa imobilizada no primeiro ciclo de fermentação foi de 0,003 g/L; com 5 dias aumentou para 0,19 g/L e ao final do último ciclo, a biomassa imobilizada foi de 0,94 g/L. É importante destacar também que as esferas de alginato permaneceram íntegras do primeiro até o último ciclo de fermentação, apenas com alteração na textura e na coloração, possivelmente devido ao crescimento microbiano no suporte, bem como à presença de levana no interior da esfera (Figura 23).

O suporte quitosana, por sua vez, apresentou biomassa imobilizada no primeiro ciclo de fermentação 0,001 g/L, e se mostrou inviável para imobilizar a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT4494, uma vez que as esferas não suportaram as condições de fermentação utilizadas, bem como os ciclos de fermentação, e se dissolveram após o segundo reciclo. A microbiota aderida ao suporte após a imobilização pode ser observada na Figura 24. Nesta,

observa-se que houve reduzida adesão microbiana, porém, assim como para o alginato, houve crescimento microbiano tanto no exterior quanto no interior da esfera. Nesta mesma Figura, destaca-se ainda, a estrutura irregular externa da esfera também com o microrganismo imobilizado (Figura 24 A, B, C e D).

Este comportamento observado para as esferas de quitosana, durante os ciclos de fermentação, pode ser devido à natureza do suporte que em meio ácido se solubiliza e devido ao metabolismo do microrganismo levar ao acúmulo de ácidos no meio de cultura, este pode ter solubilizado a quitosana desfazendo as esferas (Figura 25).

O suporte bucha vegetal foi eficiente para a imobilização do microrganismo, o qual apresentou biomassa de 0,06 g/L no primeiro ciclo de fermentação, com aumento no quinto ciclo para 0,45 g/L, porém, apresentou queda no crescimento no último ciclo de fermentação com valor de 0,13 g/L, conforme está destacado na Figura 26, por microscopia eletrônica de varredura. Nesta Figura verifica-se, principalmente, a alta adesão microbiana e também, as alterações morfológicas apresentadas pelo microrganismo imobilizado no suporte, após vários ciclos de fermentação (JAMAI, et al., 2001).

O suporte bagaço de cana, assim como o alginato e a bucha vegetal, foi eficiente para a imobilização da bactéria com crescimento inicial de 1,51 g/L. Verificou-se também, aumento da biomassa no quinto ciclo para 3,69 g/L e no último ciclo de fermentação houve pequena redução da biomassa imobilizada para 3,23 g/L. Na Figura 27, por meio de microscopia eletrônica de varredura, comprova-se a eficiência da imobilização da bactéria *Zymomonas mobilis* ao suporte bagaço de cana, onde nota-se a alta densidade celular no suporte após vários ciclos de fermentação.

Com relação à estabilidade dos suportes bucha vegetal e bagaço de cana, verificou-se que ambos permaneceram estáveis durante todos os ciclos de fermentação, conforme demonstrado nas Figuras 28 e 29.

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura de esferas de **alginato** com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 imobilizada (A: superfície externa com o microrganismo imobilizado); (B: interior da esfera destacando o crescimento microbiano); (C e D: interior da esfera em maior aumento, destacando a grande quantidade de biomassa imobilizada).

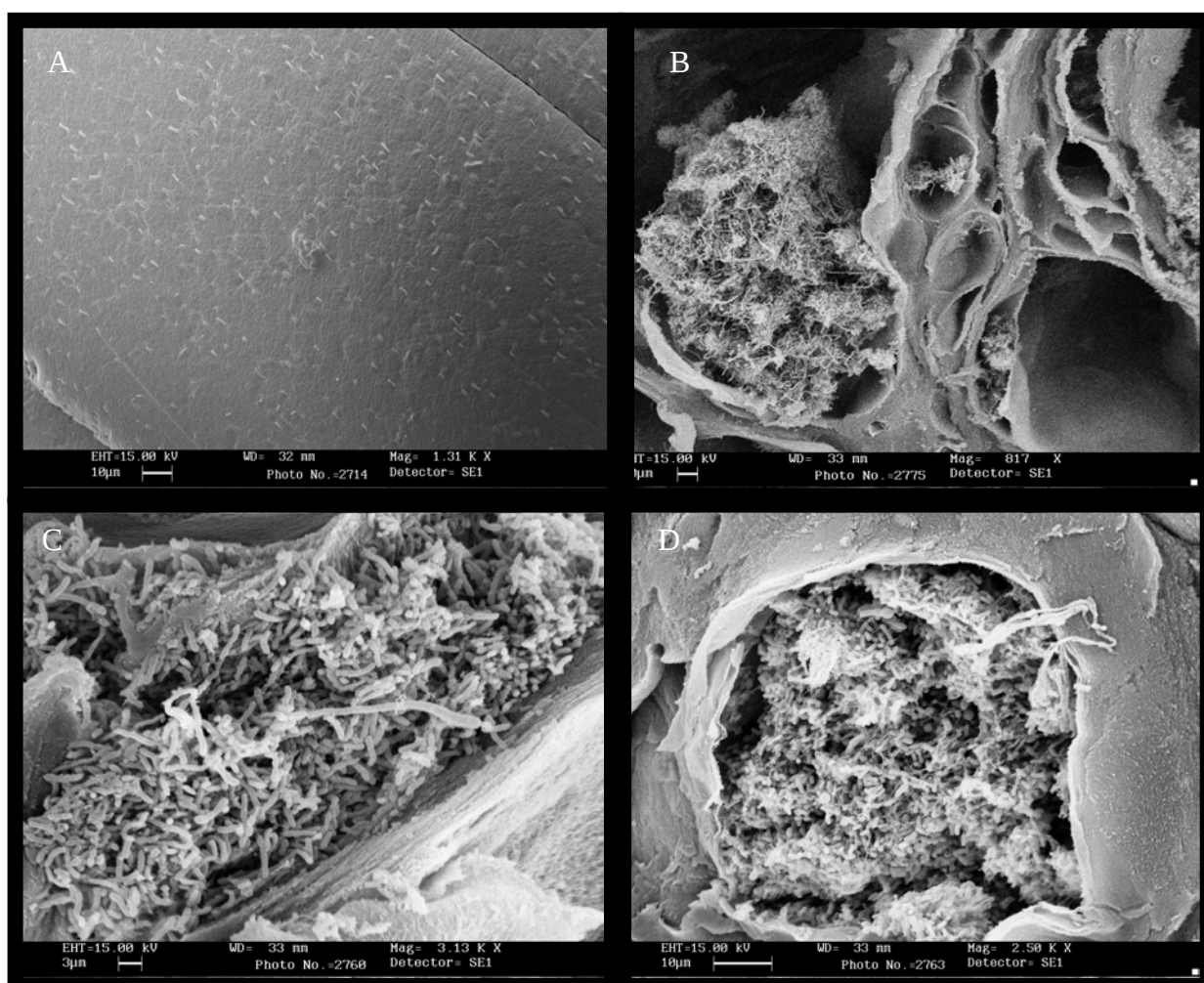


Figura 23. Aspecto das esferas de **alginato** no primeiro (A) e último dia de reciclo (B).

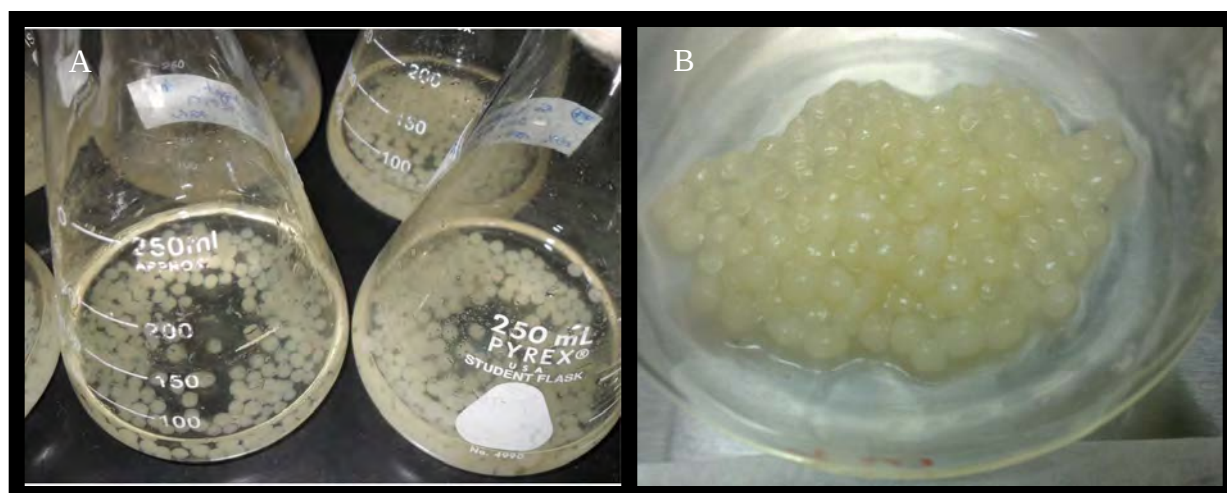


Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura de esferas de **quitosana** com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 imobilizada (A e C: exterior da esfera com o microrganismo imobilizado); (B: interior da esfera destacando o crescimento microbiano) e (D: superfície externa da esfera também com o microrganismo imobilizado, destacando que a mesma tem estrutura irregular).

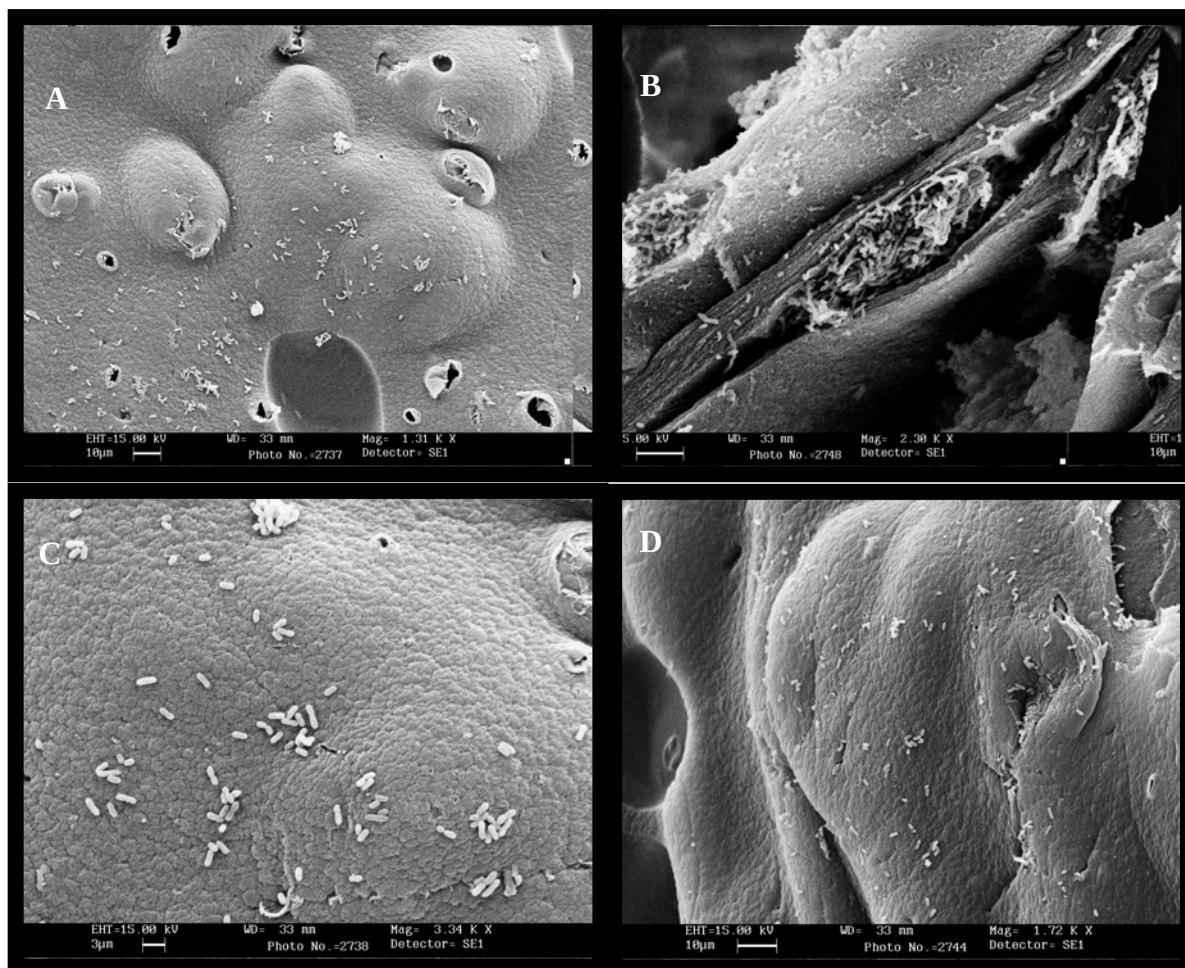


Figura 25. Aspecto das esferas de quitosana no primeiro (A) e segundo dia de reciclo (B).



Com relação à biomassa livre no meio de fermentação, utilizando o suporte quitosana, verificou-se valor de 1,63 g/L no segundo e último ciclo de reutilização, demonstrando que o microrganismo cresceu também no meio de cultivo, porém não foi possível seguir com o reciclo pois as esferas dissolveram-se. Para o suporte alginato, observou-se que houve desprendimento e crescimento celular durante todos os ciclos de reutilização do suporte, com valores de 0,18 a 2,65 g/L, sendo o sétimo ciclo, o que apresentou maior crescimento (Tabela 27).

No suporte bucha vegetal, verificou-se que houve crescimento celular durante todos os ciclos, com biomassa livre inicial de 0,41 g/L e máximo de 1,01 g/L no terceiro ciclo, com queda para 0,1 g/L após o nono ciclo de reutilização (Tabela 28). Por outro lado, o bagaço de cana foi o suporte com os maiores valores de biomassa livre no meio de cultivo, o qual apresentou biomassa inicial de 1,24 g/L, com máximo de crescimento no sétimo ciclo de (2,58 g/L), apresentando também queda no crescimento celular nos últimos ciclos de reutilização do suporte (2,51-1,43 g/L), como apresentado na Tabela 29.

Com base nos valores de biomassa livre observados para todos os suportes estudados, verifica-se que, ao utilizar células imobilizadas, independentemente do suporte e técnica, ocorre o desprendimento natural de células para o meio de cultivo, as quais crescem e auxiliam na síntese de produto, levando a um cultivo misto.

Com relação à eficiência da imobilização, o bagaço de cana foi o suporte que apresentou maiores valores de biomassa imobilizada, seguido do alginato, bucha vegetal e por último a quitosana. É importante destacar que todos, exceto a quitosana, permaneceram viáveis durante todos os ciclos de fermentação, o que indica que estes podem ser utilizados em processos fermentativos por batelada seqüencial.

Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura de **bucha vegetal** com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 imobilizada (A: estrutura da bucha vegetal com menor aumento, demonstrando as fissuras do suporte); (B: microbiota aderida a estrutura da bucha vegetal logo após a imobilização); (C e E: microbiota aderida a estrutura vegetal, em maior aumento, demonstrando a alta adesão ao suporte e também, as alterações morfológicas após vários ciclos de fermentação); (D: alta densidade celular aderida ao suporte após vários ciclos de fermentação); (E e F: microbiota aderida ao suporte após as fermentações em maior aumento).

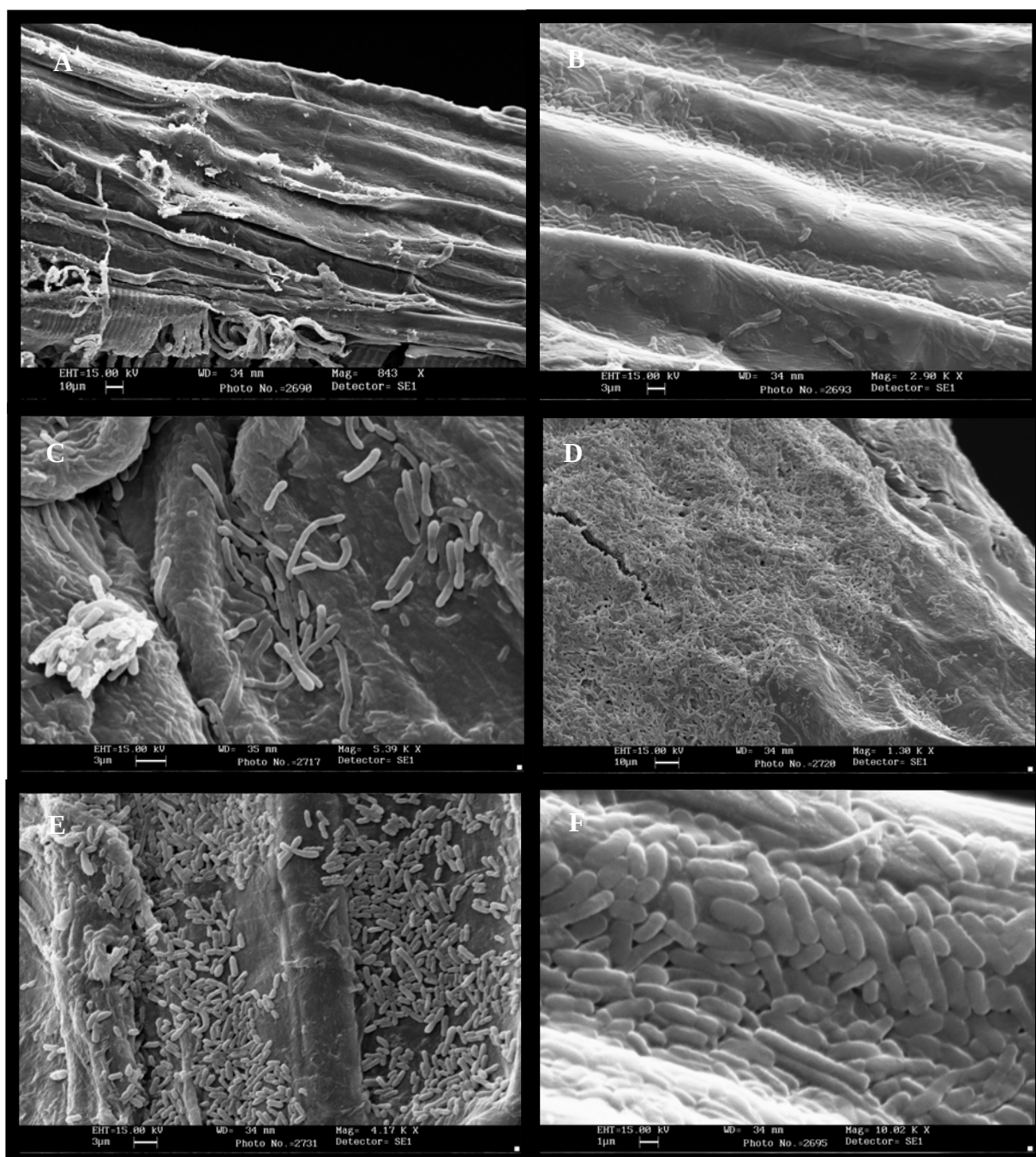


Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura de **bagago de cana** com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 imobilizada (A, B, E e F: estrutura do bagago de cana com menor aumento, demonstrando a estrutura do suporte com o microrganismo imobilizado); (C: microbiota aderida a estrutura do bagago de cana em maior aumento); (D: microbiota aderida a estrutura vegetal, em maior aumento, demonstrando a boa adesão ao suporte e após vários ciclos de fermentação).

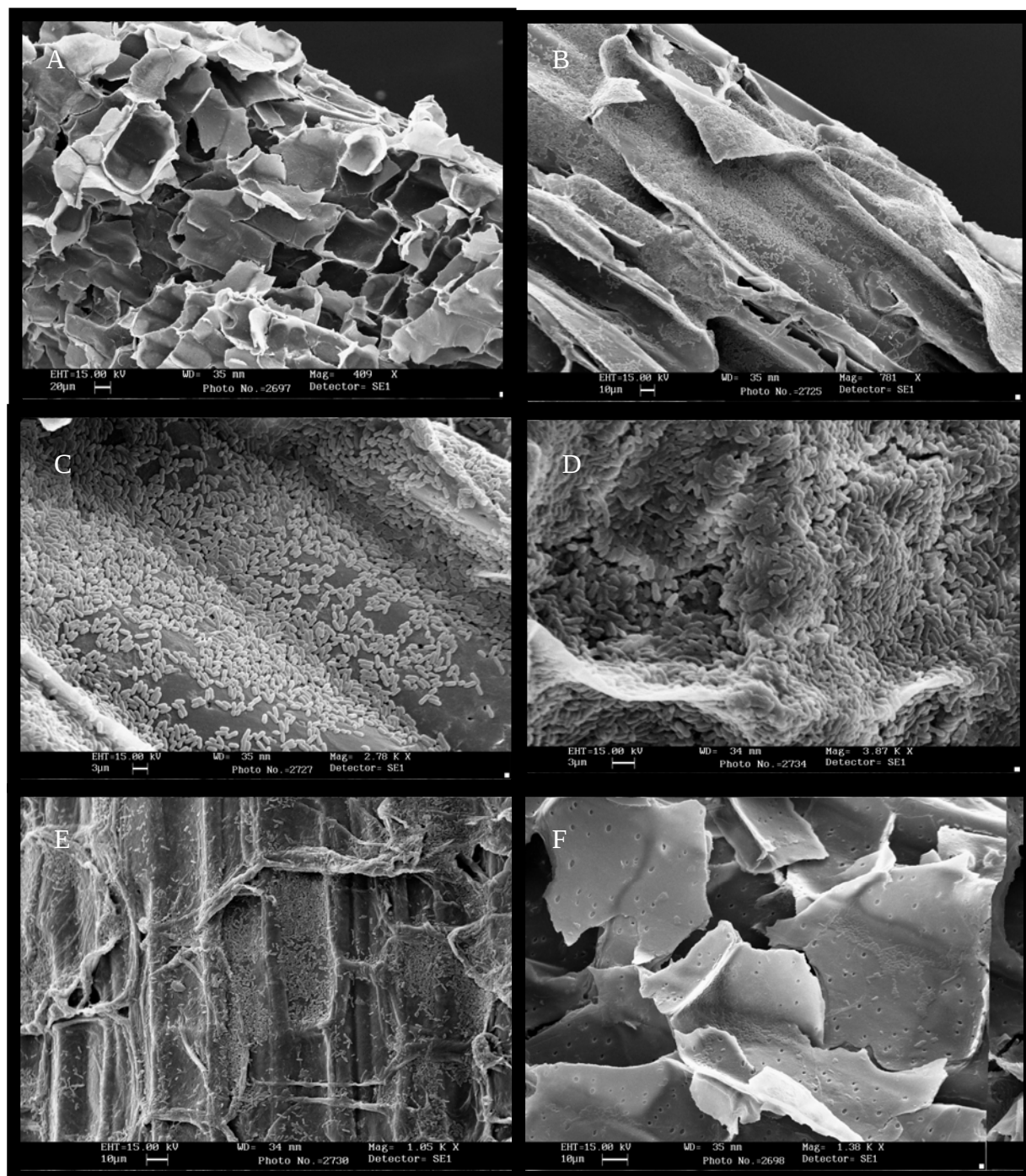


Figura 28. Aspecto do suporte **bucha vegetal** antes da imobilização (A) e no último dia de reciclo (B).



Figura 29. Aspecto do suporte **bagaço de cana** antes da imobilização (A) e no último dia de reciclo (B).



5.5.2. Comportamento do pH final do meio de cultivo e consumo do substrato sacarose durante os ciclos de reutilização dos suportes

Para o suporte quitosana, observou-se que o pH final do meio de cultivo assim como observado para os experimentos por batelada, permaneceu com valores bastante altos, sendo 7,55 para o primeiro e 8,14 para o segundo reciclo, possivelmente devido a natureza alcalina do suporte, o que afetou a produção de levana e etanol. Para o consumo do substrato, observou-se consumo de 56,69 e 76,32 % no primeiro e segundo reciclos.

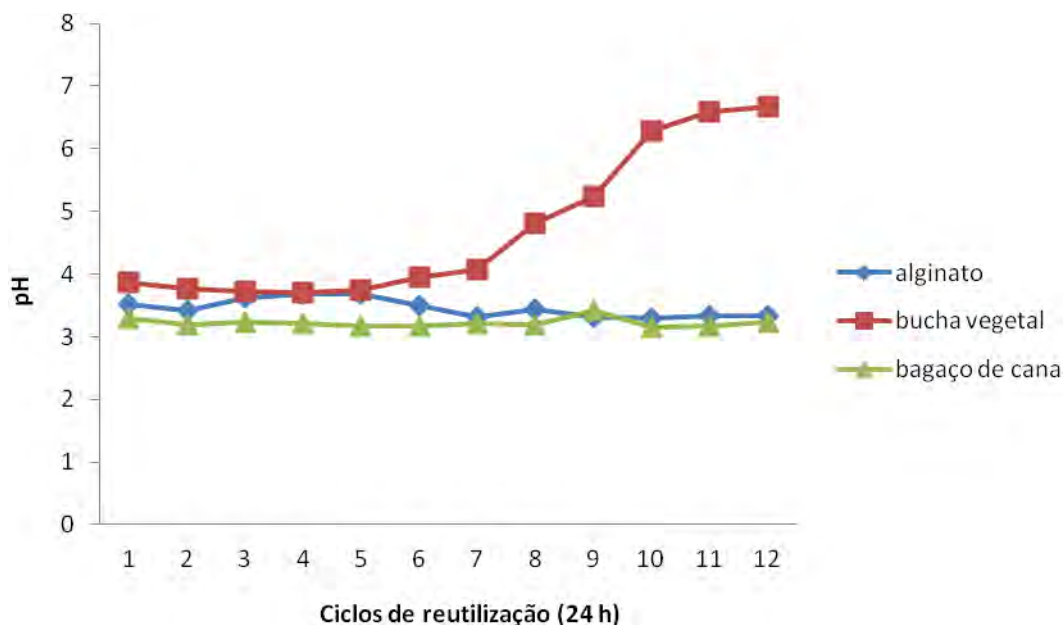
O suporte alginato de forma similar ao observado nas fermentações por batelada, apresentou valores de pH final entre 3,29 e 3,69 (Figura 28). Neste suporte, verificou-se consumo do substrato de 43,58 a 78,96 %, conforme destacado na Tabela 27.

O pH final observado nos ensaios com bucha vegetal, apresentou variações durante os ciclos de reutilização, com reduzidos valores nos primeiros ciclos (3,86-3,94), e após o oitavo, houve baixa redução, ou seja, o pH permaneceu sem redução, o que indica que nestes últimos reciclos pode ter havido morte do microrganismo no suporte (Figura 30).

Com relação ao pH final do meio de cultivo para o suporte bagaço de cana, verificou-se comportamento semelhante ao observado para o suporte alginato, com valores entre 3,15 e 3,41, conforme destacado na Figura 28. A acidificação do meio indica que o microrganismo esteve metabolicamente ativo no suporte, uma vez que os ácidos são um dos compostos sintetizados pelo microrganismo, além de levana e etanol durante o consumo do substrato (MADIGAN et al., 2010).

Com relação ao consumo do substrato sacarose, nas fermentações utilizando os suportes bucha vegetal e bagaço de cana verificou-se que houve consumo de 17-83,86% para bucha vegetal e 78,09-92,64 % para bagaço de cana, os quais apresentaram os maiores valores de consumo de sacarose, de acordo com as Tabelas 28 e 29.

Figura 30. Comportamento do pH final do meio de cultivo, fermentado por *Zymomonas mobilis* imobilizada em alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana durante os ciclos de reutilização.



5.5.3. Produção de levana durante os ciclos de reutilização dos suportes

A produção de levana pelo suporte quitosana durante os ciclos de reutilização foi baixa com maior produção no primeiro ciclo (3,47 g/L) com diferença estatística significativa a 95 % de confiabilidade, em relação ao segundo ciclo com 1,99 g/L, com consumo da sacarose de 39,37 e 76,32 % respectivamente (Figura 31). A produtividade foi de 0,08 e 0,14 g/L.h e o rendimento permaneceu entre 0,007 e 0,01 g/g. Para os demais tempos de reutilização não foi possível avaliar a produção, uma vez que as esferas se dissolveram devido ao pH do meio (Figura 25).

Este comportamento, não foi observado durante as fermentações realizadas por batelada, onde obteve-se estabilidade das esferas durante os experimentos (item 5.3), demonstrando que o suporte quitosana não é viável para processos semicontínuos de fermentação.

As células imobilizadas em alginato apresentaram boa produção de levana, com máxima produção no sétimo e décimo ciclos, sem diferença estatística significativa entre ambos ($p < 0,05$), porém em relação aos demais, o 10º ciclo apresentou os maiores valores com

diferença significativa ($p < 0,05$). O sétimo ciclo foi maior com diferença estatística ($p < 0,05$) apenas para os 1º, 5º, 6º e 9º ciclos, conforme apresentado na Figura 31 e Tabela 27.

A produção durante os doze ciclos esteve entre 3,63 e 21,11 g/L, apresentando-se quase constante após o décimo ciclo, com consumo do substrato sacarose entre 43,58 a 78,96 %, sendo que o maior consumo foi acompanhado pela maior produção de levana, e também de biomassa livre no meio de cultivo. A produtividade esteve entre 0,15 e 0,88 g/L.h e o rendimento de produção entre 0,02 a 0,09 g/g, conforme destacado na Tabela 27.

Tabela 27. Resultados para a produção de levana, etanol, consumo do substrato e biomassa livre produzida por *Zymomonas mobilis* CCT4494 imobilizada em **alginato** durante os ciclos de reutilização.

Ciclos (24 h)	L (g/L)	PTL (g/L.h)	YL (g/g)	E (g/L)	PTE (g/L.h)	YE (g/g)	CS (%)	BL (g/L)
1	3,63 ^a	0,15	0,02	5,69 ^a	0,24	0,03	61,14	0,18
2	9,81 ^{b,c}	0,41	0,04	16,97 ^{b,c,g}	0,71	0,07	74,57	1,04
3	11,32 ^{b,c}	0,47	0,06	8,17 ^d	0,34	0,05	51,41	0,29
4	10,10 ^{b,c}	0,42	0,07	17,73 ^{b,c,g}	0,74	0,12	43,58	0,14
5	8,78 ^b	0,37	0,03	2,19 ^e	0,09	0,01	74,78	1,66
6	8,29 ^b	0,35	0,04	14,65 ^f	0,61	0,08	54,14	1,17
7	17,04 ^{c,d}	0,71	0,06	17,00 ^{b,c,g}	0,71	0,06	78,96	2,65
8	10,98 ^{b,c}	0,46	0,05	16,17 ^{f,g}	0,67	0,07	64,16	1,36
9	8,63 ^b	0,36	0,03	18,26 ^{b,c}	0,76	0,07	75,75	1,64
10	21,11 ^d	0,88	0,09	18,24 ^c	0,76	0,08	64,87	1,23
11	11,42 ^{b,c}	0,48	0,05	16,51 ^{b,c,g}	0,69	0,07	64,03	1,45
12	10,39 ^{b,c}	0,43	0,04	17,94 ^{c,g}	0,75	0,08	66,66	1,97

a,b... (coluna) – médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

(C): ponto central; L: produção de levana; PTL: produtividade de levana; YL: Rendimento de levana; E: produção de etanol; PTE: produtividade de etanol; YE: rendimento de etanol; CS: consumido do substrato; BL: biomassa livre no meio de fermentação.

Nos primeiros ciclos de fermentação, utilizando o suporte alginato observou-se os menores valores de produção, possivelmente devido a adaptação do microrganismo. Porém, a partir do 2º reciclo, observou-se resultados maiores do que os observados pelos cultivos por batelada, discutidos no item 5.3, em todos os ciclos de reutilização (8,05-12,11 g/L), demonstrando que, ao reutilizar o inóculo imobilizado, este apresentou maior estabilidade fisiológica e capacidade de produzir maior quantidade de levana (Tabela 27).

Para o suporte bucha vegetal, a máxima produção (11,02 g/L) foi observada no quarto ciclo de fermentação, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$), em relação a todos os

tempos avaliados. Verificou-se também, que a produção permaneceu estável do 7º ao 11º ciclo de fermentação sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Tabela 28 e Figura 31).

A produção de levana durante todos os ciclos de fermentação com o suporte bucha vegetal, apresentou valores entre 1,20 e 11,02 g/L com consumo do substrato de 17,24 a 83,89%. Neste caso, o maior consumo não foi acompanhado pela maior produção de levana (Tabela 28). A produtividade esteve entre 0,002 e 0,42 g/L.h e o rendimento permaneceu entre 0,05 e 0,46 g/g. Em comparação com o cultivo por batelada (item 5.3), verificou-se que houve menor produção quando utilizou-se o sistema semicontínuo, indicando que o microrganismo imobilizado neste suporte não se adaptou bem a longos períodos de fermentação.

O suporte bagaço de cana apresentou alta produção de levana durante todos os reciclos, com valor máximo (32,13 g/L) durante o quarto ciclo de reutilização. Em relação aos demais suportes de imobilização avaliados, este foi o que apresentou os maiores valores durante todos os ciclos de reutilização (6,56-32,13 g/L), com diferença estatística significativa ($p < 0,05$), exceto para o 5º, 6º e 7º ciclos (Tabela 29). Após o oitavo ciclo, a produção permaneceu praticamente constante com valores entre 15,79-12,39 g/L, sem diferença estatística significativa entre si (Tabela 29). O consumo do substrato pelo microrganismo, utilizando este suporte, foi proporcional à maior produção de levana com valores entre 78,09 a 92,64 % (Tabela 29).

A produtividade para o suporte bagaço de cana esteve entre 0,27 e 1,34 g/L.h e o rendimento de produção entre 0,023 e 0,107 g/g. Verificou-se também, que este suporte apresentou maior estabilidade e maiores valores de produção em batelada sequencial do que utilizando o sistema de cultivo por batelada discutido no item 5.3, indicando que o bagaço de cana é um suporte adequado e eficiente para utilização em sistemas de fermentação semicontínua.

Estes resultados são semelhantes aos observados por Bekers et al. (2001), os quais obtiveram produção máxima de 14,4 g/L de levana, utilizando também a bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizada em esferas de aço inoxidável.

A alta produção de levana observada, utilizando altas concentrações de sacarose é citada por diferentes autores, os quais destacam que nestas condições o microrganismo desvia sua via metabólica e após hidrolisar a sacarose em unidades de frutose e glicose, inicia a transfrutossilação de unidades de frutose em ligações β (2,6), formando a cadeia de levana (VIIKARI e GISLER, 1986; SHIH et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2007; BORSARI et al., 2006; VIGANTS et al., 2001).

Oliveira et al. (2007) obtiveram melhores resultados com produção de levana de 21,70 g/L utilizando 250 g/L de sacarose a 25°C e com 24 h de fermentação.

Tabela 28. Resultados para a produção de levana, etanol, consumo do substrato e biomassa livre produzida por *Zymomonas mobilis* CCT4494 imobilizada em **bucha vegetal** durante os ciclos de reutilização.

Ciclos (24 h)	L (g/L)	PTL (g/L.h)	YL (g/g)	E (g/L)	PTE (g/L.h)	YE (g/g)	CS (%)	BL (g/L)
1	1,67 ^{a,c,e}	0,006	0,07	24,96 ^a	1,04	0,085	83,89	0,41
2	1,08 ^a	0,004	0,05	24,26 ^a	1,01	0,087	79,62	0,31
3	2,04 ^{a,c,d,e}	0,010	0,09	17,08 ^a	0,71	0,082	59,23	1,01
4	11,02 ^f	0,042	0,46	20,03 ^a	0,83	0,076	75,30	0,39
5	2,57 ^{a,c,d,e}	0,012	0,11	21,01 ^a	0,88	0,098	61,47	0,18
6	1,25 ^{a,c}	0,006	0,05	15,96 ^a	0,67	0,081	56,35	0,21
7	3,19 ^d	0,017	0,13	2,66 ^b	0,11	0,014	54,51	0,06
8	3,11 ^d	0,013	0,13	0,27 ^b	0,01	0,001	67,95	0,02
9	3,35 ^d	0,015	0,14	0,50 ^b	0,02	0,002	64,99	0,23
10	2,64 ^{d,a,b}	0,019	0,11	0,49 ^b	0,02	0,003	40,47	0,10
11	3,04 ^{d,e}	0,012	0,13	0,34 ^b	0,01	0,001	70,92	0,10
12	1,2 ^{a,b}	0,002	0,05	0,69 ^b	0,03	0,011	17,24	0,10

a,b,... (coluna) – médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

(C): ponto central; L: produção de levana; PTL: produtividade de levana; YL: Rendimento de levana; E: produção de etanol; PTE: produtividade de etanol; YE: rendimento de etanol; CS: consumido do substrato; BL: biomassa livre no meio de fermentação.

Shih et al. (2010) obtiveram maiores resultados de levana com utilização de *Bacillus subtilis* nato imobilizados em esferas de alginato, e verificaram máxima produção no terceiro reciclo (70,6 g/L), com controle de pH inicial e suplementação do meio com nitrogênio orgânico, durante cinco ciclos de reutilização cada um com 72 h. Estes autores observaram que as esferas permaneceram estáveis durante os cinco ciclos de fermentação. Este comportamento também foi observado neste estudo, durante os 12 dias de reciclo para o suporte alginato.

É importante destacar que o sistema imobilizado para todos os suportes de fermentação, exceto quitosana, permaneceu viável até o último ciclo de fermentação, com alta produção de levana tornando-se interessante para uso em fermentações por batelada sequencial, o que acarreta inúmeros benefícios como menor custo de operação quando comparado ao sistema descontínuo.

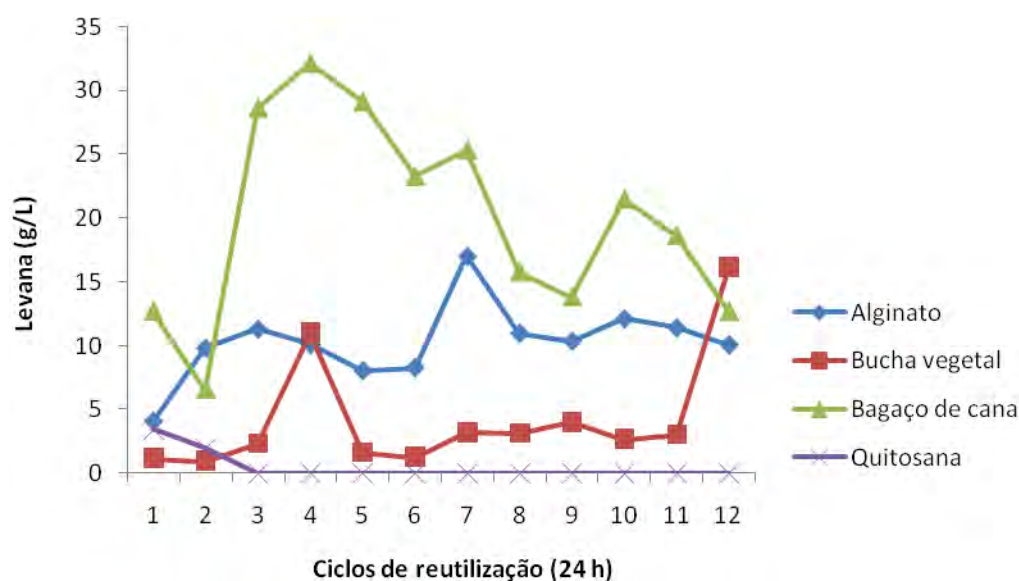
Tabela 29. Resultados para a produção de levana, etanol, consumo do substrato e biomassa livre produzida por *Zymomonas mobilis* CCT4494 imobilizada em **bagaço de cana** durante os ciclos de reutilização.

Ciclos (24 h)	L (g/L)	PTL (g/L.h)	YL (g/g)	E (g/L)	PTE (g/L.h)	YE (g/g)	CS (%)	BL (g/L)
1	12,71 ^a	0,53	0,044	24,79 ^a	1,03	0,09	82,86	1,24
2	6,57 ^{a,c}	0,27	0,023	31,74 ^a	1,32	0,11	81,14	1,53
3	31,87 ^b	1,33	0,107	29,52 ^a	1,23	0,10	84,38	1,30
4	32,13 ^b	1,34	0,099	32,64 ^a	1,36	0,10	92,64	1,45
5	29,11 ^{b,d}	1,21	0,092	36,50 ^a	1,52	0,12	90,13	1,88
6	23,27 ^{b,e}	0,97	0,076	35,67 ^a	1,49	0,12	87,08	1,86
7	25,36 ^{b,f}	1,06	0,084	26,34 ^a	1,10	0,09	86,60	2,58
8	15,79 ^{a,c,e,f}	0,66	0,058	31,32 ^a	1,30	0,11	78,09	2,51
9	11,83 ^{a,c}	0,49	0,042	37,82 ^a	1,58	0,13	81,10	2,22
10	21,47 ^{a,d,e,f}	0,89	0,075	31,12 ^a	1,30	0,11	81,42	2,18
11	14,05 ^{a,c,e}	0,59	0,051	33,04 ^a	1,38	0,12	80,68	2,39
12	12,39 ^{a,c,e}	0,52	0,042	23,51 ^a	0,98	0,08	83,82	1,43

a,b,... (coluna) – médias seguidas de mesma letra minúscula não diferiram pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

(C): ponto central; L: produção de levana; PTL: produtividade de levana; YL: Rendimento de levana; E: produção de etanol; PTE: produtividade de etanol; YE: rendimento de etanol; CS: consumido do substrato; BL: biomassa livre no meio de fermentação.

Figura 31. Produção de **levana** por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana durante os ciclos de reutilização.



5.5.4. Produção de etanol durante os ciclos de reutilização dos suportes

O suporte quitosana apresentou baixa produção de etanol durante os ciclos de reutilização, com maior produção no segundo reciclo ($p<0,05$) em relação ao primeiro, onde obteve-se apenas 0,96 g/L. Não foi possível realizar os demais ciclos de reutilização, uma vez que as esferas dissolveram-se devido ao pH do meio, conforme descrito anteriormente no item 5.5.2 (Figura 32).

Com relação ao suporte alginato, os menores valores foram obtidos no 1º e 5º reciclos (5,69 e 2,19 g/L), ambos diferentes estatisticamente ($p<0,05$). Do segundo ao oitavo ciclos, houve grandes oscilações na produção, porém, todos com diferença estatística significativa ($p<0,05$). Após o oitavo ciclo a produção permaneceu praticamente estável com valores máximos no 9º e 10º ciclos (18,26 e 18,24 g/L), sem diferença estatística significativa entre si (Tabela 27 e Figura 32).

A produtividade esteve entre 0,24 e 0,76 g/L.h, o rendimento de produção entre 0,03-0,12 g/, conforme destacado na Tabela 27. Em comparação com o cultivo por batelada, discutido no item 5.4, verificou-se os menores valores de rendimento, o que indica que este suporte não foi viável para este fim.

Para o suporte bucha vegetal, verificou-se produção de etanol do primeiro até o sexto ciclo de fermentação sem diferença estatística significativa entre em si ($p<0,05$). O valor máximo de etanol foi observado no quinto ciclo (19,11 g/L), que diferiu estatisticamente apenas do sétimo ciclo em diante. Após o sétimo ciclo, verificou-se queda na produção com valores próximos a zero, possivelmente devido à morte dos microrganismos imobilizados no suporte (Tabela 28 e Figura 32). Este comportamento pode ser devido à exposição do microrganismo a longos períodos de estresse como por exemplo, a alta temperatura e também pela alta concentrações de inibidores como o ácido acético em concentrações acima de 3 g/L (FAN et al., 2013; SLININGER et al., 2011; JIN et al., 2012).

A produtividade esteve entre 0,01e 1,04 g/L.h, rendimento de produção de 0,001 a 0,09 g/g. Tais resultados foram inferiores aos observados nos experimentos realizados por batelada, principalmente após o sexto ciclo, conforme destacado na Figura 32.

A produção de etanol utilizando o bagaço de cana permaneceu quase constante durante todos os ciclos de fermentação e não apresentaram diferença estatística significativa entre si ($p<0,05$), conforme a Tabela 29.

Os maiores valores foram observados no quinto (36,5 g/L) e sexto ciclos (35,67 g/L), de acordo com a Tabela 29 e Figura 32. A produtividade esteve entre 0,98-1,52 g/L.h, o

rendimento de produção entre 0,08-0,13 g/g. Em comparação ao cultivo por batelada, de forma similar ao observado para a produção de levana, verificou-se que o suporte bagaço de cana também apresentou alta produção durante todos os ciclos de reutilização, indicando ser promissor para utilização em sistemas de fermentação por batelada sequencial, conforme demonstrado na Tabela 29 e Figura 32.

Singh et al. (2013) utilizaram bagaço de cana como suporte de imobilização, durante 10 ciclos de reutilização e obtiveram produção de 15,4 a 15,1 g/L do primeiro ao sétimo ciclos de fermentação. Estes autores, também observaram que após o sétimo ciclo houve queda na produção, indicando que o suporte foi eficaz apenas até o sétimo reciclo. Tais resultados são inferiores aos observados nesse trabalho, utilizando o mesmo suporte de imobilização.

Em pesquisa realizada por Watanabe et al. (2012) onde a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi imobilizada em suporte misto de alginato e resina para a produção de etanol a partir de hidrolisado de palha de arroz como fonte de carbono, durante 5 ciclos de fermentação, obtiveram produção de 29,6 a 37,9 g/L do primeiro ao quinto ciclo. O suporte permaneceu viável até o último reciclo, conforme observado nesse estudo para o suporte alginato.

O valor máximo de produção de etanol obtido neste trabalho, utilizando os suportes bucha vegetal e bagaço de cana (Tabelas 28 e 29), foi maior do que o obtido por Chandel et al. (2009), que utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* V3 imobilizada em bagaço de cana (22,85 g/L); entretanto, os autores conseguiram rendimento de 0,44 g/g após oito ciclos de reutilização, o qual foi maior do que os obtidos neste estudo para o suporte alginato (Tabela 27).

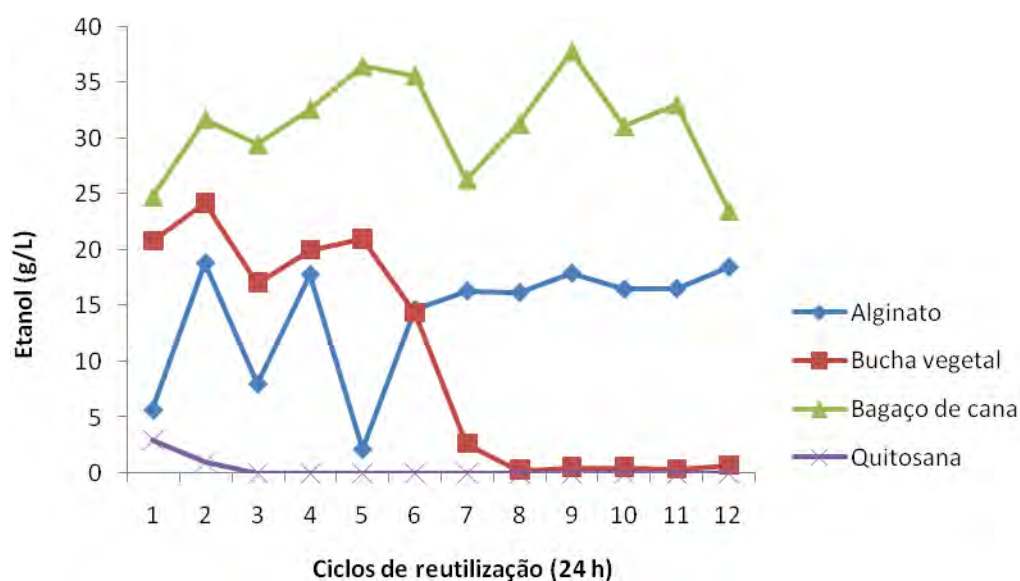
Resultados superiores aos observados nesse estudo foram obtidos por Ercan et al. (2013), os quais avaliaram a produção de etanol a partir de vagem de alfarroba, por *Saccharomyces cerevisiae* também imobilizada em alginato, durante 5 ciclos de fermentação, e obtiveram máxima produção no primeiro ciclo com 41,63 g/L e produtividade de 1,7 g/L.h. A partir do segundo ciclo, verificaram ligeira queda na produção, com valores entre 36,45-40,27 g/L.

Fan et al. (2013), utilizando *Pichia guilliermondii* para a produção de etanol a partir de sabugo de milho, obtiveram maior produção do que a obtida nesse trabalho, com valores entre 51,2 – 49,7 g/L do primeiro ao terceiro ciclo de fermentação.

Diante dos resultados apresentados, pode-se inferir que o sistema imobilizado para todos os suportes estudados, exceto para quitosana, apresentou-se viável e com produção de

etanol durante os doze ciclos de reutilização, o que os torna interessantes para uso em sistemas semicontínuos, apesar da sacarose não ser a fonte de carbono mais adequada à síntese de etanol por este microrganismo, uma vez que, ocorre a síntese de subprodutos reduzindo o rendimento de etanol.

Figura 32. Produção de **etanol** por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato, quitosana, bucha vegetal e bagaço de cana durante os ciclos de reutilização.



6. Conclusões

- No cultivo por batelada, os suportes bucha vegetal, alginato e bagaço de cana foram os melhores para a imobilização da bactéria *Zymomonas mobilis*, uma vez que estes apresentaram maior concentração e viabilidade celular quando comparados à quitosana. Para a fermentação por batelada seqüencial, o suporte que apresentou maior biomassa imobilizada foi o bagaço de cana, seguido do alginato, bucha e por último, a quitosana.
- Na fermentação por batelada, o suporte bucha vegetal apresentou os maiores valores de produção de levana, quando foi utilizada a máxima concentração de sacarose avaliada; pH inicial ajustado a 7, temperatura de 40°C, com ausência de agitação do meio de cultivo durante 16 h.
- Na fermentação por batelada seqüencial os maiores valores de levana foram observados para o suporte bagaço de cana. Este comportamento também foi observado para o consumo do substrato sacarose pelo microrganismo.
- Para a produção de etanol, nas fermentações realizadas por batelada, os maiores valores de produção foram observados utilizando os suportes bucha vegetal e bagaço de cana e na fermentação por batelada seqüencial, os maiores valores de etanol foram observados para o suporte bagaço de cana, bucha vegetal e alginato.
- O rendimento de produção de levana foi maior nos experimentos realizados por batelada seqüencial com reciclo do suporte. Porém para a produção de etanol este comportamento foi oposto, com maior rendimento nos experimentos realizados por batelada sem reciclo do suporte.
- Para a capacidade de resistir aos ciclos de reutilização do suporte, verificou-se que todos os suportes permaneceram viáveis durante os doze ciclos de fermentação realizados, exceto a quitosana.
- Entre os suportes estudados, pode-se verificar que o bagaço de cana foi o mais promissor para uso em processos fermentativos por batelada seqüencial, tanto para a produção de levana

quanto para etanol, bem como para a adesão microbiana, seguida do alginato e por último a bucha vegetal.

7. Referências bibliográficas

ALEGRE, R.M.; WENDT, R.; RIGO, M. Levan production by isolated mutants of *Zymomonas mobilis*. **Revista de Ciências exatas e naturais**. v. 7, 2005.

ALMEIDA, A.L.F.S.; CALADO, V.; BARRETO, D.W. Acetilação da Fibra de Bucha (*Luffa cylindrica*). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 15, p. 59-62, 2005.

ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of biology and technology**. v. 42, 1999.

ANI, I.; WAHIDIN, S. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**. v. 41, p.1117-1123, 2006.

ASSIS, O.B.G.; LEONI, A.M. Filmes comestíveis de quitosana. **Biotechnologia Ciência e desenvolvimento**. n. 30, 2003.

BANDARU, V.V.R.; SOMALANKA, S.R.; MENDU, D.R.; MEDICHERLA, N.R.; CHITYALA, A. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 38, p. 209-214, 2006.

BATISTA, M.A. **Estuda da imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica**. 2005. Dissertação (mestrado em Engenharia de Química) - Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia - MG.

BARROS, M.; CELLIGOI, M.A.P.C. Synthesis of sorbitol by *Zymomonas Mobilis* under high osmotic pressure. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 324-328, 2006.

BEHERA, S.; RAY, R.C.; MONHANTY, R.C. Comparative study of bioethanol production from mahula (*madhuca latifolia*) flowers by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* in calcium alginate beads. **Journal of Science Industrial Research**. v. 69, p. 472-475, 2010.

BEKERS, M.; VENTINA, E.; LAUKEVICS, J.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VIGANTS, A. Levan production by *Zymomonas mobilis* cells attached to plaited spheres. **Acta Biotechnology**. v. 17, p. 265-275, 1997.

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LINDE R. Flame burned stainless steel wire spheres as carrier of *Zymomonas mobilis* cells and extracellular levansucrase. **Acta Biotchnology**.v. 19, p. 341-348, 1999.

BEKERS, M.; VIGANTS, A.; LAUKEVICS, J.; TOMA, M.; RAPORORTS, A.; ZIKMANIS, P. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. **International Journal of Food Microbiology**. v. 55, 147-150, 2000.

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE R.; SCHERBAKA, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**. v. 36, p. 979-989, 2001.

BELAICH, J.P.; SENEZ, J.C. Influence of aeration and pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. **Journal Bacteriology**. v. 89, p. 1195-1200, 1965.

BRIVONESE, A. C.; SUTHERLAND, I. W. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 30, p. 97-101, 1989.

BORSARI, R.R.J.; CELLIOGI, M.A.P.C.; BUZATO, J.B.; SILVA, R.S.S.F. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, p. 604-609, 2006.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building**. John Wiley & Sons, Inc. 653 p. ISBN 0-471-09315-7, 1978.

BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 1201-1209, 2004.

CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E.; LIMA, R.M.O.C.; FRANÇA, F.P. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**. v. 19, p. 19-21, 1997.

CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E.; LIMA, R.M.O.C.; FRANÇA, F.P. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 27, p. 245-247, 2000.

CARVALHO, W.; SILVA, S.S.; CONVERTI, A.; VITOLO, M. Metabolic behaviour of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 79, p. 165-166, 2002.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**. v. 23, 2006.

CASSIDY, M.B.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal Industrial Microbiology**. v. 16, p. 79-101, 1996.

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

CHANDEL, A. K.; NARASU, M. L.; CHANDRASEKHAR, G.; MANIKYAM, A.; RAO, L. V. Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 2404-2410, 2009.

CIANI, M.; FERRARO, L. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. **Applied Environmental Microbiology**. v.62, p.128-132, 1996.

CHAMPGNE, C.P.; BLAHUTA, N.; GAGNON, C.A. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 68, p. 681-688, 2000.

CLEMENTI, F.; CRUDELE, M.A.; PARENTE, E.; MANCINI, M.; MORESI, M. Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 602-610, 1999.

CONAB, 2013. Companhia Nacional de desenvolvimento: Agricultura e abastecimento em boa companhia. **4º Levantamento cana-de-açúcar: Safra 2012-2013** – abril. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>.

COSTA, F.H.N.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C.; TANO, M.S. Fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose. **Semina: Ciências Exatas e Naturais**. v. 3, p. 201-207, 2001.

CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C.; QUEIROZ, D.C. Quitosana: a fibra do futuro. **PADETEC**. 1999, 124p.

CUNHA, H.C.M. **Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e do bagaço de cana pré tratado por explosão a vapor: avaliação do poder inibitório dos compostos aromáticos de baixa massa molar em processos fermentativos**. 2005. Tese (doutorado em Engenharia de Materiais) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena - Lorena - SP.

DAS, A.; PAUL, T.; JANA, A.; HALDER, S.K.; GHOSH, K.; MAITY, C.; MOHAPATRA, P.K.D.; PATI, B. R.; MONDAL, K.C. 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.

DOMINGUEZ, A.; COUTO, S.R.; SANROMÁN, A. Amelioration of ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporum* in airlift bioreactors. **Biotechnology Letters**. v.23, p. 451-455, 2001.

DOELLE, H.W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H.; DOELLE, M.B. *Zymomonas mobilis*: science and industrial application. **Critical Review Biotechnology**. v.13, p.57-98, 1993.

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

ERCAN, Y.; IRFAN, T.; MUSTAFA, K. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. **Bioresource Technology**. v. 135, p. 365-371, 2013.

ERNANDES, F.M.P.G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 2009, 145f., tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

ERNANDES, F.M.P.G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Levana Bacteriana: Aspectos Tecnológicos, Características e Produção. **Semina Ciências Agrárias**. v.26, p. 15-19, 2005.

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

ERNANDES, F.M.P.G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: Levan production optimization using submerged fermentation. **Journal of Engineering and Technology**, 2010.

FALCÃO, J.O. M.*Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos**. v. 21, p. 169-182,1983.

FAN, C.; QI, K.; XIA, X.X.; ZHONG, J.J. Efficient ethanol production from corn cob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. **Bioresource Technology**, v. 136, 309-315, 2013.

FERRARO, L.; FATICHENTI, F.; CIANI, M. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1125-1129, 2000.

GARCIA-CRUZ, C.H. **Produção de polissacarídeos bacterianos**. 1997,63 f. Dissertação (Título de Livre Docente)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

GHORBANI, F.; YOUNESI, H.; SARI, A. E.; NAJAFPOUR, G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **RenewableEnergy**. v. 36, p. 503-509, 2011.

GLICKSMAN, M. Utilization of seaweedhydrocolloidsin the foodindustry. **Hydrobiologia**, v. 151, p. 31-47, 1987.

GOMES, R.V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitina obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas e Tropicais) - Universidade Federal do Ceará.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 14, p.75-107, 1994.

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.V.; FAAIJ, A.P.C. Etanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384-410, 2005.

HAN, Y.W.; CLARKE, M. A. Production and characterization of microbial levan. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v.38, p. 393-396, 1990.

HAYASHI, T.; FURUTA, Y.; FURUKAWA, K. Respiration-deficient mutants of *Zymomonas mobilis* show improved growth and ethanol fermentation under aerobic and high temperature conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. V. 111, n. 4, p. 414-419, 2011.

HE, P.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 187, n. 1, p. 53-65, 1999.

HETTWER, U.; GROSS, M.; RUDOLPH K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal Bacteriology*. v. 177, p. 2834-2839, 1995.

HIDENO, A.; OGBONNA, J.C.; AOYAGI, H.; TANAKA, H. Acetylation of Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as Immobilization Carrier for Bioprocesses Involving Cellulase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.103, p.311-317, 2007.

IIDA T.; HITOSHI IZUMIDA, Y.A.; SAKAMOTO, M. Continuous ethanol fermentation in molasses medium using *Zymomonas mobilis* immobilized in photo-crosslinkable resin gels. *Journal of fermentation and bioengineering*. v. 75, n. 1, p. 32-35, 1993.

JAMAI, L.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; HAMDOUNI-ALAMI, O.; TAHRI-JOUTI, M. A.; MCDERMOTT, T.; ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Letters*. v. 204, p. 375-379, 2001.

JEREZ, M.C.D. **Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melão de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis***. 1993. 108 f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

JIN, M., GUNAWAN, C., UPPUGUNDLA, N., BALAN, V., DALE, B.E. A novel integrated biological process for cellulosic ethanol production featuring high ethanol productivity, enzyme recycling and yeast cells reuse. *Energy Environmental Science*. v. 5, 7168-7175, 2012.

JIN, Y.L.; SPEERS, R.A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, v. 31, p. 421-440, 1998.

JONES, C.W.; DOELLE, H.W. Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 35, p. 4-9, 1991.

KALNENIEKS, U. Physiology of *Zymomonas mobilis*: some unanswered questions. *Advanced Microbiology Physiology*. v. 51, p.73-117, 2006.

KANNAN, T.R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**. v.22, p.179-184, 1998.

KAREL, S.F.; LIBICKI, S.B.; ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, p. 1321-1354, 1985.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M. Eupergit C a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of molecular catalysis**. v.10, p.157-176, 2000.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**. v. 21, p. 337-397, 2004.

LAWFORD, H.G.; STEVNSBORG, N. Pantothenate limitation does not induce uncoupled growth of *Zymomonas* in chemostat culture. **Biotechnology Letters**. v. 8, p. 345-350, 1986.

LETTI, L.A.J.; KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L.; SOCCOL, C.R. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**. v. 44, p. 80-86, 2012.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, p.147-155, 2004.

LOOS, H.; KRÄMER, R.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: Evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. **Journal Bacteriology**. v.176, p.7688-7693, 1994.

MADI-RAVAZZI, L. **Microscopia eletrônica de varredura com ênfase à análise de amostras biológicas**. Universidade Estadual Paulista – IBILCE – Departamento de Biologia, 2009.

MAITI, B.; RATHORE A.; SRIVASTAVA, S.; SHEKHAWAT, M.; SRIVASTAVA, P. Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 90, p. 385-395, 2011.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. 1160p, 2010.

MATHEW, A.K.; CROOK, M.; CHANEY, K.; HUMPHRIES, A.C. Comparison of entrapment and biofilm mode of immobilization for bioethanol production from oilseed rape straw using *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biomass and Bioenergy**. v. 52, p. 1-7, 2013.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n.5, 831-840, 2011.

MESQUITA, A.R.C. **Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como microrganismo probiótico**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Patologia) -Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

MOHAGHEGHI, A.; RUTH, M.; SCHELL, D.J. Conditioning hemicelluloses hydrolysates for fermentation: effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. **Process Biochemistry**. v. 41, p.1806 -1811, 2006.

MONTGOMERY, D.C. In: __. **Design and analysis of experiments**. 5^a. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

MORO. M.R.; ERNANDES, F.M.; SANTOS, V.A.Q.; GARCIA-CRUZ, C.H. **Avaliação da Eficiência da Técnica para Análise de Levana Produzida por Células Imobilizadas de *Zymomonas mobilis***. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos – Caxias do Sul – RS - Sinaferm , 2011.

MURO, A.C.; RODRIGUEZ, E.; ABATE, C.M.; SIÑERIZ, F. Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. **Biotechnology Letters**. v.22, p.1639-1642, 2000.

NAGLIS, M.M.M.; ALMEIDA, J.R.M. “Aspectos do emprego de fibras naturais como reforço em compósitos: análise da morfologia da *Luffa cilíndrica*”, in: **Anais do 4ºMICROMAT**. p.575, São Carlos - SP, 1994.

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

NIKOLIC´ A.S.; MOJOVIC´ A.L.; RAKIN A.M.; PEJIN, D. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Fuel**, doi:10.1016/j.fuel.2008.12.019., 2009.

NORTON, S.; D'AMORE, T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 16, p. 365-375, 1994.

OGBONNA, J.C.; TOMYAMA, S.; TANAKA, H. Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 737-744, 1996.

OGBONNA, J.C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2000.

OLIVEIRA, M.R.; CELLIGOI, M.A.P.C.; BUZATO, J.B.B.; SILVA, R.S.S.F. Experimental Study of Sorbitol Production by *Zymomonas mobilis* in High Sucrose Concentration. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**.v. 25, p. 197-202, 2004.

OLIVEIRA, M.R. et al. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**. v. 37, p. 177-183, 2007.

PARASCANDOLA, P.; BRANDUARDI, P.; ALTERIIS, E. D. PVA-gel (Lentikats®) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 38, p. 184-189, 2006.

PARK, C.; LEE, B.; HAN, E-G.; LEE, J.; KIM, S. Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 3, p. 371-374, 2006.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology advances**. v.18, p. 303-319, 2000.

PATIL, N.K.; VEERANAGOUDA, Y.; VIJAYKUMAR, M.; NAYAK, S.; KAREGOUDAR, T. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus sp.* immobilized cells in alginate and polyurethane. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v.57, n. 2, p. 82-87, 2006.

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

PENG, C. A.; BLY, M. J. Analysis of xenobiotic bioremediation in a co-immobilized mixed culture system. **Biochemical Engineering and Biodegradation**, v. 1, n. 1, p. 63-75, 1998.

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

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

PHISALAPHONG, M.; BUDIRAHARJO, R.; BANGRAK, P.; MONGKOLKAJIT, J.;LIMTONG, S. Alginate-Loofa as Carrier Matrix for Ethanol Production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 104, p.214-217, 2007.

POÇAS, E.C.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, C.M.A.P.; NETO, D.C. Aplicação de Bucha Vegetal (*Luffa Cylindrica*) como Suporte paraProdução de Xarope de Açúcar Invertido. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 25, p. 53-58, 2004.

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

ROMANO, A. H.; CONWAY, T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. **Research Microbiology**. v. 147, p.448-455, 1996.

SABRA, W.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Bacterial Alginate - physiology, productquality and process aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56, p. 315-325,2001.

SAEED, A.; IQBAL, M. Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge: Review of Development of the Biomatrix as a Tool for Biotechnological Applications. **Biotechnology Progress**, 2013.

SANTOS, D.T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. **Journal of Food Engineering**. v. 86, p. 542-548, 2008.

SHIH, I.L.; CHEN, L.D.; WU, J.Y. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. **Carbohydrate Polymers**. v. 82, p.111-117, 2010.

SINGH, L.; SIDDIQUI, M.F.; AHMAD, A.; RAHIM, M.H.A.; SAKINAH, M.; WAHID, Z. A. Biohydrogen production from palm oil mill effluent using immobilized mixed culture. **Journal of Industrial and Engineering chemistry**.v.19, p. 659-664, 2013.

SLININGER, P.J.; THOMPSON, S.R.; WEBER, S.; LIU, Z.L.; MOON, J. Repression of xylose specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces (Pichia) stipites* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. **Biotechnology Bioengineering**. 108, p.1801-1815, 2011.

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.

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

SOUZA JUNIOR, W.C. **Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactooligosacarídeos**. 2006, 83f. dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2006.

STANISZEWSKI, M.; KUJAWSKI, W.; LEWANDOWSKA, M. Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product - Kinetic model predictions considering glucose repression. **Journal of Food Engineering**. v. 91, p. 240-249, 2009.

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

SUZZI, G.; ROMANO, P.; VANNINI, L.; TURBANTI, L.; DOMIZIO, P. Cell-recycle batch fermentation using immobilized cells of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. v. 12, p. 25-27, 1996.

SWINGS, S.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriology Review**. v. 41, p. 1-46, 1977.

TANO, M.S.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.43, p. 425-430, 2000.

TANO, M.S.; BUZATO, J.B. Influência do pH inicial do caldo de cana-de-açúcar na produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821. **Semina**. v. 23, p. 93-98, 2002.

TOMA, M.M.; KALNENIEKS, U.; BERZINS, A.; VIGANTS, A.; RIKMANIS, M.; VIESTURS, U. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**. v. 38, p. 1347- 1350, 2003.

UNREAN, P.; SRIENC, F. Continuous production of ethanol from hexoses and pentoses using immobilized mixed cultures of *Escherichia coli* strains. **Journal Biotechnology**. v.150, p. 215 -223, 2010.

VAHEED, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; GALIP, H. Evalution and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 101-111, 2011.

VIIKARI, L.;GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 240-244, 1986.

VIIKARI, L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*: critical review.**Biotechnology Letters**. v.10, p. 236-261, 1988.

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

VIGANTS, A.; HICKE, H.G.; MARX, S.P. A simple and efficient method for the purification of membrane-bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Current Microbiology**.v. 42, p. 415-418, 2001.

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

VIGNOLI, J.A.; CELLIGOI, M.A.P.C.; SILVA, R.S.F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. **Process Biochemistry**. v. 41, p.240-243, 2006.

VINHAS, G.M. **Estudo da produção e do fracionamento de levanas produzidas por *Zymomonas mobilis***. 1999. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de produtos bioativos)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

WATANABE, I.; MIYATA, N.; ANDO, A.; SHIROMA, R.; TOKUYASU, K.; NAKAMURA, T. Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Bioresource Technology**. v.123, p.695-698, 2012.

WEN-TAO, Q.; WEI-TING, Y.; YU-BING, X.; XIAOJUN, M. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate-chitosan-alginate microcapsule. **Biochemical Engineering Journal**. v. 25, p. 151-157, 2005.

YAMASHITA, Y.; KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; NAKAMURA, Y. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. **Journal of BiochemistryEngineering**, v. 42, p. 314 - 319, 2008.

YANASE, H.; IWATA, M.; NAKAHIGASHI, R.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 56, p. 1335-1337, 1992.

YOKOYA, F.; JEREZ, M.C.D. Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. v. 39, n. 1, p. 129-137, 1996.

YOSHIDA, Y.; SUZUKI, R.; YAGI, Y. Production of levan by a *Zymomonas* sp. **Journal Fermentation Bioengineering**, v.70, p.269-271, 1990.

YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. **Journal Biotechnology**. v. 129, p. 415 - 420, 2007.

YU, J.; YUE, G.; ZHONG, J.; ZHANG, X.; TAN, T. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to modified bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**. v. 35, p. 1130-1134, 2010.

Anexos

Tabela 1. Valores de absorvância de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 a 570 nm, utilizando caldo ZM após pré-fermentação a 30°C por 72 h.

Diluição	Biomassa celular seca (g/L)	Abs (570 nm)
1:7,5	0,514	0,979
1:9	0,371	0,871
1:12	0,300	0,739
1:15	0,242	0,590
1:20	0,214	0,490
1:22	0,185	0,453

Figura 1. Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 a 570 nm, utilizando caldo ZM após fermentação a 30° por 72 h.

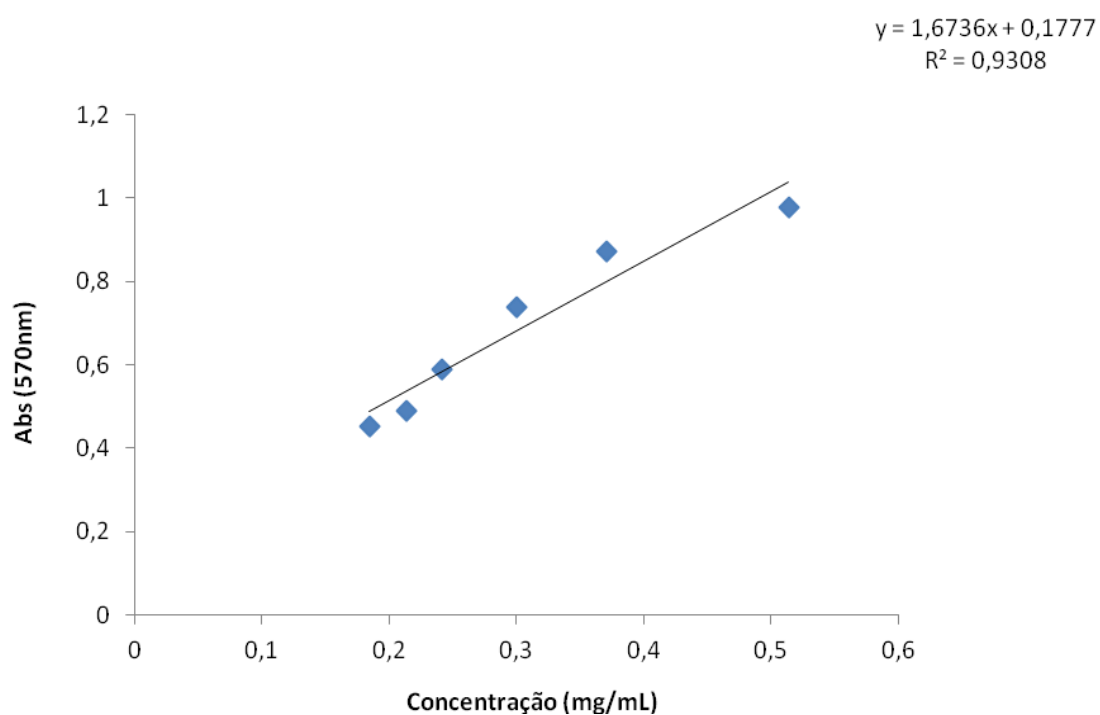


Tabela 2. Valores de absorvância a 450 nm de concentrações de etanol (g/L) .

Diluição	Concentração de etanol (g/L)	Abs (450 nm)
Branco	0	1,210
1:5	0,1478	1,198
1:2,5	0,2956	1,087
1:1,66	0,4434	0,98
1:1,25	0,5912	0,838
Sem diluição	0,739	0,749

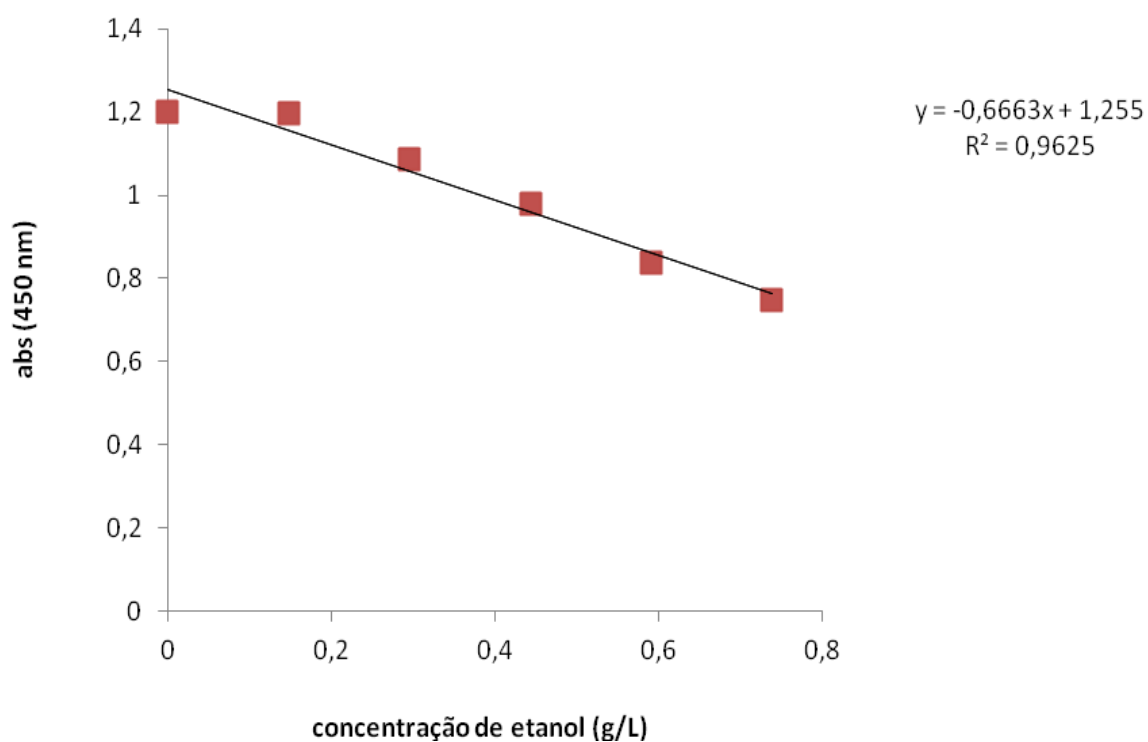
Figura 2. Curva de calibração de etanol utilizando diferentes concentrações de etanol determinadas a 450 nm.

Tabela 3. Valores de absorvância a 540 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

Concentração de glicose (g/L)	ABS (540 nm)
0,02	0,04
0,04	0,114
0,08	0,279
0,1	0,297
0,12	0,357
0,16	0,479

Figura 3. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

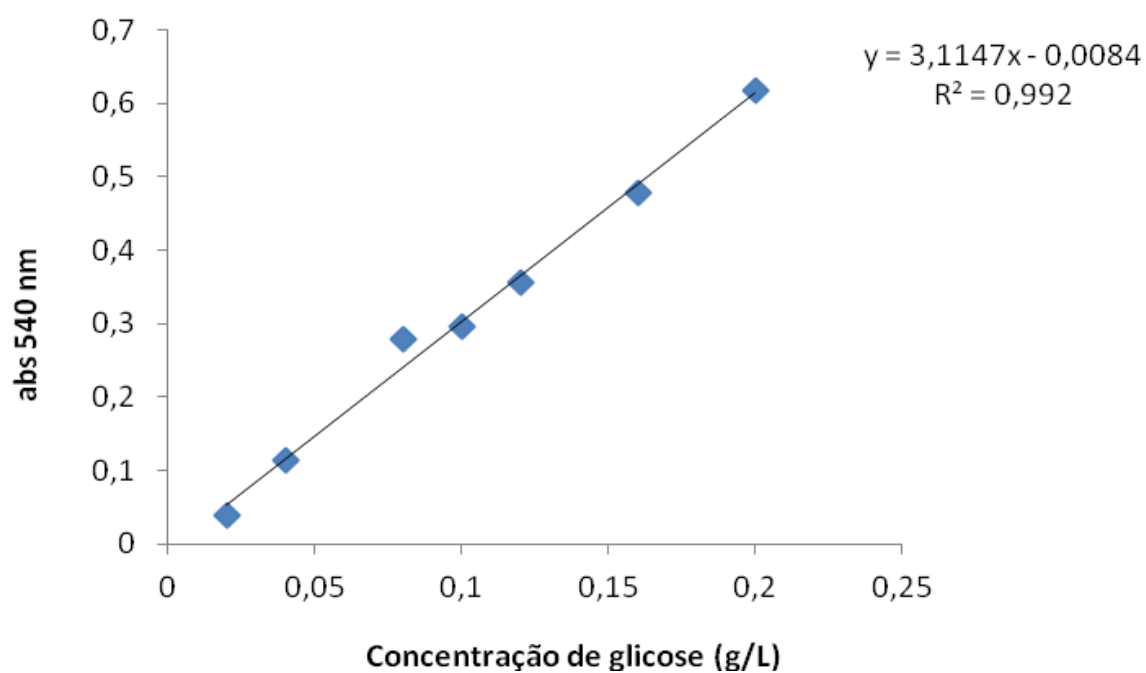


Tabela 4. Valores de absorbância a 490 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Dubois et al. (1956).

Concentração de glicose (g/L)	Abs (490 nm)
0,02	0,106
0,04	0,208
0,08	0,313
0,1	0,348
0,12	0,443
0,16	0,54

Figura 4. Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Dubois e colaboradores (1956).

