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

Natália Righetti Rocha Trinca

Conversão de glicose e xilose em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

São José do Rio Preto
2018

Natália Righetti Rocha Trinca

Conversão de glicose e xilose em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto

2018

Trinca, Natália Righetti Rocha.
Conversão de glicose e xilose em etanol por Saccharomyces cerevisiae ATCC 26602, Zymomonas mobilis CCT 4494 e Pachysolen tannophilus CCT 1891 / Natália Righetti Rocha Trinca. -- São José do Rio Preto, 2018
130 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. Etanol. 3. Glicose. 4. Fermentação. 5. Levedos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 661.722

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

Natália Righetti Rocha Trinca

Conversão de glicose e xilose em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP - São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Marcos de Lucca Júnior
IFSP - Barretos/SP

Profª Drª Vidiany Aparecida Queiroz Santos
UTFPR – Pato Branco/PR

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto/SP

Profª Drª. Marília Gonçalves Cattelan
UNESP – São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto

23 de fevereiro de 2018

“(...) O mundo precisa saber a verdade, passado não volta, futuro não temos e o hoje não acabou, por isso ame mais, abrace mais, pois não sabemos quanto tempo temos pra respirar. Fale mais, ouça mais, vale a pena lembrar que a vida é curta demais”

Música Verdades do Tempo - Thiago Brado

Dedico este trabalho às pessoas que sempre estarão ao meu lado: meus pais Simone e Fernando e minha irmã Michelle.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta conquista em minha vida, por sempre iluminar meu caminho e guiar meus passos. Obrigada por me fazer ser uma pessoa tão abençoada e cheia de luz. A fé move montanhas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Crispin que, com tanta paciência, me orientou durante todos esses anos. Obrigada por tentar me fazer acreditar que sou capaz e por enxergar coisas boas em meus trabalhos. Obrigada por todo apoio, principalmente na fase final do Doutorado. Da mesma maneira que agradeci no Mestrado, obrigada por me fazer rir mesmo quando eu queria chorar (que não foram poucas vezes).

Não existem palavras suficientes para agradecer meus pais Simone e Fernando e minha irmã Michelle por todo amor incondicional e suporte para que eu alcançasse mais esta vitória. Vocês sabem o quanto me esforcei para chegar até aqui. Só tenho a agradecer vocês por todo o apoio e carinho. Vocês são meus exemplos de vida e minha base, não sei como agradecer tudo que vocês fizeram, fazem e são para mim. Me desculpem por todos esses anos de ausência. Amo muito vocês, meus parceiros. Pai... subi mais um degrau.

Ao Diego, meu amor, meu amigo e meu companheiro, obrigada por estar ao meu lado todos esses anos. Obrigada por tornar minha vida mais leve, por me ouvir e não me deixar desistir do Doutorado, você foi peça fundamental para que eu chegasse até aqui, foi você que me aturou em todos os meus dias de estresse, tristeza e desespero.

À minha família agradeço, em especial, ao meu avô Rocha, minha avó Alice, William, Fátima (sogrinha) e Álvaro pela força e torcida. Com muito carinho agradeço aos meus anjos da guarda, avó Elza (*In memoriam*) e avô João (*In memoriam*) que sei que nunca deixarão de estarem presentes em meus pensamentos, memórias e em meu coração.

Ao Padre Sidnei que sempre torceu e orou por mim e que foi instrumento de Deus como um anjo da guarda em minha vida. Obrigada por fazer parte desta história.

Aos amigos que já tinha e aos que adquiri ao longo destes anos: Mirian (querida companheira de Doutorado, almoço e natação), Juliana Ferreira, Daiane, Aline, Amandinha, Pedro, Sidnei, Txomin e clube da "Luluzinha" (Heloisa, Letícia, Bruna e Melissa), obrigada por tornarem esta caminhada mais alegre com nossos encontros e conversas. Em especial agradeço a Talita, minha amiga querida que me ensinou que é possível formar uma família mesmo buscando o sucesso profissional, te admiro muito

como mulher, profissional e mãe. Obrigada por sempre me ouvir e me aconselhar da melhor maneira possível.

A todos os professores e funcionários do IBILCE por todo suporte e conhecimento passado. Agradeço à Tânia que, além de toda ajuda prestada, se tornou uma amiga muito querida.

Aos professores que fizeram parte das bancas de qualificação e defesa Prof. Dr. Marcos de Lucca Júnior, Profª Drª Vidiany Aparecida Queiroz Santos, Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, Profª Drª. Marília Gonçalves Cattelan e Profª Drª Fernanda Maria Pagane Guereschi Ernandes. Obrigada por todas as críticas que enriqueceram meu trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica Thaís Monteiro e Matheus Medeiros que me ajudaram nos experimentos e no meu crescimento profissional.

Aos alunos ingressantes de 2016 do curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do IBILCE, por terem sido minhas cobaias ao longo do ano de 2017 nas disciplinas de Microbiologia de Alimentos I e II, obrigada pela paciência e por me ensinarem como ser uma professora melhor a cada dia.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara pelas análises de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução.

Espero não ter me esquecido de ninguém, por isso, a todos que me ajudaram e me apoiaram direta ou indiretamente minha eterna gratidão.

RESUMO

O etanol pode ser obtido pela conversão de açúcares como a glicose e a xilose por diferentes micro-organismos. Empregar dois ou mais micro-organismos que assimilem estes açúcares e utilizar o método de imobilização celular em um determinado suporte tem se mostrado eficaz na produção de etanol comparado com a monocultura com células livres. Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi comparar a produção de etanol entre células livres e imobilizadas em casca de soja em diferentes condições da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e da levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e verificar a cofermentação destes três micro-organismos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicose e xilose como simulação da produção de etanol de segunda geração. Para isto foram realizadas fermentações com os três micro-organismos, em monocultura, em meios de cultivo contendo glicose para a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Z. mobilis* e em meios contendo xilose para a levedura *P. tannophilus* utilizando células livres e imobilizadas por ligação a superfície em casca de soja. Variou-se condições de cultivo como pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração inicial de açúcar. Todas as fermentações ocorreram em 15 horas e foram realizadas análise para verificar crescimento celular, consumo de açúcar, produção de etanol e coeficiente de rendimento. Após estes experimentos, selecionaram-se as condições que proporcionaram maior coeficiente de rendimento para cada micro-organismo e foi realizado cultivo com cada micro-organismo retirando-se alíquotas a cada hora de fermentação para verificar o melhor tempo. A partir destas informações foram realizados dois tipos de cofermentações em diferentes meios de cultivo, para os quais foram variadas as concentrações de glicose e xilose. Realizou-se o reciclo celular da monocultura e da cofermentação. Para os três micro-organismos em monocultura o maior rendimento foi obtido utilizando o método de imobilização celular. Com a levedura *S. cerevisiae* o maior rendimento foi de 0,44 $g.g^{-1}$ nas condições de 35 ºC, estático, concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$ e pH 5,5. No reciclo desta levedura obteve-se maior rendimento (0,37 $g.g^{-1}$) no ciclo 11. Utilizando a bactéria *Z. mobilis* foi alcançado um rendimento de 0,39 $g.g^{-1}$ nas condições de 30 ºC, estático, concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$ e pH 5,5. O reciclo promoveu uma aumento do rendimento para 0,49 $g.g^{-1}$ no ciclo 5. Com a levedura *P. tannophilus* o maior rendimento obtido foi de

0,44 $g.g^{-1}$ nas condições de 35 ºC, velocidade de agitação de 100 rpm, concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$ e pH 4,5. No reciclo o maior rendimento foi de 0,38 $g.g^{-1}$ no ciclo 5. Na cofermentação, o qual inoculou-se a levedura *S. cerevisiae*, seguida da bactéria *Z. mobilis* e da levedura *P. tannophilus* no meio de cultura com 40% de xilose e 60% de glicose, foi obtido o maior rendimento (0,19 $g.g^{-1}$) e no reciclo da cofermentação ocorreu um maior rendimento de 0,31 $g.g^{-1}$ no ciclo 3. A imobilização celular proporcionou um aumento do rendimento da produção de etanol para a levedura *S. cerevisiae* e para a bactéria *Z. mobilis* a partir da glicose e, esta foi necessária para obtenção de etanol com a levedura *P. tannophilus*. O reciclo da cofermentação forneceu aumento no coeficiente de rendimento no terceiro ciclo.

Palavras-chave: Imobilização celular. Casca de soja. Cofermentação. Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

Ethanol can be obtained by the conversion of sugars such as glucose and xylose by different microorganisms. Employing two or more microorganisms that assimilate these sugars and use the cellular immobilization method in a given support has been shown to be effective in the production of ethanol compared to free-cell monoculture. The objective of the present work was to compare the ethanol production between free and immobilized cells in soybean hull under different conditions of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, bacterium *Zymomonas mobilis* CCT 4494 and the yeast *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 and verify the co-fermentation of these three microorganisms in culture medium containing different concentrations of glucose and xylose as simulation of the production of second generation ethanol. Fermentations have been carried out with the three microorganisms, in monoculture, in culture media containing glucose for the yeast *S. cerevisiae* and the bacteria *Z. mobilis* and in media containing xylose for the yeast *P. tannophilus* using free cells and immobilized by surface connection in soybean hull. The experimental conditions pH, temperature, stirring speed and initial sugar concentration have been varied. All fermentations occurred in 15 hours and analyzes were performed to verify cell growth, sugar consumption, ethanol production and yield. After these experiments, the conditions that provided the highest yield for each microorganism were selected and experiments have been carried out using each microorganism, removing aliquots at each hour to verify the best time. Thus, two types of co-fermentations have been carried out in different culture media, whose concentrations of glucose and xilose have been varied. Cellular recycling of monoculture and co- fermentation has been carried out. For the three monoculture cultivation the highest yield has been obtained using the cellular immobilization method. For *S. cerevisiae*, the highest yield was 0.44 $g.g^{-1}$ under the conditions of 35 °C, static, initial sugar concentration of 60 $g.L^{-1}$ and pH 5.5. In the recycling of this yeast the higher yield (0.37 $g.g^{-1}$) has been obtained in cycle 11. Using the *Z. mobilis* a yield of 0.39 $g.g^{-1}$ has been achieved under conditions of 30 °C, static, initial sugar concentration of 90 $g.L^{-1}$ and pH 5.5. The recycle promoted an increase in yield to 0.49 $g.g^{-1}$ in cycle 5. For *P. tannophilus* the highest yield was 0.44 $g.g^{-1}$ under the conditions of 35 °C, stirring speed of 100 rpm, initial sugar concentration of 60 g L^{-1} and pH 4.5. In the recycle the highest yield was 0.38 $g.g^{-1}$ in cycle 5. In the co-fermentation, *S.*

cerevisiae has been inoculated, followed by *Z. mobilis* and *P. tannophilus* in the culture medium combining 40% of xylose and 60% of glucose, the highest yield obtained was 0.19 $g.g^{-1}$ and in the recycle of the co-fermentation the higher yield was 0.31 $g.g^{-1}$ in cycle 3. The cellular immobilization provided an increase in ethanol production yield for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* from glucose and the cellular immobilization was necessary to obtain ethanol using *P. tannophilus* from xylose. The recycling of co-fermentation provided an increase in the coefficient of yield in the third cycle.

Keywords: Cell immobilization. Soybean Hulls. Alcoholic Fermentation. Co-fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura geral do resíduo lignocelulósico..... 24

Figura 2 Estrutura da fração de lignina..... 25

Figura 3 Componentes presentes na fração de hemicelulose..... 26

Figura 4 Estrutura linear da fração de celulose..... 26

Figura 5 Via metabólica para obtenção de etanol a partir de glicose..... 29

Figura 6 Via metabólica para obtenção de etanol a partir de xilose..... 30

Figura 7 Classificação do sistema de imobilização celular..... 37

Figura 8 Classificação dos suportes para imobilização enzimática e celular.. 38

Figura 9 Fluxograma geral dos experimentos realizados para cada micro-organismo com células livres e células imobilizadas em casca de soja..... 46

Figura 10 Fluxograma da cofermentação I e da cofermentação II..... 47

Figura 11 Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 56

Figura 12 Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 57

Figura 13 Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas temperaturas e concentração inicial de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 59

Figura 14 Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 60

Figura 15 Produção de etanol com células imobilizadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*..... 63

Figura 16 Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células mobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae*..... 64

Figura 17 Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*..... 67

Figura 18 Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da bactéria *Zymomonas mobilis* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 71

Figura 19 Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 72

Figura 20 Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da bactéria *Zymomonas mobilis* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 74

Figura 21 Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pHe velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 75

Figura 22 Produção de etanol com células imobilizadas da bactéria *Zymomonas mobilis*..... 77

Figura 23 Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células mobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis*..... 78

Figura 24 Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da bactéria *Zymomonas mobilis*..... 81

Figura 25 Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura *Pachysolen tannophilus* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 86

Figura 26 Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 87

Figura 27 Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura *Pachysolen tannophilus* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 89

Figura 28 Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus* nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (A), 30 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (B), 35 ºC e 60 $g.L^{-1}$ (C) e 35 ºC e 90 $g.L^{-1}$ (D)..... 90

Figura 29 Produção de etanol com células imobilizadas da levedura *Pachysolen tannophilus*..... 92

Figura 30 Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células mobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus*. 93

Figura 31 Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da levedura *Pachysolen tannophilus*..... 96

Figura 32 Glicose residual, xilose residual e produção de etanol da cofermentação I..... 99

Figura 33 Glicose residual, xilose residual e produção de etanol da cofermentação II..... 101

Figura 34 Produção de etanol do reciclo da cofermentação..... 105

Figura 35 Glicose residual, xilose residual e produção de etanol dos ciclos separados da cofermentação..... 106

Figura 36 Desprendimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da bactéria *Zymomonas mobilis* e da levedura *Pachysolen tannophilus* em cada ciclo do reciclo da cofermentação..... 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade das frações de celulose e hemicelulose em diferentes resíduos.....	27
Tabela 2	Quantidade de glicose e xilose em diferentes resíduos lignocelulósicos.....	28
Tabela 3	Composição ($g.L^{-1}$) dos meios de cultura utilizados para armazenamento e crescimento das leveduras e da bactéria.....	42
Tabela 4	Condições de crescimento de cada micro-organismo.....	42
Tabela 5	Composição ($g.L^{-1}$) do meio semissintético utilizado para fermentação.....	43
Tabela 6	Condições de fermentação durante 15 horas utilizando diferentes parâmetros.....	45
Tabela 7	Meios de cultura utilizados nas co-fermentações com diferentes concentrações de xilose e glicose.....	48
Tabela 8	Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.....	54
Tabela 9	Coeficiente de rendimento, rendimento teórico, crescimento celular e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.....	65
Tabela 10	Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis*.....	69
Tabela 11	Coeficiente de rendimento, rendimento teórico, crescimento celular e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis*.....	79
Tabela 12	Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus*.....	83
Tabela 13	Coeficiente de rendimento, rendimento teórico, crescimento celular e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus*.....	94

Tabela 14 Coeficiente de rendimento e rendimento teórico das cofermentações I e II..... 102

Tabela 15 Crescimento celular dos micro-organismos na cofermentação I e II dos três meios de cultura..... 103

Tabela 16 Coeficiente de rendimento, rendimento teórico e produtividade dos ciclos fermentativos da cofermentação..... 107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 19
2. OBJETIVOS 21
2.1. Geral 21
2.2. Específicos 21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22
3.1. Produção de Etanol 22
3.2. Micro-organismos Produtores de Etanol 30
3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* 30
3.2.2. *Zymomonas mobilis* 32
3.2.3. *Pachysolen tannophilus* 33
3.3. Cofermentação 34
3.4. Imobilização Celular 36
4. MATERIAL E MÉTODOS 41
4.1. Micro-organismos e Meios de Cultivo 41
4.1.1. Micro-organismos 41
4.1.1.1. Meios de Armazenamento e Crescimento 42
4.2. Resistência ao Etanol 42
4.3. Fermentação 43
4.3.1. Meio de Cultura 43
4.3.2. Células Livres 43
4.3.3. Células Imobilizadas 44
4.3.4. Condições da Fermentação 44
4.3.4.1. Fermentação Com Tempo Fixo 44
4.3.4.2. Determinação do Melhor Tempo de Fermentação 47
4.3.5. Reciclo dos Micro-organismos Separados 47
4.3.6. Cofermentação 47
4.3.6.1. Reciclo Utilizando Cofermentação 48
4.4. Métodos Analíticos 48
4.4.1. Crescimento Celular 48
4.4.2. Açúcares Redutores 49

4.4.3. Análise de Glicose 49
4.4.4. Etanol 50
4.4.5. Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) 50
4.5. Cálculo Parâmetros Cinéticos 50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
5.1. *Saccharomyces cerevisiae* 52
5.1.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas 52
5.1.2. Determinação do Tempo 61
5.1.3. Reciclo 63
5.1.3.1. Fotografias Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) 66
5.2. *Zymomonas mobilis* 68
5.2.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas 68
5.2.2. Determinação do Tempo 76
5.2.3. Reciclo 77
5.2.3.1. Fotografias de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) 80
5.3. *Pachysolen tannophilus* 82
5.3.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas 82
5.3.2. Determinação do Tempo 91
5.3.3. Reciclo 92
5.3.3.1. Fotografias da Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) 94
5.4. Cofermentação 97
5.4.1. Reciclo da Cofermentação 104
6. CONCLUSÕES 109
REFERÊNCIAS 110
APÊNDICES 124

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Para a produção do etanol de segunda geração é necessário quebrar os resíduos lignocelulósicos e liberar os açúcares presentes utilizando métodos físicos, químicos ou biológicos. Esta quebra libera açúcares de cinco e seis carbonos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*, micro-organismos muito empregados e estudados para produção de etanol, não são capazes de assimilar os açúcares de cinco carbonos quando não modificadas geneticamente. Para isto, o estudo de micro-organismos que utilizem pentoses para produção de etanol é de suma importância.

A cofermentação, cocultura ou consórcio são nomes dados ao método de utilizar diferentes micro-organismos em um único cultivo. Neste processo podem-se utilizar dois ou mais micro-organismos, os quais podem ser inoculados juntos ou em sequência. Empregar a cofermentação em sequência traz as vantagens de se poder aplicar as melhores condições de temperatura, velocidade de agitação, pH, entre outras condições para cada micro-organismos. Contudo é necessário que o micro-organismo em sequência seja resistente aos produtos produzidos pelo micro-organismo anterior.

A glicose é o açúcar universal consumido por quase 100% das células vivas. A levedura *Pachysolen tannophilus* tem destaque pelo fato de ter sido a primeira levedura a ser descoberta capaz de converter xilose a etanol naturalmente. Por isso utilizar esta levedura juntamente com outros micro-organismos pode possibilitar o aumento no rendimento de etanol.

A imobilização celular é outro método que pode ser utilizado para melhorar e aumentar a produção de etanol. Este método baseia-se em reter células de micro-organismos em diferentes suportes, assim como é empregado para imobilização de enzimas. Existem diversos suportes que podem ser aplicados na imobilização celular e um desses suportes é o próprio material lignocelulósico, que se empregado como suporte, a produção de etanol de segunda geração se torna uma alternativa para reduzir a quantidade de resíduos descartados incorretamente. Pode-se utilizar vários resíduos como o bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja, casca de arroz, bucha vegetal, entre outros, desde que estes resíduos sejam porosos para reter maiores quantidades de células, já que, nestes casos, a imobilização ocorre por adsorção na superfície do suporte.

Este método além de melhorar a produção de etanol e simplificar o processo por promover fácil separação da célula com o meio reativo sem precisar, em alguns casos, de centrifugação, permite reutilizar as células imobilizadas em fermentações consecutivas, nas quais as células no suporte são recolhidas e transferidas para um novo meio de cultivo. Também conhecido como reciclo, este procedimento permite utilizar as mesmas células, o qual reduz o tempo de reativação celular e diminui a possibilidade de possíveis contaminações por micro-organismos indesejáveis e consequente redução na aplicação de antibióticos no meio de processo.

Com isto, o estudo de diferentes micro-organismos, bem como a aplicação de cofermentação e imobilização celular é necessário para melhorar a produção de etanol de segunda geração pela utilização dos diferentes tipos de açúcares e promover um maior rendimento de etanol. Portanto, este estudo teve por objetivo Comparar a produção de etanol entre células livres e imobilizadas em casca de soja em diferentes condições da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e da levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e verificar a cofermentação destes três micro-organismos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicose e xilose como simulação da produção de etanol de segunda geração.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Comparar a produção de etanol entre células livres e imobilizadas em casca de soja em diferentes condições da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e da levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e verificar a cofermentação destes três micro-organismos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicose e xilose como simulação da produção de etanol de segunda geração.

2.2. Específicos

Avaliar a produção de etanol dos micro-organismos separadamente alterando-se pH, velocidade de agitação, temperatura e concentração inicial de substrato (glicose para *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*; xilose para *P. tannophilus*) com células livres e tempo fixo.

Avaliar a produção de etanol dos micro-organismos separadamente alterando-se pH, velocidade de agitação, temperatura e concentração inicial de substrato (glicose para *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*; xilose para *P. tannophilus*) com células imobilizadas e tempo fixo.

Determinar o melhor tempo de produção de etanol para cada micro-organismo separadamente.

Estabelecer, dentro das condições estudadas, as melhores para produção de etanol empregando-se a cofermentação em diferentes proporções na mistura de glicose e xilose.

Avaliar o emprego do reciclo das células imobilizadas em casca de soja dos micro-organismos separadamente.

Avaliar o emprego do reciclo das células imobilizadas em casca de soja na cofermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção de Etanol

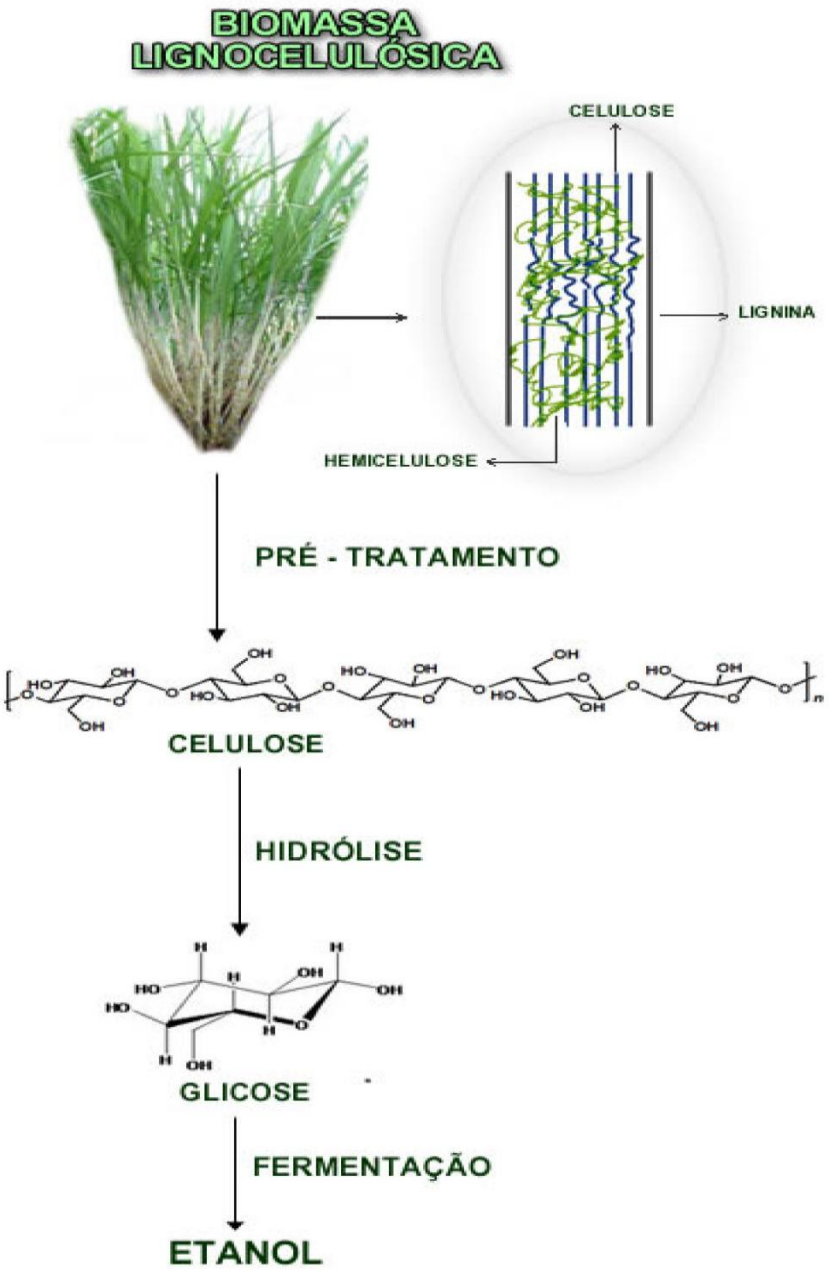
A produção de etanol no Brasil foi insignificante, até o fim da década de 70, uma vez que, era produzido apenas como insumo para indústria alimentícia e alguns setores da indústria química. Em 1975 o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), o qual impulsionou a produção de etanol no Brasil. Este Programa surgiu principalmente pelo aumento no preço do petróleo e pelos dois choques de ofertas ocorridos: adição de etanol à gasolina (1975-1979) e carros exclusivamente movidos a etanol (1979 a meados de 1980). Após 15 anos de produção estagnada devido à redução no preço do petróleo, a produção de etanol voltou a crescer por dois motivos: primeiro pela mudança na legislação norte-americana, na qual foi estabelecido que a substância adicionada à gasolina, éter metil-terbutílico (MTBE), deveria ser substituída pelo etanol, uma vez que esta causa problemas ambientais; e segundo pelo surgimento, em 2003, dos carros com motores flexíveis, chamados de "*flex*", os quais utilizam tanto gasolina quanto etanol como combustível (ROSA, GARCIA, 2009).

A produção de etanol no Brasil na safra de 2017/2018 teve uma queda de 2,6% em relação à safra de 2016/2017, com uma produção de 27,1 bilhões de litros. A região sudeste foi responsável por 57,1% da produção total, sendo que São Paulo foi o estado que obteve maior produção (46,6%) seguido por Goiás (16,7%). Apesar de a região sudeste ter sido responsável por maior parte da produção de etanol no Brasil, esta produção foi 6,2% menor que a safra anterior (2016/2017). Uma queda de 8,5% também pode ser observada na região sul. Os estados do Acre e Ceará não apresentaram produção de etanol na safra de 2017/2018. A menor produção de etanol na safra de 2017/2018 foi devida à queda de 5,2% na produção de etanol hidratado, uma vez que o consumo de gasolina nesta safra aumentou 4,3% e o consumo de etanol reduziu 10,2% (CONAB, 2017).

O etanol, quando queimado, libera quantidades similares de dióxido de carbono quando comparado aos combustíveis fósseis. Contudo, por ser de origem vegetal, este dióxido de carbono é captado por sua fonte de origem durante todo seu cultivo e retorna ao ciclo do carbono. Assim, os combustíveis renováveis não aumentam a quantidade de dióxido de carbono na atmosfera e não acarreta em danos na camada de ozônio (BONASSA et al., 2015).

Este biocombustível é considerado uma alternativa viável para substituição dos combustíveis de origem fóssil, que possuem fontes finitas, além de ser mais amigável ao meio ambiente. O etanol pode ser produzido a partir dos açúcares de reserva energética das plantas ou a partir de resíduos lignocelulósicos, chamados de etanol de primeira geração e segunda geração, respectivamente (ARIYAJAROENWONG, LAOPAIBOON; LAOPAIBOON, 2015). Entretanto, para produção do etanol de primeira geração é necessário uma área de cultivo grande, podendo competir com a plantação destinada ao consumo humano (OFORI-BOATING; LEE, 2014). Por outro lado, no etanol de segunda geração utilizam-se resíduos, sejam eles de origem agrícola, florestal ou da indústria alimentícia, os quais contêm açúcares que podem ser convertidos a etanol durante o processo fermentativo (DIAS et al., 2012). Estes resíduos são formados, principalmente, por lignina, hemicelulose e celulose ligados entre si por ligações covalentes (Figura 1).

Figura 1: Estrutura geral do resíduo lignocelulósico.

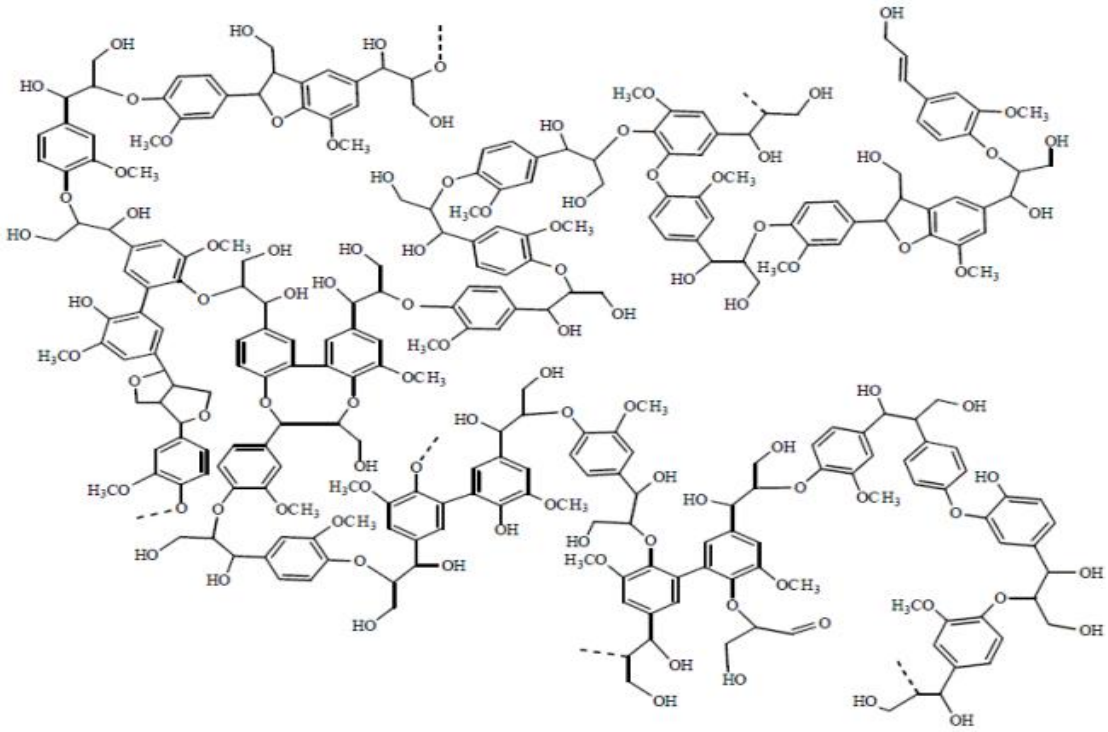


Fonte: Adaptado de Santos et al., 2012

A lignina (Figura 2) é um polímero aromático heterogênio com regiões amorfas que fornece proteção uma proteção física contra ataque de enzimas e micro-organismos para as plantas (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010). As unidades aromáticas são ligadas entre si por ligações covalentes de éter e éster de benzilo e ligações fenil-glicosídeo. Quando rompida a lignina libera compostos fenólicos, os quais podem ser tóxicos aos micro-

organismos durante processos fermentativos, sendo as bactérias as mais sensíveis a estes compostos (RABELO, 2007; ZIKELI et al., 2016).

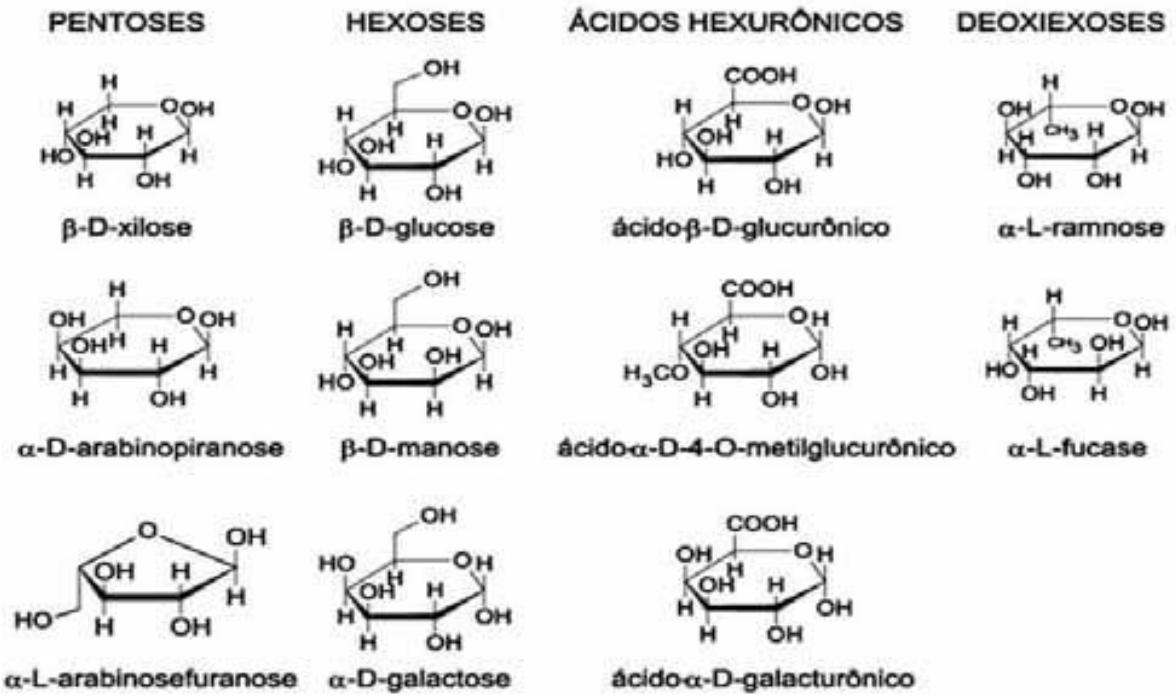
Figura 2: Estrutura da fração de lignina.



Adaptado de Souto; Calado; Pereira Junior (2015).

A hemicelulose (Figura 3), fração que liga quimicamente a celulose e a lignina, é composta, entre outras substâncias, por hexoses e pentoses. As hexoses presentes podem ser glicose, galactose e manose e as pentoses são xilose, ramnose e arabinose (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010). Esta fração é responsável por parte dos açúcares fermentescíveis liberados durante processos que rompem as ligações internas. A hemicelulose pode se classificada como um homopolímero, quando é formado apenas por um componente, como é o caso da xilana que é composta apenas por xilose, ou heteropolímero, o qual possui deferentes tipos de açúcares e outras substâncias. A variedade e quantidade destes componentes variam de acordo com o resíduo lignocelulósico (RABELO, 2007; ALBANO, 2012).

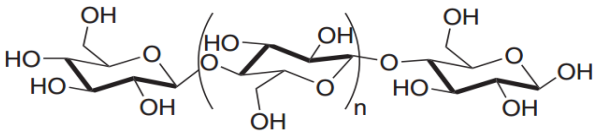
Figura 3: Componentes presentes na fração de hemicelulose.



Fonte: Albano, 2012.

A fração central da estrutura lignocelulósica é a celulose (Figura 4), um polissacarídeo composto apenas por glicose. Esta fração juntamente com a hemicelulose são as de maior interesse para a produção de etanol de segunda geração (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010). A celulose é o polímero mais abundante na Terra, seguida da lignina. Este polímero é formado por cadeias longas de glicose e paralelas formando uma estrutura cristalina, contudo há uma região amorfa que apesar de estar em menor quantidade pode dificultar o rompimento desta estrutura. Na quebra da celulose ocorre a liberação de celobiose, que é composta por duas unidades de glicose, e glicose (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009)

Figura 4: Estrutura linear da fração de celulose.



Fonte: Adaptado de Ferreira; Rocha; Silva, 2009.

A quantidade de hemicelulose e celulose pode variar de acordo com o resíduo (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010). A Tabela 1 mostra as quantidades de celulose e hemicelulose presentes em diferentes resíduos que podem ser utilizados para produção de etanol de segunda geração a partir da quebra e consequente liberação de açúcares fermentescíveis presentes nos mesmos.

Tabela 1: Quantidade das frações de celulose e hemicelulose em diferentes resíduos.

Resíduo	**Celulose (%)**	**Hemicelulose (%)**	**Referência**
Algodão	62,2	15,6	Moreira (2013)
Arundo (cana do reino)	32,3	41,5	Azevedo (2015)
Aveia Preta	34,5	26,8	Aita e Giacomini (2003)
Bagaço de Cana	42,8	25,8	Sarrouh (2009)
Bagaço de Malte	38,9	26,2	Mussatto e Roberto (2006)
Bagaço de Sorgo	36,6	28,9	Marx et al. (2014)
Casca de Arroz	30,3	31,1	Azevedo (2015)
Casca de Soja	39,7	25,5	Cassales et al. (2011)
Ervilhaca Comum	25,7	11,5	Aita e Giacomini (2003)
Farelo de Cevada	23,0	32,7	Cruz et al. (2000)
Fibra de Coco	52,8	10,6	Benini (2011)
Folhas de Milho	37,6	34,5	Cruz et al. (2000)
Lama de Papel	33,4	14,2	Yamashita et al. (2008)
Miscanthus	30,5	29,9	Jung; Kim; Chung (2015)
Nabo forrageiro	33,2	9,4	Aita e Giacomini (2003)
Palha de Arroz	43,5	22,0	Mussatto e Roberto (2002)
Palha de Milho	38,7	21,7	Chen; Zhao; Xia (2009)
Palha de Sorgo	42,0	24,5	Sathesh-Prabu, Murugesan (2011)
Palha de Trigo	37,8	28,2	Coimbra et al. (2016)
Palha de Trigo Tratada (Extrusão Alcalina)	46,9	28,7	Coimbra et al. (2016)
Pedúnculo de Banana	33,2	8,4	Vélez (2015)
Sabugo de Milho	31,7	34,7	Cruz et al. (2000)

Fonte: Autoria própria

Pela composição das frações de celulose e hemicelulose variarem de acordo com o resíduo, consequentemente a quantidade de glicose e xilose também podem variar (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010). Os açúcares glicose e xilose possuem destaque em se tratando de resíduos lignocelulósicos, uma vez que a glicose e a xilose estão presentes em maiores quantidades nestes materiais, principalmente na celulose e hemicelulose, respectivamente (FU et al., 2009). Na Tabela 2 podem-se observar as diferentes quantidades de glicose e xilose em diversos resíduos lignocelulósicos.

Tabela 2: Quantidade de glicose e xilose em diferentes resíduos lignocelulósicos.

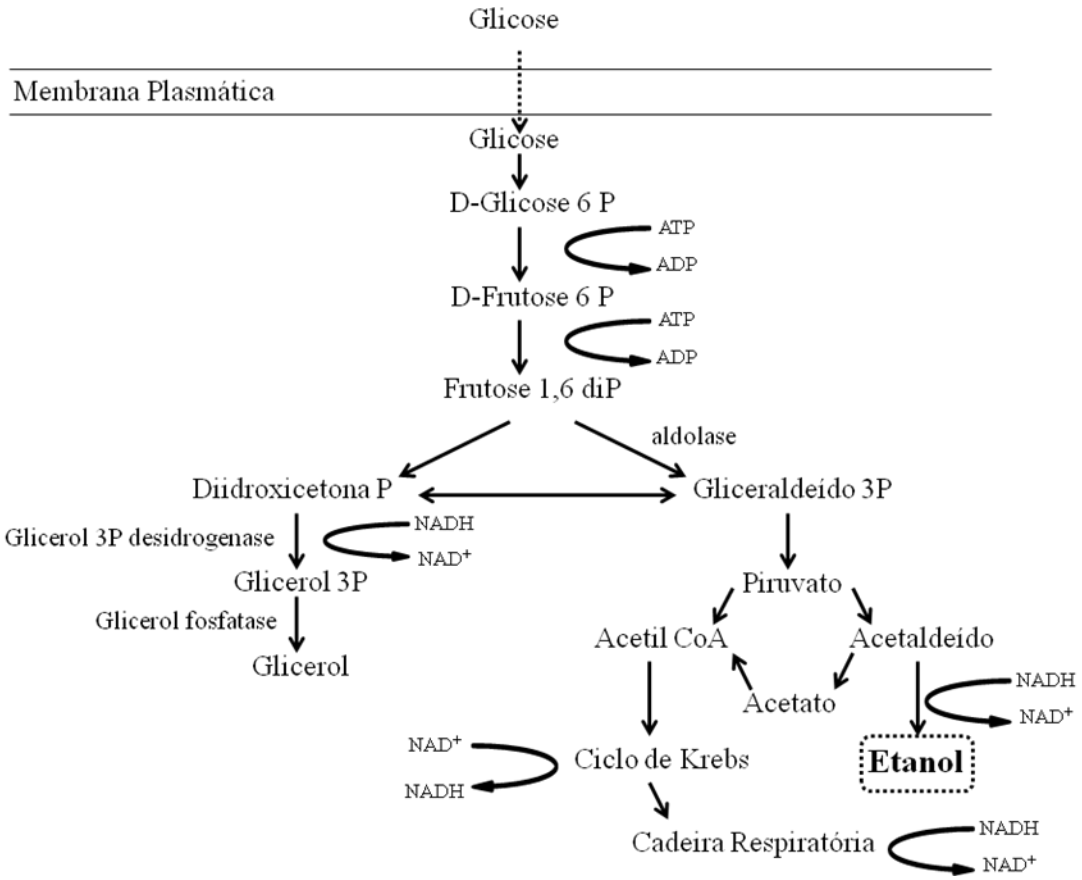
Resíduo	**Glicose (%)**	**Xilose (%)**	**Referência**
Bagaço de Cana	43,3	22,4	Girisuta et al. (2013)
Bagaço de Cana Branqueado	61,6	17,1	Benini (2011)
Bambu	44,6	14,7	Rambo (2013)
Capim	27,5	16,2	Rambo (2013)
Caroço de Açaí	8,6	3,1	Rambo (2013)
Casca de Arroz	34,1	13,1	Dagnino et al. (2013)
Casca de Soja	39,7	19,6	Cassales et al. (2011)
Cascas de Café	35,3	22,8	Rambo (2013)
Caule de Banana	36,3	5,3	Rambo (2013)
Coco	32,4	14,3	Rambo (2013)
Coco Branqueado	57,1	9,0	Benini (2011)
Engaço de Banana	28,8	6,9	Rambo (2013)
Jornal	30,4	-	Zimbardi (2014)
Miscanthus	40,3	19,4	Haverty et al. (2012)
Palha de Cana	30,1	12,7	Georges (2011)
Papelão	41,8	-	Zimbardi (2014)
Serragem	38,8	9,7	Rambo (2013)

Fonte: Autoria própria

A glicose é a fonte de carbono mais utilizada pelos micro-organismos para obtenção da energia necessária para manutenção celular e também conversão deste

carboidrato para um determinado produto (ARAÚJO et al., 1994). Na Figura 5 pode-se observar a absorção de glicose pela membrana plasmática e como ocorre a conversão de glicose a etanol. Após a glicose entrar na célula do micro-organismo passa de D-glicose 6P para D-frutose 6P com consumo de energia (ATP para ADP) e posteriormente a D-frutose 6P passa para frutose 1,6 diP. A partir disto, com a atuação da enzima aldolase, forma-se gliceraldeído 3P seguido de piruvato e acetaldeído. No acetaldeído ocorre oxidação de NAD^+ e assim a formação do etanol.

Figura 5: Via metabólica para obtenção de etanol a partir de glicose.

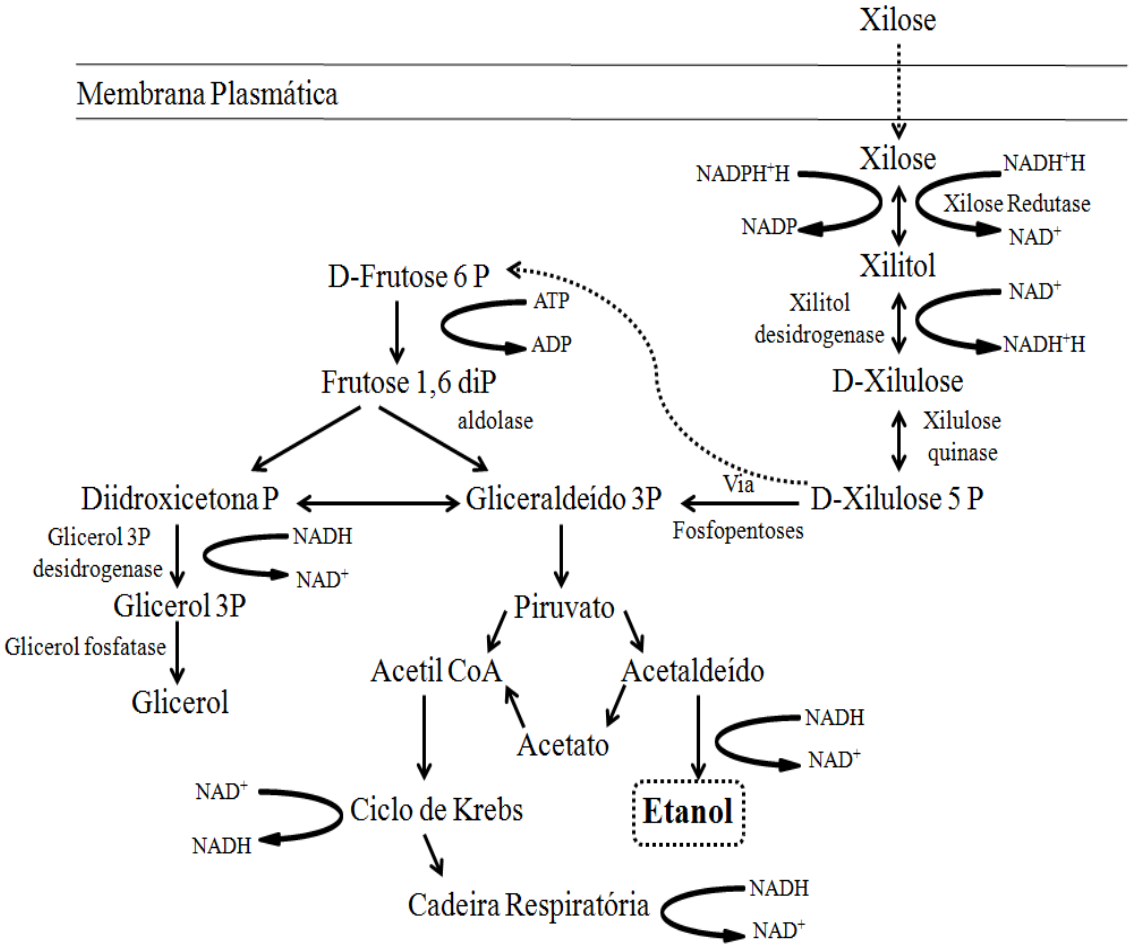


Fonte: Adaptado de Hahn-Hagerdal et al., 1994.

As leveduras tradicionalmente utilizadas na fermentação para produção de etanol geralmente não são capazes de assimilar outros açúcares como a xilose que está presente em hidrolisados lignocelulósicos. A busca por micro-organismos capazes de produzir etanol a partir de xilose vem ocorrendo durante anos (SPENCER-MARTINS, 1994). Esta conversão ocorre aerobicamente (Figura 6). Primeiramente a xilose é reduzida a xilitol e

em seguida o xilitol é convertido em xilulose. A xilulose é fosforilada e em seguida metabolizada pela via fosfopentose (SMILEY; BOLEN, 1982) formando gliceraldeído. Posteriormente, bem como na produção de etanol a partir de glicose, o gliceraldeído 3P transforma-se em piruvato e acetaldeído. No acetaldeído ocorre oxidação do NAD^+ e assim a formação do etanol.

Figura 6: Via metabólica para obtenção de etanol a partir de xilose.



Fonte: Adaptado de Hahn-Hagerdal et al., 1994.

3.2. Micro-organismos Produtores de Etanol

3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo tradicional utilizado no mundo todo para produção de etanol (BEHERA; MOHANTY; RAY, 2010). Esta levedura é utilizada nas industrias em larga escala por ter alta produção; resistência ao etanol, que

mantém baixo custo de destilação nas usinas; e consumir diferentes açúcares como a sacarose, glicose e frutose (GOMES et al., 2012, KASAVI et al., 2012). Entretanto, em sua forma natural, esta levedura é incapaz de assimilar xilose para formação de biomassa e produção de etanol, uma vez que não possui as enzimas necessárias para essa conversão. Apenas as cepas geneticamente modificadas conseguem produzir etanol a partir de xilose (ZHANG et al., 2016).

Apesar de não converter xilose a etanol, a levedura *S. cerevisiae* é considerada um micro-organismo com vantagens para produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos. Destacam-se entre essas vantagens a não exigência de oxigenação no meio e a tolerância aos compostos formados durante o processo utilizado para a liberação dos açúcares dos resíduos lignocelulósicos que podem causar inibição de alguns micro-organismos (SANTOS; GUSMÃO; GOUVEIA, 2010).

Ariyajaroenwong, Laopaiboon e Laopaiboon (2015), utilizaram talos de sorgo não descascados para imobilizar células de *S. cerevisiae* para produção de etanol. O meio de cultivo foi composto apenas por caldo de sorgo, o qual foi constituído em maior quantidade por glicose e sacarose, na concentração de 240 $g.L^{-1}$ a 30 ºC. O tempo de fermentação foi de 24 horas e neste tempo a produção de etanol foi de aproximadamente 93 $g.L^{-1}$, esta produção se repetiu nos quatro reciclos. Esta produção foi aumentada para 105 $g.L^{-1}$ quando o caldo utilizado na fermentação foi suplementado com extrato de levedura. Os autores concluíram que o suporte empregado foi utilizado com sucesso e baixo custo para produção de etanol (ARIYAJAROENWONG; LAOPAIBOON; LAOPAIBOON, 2015).

No trabalho de Bonassa et al. (2015) variaram as condições de temperatura, pH e concentração de açúcares (ºBrix) no meio fermentativo com caldo de cana-de-açúcar para maximizar a produção de etanol com células livres da levedura *S. cerevisiae*. A maior produção de etanol neste trabalho foi de 45,9 $g.L^{-1}$ em pH 5, temperatura de 32 ºC e concentração de açúcares de 16 ºBrix. Esta produção foi atingida com tempo final de 51 horas, entretanto os autores observaram que em um menor tempo de fermentação (30 horas) a produção de etanol foi de 36,2 $g.L^{-1}$, uma redução de 9,7 $g.L^{-1}$ de etanol, contudo esta redução de tempo foi aproximadamente 48%, o qual pode reduzir custos de produção (BONASSA et al. 2015).

3.2.2. *Zymomonas mobilis*

A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa e foi isolada pela primeira vez em bebidas de alguns países tropicais como África e México e como contaminante em bebidas de países europeus. Esta bactéria utiliza a via Entner-Doudoroff para degradação da glicose. No final da década de 70 o grupo Australiano P. L. Rogers reportaram a potencialidade da *Z. mobilis* para produzir etanol. Com a crise no preço do petróleo, muitos países buscaram alternativas para produzir combustível de fontes renováveis. Este mesmo grupo Australiano demonstrou as vantagens da *Z. mobilis* em comparação com as leveduras tradicionalmente utilizadas para produção de etanol, isto fez com que ocorresse uma "explosão" de pesquisas e publicações para esta bactéria no início da década de 80 (BARATTI; BU'LOCK, 1986).

Quando a única fonte de carbono é a glicose a produção de etanol por *Z. mobilis* chega ao valor teórico de produção, porém quando a única fonte de carbono disponível é a sacarose a produção diminui e chega a 70% do valor teórico devido a formação de outros produtos como a levana e o sorbitol (ZHANG et al., 2008).

A bactéria *Z. mobilis* pode crescer em anaerobiose e apresente elevada tolerância ao etanol e aos açúcares presentes no meio fermentativo. Por esta bactéria utilizar a via Entner-Doudoroff ocorre menor formação de ATP e biomassa e consequentemente maior rendimento de etanol. Esse fluxo metabólico da glicose para conversão a etanol é considerado de três a cinco vezes maior que o da *S. cerevisiae* (MA et al., 2016, MAJIDAN et al., 2018). Por ter alta capacidade de produção de etanol, esta bactéria pode ser utilizada para melhoramento genético de outros micro-organismos, fornecendo a estes os genes responsáveis pela produção de enzimas que convertem o açúcar a etanol (BALAGURUNATHAN; TAN; ZHAO, 2018).

No trabalho de Davis et al. (2006) compararam a produção de etanol pela bactéria *Z. mobilis* e a levedura *S. cerevisiae* em hidrolisado enzimático de resíduos de amido de milho nas condições de 30 ºC, pH 5 e velocidade de agitação de 200 rpm. Os autores realizaram três experimentos: no primeiro utilizaram concentração inicial de glicose de 80 $g.L^{-1}$, no segundo 100 $g.L^{-1}$ de glicose e no último experimento aplicaram o hidrolisado de resíduos de amido de milho na concentração de 98 $g.L^{-1}$ de substrato. Os autores observaram que nos três experimentos os rendimentos de produção de etanol foram semelhantes, contudo estes rendimentos foram maiores nos experimentos empregando a

bactéria *Z. mobilis*, rendimentos estes próximos ao rendimento teórico (DAVIS et al. 2006).

No estudo de Cazetta et al. (2007) aplicaram células livres da bactéria *Z. mobilis* para produção de etanol a partir do melaço de cana-de-açúcar . Os autores variaram condições de temperatura, concentração inicial de substrato, velocidade de agitação e tempo de fermentação visando a otimização na produção de etanol. A produção máxima de etanol foi de 55,8 $g.L^{-1}$ utilizando 200 $g.L^{-1}$ de concentração inicial de substrato e temperatura de 30 ºC. A velocidade de agitação aplicada não influenciou na produção de etanol. O melhor tempo para produção de etanol neste estudo foi de 48 horas de fermentação (CAZETTA et al. 2007).

3.2.3. *Pachysolen tannophilus*

As leveduras que são consideradas tradicionais na produção de etanol são dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, contudo, essas leveduras não são capazes de converter xilose a etanol (BRAVO et al., 1995). A levedura *Pachysolen tannophilus* foi a primeira levedura identificada com capacidade natural de conversão da xilose a etanol. Além da xilose, a levedura *P. tannophilus* é capaz de crescer e fermentar meios contendo outros substratos como a glicose, arabinose, manose e galactose (SLININGER; BOLEN; KURTZMAN, 1987). Esta levedura tem a vantagem de converter o substrato a etanol em condição aeróbica e é termorresistente, possibilitando trabalhar com temperaturas até 37 ºC (BRAVO et al., 1990).

Além dos açucares citados, a levedura *P. tannophilus* é naturalmente capaz de converter glicerol a etanol. No estudo de Stepanov e Efremenko (2017) imobilizaram células da levedura *P. tannophilus* em álcool polivinílico para produção de etanol a partir de glicerol bruto empregando condições aeróbicas, com agitação de 200 rpm, pH 5,6, a 28 ºC por 24 horas. A maior produção de etanol (8,3 $g.L^{-1}$) foi em concentração 25 $g.L^{-1}$ de glicerol. Os autores consideraram que o glicerol pode ser aplicado na produção de etanol, juntamente com a levedura *P. tannophilus*.

O trabalho de Kaur (1989) analisou a produção de etanol com células livres da levedura *P. tannophilus* a partir de diferentes tratamentos em palha de trigo para obtenção de açúcares. A produção de etanol foi avaliada em processo de fermentação contínuo e em batelada. Ao comparar os dois processos, o autor observou que a produção em processo

contínuo foi melhor que em fermentação em batelada com eficiência de 63,4 e 58,8%, respectivamente (KAUR 1989).

No estudo de Zhao, Zhang e Tan (2008) utilizaram glicose e xilose em meio fermentativo para observar a produção de etanol por células livres da levedura *P. tannophilus*. As concentrações de cada açúcar foi de 20 $g.L^{-1}$, a 30 ºC e agitação de 140 rpm. As fermentações tiveram duração de 60 horas e primeiramente as fermentações ocorreram com os açúcares separadamente. Para a glicose a maior produção de etanol foi de 6,9 $g.L^{-1}$ em 12 horas e para a xilose foi de 2,7 $g.L^{-1}$ em 48 horas, mostrando que na presença de glicose a levedura produziu etanol mais rapidamente e em maior concentração. Nos experimentos com a mistura de açúcares foram realizados três experimentos distintos, os quais variaram-se as concentrações de açúcares com 75 e 25%; 50 e 50%; e 25 e 75% de glicose e xilose, respectivamente. Nos três experimentos o comportamento da produção de etanol foi semelhante; foi observado que a produção de etanol teve um aumento rápido nas primeiras horas, com consumo apenas da glicose. A xilose começou a ser assimilada pela levedura após a glicose ser consumida completamente. A produção de etanol com as misturas dos açúcares foi maior quando a glicose estava presente em maior concentração. Apesar da produção lenta e menor de etanol pela levedura *P. tannophilus* na presença de xilose, a capacidade desta levedura em converter xilose a etanol é promissora para ser utilizada em fermentação com biomassa lignocelulósica hidrolisada (ZHAO; ZHANG; TAN, 2008).

3.3. Cofermentação

Os hidrolisados utilizados na produção de etanol de segunda geração são compostos por diferentes açúcares (hexoses e pentoses), portanto, para conseguir maior eficiência na produção de etanol de segunda geração é necessário empregar micro-organismos que consigam assimilar os diversos açúcares presentes. Ainda é limitada a conversão dos açúcares a etanol utilizando-se micro-organismos geneticamente modificados (KO et al., 2016). Assim, utilizar diferentes micro-organismos em conjunto que assimilam diferentes açúcares pode tornar a produção de etanol mais eficaz.

Este conjunto de micro-organismos empregados para fermentação é conhecido por cofermentação, cocultura ou consórcio de micro-organismos. Tem como principal objetivo aumentar a produção do produto desejado e diminuir a quantidade de açúcar residual ao final do processo fermentativo (CASSALES, 2010). Entretanto, a produção de etanol em

meios de cultura contendo mistura de glicose e xilose é dificultada pela necessidade de proporcionar condições para que todos os micro-organismos aplicados possam consumir os açúcares e converte-los a etanol. A conversão de glicose a etanol ocorre de forma eficaz, já a conversão da xilose é lenta e de baixa eficácia, isto pode ser devido à quantidade de oxigênio no meio ser conflitante entre os micro-organismos utilizados (FU et al., 2009). Uma solução para este tipo de fermentação é empregar um micro-organismo de cada vez, podendo assim fornecer as devidas condições para cada micro-organismo durante a fermentação, além da imobilização celular, já que a imobilização celular permite o micro-organismo de fermentar em condições não usuais.

Utilizando uma mistura de glicose e xilose para simular o hidrolisado de bagaço de cana, Fu e Peiris (2008) aplicaram cofermentação com células livres da bactéria *Z. mobilis* e a levedura *P. tannophilus* para produção de etanol. A bactéria foi inoculada primeiramente e a levedura foi inoculada posterior conversão total da glicose em etanol. Na cofermentação os autores empregaram dois tipos de aeração, os quais foram chamados de aeração e micro-aeração. A produção de etanol por cofermentação foi comparada com o etanol produzido nas mesmas condições com os micro-organismos separadamente. Para a bactéria *Z. mobilis* o rendimento de etanol foi semelhante tanto na fermentação separadamente quanto na fermentação com a levedura nas duas condições de aeração. Já para a levedura *P. tannophilus* a produção com micro-aeração foi o experimento que obteve maior rendimento de etanol. Os autores concluíram que pode-se melhorar as condições para aumentar o rendimento do etanol, contudo a aplicação da cofermentação utilizada no trabalho mostra potencial para conversão dos açúcares em etanol (FU; PEIRIS, 2008).

No estudo de Fu et al. (2009) aplicaram a bactéria *Z. mobilis* e a levedura *Pichia stipitis* em duas condições de cofermentação. O processo foi chamado de cocultura para os experimentos com os dois micro-organismos inoculados de forma simultânea e em cultura sequencial, o qual foi inoculado primeiramente células livres da bactéria *Z. mobilis* e, posterior inativação das células em autoclave, foi inoculado células livres da levedura *P. stipitis*. Os autores utilizaram hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar no meio de cultura como fonte de carbono. Na cocultura também foram realizados dois experimentos distintos, um com células livres da bactéria e da levedura e outro com células imobilizadas em alginato de cálcio da *Z. mobilis* e células livres da *P. stipitis*. Neste último experimento as células imobilizadas da bactéria foram removidas após cessar a

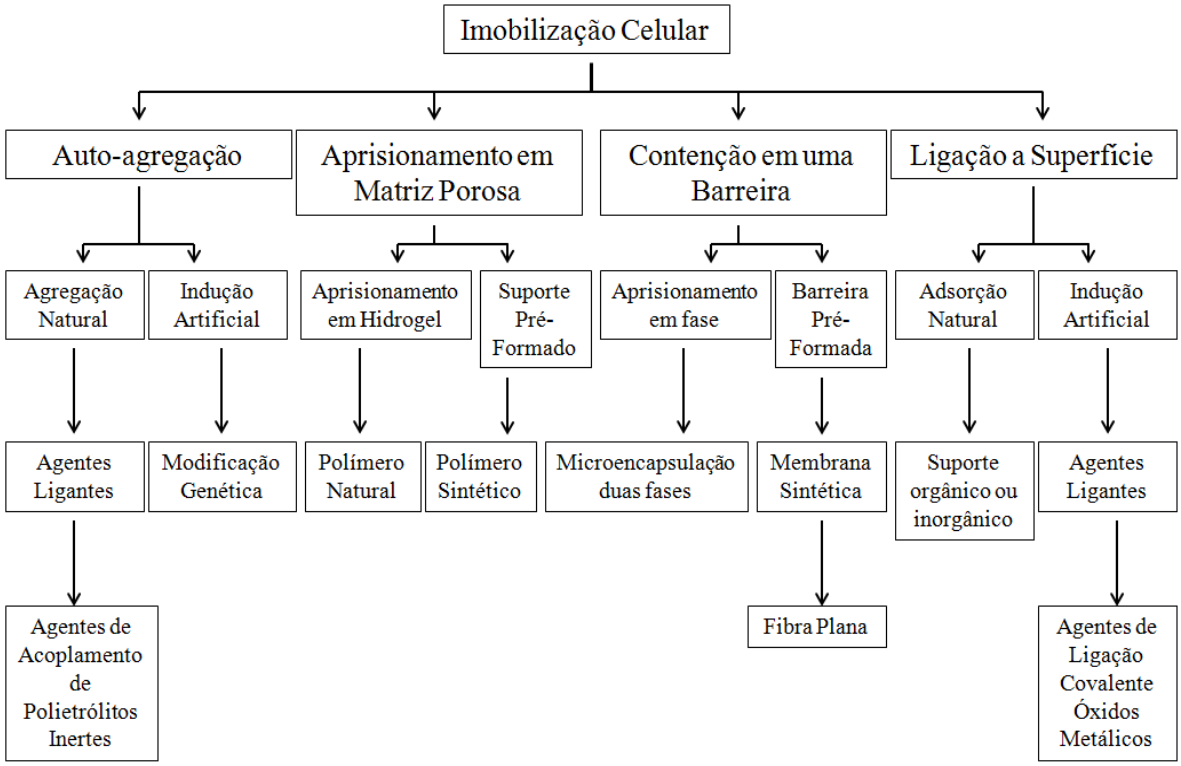
fermentação a partir da glicose. Nas fermentações, os autores aplicaram 30 ºC e agitação de 150 rpm. Dentre estas três condições citadas, a fermentação com melhor rendimento de etanol foi com células de *Z. mobilis* imobilizadas inoculada juntamente com células livres de *P. stipitis*. Neste experimento o rendimento foi de 0,50 $g.g^{-1}$, quase o valor teórico total, em 22 horas de fermentação com consumo dos açúcares em 100% (FU et al., 2009).

3.4. Imobilização Celular

A imobilização celular originou-se na década de 70, na qual se pensava que imobilizar células, assim como se imobilizavam enzimas, iria revolucionar a fermentação a nível industrial com produtividade contínua e fermentações viáveis. As primeiras aplicações de imobilização celular foi na produção de vinagre, ácidos orgânicos, aminoácidos, tratamento de águas residuais e um pouco depois na produção de cerveja em escala laboratorial e em planta piloto (NORTON, D'AMORE, 1994).

A imobilização pode ser definida como o confinamento físico de células ou enzimas em uma região definida de espaço sem que haja perdas da atividade desejada (WILLAERT, 2007). Destacam-se como vantagens da imobilização celular: facilidade na separação do produto/célula; concentração celular elevada; aumento da produtividade; reutilização das células (FREEMAN; LILLY, 1998; YU; ZHANG; TAN, 2007; TESFAW; ASSEFA, 2014). Além disso, a imobilização protege as células dos compostos tóxicos que podem estar presentes na produção de etanol de segunda geração (KIRDPONPATTARA; PHISALAPHONG, 2013). Basicamente existem quatro formas de imobilização celular, descritos na Figura 7.

Figura 7: Classificação do sistema de imobilização celular.



Fonte: Adaptado de Willaert; Banon, 1996.

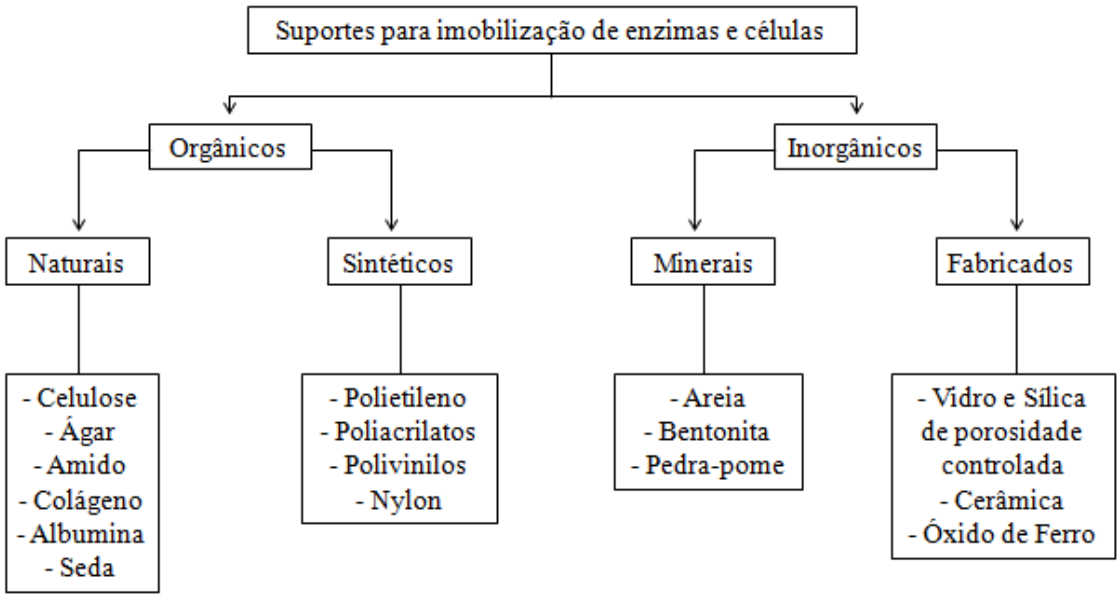
A imobilização por auto-agregação pode ser de forma natural ou com adição de algum agente químico que auxilia na ligação entre as membranas das células. Este método tem a vantagem de não precisar de suporte para imobilização, contudo a agregação é sensível à ação mecânica. No aprisionamento em matrizes o biocatalisador, seja ela uma enzima ou célula microbiana, é envolvido em uma matriz porosa, o qual pode ser empregado em condições não amenas para o micro-organismo, contudo, o pequeno volume de células disponível para imobilização é destacado como principal desvantagem do método. A imobilização por contenção por membranas é utilizada como alternativa para a imobilização por aprisionamento em matrizes, por possuir maior volume celular imobilizado. Como desvantagem cita-se a baixa transferência de massa. Neste método emprega-se membrana pré-formada ou formação *in situ* da membrana em torno da célula (CUNHA et al., 2005).

O método de imobilização por ligação a superfície ocorre por adsorção física que pode ser força eletrostática ou ligação covalente. Esta adsorção acontece entre a membrana celular do micro-organismo e o suporte utilizado. Uma das vantagens desta imobilização é

a possibilidade de utilizar resíduos celulósicos como suporte, tornando o processo com custo reduzido. É um método de fácil realização, contudo o desprendimento celular para o meio reacional é a principal desvantagem (KOURKOUTAS et al., 2004). Para reduzir esse desprendimento celular do suporte para o meio fermentativo, pode-se utilizar suportes mais porosos, para as células serem adsorvidas no interior dos poros (GROBOILLOT et al., 1994).

Os suportes que podem ser utilizados para imobilização celular ou enzimática são diversos. A Figura 8 mostra a classificação dos suportes.

Figura 8: Classificação dos suportes para imobilização enzimática e celular.



Fonte: Adaptado de Zanin; Moraes, 2004.

Para que se torne viável o processo de imobilização celular é necessário utilizar suportes de baixo custo. O emprego de resíduos celulósicos, já que possuem custo reduzido, é reutilizável e biodegradável (POÇAS et al., 2004) e, juntamente com a aplicação da técnica de imobilização por ligação a superfície, torna-se uma alternativa viável e de custo reduzido para produção de etanol.

O reciclo das células imobilizadas é um destaque dentre as vantagens do método de imobilização, principalmente quando os suportes apresentam resistência mecânica e não interagem com o processo ao qual a imobilização foi empregada (COVIZZI et al., 2007). De acordo com Yuvadetkun, Reungsang, Boonmee (2018) o reciclo pode ser aplicado para

reduzir o tempo de preparo do inóculo, com consequente melhoria da produtividade geral do etanol e sem comprometer o volume coletado.

O reciclo é a fermentação sucessiva e emprega as mesmas condições e após um determinado tempo as células imobilizadas são coletadas de forma estéril e transferidas para outro frasco ou reator com um novo meio de cultivo.

Com melaço de cana nas concentrações de açúcares de 50, 100 e 150 $g.L^{-1}$, pH 4,5 em temperatura ambiente, Ghorbani et al. (2011), imobilizaram a levedura *S. cerevisiae* em uma mistura de sódio-alginato para produção de etanol. A produção máxima de etanol foi de 19,1 $g.L^{-1}$ com 96% de consumo dos açúcares. Os autores concluíram que a imobilização celular possibilitou o aumento da produtividade e o consumo de açúcares no meio fermentativo (GHORBANI et al., 2011).

No estudo de Yamashita et al. (2008), utilizaram lamas residuais da industria de papel como fonte de carbono para produção de etanol com a bactéria *Z. mobilis*, a produção de etanol só foi possível com a imobilização celular em alginato de cálcio. Esta produção chegou a 18 $g.L^{-1}$ de etanol após 48 horas de fermentação (YAMASHITA et al. 2008).

Para reaproveitar resíduos de vinificação (semente da uva, casca da uva e caules) e sabugo de milho, Genisheva et al. (2011) aplicaram esses resíduos como suportes de imobilização da levedura *S. cerevisiae* para produção de etanol. No estudo a casca da uva e a espiga de milho mostraram-se os melhores suportes para imobilização com produção de etanol próximos a 55 $g.L^{-1}$, para ambos suportes, e alta concentração celular. Os autores destacaram que a casca de uva é de maior interesse, uma vez que possui custo reduzido e tem um grau de pureza alimentar aceitável, o qual pode ser empregado para produção de vinho (GENISHEVA et al., 2011).

No trabalho de Unrean e Srienc (2010), utilizaram quatro linhagens da bactéria *Escherichia coli* modificadas geneticamente e imobilizadas para produção de etanol. No meio empregado para fermentação havia glicose e xilose nas proporções 20 e 60 $g.L^{-1}$, respectivamente, e obtiveram 12 ciclos de fermentação. Nesses 12 ciclos os autores reportaram que não houve perda de produtividade ou rendimento do etanol e o consumo dos açúcares, bem como a produção de etanol, foram semelhantes em todos os ciclos e poderiam ser realizados mais ciclos de fermentação (UNREAN; SRIENC, 2010).

No estudo de Santos (2013) foram aplicados quatro tipos de imobilização em células da bactéria *Z. mobilis* com os suportes quitosana, alginato, bucha vegetal e bagaço

de cana. Foram realizados 12 ciclos de fermentação para cada suporte com duração de 24 horas cada ciclo. Dentre os suportes utilizados o bagaço de cana foi o de maior destaque na produção de etanol com produção máxima de 36,5 $g.L^{-1}$ no nono ciclo. Os suportes de alginato e bucha vegetal tiveram produções máximas de etanol semelhantes (18,2 e 19,1 $g.L^{-1}$, respectivamente) e o suporte de quitosana teve produção de etanol menor que 1 $g.L^{-1}$ e após o segundo ciclo as esferas de quitosana dissolveram-se no meio de cultivo (SANTOS, 2013).

Utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* geneticamente modificada e imobilizada em alginato, Zhao e Xia (2010) produziram etanol a partir de hidrolisado ácido de palha de milho. A maior produção de etanol foi 31,1 $g.L^{-1}$ com rendimento em relação aos açúcares de 0,4 $g.g^{-1}$. Neste estudo foram realizados cinco ciclos de fermentação e em todos os ciclos a produção de etanol e o rendimento se mantiveram praticamente constantes. A produção de etanol no reciclo foi semelhante a produção sem reciclo (ZHAO; XIA, 2010).

No trabalho de Mishra et al. (2016), realizaram fermentação em meio de cultivo contendo glicose para produção de etanol com *S. cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio. Os autores realizaram um experimento com dois tipos de esferas para imobilização que foram chamadas de “esferas normais” e “esferas extra endurecidas” de acordo com o tempo de residência em solução de cloreto de cálcio por 16 e 120 horas, respectivamente. Obtiveram produções de etanol semelhante para os dois tipos de esfera, contudo com a “esfera normal” foi possível realizar 24 reciclos, já para a “esfera extra endurecida” o reciclo chegou a 40 ciclos. Para as esferas extra endurecidas, a produção se manteve praticamente constante até o 34º ciclo, após este ciclo a produção reduziu. Quando os autores utilizaram hidrolisado enzimático de palha de arroz sem desintoxicação, a produção de etanol foi semelhante a apresentada em meio de cultivo contendo glicose (MISHRA et al., 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), na Universidade Estadual de "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP da cidade de São José do Rio Preto/SP.

A casca de soja foi fornecida pelo Planeta Soja da Universidade de Marília (UNIMAR) da cidade de Marília/SP.

Foram realizados experimentos com os micro-organismos separadamente e posterior foram realizados experimentos com cofermentação.

Em monocultura realizou-se primeiramente o cultivos com cada micro-organismo com células livres e com células imobilizadas e foram variadas condições de pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração inicial de açúcar. Todos estes experimentos ocorreram em um tempo fixo de 15 horas. Foram selecionadas e fixadas as condições do experimento que forneceu maior valor de coeficiente de rendimento e após foi realizado um cultivo para cada micro-organismo para determinação do tempo de fermentação. As condições de tempo, temperatura, velocidade de agitação, pH, concentração inicial de açúcar e célula livre ou imobilizada, foram fixadas para cada micro-organismo e para realização do reciclo celular em monocultura e para as cofermentações.

4.1. Micro-organismos e Meios de Cultivo

4.1.1. Micro-organismos

Neste estudo foram utilizadas duas leveduras e uma bactéria. A levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 foi fornecida pelo Prof. Dr. Jorge Rocha do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, Portugal e a levedura *P. tannophilus* CCT 1891 e a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas/SP.

4.1.1.1. Meios de Armazenamento e Crescimento

Os meios utilizados para armazenamento e crescimento dos micro-organismos estão descritos na Tabela 3. As células foram armazenadas à temperatura de refrigeração (4 a 8 ºC) e repicadas quando necessário. Como açúcar, foi utilizada a glicose para a levedura *S. cerevisiae* e para a bactéria *Z. mobilis* e xilose para a levedura *P. tannophilus*. Os meios de cultura foram formados de acordo com as instruções fornecidas pelo Centro de Culturas Tropical e pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra.

Tabela 3: Composição ($g.L^{-1}$) dos meios de cultura utilizados para armazenamento e crescimento das leveduras e da bactéria.

	Leveduras		**Bactéria**
	Armazenamento	**Crescimento**	**Armazenamento/Crescimento**
Extrato de Levedura	3	3	10
Extrato de Malte	3	3	-
Peptona	5	5	10
Açúcar	10	10	20
Ágar	15	-	-

As condições para crescimento de cada micro-organismo estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Condições de crescimento de cada micro-organismo.

Condições	***S. cerevisiae***	***Z. mobilis***	***P. tannophilus***
Temperatura (ºC)	30	30	28
Velocidade de agitação (rpm)	100	Estático	100
Tempo (horas)	24	24	24

4.2. Resistência ao Etanol

Foi avaliada a resistência ao etanol utilizando diferentes concentrações que variaram entre 1 e 10% (v/v) com intervalo de 1% para verificar se os micro-organismos seriam inibidos ou não pelo etanol. Para isto utilizou-se o método de disco difusão proposto por Bauer et al. (1966). O inoculo utilizado foi padronizado com a escala 0,5 de

Mc Farland para garantir um inóculo de 10^8 UFC.mL^{-1} e semeado em placas de Petri nos mesmos meios de cultura para armazenamento (Tabelas 3 e 4). Os discos de papel filtro com 0,5 cm de diâmetro foram embebidos com as diferentes soluções alcoólicas e foram alocadas na placa posterior semeadura em superfície. As placas foram incubadas a 30 ºC durante 24 horas para a levedura *S. cerevisiae*, 28 ºC por 24 horas para a levedura *P. tannophilus*, e 30 ºC por 48 horas para a bactéria *Z. mobilis*. Após, foi determinado o tamanho do halo de inibição, quando presente, com auxílio de um paquímetro.

4.3. Fermentação

4.3.1. Meio de Cultura

Para a fermentação utilizou-se meio de cultura proposto por Rodriguez e Callieri (1986), com modificações, o qual continha sais e açúcares como descrito na Tabela 5. Este meio de cultura foi empregado para os três micro-organismos, diferindo a fonte de carbono, sendo glicose para a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Z. mobilis*; e xilose para a levedura *P. tannophilus*.

Tabela 5: Composição (g.L^{-1}) do meio semissintético utilizado para fermentação.

	S. cerevisiae	***Z. mobilis***	***P. tannophilus***
$MgSO_4$	1	1	1
$(NH_4)_2SO_4$	1	1	1
KH_2PO_4	1	1	1
Extrato de levedura	5	5	5
Glicose	60 e 90	60 e 90	-
Xilose	-	-	60 e 90

-: sem adição.

4.3.2. Células Livres

Para a fermentação com células livres, após o crescimento de cada micro-organismo nos meios de cultura citados nas Tabelas 3 e 4, o caldo foi centrifugado em tubos estéreis a 6000 rpm, 4 ºC e 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em água destilada esterilizada. O inoculo foi padronizado gotejando-se a ressuspensão em 3 mL de água destilada contida em cubeta de espectrofotômetro até

obtenção de 0,600 da absorbância determinada a 600 nm. Ao atingir a absorbância desejada, utilizou-se a regra de três, descrita a seguir, para semear de acordo com a quantidade de meio de cultivo (Tabela 5) empregado na fermentação.

3 mL ------ x v ------ z

Onde:

x = volume gotejado da suspensão celular na cubeta (0,600 de absorbância);

y = volume do meio da fermentação a ser utilizado;

z = volume de suspensão contendo o micro-organismo utilizada para fermentação.

4.3.3. Células Imobilizadas

Os micro-organismos foram imobilizados em casca de soja pelo método de imobilização por ligação a superfície e de acordo com o proposto por Santos (2013). A casca de soja foi lavada e esterilizada. Para imobilização das células primeiramente foi realizado o crescimento celular e a padronização do inoculo da forma descrita no item 4.3.2. Os micro-organismos foram inoculados em meio de cultura para crescimento contendo casca de soja na proporção de 6 gramas de casca de soja para 100 mL de meio de cultura e foram incubados a 30 ºC e 150 rpm por 24 horas. Posterior este tempo, com o auxílio de uma peneira metálica descartou-se o meio de cultura e as células imobilizadas foram transferidas de forma estéril para o meio de cultura da fermentação (Tabela 5).

4.3.4. Condições da Fermentação

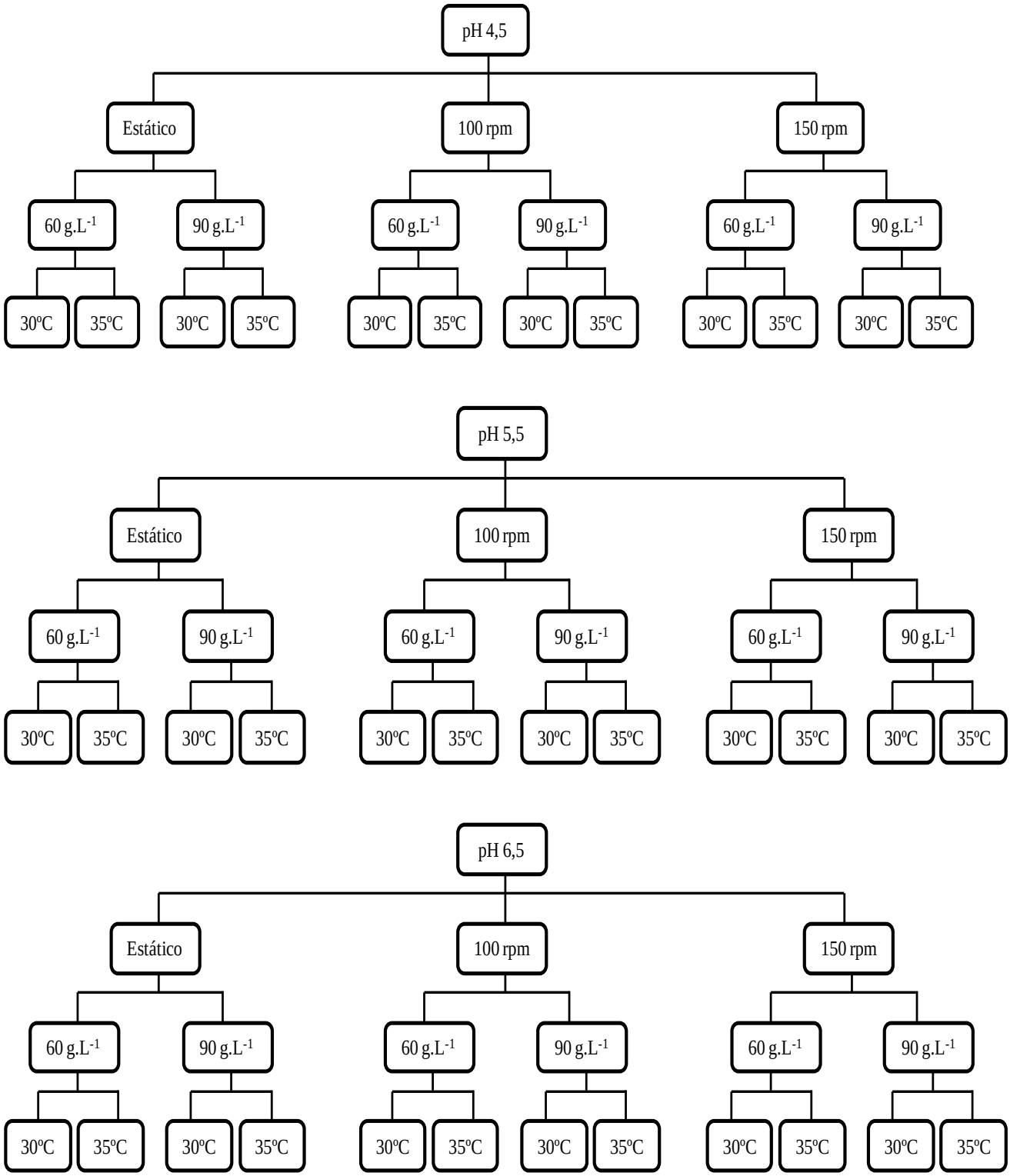
4.3.4.1. Fermentação Com Tempo Fixo

Primeiramente foram realizadas fermentações com tempo fixo de 15 horas, para estabelecer as melhores condições. As alíquotas coletadas neste período foram armazenadas a temperatura de congelamento (-18 ºC). Para todos os micro-organismos foram utilizadas as mesmas condições de pH, temperatura, concentração inicial de açúcar e velocidade de agitação conforme descrito na Tabela 6 e demonstrado na Figura 9 e foi determinado o pH final, crescimento celular, consumo de açúcar e produção de etanol. Ajustou-se os valores de pH dos meios de fermentação utilizando ácido clorídrico 2 $mol.L^{-1}$ e/ou hidróxido de sódio 2 $mol.L^{-1}$.

Tabela 6: Condições de fermentação durante 15 horas utilizando diferentes parâmetros.

Fator	**Condições**		
pH	4,5	5,5	6,5
Velocidade de agitação	Estático	100 rpm	150 rpm
Concentração inicial de açúcar	60 $g.L^{-1}$		90 $g.L^{-1}$
Temperatura	30 ºC		35 ºC

Figura 9: Fluxograma geral dos experimentos realizados para cada micro-organismo com células livres e células imobilizadas em casca de soja.



Fonte: Autoria própria.

4.3.4.2. Determinação do Melhor Tempo de Fermentação

Para cada micro-organismo foi determinado o tempo com maior produção de etanol. Para isto foram utilizadas as melhores condições de pH, velocidade de agitação, temperatura e concentração inicial de açúcar e foram realizados alíquotas a cada hora de fermentação até oito horas para a levedura *S. cerevisiae* e para a bactéria *Z. mobilis* e 20 horas para a levedura *P. tannophilus*.

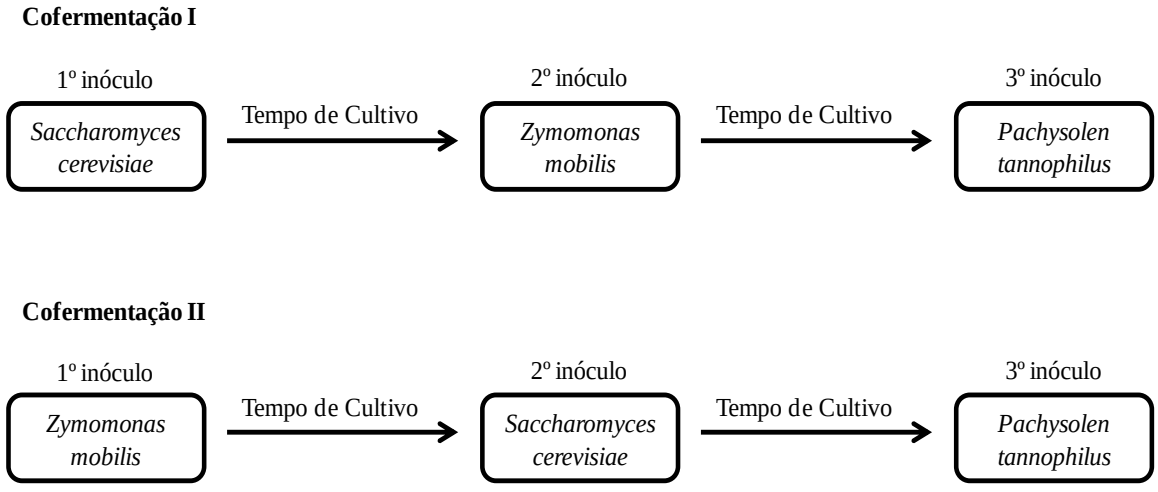
4.3.5. Reciclo dos Micro-organismos Separados

Com as condições de tempo, temperatura, pH, velocidade de agitação e concentração inicial de substrato definidos, foram realizados ciclos fermentativos reutilizando as mesmas cascas de soja com o micro-organismo imobilizado de acordo com o proposto por Santos (2013) com modificações. A cada tempo de fermentação as cascas com o micro-organismo eram coletadas com o auxílio de uma peneira metálica esterilizada e inoculadas em um meio fermentativo novo, até completar o ciclo fermentativo. Para cada micro-organismo foram realizados 12 ciclos e foram observadas a produção de etanol, rendimento e produtividade.

4.3.6. Cofermentação

Foram utilizadas as mesmas condições determinadas e empregadas no reciclo (4.3.5.) de cada micro-organismo para a cofermentação. Foram realizados dois tipos de cofermentação como demonstrado no fluxograma da Figura 10.

Figura 10: Fluxograma da cofermentação I e da cofermentação II.



Após decorrer o tempo de cultivo de cada micro-organismo, estes foram retirados do meio fermentativo com o auxílio de uma peneira metálica esterilizada e o meio foi centrifugado a 7000 rpm por 15 minutos para retirar as células que se desprenderam da casca de soja. Posterior centrifugação o micro-organismo da sequência foi inoculado. Foram empregados três meios de fermentação, para cada cofermentação, com diferentes concentrações de glicose e xilose conforme descrito na Tabela 7. Essas concentrações foram calculadas para uma quantidade de açúcares final de 60 $g.L^{-1}$. Para as cofermentações foi empregado o mesmo meio fermentativo descrito na Tabela 5.

Tabela 7: Meios de cultura utilizados nas cofermentações com diferentes concentrações de xilose e glicose.

Meio	Xilose (%)	Glicose (%)
A	20	80
B	30	70
C	40	60

4.3.6.1. Reciclo Utilizando Cofermentação

Foi escolhida a melhor cofermentação e o meio de fermentação para realização do reciclo com a cofermentação. Para isto o primeiro micro-organismo foi inoculado nas melhores condições de tempo, temperatura, pH, velocidade de agitação e concentração inicial de açúcar. Decorrido o tempo, o primeiro micro-organismo imobilizado foi retirado do meio de fermentação com auxílio de uma peneira metalizada esterilizada e foi inoculada em um novo meio de fermentação. O primeiro meio fermentativo foi centrifugado a 7000 rpm por 15 minutos a fim de retirar as células que se desprenderam da casca de soja e assim o segundo micro-organismo foi inoculado. Este processo foi repetido até completar 5 reciclos.

4.4. Métodos Analíticos

4.4.1. Crescimento Celular

O crescimento celular de cada micro-organismo foi realizado por espectrofotometria a 600nm. Para o branco utilizou-se o mesmo meio de cultura empregado na fermentação ou água destilada quando foi necessário diluição. Nos experimentos com células livres foi considerado o crescimento celular no meio de cultura e

para os experimentos com células imobilizadas foi considerado como crescimento celular a soma do desprendimento da célula do suporte, obtido no meio de cultura, mais o crescimento no suporte casca de soja, sendo assim um cultivo misto. Para quantificar o crescimento celular na casca de soja, estas foram recolhidas com auxílio de uma peneira e foi adicionada água destilada no mesmo volume do meio fermentativo. Os frascos Erlenmeyers foram incubados a 30 ºC, 200 rpm por 2 horas e após realizou-se a leitura em espectrofotômetro. Para cada micro-organismo foi construída uma curva de calibração para o crescimento celular, que podem ser observadas nos apêndices B, C e D para a *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *P. tannophilus*, respectivamente.

4.4.2. Açúcares Redutores

A análise de açúcares redutores foi realizada pelo método proposto por Nelson (1944) e Somogyi (1952). Para isto, em um tubo de ensaio colocou-se 0,5 mL da amostra e 0,5 mL do Reativo Somogyi. O tubo permaneceu em água fervente por 10 minutos e posterior este tempo o tubo foi resfriado até temperatura ambiente. Adicionou-se 0,5 mL do Reativo Nelson e agitou-se vigorosamente. Foram adicionados 3,5 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Duas curvas de calibração foram construídas para quantificação de glicose e xilose, que podem ser observadas nos apêndices E e F, respectivamente.

4.4.3. Análise de Glicose

Para determinar a quantidade de xilose consumida durante os experimentos com mistura de glicose e xilose, foi realizada análise enzimática de glicose e de açúcares redutores (item 4.4.2.). A diferença entre açúcares redutores e glicose foi considerada como xilose.

Foi utilizado o *kit* de teste enzimático colorimétrico para determinação de glicose da marca *Bioliquid* e foram seguidas as instruções recomendadas pelo fabricante. Para isto foi coletado 0,01 mL da amostra e adicionou-se 1 mL do reagente do kit. O branco para a leitura no espectrofotômetro foi realizado com 1 mL do reagente do kit e realizou-se a leitura com 0,01 mL do padrão do kit adicionado de 1 mL do reagente, sendo que este padrão foi utilizado para o cálculo. Os tubos de ensaio foram agitados em vórtex e permaneceram a 37 ºC por 10 minutos. Em seguida fez-se a leitura no espectrofotômetro a 505 nm e foi utilizado cubeta própria para análise de glicose.

Para quantificar a glicose foi utilizado a equação 1 a seguir:

$$\text{Glicose} = \frac{At}{Ap} \quad (g.L^{-1}) \qquad \textit{(Equação 1)}$$

Onde:

At = absorbância da amostra

Ap = absorbância do padrão.

4.4.4. Etanol

O Etanol foi quantificado por Cromatografia Gasosa utilizando um Cromatógrafo Thermo Scientific modelo GC Focus Series, coluna TR-WAX e detector de ionização de chamas (FID). A temperatura do injetor foi mantida a 230 ºC, o detector a 270 ºC e o forno a 100 ºC. As amostras foram armazenadas em frasco de vidro tipo de penicilina e para a análise deixou-se os frascos em banho-maria a 40 ºC por 5 minutos para formação do *headspace*. Foi coletado 200 µL do gás, com auxílio de seringa própria para cromatografia gasosa, e injetado no cromatógrafo. A corrida foi de 5 minutos com tempo de retenção de 3,3 minutos para etanol (COIMBRA, 2015). Foi construída uma curva de calibração para quantificação de etanol que pode ser observada no apêndice G.

4.4.5. Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG)

As cascas de soja juntamente com o micro-organismo foram observadas em microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG) antes e após os 12 reciclos de cada micro-organismo. Esta análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) dentro do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara/SP. Posterior retirada da água presente nas amostras, estas foram metalizadas com ouro por 25 segundo e encaminhadas para análise no MEV-FEG.

4.5. Cálculo Parâmetros Cinéticos

O cálculo do coeficiente de rendimento (Yp/s) foi determinado de acordo com proposto por Hickert et al., (2013) na equação 2.

$$Yp/s = \frac{(P_f - P_0)}{(S_f - S_0)} \quad (g.g^{-1})$$ *(Equação 2)*

Onde:

Yp/s = coeficiente de rendimento ($g.g^{-1}$);

P_0 = massa produto de inicial ($g.L^{-1}$);

P_f = massa de produto final ($g.L^{-1}$);

S_f = Substrato final ($g.L^{-1}$);

S_0 = Substrato inicial ($g.L^{-1}$).

O cálculo da porcentagem do rendimento teórico ($Y_{\%T}$) foi realizado segundo Keating et al. (2004) na equação 3.

$$Y_{\%T} = \frac{Yp/s}{0,51} * 100 \quad (\%)$$ *(Equação 3)*

Onde:

$Y_{\%T}$ = porcentagem de rendimento teórico (%);

Yp/s = Coeficiente de rendimento ($g.g^{-1}$).

A produtividade foi determinada ao final de cada fermentação de acordo com a equação 4.

$$P = \frac{(P_f - P_0)}{(t_f - t_0)} \quad (g.L^{-1}.h)$$ *(Equação 4)*

Onde:

P = produtividade ($g.L^{-1}.h$);

P_0 = massa produto de inicial ($g.L^{-1}$);

P_f = massa de produto final ($g.L^{-1}$);

t_f = tempo (h);

t_0 = tempo inicial (h).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados experimentos com os micro-organismos separadamente para verificar a inibição do crescimento em diferentes concentrações de etanol, variando de 1 a 10%. Os três micro-organismos mostraram-se resistentes nessas concentrações de etanol utilizadas, uma vez que apresentaram crescimento celular sem formação do halo de inibição. Os resultados obtidos podem ser observados no apêndice A.

Os resultados dos experimentos em monocultura dos três micro-organismos utilizados no trabalho bem como as cofermentações estão descritas a seguir.

5.1. *Saccharomyces cerevisiae*

5.1.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas

Os resultados obtidos com os experimentos com células livres e imobilizadas em casca de soja utilizando a levedura *S. cerevisiae* estão expostos na Tabela 8 e nas Figuras 10, 11, 12 e 13.

Na Tabela 8 é possível observar o consumo de açúcar e o crescimento celular tanto dos experimentos com células livres quanto os experimentos com células imobilizadas da levedura *S. cerevisiae*. O consumo de açúcar com células livres variou entre 76,1 e 99,8%. Em todos os experimentos com consumo de açúcar menor que 90% ocorreram quando a concentração inicial de açúcar era de 90 $g.L^{-1}$. Em todas os experimentos com concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$ o consumo de açúcar foi acima de 97,7%. Ainda com a concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$ juntamente com pH 4,5 e velocidade de agitação de 150 rpm tanto na temperatura de 30 ºC e 35 ºC ocorreram os menores consumos de açúcar (79,1 e 76,1%, respectivamente). Ao utilizar células imobilizadas, em todas as condições aplicadas o consumo de açúcar chegou a quase 100%, variando entre 99,6 e 99,8%.

Nos experimentos com células livres obteve-se produção de biomassa celular de 2,3 a 5,6 $g.L^{-1}$ e com células imobilizadas variou-se de 4,4 a 15,2 $g.L^{-1}$. Para ambos os experimentos, o inóculo inicial foi de 0,21 $g.L^{-1}$. O crescimento celular máximo para células imobilizadas foi 2,7 vezes maior que o crescimento celular em cultivos com células livres. Tanto para células livres quanto com células imobilizadas os experimentos estáticos influenciaram negativamente no crescimento celular, o qual, se comparado com os cultivos

que tiveram velocidade de agitação aplicada, obtiveram os menores valores de crescimento celular. Para células livres os valores de crescimento celular foram semelhantes para velocidade de agitação de 100 rpm e 150 rpm de acordo com a temperatura, pH e concentração inicial de açúcar utilizado. Já para células imobilizadas a formação de biomassa aumentou conforme o aumento da velocidade de agitação.

Tabela 8: Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Temperatura (°C)	pH	Concentração de açúcar inicial ($g.L^{-1}$)	Velocidade de agitação (rpm)	Açúcar consumido (%) Livre	Açúcar consumido (%) Imobilizada	Crescimento celular ($g.L^{-1}$) Livre	Crescimento celular ($g.L^{-1}$) Imobilizada
30 ºC	4,5	60	Estático	99,3	99,7	3,5	4,4
			100	98,9	99,6	4,2	5,2
			150	97,7	99,6	4,7	8,9
		90	Estático	84,1	99,7	2,7	6,0
			100	84,0	99,7	4,7	7,8
			150	79,1	99,7	4,6	10,8
	5,5	60	Estático	98,1	99,6	3,5	6,7
			100	99,7	99,6	5,1	7,8
			150	99,5	99,7	5,1	9,4
		90	Estático	84,5	99,8	2,8	8,2
			100	96,9	99,7	5,1	9,3
			150	88,3	99,7	5,0	10,4
	6,5	60	Estático	99,2	99,7	2,8	7,2
			100	99,8	99,8	5,2	7,5
			150	99,7	99,7	5,2	10,9
		90	Estático	89,3	99,8	2,9	8,9
			100	99,5	99,8	5,6	10,8
			150	95,1	99,7	5,4	12,2
35 ºC	4,5	60	Estático	99,6	99,7	3,1	5,6
			100	99,6	99,6	4,5	9,0
			150	99,6	99,6	4,5	10,5
		90	Estático	86,0	99,7	3,0	7,1
			100	77,2	99,7	4,2	9,8
			150	76,1	99,6	4,2	10,6
	5,5	60	Estático	99,2	99,8	2,5	6,5
			100	99,7	99,7	4,8	10,4
			150	99,6	99,6	4,8	12,4
		90	Estático	86,0	99,7	2,5	8,3
			100	95,6	99,7	4,9	10,8
			150	87,3	99,6	4,8	15,2
	6,5	60	Estático	99,2	99,8	2,3	7,6
			100	99,7	99,7	5,0	9,0
			150	99,6	99,7	5,3	12,8
		90	Estático	99,4	99,8	2,7	8,9
			100	99,6	99,7	5,4	11,1
			150	84,5	99,7	5,1	13,1

Livre: células livres; Imobilizada: células imobilizadas.

Nas Figuras 11 e 12 estão representadas as quantidades de etanol obtidas em todos os experimentos com células livres e imobilizadas em casca de soja, respectivamente, da levedura *S. cerevisiae*. Em todas as combinações das condições de pH, velocidade de agitação, concentração inicial de açúcar e temperatura tanto para células livres quanto para células imobilizadas obteve-se produção de etanol. Para células livres a produção variou entre 5,7 e 21,8 $g.L^{-1}$. Na combinação velocidade de agitação de 100 rpm e pH 5,5 na concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$ obteve-se as menores produções de etanol de 5,7 e 6,8 $g.L^{-1}$ nas temperaturas de 35 e 30 ºC, respectivamente. Nos experimentos com pH 4,5 a aplicação de velocidade de agitação tive efeito negativo na produção de etanol, uma vez que com velocidade de agitação de 100 e 150 rpm a produção foi menor que em experimento estático, entretanto em temperatura de 30 ºC e concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$ a produção de etanol foi semelhante nas três variações de velocidade de agitação com pH 4,5, o mesmo pode ser observado nas mesmas condições com pH 6,5.

Ao contrário do ocorrido nos experimentos com células livres, a aplicação de velocidade de agitação teve influência positiva na produção de etanol em pH 4,5, com exceção apenas das condições de 30 ºC e concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$, o qual, em pH 4,5, a velocidade de agitação de 100 rpm resultou em uma produção de etanol menor, quando comparado com experimento estático e velocidade de agitação de 100 rpm. A maior produção de etanol utilizando células imobilizadas foi de 37,4 $g.L^{-1}$, valor este 71,5% maior que o pico de produção de etanol utilizando células livres. A variação na produção de etanol utilizando células imobilizadas foi de 13,6 a 37,4 $g.L^{-1}$. As condições que proporcionaram a maior produção de etanol foram de 30 ºC, concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$, velocidade de agitação de 150 rpm e pH 4,5.

Figura 11: Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).

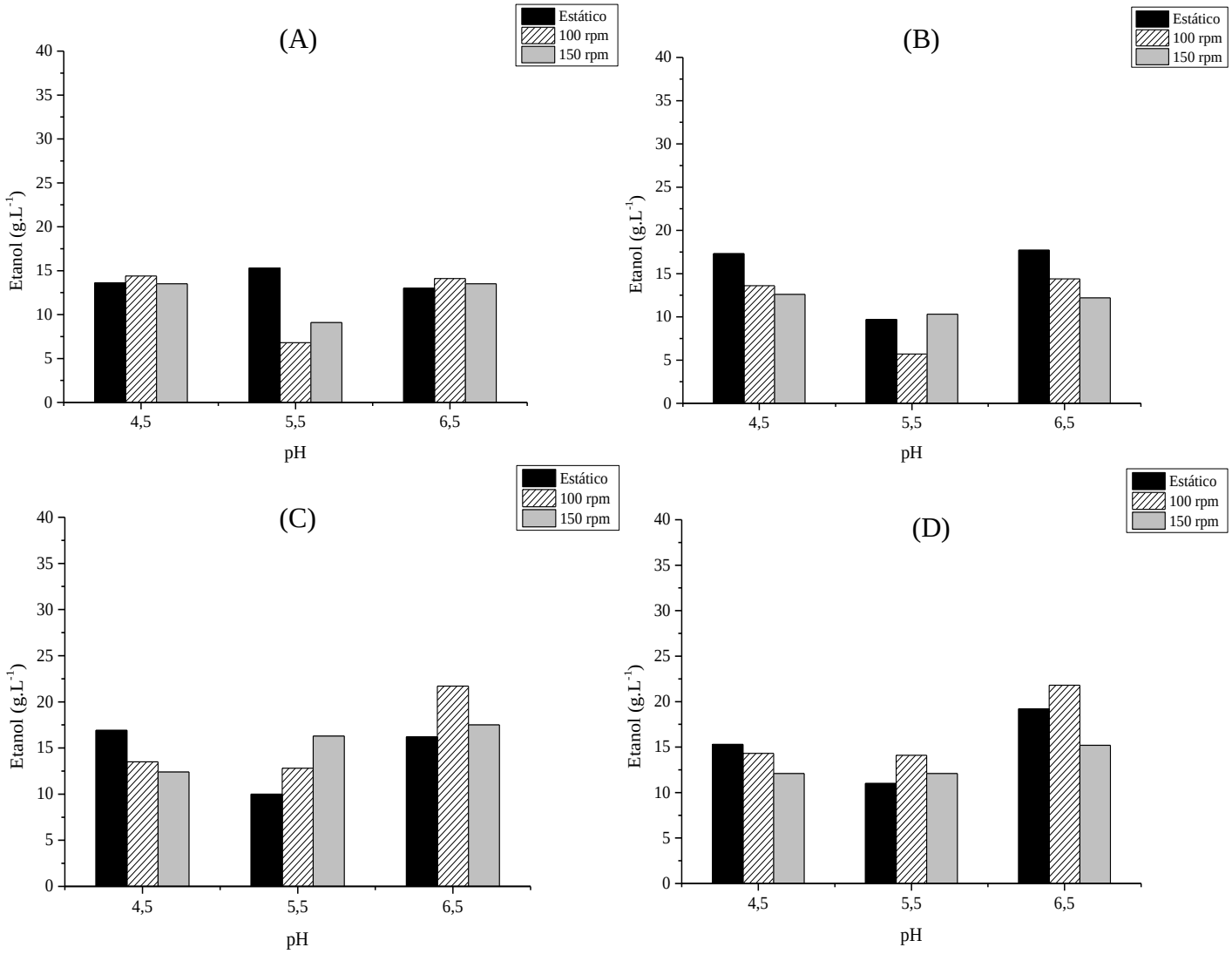
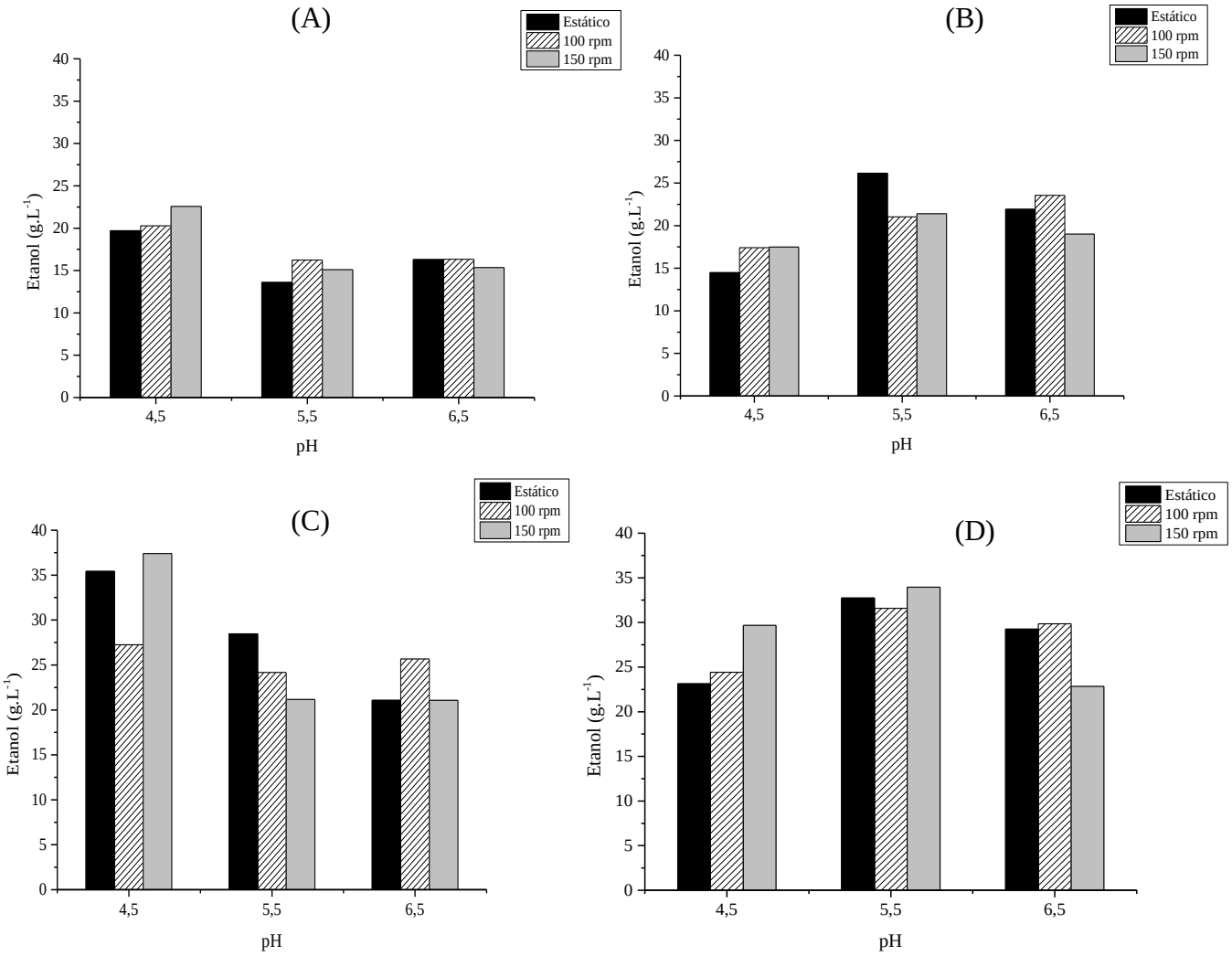


Figura 12: Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).



Os coeficientes de rendimento dos experimentos utilizando células livres e imobilizadas da levedura *S. cerevisiae* estão representados nas Figuras 13 e 14, respectivamente. Na Figura 13 pode-se observar que o pH 5,5 proporcionou rendimentos mais baixos, quando comparados com os outros valores de pH, em todas as condições de temperatura, velocidade de agitação e concentração inicial de açúcar, com exceção do cultivo com concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$, 30 ºC e experimento estático. Estes valores foram iguais ou menores de 0,20 $g.g^{-1}$. O rendimento utilizando células livres variou entre 0,10 e 0,30 $g.g^{-1}$. Este maior valor de rendimento equivale a 58,8% do rendimento teórico.

Nos experimentos utilizando células imobilizadas os valores de coeficiente de rendimento (Figura 14) variaram entre 0,23 e 0,44 $g.g^{-1}$. O maior valor de rendimento obtido (0,44 $g.g^{-1}$) correspondeu a 86,3% do rendimento teórico, valor este 27,5% maior que o rendimento máximo utilizando células livres. Nos experimentos com pH inicial de 4,5 e 30 ºC obteve-se valores de rendimento maiores em comparação aos valores de pH de 5,5 e 6,5, contudo, com o aumento de temperatura para 35 ºC os rendimentos com pH 5,5 e 6,5 (este último apenas na concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$) foram maiores que os obtidos com pH 4,5.

Figura 13: Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).

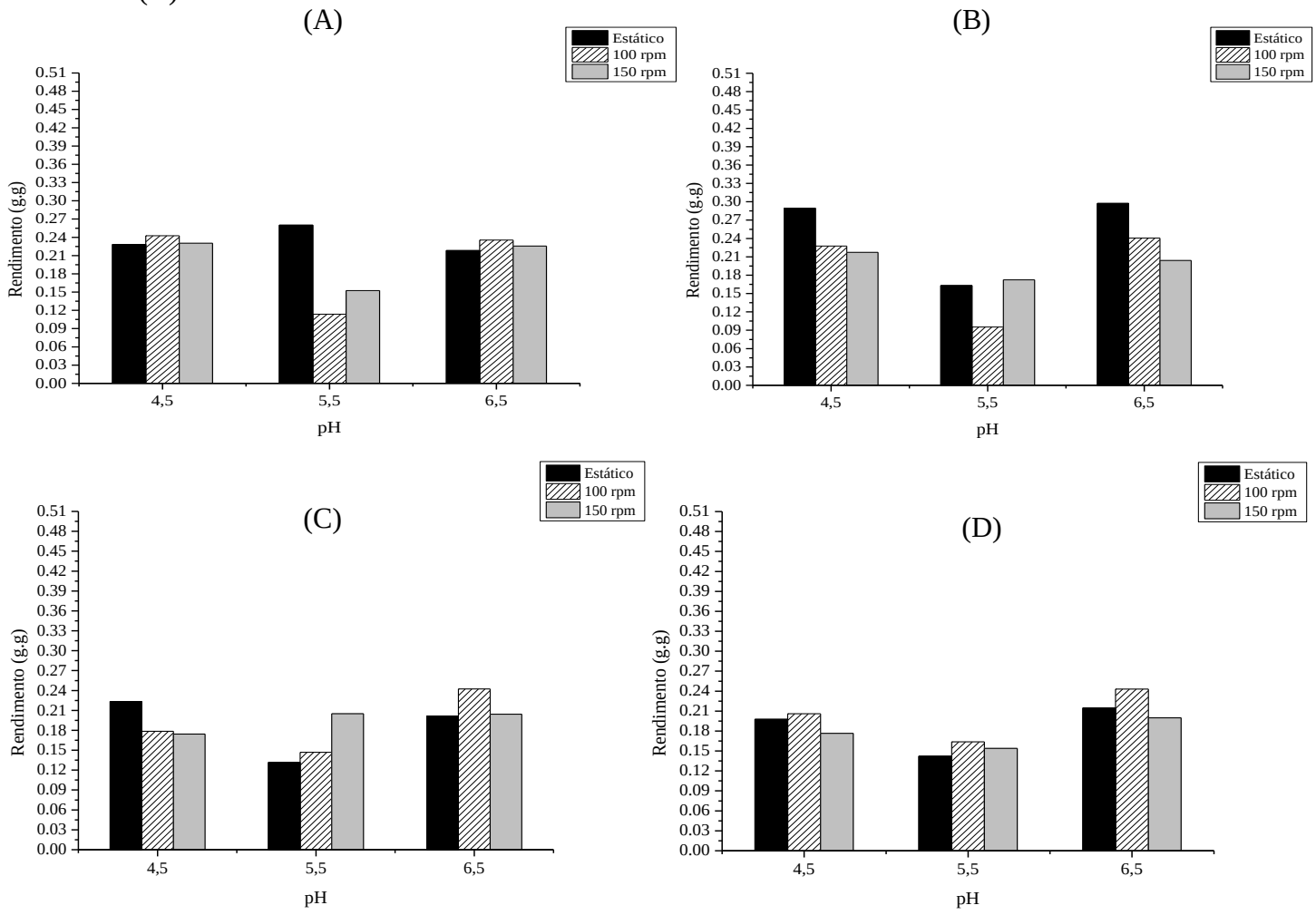
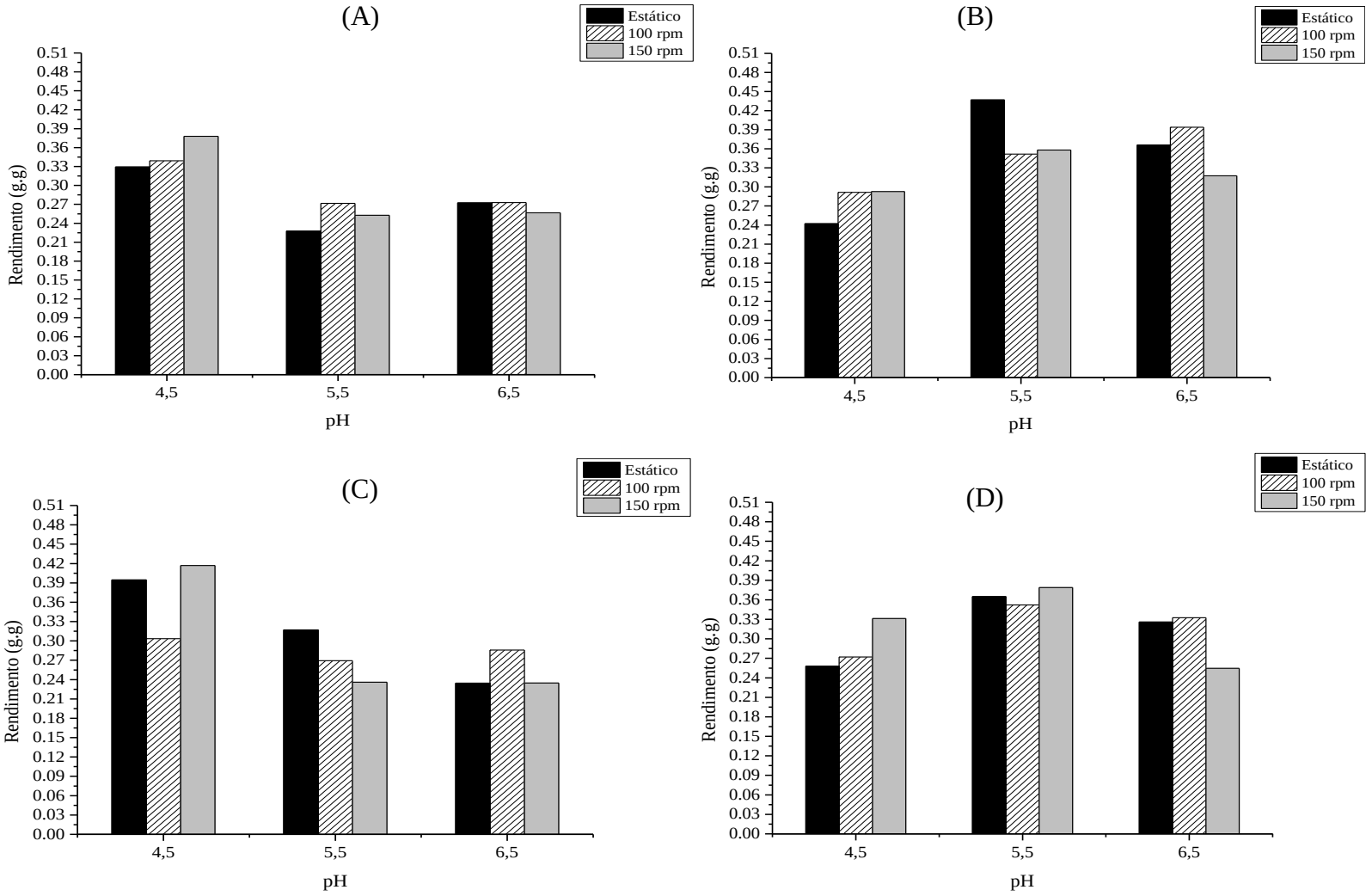


Figura 14: Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).



No trabalho de Behera, Mohanty e Ray (2011) foi compararada a produção de etanol utilizando células livres e imobilizadas em bucha vegetal da levedura *S. cerevisiae* em hidrolisado de uma flor típica da Índia chamada Mahula. Assim como no presente trabalho, a produção de etanol e o rendimento foram maiores com células imobilizadas do que com células livres. O mesmo comportamento dos resultados foi obtido no estudo de Pacheco, Gondim e Gonçalves (2010) os quais compararam a produção de etanol de células livres e células imobilizadas em bagaço de caju após extração do suco de caju. Os autores acompanharam a produção de etanol e o consumo de açúcar a cada hora de cultivo até completar 9 horas de processo e obtiveram produção de etanol, consumo de açúcar e rendimento maior utilizando células imobilizadas do que com células livres.

No trabalho de Mathew et al. (2013) foi obtida a produção de etanol usando hidrolisado de palha de colza utilizando células livres e imobilizadas da levedura *S. cerevisiae*. Os autores empregaram dois suportes diferentes para a imobilização celular que foram alginato de sódio e discos de hidrogel Lentikat®. O coeficiente de rendimento obtido foi de 0,47 e 0,46 $g.g^{-1}$ para alginato de sódio e Lentikat®, respectivamente, mostrando que não houve grande diferença no rendimento de etanol entre os suportes utilizados. Por outro lado o rendimento de etanol utilizando células livres foi 0,11 e 0,10 $g.g^{-1}$ menor que os obtidos com os suportes alginato de sódio e Lentikat®. No presente estudo o mesmo foi observado, uma vez que, quando comparado os maiores rendimentos utilizando células livres e células imobilizadas em casca de soja, a diferença foi de 0,14 $g.g^{-1}$.

No estudo de Karagöz e Özkan (2014) utilizaram células livres e imobilizadas em alginato de cálcio das leveduras *S. cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis* (chamada também de *Pichia stipitis*) em meio de cultura adicionado de glicose e xilose para produção de etanol. Ao contrário do observado no presente trabalho, ao final das 24 horas de cultivo, os autores obtiveram uma produção de etanol ligeiramente superior utilizando células livres, contudo a taxa de produção de etanol na fase logarítmica foi maior usando células imobilizadas, o que, de acordo com os autores, a imobilização celular demonstra importância para a redução do tempo de processo.

5.1.2. Determinação do Tempo

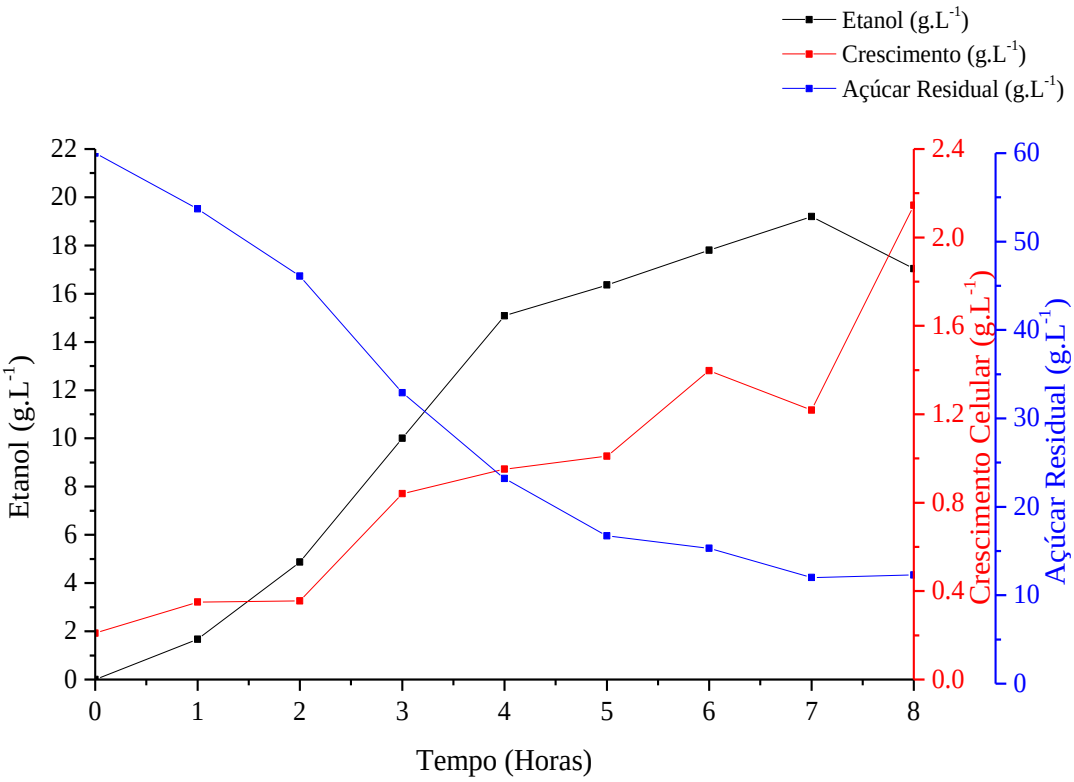
Posterior experimentos variando condições de temperatura, pH, velocidade de agitação e concentração inicial de açúcar, foi selecionado o maior valor de rendimento, comparando-se células livres e células imobilizadas, para realizar experimentos de reciclo e cofermentação.

Para a levedura *S. cerevisiae* foi considerado o maior valor de rendimento no experimento com células imobilizadas em casca de soja, valor este (0,44 $g.g^{-1}$) correspondente a 86,3% do valor teórico de produção de etanol. As condições utilizadas selecionadas foram 35 ºC, pH 5,5, concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$ e estático. Após esta escolha foi realizado um experimento nestas condições e retirou-se alíquotas a cada hora, partindo do tempo zero, buscando definir o tempo de fermentação a ser aplicado para o reciclo e cofermentação.

Na Figura 15 pode-se observar a produção de etanol, o crescimento celular e o açúcar residual de cada alíquota retirada ao longo de oito horas de processo. Como pode ser observado nesta Figura 15, com o decorrer do tempo o açúcar presente (glicose) foi consumido proporcionalmente com a produção de etanol e multiplicação celular. O crescimento celular aumentou conforme o decorrer do tempo. Entretanto ocorreu uma queda no crescimento no tempo de 7 horas, contudo na hora seguinte o crescimento celular foi maior chegando a 2,14 $g.L^{-1}$ de biomassa. A produção de etanol foi aumentando com o tempo e o maior pico de produção de etanol foi de 19,2 $g.L^{-1}$ em 7 horas de fermentação e houve uma queda em 8 horas de fermentação (Figura 15).

Observando-se o coeficiente de rendimento do etanol produzido bem como a produção de etanol, considerou-se 4 horas como o tempo de fermentação para as próximas etapas de reciclo e cofermentação. Neste tempo a produção de etanol foi de 15,1 $g.L^{-1}$ com rendimento de 0,40 $g.g^{-1}$.

Figura 15: Produção de etanol com células imobilizadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

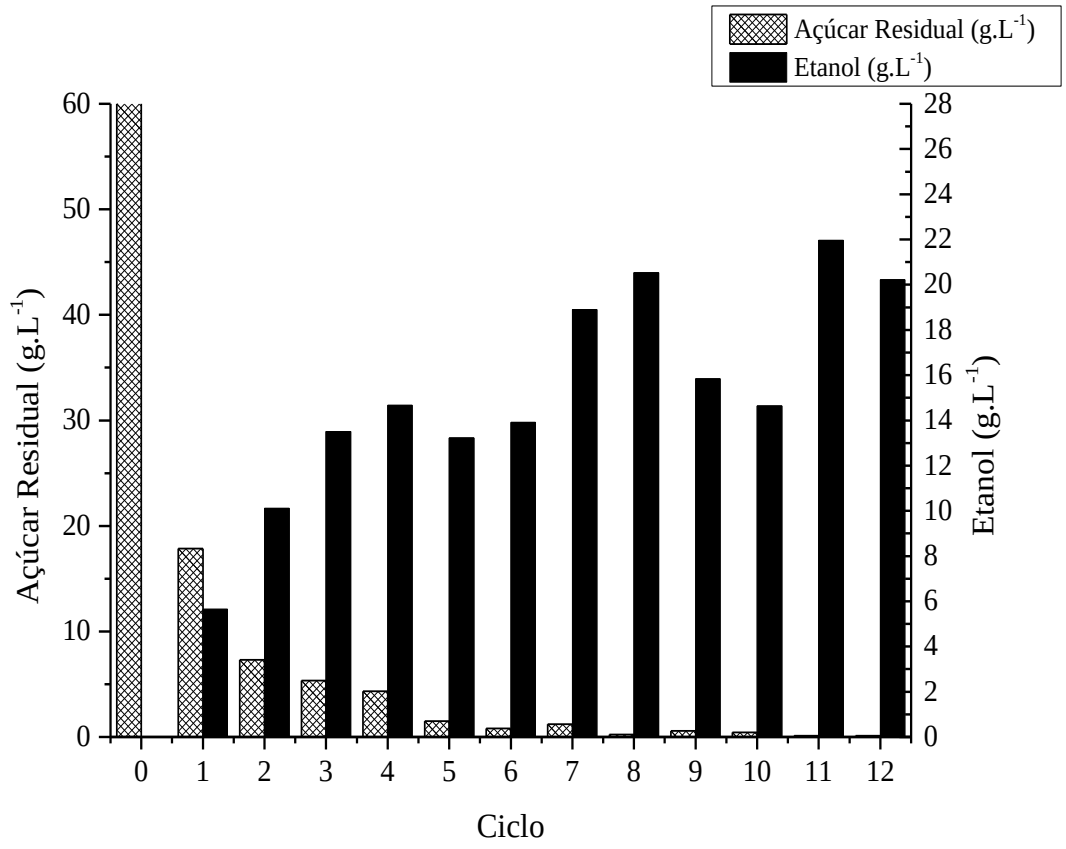


5.1.3. Reciclo

Com todas as condições obtidas nos experimentos anteriores (itens 5.1.1. e 5.1.2.) realizou-se o reciclo das células da levedura *S. cerevisiae* imobilizadas em casca de soja. A produção de etanol e o açúcar residual dos 12 ciclos estão representados na Figura 16. Nesta Figura 16 pode-se observar que a cada ciclo ocorreu um maior consumo de açúcar, uma vez que a quantidade de açúcar residual foi menor com o decorrer dos ciclos.

A produção de etanol teve um aumento gradativo conforme cada ciclo, com uma redução na produção nos ciclos 5, 9 e 10. Os ciclos 7, 8, 11 e 12 obtiveram as maiores produções de etanol (18,9; 20,5; 22,0 e 20,2 $g.L^{-1}$, respectivamente). Com estes resultados é possível afirmar que a imobilização celular com a casca de soja da levedura *S. cerevisiae* teve um efeito positivo para produção de etanol.

Figura 16: Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células mobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Na Tabela 9 estão descritos os resultados de coeficiente de rendimento, rendimento teórico, produtividade e crescimento celular do reciclo das células imobilizadas da levedura *S. cerevisiae*. O maior coeficiente de rendimento (0,37 $g.g^{-1}$) obtido foi no ciclo 11, o qual corresponde a 71,9% do rendimento teórico. Neste mesmo ciclo houve a maior produtividade que foi 5,49 $g.L^{-1}.h$. Estes resultados corroboram para afirmar a eficácia do reciclo para a levedura *S. cerevisiae* imobilizada em casca de soja.

Tabela 9: Coeficiente de rendimento, rendimento teórico e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Ciclo	**Yp/s ($g.g^{-1}$)**	**$Y_{\%T}$ (%)**	**Produtividade ($g.L.h^{-1}$)**
1	0,13	26,2	1,41
2	0,19	37,6	2,53
3	0,25	48,5	3,38
4	0,26	51,7	3,67
5	0,23	44,3	3,31
6	0,23	46,1	3,48
7	0,32	63,1	4,73
8	0,34	67,4	5,13
9	0,27	52,3	3,96
10	0,25	48,2	3,66
11	0,37	71,9	5,49
12	0,34	66,2	5,06

Yp/s: coeficiente de rendimento teórico; $Y_{\%T}$: porcentagem do rendimento teórico.

Singh et al. (2013) utilizaram a levedura *S. cerevisiae* imobilizada em diferentes suportes para produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar. Este mesmo resíduo serviu como um dos suportes empregados pelos autores bem como o alginato de cálcio e agar-agar. As produções máximas de etanol encontradas pelos autores foram de 15,4; 11,8 e 9,4 $g.L^{-1}$ com os suportes bagaço de cana de açúcar, alginato de cálcio e agar-agar, respectivamente com 36 horas de processo fermentativo. Os autores realizaram quatro ciclos com os suportes alginato de cálcio e agar-agar, por possível perda de integridade do suporte, e dez ciclos com o bagaço de cana de açúcar e com este último suporte empregado, a produção reduziu do oitavo ciclo em diante, diferente do presente estudo, no qual o pico máximo de etanol obtido foi de 22 $g.L^{-1}$ no ciclo 11 e com tempo menor de processo fermentativo (4 horas).

Utilizando glicose como fonte de carbono para produção de etanol, Winkelhausen et al. (2010) imobilizaram a levedura *S. cerevisiae* em gel liofilizado contendo cloreto de trimetilamônio como fotoiniciador. Neste trabalho, os autores realizaram três ciclos

fermentativos de 72 horas cada ciclo e no segundo ciclo obteve-se maior pico de produção de etanol. O consumo de glicose foi maior e mais rápido com o decorrer de cada ciclo, igual ao apresentado no presente trabalho. Este mesmo comportamento foi observado também para o consumo de açúcar no trabalho de Pacheco, Gondim e Gonçalves (2010) que realizaram dez ciclos utilizando células da levedura *S. cerevisiae* imobilizada em bagaço de caju e observaram a produção de etanol em suco de caju como substrato.

Em outro estudo de Gökgöz e Yigtoglu (2011) realizaram cinco ciclos de fermentação utilizando células imobilizadas em carboximetilcelulose da levedura *S. cerevisiae* para produção de etanol a partir de glicose. Os autores concluíram que o reciclo foi eficaz até o quarto ciclo, já que houve uma queda significativa da produção no último ciclo. No presente trabalho o emprego de resíduo celulósico como suporte para imobilização celular permitiu maior número de ciclos fermentativos, isto possibilitaria a redução de custo do processo tanto pela a utilização de um suporte de baixo custo, além de que os resíduos celulósicos utilizados como suporte para imobilização celular apresentam maior resistência mecânica, simplicidade de processo, durabilidade e possibilidade de maior número de ciclos fermentativos, vantagens estas principalmente quando comparadas com suportes utilizados na imobilização em matriz porosa, como por exemplo o alginato (YUVADETKUN; REUNGSANG; BOONMEE, 2018).

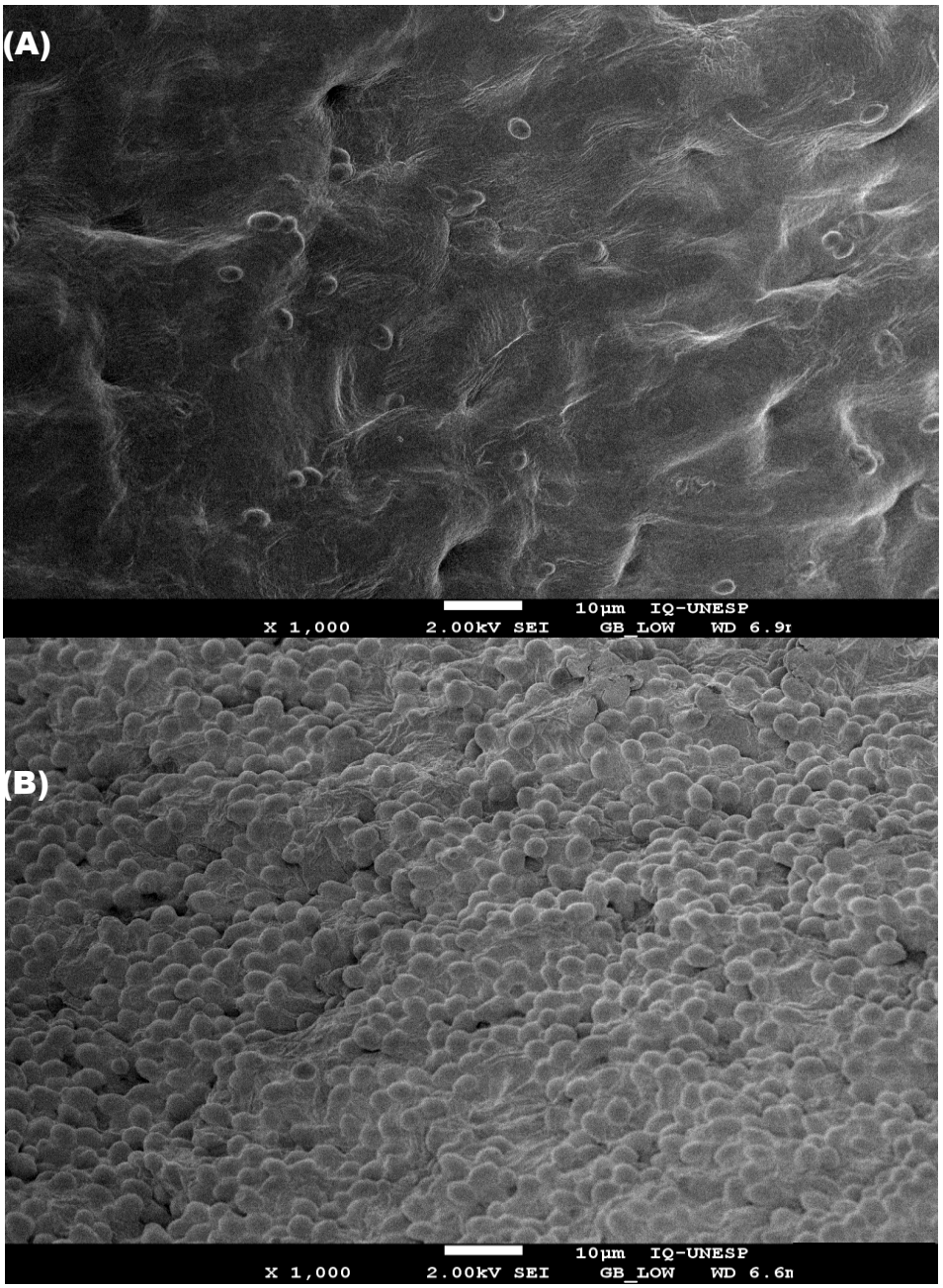
Na pesquisa de Santos et al. (2015) foi desenvolvido um novo processo industrial utilizando uma cepa floculante da levedura *S. cerevisiae* para reciclagem desta durante a produção de etanol. Neste trabalho dois reatores foram montados para operar em série, e os autores puderam observar a conversão da sacarose da cana de açúcar a etanol. Assim como no presente trabalho, cujo reciclo das células imobilizadas apresentou eficácia no reciclo celular com rendimento teórico de etanol de até 71,9%, os autores obtiveram sucesso no reciclo celular neste novo processo e alcançaram rendimento teórico de até 86%.

5.1.3.1. Fotografias Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG)

A Figura 17 mostra as fotografias da análise em MEV-FEG do suporte casca de soja com a levedura *S. cerevisiae* inicialmente imobilizada (A) e após os 12 ciclos fermentativos (B). Pode-se observar pelas fotografias que ocorreu multiplicação celular na casca e que a levedura continuou aprisionada após os 12 ciclos fermentativos, isto mostra que a levedura possui afinidade pelo suporte utilizado. A elevada quantidade de células que apresentou na Figura 17B pode ter ocorrido devido a capacidade da levedura *S. cerevisiae* de se agregar, isto pode ocorrer devido ao pH ou esgotamento de nutrientes (SOARES, 2011). Apesar da

afinidade da levedura *S. cerevisiae* com a casca de soja ocorreu desprendimento celular para o meio reacional. Este desprendimento variou entre 0,37 e 0,49 $g.L^{-1}$, e o menor desprendimento foi nos ciclos 1 e 9 e o maior ocorreu no ciclo 10.

Figura 17: Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



A: MEV-FEG da casca de soja com imobilização inicial da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. B: MEV-FEG da casca de soja com imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* posterior 12 ciclos de fermentação.

5.2. *Zymomonas mobilis*

5.2.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas

Os resultados obtidos dos experimentos com células livres e imobilizadas em casca de soja da bactéria *Z. mobilis* variando-se condições de pH, temperatura, concentração inicial de açúcar e velocidade de agitação estão descritos na Tabela 10 e nas Figuras 18, 19, 20 e 21. O consumo de açúcar e o crescimento celular tanto dos cultivos com células livres quanto com células imobilizadas estão na Tabela 10.

O consumo de açúcar para células livres variou entre 53,6 a 99,8%. De todos os experimentos realizados 66,7% resultou em um consumo de açúcar acima de 90%. Comparando-se o consumo de açúcares dos cultivos utilizando células livres com os cultivos utilizando células imobilizadas, com células livres obtiveram-se mais experimentos com maior consumo de açúcares, uma vez que com células imobilizadas o consumo variou entre 25,9 a 99,3% e 41,7% dos cultivos o consumo foi maior que 90%. Na temperatura de 35 ºC foi observado um menor consumo de açúcar, já que, com exceção de três cultivos (dos dezoito com temperatura de 35 ºC), o consumo foi abaixo de 71% e destes experimentos, na ausência de agitação do meio de cultivo também foi observado um menor consumo de açúcar.

O inóculo inicial para cultivos utilizando células livres e células imobilizadas foi de 0,18 $g.L^{-1}$. Em experimentos posteriores, o crescimento das células livres variou entre 0,52 e 2,41 $g.L^{-1}$ e para as células imobilizadas foi de 0,56 a 5,98 $g.L^{-1}$. A máxima produção de biomassa celular com células imobilizadas foi 2,5 vezes maior que utilizando células livres. Com temperatura de 30 ºC e sem agitação (experimento estático) o crescimento celular foi maior, usando células imobilizadas, nos três valores de pH utilizados e nas duas concentrações iniciais de açúcar empregadas. Com aplicação de agitação, o crescimento celular foi menor. Contudo, na temperatura de 35 ºC a formação de biomassa celular foi gradativamente maior com o aumento da velocidade de agitação.

Tabela 10: Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis*.

Temperatura (°C)	pH	Concentração de açúcar inicial ($g.L^{-1}$)	Velocidade de agitação (rpm)	Açúcar consumido (%)	Açúcar consumido (%)	Crescimento celular ($g.L^{-1}$)	Crescimento celular ($g.L^{-1}$)
				Livre	Imobilizada	Livre	Imobilizada
30 ºC	4,5	60	Estático	99,7	98,8	0,84	2,47
			100	74,1	96,7	0,59	2,09
			150	67,4	93,5	0,65	0,75
		90	Estático	84,8	99,0	1,15	3,33
			100	62,3	98,3	0,73	2,86
			150	53,6	36,2	0,52	0,58
	5,5	60	Estático	99,5	99,1	1,13	2,41
			100	99,8	96,7	1,68	2,11
			150	98,4	93,9	1,50	0,57
		90	Estático	98,0	99,1	1,22	3,32
			100	98,6	92,7	1,88	1,81
			150	76,3	34,5	1,20	0,72
	6,5	60	Estático	99,7	99,0	1,21	2,59
			100	98,3	96,8	2,00	1,65
			150	97,3	47,1	1,58	0,64
		90	Estático	99,7	99,3	1,93	3,41
			100	98,7	44,1	2,18	0,56
			150	97,6	58,2	1,26	0,91
35 ºC	4,5	60	Estático	99,1	25,9	0,99	2,32
			100	71,7	91,0	1,05	3,28
			150	59,3	70,4	0,85	4,05
		90	Estático	68,5	28,7	1,03	2,07
			100	85,8	37,2	1,00	2,99
			150	73,6	55,4	0,89	4,02
	5,5	60	Estático	99,6	31,3	0,98	2,23
			100	98,1	55,6	1,83	3,35
			150	97,5	89,4	1,77	4,81
		90	Estático	87,7	34,2	1,07	2,06
			100	96,2	44,6	2,15	3,17
			150	94,5	46,5	1,83	4,23
	6,5	60	Estático	99,6	38,5	1,03	2,63
			100	98,6	90,6	2,20	3,67
			150	97,4	55,9	1,74	5,98
		90	Estático	98,8	41,8	1,25	2,81
			100	98,2	40,0	2,41	2,92
			150	99,7	59,6	2,14	4,39

Livre: células livres; Imobilizada: células imobilizadas.

A produção de etanol utilizando células livres e imobilizadas da bactéria *Z. mobilis* estão representadas nas Figuras 18 e 19, respectivamente. Na Figura 18 pode-se observar que em todos os experimentos aplicando-se pH inicial de 4,5 a produção de etanol foi menor conforme o aumento na velocidade de agitação, o mesmo foi observado em cultivo com pH 6,5, temperatura de 35 ºC e concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$. Nos experimentos com temperatura de 30 ºC, concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$ e nos valores de pH 5,5 e 6,5 a produção de etanol foi semelhante para cultivos estáticos e velocidade de agitação de 100 rpm, entretanto com velocidade de agitação de 150 rpm a produção foi menor. Com isto, pode-se observar que na maioria dos experimentos a velocidade de agitação de 150 rpm teve influência negativa na produção de etanol, na qual obteve-se a menor produção de etanol (6,3 $g.L^{-1}$) juntamente com as condições de temperatura de 30 ºC, pH 4,5 e concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$. O maior pico de produção de etanol utilizando células livres da bactéria *Z. mobilis* foi de 25,7 $g.L^{-1}$ nas condições de temperatura de 35 ºC, concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$, pH 6,5 em experimento estático.

As produções de etanol obtidas com os experimentos utilizando células imobilizadas da bactéria *Z. mobilis* estão representadas na Figura 19, na qual pode-se observar que a temperatura de 35 ºC teve influência negativa para a produção de etanol, que alcançou produções abaixo de 12 $g.L^{-1}$. O mesmo ocorreu com o consumo de açúcar (Tabela 10), que foi menor em temperatura de 35 ºC, contudo favoreceu crescimento celular (Tabela 10). Com a temperatura de 30 ºC a produção de etanol foi maior com o aumento da concentração inicial de açúcar de 60 para 90 $g.L^{-1}$ em todas as velocidade de agitação e pH empregados, com exceção dos experimentos com pH 6,5 e velocidade de agitação de 100 rpm; e pH 5,5 e velocidade de agitação de 150 rpm. No geral, a velocidade de agitação de 150 rpm forneceu menores valores de produção de etanol nos cultivos com temperatura de 30 ºC.

A variação da produção de etanol utilizando células livres foi de 6,3 a 25,7 $g.L^{-1}$, já para experimentos utilizando células imobilizadas a variação foi maior (0,8 a 34,4 $g.L^{-1}$), contudo o maior pico de produção de etanol com células imobilizadas foi 34% maior que o pico de produção de etanol utilizando células livres. Esta variação na produção de etanol com células imobilizadas ocorreu nas mesmas condições de pH (5,5), concentração inicial de açúcar (90 $g.L^{-1}$) e velocidade de agitação (estático), na temperatura de 30 ºC obteve-se a maior produção de etanol (34,4 $g.L^{-1}$).

Figura 18: Produção de etanol em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da bactéria *Zymomonas mobilis* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 g.L^{-1} e 30 ºC (A), 60 g.L^{-1} e 35 ºC (B), 90 g.L^{-1} e 30 ºC (C) e 90 g.L^{-1} e 35 ºC (D).

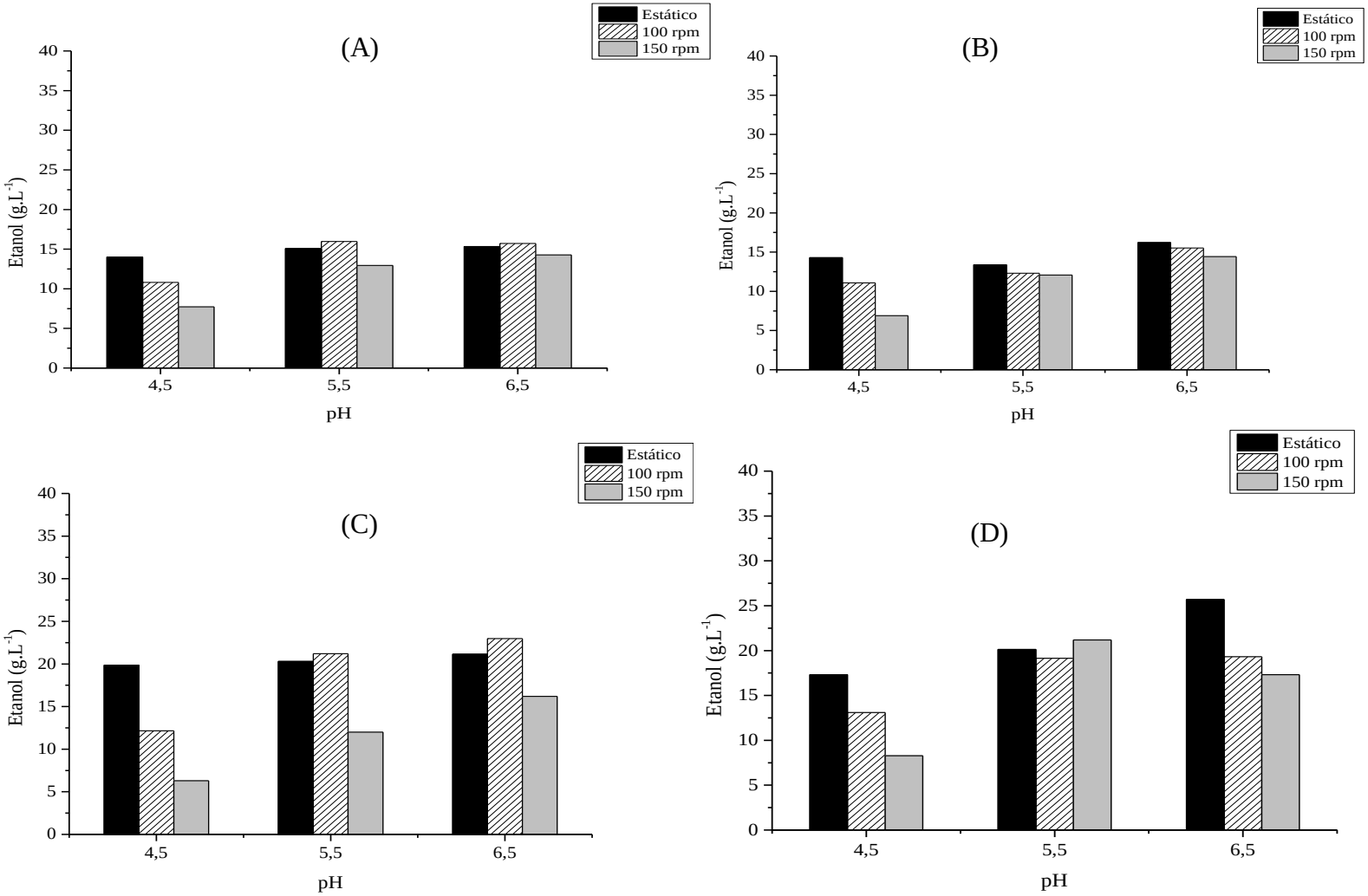
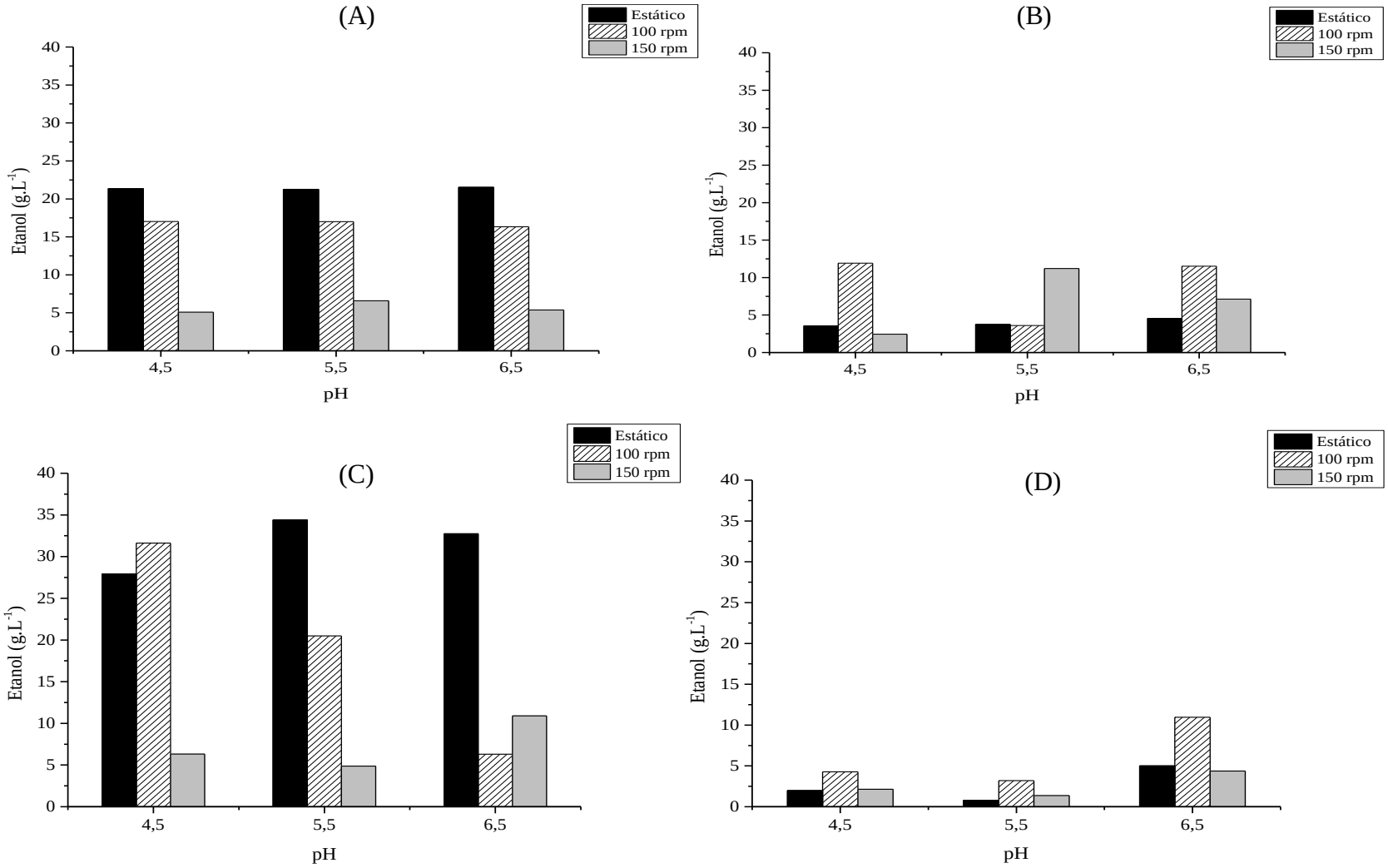


Figura 19: Produção de etanol em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 g.L^{-1} e 30 ºC (A), 60 g.L^{-1} e 35 ºC (B), 90 g.L^{-1} e 30 ºC (C) e 90 g.L^{-1} e 35 ºC (D).



Os coeficientes de rendimento de etanol dos experimentos com células livres e imobilizadas em casca de soja da bactéria *Z. mobilis* podem ser observadas nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Na Figura 20 pode-se observar que o coeficiente de rendimentos foi semelhante em todas as condições aplicadas, com exceção da combinação das condições de velocidade de agitação de 150 rpm e a concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$, condições estas responsáveis pelos menores coeficientes de rendimento. O maior rendimento obtido com células livres foi de 0,29 $g.g^{-1}$, que corresponde a 56,8% do rendimento teórico nas condições de 35 ºC, concentração inicial de substrato de 90 $g.L^{-1}$, pH 6,5 e experimento estático.

Utilizando células imobilizadas da bactéria *Z. mobilis* os coeficientes de rendimento (Figura 21) foram maiores em temperatura de 30 ºC em experimento estático e velocidade de agitação de 100 rpm, com exceção do pH 6,5 para velocidade de agitação de 100 rpm. Como foi observada na produção de etanol, a temperatura de 35 ºC também teve influência negativa para o rendimento de etanol, principalmente com concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$, no qual os rendimentos obtidos foram abaixo de 0,13 $g.g^{-1}$, com exceção do experimento com velocidade de agitação de 100 rpm e pH 6,5 em que o rendimento foi de 0,30 $g.g^{-1}$. O maior valor de coeficiente de rendimento obtido utilizando células imobilizadas foi de 0,39, o qual corresponde a 76,5% do valor teórico. Este rendimento foi resultante das condições de 30 ºC, concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$, pH 5,5 e experimento estático.

Figura 20: Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da bactéria *Zymomonas mobilis* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).

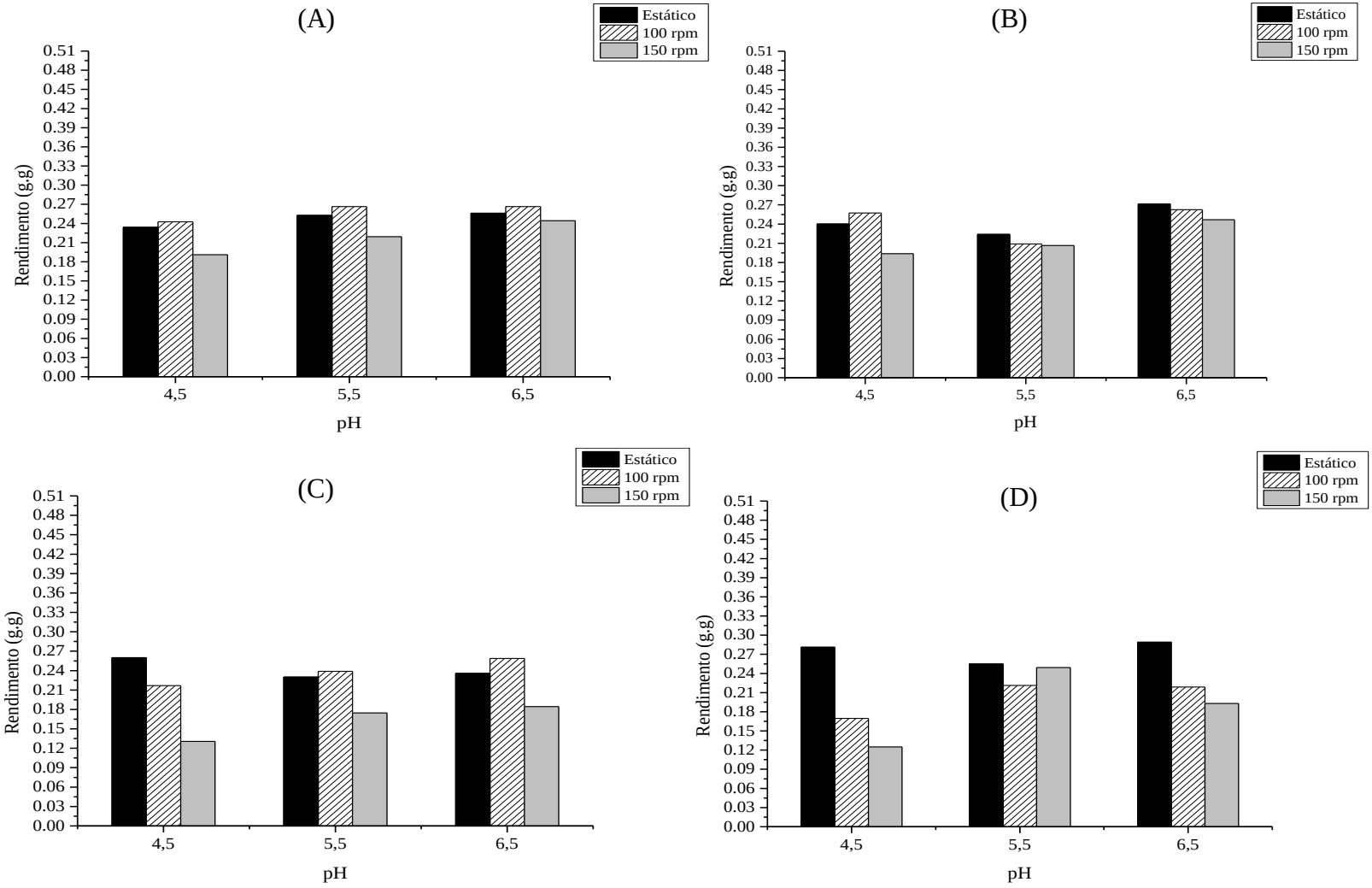
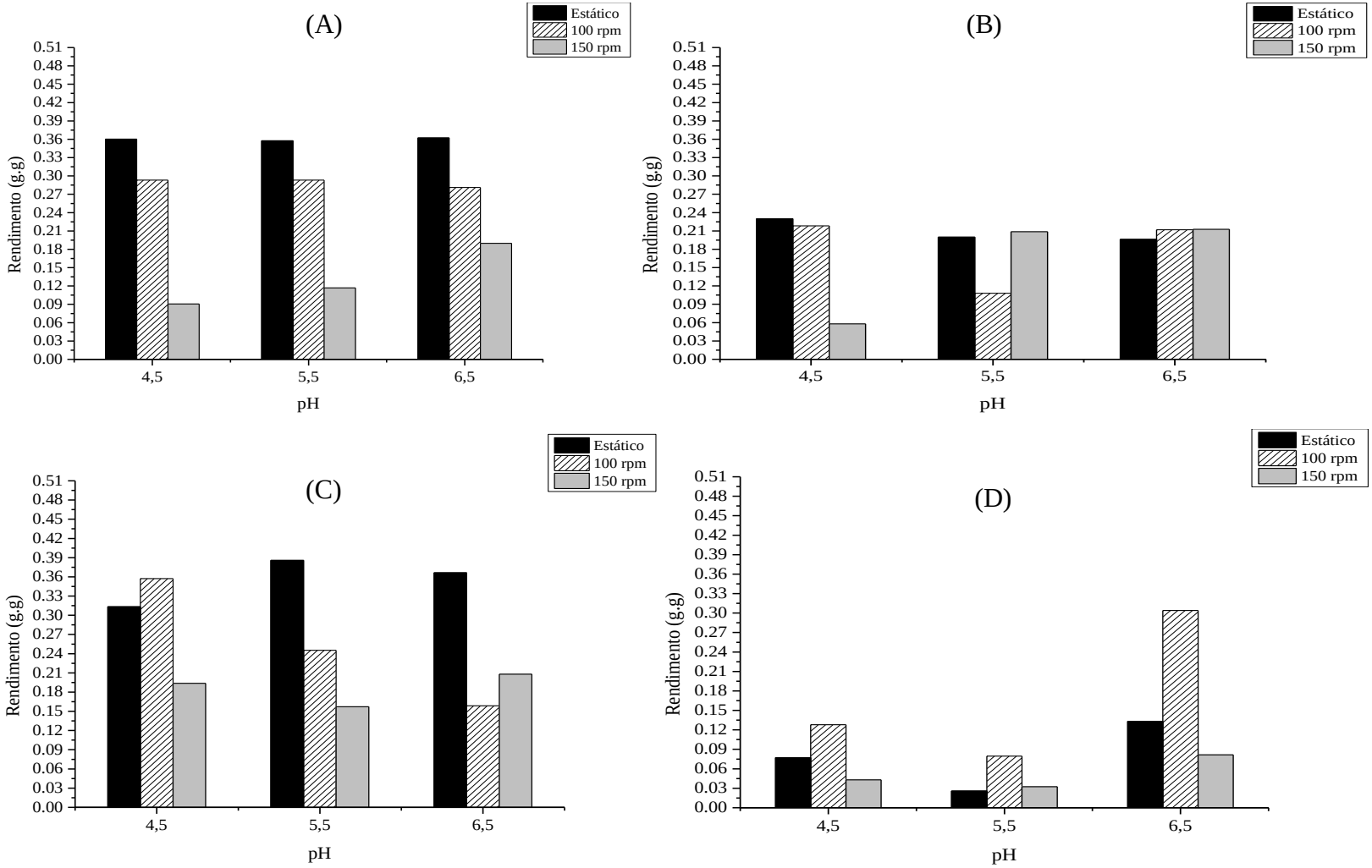


Figura 21: Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pHe velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).



No presente trabalho a temperatura de 35 ºC teve influência negativa no consumo de açúcar e no rendimento de etanol, influência esta observada principalmente nos experimentos utilizando células imobilizadas. Este comportamento também foi observado no estudo de Lee et al. (1981) o qual houve uma redução tanto no coeficiente de rendimento quanto na concentração máxima de etanol encontrada pelos autores conforme aumento da temperatura, temperatura esta variada entre 20 e 40 ºC. No trabalho de Skotinicki et al. (1981) utilizaram diferentes cepas da bactéria *Z. mobilis* para produção de etanol a partir de glicose e de sacarose. Para ambos os açúcares a concentração final de etanol com as quatro cepas empregadas foi maior em temperatura de 30 ºC com queda ou ausência na produção nas temperaturas de 37 e 42 ºC. Cazetta et al. (2007) variaram temperatura de 30, 35 e 40 ºC e verificaram a produção de etanol a partir do melaço de cana-de-açúcar obtendo-se uma produção mais baixa em temperatura de 40 ºC.

Na pesquisa de Rebros et al. (2005) utilizaram condições como temperatura de 30 ºC e pH 5 para produção de etanol a partir de glicose com células livres e imobilizadas em gel LentiKats da bactéria *Z. mobilis*. Posterior cultivo obtiveram coeficientes de rendimento semelhantes utilizando células livres e imobilizadas, estes rendimentos foram de 0,47 e 0,50 $g.g^{-1}$, respectivamente. No presente trabalho os maiores coeficientes de rendimento obtidos utilizando células livres e imobilizadas em casca de soja foram de 0,29 e 0,39 $g.g^{-1}$, respectivamente. Apesar de o presente trabalho ter apresentado rendimentos menores que o obtido por Rebros et al. (2005), houve maior rendimento utilizando células livres, o qual condiz com o trabalho destes autores.

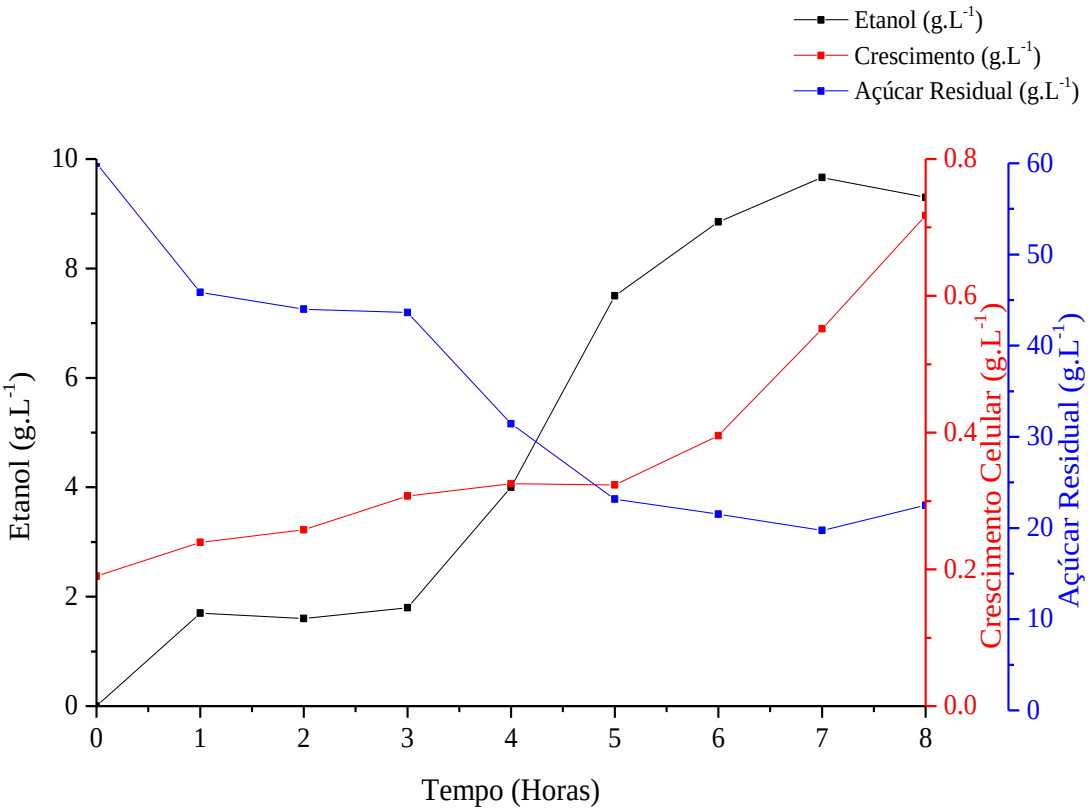
5.2.2. Determinação do Tempo

Posterior experimentos variando condições de temperatura, pH, velocidade de agitação e concentração inicial de açúcar, foi selecionado o maior valor de rendimento, comparando-se células livres e imobilizadas, para realizar experimentos de reciclo e cofermentação. No caso da bactéria *Z. mobilis* o maior coeficiente de rendimento obtido foi de 0,39 $g.g^{-1}$ utilizando células imobilizadas. Contudo, neste rendimento, a concentração inicial de açúcar foi de 90 $g.L^{-1}$ e, como para a levedura *S. cerevisiae* a concentração inicial de açúcar selecionada foi de 60 $g.L^{-1}$ e, pensando-se em redução de custo, optou-se em utilizar o rendimento de 0,36 $g.g^{-1}$ que corresponde a 70,5% do rendimento teórico. Portanto as condições selecionadas foram concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$, 30 ºC, pH 4,5 e experimento estático.

Foi realizado um cultivo de oito horas, retirando-se alíquotas a cada hora, com a bactéria *Z. mobilis* imobilizada em casca de soja (Figura 22). Nas primeiras cinco horas (Figura 22) o crescimento celular ocorreu de forma mais lenta, tendo um aumento da sexta hora em diante, chegando a um crescimento máximo de 0,71 $g.L^{-1}$ em oito horas.

Na segunda e terceira hora de cultivo, houve baixo consumo de açúcar, o mesmo ocorreu no tempo de seis, sete e oito horas de fermentação. A produção de etanol teve um pico em sete horas, com produção máxima de 9,7 $g.L^{-1}$. Ao calcular o coeficiente de rendimento de cada alíquota, observou-se que o tempo de seis horas obteve maior valor de rendimento, que foi de 0,23 $g.g^{-1}$. Fixou-se este tempo de seis horas como tempo para cultivo do reciclo e da cofermentação. Neste ponto do processo a produção de etanol foi de 8,8 $g.L^{-1}$.

Figura 22: Produção de etanol com células imobilizadas da bactéria *Zymomonas mobilis*.



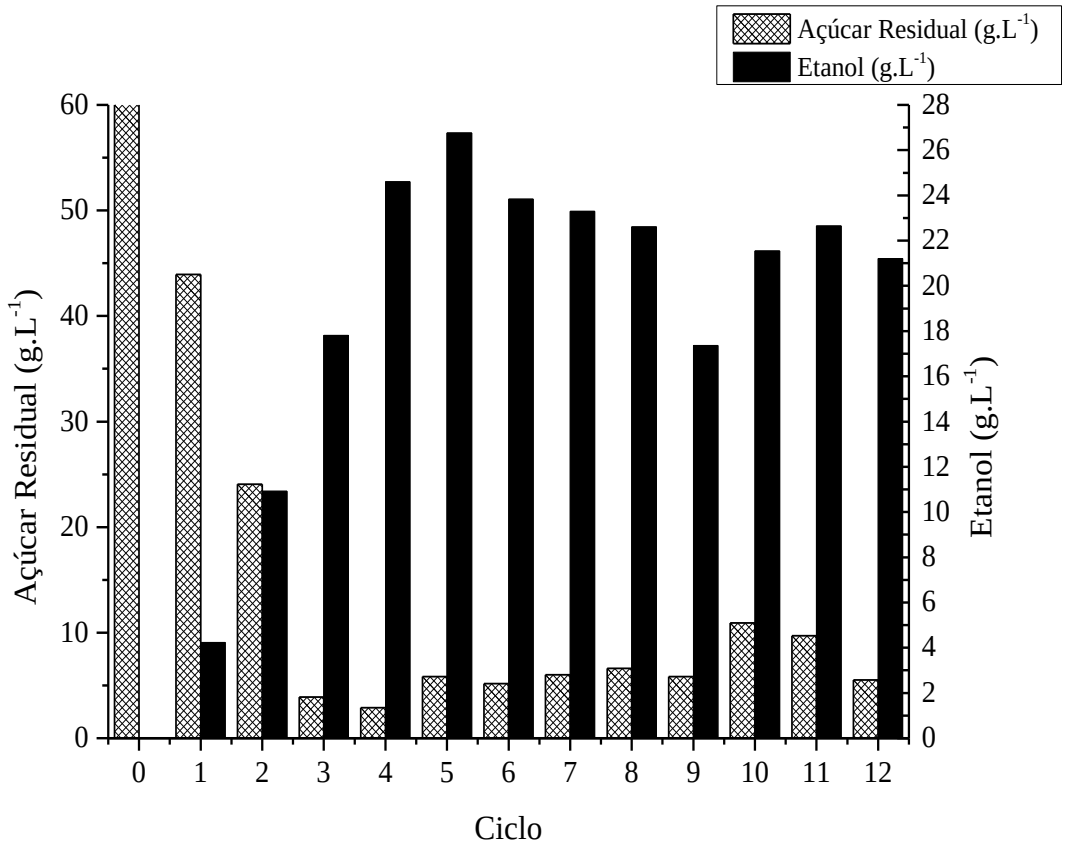
5.2.3. Reciclo

Com as condições de tempo, temperatura, pH, velocidade de agitação e concentração inicial de substrato determinadas, realizou-se o reciclo celular para observar a produção de

etanol, o consumo de açúcar (Figura 23), o rendimento e a produtividade (Tabela 11) no decorrer dos ciclos.

A Figura 23 mostra que com o passar dos ciclos o consumo de açúcar aumentou e que do ciclo 3 até o ciclo 12 a quantidade de açúcar residual foi abaixo de 10 $g.L^{-1}$, ou seja, ocorreu um consumo de açúcar de mais de 80%. A produção de etanol (Figura 23) teve um aumento gradativo até o quinto ciclo e após este ciclo a produção diminuiu e se estabilizou, com exceção do ciclo 9 que teve uma produção menor em relação aos ciclos de 6 a 12. O maior pico de produção foi de 26,7 $g.L^{-1}$ no ciclo 5.

Figura 23: Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis*.



De todos os ciclos realizados com células imobilizadas da bactéria *Z. mobilis* o ciclo 5 teve destaque por apresentar maior produtividade (4,46 $g.L.h^{-1}$) e maior valor do coeficiente de rendimento (0,49 $g.g^{-1}$), o qual foi 96,9% do rendimento teórico. No primeiro e no segundo ciclo ocorreram os menores coeficientes de rendimento que foram 0,26 e 0,30 $g.g^{-1}$, respectivamente. A partir do terceiro ciclo tanto o coeficiente quanto a produtividade foram

maiores e, apesar da variação, se mantiveram acima de 0,32 $g.g^{-1}$ e 2,89 $g.L.h^{-1}$, respectivamente.

Tabela 11: Coeficiente de rendimento, rendimento teórico e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da bactéria *Zymomonas mobilis*.

Ciclo	**Yp/s ($g.g^{-1}$)**	**Y%T (%)**	**Produtividade ($g.L.h^{-1}$)**
1	0,26	50,9	0,70
2	0,30	58,8	1,82
3	0,32	62,7	2,97
4	0,43	84,3	4,10
5	0,49	96,1	4,46
6	0,43	84,3	3,97
7	0,43	84,3	3,88
8	0,42	82,3	3,77
9	0,32	62,7	2,89
10	0,44	86,3	3,59
11	0,45	88,2	3,78
12	0,39	76,4	3,53

Yp/s: coeficiente de rendimento teórico; $Y_{\%T}$: porcentagem do rendimento teórico.

No estudo de Yamashita et al. (2008) realizaram o reciclo celular com células da bactéria *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio para produção de etanol utilizando lama residual da indústria de papel como substrato. Nas condições empregadas pelos autores foi possível realizar 4 ciclos fermentativos e obtiveram produção máxima de etanol de 17,86 $g.L^{-1}$ e 47,8% do rendimento teórico no primeiro ciclo. Conforme o decorrer dos ciclos houve queda na produção de etanol até que no último ciclo obtiveram uma produção de 5,32 $g.L^{-1}$ e um rendimento teórico de 14,1%. Este resultado foi abaixo do obtido no presente trabalho, uma vez que, o menor rendimento teórico foi de 50,9% no primeiro ciclo. Esta diferença pode ser devida ao suporte utilizado para imobilização, já que, de acordo com os autores a redução na estabilidade do alginato de cálcio pode ter provocado uma inibição celular gradativa de acordo com o ciclo.

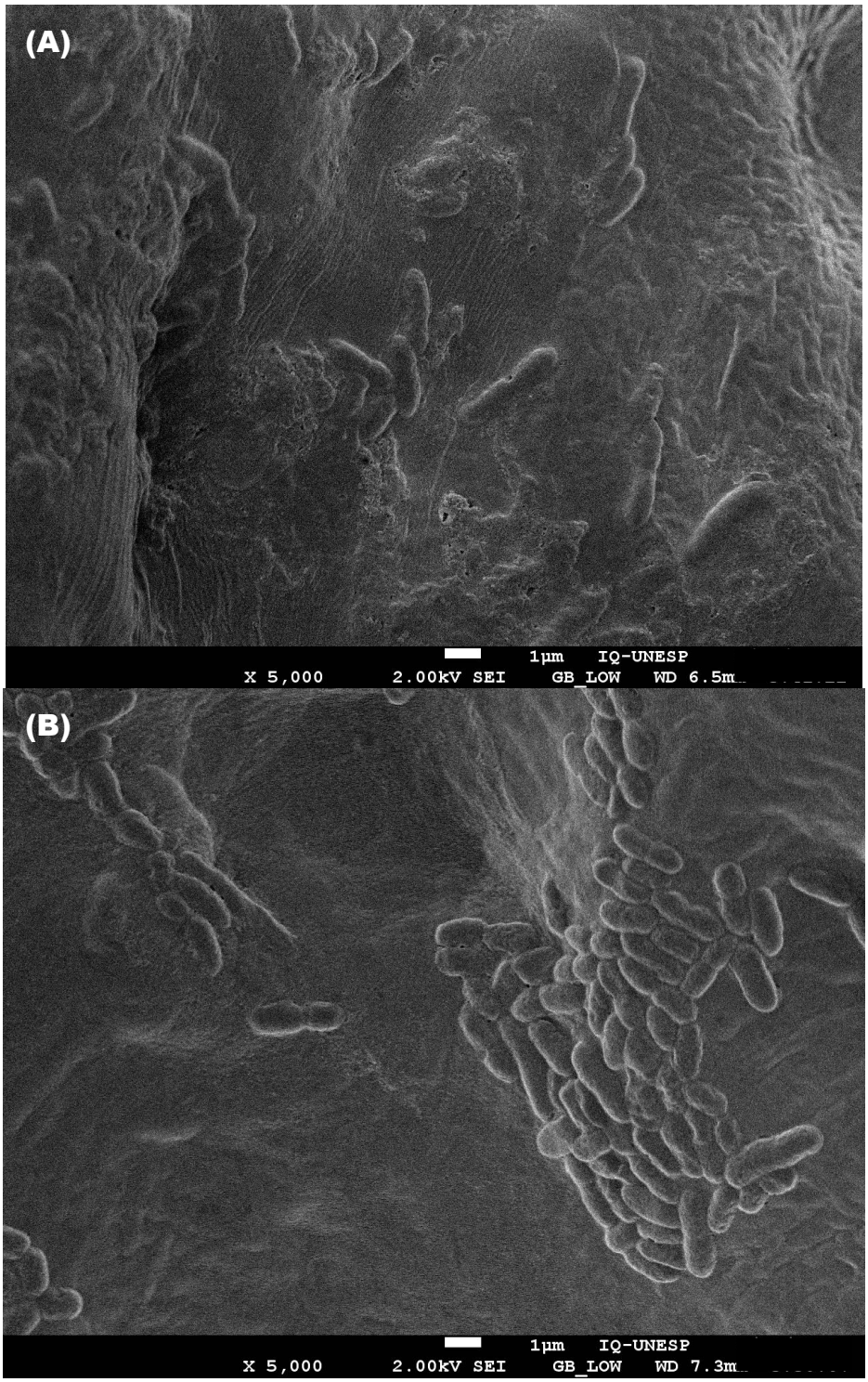
No presente estudo a produtividade de etanol aumentou gradativamente até o quinto ciclo e após manteve-se quase constante, com exceção do ciclo 9. Em acordo com o presente trabalho pode-se citar a pesquisa de Rebros et al. (2005) que realizaram 30 ciclos com células imobilizadas em gel LentiKats da bactéria *Z. mobilis* e após o oitavo ciclo, a produtividade manteve-se constante e sem diferença significativa.

Na pesquisa de Santos e Cruz (2017) utilizaram bucha vegetal e bagaço de cana-de-açúcar como suporte para imobilização da bactéria *Z. mobilis* para produção de etanol. Os autores realizaram 12 ciclos com 24 horas cada ciclo e empregaram as condições de 350 $g.L^{-1}$ de concentração inicial de sacarose, experimento estático, pH 7 e 4, e temperaturas de 40 e 30 ºC utilizando os suportes bucha vegetal e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente. O suporte bagaço de cana-de-açúcar forneceu maiores coeficientes de rendimento comparado com o suporte bucha vegetal. Estes rendimentos com o bagaço de cana-de-açúcar foram semelhantes ao obtidos no presente trabalho.

5.2.3.1. Fotografias de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG)

A Figura 24 mostra as fotografias da análise em MEV-FEG do suporte casca de soja com a bactéria *Z. mobilis* inicialmente imobilizada (A) e após os 12 ciclos fermentativos (B). Na Figura 24A podem-se observar poucas células da bactéria no suporte e na Figura 24B há uma quantidade maior de células em relação à Figura anterior. A bactéria *Z. mobilis* possui afinidade com a casca de soja, porém visivelmente menor que a levedura *S. cerevisiae* (Figura 17). Com o decorrer dos ciclos houve uma variação de desprendimento celular de 0,27 (ciclo 1) e 0,48 $g.L^{-1}$ (ciclo 11).

Figura 24: Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da bactéria *Zymomonas mobilis*.



A: MEV-FEG da casca de soja com imobilização inicial da bactéria *Zymomonas mobilis*. B: MEV-FEG da casca de soja com imobilização da bactéria *Zymomonas mobilis* posterior 12 ciclos de fermentação.

5.3. *Pachysolen tannophilus*

Para a levedura *P. tannophilus* o crescimento celular é facilitado na presença de glicose, fazendo com que a levedura tenha preferência pela glicose quando há a presença de glicose e xilose no meio fermentativo (ZHAO et al., 2010), por isto, nestes experimentos com esta levedura utilizou-se apenas xilose como fonte de carbono; uma vez que será incubada em cofermentação e é necessário que esta levedura assimile apenas a xilose para conversão à etanol, já que, espera-se, que toda a glicose presente no meio fermentativo seja consumida pela levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Z. mobilis* antes da inoculação da levedura *P. tannophilus*.

5.3.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas

A quantidade do consumo de açúcar e do crescimento celular ao fim de cada experimento com células livres e imobilizadas em casca de soja da levedura *P. tannophilus* em todas as condições de temperatura, pH, concentração inicial de açúcar e velocidade de agitação encontram-se na Tabela 12. Nesta Tabela 12 pode-se observar que o maior consumo de açúcar para o experimento com células livres foi de 41,9% e o menor consumo foi de 5,6% e para células imobilizadas o maior consumo foi de 53,4% e o menor consumo foi de 19,4%.

Em todas as condições utilizadas de pH e concentração inicial de açúcar na temperatura de 35 ºC o consumo de açúcar com células livres foi maior em cultivos que tiveram velocidade de agitação e em experimentos estáticos o consumo foi menor. O mesmo pode ser observado em temperatura de 30 ºC, com exceção dos cultivos com concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$ em pH 5,5 e 6,5. Em pouco mais de 80% dos experimentos com células imobilizadas o consumo de açúcar foi maior que os experimentos com células livres, mostrando que a imobilização celular da levedura *P. tannophilus* auxilia no consumo de xilose.

Para o crescimento celular com células livres a velocidade de agitação foi necessária para que houvesse formação de biomassa celular, uma vez que nos cultivos estáticos, apesar de haver consumo da xilose, o crescimento celular foi insignificante, já que o inóculo inicial foi de 0,19 $g.L^{-1}$. O mesmo pode ser observado com células imobilizadas, entretanto houve um crescimento maior se comparado com os experimentos com células livres. O maior crescimento celular obtido com células imobilizadas foi de 5,44 $g.L^{-1}$, valor este 2,1 vezes maior que o maior crescimento celular com células livres que foi de 2,6 $g.L^{-1}$.

Tabela 12: Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus*.

Temperatura (°C)	pH	Concentração de açúcar inicial ($g.L^{-1}$)	Velocidade de agitação (rpm)	Açúcar consumido (%)	Açúcar consumido (%)	Crescimento celular ($g.L^{-1}$)	Crescimento celular ($g.L^{-1}$)
				Livre	Imobilizada	Livre	Imobilizada
30 ºC	4,5	60	Estático	16,2	21,2	0,24	0,63
			100	23,8	25,8	2,08	1,33
			150	41,0	29,3	2,60	3,03
		90	Estático	18,1	32,6	0,22	0,26
			100	41,8	48,5	1,82	1,07
			150	41,3	33,1	2,21	2,51
	5,5	60	Estático	26,8	32,0	0,23	0,80
			100	22,5	32,0	1,94	1,03
			150	33,0	31,6	2,08	2,92
		90	Estático	24,7	33,9	0,22	0,39
			100	31,4	43,6	1,53	0,91
			150	36,5	19,4	1,69	2,38
	6,5	60	Estático	40,9	21,7	0,23	0,84
			100	29,6	39,6	1,56	0,99
			150	36,7	32,1	1,68	4,21
		90	Estático	30,9	49,3	0,22	0,74
			100	32,8	44,9	1,29	2,74
			150	40,0	29,0	1,48	0,86
35 ºC	4,5	60	Estático	8,3	27,9	0,21	1,17
			100	8,8	47,6	1,04	2,86
			150	26,0	37,6	1,84	4,79
		90	Estático	33,3	37,1	0,20	0,40
			100	38,2	45,0	0,78	2,49
			150	35,3	38,1	1,11	4,26
	5,5	60	Estático	5,6	25,0	0,23	0,66
			100	23,0	37,7	1,37	2,67
			150	10,1	27,5	1,96	4,34
		90	Estático	30,0	49,6	0,20	1,74
			100	32,4	39,4	0,91	2,75
			150	41,9	51,2	1,30	4,73
	6,5	60	Estático	17,0	31,0	0,21	1,24
			100	18,5	33,7	1,02	2,75
			150	24,9	37,7	0,96	5,44
		90	Estático	40,0	53,4	0,20	1,30
			100	37,6	39,5	0,70	2,42
			150	40,4	50,9	1,00	4,49

Livre: células livres; Imobilizada: células imobilizadas.

Nas Figuras 25 e 26 estão representadas as produção de etanol com células livres e imobilizadas em casca de soja, respectivamente, da levedura *P. tannophilus* em todas as condições de temperatura, pH, concentração inicial de açúcar e velocidade de agitação.

Pode-se observar que para cultivos com células livres da levedura *P. tannophilus* em todas as condições utilizadas a produção de etanol (Figura 25) foi menor que 2 $g.L^{-1}$. Nos experimentos estáticos em todas as temperaturas, concentração inicial de açúcar e pH não houve produção de etanol, ou este foi próximo a zero, isto pode ter ocorrido, uma vez que leveduras como *P. tannophilus*, *Candida tropicalis*, *Candia shehataea*, *Candita tenuis*, *Candida utilis*, *Pichia stipitis*, *P. segobiensis* entre outras leveduras necessitam de aeração ou oxigenação no meio de cultivo para que estas consigam assimilar a xilose e converte-la a etanol (JEFFRIES, 1981; BRUINENBERG et al., 1984; HARNER et al., 2014). É possível notar uma produção maior, mesmo que pouca, com o aumento de temperatura de 30 para 35 ºC. A produção máxima de etanol com células livres foi de 1,6 $g.L^{-1}$.

A baixa ou falta de produção de etanol a partir de xilose com célula livre da levedura *P. tannophilus* pode ter ocorrido por causa do curto tempo de fermentação do presente trabalho que foi de 15 horas. Por exemplo, no estudo de Zhao, Zhang e Tan (2008) foram necessárias 48 horas de fermentação para produzir um máximo de 2,7 $g.L^{-1}$ de etanol a partir de xilose com esta mesma levedura. Outro exemplo foi no trabalho de Fu e Peiris (2008) o qual houve um pico máximo de produção de etanol (7,31 $g.L^{-1}$) a partir de xilose que ocorreu em 76 horas do processo fermentativo. Também no trabalho de Zhao et al. (2010) obtiveram produção de 3,9 $g.L^{-1}$ de etanol após 48 horas de fermentação e a concentração de xilose foi consumida quase em sua totalidade apenas após 72 horas. Entretanto, sabe-se que, assim como a temperatura e o pH, o etanol também pode ser responsável por causar desnaturação proteica dependendo do tempo de exposição e a concentração desta substância. O etanol também pode ser responsável pelo estresse hídrico e oxidativo causando mudanças conformacionais nas proteínas (SAHARAN; SHARMA, 2011). Diante disto, tempos prolongados de fermentação, com consequente exposição ao etanol, podem causar danos estruturais e enzimáticos no micro-organismo.

Com os experimentos com células imobilizadas foi possível obter produção de etanol em algumas condições de cultivo. Nos experimentos com temperatura de 35 ºC obteve-se maiores produções de etanol quando comparado com experimentos com temperatura de 30 ºC, isto pode ter ocorrido uma vez que temperaturas próximas a 34 ºC facilitam a conversão de xilose a etanol (HARNER et al., 2014). A maior produção de etanol com células

imobilizadas foi de 10,4 $g.L^{-1}$ na temperatura de 35 ºC, pH 4,5, concentração inicial de açúcar de 90 $g.L^{-1}$ e velocidade de agitação de 150 rpm. A produção de etanol com a levedura *P. tannophilus* a partir de xilose só foi possível, no presente trabalho, com a utilização do método de imobilização celular.

Figura 25: Produção de etanol em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura *Pachysolen tannophilus* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).

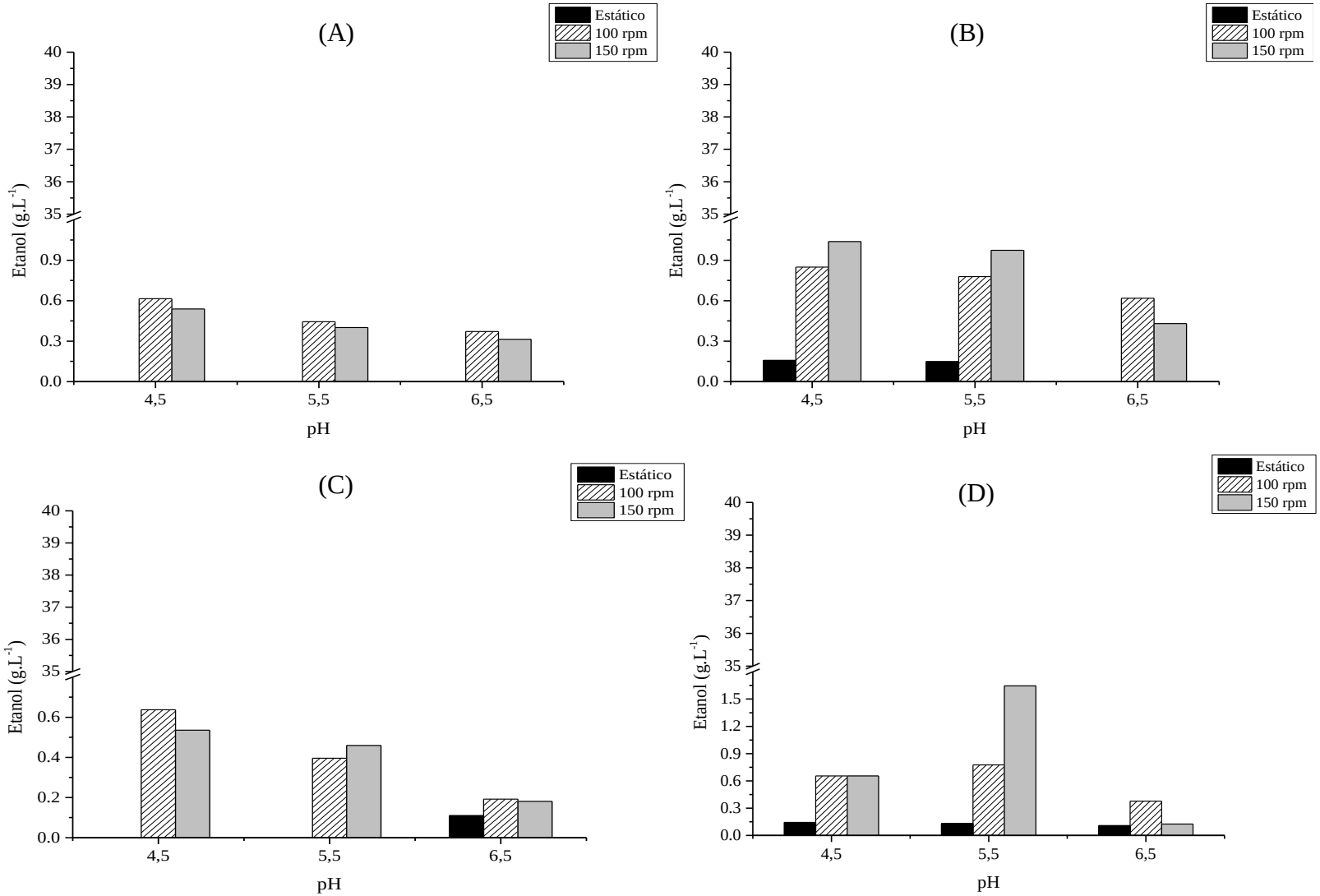
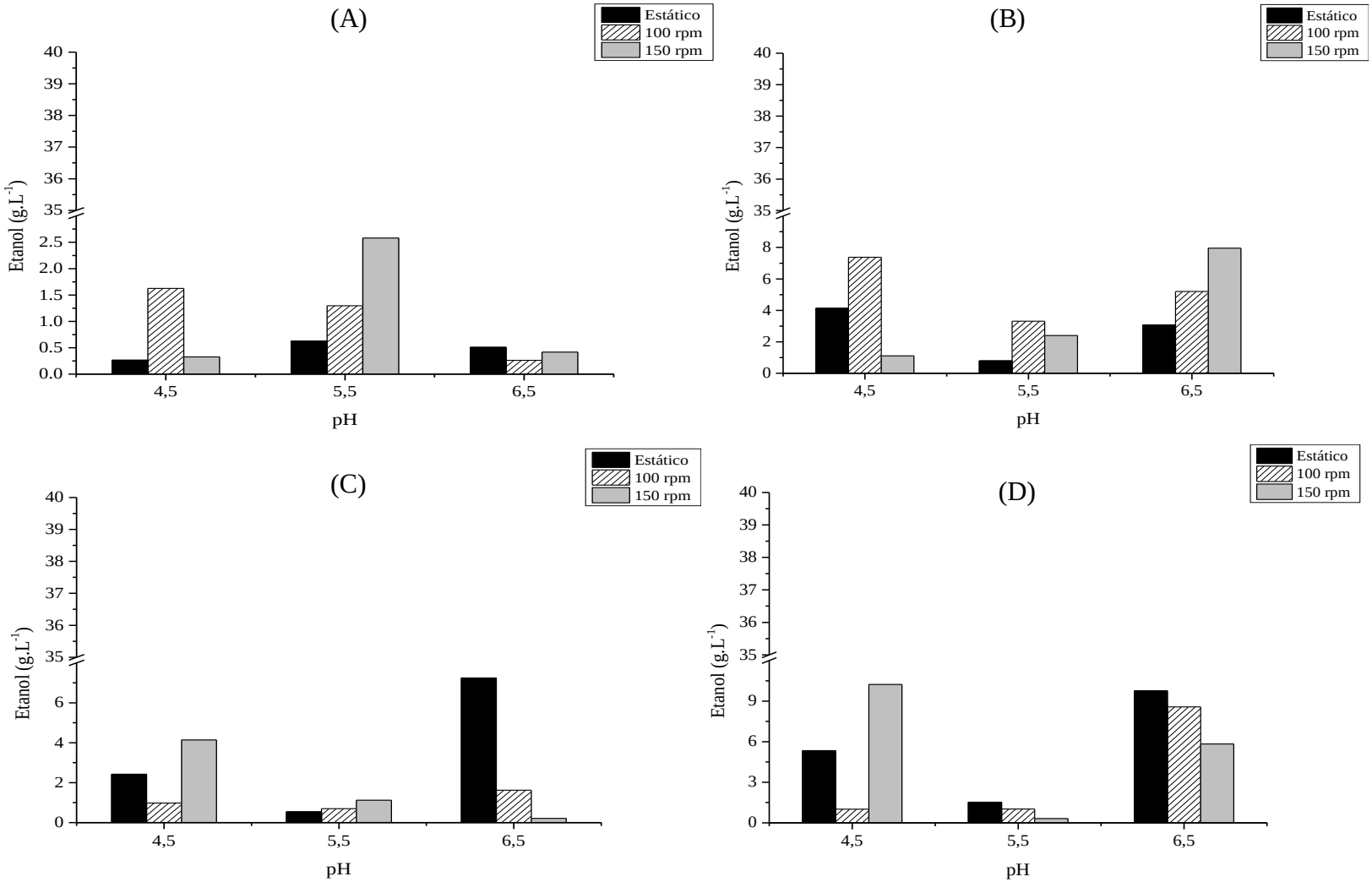


Figura 26: Produção de etanol em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).



As Figuras 27 e 28 mostram o coeficiente de rendimento dos experimentos com células livres e imobilizadas em casca de soja, respectivamente, da levedura *P. tannophilus*. Nos experimentos com células livres (figura 27) apenas dois cultivos, com temperatura de 35 ºC e concentração inicial de açúcar tiveram coeficiente de rendimento de 0,16 $g.g^{-1}$. Nestes dois experimentos um foi com pH 4,5 e velocidade de agitação de 100 rpm e o outro foi em pH 5,5 e 150 rpm. Em todos os outros cultivos o rendimento de etanol foi menor que 0,05 $g.g^{-1}$.

Assim como ocorreu com a produção de etanol, nos experimentos com células imobilizadas em casca de soja da levedura *P. tannophilus* (Figura 28) a temperatura de 30 ºC obteve os valores de coeficiente de rendimento abaixo de 0,14 $g.g^{-1}$, com exceção apenas do experimento com pH 6,5, estático e concentração inicial de açúcar de 0,25 $g.g^{-1}$. Com a temperatura de 35 ºC obteve-se valores de rendimento maior, tendo destaque para o experimento com pH 4,5, velocidade de agitação de 100 rpm e concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$, o qual foi 0,44 $g.g^{-1}$ de rendimento, que corresponde a 86,2% do rendimento teórico. O rendimento adquirido para a maior produção de etanol com células livres foi de 0,30 $g.g^{-1}$.

Figura 27: Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura *Pachysolen tannophilus* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (A), 60 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (B), 90 $g.L^{-1}$ e 30 ºC (C) e 90 $g.L^{-1}$ e 35 ºC (D).

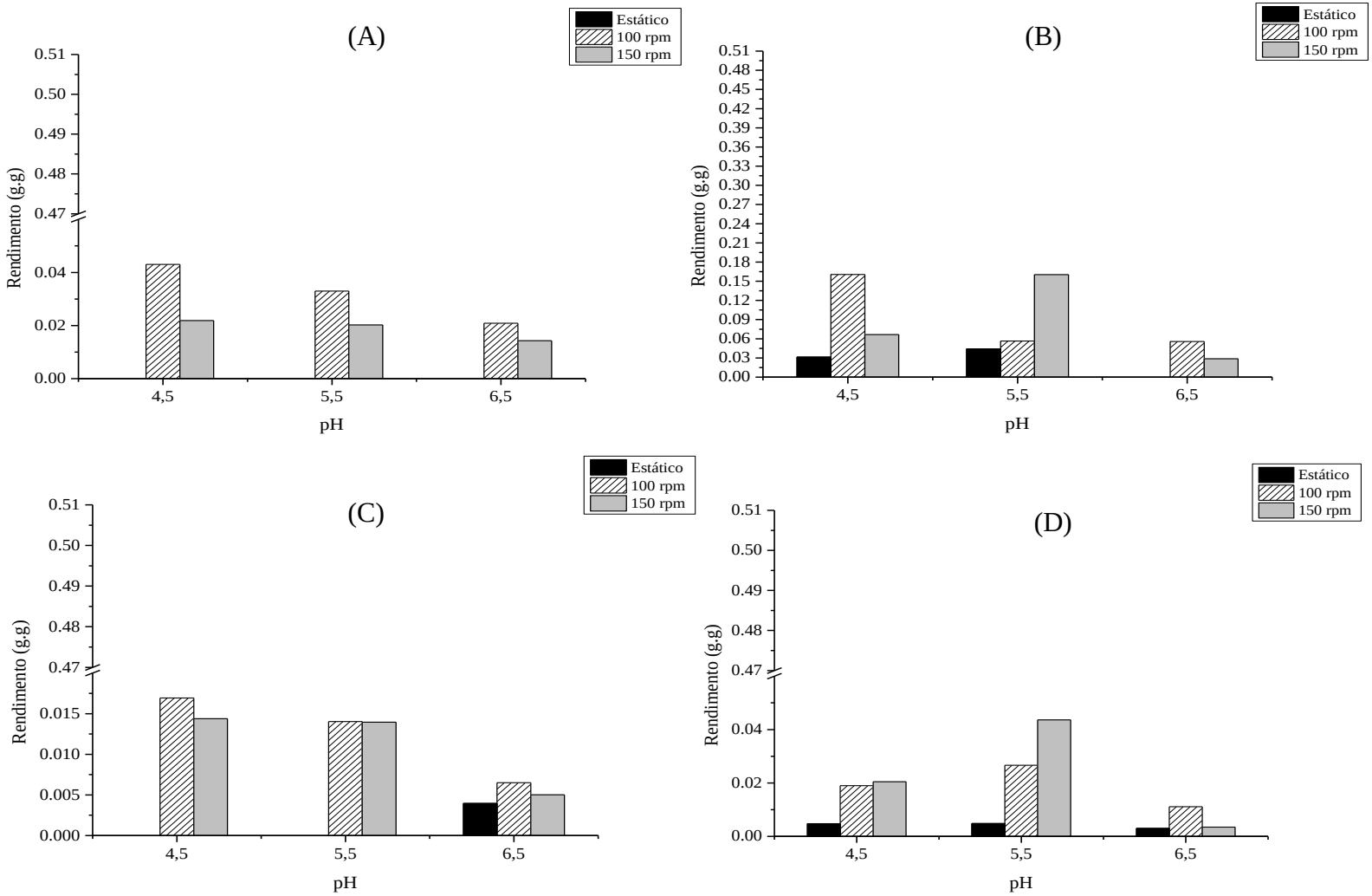
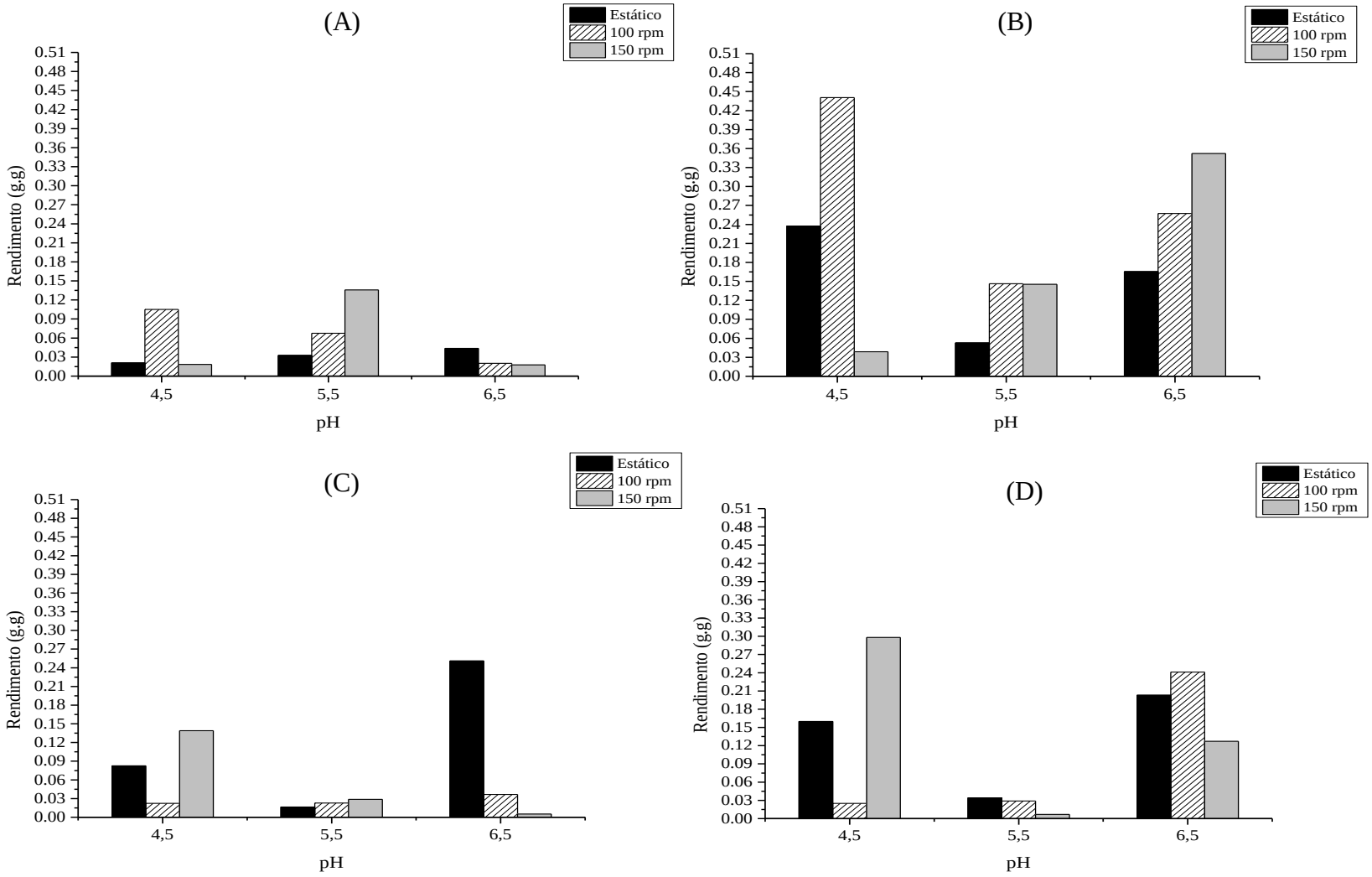


Figura 28: Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus* nas concentrações iniciais de açúcar e temperaturas de 60 g.L^{-1} e 30 ºC (A), 60 g.L^{-1} e 35 ºC (B), 90 g.L^{-1} e 30 ºC (C) e 90 g.L^{-1} e 35 ºC (D).



De acordo com Zhao, Zhang e Tan (2008), que estudaram a produção de etanol a partir de glicose e xilose utilizando células livres da levedura *P. tannophilus*, este micro-organismo possui baixa conversão da xilose a etanol, principalmente pelo fato desta exigir um tempo de adaptação para assimilar a xilose e converter a etanol, contudo é um micro-organismo promissor para produção de etanol de segunda geração, uma vez que é eficaz na conversão de glicose a etanol e posterior consumo da glicose a levedura *P. tannophilus* converte xilose a etanol. Com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se observar que utilizando o método de imobilização celular pode tornar a levedura *P. tannophilus* um micro-organismo mais promissor para produção de etanol principalmente para etanol de segunda geração, o qual possui açúcares de cinco e seis carbonos.

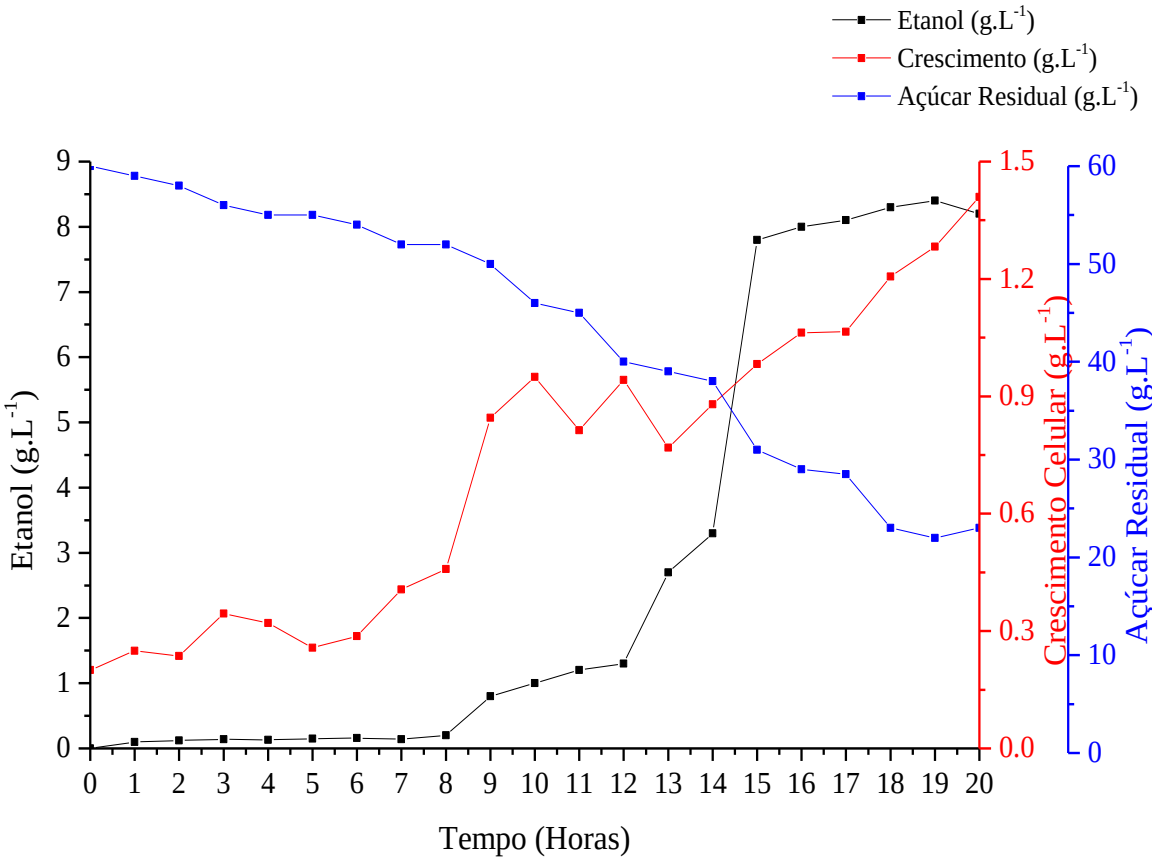
5.3.2. Determinação do Tempo

Posterior experimentos variando condições de temperatura, pH, velocidade de agitação e concentração inicial de açúcar, foi selecionado o maior valor de rendimento comparando-se células livres e imobilizadas para realizar experimentos de reciclo e cofermentação. As condições selecionadas para a levedura *P. tannophilus* foram 35 ºC, velocidade de agitação de 100 rpm, concentração inicial de açúcar de 60 $g.L^{-1}$, pH 4,5 com células imobilizadas. Como pode ser observado nos experimentos anteriores não houve ou teve pequena produção de etanol com os cultivos com células livres, portanto para a levedura *P. tannophilus* foram selecionadas as condições obtidas para as células imobilizadas. Desta maneira para determinar o tempo de produção de etanol foi realizado um cultivo de 20 horas retirando-se alíquotas a cada hora (Figura 29).

Na Figura 29 pode-se observar que houve crescimento celular durante as 20 horas de processo atingindo um máximo de 1,4 $g.L^{-1}$. O consumo de açúcar foi baixo, principalmente nas primeiras horas de cultivo, porém foi diminuindo gradativamente. A produção de etanol começou a aumentar a partir da nona hora de fermentação ocorrendo um pico após 15 horas. Porém a produção máxima (8,4 $g.L^{-1}$) foi em 19 horas, entretanto a produção entre 15 e 20 horas foi praticamente estável. Por isso, foi considerado o tempo de 15 horas para fermentação, uma vez que neste tempo observou-se um maior valor de coeficiente de rendimento (0,19 $g.g^{-1}$). Apesar de haver consumo de xilose durante o período de cultivo, a produção de etanol foi baixa, já que, segundo Zhao, Zhang e Tan (2008) na presença de xilose a produção de biomassa celular é maior em comparação ao experimento contendo glicose como fonte de carbono. Em adição, a via metabólica da xilose tem como produto inicial o

xilitol, e o etanol encontra-se como produto final juntamente da cadeia respiratória e glicerol (HAHN-HAGERDAL et al., 1994), possivelmente ocorreu produção de xilitol e não de etanol.

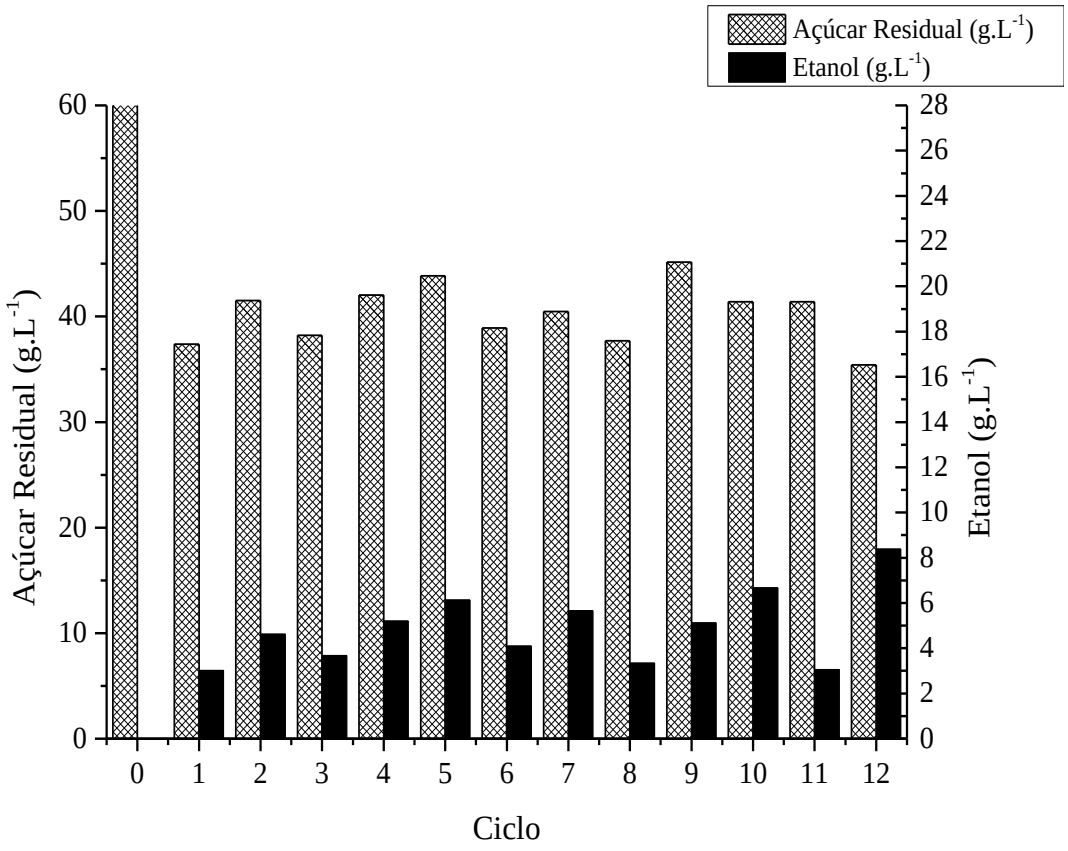
Figura 29: Produção de etanol com células imobilizadas da levedura *Pachysolen tannophilus*.



5.3.3. Reciclo

Assim como ocorreu em todos os cultivos realizados com células imobilizadas da levedura *P. tannophilus* no presente trabalho, a produção de etanol a partir de xilose também foi baixa no reciclo, contudo houve produção de etanol (Figura 30) em todos os ciclos realizados. O maior consumo de etanol foi de 40% no ciclo 12 que também apresentou a maior produção de etanol (8,4 $g.L^{-1}$). Na Figura 30 pode-se observar que houve uma variação na produção de etanol nos ciclos 1 e 12 que foram 3 a 8,4 $g.L^{-1}$, respectivamente. Com o decorrer dos ciclos a variação ocorreu tanto no consumo de açúcar quanto na produção de etanol, sendo que os ciclos 5, 10 e 12 apresentaram produções de etanol acima de 6 $g.L^{-1}$ (Figura 30).

Figura 30: Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus*.



Apesar da maior produção de etanol ter ocorrido no ciclo 12, o ciclo que apresentou maior coeficiente de rendimento (descritos na Tabela 13) foi o ciclo 5 com rendimento de 0,38 $g.g^{-1}$, correspondente a 74,5% do valor teórico. Por outro lado, a maior produtividade (Tabela 13) foi observada no ciclo 12 com 0,56 $g.L.h^{-1}$. O primeiro ciclo apresentou o menor rendimento e produtividade. Como no ciclo 2 houve um aumento em ambos, pode-se dizer que a levedura precisou de um ciclo para se adaptar às condições fornecidas e ter uma maior produção de etanol (Figura 30).

Tabela 13: Coeficiente de rendimento, rendimento teórico e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da levedura *Pachysolen tannophilus*.

Ciclo	**Yp/s ($g.g^{-1}$)**	**Y%T (%)**	**Produtividade ($g.L.h^{-1}$)**
1	0,13	26,2	0,20
2	0,25	49,0	0,31
3	0,17	33,1	0,25
4	0,29	56,8	0,35
5	0,38	74,5	0,41
6	0,19	38,1	0,27
7	0,29	56,8	0,38
8	0,15	29,4	0,22
9	0,34	67,6	0,34
10	0,36	70,2	0,44
11	0,16	32,2	0,20
12	0,34	67,0	0,56

Yp/s: coeficiente de rendimento teórico; $Y_{\%T}$: porcentagem do rendimento teórico.

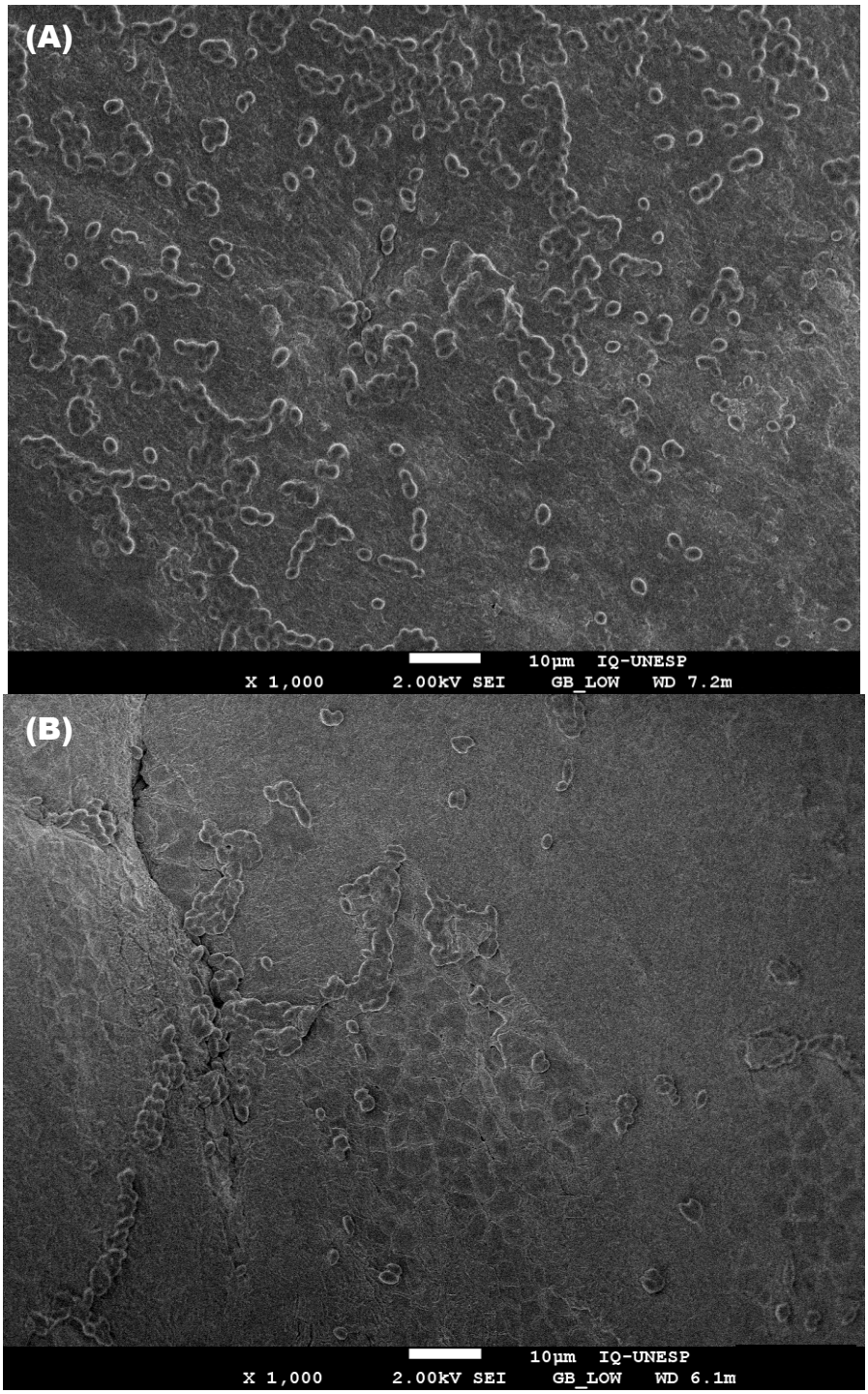
No trabalho de Stepanov e Efremenko (2017) utilizaram a levedura *P. tannophilus* para produção de etanol a partir de glicerol. Como suporte para imobilização os autores empregaram um criogel de álcool polivinilico e obtiveram eficácia na produção de etanol em pelo menos 16 ciclos. Além disso, os autores demonstraram a resistência tanto da levedura quanto da imobilização celular ao realizarem um cultivo contínuo e durante 140 horas. Os autores observaram que tanto no reciclo quanto no processo de 140 horas foi observada uma redução menor que 7% na atividade metabólica (STEPANOV; EFREMENKO 2017).

5.3.3.1. Fotografias da Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG)

Foram realizadas análises de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) a fim de se observar o comportamento e a afinidade da levedura *P. tannophilus* com o suporte de imobilização (casca de soja) antes do primeiro ciclo (Figura 31A) fermentativo e após o último ciclo (Figura 31B). Na figura 31A pode-se observar que ao contrário do ocorrido com a levedura *S. cerevisiae* (Figura 17) e com a bactéria *Z. mobilis* (Figura 24) a levedura *P.*

tannophilus teve uma afinidade inicial com o suporte maior. Contudo, na Figura 31B pode-se observar que ao final de todos os ciclos fermentativos ocorreu um elevado desprendimento celular, que pode indicar baixa afinidade desta levedura com o suporte utilizado com o decorrer dos ciclos. Além disto, observam-se células injuriadas, que não estavam no início dos ciclos. Ocorreu um alto desprendimento celular nos ciclos fermentativos, variando entre 2,2 (ciclo 10) e 4,1 $g.L^{-1}$ (ciclo 3). Possivelmente este desprendimento e a baixa afinidade celular com o suporte pode ter ocorrido devido à velocidade de agitação aplicada durante o processo, o qual não foi aplicado para a bactéria *Z. mobilis* e nem para a levedura *S. cerevisiae*.

Figura 31: Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da levedura *Pachysolen tannophilus*.



A: MEV-FEG da casca de soja com imobilização inicial da levedura *Pachysolen tannophilus*; B: MEV-FEG da casca de soja com imobilização da levedura *Pachysolen tannophilus* posterior 12 ciclos de fermentação.

5.4. Cofermentação

Foram realizadas duas cofermentações, nas quais se alteraram a sequência em que o micro-organismo foi inoculado em meios de cultivo com diferentes concentrações de xilose e glicose. Foi escolhido a cofermentação inoculando um micro-organismo de cada vez, já que desta forma pode-se aplicar as melhores condições para cada micro-organismo. Para a cofermentação os três micro-organismos foram utilizados como células imobilizadas, uma vez que a imobilização celular forneceu maiores valores de coeficiente de rendimento para produção de etanol.

A escolha da variação de xilose de 20 a 40% foi realizada uma vez que, de acordo com Singh, Majumder e Ghosh (2014) a xilose é responsável por 30 a 40% de xilose do total de açúcar fermentescível presente em hidrolisados de material lignocelulósico.

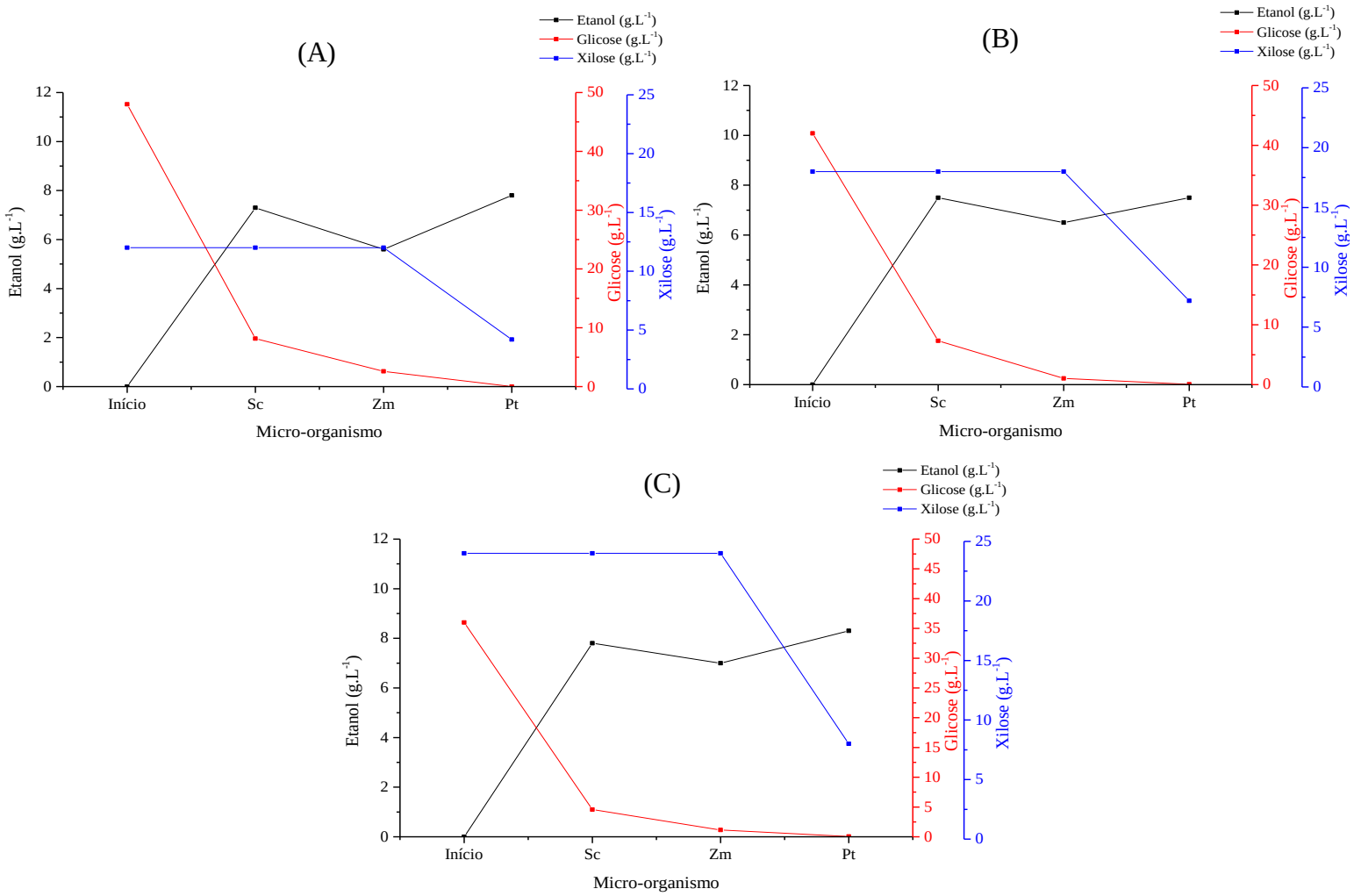
Na cofermentação I a ordem dos micro-organismos foi: *S. cerevisiae*, seguido de *Z.mobilis* e *P. tannophilus* e na cofermentação II foi: *Z.mobilis*, seguido de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus*. Não foi alterada a ordem da levedura *P. tannophilus*, uma vez que esta levedura preferencialmente utiliza a glicose e somente após este açúcar se esgotar é que a xilose é assimilada. Este fato pode ser observado no trabalho de Zhao, Zhang e Tan (2008), os quais utilizaram uma mistura de glicose e xilose para obtenção de etanol e o consumo de xilose só teve início após 12 horas de fermentação, tempo este em que a glicose foi totalmente consumida.

Nas Figuras 32 e 33 estão representadas as cofermentações I e II, respectivamente, nos diferentes meios de cultivo com as diferentes concentrações de xilose e glicose. Na Figura 32 pode-se observar que nos três meios de cultura houve uma redução na produção de etanol quando a bactéria *Z. mobilis* foi inoculada, isto pode ter ocorrido pelo fato de a levedura *S. cerevisiae* consumiu 81,8; 87,2 e 87,3% da glicose presente nos meios A, B e C, respectivamente (Figura 32) restando baixa concentração de açúcar e, segundo os trabalhos de Ernandes (2009), Ferreira (2013) e Ferreira (2017), a bactéria *Z. mobilis* tem preferência por maiores concentrações de açúcar. Após a levedura *P. tannophilus* ser inoculada a produção de etanol foi maior em comparação com a bactéria *Z. mobilis*, porém a produção foi muito próxima à produção com a levedura *S. cerevisiae*.

Ao final dos cultivos com a cofermentação I a glicose foi consumida quase que em sua totalidade. Uma vez que a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Z. mobilis* utilizadas no presente trabalho não são geneticamente modificadas, estas somente consumem glicose, a xilose continuou na mesma concentração inicial, sendo consumida apenas quando a levedura *P.*

tannophilus foi inoculada, porém, como esta levedura só consome xilose na ausência de glicose (FU; PEIRIS, 2008; ZHAO et al., 2010), possivelmente a levedura *P. tannophilus* esgotou o restante de glicose presente no meio e após começou a assimilar a xilose para produção de etanol e biomassa celular. O consumo da xilose na cofermentação I foi de 65, 60 e 66,7% nos meios A, B e C, respectivamente, consumo este maior que com a levedura *P. tannophilus* em cultivo separado com imobilização em casca de soja (Tabela 12).

Figura 32: Glicose residual, xilose residual e produção de etanol da cofermentação I.



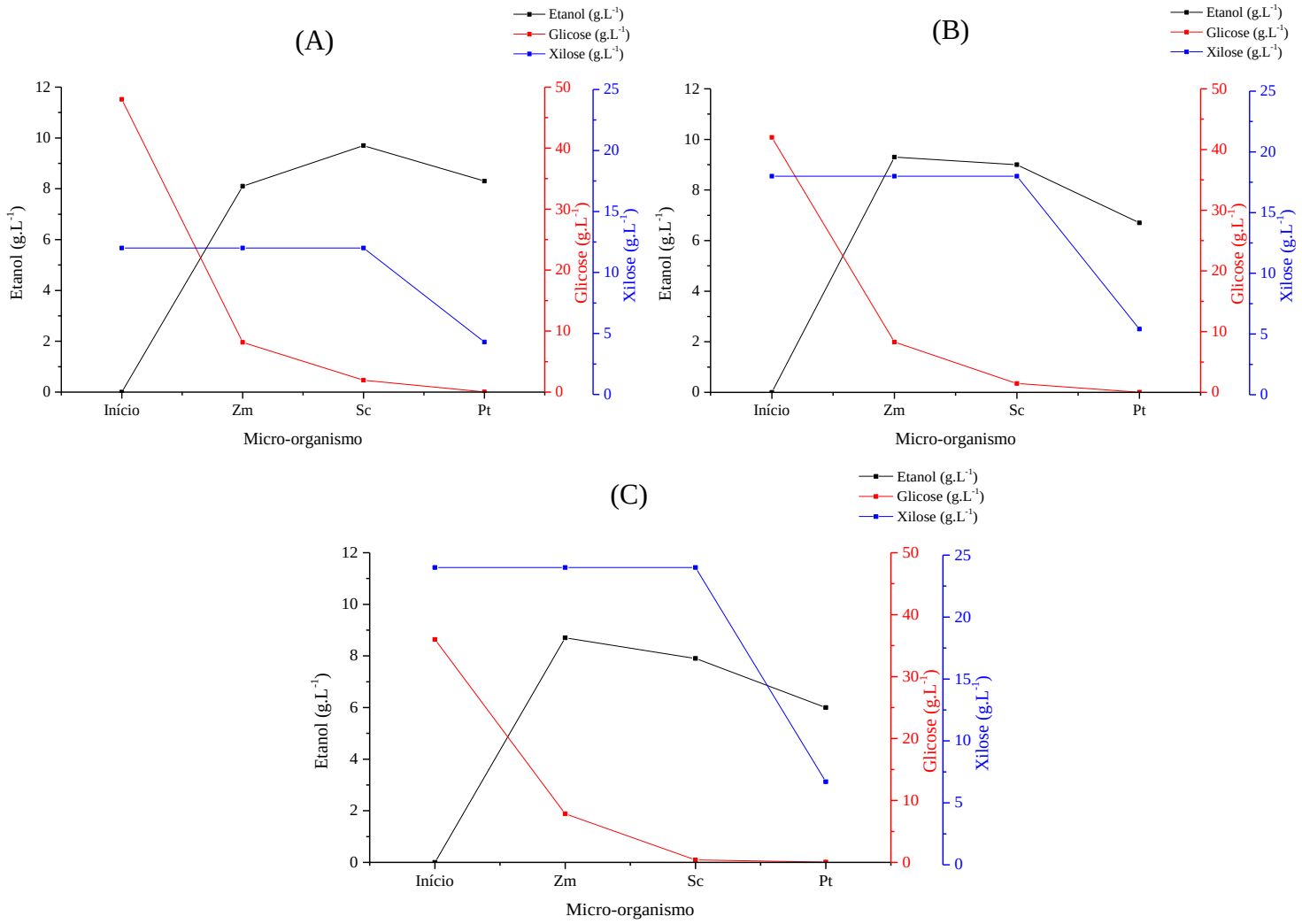
(A): meio com 20% de xilose e 80% de glicose; (B): meio com 30% de xilose e 70% de glicose; (C): meio com 40% de xilose e 60% de glicose; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Zm: *Zymomonas mobilis*; Pt: *Pachysolen tannophilus*.

Na cofermentação II, na qual a bactéria *Z. mobilis* foi o primeiro micro-organismo a ser inoculado. Diferente da cofermentação I (Figura 32), que nos três meios de cultura a cofermentação se comportou de forma semelhante, na cofermentação II (Figura 33) a produção de etanol no meio A foi diferente dos meios B e C. No meio A a concentração de etanol aumentou quando a levedura *S. cerevisiae* foi inoculada e reduziu quando a levedura *P. tannophilus* foi inoculada. Nos meios B e C ocorreu uma queda na produção após a inoculação das duas leveduras.

Ao final dos cultivos nos três meios de cultura a glicose foi consumida quase que por completo assim como ocorreu com a cofermentação I (Figura 32). A xilose foi consumida apenas pela levedura *P. tannophilus* e o consumo na cofermentação II nos meios de cultivo B e C foram maiores que o observado na cofermentação I com os mesmos meios. Esses consumos foram de 70 e 72,1% nos meios B e C, respectivamente. Já para o meio A o consumo na cofermentação II foi semelhante à cofermentação I, ou seja, ocorreu aumento consumo de xilose na presença de maior concentração deste açúcar na cofermentação II.

A possível queda na produção de etanol com a levedura *S. cerevisiae* na cofermentação II pode ser pelo estresse causado nas células desta levedura pelo etanol presente no meio formado pela bactéria *Z. mobilis*, uma vez que o etanol inibe o crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* resultando em redução da produção do mesmo (WINKELHAUSEN et al., 2010). Na cofermentação I a mesma queda pode ser observada, porém inoculando a bactéria *Z. mobilis* após a levedura *S. cerevisiae*, contudo, como esta bactéria possui maior resistência ao etanol se comparado com a levedura *S. cerevisiae* (MA et al., 2016) é possível que a bactéria tenha consumido etanol pela baixa concentração de glicose presente no meio, já que para a bactéria *Z. mobilis* quanto maior a concentração de glicose maior a produção de etanol e menor o crescimento celular ou vice versa (ROGERS; LEE; TRIBE, 1979), já que a produção de etanol não e diretamente proporcional ao crescimento celular (DiMARCO; ROMANO, 1985), o qual foi observado no presente trabalho na cofermentação I (Figura 32), que o crescimento celular foi maior e a produção de etanol foi menor do que na cofermentação II (Figura 33) com a bactéria *Z. mobilis*.

Figura 33: Glicose residual, xilose residual e produção de etanol da cofermentação II.



(A): meio com 20% de xilose e 80% de glicose; (B): meio com 30% de xilose e 70% de glicose; (C): meio com 40% de xilose e 60% de glicose; Zm: *Zymomonas mobilis*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Pt: *Pachysolen tannophilus*.

Na Tabela 14 estão descritos os coeficientes de rendimento e os rendimentos teóricos das cofermentações I e II nos três meios de cultura utilizados. Foi considerado para cálculo do coeficiente de rendimento apenas a produção de etanol final e o consumo final. Assim foi selecionado o maior valor de rendimento para realizar o reciclo da cofermentação.

Na cofermentação I o coeficiente de rendimento foi maior no meio C que continha a maior concentração de xilose e para a cofermentação II foi maior no meio A, meio de cultura com a menor concentração de glicose. É possível observar na Tabela 14 que o rendimento da cofermentação I aumentou de acordo com o aumento da proporção de xilose e para a cofermentação II ocorreu o contrário, na qual o rendimento foi menor em elevada concentração de glicose. Apesar disto os rendimentos obtidos nas duas cofermentações e nos três meios de cultura utilizados foram próximos, contudo baixos quando comparados com o rendimento utilizando os micro-organismos separadamente. O maior valor de coeficiente de rendimento obtido foi na cofermentação I com o meio de cultivo C, o qual continha 40% de xilose e 60% de glicose. Este rendimento foi de 0,19 $g.g^{-1}$ que corresponde a 37,3% do rendimento teórico.

Tabela 14: Coeficiente de rendimento e rendimento teórico das cofermentações I e II.

Meio	Yp/s ($g.g^{-1}$) Cofermentação I	$Y_{\%T}$ (%) Cofermentação I	Yp/s ($g.g^{-1}$) Cofermentação II	$Y_{\%T}$ (%) Cofermentação II
A	0,15	29,4	0,15	29,4
B	0,16	31,4	0,14	27,4
C	0,19	37,3	0,13	25,5

O crescimento celular de cada micro-organismo nas duas cofermentações e nos três meios de cultura estão descritos na Tabela 15. Ao analisar a produção de etanol final (Figura 32) e o crescimento celular (Tabela 15) da levedura *P. tannophilus* na cofermentação I, observa-se que quanto maior a produção de etanol, menor é o crescimento celular, uma vez que no meio de cultivo C a produção de etanol foi de 8,3 $g.L^{-1}$ e o crescimento celular de 1,38 $g.L^{-1}$ e para o meio B a produção de etanol foi de 7,5 $g.L^{-1}$ e o crescimento celular de 1,61 $g.L^{-1}$. O mesmo pode ser observado na cofermentação II, na qual a maior produção de etanol (8,3$g.L^{-1}$) no meio A obteve o menor crescimento celular de 1,47 $g.L^{-1}$ e no meio C, cuja produção de etanol foi menor (6 $g.L^{-1}$), o crescimento celular foi o maior (1,85 $g.L^{-1}$).

Tabela 15: Crescimento celular dos micro-organismos na cofermentação I e II dos três meios de cultura.

	Crescimento Celular ($g.L^{-1}$)		
Meio – Cofermentação	*Saccharomyces cerevisiae*	*Zymomonas mobilis*	*Pachysolen tannophilus*
A – I	1,27	0,97	1,45
B – I	1,49	0,87	1,61
C – I	1,93	0,85	1,38
A – II	1,08	0,49	1,47
B – II	1,30	0,47	1,70
C – II	1,56	0,19	1,85

A-I: cofermentação I meio A (20% de xilose e 80% de glicose); B-I: cofermentação I meio B (30% de xilose e 70% de glicose); C-I: cofermentação I meio C (40% de xilose e 60% de glicose); A-II: cofermentação II meio A (20% de xilose e 80% de glicose); B-I: cofermentação II meio B (30% de xilose e 70% de glicose); C-II: cofermentação II meio C (40% de xilose e 60% de glicose).

Os coeficientes de rendimento das produções de etanol da cofermentação I e II (Tabela 14) foram menores aos obtidos pelos micro-organismos em monocultura. O maior rendimento obtido foi de 0,19 $g.g^{-1}$ na cofermentação I utilizando o meio de cultura C (40% xilose e 60% glicose). Este valor foi igual ao cultivo com a levedura *P. tannophilus* (Figura 29) e inferior aos obtidos pela levedura *S. cerevisiae* (0,44 $g.g^{-1}$ – Figura 15) e bactéria *Z. mobilis* (0,39 $g.g^{-1}$ – Figura 22). Este resultado condiz com o trabalho de Latif e Rajoka (2001), que utilizaram células livres das leveduras *S. cerevisiae* e *Candida tropicalis* em monocultura e cofermentação para produção de etanol empregando hidrolisado de espiga de milho e obtiveram maior rendimento com monocultura em todas as concentrações de açúcares utilizadas.

Contudo no trabalho de Patle e Lal (2008), que utilizaram hidrolisado de Thippi (um complexo de amido, pectina, fibra e proteína) obtiveram maiores rendimentos e produção de etanol empregando cofermentação com células livres da bactéria *Z. mobilis* e da levedura *C. tropicalis* do que utilizando monocultura destes micro-organismos. O mesmo pode ser observado no trabalho de Abate et al. (1996) que produziram etanol a partir de sacarose e a

cofermentação com células livres de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, no qual a cofermentação forneceu maior rendimento de etanol quando comparada com a monocultura. No trabalho de Karagöz e Özkan (2014), a conversão glicose e xilose a etanol foi melhor na cofermentação de células imobilizadas em alginato de cálcio das leveduras *S. cerevisiae* e *Scheffersomyces stipits* do que com a monocultura da *S. cerevisiae*.

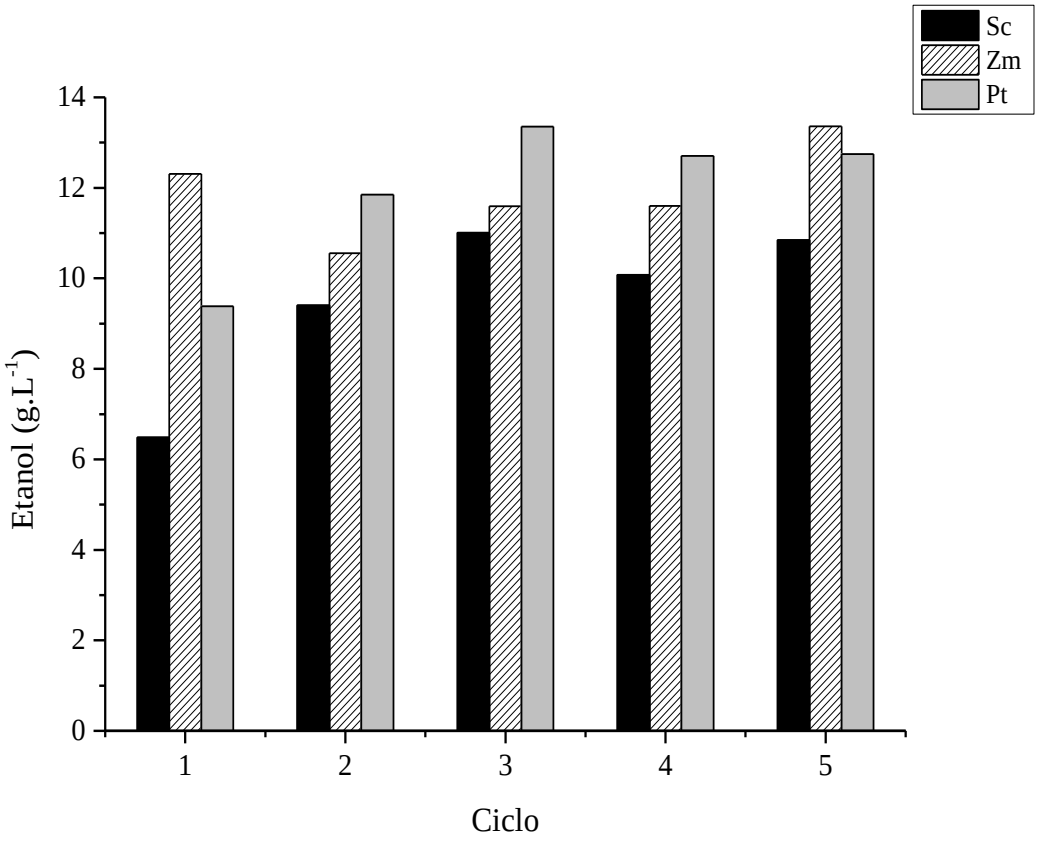
Assim como o presente trabalho, Fu e Peiris (2008) utilizaram uma mistura de glicose e xilose na proporção de 60 e 40%, respectivamente, para produção de etanol com cofermentação com células livres da bactéria *Z. mobilis* seguida da levedura *P. tannophilus*. O experimento foi realizado sem agitação para a bactéria e com aeração para a levedura e para ambos foi empregado temperatura de 30 ºC. De acordo com os autores a cofermentação permitiu um maior rendimento de etanol a partir da xilose, uma vez que a monocultura com a levedura *P. tannophilus* obteve rendimento de 0,15 $g.g^{-1}$ e aumentou para 0,17 $g.g^{-1}$ com a cofermentação. Entretanto a cofermentação forneceu rendimento menor do que a monocultura com a bactéria *Z. mobilis*, o mesmo resultado foi obtido no presente trabalho.

5.4.1. Reciclo da Cofermentação

Para realizar o reciclo da cofermentação foi selecionada a cofermentação e o meio de cultivo utilizado com o maior valor de coeficiente de rendimento. Diante disto escolheu-se a cofermentação I, na qual a sequência de micro-organismo a ser inoculado foi primeiro a levedura *S. cerevisiae*, em seguida a bactéria *Z. mobilis* e por último a levedura *P. tannophilus*, no meio de cultivo C, o qual continha 40% de xilose e 60% de glicose. Foram realizados cinco ciclos de cultivo, já que no reciclo com a levedura *P. tannophilus* o maior rendimento de etanol foi obtido com cinco ciclos.

Na Figura 34 pode-se observar o comportamento de cada micro-organismo nos ciclos da cofermentação. No geral todos os ciclos apresentaram produção de etanol maior que na cofermentação individual. A maior produção final de etanol foi obtida no ciclo 3 com produção de 13,4 $g.L^{-1}$.

Figura 34: Produção de etanol do reciclo da cofermentação.

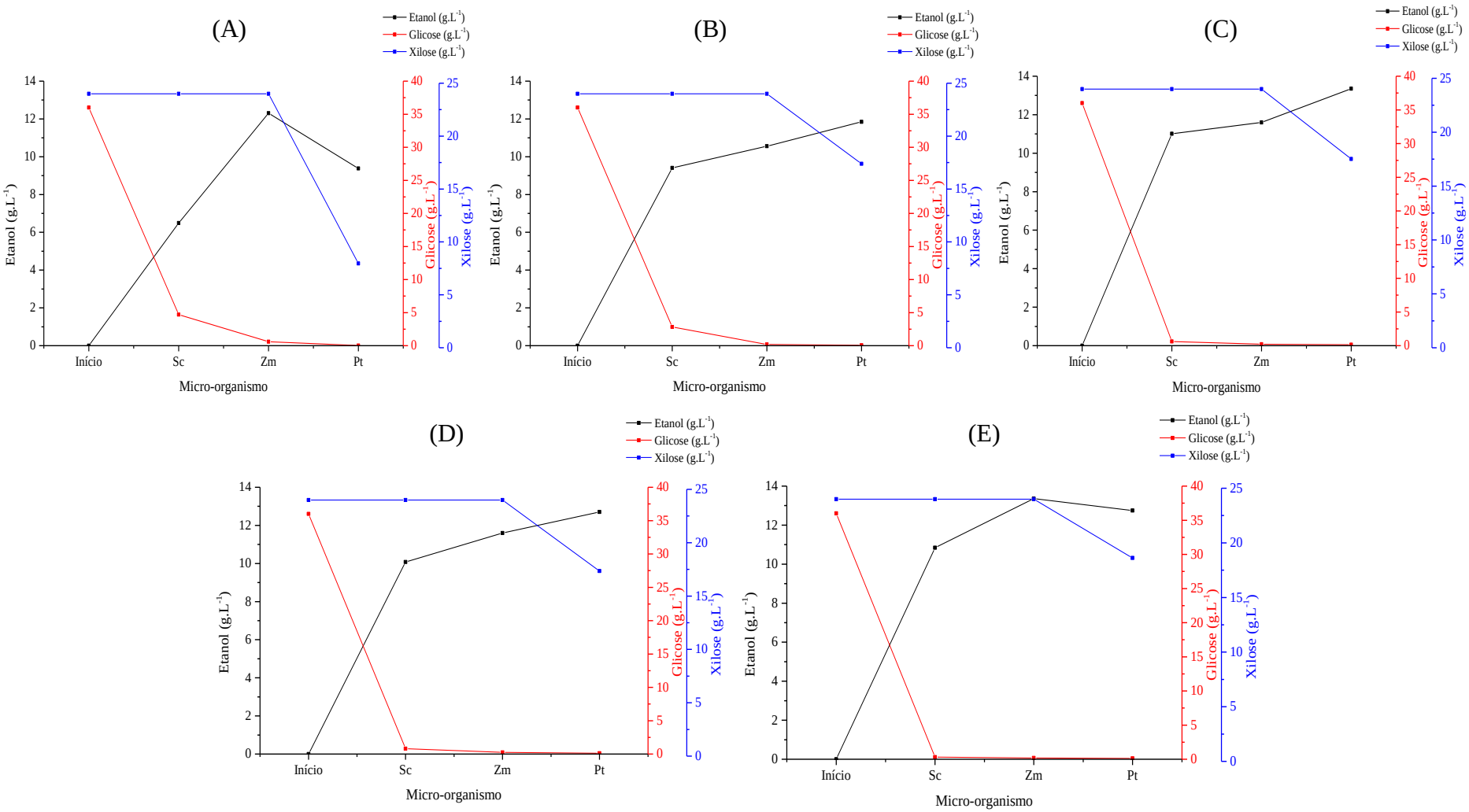


Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Zm: *Zymomonas mobilis*; Pt: *Pachysolen tannophilus*.

Nesta Figura 35 é possível visualizar o comportamento de cada ciclo durante a produção de etanol, bem como a quantidade de glicose e xilose residual. A cada ciclo a quantidade de glicose residual após o cultivo com a levedura *S. cerevisiae* foi reduzindo, assim pode-se observar que a produção de etanol em cultivo com a bactéria *Z. mobilis* foi menor conforme os ciclos, com exceção do ciclo 5.

O consumo de xilose diminuiu conforme cada ciclo. A Figura 36 mostra o desprendimento celular da casca de soja de cada micro-organismo, nota-se que este desprendimento celular foi maior no primeiro ciclo e reduziu gradualmente.

Figura 35: Glicose residual, xilose residual e produção de etanol dos ciclos separados da cofermentação.



Ciclo 1 (A); Ciclo 2 (B); Ciclo 3 (C); Ciclo 4 (D); Ciclo 5 (E); Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Zm: *Zymomonas mobilis*; Pt: *Pachysolen tannophilus*.

Os valores de coeficiente do rendimento, rendimento teórico e produtividade podem ser observados na Tabela 16. Todos estes parâmetros foram calculados de acordo com o valor final de etanol de cada ciclo. Assim como a maior produção de etanol, o ciclo 3 foi o que apresentou maior valor de coeficiente de rendimento (0,31 $g.g^{-1}$) e produtividade (0,53 $g.L.h^{-1}$). Este rendimento correspondeu a 60,9% do rendimento teórico e foi 1,6 vezes maior que o rendimento obtido na cofermentação única, mostrando que o reciclo da cofermentação foi eficaz no aumento do rendimento de produção de etanol.

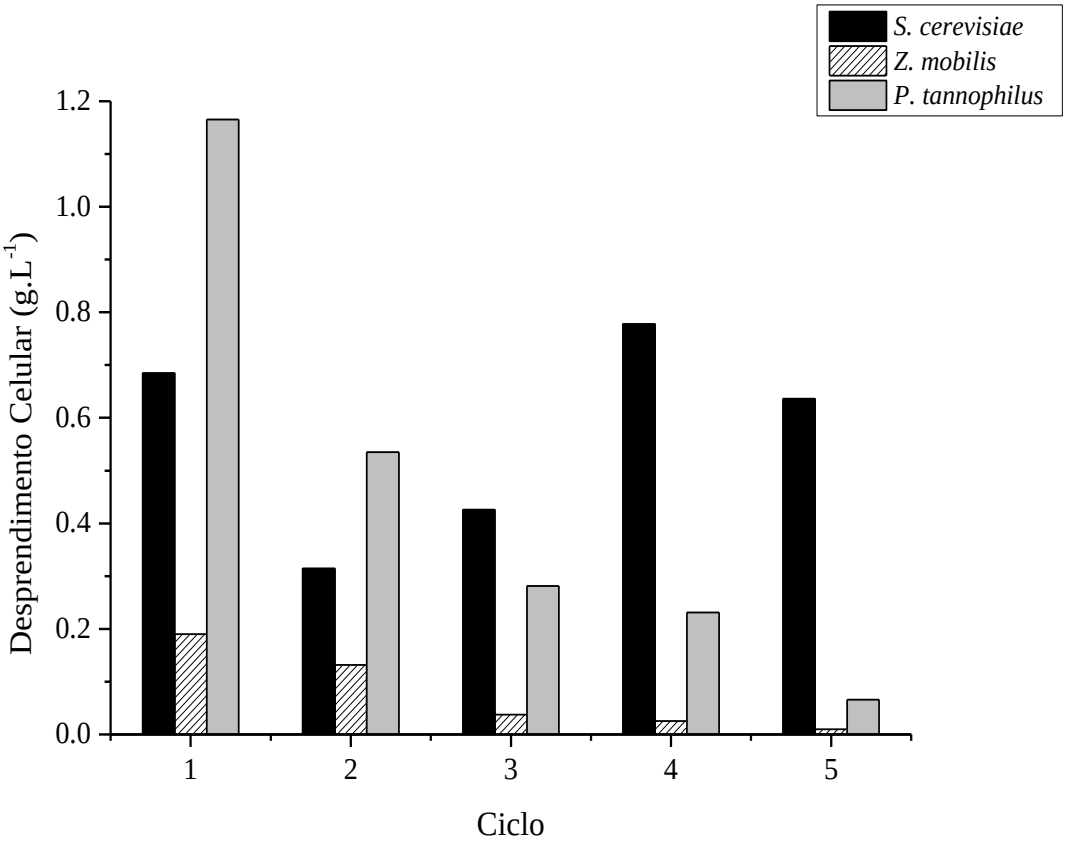
Tabela 16: Coeficiente de rendimento, rendimento teórico e produtividade dos ciclos fermentativos da cofermentação.

Ciclo	Yp/s ($g.g^{-1}$)	T%T (%)	Produtividade ($g.L.h^{-1}$)
1	0,18	35,1	0,38
2	0,28	54,0	0,47
3	0,31	60,9	0,53
4	0,29	57,8	0,51
5	0,30	59,7	0,51

Uma vez que o reciclo das células imobilizadas foi o experimento em que se utilizou a mesma célula imobilizada, foi quantificado apenas o desprendimento celular de cada micro-organismo. O desprendimento celular de cada ciclo da cofermentação pode ser observado na Figura 36. A levedura *P. tannophilus* e a bactéria *Z. mobilis* tiveram comportamento semelhante em relação ao desprendimento celular. Este desprendimento diminuiu gradativamente com o passar de cada ciclo, contudo com a levedura foi observado um maior que o desprendimento da bactéria. Já para a levedura *S. cerevisiae* o desprendimento foi semelhante nos ciclos 1, 4 e 5, sendo o ciclo 4 com maior desprendimento, e o ciclo 2 e 3 apresentaram desprendimentos menores. O ciclo 2 foi o que apresentou o menor desprendimento celular.

O desprendimento celular comumente ocorre na imobilização por ligação a superfície, técnica empregada no presente trabalho, já que as células dos micro-organismos ligam-se ao suporte por ligação covalente ou forças eletrostáticas e, quando estas ligações são rompidas, ocorre o desprendimento celular, uma vez que não existir nenhum tipo de barreira para que pudesse ocorrer um equilíbrio entre as células adsorvidas no suporte e as que foram desprendidas (SINGH et al., 2013).

Figura 36: Desprendimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da bactéria *Zymomonas mobilis* e da levedura *Pachysolen tannophilus* em cada ciclo do reciclo da cofermentação.



No presente trabalho a produção de etanol no reciclo da cofermentação foi melhor no ciclo 3, assim como o rendimento e a produtividade, contudo a produção de etanol no decorrer dos ciclos teve pouca variação (de 9,4 a 13,2 $g.L^{-1}$ de etanol). No estudo de Beniwal et al. (2018) o mesmo comportamento foi observado, no qual os autores obtiveram maior produção de etanol nos três primeiros ciclos da sacarificação e fermentação simultânea do hidrolisado de soro de leite, utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio da levedura *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, no qual a produção de etanol foi menor no quarto e no último ciclo..

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou resultados promissores para produção de etanol de segunda geração utilizando células imobilizadas em casca de soja e o reciclo da cofermentação com os três micro-organismos imobilizados em casca de soja.

A maior produção e o maior coeficiente de rendimento dos três micro-organismos utilizados em monocultura com tempo fixo de 15 horas ocorreram utilizando células imobilizadas. Para a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Z. mobilis* a imobilização celular forneceu um aumentou tanto na produção quanto no coeficiente de rendimento de etanol, e para a levedura *P. tannophilus* a imobilização celular foi necessária para obtenção de uma maior produção de etanol a partir de xilose em comparação com os experimentos com células livres.

O reciclo realizado com a bactéria *Z. mobilis* proporcionou um aumento no rendimento em comparação com o maior rendimento obtido no experimento com tempo fixo de 15 horas e o obtido no experimento da determinação do tempo de fermentação. Para a levedura *P. tannophilus* com o reciclo celular foi possível aumentar o coeficiente de rendimento quando comparado com o experimento da determinação do tempo.

Com as micrografias tiradas na análise de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) foi observada a afinidade da levedura *S. cerevisiae* e da bactéria *Z. mobilis* com a casca de soja, suporte utilizado para imobilização celular. Para a levedura *P. tannophilus* a afinidade foi menor que os outros dois micro-organismos utilizados no trabalho.

Foram obtidos coeficientes de rendimento próximos para as duas cofermentações e nos três meios de fermentação com diferentes concentrações de glicose e xilose utilizadas, portanto a alteração da ordem de inoculação da *S. cerevisiae* e da *Z. mobilis* não influenciaram na produção de etanol pela cofermentação. A utilização do reciclo para a cofermentação promoveu aumento no rendimento de etanol no terceiro ciclo.

REFERÊNCIAS

ABATE, C.; CALLIERI, D.; RODRÍGUEZ, E.; GARRO, O. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 580-583, 1996.

AITA, C.; GIACOMINI, S. J. Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura de solo solteiras e consorciadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 601-612, 2003.

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

ARAÚJO, R. P. C.; RAMALHO, L. M. P.; ARAÚJO, M. T. B.; ALMEIDA, J. C. S. Determinação do consumo de glicose "*in vitro*" pelos micro-organismos presentes na saliva total de humanos. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 21, p. 71-83, 1994.

ARIYAJAROENWONG, P.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. Capability of sweet sorghum stalks as supporting materials for yeast immobilization to produce ethanol under various fermentation processes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers,** v. 49, p. 79-84, 2015.

AZEVEDO, V. Q. **Caracterização e rendimento de hidrólise e fermentação de biomassa orundo, palha e casca de arroz**. 2015. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

BALAGURUNATHAN, B.; TAN, L.; ZHAO, H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for acetaldehyde overproduction using pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 58-65, 2018.

BARATTI, J. C.; BU'LOCK, J. D. *Zymomonas mobilis*: a bacterium for ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 4, p. 95-115, 1986.

BAUER, A. W.; KIRBY, V. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

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

BENINI, K.C.C.C. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos poliméricos reforçados com fibras lignocelulósicas: HIPS/fibras da casca de coco verde e bagaço de cana de açúcar.** 2011. 124f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2011.

BENIWAL, A.; SAINI, P.; KOKKILIGADDA, A.; VIJ, S. Metabolic engineering of Escherichia coli for acetaldehyde overproduction using pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 87, p. 553-561, 2018.

BONASSA, G.; SCHNEIDER, L. T.; CREMONEZ, P. A.; OLIVEIRA, C. J.; TELEKEN,J. G.; FRIGO, E. P. Optimization of first generation alcoholic fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 31, n. 3, p. 313-320, 2015.

BRAVO, R. V.; CAMACHO, R. F.; SÁNCHEZ, V. S.; CASTRO,V. M. The influence of the inicial concentrations of glucose and yeast extract on the ethanolic fermentation by *Pachysolen tannophilus*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 55, p. 854-866, 1990.

BRAVO, V.; CAMACHO, F.; SÁNCHEZ, S.; CASTRO, E. Influence of the concentrations of D-xylose and yeast extract on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 566-571, 1995.

BRUINENBERG, P. M.; BOT, P. H. M.; DIJEKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 256-260, 1984.

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

CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4675-4683, 2011.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova,** v. 33, p. 181-188, 2010.

CAZETTA, M. L.; CLLIGOI, 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.

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. Comparasion of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1381-1285, 2009.

COIMBRA, M. C. **Produção de etanol utilizando cascas de banana e laranja por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis*.** 2015. 125p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2015.

COIMBRA, M. C.; DUQUE, A.; SAÉZ, F.; MANZANARES, P.; GARCIA-CRUZ, C. H.; BALLESTEROS, M. Sugar production from wheat straw biomass by alkaline extrusion and enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 86, p. 1060-1068, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Cana-de-açúcar. **Acompanhamento da Safra Brasileira**, v. 4, p. 1-81, 2017.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Immobilization of microbial cells and their biotechnology applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas,** v. 28, p. 143-160, 2007.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food Biotechnology**, v.14, p.79-97, 2000.

CUNHA, A. A.; SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J. C. Use of PVA-gel immobilized cells: a new strategy for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse hidrolysate. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, p. 61-70, 2005.

DAGNINO, E. P.; CHAMORRO, E. R.; ROMANO, S. D.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of Rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Croops and Products**, v. 42, p. 363-368, 2013.

DAVIS, L.; ROGERS, P.; PEARCE, J.; PEIRIS, P. Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 809-814, 2006.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R. M.; BONOMI, A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy,** v. 43, p. 246 - 252, 2012.

DiMARCO, A. A.; ROMANO, A. H. D-Glucose Transport System of *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 151-157, 1985.

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

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidade e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova,** v. 32, p. 623-638, 2009.

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

FERREIRA, J. **Produção de bioetanol utilizando cascas de banana, maracujá e coco verde por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus***. 2017. 117 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2017.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

FU, N.; PEIRIS, P. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1091-1097, 2008.

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

GENISHEVA, Z.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. Evaluation the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 979-985, 2011.

GEORGES, F. **Caracterização da palha de cana-de-açúcar do Rio Grande do Sul e de seus produtos de pirólise**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

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

GIRISUTA, B.; DUSSAN K.; HAVERTY, D.; LEAHY, J. J.; HAYES, M. H. B. A kinetic study of acid catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to levulinic acid. **Chemical Engineering Journal**, v. 217, p. 61-70, 2013.

GÖKGÖZ, M.; YIGTOGLU, M. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to modified carboxymethylcellulose for production of ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 849-857, 2011.

GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; PEREIRA, F. B.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Plasmid-mediate transfer of *FLO1* into industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain creates a strain useful for repeat-batch fermentations involving flocculation-sedimentation. **Bioresourse Technology**, v. 108, p. 162-168, 2012.

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.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 993-943, 1994.

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

HAVERTY, D.; DUSSAN, K.; PITERINA, A. V.; LEAHY, J. J.; HAYES, M. H. B. Autothermal, single-stage, pergormic acid pretreatment of Miscanthus *x* giganteus for the rapid fractionation of its biomass components into a lignin/hemicelluloses-rich liquor and a cellulose-digestible pulp. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 173-177, 2012.

HICKERT, L. R.; SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation of um-detoxifed Rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 112-116, 2013.

JEFFRIES, T. W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, v. 3, p. 213-218, 1981.

JUNG, S. J.; KIN, S. H.; CHUNG, I. M. Comparison of lignin, cellulose, and hemicelluloses contents for biofuels utilization among 4 types of lignocellulosic crops. **Biomass and Bioenergy,** v. 83, p. 322-327, 2015.

KARAGÖZ, P.; ÖZKAN, M. Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 286-293, 2014.

KASAVI, C.; FINORE, I.; LAMA, L.; NICOLAUS, B.; OLIVER, S. G.; ONER, E. T.; KIRDAR, B. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 230-238, 2012.

KAUR, H. R. P. Fermentation of wheat straw hydrolyzate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*: a comparison of batch and continuous culture systems. **Biological Wastes**, v. 30, p. 301-308, 1989.

KEATING, J. D.; ROBINSON, J.; COTTA, M. A.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D. An ethanologenic yeast exhibiting unusual metabolism in the fermentation of lignocellulosic hexose sugars. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** v. 31, p. 235-244, 2004.

KIRDPONPATTARA, S.; PHISALAPHONG, M. Bacterial cellulose-alginate composite sponge as a yeast cell carrier for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal,** v. 77, p. 103-109, 2013.

KO, J. K.; UM, Y.; WOO, H. M.; KIM, K. H.; LEE, S. M. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. **Bioresource Technology,** v. 209, p. 290-296, 2016.

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.377-397, 2004.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 57-63, 2001.

LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 3, p. 291-296, 1981.

MA, K.; RUAN, Z.; SHUI, Z.; WANG, Y.; HU, G.; HE, M. Open fermentative production of fuel ethanol from food waste by an acid-tolerant mutant strain of *Zymomonas mobilis*. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 295-302, 2016.

MAJIDAN, P.; TABATABAEI, M.; ZEINOLABEDINI, M.; NAGHSHBANDI, M. P.; CHISTI, Y. Metabolic engineering of microorganisms for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 3863-3885, 2018.

MARX, S.; NDABA, B.; CHIYANZU, I.; SCHABORT C. Fuel ethanol production from sweet sorghum bagasse using microwave irradiation. **Biomass and Bioenergy**, v. 65, p. 145-150, 2014.

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

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; SHARMA, S.; BAGAI, R.; MATHUR, A. S.; GUPTA, R. P.; TULI, D. K. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. **Renewable Energy**, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.010.

MOREIRA, L. R. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos**. 2013. 297f. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 28, p. 34-39, 2002.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 286-274, 2006.

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

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

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

PACHECO, A. M.; GONDIM, D. R.; GONÇALVES, L. R. B. Ethanol Production by Fermentation Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in Cashew Apple Bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 209-217, 2010.

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

POÇAS, E. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; CAMILIOS NETO, D. Application of Loofa Sponge (*Luffa cylindrica*) as Carrier for Invertase Immobilization for Invert Sugar Syrup Production. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 53-58, 2004.

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

RAMBO, M. K. D. **Caracterização de resíduos lignocelulósicos por espectroscopia NIR aliada à quimiometria para a obtenção de insumos químicos**. 2013. 182f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

RESBROS, M.; ROSENBERG, M.; SLOUKAL, R.; KRISTOFÍKOVÁ, L. High efficiency ethanol fermentation by entrapment of *Zymomonas mobilis* into LentiKats®. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 412-416, 2005.

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.

ROGERS, P. L.; LEE, . J.; TRIBE, D. E. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 1, p. 165-170, 1979.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, v. 32, p. 117-156, 2009.

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

SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, N. B.; GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e agitação. Revista **Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 75-80, 2010.

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

SANTOS, V. A. Q. **Avaliação de suportes para imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 visando à produção de etanol e levana**. 2013. 116f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

SANTOS, L. D.; SOUZA, M. B.; GUIDINI, C. Z.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1725-1729, 2015.

SANTOS, V. A. Q.; CRUZ, C. H. G. *Zymomonas mobilis* immobilized on loofa sponge and sugarcane bagasse for levan and ethanol production using repeated batch fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, p. 407-418, 2017.

SARROUH, B. F. **Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leito fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e células imobilizadas: avaliação de parâmetros operacionais e viabilidade econômica**. 2009. 185f. Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SATHESH-PRABU, C. MURUGESAN, A. G. Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2788-2792, 2011.

SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v. 50, p. 488-493, 2013.

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

SKOTINICKI, M. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. Comparison of Ethanol Production by Different *Zymomonas* Strains. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 41, p. 889-893, 1981.

SLININGER, P. J.; BOLEN, P. L.; KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 5-15, 1987.

SMILEY, K. L.; BOLEN, P. L. Demonstration of D-xylose Redutase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 4, p. 607-610, 1982.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1-18, 2011.

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

SOUTO, F.; CALADO, V.; PEREIRA JUNIOR, N. Carbon fiber from lignin: a literature review. **Revista Matéria**, v. 20, p. 100-114, 2015.

SPENCER-MARTINS, I. Transport of sugars in yeast: implications in the fermentations of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 51-57, 1994.

STEPANOV, N.; EFREMENKO, E. Immobilised cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol. **New Biotechnology**, v. 34, p. 54-58, 2017.

TESFAW, A.; ASSEFA, F.. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. **International Scholary Research Notices**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

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

VÉLEZ, H. A. V. **Estudo do ultrassom de potência no pré-tratamento do material lignocelulósico de resíduos da bananeira**. 2015. 108p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2015.

WILLAERT, R; BARON, G. V. Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 12, p. 5-205. 1996.

WILLAERT, R. **Cell immobilization and its applications in biotechnology: current trends na future prospects**. In_____ Fermentation Microbiology and Biotechnology. Ed. Taylor & Francis, p. 287-362, 2007.

WINKELHAUSEN, E.; VELIEKOVA, E.; AMARTEY, S. A.; KUZMANOVA, S. Ethanol Production Using Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in Lyophilized Cellulose Gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2214-2220, 2010.

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

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

YUVADETKUN, P.; REUNGSANG, A.; BOONMEE, M. Comparison between free cells and immobilized cells of *Candida shehatae* in ethanol production from rice straw hydrolysate using repeated batch cultivation. **Renewable Energy**, v. 115, p. 634-640, 2018.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Enzimas imobilizadas**. In_____ Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. SAID S. E PIETRO R.C. Ed Legis Summa, p. 35-86, 2004.

ZHANG, L.; LANG, Y.; WANG, C.; NAGATA, S. Promoting effect of compatible solute ectoine on the ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* CICC10232. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 642-646, 2008.

ZHANG, B.; SUN, H.; LI, J.; WAN, Y.; LI, Y.; ZHANG, Y. High-titer-ethanol production from cellulosic hydrolysate by anengineered strain of *Saccharomyces cerevisiae* during an in situ removalprocess reducing the inhibition of ethanol on xylose metabolism. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 967-972, 2016.

ZHAO, L.; ZHANG, X.; TAN, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1156-1161, 2008.

ZHAO, L.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. The ethanol tolerance of *Pachysolen tannophilus* in fermentation on xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 378-385, 2010.

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

ZIKELI, F.; TERS, T.; FACKLER, K.; SREBOTNIK, E. LI, J. Wheat straw lignin fraction and characterization as lignin-carbohydrate complexes**. Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 309-317, 2016**.**

ZIMBARDI, A. L. R. L. **Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica**. 2014. 203f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

APÊNDICES

Apêndice A – Halo de inibição para resistência ao etanol em diferentes concentrações das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pachysolen tannophilus* e da bactéria *Zymomonas mobilis.*

Concentração da solução de etanol %(v/v)	***S. cerevisiae***	***Z. mobilis***	***P. tannophilus***
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-

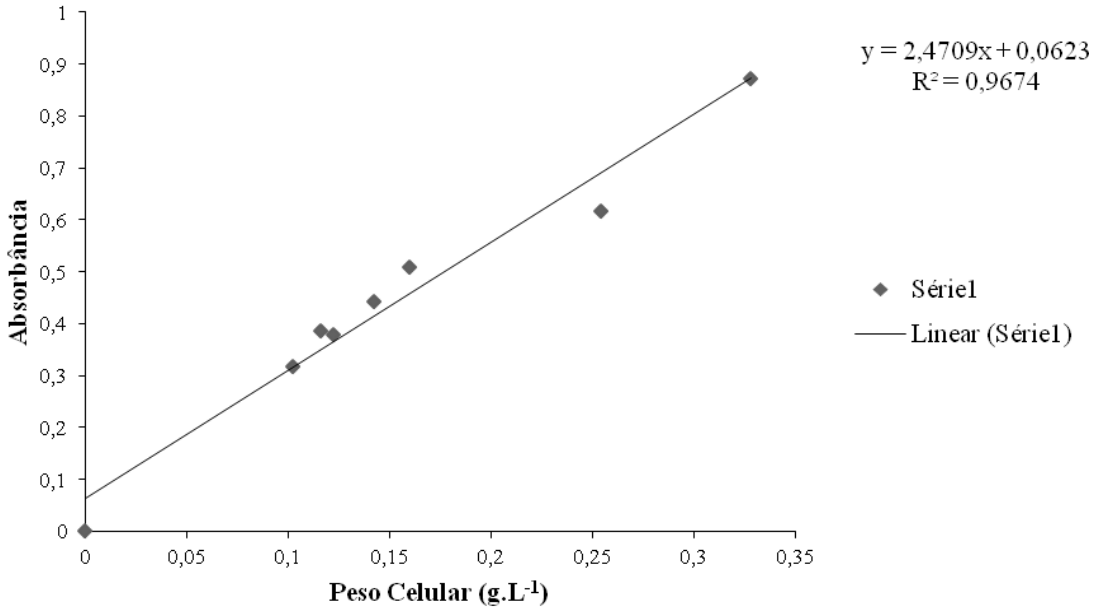
-: sem formação de halo.

Como pode ser observado não houve formação de halo de inibição em nenhum dos experimentos, isto indica que os três micro-organismos são resistentes ao etanol em soluções com até 10% (v/v), o qual corresponde a aproximadamente 79 $g.L^{-1}$ de etanol. Com estes resultados pode-se garantir que na aplicação da cofermentação nenhum micro-organismo será inibido pela produção de etanol do micro-organismo anterior, uma vez que serão inoculados sequencialmente para garantir a utilização completa dos açúcares adicionados. A produção máxima teórica do presente trabalho é de 46 $g.L^{-1}$ ou aproximadamente 6% (v/v) de etanol, produção esta que não a causará inibição da bactéria *Z. mobilis* nem das leveduras *S. cerevisiae* e *P. tannophilus.*

Apêndice B – Concentração celular (g) e absorbância para construção da curva padrão de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Célula (g)	Absorbância
0,102	0,318
0,122	0,379
0,116	0,387
0,142	0,442
0,160	0,508
0,254	0,617
0,328	0,872

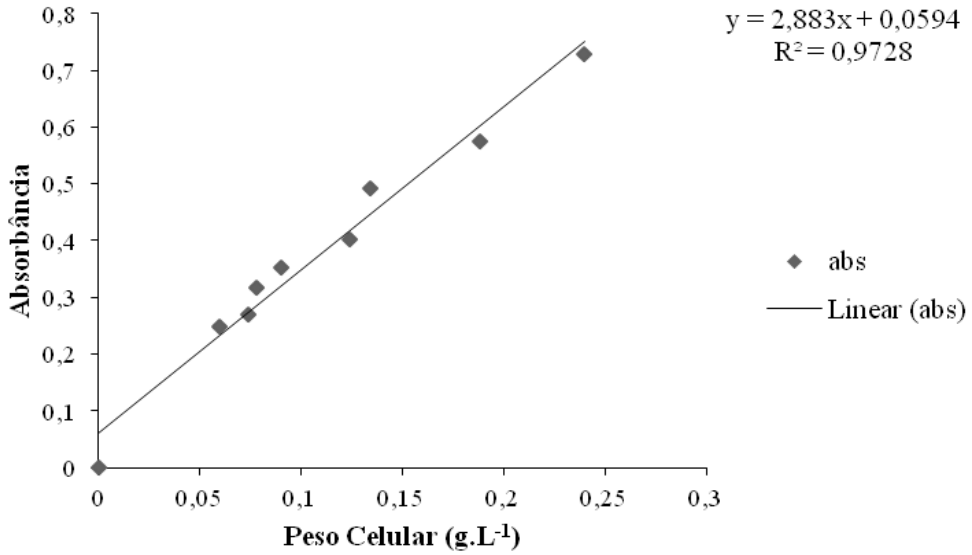
Apêndice B.1 – Curva padrão para determinação espectrofotométrica de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Apêndice C – Concentração celular (g) e absorbância para construção da curva padrão de crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis*.

Célula (g)	Absorbância
0,060	0,248
0,074	0,269
0,078	0,316
0,090	0,353
0,124	0,402
0,134	0,492
0,188	0,575
0,240	0,728

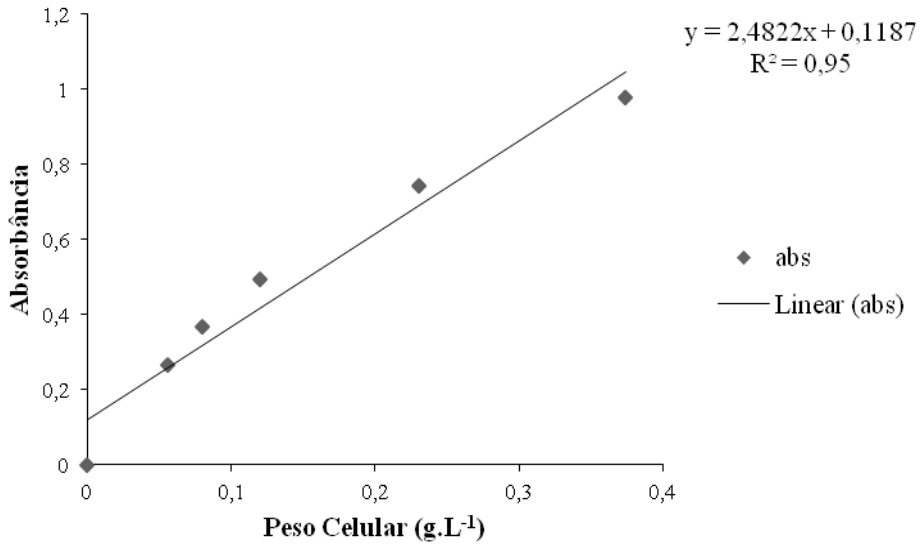
Apêndice C.1 – Curva padrão para determinação espectrofotométrica de crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis*.



Apêndice D – Concentração celular (g) e absorbância para construção da curva padrão de crescimento da levedura *Pachysolen tannophilus*.

Célula (g)	Absorbância
0,056	0,264
0,080	0,369
0,120	0,494
0,230	0,742
0,374	0,978

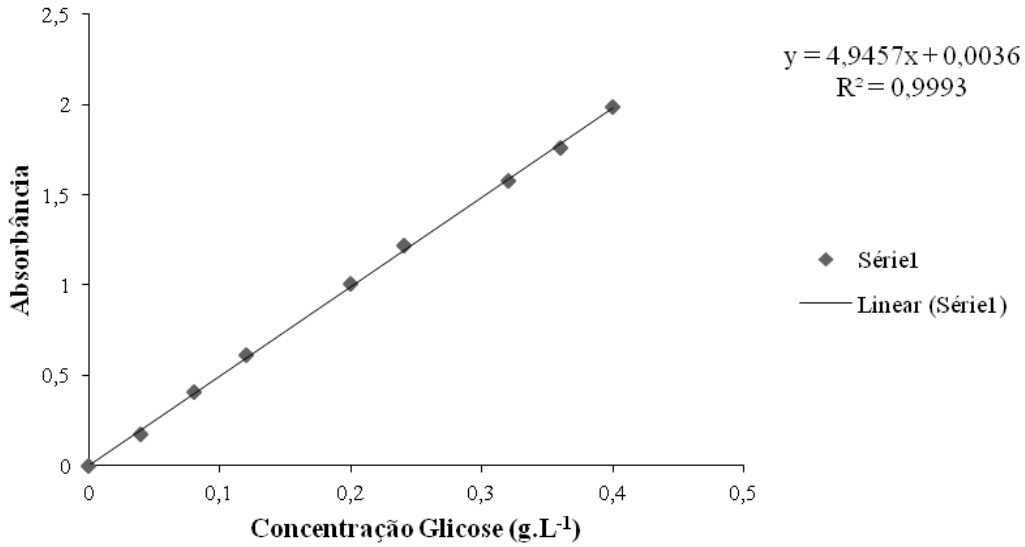
Apêndice D.1 – Curva padrão para determinação espectrofotométrica de crescimento da levedura *Pachysolen tannophilus*.



Apêndice E – Concentração de glicose ($g.L^{-1}$) e absorbância para construção da curva padrão de açúcares redutores.

Glicose ($g.L^{-1}$)	Absorbância
0,04	0,174
0,08	0,405
0,12	0,613
0,20	1,006
0,24	1,217
0,32	1,577
0,36	1,757
0,40	1,988

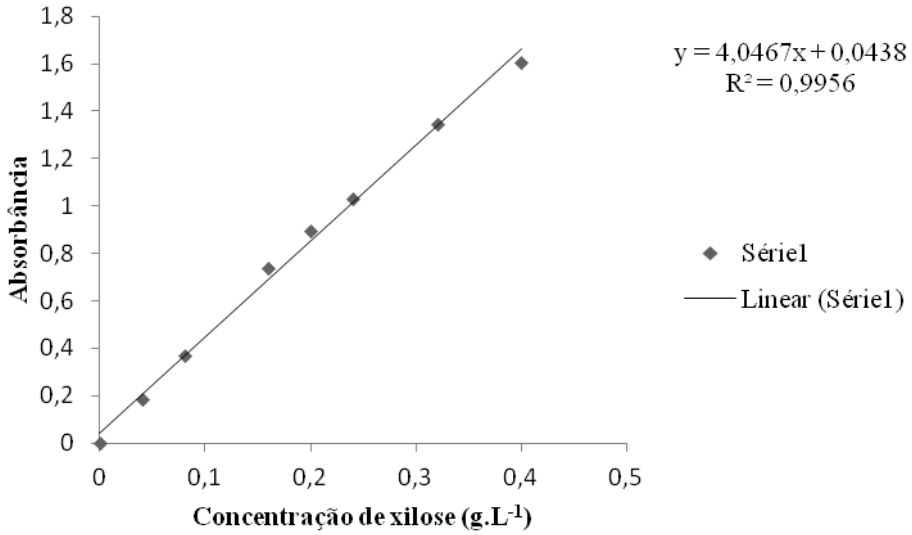
Apêndice E.1 – Curva padrão para determinação espectrofotométrica de açúcares redutores.



Apêndice F – Concentração de xilose ($g.L^{-1}$) e absorbância para construção da curva padrão de açúcares redutores.

Xilose ($g.L^{-1}$)	Absorbância
0,04	0,187
0,08	0,370
0,16	0,739
0,20	0,897
0,24	1,033
0,32	1,344
0,40	1,608

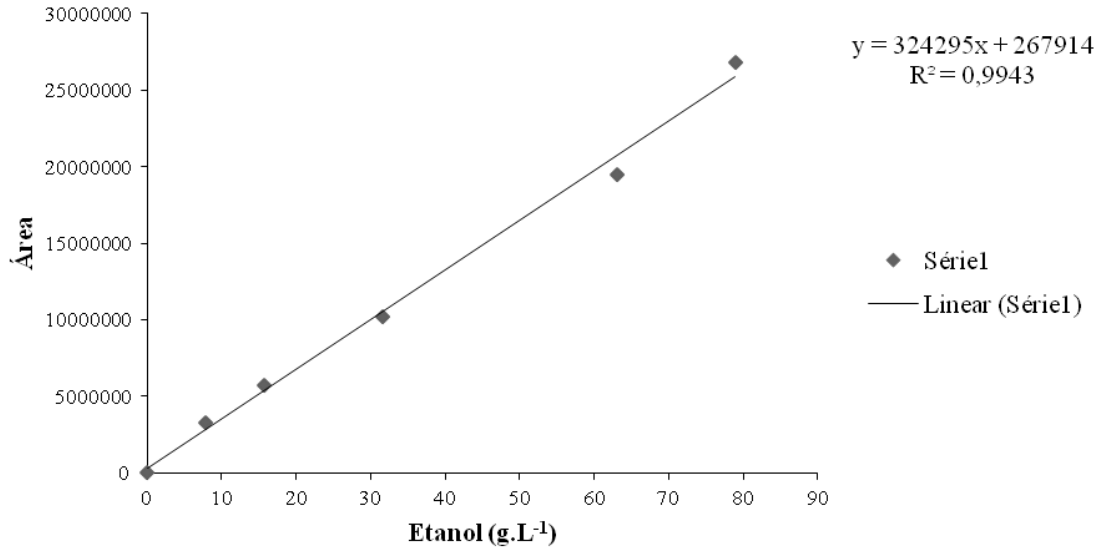
Apêndice F.1 – Curva padrão para determinação espectrofotométrica de açúcares redutores.



Apêndice G – Concentração de etanol ($g.L^{-1}$) e área do pico do cromatograma para construção da curva padrão de etanol.

Etanol ($g.L^{-1}$)	Área
7,89	3283491
15,78	5732919
31,56	10214149
63,12	19496057
78,90	26848097

Apêndice G.1 – Curva padrão para quantificação de etanol por cromatografia gasosa



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

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 21 / 03 / 2018

Natália Righetti Rocha Trinca

Assinatura do autor