

Michelle Cardoso Coimbra

Produção de etanol utilizando cascas de banana e laranja por  
co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis*

São José do Rio Preto  
2015

Michelle Cardoso Coimbra

Produção de etanol utilizando cascas de banana e laranja por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis*

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

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

São José do Rio Preto  
2015

Coimbra, Michelle Cardoso

Produção de etanol utilizando cascas de banana e de laranja por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis* / Michelle Cardoso Coimbra. - São José do Rio Preto, 2015

125 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 - Indústria. 3. Resíduos industriais. 4. Biomassa. 5. *Zymomonas mobilis*. 6. *Pichia stipitis*. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 661.722

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

Michelle Cardoso Coimbra

Produção de etanol utilizando cascas de banana e laranja por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis*

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
UFGD – Dourados

Prof. Dr. Marcos de Lucca Junior  
IFSP – Barretos

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Maurício Boscolo  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
11 de setembro de 2015

Aos meus pais, Edna e Aristides,  
por todo apoio e confiança,

dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar, concedendo-me persistência, intuição e, sobretudo, sabedoria para compreensão do que quero, do que posso e do que consigo;

Ao querido orientador, Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz, pelo privilégio e oportunidade concedidos, e, sobretudo, pela confiança, orientação, amizade e apoio para realização deste trabalho;

À Fapesp, pela concessão da bolsa de estudos no país (Proc. nº 2011/07147-1), pela bolsa de pesquisa no exterior (Proc. nº 2013/23525-1) e pela concessão de auxílio pesquisa (Proc. nº 2011/51128-1), que possibilitou a aquisição de muitos dos equipamentos indispensáveis para a execução deste trabalho;

A todas as colegas do laboratório e companheiras nas pesquisas, em especial Juliana Guerra, Juliana Ferreira, Vidiany, pelo apoio nas análises;

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, com quem convivi durante o doutorado, pela constante demonstração de amizade;

À Técnica do Laboratório, Tânia, pelo apoio, carinho, amizade e dedicação;

A toda minha família, especialmente meus queridos pais, a quem tanto amo e me orgulho e sempre me deram muito carinho, estímulo e dedicação em todos os momentos da minha vida;

Aos grandes amigos que conquistei na pós-graduação, Bruna, Crislene, Gisele, Juliana G., Juliana F., Lívia, Luana, Vanessa, Vidiany;

Ao Rafael, que muito me ajudou, acompanhou e torceu em muitos momentos, tornando o caminho mais fácil;

A todos os professores, técnicos e alunos do laboratório Ciemat (Madrid), em especial às professoras Mercedes Ballesteros e Paloma Manzanares, que tão bem me receberam e muito me ensinaram durante meu estágio;

E e todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Crise energética e bioetanol.....	21
3.2. Aplicações e vantagens do etanol.....	22
3.3. Processo convencional de produção de etanol.....	24
3.4. Uso de biomassa para produção de etanol.....	25
3.4.1. Celulose.....	28
3.4.2. Hemicelulose.....	29
3.4.3. Lignina.....	30
3.5. Resíduos de banana e produção de bioetanol.....	31
3.6. Resíduos de laranja e produção de bioetanol.....	32
3.7. Tratamento dos resíduos lignocelulósicos.....	33
3.7.1. Hidrólise ácida.....	34
3.7.2. Hidrólise enzimática.....	35
3.7.3. Formação de compostos inibidores da fermentação.....	36
3.8. Microrganismos utilizados para produção de bioetanol e co-culturas.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Preparo das cascas de banana e laranja.....	40
4.2. Pré-tratamento do substrato: hidrólise ácida.....	43
4.3. Hidrólise enzimática.....	44
4.4. Concentração e desintoxicação dos hidrolisados.....	45
4.5. Fermentação.....	46
4.5.1. Microrganismos.....	46
4.5.2. Meios de cultura.....	46
4.5.2.1. Meios de crescimento e manutenção das culturas.....	46

4.5.2.2. Meio sintético para fermentação.....	47
4.5.2.3. Meio de cascas de banana e meio de cascas de laranja para fermentação.....	47
4.5.3. Condições de fermentação.....	47
4.5.3.1. Preparo do pré-inóculo.....	47
4.5.3.2. Pré-fermentação.....	48
4.5.3.3. Padronização do inóculo.....	48
4.6. Métodos analíticos.....	49
4.6.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.....	49
4.6.2. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de <i>Pichia stipitis</i> CCT 2617.....	50
4.6.3. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de <i>Z. mobilis</i> CCT 4494 e <i>P. stipitis</i> CCT 2617.....	51
4.6.4. Coleta e preparo das amostras durante a fermentação.....	51
4.6.5. Determinação do pH.....	51
4.6.6. Determinação da concentração celular.....	51
4.6.7. Determinação de etanol.....	52
4.6.8. Determinação de açúcares totais (AT).....	52
4.6.9. Determinação de açúcares redutores (AR) .....	52
4.6.10. Determinação dos teores de compostos fenólicos.....	53
4.7. Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. Ensaio de hidrólise ácida com a casca de banana.....	55
5.2. Ensaio de hidrólise enzimática com a casca de banana.....	56
5.3. Ensaio de hidrólise ácida com a casca de laranja.....	57
5.4. Hidrólise enzimática com a casca de laranja.....	58
5.5. Desintoxicação dos hidrolisados.....	59
5.6. Fermentação com o meio sintético.....	62
5.6.1. Crescimento celular na fermentação com meio sintético.....	62
5.6.2. pH final do caldo na fermentação com meio sintético.....	65
5.6.3. Produção de etanol na fermentação com meio sintético.....	67
5.7. Fermentação com o meio de cascas de banana.....	73

5.7.1. Crescimento celular na fermentação com meio de cascas de banana.....	73
5.7.2. pH final do caldo na fermentação com meio de cascas de banana.....	77
5.7.3. Produção de etanol na fermentação com meio de cascas de banana.....	80
5.8. Fermentação com o meio de cascas de laranja.....	86
5.8.1. Crescimento celular na fermentação com meio de cascas de laranja.....	86
5.8.2. pH final do caldo na fermentação com meio de cascas de laranja.....	89
5.8.3. Produção de etanol na fermentação com meio de cascas de laranja.....	91
5.9. Fermentação com o meio sintético em biorreator.....	96
5.10. Fermentação com o meio de cascas de banana em biorreator.....	100
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
ANEXO.....	118

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais aplicações do etanol e de seus produtos.....	24
Figura 2 - Processo de produção convencional de etanol.....	25
Figura 3 - Produção de etanol a partir de material lignocelulósico.....	26
Figura 4 - Representação estrutural da fibra lignocelulósica.....	26
Figura 5 - Estrutura do polímero de celulose.....	28
Figura 6 - Estrutura do polímero de hemicelulose.....	29
Figura 7 - Estrutura da macromolécula de lignina.....	30
Figura 8 - Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose.....	36
Figura 9 - Cascas de banana em bandeja de alumínio para serem secas ao sol.....	41
Figura 10- Cascas de laranja em bandeja de alumínio para serem secas ao sol.....	41
Figura 11 - Cascas de banana secas ao sol por aproximadamente 24 h.....	42
Figura 12 - Cascas de laranja secas ao sol por aproximadamente 24 h.....	42
Figura 13 - Frascos Erlenmeyer contendo as cascas de banana seca e o ácido sulfúrico 5%, antes da hidrólise ácida.....	43
Figura 14 - Meio de casca de banana, com 50 g/L de açúcares totais, (a) antes e (b) depois da desintoxicação.....	61
Figura 15 - Valores de pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.....	66
Figura 16 - Valores de pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio de cascas de banana.....	79
Figura 17 - Valores de pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio de cascas de laranja.....	91
Figura 18 - Biorreator com o meio sintético após 24 h do início da fermentação.....	97
Figura 19 - Forma de coleta das amostras nos diferentes tempos de fermentação em biorreator de 5 L.....	98
Figura 20 - Cinética do consumo de açúcar total, produção de etanol e crescimento celular da co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. stipitis</i> apresentada na fermentação conduzida em biorreator com meio sintético.....	100

Figura 21 - Cinética do consumo de açúcar total, produção de etanol e crescimento celular da co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* apresentada na fermentação conduzida em biorreator com meio de cascas de banana... 103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Uso do etanol como combustível em alguns países.....	23
Tabela 2 - Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática.....	34
Tabela 3 - Dosagem recomendada, pH e temperatura de atuação das enzimas fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda.....	45
Tabela 4 - Variáveis independentes, codificadas, estudadas para o meio sintético e meio de cascas de banana e meio de cascas de laranja.....	54
Tabela 5 - Açúcares totais (AT) e redutores (AR) (g/L) liberados nos ensaios de hidrólise ácida das cascas de banana.....	55
Tabela 6 - Açúcares totais (AT) e redutores (AR) (g/L), liberados pela hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática, das cascas de banana.....	56
Tabela 7 - Açúcares totais (AT) e redutores (AR) (g/L) liberados nos ensaios de hidrólise ácida das cascas de laranja.....	58
Tabela 8 - Açúcares totais (AT) e redutores (AR) (g/L), liberados pela hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática, das cascas de laranja.....	58
Tabela 9 - Compostos fenólicos (g/L) e açúcares totais (AT) (g/L) antes e depois da desintoxicação dos meios com concentrações de açúcar de 50, 150 e 250 g/L).....	59
Tabela 10 - Compostos fenólicos (g/L) e açúcares totais (AT) (g/L) antes e depois da desintoxicação dos meios de cascas de laranja com teores de açúcar de 50, 150 e 250 g/L.....	60
Tabela 11 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.....	63
Tabela 12 - Estimativa dos efeitos principais e valor de $p$ referentes ao delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.....	64

Tabela 13 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.....	65
Tabela 14 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a produção de etanol (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético.....	67
Tabela 15 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a concentração de AT no meio (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético.....	71
Tabela 16 - Estimativa dos efeitos principais e valor de $p$ referentes ao delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético.....	72
Tabela 17 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.....	74
Tabela 18 - Estimativa dos efeitos principais e valor de $p$ referentes ao delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.....	76
Tabela 19 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.....	78
Tabela 20 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a produção de etanol (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.....	81

Tabela 21 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a concentração de AT no meio (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de banana.....	84
Tabela 22 - Estimativa dos efeitos principais e valor de $p$ referentes ao delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.....	85
Tabela 23 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.....	87
Tabela 24 - Estimativa dos efeitos principais e valor de $p$ referentes ao delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.....	88
Tabela 25 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.....	89
Tabela 26 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a produção de etanol (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.....	92
Tabela 27 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a concentração de AT no meio (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de laranja.....	95
Tabela 28 - Estimativa dos efeitos principais e valor de $p$ referentes ao delineamento fracionado $2^{4-1}$ , para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.....	96

Tabela 29 - Médias de pH, biomassa (g/L), etanol (g/L) e açúcares totais (AT) (g/L) da fermentação realizada com meio sintético em fermentador de 5 L nos tempos de 18, 24, 48, 72 e 96 h de processo..... 99

Tabela 30 - Médias de pH, biomassa (g/L), etanol (g/L) e açúcares totais (AT) (g/L) da fermentação realizada com meio de cascas de banana em fermentador de 5 L nos tempos de 18, 24, 48, 72 e 96 h de processo..... 101

## RESUMO

A geração de álcool combustível a partir de resíduos lignocelulósicos pode ser uma fonte alternativa e renovável de energia. O Brasil é um dos maiores produtores de frutas tropicais do mundo, com destaque para a laranja e banana. Em consequência disto, é capaz de gerar grandes quantidades de resíduos que podem ser utilizados como biomassa que, uma vez hidrolisada, libera pentoses e hexoses. A fim de se buscar uma maior produção de etanol, a utilização de co-culturas que metabolizem tanto pentoses quanto hexoses torna-se bastante interessante. Dentro desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da hidrólise de cascas de banana e laranja para a produção de etanol por co-culturas de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis*. A hidrólise ácida foi feita com ácido sulfúrico 5% e 15 min em autoclave, para a hidrólise enzimática utilizou-se kit fornecido pela Novozymes em reação a 50°C durante 36 h. Após as hidrólises o meio foi desintoxicado com carvão ativado. Foram avaliados os efeitos da fermentação somente por *Z. mobilis* e por co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis*, do pH, da agitação e da quantidade de açúcares no meio. As hidrólises ácida e enzimática liberaram 64,97 e 134,75 g/L de açúcares totais das cascas de banana e 101,30 e 176,70 g/L de açúcares totais das cascas de laranja, respectivamente. A desintoxicação do hidrolisado resultou em remoção de 58% a 93% dos fenóis e 1,7% a 4% dos açúcares totais. Nas fermentações descontínuas com meio sintético o maior crescimento celular e máxima produção de etanol foram 1,52 e 11,29 g/L para a monocultura de *Z. mobilis*, e 8,00 e 77,02 g/L para a co-cultura, respectivamente. Para o meio com cascas de banana essas respostas foram 1,87 e 4,16 g/L para a monocultura, e 15,19 e 23,92 g/L para a co-cultura, respectivamente. Para o meio com cascas de laranja, as mesmas respostas foram 0,39 e 1,85 g/L para a monocultura, e 6,73 e 11,36 g/L para a co-cultura, respectivamente. Para todos meios avaliados, as co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* foram mais eficientes na fermentação alcoólica do que a monocultura de *Z. mobilis*, apresentando maiores concentrações de biomassa e etanol.

Palavras-chave: etanol, biomassa, co-fermentação, resíduos lignocelulósicos, banana, laranja.

## **ABSTRACT**

*The generation of ethanol from lignocellulosic waste, such as fruit crops, can be an alternative and renewable energy source. Brazil is one of the largest producers of tropical fruits in the world, especially orange and banana. As a result, it is able to generate large amounts of waste that may be used as biomass, which once hydrolyzed, releases pentoses and hexoses. In order to get a higher ethanol yield, the use of co-cultures which metabolize both pentose and hexose becomes quite interesting. In this context, the objective of this work was to study the hydrolysis effect of banana and orange peels for ethanol production by co-cultures of *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis*. The acid hydrolysis was performed with 5% sulfuric acid and 15 min in autoclave; for the enzymatic hydrolysis was used a commercial kit supplied by Novozymes, in reaction at 50°C for 36 h. After the hydrolysis the medium was detoxified with activated carbon. The effects of fermentation by *Z. mobilis* monoculture and *Z. mobilis* and *P. stipitis* co-cultures, pH, agitation and the initial amount of sugars in the middle were evaluated. The sequential acid and enzymatic hydrolysis released 64.97 and 134.75 g/L of total sugars from banana peels and 101.30 and 176.70 g/L of total sugars from orange peels, respectively. The detoxification of the hydrolysate resulted in a removal of 58% to 93% of phenol and 1.7% to 4% of the total sugars. In Erlenmeyer fermentations with synthetic medium, the largest cell growth and maximum ethanol production were 1.52 and 11.29 g/L for *Z. mobilis* monoculture, and 8.00 and 77.02 g/L for the co-culture, respectively. In the medium with banana peels, these responses were 1.87 and 4.16 g/L for monoculture, and 15.19 and 23.92 g/L for the co-culture, respectively. To the medium with orange peels, the same responses were 0.39 and 1.85 g/L for monoculture and 6.73 and 11.36 g/L for the co-culture, respectively. For all evaluated media, the *Z. mobilis* and *P. stipitis* co-cultures were more efficient in fermentation than the *Z. mobilis* monoculture, with higher concentrations of biomass and ethanol.*

*Keywords: ethanol, biomass, co-fermentation, lignocellulosic residues, banana, orange.*

## 1. INTRODUÇÃO

A queima de combustíveis, além de ser fonte não renovável de energia, libera dióxido de carbono no meio ambiente, contribuindo para o aquecimento global. Ao contrário dos combustíveis fósseis, o etanol é uma fonte renovável de energia produzida pela fermentação de açúcares e sua obtenção de biomassa renovável vem ganhando muita popularidade. Hoje é possível encontrar muitas pesquisas em todo o mundo visando produzir etanol a partir de substratos regionais de baixo custo.

No Brasil, a banana e a laranja estão entre as frutas mais produzidas, no entanto, geram uma grande quantidade de resíduos. Uma forma de aproveitamento que tem se mostrado bastante promissora refere-se ao uso dessa biomassa na produção do bioetanol.

A geração de etanol a partir de biomassa lignocelulósica pode ser realizada seguindo basicamente as seguintes etapas: pré-tratamento físico e/ou químico do material lignocelulósico, hidrólise da celulose e hemicelulose e fermentação dos açúcares por microrganismos. Na etapa da hidrólise podem ser utilizados os processos com ácido e enzimas. O pré-tratamento ácido tem por objetivo promover uma quebra parcial da biomassa, abrindo as cadeias lignocelulósicas de forma a permitir a atuação das enzimas. A hidrólise enzimática visa liberar açúcares fermentescíveis a partir da celulose e hemicelulose tratadas com ácido.

Entre os principais açúcares que podem ser liberados pela hidrólise dessa biomassa estão hexoses e pentoses, como a glicose e xilose. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo tradicionalmente usado para a biossíntese de etanol, não metaboliza xilose. Assim, a utilização de culturas de microrganismos que fermentem esses dois tipos de açúcares pode gerar uma maior produção de etanol, uma vez que tanto as hexoses como as pentoses podem ser convertidas no produto. A bactéria *Zymomonas mobilis* metaboliza hexoses e é conhecida por seu potencial na produção de etanol. A levedura *Pichia stipitis* pode metabolizar pentoses com rendimentos e taxas de fermentação relativamente altos.

Dentro do contexto apresentado, considerando o aproveitamento de diferentes resíduos lignocelulósicos para produção de biocombustíveis e o uso de co-culturas de microrganismos para uma fermentação mais eficiente, torna-se importante um estudo

da viabilidade da produção de bioetanol a partir de cascas de banana e laranja e co-fermentação por *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis*, buscando os melhores parâmetros para o processo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a produção de etanol por co-culturas de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis* em hidrolisados de cascas de banana e laranja.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a influência da hidrólise ácida como pré-tratamento sobre a despolimerização das cascas de banana e de laranja;
- Avaliar a eficiência do uso de diferentes enzimas comerciais sobre a despolimerização das cascas de banana e de laranja;
- Verificar a produção de bioetanol por co-culturas de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis*, comparativamente à fermentação somente por *Zymomonas mobilis*;
- Maximizar a produção de bioetanol utilizando cascas de banana e de laranja, pelo estudo dos efeitos dos parâmetros: microrganismos; pH, agitação e quantidade inicial de substrato;
- Realizar ampliação da escala de produção de etanol por fermentação descontínua para reator de 5 L.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Crise energética e bioetanol

As crises de energia, juntamente com a carência de alimentos e a ameaça ao meio ambiente, constituem os principais problemas que afligem o homem moderno. Por mais que a indústria invista no desenvolvimento de equipamentos cada vez mais econômicos e por mais que os setores produtivos da sociedade se organizem na busca da chamada eficiência energética, a produção de energia terá de ser cada vez maior. Nos últimos 20 anos, o consumo de energia nos países mais pobres do mundo aumentou de forma espantosa, fenômeno que atinge também os países emergentes. Na Índia, o consumo dobrou em duas décadas. Em Bangladesh, o aumento foi de 150%, no Brasil, 250%. O consumo de energia *per capita* dos brasileiros equivale a apenas um terço do consumo *per capita* de espanhóis e coreanos (OINEGUE, 2009).

Petróleo, gás natural e seus derivados representam 55% do consumo mundial de energia. São esses combustíveis que permitem a existência dos meios de transporte rápidos e eficientes e de boa parte das atividades industriais. Lamentavelmente, eles não vão durar mais do que algumas décadas: como combustíveis fósseis, suas reservas são finitas, a segurança de abastecimento é problemática para os países que os importam e seu uso é a principal fonte dos gases que provocam mudanças climáticas e o aquecimento global (NOGUEIRA et al., 2005).

O aumento da demanda energética mundial e o uso indiscriminado das reservas de petróleo pela humanidade motivaram a busca por fontes renováveis de energia, especialmente por aquelas derivadas de materiais renováveis como a biomassa (SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009). Além disso, o esgotamento dos combustíveis derivados do petróleo, a preocupação mundial com o aumento das emissões dos gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera e as conseqüentes mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global encorajaram cada vez mais o uso de biocombustíveis, como o bioetanol (BUCKERIDGE; SANTOS; DE SOUZA, 2009).

O fornecimento de energia de maneira sustentável é fundamental não apenas para o desenvolvimento econômico das nações, mas também para assegurar o bem estar do cidadão (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006). A Agência Internacional de

Energia calcula que dentro de 20 anos aproximadamente 30% do total da energia consumida pela humanidade será proveniente das fontes renováveis, que hoje representam 14% da energia produzida no mundo, em que a biomassa tem 11,4%, na participação da oferta (CORTEZ; LORA; AYARZA, 2008).

O bioetanol não só assegura reduções nos problemas de poluição ambiental devido ao seu elevado teor de oxigênio como reduz a dependência das importações de petróleo e alivia incertezas causadas pelas flutuações do preço deste (HUANG; RAMASWAMY; TSCHIRNER, 2008). Segundo estimativas da Empresa de Pesquisa Energética (EPE), em 2017 o consumo de etanol no Brasil irá saltar para 53 bilhões de litros anuais e esse volume representará cerca de 80% dos combustíveis líquidos consumidos por veículos leves e de pequeno porte no Brasil. No ano de 2008, as vendas de álcool foram 1,6% maiores que as da gasolina (OINEGUE, 2009).

No mercado brasileiro a produção do bioetanol está diretamente ligada ao mercado internacional de açúcar. Quando a demanda por açúcar no mundo aumenta ou há uma quebra de produção, como ocorreu em 2009, a produção de bioetanol é prejudicada e o mercado se retrai na utilização desse biocombustível. Não é possível conduzir uma política de uso do bioetanol renovável sem utilizar novas fontes de matérias-primas que não estejam atreladas ao mercado mundial de *commodities*, como no caso do açúcar (LUZ JUNIOR et al., 2009).

O dilema do uso de matérias-primas alimentícias ou não também exerce influencia sobre este mercado. A busca de novas matérias-primas ou processos está acontecendo. O uso de biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol é muito promissor e constitui uma opção para países que não produzem grãos. Materiais lignocelulósicos são baratos, abundantes e renováveis, e podem minimizar os efeitos da produção de bioetanol a partir de fontes alimentares (BALAT; BALAT, 2009).

### **3.2. Aplicações e vantagens do etanol**

O etanol foi inicialmente utilizado para a produção de bebidas alcoólicas, vinagres e conservas. Nas últimas décadas tem sido aplicado na indústria de fármacos, perfumes e cosméticos; na fabricação de corantes, materiais explosivos, seda artificial e materiais plásticos; e como matéria-prima de produtos da química fina. O etanol é

utilizado também em iluminação e aquecimento; na produção de éter para misturas com carburantes e na fabricação de borracha sintética (CRUEGER; CRUEGER, 1993). No entanto, sendo o etanol uma fonte líquida de energia facilmente estocável, com alto conteúdo de oxigênio (35%) e combustão limpa, tem seu maior potencial de aplicação na área dos combustíveis, sendo utilizado como alternativa a gasolina, como aditivo da mesma e/ou como insumo na produção de biodiesel (SOMAVILLA; GOMES NETO, 2011).

Além de ser uma alternativa para superar a problemática econômica do mercado energético, especialmente de combustíveis fósseis, o álcool hidratado e a mistura etanol-gasolina apresentam diversas vantagens ambientais. Quando utilizado como combustível, comparado à gasolina, apresenta uma redução nas emissões de enxofre, CO<sub>2</sub>, particulados e outras substâncias poluentes. As reduções nas emissões de CO, hidrocarbonetos e NO atingem 57%, 64% e 13%, respectivamente (SOMAVILLA; GOMES NETO, 2011). A Tabela 1 aponta a porcentagem de uso do etanol como aditivo ou substituto para a gasolina em alguns países.

Tabela 1 - Uso do etanol como combustível em alguns países.

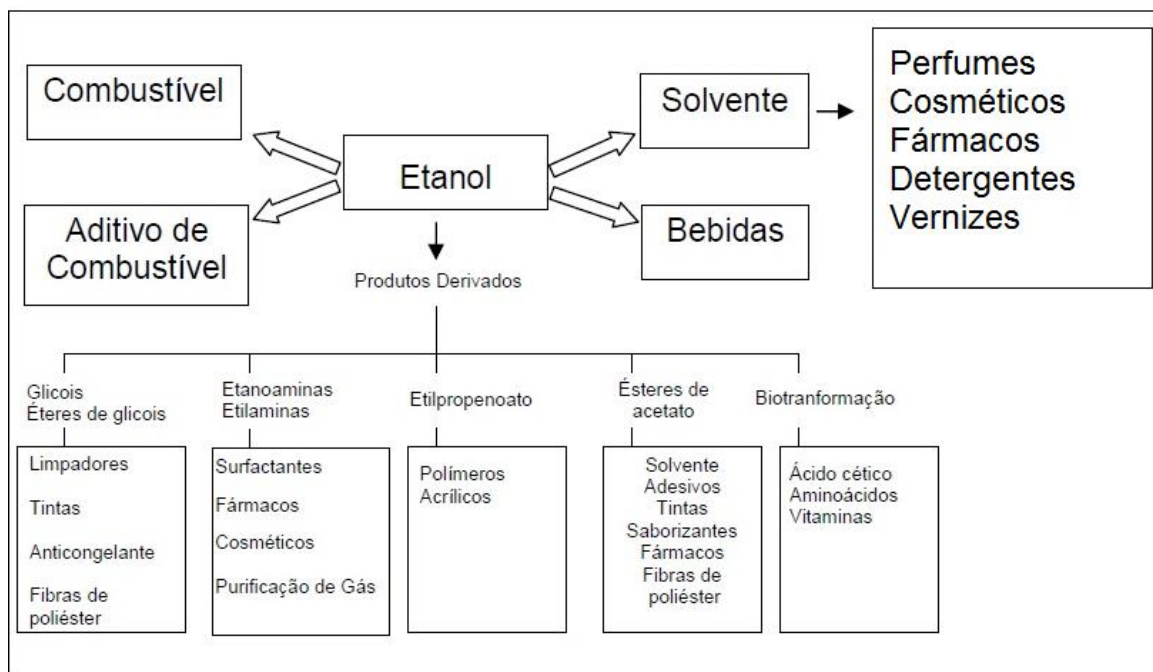
<b>País</b>	<b>Matéria-prima</b>	<b>Porcentagem de etanol nas misturas com gasolina (%v/v)</b>
Brasil	Cana-de-açúcar	20-25
Estados Unidos	Milho	10
Canadá	Milho, trigo, cevada	7,5-10
Colômbia	Cana-de-açúcar	10
Suécia	Trigo	5
Índia	Cana-de-açúcar	5
Tailândia	Mandioca, cana-de-açúcar, arroz	10

Fonte: Sanchez; Cardona 2008.

Outras vantagens da utilização do etanol merecem destaque: é uma *commodity* de alta pureza; de fácil transporte e estocagem; facilmente miscível com água; apresenta baixo perigo de explosão; é um agente desinfetante; facilmente oxidável; e pode ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos. Na Figura 1 são apresentadas as aplicações mais comuns para o etanol e alguns dos produtos derivados deste álcool,

assim como algumas das substâncias obtidas por meio de biotransformação microbiana (OLIVEIRA, 2010).

Figura 1 - Principais aplicações do etanol e de seus produtos.



Fonte: OLIVEIRA, 2010.

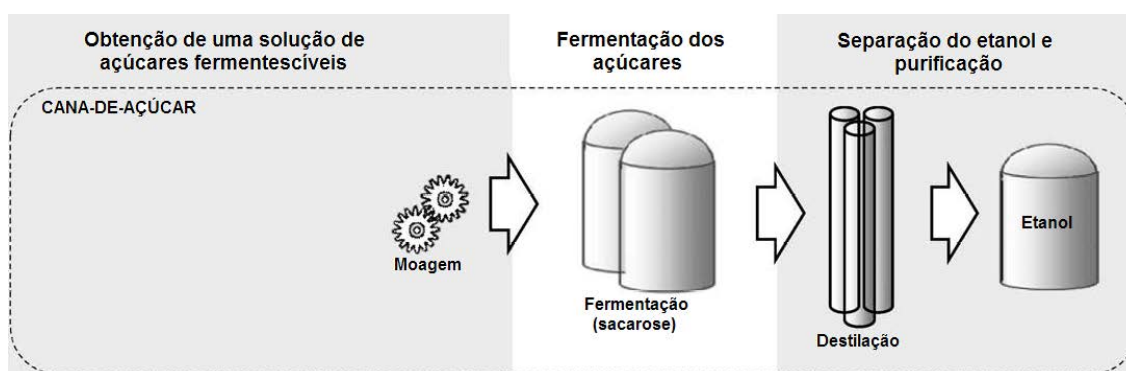
### 3.3. Processo convencional de produção de etanol

Desde os tempos antigos, o álcool foi produzido por meio de diversos processos artesanais de fermentação, principalmente, na produção de bebidas para o consumo humano. Posteriormente, com o desenvolvimento da microbiologia industrial, o álcool foi produzido em quantidades que permitiram seu uso como matéria-prima para diversos produtos químicos e como combustível. O etanol é obtido utilizando-se três vias: degradativa, fermentativa e sintética, sendo o processo de fermentação o mais utilizado por ser mais econômico. A via degradativa não tem muita importância econômica no Brasil, o etanol é obtido por desidratação do aguardente de cana. Já pela via sintética, o etanol é obtido a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o etileno, acetileno, gases de petróleo. (SCHMIDELL et al., 2001).

O método atual de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é realizado pela extração e fermentação do caldo, que possui aproximadamente 15% de sacarose e

15% de fibras. O processo começa com a limpeza e trituração da cana, separando o suco do bagaço. O bagaço é destinado às caldeiras para geração de energia para a usina e o suco, levemente tratado e concentrado, segue para a fermentação, que ocorre por meio de linhagens selecionadas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Como produto é obtido um vinho, que resultará no etanol hidratado após a destilação (Figura 2). Este etanol hidratado pode ser estocado como produto final e comercializado ou é desidratado para a produção do álcool anidro (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008).

Figura 2 - Processo de produção convencional de etanol.



Fonte: MUSATTO et al., 2010.

### 3.4. Uso de biomassa para produção de etanol

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica compreende resumidamente as seguintes etapas: pré-tratamento do material lignocelulósico por métodos químicos (álcalis, ácidos) e/ou físicos (temperatura, pressão), hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose, fermentação dos açúcares, separação da lignina residual e, finalmente, recuperação e purificação do etanol até as especificações desejadas para o combustível (Figura 3) (ALVIRA et al., 2010).

A biomassa lignocelulósica pode ser considerada como a massa orgânica de qualquer material vegetal, geralmente composto por celulose, hemicelulose, lignina, lipídeos, proteínas, açúcares simples, amido, água e cinzas sendo os três primeiros os principais constituintes (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006). A Figura 4 mostra uma representação da fibra lignocelulósica que constitui a biomassa. Trata-se da quarta maior fonte de energia do mundo, logo após o carvão, petróleo e gás natural (SAXENA;



que podem ser sustentavelmente desenvolvidas no futuro; apresentam propriedades ambientais muito positivas, como menor emissão de dióxido de carbono; além do potencial econômico promovido nos momentos de alta do preço dos combustíveis fósseis.

O uso da biomassa de resíduos agroindustriais, além de representar uma fonte alternativa, ajuda a minimizar problemas ambientais que são causados por sua deposição (KALOGERIS et al., 2003). Além do aspecto ambiental, deve-se também considerar que o despejo indevido dos subprodutos agrícolas constitui desperdício de rendimento para o produtor, quando se consideram as quantidades geradas e a composição dos subprodutos (CEREDA, 2001).

A biomassa é, dentre todas as fontes de energia renováveis, a única fonte de carbono capaz de ser convertida em combustíveis sólidos, líquidos e gasosos através de diferentes processos (OZBAY et al., 2001). Uma grande variedade de recursos de biomassa está disponível em nosso planeta para a conversão em bioprodutos. Dentre esses recursos podem-se incluir a madeira e seus resíduos, as safras agrícolas e seus subprodutos e resíduos, resíduos do processamento de alimentos, materiais de origem marinha (plantas aquáticas e algas), e os resíduos municipais e industriais (BALAT et al., 2009).

O maior sistema de energia comercial de biomassa no mundo é mantido pela indústria da cana-de-açúcar, através da produção de etanol e do uso quase total de bagaço para geração de eletricidade. Vários estudos têm sido desenvolvidos visando o uso dos bagaços para a produção de etanol, reduzindo assim a sua queima. A obtenção deste produto, denominado de etanol de 2ª geração, tem sido avaliado mundialmente também a partir de outros tipos de resíduos lignocelulósicos, como por exemplo: madeira de eucalipto e resíduos de palha de trigo (BALLESTEROS et al., 2004), resíduos de fibra de milho (SCHELL et al., 2007), resíduos de uva (PRAMANIK, 2005), resíduos de frutas e vegetais (SAEED, 2005), extrato de bagaço de maçã (NOGUEIRA et al., 2005)

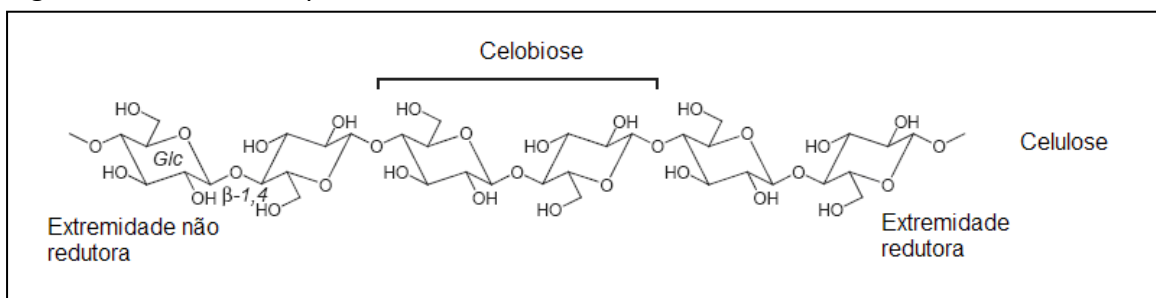
Segundo Moreira (2005), os carboidratos estão entre os componentes mais abundantes desses resíduos. Praticamente todos os polissacarídeos naturais contêm cinco ou seis átomos de carbono, denominados pentoses e hexoses, respectivamente. Nas biomassas celulósicas, uma mistura complexa de celulose e hemicelulose, lignina e

uma pequena quantidade de outros compostos conhecidos como extratos fazem parte da estrutura física do vegetal.

### 3.4.1. Celulose

Em geral, a celulose é a maior porção da biomassa vegetal e representa cerca de 40% a 50% do material, em massa. Trata-se um homopolissacarídeo linear que possui de 8.000 a 14.000 unidades de glicose (D-glicopirranose) unidas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1-4). A parte final da cadeia de glicose apresenta um carbono anomérico não ligado a outro resíduo de glicose e é conhecida como extremidade redutora do polímero, a outra extremidade é chamada não redutora (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005). A análise conformacional da celulose indica que a celobiose (4-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-glicopirranose) seja a sua unidade básica (RAMOS, 2003), como apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura do polímero de celulose.



Fonte: SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005.

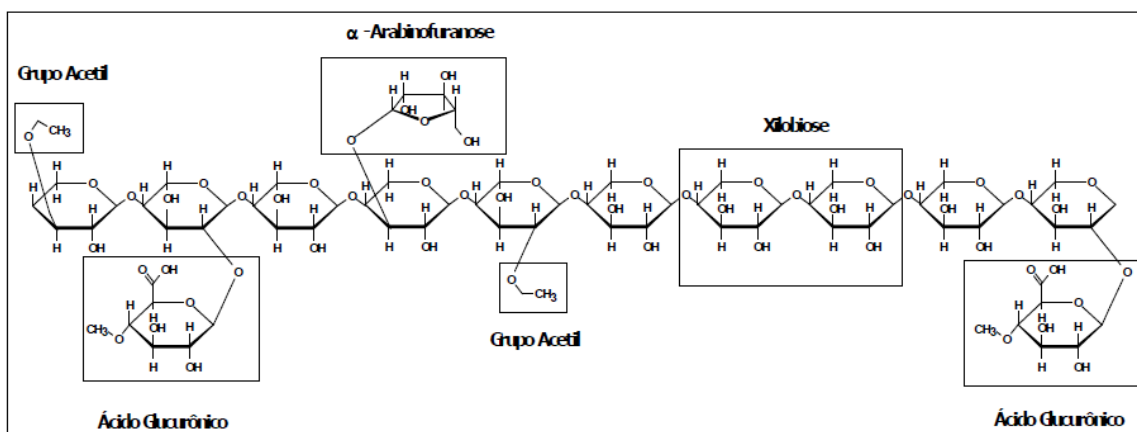
As cadeias de celulose formam entre si ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. Estas ligações conferem alta rigidez e ordenação à estrutura, criando as denominadas regiões cristalinas, responsáveis pela insolubilidade e pouca reatividade da celulose (LEMOS, 2001).

Uma das maiores dificuldades para conversão biotecnológica da celulose é hidrolisar a molécula até obter os sacarídeos constituintes da fibra. A resistência à hidrólise é conferida pelas regiões cristalinas e pela barreira física gerada pela lignina presente nos materiais lignocelulósicos. No entanto, existem algumas regiões amorfas, ou não cristalinas, mais susceptíveis à hidrólise. Quando a celulose é hidrolisada em condições brandas é obtida, como unidade de repetição, a celobiose (BETANCUR, 2005).

### 3.4.2. Hemicelulose

A quantidade de hemicelulose nas biomassas representa de 20% a 40% do material lignocelulósico. Na estrutura da hemicelulose participam pelo menos dois tipos de unidades de açúcar, formando cadeias entre 100 e 200 unidades de pentoses (xilose, ramnose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose) (Figura 6). A macromolécula de hemicelulose, que não apresenta regiões cristalinas devido ao seu alto grau de ramificação, está constituída majoritariamente por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular como xilanas, arabinanas e mananas, mas podem ser encontrados polissacarídeos mais complexos como arabinoxilanas, glucoarabinoxilanas, arabinogalactanas, arabinoglucouranoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas, galactoglucomananas e galactomananas (MARTÍNEZ et al., 2005).

Figura 6 - Estrutura do polímero de hemicelulose.



Fonte: MUSATTO et al., 2010.

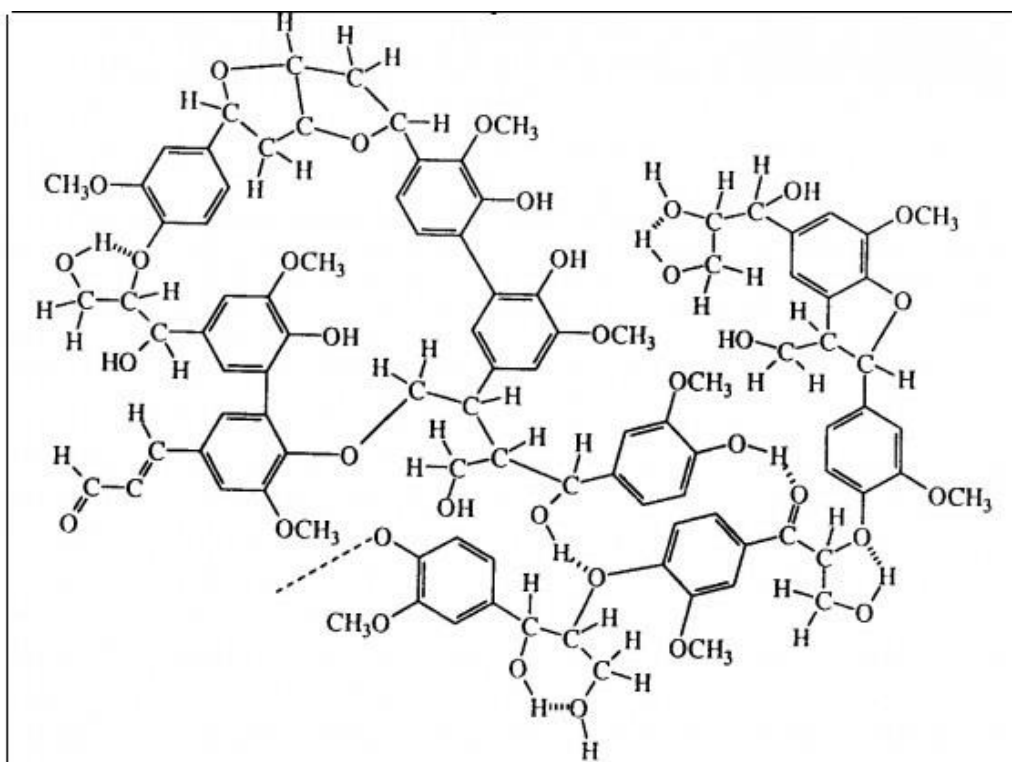
A xilana é o componente majoritário do complexo hemicelulósico, constituindo entre 15% e 30% da massa seca. Em termos gerais, é um polissacarídeo de cadeia linear formada por unidades de xilose, as quais se encontram unidas por ligações  $\beta$ -(1,4) xilanopiranosil. Devido ao menor grau de cristalinidade e a menor estabilidade das ligações glicosídicas, comparando-se à celulose, os monômeros constituintes das xilanas podem ser recuperados com altos rendimentos utilizando ácidos diluídos (KATAPODIS; CHRISTAKOPOULOU; CHRISTAKOPOULOU, 2006). O aproveitamento eficiente da xilana é imprescindível quando se deseja utilizar a biomassa lignocelulósica para processos de fermentação alcoólica.

### 3.4.3. Lignina

As partes remanescentes da biomassa são formadas predominantemente por lignina, principal componente não carboidrato. É a responsável pela rigidez da parede celular em vegetais, pela sua resistência ao impacto, compressão e dobra, sendo também um agente permanente de ligação entre as células (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

Essa macromolécula tridimensional de origem fenilpropanóica é formada por polímeros aromáticos naturais (p-hidroxifenilpropano, guaiacilpropano e siringilpropano), com numerosas ligações cruzadas (aproximadamente 10 tipos diferentes), resultando em uma macromolécula hidrofóbica e opticamente inativa (Figura 7). A lignina também está covalentemente ligada à hemicelulose, através de ligações éster com a xilana, formando uma matriz que envolve as microfibrilas da celulose. Essa ligação cria um dos impedimentos para a hidrólise das estruturas polissacarídeas. Cabe ressaltar que os compostos derivados da lignina, quando liberados, dificultam os processos fermentativos (LEMOS, 2001).

Figura 7 - Estrutura da macromolécula de lignina.



Por todo o contexto apresentado, tornam-se importantes estudos para uma maior utilização da biomassa de resíduos agroindustriais, como por exemplo, resíduos e subprodutos das culturas de frutas e vegetais. O Brasil é um dos maiores produtores de frutas tropicais e grandes quantidades destes alimentos se desperdiçam, gerando uma quantidade de biomassa considerável que poderia ser aproveitada (FAO, 2008). Diversos processos são desenvolvidos para transformação desses materiais em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos (PANDEY et al., 2000).

### **3.5. Resíduos de banana e produção de bioetanol**

A banana constitui o quarto produto alimentar mais produzido no planeta e o oitavo lugar em exportações. Em muitos países é a principal fonte de arrecadação e de geração de emprego e renda para uma parte expressiva da população. Nas últimas três décadas, essa cultura tem apresentado um aumento significativo (122%) no volume produzido (CEPA, 2010). Países como Brasil, Equador, Colômbia e Costa Rica, possuem uma cultura bananeira de grande importância no mercado nacional e internacional. O Brasil ocupa o terceiro lugar em produção com um total de 7 milhões de toneladas, e o décimo oitavo lugar em exportação com um total de 185 mil toneladas. A banana é a segunda fruta mais explorada no Brasil, sendo precedida somente pela laranja (FAO, 2008).

A maior parte da produção brasileira de bananas é consumida *in natura*. As cascas de bananas consumidas geralmente são descartadas ou utilizadas na alimentação animal e na compostagem. São industrializados cerca de 3% da produção, sendo 33% desses produtos consumidos no mercado interno. O principal produto derivado da banana produzido no Brasil é o purê, correspondendo a 55% do total de produtos industrializados, sendo exportado para o Japão, Estados Unidos e Europa. Também são produzidos, em quantidades consideráveis, bananada (20%), banana-passa (13%), flocos (10%) e chips (2%). Além dos mencionados, diversos outros produtos podem ser obtidos da banana: fruta em calda, fruta cristalizada, balas, farinha, suco clarificado, néctar, vinho, vinagre, cerveja, aguardente, licor, etc. Como ingrediente, a banana pode ainda ser utilizada em formulações de tortas, bolos, biscoitos, cereais matinais, barras de fruta,

alimentos infantis e dietéticos, iogurtes, sorvetes, bombons, dentre outros (EMBRAPA, 2008).

Pesquisas estimam que em torno de um quinto de toda a banana colhida é rejeitado, devido ao fato de que muitos destes frutos não chegam a ter os padrões de qualidade para sua exportação e pelo excesso produzido existente no mercado interno. Cada hectare de cultivo de banana gera, aproximadamente, 220 toneladas de resíduos constituídos principalmente de matérias lignocelulósicas. Considerando-se que a porcentagem da produção de banana que é industrializada neste país é de 3%, e que a casca da banana corresponde a 40% do seu peso tem-se uma geração de resíduo industrial anual de cerca de 83 mil toneladas de cascas de banana (EMBRAPA, 2008).

A casca de banana apresenta alto teor de carboidratos, que são facilmente metabolizados por microrganismos devido à sua natureza orgânica, é uma rica fonte de amido (3%), lignina (6-12%), pectina (10-21%), celulose (7,6-9,6%) e hemicelulose (6,4-9,4%) (MOHAPATRA; MISHRA; SUTAR, 2010). Esses fatores aliados ao seu baixo custo e alta disponibilidade tornam a casca de banana um interessante resíduo lignocelulósico que pode ser convertido em bioetanol (ESSIEN; AKPAN; ESSIEN, 2005).

Hammond et al. (1996) avaliaram o potencial de produção de bioetanol a partir de bananas verdes e maduras. As fermentações foram conduzidas com *Saccharomyces cerevisiae* a 35°C e 72 h. Os resultados da produção de etanol em relação ao fruto inteiro foram de 0,082 L/kg para a polpa e 0,006 L/kg para a casca. Schulz (2010) realizou fermentações em biorreatores e atingiu uma produção de etanol na ordem de 7,88 e 7,15 g/L, a partir de cascas de banana com concentrações iniciais de açúcares de 19,51 e 12,24 g/L, respectivamente.

### **3.6. Resíduos de laranja e produção de bioetanol**

A laranja representa aproximadamente 49% da produção brasileira de frutas. Em 2007, a produção de laranja foi de 18 milhões toneladas e no ano de 2008 a safra ultrapassou 18.580.908 toneladas (IBGE, 2008). O Brasil produz em torno de 53% da produção mundial de suco de laranja sendo responsável por 80% do comércio internacional desse produto. Dentre os estados brasileiros que mais se destacam na produção de cítricos estão São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Sergipe, Rio Grande

do Sul, Paraná e Goiás (ABECITRUS, 2008). A casca da laranja contém 16,9% de açúcares solúveis, 9,21% de celulose, 10,5% de hemicelulose e 42,5% de pectina, como o componente mais importante. Os açúcares solúveis da casca de laranja são glicose, frutose e sacarose. A pectina e as hemiceluloses são ricas em ácido galacturônico, arabinose, galactose e pequenas quantidades de xilose, ramnose e glicose (GROHMANN; CAMERON; BUSLIG, 1995).

A industrialização de citros para a produção de sucos gera grandes quantidades de resíduos, que equivalem a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82%. Os resíduos da laranja são utilizados principalmente como complemento para ração animal (ABECITRUS, 2008), porém, devido à sua composição rica em carboidratos solúveis e insolúveis, esse subproduto apresenta grande potencial para ser utilizado em produtos de alto valor agregado obtidos através da hidrólise química ou enzimática e posterior conversão biológica (RIVAS et al., 2008).

Albán e Freire (2009) estudaram a produção de bioetanol a partir de cascas de laranja hidrolisadas por diferentes linhagens de *Aspergillus ssp.* A fermentação foi realizada a 30°C e pH igual a 4, por *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*. O rendimento em etanol foi de 30,32% e 18,05% para *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, respectivamente.

### **3.7. Tratamento dos resíduos lignocelulósicos**

A área da fermentação para a obtenção de biocombustíveis vem sendo explorada fortemente. Esta área se desenvolve em ritmo acelerado procurando alternativas para o aproveitamento dos resíduos da agricultura e da indústria de alimentos, dando-lhes valor de subproduto industrial (STEINER, 2006). Pesquisadores como Rajeev et al. (2009) e Wilkins (2009) mostraram que é possível obter etanol através do material hemicelulósico, como cascas de banana e de laranja.

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

principalmente a xilose, é preciso um pré-tratamento químico do material lignocelulósico para remoção da lignina (SÖDERSTRÖM et al., 2003).

Na tabela 2 são comparadas as principais características da etapa ácida e enzimática. Propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial, a conformação molecular e a cristalinidade são fatores que influenciam na hidrólise da celulose, sendo que estes dependerão da origem e dos processos a que esse polissacarídeo for submetido (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

Tabela 2 - Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática.

Variável da hidrólise	Hidrólise ácida	Hidrólise enzimática
Condições brandas	Não	Sim
Altos rendimentos	Não	Sim
Auto-inibição	Não	Sim
Formação de inibidores	Sim	Não
Baixo custo de catálise	Sim	Não
Menor tempo	Sim	Não

Fonte: Tahezadeh; Karimi (2007).

### 3.7.1. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida é utilizada no pré-tratamento da biomassa tanto para a quebra da hemicelulose e celulose como para proporcionar um tratamento inicial, facilitando uma posterior hidrólise enzimática da hemicelulose em hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) (ALZATE; TORO; SÁNCHEZ, 2006). O principal objetivo do tratamento ácido é solubilizar e hidrolisar a fração de hemicelulose da biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas. A celulose é a última a ser hidrolisada devido à sua forte interação intermolecular, à completa ausência de água na estrutura da microfibrila e também ao fato das fibrilas estarem cobertas pela hemicelulose (AGUILAR et al., 2002; SUN; CHENG, 2002).

Esse tipo de pré-tratamento pode ser realizado com ácidos diluídos ou concentrados, porém a utilização do ácido na forma concentrada induz a formação de maior número de compostos inibidores, sendo menos atrativa para o processo de produção de etanol (ALVIRA et al., 2010).

Quando realizada com ácidos diluídos, permite aumentar a susceptibilidade da celulose aos futuros processos de hidrólise sem afetar, notavelmente, sua estrutura base. Essa característica do processo permite a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose em relação a outros glicídios. Durante a hidrólise ácida, os catalisadores liberam prótons que clivam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da hemicelulose e, no caso de ácidos concentrados, da celulose. Com a clivagem dos polímeros são liberadas diversas substâncias, sendo majoritário o conteúdo de xilose, glicose e arabinose. Entre os ácidos utilizados para este tipo de pré-tratamento, encontram-se: ácido sulfúrico, ácido fluorídrico e ácido acético (RODRIGUEZ-CHONG et al., 2004).

### **3.7.2. Hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é conduzida através de enzimas celulasas, que são altamente específicas. Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidos no processo de hidrólise são: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases (SUN; CHENG, 2002). As endoglucanases atuam hidrolisando as cadeias aleatoriamente, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução no grau de polimerização da cadeia. As exoglucanases atuam sobre a celulose a partir das extremidades redutoras e não redutoras removendo unidades de celobiose (dímeros de glicose). Finalmente, as  $\beta$ -glucosidases hidrolisam a celobiose e outras ciclodextrinas a glicose, liberando açúcares fermentescíveis, como ilustra a Figura 8 (LEITE et al., 2007).

É importante ressaltar que as três enzimas deste complexo sofrem inibição pelos produtos finais da hidrólise. Como as endo- e exoglucanases são inibidas pela celobiose, a  $\beta$ -glucosidases desempenha um papel crucial na degradação da celulose, ao prevenir o acúmulo de celobiose. No entanto, esta enzima também sofre inibição pelo produto final da reação, no caso, a glicose (LEITE et al., 2007).

Ao contrário do emprego de ácidos, a hidrólise enzimática é conduzida sob condições brandas, atingindo alta degradação da celulose; ainda, a ação das enzimas é específica pelo substrato, evitando a geração de compostos secundários que podem inibir a etapa de fermentação. No entanto, o uso de enzimas requer um tempo maior para que ocorra a hidrólise, além de maior custo. Alguns dos fatores que podem afetar a



fenólicos, variando suas concentrações de acordo com as condições nas quais estes hidrolisados são processados (BETANCUR, 2005).

O ácido acético é gerado a partir dos grupos acetil presentes na estrutura hemicelulósica. O ácido, na forma não dissociada, pode difundir-se ao citoplasma da célula e reduzir o pH intracelular, gerando problemas para produção de energia e o transporte de diversos nutrientes, aumentando o requerimento energético da célula. A assimilação do ácido pelos microrganismos depende, principalmente, do pH e de sua concentração, fatores chave na dissociação do ácido, assim como do nível de aeração do meio. A presença de ácido acético no meio de fermentação provoca queda no rendimento, produtividade e consumo de açúcar (TOSETTO, 2008).

O furfural é um aldeído de natureza aromática formado pela hidrólise de materiais lignocelulósicos que contêm pentoses (GUTIERREZ et al., 2002). Este tipo de substância reduz o crescimento celular, a formação de ATP e a produção de etanol. Dependendo do tipo de microrganismo, pode causar a morte da célula ao interferir na respiração e na fosforização oxidativa. (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

O hidroximetilfurfural (HMF) é gerado pela degradação de hexoses durante o processo de hidrólise e apresenta um mecanismo de ação similar ao descrito para o furfural. O HMF é assimilado em taxas menores tendo o efeito de aumentar a fase lag de crescimento das células (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Os compostos fenólicos originam-se da degradação da lignina durante a etapa de pré-tratamento. Alguns exemplos encontrados são o ácido 4-hidroxibenzóico, seringaldeído, 4-hidroxibenzaldeído e os ácidos salicílico, vanílico, siríngico entre outros. Muitos dos mecanismos de ação desses compostos sobre o microrganismo no processo de fermentação alcoólica ainda não foram completamente estudados, mas já foi demonstrado que eles podem reagir com moléculas biológicas da célula (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) ou ocasionar danos à membrana celular com consequente perda da seletividade, e ainda, inibir enzimas glicolíticas e fermentativas. Adicionalmente, tem sido reportada a inibição do consumo de xilose na presença de alguns compostos fenólicos de baixa massa molecular. De qualquer forma, estes compostos produzem efeitos negativos na fermentação por meio da redução da taxa específica de crescimento do microrganismo e da diminuição da produtividade de etanol (ROSSELL, 2006).

Diferentes processos têm sido propostos para diminuir a concentração de inibidores em hidrolisados hemicelulósicos. Os métodos para desintoxicação do hidrolisado variam de acordo com o tipo de inibidor presente. Entre os mais conhecidos encontram-se: mudanças de pH com óxido de cálcio, hidróxido de cálcio e ácido sulfúrico; utilização de carvão ativado, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares e até aplicação de enzimas (YADAV et al., 2011).

### **3.8. Microrganismos utilizados para produção de bioetanol e co-culturas**

Na fermentação alcoólica, as leveduras são os microrganismos comumente utilizados a nível industrial. Contudo, nas últimas décadas, a bactéria *Zymomonas mobilis* vem despertando muito interesse pelo seu potencial na produção de etanol, suportando concentrações de etanol três a quatro vezes maiores que *Saccharomyces cerevisiae* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009). É um microrganismo anaeróbio facultativo, gram-negativo e mesófilo; as condições ideais para o crescimento desta bactéria são intervalos de temperatura de 30 a 36°C e intervalos de pH entre 5 e 7. A *Z. mobilis* apresenta como exigência nutricional a presença de glicose, sacarose ou frutose no meio de cultivo, gerando quantidades praticamente equimolares de etanol e CO<sub>2</sub>. Quando cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose presente em etanol, CO<sub>2</sub>, lactato e outros, seguindo um balanço metabólico simples (SWINGS; DE LEY, 1977). Segundo Doelle et al. (1993), *Z. mobilis* é uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta as condições de cultura extremamente peculiares, causando grande interesse no meio científico, biotecnológico e industrial.

Contudo, tanto *S. cerevisiae* quanto *Z. mobilis* não metabolizam pentoses, como a xilose. A descoberta de leveduras que fermentam pentoses tem atraído grande interesse, já que a produção de combustíveis líquidos a partir de materiais lignocelulósicos torna-se muito mais eficiente a partir da fermentação tanto das hexoses quanto das pentoses liberadas na etapa de hidrólise (HINMAN et al., 1989). A conversão de xilose em etanol, junto com a glicose, permite um maior rendimento em etanol na fermentação de materiais lignocelulósicos, já que assim quase todos os açúcares são

transformados em etanol, dessa forma, o emprego de co-culturas de microrganismo que metabolizem pentoses e hexoses torna-se bastante vantajosa.

A xilose pode ser metabolizada por diferentes espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras naturalmente ocorrentes e/ou recombinantes. Entretanto, as bactérias possuem baixa tolerância ao etanol e fungos filamentosos possuem baixas produtividades. Entre as leveduras, *Pichia stipitis* destaca-se por ser uma das melhores produtoras de etanol com taxa de fermentação e rendimentos relativamente altos (LAPLACE, 1991). Além disso, a levedura *P. stipitis* praticamente não requer a adição de vitaminas para a fermentação de xilose e é capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo a celobiose (NIGAN, 2002).

*P. stipitis* tem apresentado resultados promissores na conversão de xilose em etanol a partir de hidrolisados de biomassa lignocelulósica, tanto em monoculturas como em co-culturas com outros microrganismos (DELGENES et al., 1996; NIGAM, 2002; FU et al., 2009). Estudo com hidrolisado de palha de arroz mostrou que a produção de etanol foi de 7,5 g/L quando somente *S. cerevisiae* foi utilizada na fermentação, e aumentou para 12 g/L quando foram utilizadas co-culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis* (YADAV et al., 2011).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

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

### 4.1. Preparo das cascas de banana e laranja

Os frutos maduros da banana nanica (*Musa cavendishii*) foram adquiridos em um supermercado da cidade de São José do Rio Preto entre os meses de fevereiro a maio de 2012. As cascas de banana foram separadas da polpa e as cascas foram cortadas manualmente, com auxílio de faca inox, em formato quadrado medindo cerca de 1 cm. Em seguida, foram distribuídas em bandejas de alumínio e secadas em ambiente externo por aproximadamente 24 h, até que ficassem quebradiças.

Os frutos da laranja (*Citrus sinensis*) variedade pera rio foram adquiridos em supermercado da cidade de São José do Rio Preto entre os meses de fevereiro a abril de 2013. O suco dos frutos foi extraído e as cascas foram cortadas manualmente, com auxílio de faca inox, em formato quadrado medindo cerca de 1 cm. Em seguida foram distribuídas em bandejas de alumínio e secadas ao sol por aproximadamente 24 h, até que ficassem quebradiças.

As Figuras 9 e 10 mostram as cascas de banana e laranja imediatamente após terem sido cortadas e distribuídas nas bandejas de alumínio; as Figuras 11 e 12 mostram as cascas de banana e laranja já secas, depois de 24 h expostas ao sol.

Depois de secas as cascas foram trituradas em liquidificador doméstico e passadas em peneiras de 18 mesh. As cascas trituradas foram armazenadas em potes de vidro bem fechados e deixados em temperatura ambiente, até o momento das análises. Ao todo foram obtidos 900 g de cascas de banana e 900 g de cascas de laranja secas e trituradas.

Figura 9 - Cascas de banana em bandeja de alumínio para serem secas ao sol.



Fonte: Autor

Figura 10 - Cascas de laranja em bandeja de alumínio para serem secas ao sol.



Fonte: Autor

Figura 11 - Cascas de banana secas ao sol por aproximadamente 24 h.



Fonte: Autor

Figura 12 - Cascas de laranja secas ao sol por aproximadamente 24 h.



Fonte: Autor

#### 4.2. Pré-tratamento do substrato: hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi feita de acordo com o método proposto por Sun e Cheng (2002) com algumas modificações. O mesmo método foi adotado tanto para as cascas de banana quanto para as cascas de laranja. Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 10 g de casca seca e 50 mL de ácido sulfúrico a 5% (v/v) (Figura 13).

Figura 13 - Frascos Erlenmeyer contendo as cascas de banana seca e o ácido sulfúrico 5%, antes da hidrólise ácida.



Fonte: Autor

Os frascos foram colocados em autoclave a 121°C e pressão de 1 atm durante 15 e 30 min (HA 15 e HA 30, respectivamente). A fim de avaliar somente o efeito do aquecimento, foram adicionados 10 g de casca seca e 50 mL de água destilada em frasco Erlenmeyer de 250 mL, sendo o frasco também levado à autoclave a 121°C e pressão de 1 atm durante 15 min (Branco). Após resfriamento em banho de gelo até temperatura ambiente, o pH dos hidrolisados foi ajustado para 6 com adição de NaOH, utilizando pHmetro Digmed modelo DM20.

Para avaliar o efeito somente do ácido, sem aquecimento, em frasco Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 10 g de casca seca e 50 mL de ácido sulfúrico a 5% (v/v), o

frasco foi deixado a temperatura ambiente por 15 min e, após, o pH ajustado para 6 com adição de NaOH (HA 0).

Todos os hidrolisados foram centrifugados a 6941 g, 4°C por 15 min e nos respectivos sobrenadantes foram determinadas as quantidades de açúcares totais e açúcares redutores, a fim de verificar a eficiência da hidrólise ácida em cada tratamento. O tratamento que proporcionou maior liberação de açúcares totais e redutores foi adotado para obtenção do meio de cascas de banana e meio de cascas de laranja utilizados na etapa de fermentação.

### **4.3. Hidrólise enzimática**

Para a hidrólise enzimática foram empregadas as enzimas comerciais: celulase (NS22086), xilanase (NS22083),  $\beta$ -glucosidase (NS22118), complexo enzimático (NS22119) contendo as enzimas arabinase,  $\beta$ -glucanase, celulase, hemicelulase, pectinase e xilanase; hemicelulase (NS22002) e glucoamilase (NS22035). As enzimas citadas fazem parte do “Novozymes’ Cellulosic Ethanol Enzyme Kit” e foram gentilmente fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda. A Tabela 3 mostra as dosagens recomendadas e as faixas de pH e de temperatura de atuação das enzimas. Esses dados foram fornecidos por cada fabricante, juntamente com as enzimas.

Todo o hidrolisado obtido no item 4.2 foi utilizado como substrato para a hidrólise enzimática. Em Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 10 g deste substrato, 10 mL de solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 M e as quantidades recomendadas das enzimas. Antes da adição das enzimas o pH da reação foi ajustado para 5, com auxílio do pHmetro. Todas as enzimas foram utilizadas juntas nas dosagens máximas recomendadas pelo fabricante, conforme Tabela 3. Os frascos Erlenmeyer foram, então, colocados em incubadora a 50°C e 150 rpm. A temperatura de 50°C e o pH de 5 foram definidos de modo que os seus valores estivessem dentro das faixas recomendadas pelo fornecedor das enzimas (Tabela 3), exceto para a enzima glucoamilase (NS22035) cuja faixa ótima de temperatura é alta e poderia inibir a ação das outras enzimas.

Depois de 24 h a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de NaOH 2 N e as quantidades de açúcares totais e redutores foram determinadas.

Tabela 3 - Dosagem recomendada, pH e temperatura de atuação das enzimas fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda.

Enzima	pH	Temperatura (°C)	Dosagem (% p/p)
NS22086 Celulase	5,0-5,5	45-50	1-5
NS22083 Xilanase	4,5-6,0	35-55	0,05-0,25
NS22118 β-glicosidade	2,5-6,5	45-70	0,2-0,6
NS22119 Complexo enzimático	4,5-6,0	25-55	0,05-0,4
NS22002 Hemicelulase	5,0-6,5	40-60	0,4-2
NS22035 Glucoamilase	4,5-5,5	60-70	0,01-0,06

#### 4.4. Concentração e desintoxicação dos hidrolisados

Após a hidrólise enzimática, os hidrolisados foram filtrados em papel filtro, colocados em béqueres de 1 L cada e concentrados em banho-maria a 80°C até atingirem o teor de açúcares totais de 150 e 250 g/L. O meio de cascas de banana com teor desejado de açúcares totais de 50 g/L não necessitou de concentração. Já para as de cascas de laranja, os meios com teores de açúcares totais de 50 e 150 g/L não necessitaram de concentração.

Para a desintoxicação, os hidrolisados nas concentrações de açúcares totais de 50, 150 e 250 g/L foram adicionados de óxido de cálcio com agitação, até atingirem pH 10. Então, foram deixados em repouso por 30 min a 25°C, seguidos de centrifugação (3000 g por 20 min) e filtração. Após, o pH dos hidrolisados foi reduzido para 4 com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (CHANDEL et al., 2007). Os hidrolisados foram distribuídos em frascos Erlenmeyers, adicionados de 3,5% de carvão ativado e agitados a 200 rpm por 1 h. A mistura foi novamente centrifugada a 3000 g por 20 min e filtrada. Os hidrolisados tratados foram então utilizados como meio de cascas de banana e meio de cascas de laranja para a fermentação.

## 4.5. Fermentação

Foram realizados 27 ensaios de fermentação em Erlenmeyer de 250 mL, sempre em triplicata: 9 ensaios com meio sintético (item 4.5.2.2), 9 ensaios com meio de cascas de banana (item 4.5.2.3) e 9 ensaios com meio de cascas de laranja (item 4.5.2.3). As mesmas condições de fermentação foram estudadas para os três meios avaliados.

As fermentações em Erlenmeyer foram realizadas em shaker orbital com temperatura controlada, a 30°C por 72 h. O pH inicial do meio de fermentação foi ajustado no valor de 4,5; 5,5 ou 6,5.

Foram avaliados três tipos de agitação:

- agitação de 150 rpm durante 5 min ao dia,
- agitação constante a 150 rpm nas primeiras 18 h seguida de fermentação estática até 72 h,
- agitação constante a 150 rpm durante as 72 h de fermentação.

Três tipos de inóculos também foram avaliados:

- inoculação somente com a bactéria *Z. mobilis*,
- inoculação com a levedura *P. stipitis* no início da fermentação e inoculação da bactéria *Z. mobilis* somente 24 h depois (a fim de evitar a inibição das células de *P. stipitis* pela *Z. mobilis*),
- inoculação simultânea com *Z. mobilis* e *P. stipitis* no início da fermentação.

### 4.5.1. Microrganismos

A bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e a levedura *Pichia stipitis* CCT 2617 foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP.

### 4.5.2. Meios de cultura

#### 4.5.2.1. Meios de crescimento e manutenção das culturas

A linhagem bacteriana de *Zymomonas mobilis* foi cultivada e mantida em tubos de ensaio contendo meio líquido denominado Zm e composto por (em g/L): glicose, 20; extrato de levedura, 10; peptona, 10. Após a inoculação as células foram mantidas em estufa a 30°C durante 24 h e, então, armazenadas em geladeira a 4°C.

A levedura *Pichia stipitis* foi mantida em tubos de ensaio a partir do cultivo de superfície em meio sólido inclinado (meio Ps) composto por (em g/L): glicose, 10; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5; ágar-ágar, 20. Após o crescimento em estufa a 28°C durante 48 h as células foram armazenadas em geladeira a 4°C.

Para melhor conservação ambos os microrganismos foram reativados mensalmente através de repiques em meio fresco.

#### 4.5.2.2. Meio sintético para fermentação

O meio sintético utilizado nas fermentações foi semelhante ao definido por Rodriguez e Callieri (1986), com algumas modificações, cuja composição (em g/L) foi: extrato de levedura, 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1; e a concentração desejada de açúcares. Três diferentes concentrações de glicose e xilose foram avaliadas conjuntamente: 25, 75 e 125 g/L, formando três meios sintéticos com concentração total de açúcares de 50, 150 e 250 g/L, respectivamente. As soluções de glicose e xilose foram esterilizadas separadamente a 121°C durante 15 min e, depois de resfriadas até temperatura ambiente, misturadas assepticamente no momento do preparo do meio de fermentação contendo os demais constituintes previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados. O pH do meio foi ajustado para o valor desejado de 4,5; 5,5 ou 6,5 com adições de NaOH e/ou HCl 2N.

#### 4.5.2.3. Meio de cascas de banana e meio de cascas de laranja para fermentação

O meio de cascas de banana e o meio de cascas de laranja na concentração de açúcares totais de 50, 150 e 250 g/L, depois de desintoxicados (item 4.4), foram autoclavados a 121°C durante 15 min. Após, foram misturados assepticamente com o meio de sais (meio definido por Rodriguez e Callieri (1986), item 4.5.2.2, sem a fonte de açúcar), previamente dissolvido em água destilada e esterilizado. O pH de cada meio foi ajustado para 4,5; 5,5 ou 6,5 com adições de NaOH e/ou HCl 2N.

### 4.5.3. Condições de fermentação

#### 4.5.3.1. Preparo do pré-inóculo

A partir das culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* armazenadas em geladeira foram feitos os pré-inóculos para reativação das células. Uma alíquota de 1 mL da cepa de *Z.*

*mobilis* armazenada foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio Zm, conforme descrito no item 4.5.2.1 e estes foram incubados em estufa a 30°C por 24 h. Uma alçada da cepa de *P. stipitis* armazenada foi repicada por esgotamento em tubos inclinados contendo 10 mL do meio Ps, conforme descrito no item 4.5.2.1, e estes foram incubados em estufa a 28°C durante 48 h.

#### 4.5.3.2. Pré-fermentação

As pré-fermentações foram realizadas separadamente para cada microrganismo. Para a *Z. mobilis*, 10 tubos de ensaio com os pré-inóculos obtidos no item 4.5.3.1 foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio Zm, descrito no item 4.5.2.1. Os frascos foram incubados em shaker orbital com temperatura controlada, a 30°C, durante 24 h. Para a *P. stipitis* obteve-se, primeiramente, uma suspensão celular pela adição de 5 mL de água destilada estéril ao pré-inóculo obtido no item 4.5.3.1. As suspensões celulares obtidas de 3 tubos com pré-inóculos foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio Ps, descrito no item 4.5.2.1, sem a adição de ágar. Os frascos foram então incubados em shaker orbital com temperatura controlada, a 28°C, durante 24 h e 150 rpm.

#### 4.5.3.3. Padronização do inóculo

A padronização do inóculo foi feita de acordo com Vignoli (2003) para garantir que a concentração de inóculo inicial fosse igual para todos os ensaios de fermentação. As suspensões celulares de *Z. mobilis* e *P. stipitis* obtidas na pré-fermentação (item 4.5.3.2) foram centrifugadas separadamente a 6941g, 4°C durante 15 min e ressuspensas em água destilada estéril.

Para a padronização utilizou-se espectrofotômetro. Em uma cubeta de vidro foram adicionados 3 mL de água destilada e gotas da cultura ressuspensa em água até atingir uma densidade ótica de 0,3 no comprimento de onda de 570 nm, para cada microrganismo. Por meio de uma regra de três foi possível calcular os volumes de inóculos iniciais de *Z. mobilis* e de *P. stipitis* a serem adicionados em cada frasco Erlenmeyer de 250 mL, de modo que o volume final de trabalho com a adição do meio sintético fosse 100 mL. O inóculo inicial foi calculado, então, por meio da Equação 1:

$$V_0 = \frac{100 \times y}{3 + y}$$

Onde:

$V_0$  = volume do inóculo inicial, em mL;

$y$  = volume de cultura ressuspensa em água para atingir densidade ótica de 0,3, em mL.

Para todos os experimentos realizados, o volume adicionado de células de *Z. mobilis* ressuspensas em água variou de 5 a 6 mL, enquanto que o volume de células de *P. stipitis* variou de 6 a 7 mL. De acordo com as curvas de calibrações construídas para cada microrganismo (Tabela 1.A e 2.A, e Figura 1.A e 2.A, no Anexo), o inóculo inicial em massa seca foi de 0,073 g/L para as fermentações realizadas somente com a bactéria *Z. mobilis*, e de 0,237 g/L para as fermentações com co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis*.

#### 4.6. Métodos analíticos

##### 4.6.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494

Para construção da curva de calibração relacionando a absorbância com diferentes concentrações da suspensão celular foi utilizada cultura de células de *Z. mobilis* obtida de forma semelhante ao processo de pré-fermentação para este microrganismo, conforme descrito no item 4.5.3.1, sendo que para a construção da curva os frascos Erlenmeyer de 250 mL foram deixados na estufa a 30°C por 72 h.

Um volume de 150 mL da cultura de *Z. mobilis* obtido foi centrifugado a 6941g, 4°C, durante 15 min e lavado duas vezes com água destilada. A massa celular úmida foi ressuspensa em 20 mL de água destilada e posteriormente foram preparadas diferentes diluições. Um volume de 7 mL de cada diluição preparada foi colocado em cadinhos de porcelana, previamente secos em estufa a 105°C e tarados. Os cadinhos foram, então, deixados na estufa a 105°C por 24 h. Findo o período, os cadinhos foram transferidos para um dessecador contendo cristais de sílica e mantidos até atingirem temperatura ambiente. Após o resfriamento, foram pesados em balança analítica, transferidos novamente para a estufa e, após 24 h, pesados de novo até a obtenção de massa

constante. A concentração celular de cada diluição preparada a partir da suspensão de células original foi determinada pela Equação 2:

$$X = \frac{(M_2 - M_1) \times 1000}{V}$$

Onde:

X = Concentração celular, em g/L;

M<sub>1</sub> = massa do cadinho vazio e tarado, em g;

M<sub>2</sub> = massa final do cadinho, em g;

V = volume de amostra colocado no cadinho, em mL.

Paralelamente, a absorbância das diferentes diluições preparadas a partir da suspensão de células original foi lida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 570 nm e, então, foi construída uma curva de calibração, relacionando a absorbância das diferentes diluições com a concentração celular (Tabela 1.A e Figura 1.A, no Anexo)

#### **4.6.2. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de *Pichia stipitis* CCT 2617**

Para a curva de calibração relacionando a absorbância com diferentes concentrações da suspensão celular de *P. stipitis* foi utilizada uma cultura de células obtida de forma idêntica ao processo de pré-fermentação para este microrganismo, conforme descrito no item 4.5.3.1.

Um volume de 50 mL da cultura de *P. stipitis* obtida foi centrifugado a 6941g, 4°C, durante 15 min e lavado duas vezes com água destilada. A massa celular úmida foi ressuspensa em 50 mL de água destilada e a partir daí foram preparadas diferentes diluições. Feitas as diluições, a curva de calibração para esta levedura (Tabela 2.A e Figura 2.A, no Anexo) foi construída utilizando a mesma metodologia descrita no item 4.6.1.

#### **4.6.3. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e *Pichia stipitis* CCT 2617**

A cultura de células para construção da curva foi obtida a partir de um inóculo da bactéria *Z. mobilis* e um inóculo da levedura *P. stipitis* padronizados como descrito no item 4.5.3.3. Estes foram inoculados simultaneamente em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio sintético com concentração de açúcares de 50 g/L. O frasco foi, então, colocado em incubadora a 30°C e 150 rpm por 24 h.

Um volume de 50 mL da cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* obtido foi centrifugado a 6941g, 4°C, durante 15 min e lavado duas vezes com água destilada. A massa celular úmida foi ressuspensa em 50 mL de água destilada e a partir daí foram preparadas diferentes diluições. Feitas as diluições, a curva de calibração para a *Z. mobilis* e *P. stipitis* crescendo simultaneamente (Tabela 3.A e Figura 3.A, no Anexo) foi construída utilizando a mesma metodologia descrita no item 4.6.1.

#### **4.6.4. Coleta e preparo das amostras durante a fermentação**

As amostras de cada ensaio de fermentação foram coletadas a cada 24 h em temperatura ambiente de 30°C. Primeiramente foi determinado o valor de pH do caldo fermentado e, em seguida, 10 mL do caldo foram centrifugados a 6941g, 4°C, durante 15 min, para a determinação da concentração celular em espectrofotômetro. O restante do caldo obtido foi centrifugado nas mesmas condições e o sobrenadante foi separado e congelado para as análises posteriores (determinação de etanol e açúcares totais).

#### **4.6.5. Determinação do pH**

O pH foi determinado diretamente no caldo fermentado por potenciometria.

#### **4.6.6. Determinação da concentração celular**

Após a centrifugação do caldo fermentado, a concentração celular foi determinada pela medição da absorbância de suspensões celulares diluídas em água destilada. As leituras foram feitas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm para os dois microrganismos. A conversão da suspensão microbiana em concentração celular (massa de matéria seca por unidade de volume) foi obtida através das curvas de calibração da concentração celular de *Z. mobilis* (item 4.6.1) ou *P. stipitis*

(item 4.6.2) para os ensaios com somente um desses microrganismos e através da curva de calibração de *Z. mobilis* e *P. stipitis* (item 4.6.3) para os ensaios onde os dois microrganismos foram inoculados juntos.

#### **4.6.7. Determinação de etanol**

O etanol foi determinado por cromatografia gasosa, após separação das células por centrifugação, utilizando cromatógrafo equipado com detector FID (Flame Ionization Detector), coluna – TR-WAX (30 m x 0,53 mm x 1,0 µm); temperatura do forno de 100°C (mantendo esta temperatura por toda corrida - isotérmica); tempo da corrida de 5 min; temperatura do injetor de 230°C; temperatura do detector de 270°C; injeção de 50 µl de vapor da amostra. As amostras foram deixadas em “dry block” em uma temperatura de 40°C (até atingir o equilíbrio). Para quantificação foi criada uma curva de calibração utilizando soluções de etanol absoluto em água como padrão, em concentrações de 7,89 a 78,90 g/L, nas mesmas condições descritas acima (Tabela 4.A e Figura 4.A, no Anexo).

#### **4.6.8. Determinação de açúcares totais (AT)**

Os açúcares totais (AT) foram determinados pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). Em um tubo de ensaio foram adicionados 500 µl da amostra, 500 µl de solução de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi levemente agitada e deixada em repouso, à temperatura ambiente, por 20 min. Após esse período, a coloração alaranjada produzida pela condensação do reagente fenol com os grupos aldeídos foi medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 490 nm, e a absorbância utilizada para calcular o conteúdo de açúcares totais nas amostras.

Para quantificação de AT foi utilizada curva de calibração obtida a partir de soluções aquosas de glicose nas concentrações de 0,02 a 0,10 g/L, nas mesmas condições descritas acima (Tabela 5.A e Figura 5.A, no Anexo).

#### **4.6.9. Determinação de açúcares redutores (AR)**

Os açúcares redutores (AR) foram determinados pelo método do cuproarsenato, descrito por Somogyi (1952) e Nelson (1944). Em um tubo de ensaio foram adicionados 500 µl da amostra e 500 µl de reativo de Somogyi. A mistura foi deixada em banho-maria

por 10 min e, após esfriar, adicionada de 500 µl de reativo de Nelson e 3,5 mL de água destilada, com posterior agitação manual vigorosa. A coloração azul produzida pela redução do arsênio-molibdico a óxido de molibdênio foi medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 540 nm, e o valor da absorbância utilizada para calcular o conteúdo de açúcares redutores nas amostras.

Para quantificação de AR foi utilizada curva de calibração utilizando soluções aquosas de glicose nas concentrações de 0,02 a 0,10 g/L, nas mesmas condições descritas acima (Tabela 6.A e Figura 6.A, no Anexo).

#### **4.6.10. Determinação dos teores de compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos totais foram determinados antes e depois da desintoxicação, nos meios contendo 50, 150 e 250 g/L de açúcares totais. A determinação foi feita pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Chaovanalikit e Wrolstad (2004), no qual a mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico em meio básico se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, originando óxidos azuis de tungstênio e molibdeno. O reagente de Folin-Ciocalteu tem sua coloração alterada de amarela para azul na presença de compostos fenólicos e a intensidade da coloração azul segue a Lei de Lambert-Beer (KUSKOSKI et al., 2005).

A reação foi composta por 500 µL do hidrolisado, 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso por 10 min, na ausência de luz e em temperatura ambiente; e seguida acrescentou-se 1,5 mL de solução de carbonato de sódio 20% e após 20 min foi feita a leitura da absorbância em 755 nm.

Para quantificação foi criada uma curva de calibração utilizando ácido vanílico como padrão, em concentrações de 0,05 a 0,25 g/L, nas mesmas condições descritas acima (Tabela 7.A e Figura 7.A, no Anexo). Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos como g de equivalentes de ácido vanílico por L de hidrolisado.

#### **4.7. Análise estatística**

Para as fermentações realizadas com meio sintético, meio de cascas de banana e meio de cascas de laranja foi empregado o planejamento experimental utilizando o software *Minitab 14*, a partir de um delineamento do tipo  $2^{4-1}$  (BOX; HINTER, 1978),

sendo necessários 8 experimentos e 3 repetições no ponto central, os 8 experimentos também foram realizados em triplicata.

As variáveis independentes estudadas foram:  $X_1$  = microrganismo;  $X_2$  = pH inicial;  $X_3$  = agitação e  $X_4$  = concentração inicial de açúcares. A Tabela 4 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis. A análise dos resultados e os efeitos principais e interações entre as variáveis do planejamento fatorial foram realizados através do programa computacional *Minitab 14*.

Tabela 4 - Variáveis independentes, codificadas, estudadas para o meio sintético, meio de cascas de banana e meio de cascas de laranja.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
$X_1$ - microrganismo	<i>Z. mobilis</i> t=0	<i>P. stipitis</i> t=0 e <i>Z. mobilis</i> t=24	<i>Z. mobilis</i> e <i>P. stipitis</i> t=0
$X_2$ - pH	4,5	5,5	6,5
$X_3$ - agitação	manual 5 min/dia	150 rpm até 18 h, depois estático	150 rpm
$X_4$ - concentração inicial de açúcares (g/L)	50	150	250

t = 0 - início da fermentação

t = 24 - após 24 h de fermentação

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio de hidrólise ácida com a casca de banana

No teste realizado para a hidrólise ácida, o emprego do aquecimento e do ácido diluído, simultaneamente, proporcionou maior liberação de açúcares do que a utilização destes fatores separadamente, conforme apresentado na Tabela 5. O emprego somente do aquecimento (Branco) ainda foi mais eficiente do que somente o ácido diluído (HA 0) na liberação de açúcares totais e redutores.

Os hidrolisados com ácido obtidos após 15 e 30 min de aquecimento em autoclave (ensaios HA 15 e HA 30) apresentaram teores de açúcares totais de 75,40 e 76,47 g/L, respectivamente (Tabela 5), não apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Já para os açúcares redutores, o tempo de 15 min apresentou aproximadamente 4 g/L a mais do que o tempo de 30 min. Desta forma, foi adotado o tempo de 15 min em autoclave para a etapa de hidrólise ácida das cascas de banana e das cascas de laranja.

Tabela 5 - Açúcares totais (AT) e redutores (AR) (g/L) liberados nos ensaios de hidrólise ácida das cascas de banana.

Ensaio de hidrólise ácida*	AT (g/L)	AR (g/L)
Branco	46,22 ± 6,11 <sup>b</sup>	38,73 ± 2,01 <sup>b</sup>
HA 0	35,02 ± 1,17 <sup>c</sup>	9,51 ± 1,50 <sup>c</sup>
HA 15	75,40 ± 6,01 <sup>a</sup>	43,90 ± 2,80 <sup>a</sup>
HA 30	76,47 ± 2,92 <sup>a</sup>	40,20 ± 3,84 <sup>a</sup>

Os resultados representam a média ± desvio padrão das análises realizadas em duplicata.

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

\*Branco - substrato aquecido (121°C, 15 min) sem adição de ácido; HA 0 - substrato em reação com ácido durante 15 min (sem aquecimento); HA 15 - substrato em reação com ácido a 121°C durante 15 min; HA 30 - substrato em reação com ácido a 121°C durante 30 min.

A escolha se deve ao fato de que quanto menor for o tempo de aquecimento na hidrólise ácida, maior a economia do processo e, principalmente, menor a quantidade de compostos inibidores e tóxicos que poderão ser formados pela degradação dos açúcares e da lignina. Em altas temperaturas e pressões, glicose e xilose podem ser degradadas

em hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente. Esses compostos, por sua vez, podem ser degradados formando ácido fórmico, que é tóxico para os microrganismos da fase de fermentação, inibindo seu metabolismo e interferindo negativamente no processo (FINGUERUT et al., 2008).

Schulz (2010) testou os tempos de 15 e 30 min para a hidrólise da casca de banana nanica *in natura*, utilizando ácido sulfúrico a 1 e 2% e temperatura de 120°C. Para a concentração de ácido de 1%, os valores de açúcares totais foram de 7,95 e 7,21 g/L em 15 e 30 min de reação, respectivamente. Para a concentração de 2%, esses valores foram de 8,13 e 7,89 g/L, respectivamente. Como observado, os valores de açúcares totais obtidos pelo autor também foram próximos nos tempos de 15 e 30 min, porém inferiores aos encontrados neste trabalho. Apesar de tratar-se do mesmo resíduo, a casca de banana foi utilizada sem secagem prévia na pesquisa citada, o que pode acarretar menor concentração de açúcares.

## 5.2. Hidrólise enzimática com a casca de banana

Após a realização da hidrólise enzimática todo o meio obtido foi filtrado e homogeneizado, a Tabela 6 apresenta as quantidades de AT e AR, liberadas por cada hidrólise, presentes nesse meio que foi utilizado nas fermentações. Lembrando que para as fermentações com quantidade inicial de açúcares de 50 g/L não houve concentração do meio; já para as fermentações com 150 e 250 g/L de açúcar, o meio obtido foi aquecido em banho-maria a 80°C, até atingir os respectivos teores de açúcares, isto é 150 e 250 g/L.

Tabela 6 - Açúcares totais (AT) e redutores (AR) (g/L), liberados pela hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática, das cascas de banana.

Hidrólise	AT (g/L)	AR (g/L)
Ácida	64,97 ± 2,11	35,19 ± 1,42
Enzimática	134,75 ± 6,51	91,81 ± 5,27

Em sua pesquisa, El-Zawawy et al. (2011) realizaram a hidrólise enzimática de resíduos da bananeira previamente submetidos a explosão a vapor. Para a hidrólise

empregou-se um complexo de celulases produzidas por *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma), a reação ocorreu a 50°C, pH de 4,7 e agitação de 75 rpm durante 4 dias. A maior quantidade de glicose liberada foi 8 g/L, depois de 3 dias de reação.

A hidrólise enzimática de cascas de banana, previamente secas em estufa a 60°C, também foi realizada por Oberoi et al. (2011). Foram utilizadas proporções variadas das enzimas celulase, cedida pela empresa Novozymes, e pectinase, cedida pela empresa Sigma-Aldrich. A maior quantidade de glicose (32,7 g/L) foi liberada em 20 h de reação, pH 5,5 a 40°C e proporção de pectinase:celulase de 8:1.

Schulz (2010) hidrolisou cascas de banana nanica *in natura* empregando o mesmo conjunto de enzimas utilizado no Ensaio I do presente trabalho e nas mesmas quantidades, porém a reação ocorreu a 45°C e pH de 4,5. A quantidade máxima de açúcares foi de 9,17 g/L, obtida depois de 2 h de reação. No mesmo trabalho, somente com a hidrólise ácida, o autor já havia encontrado 8,13 g/L de açúcar na casca de banana *in natura* e, dada a proximidade dos valores, não apontou como justificável o uso da hidrólise enzimática nos resíduos. Essa observação foi diferente da encontrada nesta pesquisa, onde, após a hidrólise enzimática, a quantidade de açúcares totais praticamente dobrou, justificando assim a realização dessa etapa.

### **5.3. Ensaio de hidrólise ácida com a casca de laranja**

Nos testes realizados para a hidrólise ácida, a Tabela 7 mostra que os hidrolisados obtidos depois de 15 e 30 min em autoclave apresentaram teor de AT de 101,30 e 101,07 g/L, e de AR de 65,89 e 65,05 g/L, respectivamente.

Observa-se que somente o uso de aquecimento (HA branco) liberou maior quantidade de AT do que somente o uso do ácido (HA 0), mesmo assim, a adição de ácido sulfúrico juntamente com o aquecimento em autoclave mostrou-se mais eficiente para a liberação de AT e AR, sendo o tempo de 15 min mais vantajoso, da mesma forma como observado para as cascas de banana.

Em estudo com cascas de laranja, Tejeda et al. (2010) também trataram esses resíduos com hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico a 5%. Após a hidrólise obtiveram 80 g/L de açúcares fermentescíveis, que produziram 13,9 g/L de etanol após fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 7 - Açúcares totais (AT) e redutores (AR) (g/L) liberados nos ensaios de hidrólise ácida das cascas de laranja.

Hidrólise ácida	AT (g/L)	AR (g/L)
Branco	71,04 ± 5,92 <sup>b</sup>	48,66 ± 6,01 <sup>b</sup>
HA 0	62,71 ± 2,86 <sup>b</sup>	22,11 ± 0,43 <sup>c</sup>
HA 15	101,30 ± 7,61 <sup>a</sup>	65,81 ± 6,22 <sup>a</sup>
HA 30	101,07 ± 2,60 <sup>a</sup>	65,05 ± 0,43 <sup>a</sup>

Os resultados representam a média ± desvio padrão das análises realizadas em duplicata.

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

\*Branco - substrato aquecido (121°C, 15 min) sem adição de ácido; HA 0 - substrato em reação com ácido durante 15 min (sem aquecimento); HA 15 - substrato em reação com ácido a 121°C durante 15 min; HA 30 - substrato em reação com ácido a 121°C durante 30 min.

#### 5.4. Hidrólise enzimática com a casca de laranja

Após a realização de toda a hidrólise enzimática com as cascas de laranja, o meio foi filtrado e homogeneizado para a realização das fermentações. A Tabela 8 apresenta os teores de açúcares totais e redutores liberados pelas hidrólises ácida e enzimática das cascas de laranja.

Tabela 8 - Açúcares totais (AT) e redutores (AR) (g/L), liberados pela hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática, das cascas de laranja.

Hidrólise	AT (g/L)	AR (g/L)
Ácida	101,30 ± 1,75	65,89 ± 2,14
Enzimática	176,70 ± 2,27	145,97 ± 3,19

Sharma et al. (2007) hidrolisaram uma mistura de resíduos de tangerina e banana, na proporção de 4:6, previamente secos em estufa a 70°C. A hidrólise enzimática ocorreu a 30°C por 72 h, com celulases provenientes de *Trichoderma reesei* Rut C-30. A máxima quantidade de açúcares redutores produzida foi 63 g/L.

## 5.5. Desintoxicação dos hidrolisados

Os teores de compostos fenólicos e açúcares totais (g/L) dos meios de casca de banana e casca de laranja com teor de 50, 150 e 250 g/L de açúcares, antes e depois do processo de desintoxicação, estão apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

A concentração dos meios proporcionou um aumento nos teores de açúcares para obtenção dos meios com 150 e 250g/L, esse aumento mostra que não houve degradação dos açúcares presentes nos hidrolisados pelo processo de concentração em banho-maria a 80°C, tanto para a casca de banana quanto para a casca de laranja.

Tabela 9 - Compostos fenólicos (g/L) e açúcares totais (AT) (g/L) antes e depois da desintoxicação dos meios de cascas de banana com teores de açúcar de 50, 150 e 250 g/L.

Desintoxicação	Teores de açúcar do meio (g/L)		
	50	150	250
Compostos fenólicos (g/L)			
Antes	0,95 ± 0,00 <sup>aC</sup>	2,53 ± 0,02 <sup>aB</sup>	3,86 ± 0,02 <sup>aA</sup>
Depois	0,06 ± 0,01 <sup>bC</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>bB</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>bA</sup>
AT (g/L)			
Antes	54,96 ± 0,77 <sup>a</sup>	154,44 ± 1,82 <sup>b</sup>	253,34 ± 0,91 <sup>c</sup>
Depois	52,57 ± 0,51 <sup>a</sup>	150,49 ± 0,13 <sup>b</sup>	244,08 ± 6,12 <sup>c</sup>

Os resultados representam a média ± desvio padrão das análises realizadas em duplicata.

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

A, B... (linha) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para as cascas de banana, o meio com 50 g/L de açúcar, que não foi concentrado, apresentou menor quantidade de compostos fenólicos antes da desintoxicação, já os meios com 150 e 250 g/L apresentaram maior quantidade de fenólicos e esse aumento foi proporcional ao maior tempo em banho-maria, mostrando que o aquecimento utilizado para a concentração dos meios também concentrou o teor de compostos fenólicos, potenciais inibidores da fermentação.

Tabela 10 - Compostos fenólicos (g/L) e açúcares totais (AT) (g/L) antes e depois da desintoxicação dos meios de cascas de laranja com teores de açúcar de 50, 150 e 250 g/L.

Desintoxicação	Concentração de açúcar do meio (g/L)		
	50	150	250
Compostos fenólicos (g/L)			
Antes	0,59 ± 0,01 <sup>aC</sup>	1,13 ± 0,06 <sup>aB</sup>	2,23 ± 0,11 <sup>aA</sup>
Depois	0,05 ± 0,01 <sup>bC</sup>	0,47 ± 0,05 <sup>bB</sup>	0,76 ± 0,02 <sup>bA</sup>
AT (g/L)			
Antes	60,66 ± 2,60 <sup>a</sup>	153,67 ± 1,95 <sup>b</sup>	259,23 ± 5,46 <sup>c</sup>
Depois	58,48 ± 1,46 <sup>a</sup>	151,00 ± 0,26 <sup>b</sup>	252,72 ± 5,07 <sup>c</sup>

Os resultados representam a média ± desvio padrão das análises realizadas em duplicata.

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

A, B... (linha) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

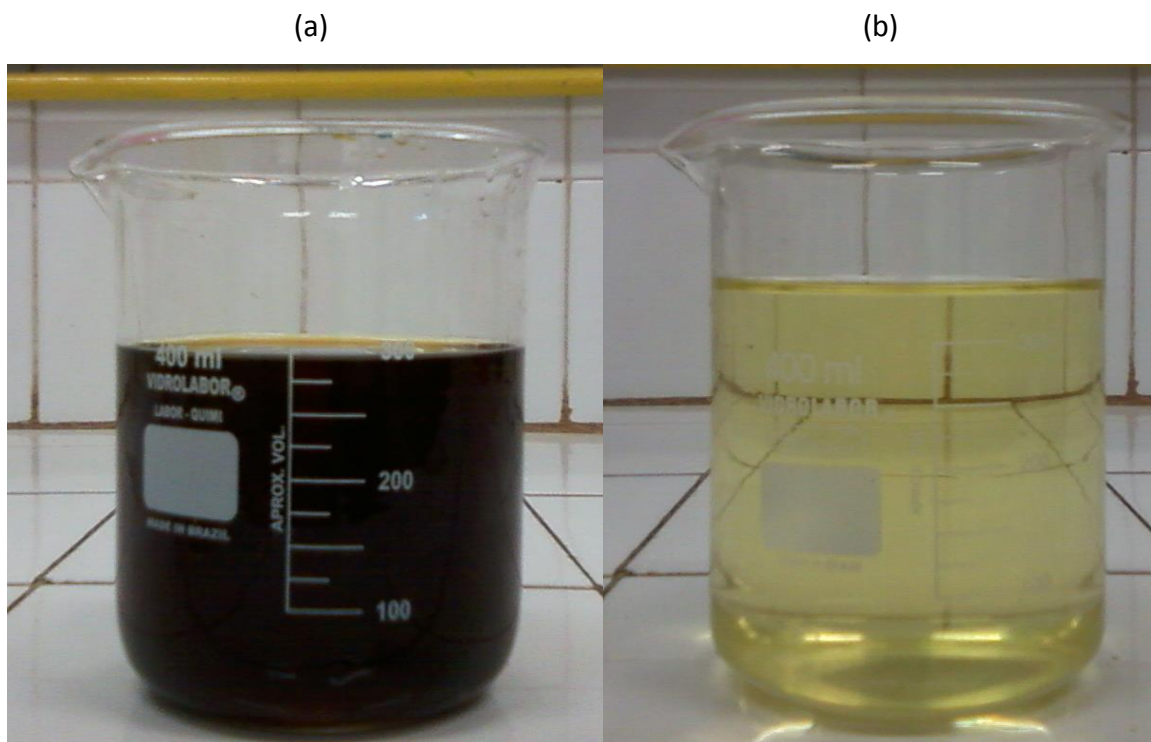
Para as cascas de laranja, o meio com 150 g/L foi concentrado em banho-maria para a obtenção do meio com 250 g/L de açúcar, o que também proporcionou o aumento no teor de compostos fenólicos.

Outros trabalhos também mostraram que a etapa de concentração dos meios aumenta, além dos teores de açúcares, a quantidade de compostos inibidores presentes. Em hidrolisado de palha de arroz concentrado com destilação a vácuo a 80°C, a quantidade de açúcares redutores aumentou de 16 para 30 g/L, enquanto os compostos fenólicos aumentaram de 0,95 para 1,58 g/L (YADAV et al., 2011); em outra concentração de hidrolisado de palha de arroz, dessa vez sob pressão reduzida em evaporador a 70°C, a quantidade de açúcares aumentou 9 vezes e os teores de hidroximetilfurfural de 0,20 para 0,50 g/L (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Após a desintoxicação, o teor de compostos fenólicos foi significativamente menor do que antes do tratamento, para todos os meios desintoxicados, como observado nas Tabelas 9 e 10. A diminuição de fenóis foi de 93%, 79% e 84% para os meios de cascas de banana com 50, 150 e 250 g/L de açúcar, respectivamente. Para o meio com cascas de laranja essa diminuição foi de 92%, 58% e 66% para os meios com 50, 150 e 250 g/L de açúcar, respectivamente. Esses dados indicam que o método

adotado para a desintoxicação foi eficaz na remoção de compostos fenólicos do meio. Visualmente também foi possível observar grande diferença na coloração, entre os meios antes e após o tratamento, como mostra a Figura 14, para o meio de cascas de banana com 50 g/L de açúcar.

Figura 14 - Meio de casca de banana, com 50 g/L de açúcares totais, (a) antes e (b) depois da desintoxicação.



Fonte: Autor

Apesar dos mecanismos de ação desses compostos sobre os microrganismos no processo de fermentação alcoólica ainda não terem sido completamente estudados, a redução dos teores de fenóis no meio é muito importante para o rendimento do processo, uma vez que estes produzem efeitos negativos na fermentação por meio da diminuição da taxa específica de crescimento do microrganismo e da produtividade de etanol (ROSSELL, 2006).

Para o processo de desintoxicação ser considerado vantajoso, além de diminuir a quantidade de compostos inibidores, ele não deve causar grande redução na quantidade de açúcar presente no meio. Como observado, a quantidade de açúcares diminuiu muito pouco nos três meios desintoxicados para cada casca e pôde ser

considerada estatisticamente igual à antes do tratamento (Tabelas 9 e 10). A remoção foi de apenas 4%, 2,5% e 3% para os meios de casca de banana; e 3,5%, 1,7% e 2,5% para os meios de cascas de laranja com 50, 150 e 250 g/L de açúcar, respectivamente. Também é possível inferir que nos meios com maior remoção de compostos fenólicos a diminuição na quantidade de açúcares também foi mais elevada.

Yadav et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes a este trabalho, a redução de açúcares foi de 3% e o teor de fenólicos totais diminuiu de 0,95 para 0,14 g/L depois da desintoxicação de hidrolisado de palha de arroz com carvão ativado. Na pesquisa de Mussatto e Roberto (2004) com palha de arroz, a máxima remoção de furfural e hidroximetilfurfural foi de 96% e 93%, respectivamente, com redução de açúcares em torno de 2%, após a desintoxicação com diferentes tipos de carvão ativado.

## **5.6. Fermentação com o meio sintético**

### **5.6.1. Crescimento celular na fermentação com meio sintético**

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das respostas para a concentração celular (biomassa) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético. As médias das 8 combinações realizadas em triplicata e as 3 repetições no ponto central é apresentada na Tabela 11.

Pode-se verificar que, em geral, as fermentações realizadas com as co-culturas apresentaram maiores valores de crescimento celular, esse maior crescimento foi facilmente observado, uma vez que o precipitado formado pela biomassa dessas fermentações, após centrifugação, era visivelmente maior que o precipitado formado pela biomassa somente da *Z. mobilis*.

Observa-se também que somente a corrida 1, realizada com todas as variáveis no nível -1, apresentou maior crescimento celular em 24 h de fermentação. A maioria das fermentações (corridas 2, 3, 4, 5, 8 e 9), tanto utilizando somente a bactéria como utilizando co-culturas, apresentaram maior valor de biomassa depois de 72 h de fermentação. As fermentações representadas pelas corridas 6 e 7 apresentaram maior crescimento celular em 48 h de fermentação, porém esses valores foram bem próximos aos observados para 72 h.

Tabela 11 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Biomassa (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	1,15	0,70	0,86
2	1	-1	-1	1	0,59	0,60	1,07
3	-1	1	-1	1	0,05	0,36	0,39
4	1	1	-1	-1	2,87	2,44	3,05
5	-1	-1	1	1	0,11	0,13	0,15
6	1	-1	1	-1	6,87	8,00	7,90
7	-1	1	1	-1	1,02	1,52	1,49
8	1	1	1	1	6,54	6,74	7,67
9*	0	0	0	0	6,95	7,21	7,32

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

O maior valor (8,00 g/L) foi obtido depois de 48 h na fermentação com co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* inoculadas no início da fermentação, pH de 4,5, agitação constante de 150 rpm e concentração inicial de açúcares de 50 g/L.

O menor valor de biomassa foi obtido depois de 24 h de fermentação utilizando somente a bactéria *Z. mobilis*, pH de 6,5, agitação manual de 5 min ao dia e concentração inicial de açúcares de 250 g/L (corrida 3, Tabela 11). Apesar dessa fermentação apresentar o menor valor observado, depois de 48 h de fermentação a biomassa teve um crescimento considerável, obtendo média de biomassa nos três tempos de 0,27 g/L. Avaliando-se os três tempos de fermentação em conjunto, a fermentação que apresentou menores valores de biomassa foi a realizada somente com a bactéria *Z. mobilis*, pH de 4,5, agitação constante de 150 rpm e concentração inicial de açúcares de 250 g/L (corrida 5, Tabela 11), com média de biomassa nos três tempos de 0,13 g/L, mostrando que realmente foi a fermentação com menores valores de crescimento celular.

A Tabela 12 apresenta a estimativa dos efeitos principais para cada variável, assim como as interações entre elas, e o valor de  $p$  para a resposta da biomassa, depois de 24, 48 e 72 h de fermentação. Entre os efeitos principais, as variáveis independentes  $X_1$  (microrganismo) e  $X_3$  (agitação) foram significativas ( $p < 0,05$ ) para a resposta da biomassa em todos os tempos de fermentação, sendo que a variável que mais influenciou o crescimento celular foi  $X_1$ , que apresentou maiores valores para o efeito. As variáveis  $X_2$  (pH) e  $X_4$  (concentração inicial de açúcares) não influenciaram de forma significativa o processo fermentativo para a resposta da biomassa, entretanto, pode-se dizer que entre estes o que apresentou menor efeito foi o pH inicial do caldo.

Tabela 12 - Estimativa dos efeitos principais e valor de  $p$  referentes ao delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.

Variáveis	Biomassa (h)					
	24		48		72	
	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$
Intercepto*	2,905	0,000	3,080	0,000	3,323	0,000
$X_1$ *	3,635	0,000	3,770	0,000	4,199	0,000
$X_2$	0,441	0,534	0,408	0,574	0,652	0,357
$X_3$ *	2,467	0,002	3,073	0,000	2,957	0,000
$X_4$	-1,156	0,114	-1,211	0,106	-1,006	0,162
$X_1X_2$	0,540	0,448	-0,115	0,873	0,220	0,754
$X_1X_3$ *	2,505	0,002	2,779	0,001	2,768	0,001
$X_1X_4$	-0,146	0,836	-0,341	0,639	-0,102	0,884

\* Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ( $p < 0,05$ ).

$X_1$  (microrganismo);  $X_2$  (pH inicial);  $X_3$  (agitação);  $X_4$  (concentração inicial de açúcares).

Pela Tabela 12 pode-se notar que, a com exceção da variável  $X_4$  (concentração inicial de açúcares), as demais variáveis independentes testadas apresentaram efeito positivo sobre o crescimento celular, ou seja, a biomassa aumentou quando essas variáveis estavam no nível maior. A única variável que teve efeito negativo foi a concentração inicial de açúcares, assim, a biomassa foi maior quando a concentração de açúcares foi menor. Esse comportamento foi observado para os três tempos de

fermentação. As variáveis com significância estatística (microrganismo e agitação) causaram maior variação na média da biomassa, enquanto que para as variáveis que não influenciaram significativamente o processo (pH e concentração inicial de açúcares) a média do crescimento celular pouco variou.

### 5.6.2. pH final do caldo na fermentação com meio sintético

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das medições para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético. A Tabela 13 apresenta as médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.

Tabela 13 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	pH		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	3,81	3,86	3,83
2	1	-1	-1	1	4,18	3,97	3,74
3	-1	1	-1	1	5,20	4,30	3,62
4	1	1	-1	-1	3,91	3,82	3,97
5	-1	-1	1	1	3,79	3,56	3,40
6	1	-1	1	-1	3,79	3,74	3,75
7	-1	1	1	-1	4,03	3,88	3,80
8	1	1	1	1	3,99	3,69	3,84
9*	0	0	0	0	4,05	3,87	3,73

\* pontos centrais.

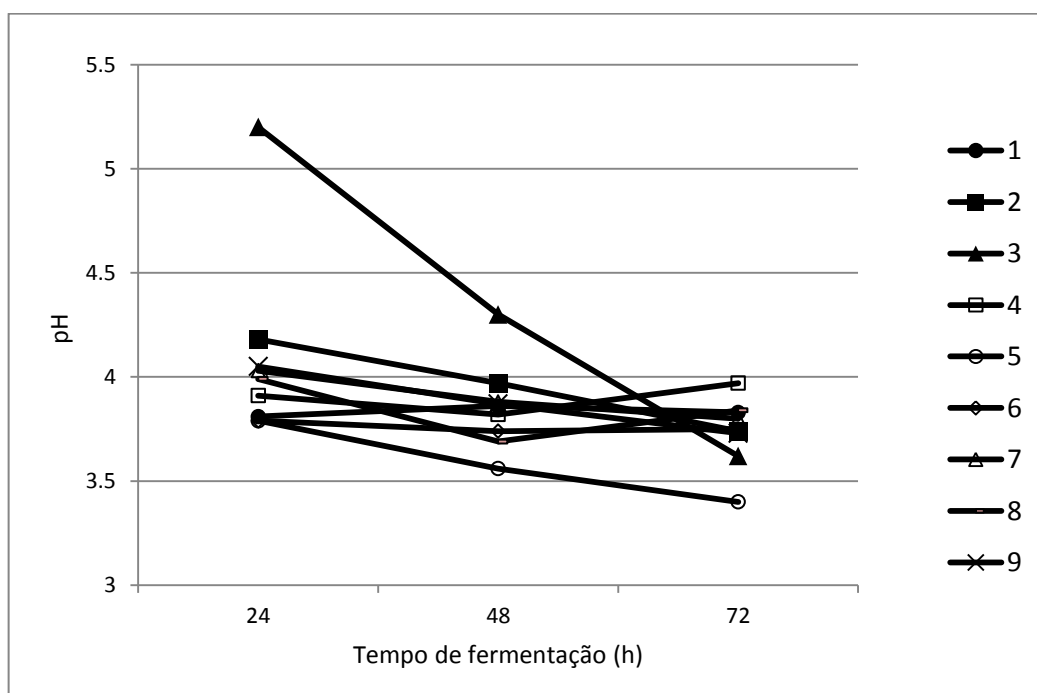
X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

Verifica-se que, depois de 24 h, as fermentações representadas pelas corridas 2 e 3 apresentaram menor diminuição de pH com relação ao valor inicial, que foi de 4,5 e 6,5, respectivamente. No tempo de 24 h o crescimento celular nessas fermentações

também foi menor (Tabela 11). A fermentação representada pela corrida 2 teve biomassa de 0,59 g/L, a menor observada para o crescimento da co-cultura. Já a fermentação representada pela corrida 3 teve biomassa de 0,05 g/L, que foi o menor valor observado. A diminuição do pH do caldo normalmente está relacionada com o catabolismo dos carboidratos, o qual resulta na liberação de ácidos como um dos produtos finais da produção de energia utilizada para o crescimento celular (FERREIRA, 2007), fato este que explica a pouca diminuição do pH nos tempos com baixa produção de biomassa.

A partir das médias de pH final do caldo para cada tempo de fermentação (Tabela 13) foi construído um gráfico relacionando, para cada corrida, os valores de pH final depois de 24, 48 e 72 h de fermentação (Figura 15).

Figura 15 - Valores de pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio sintético.



\* Legenda - os números de 1 a 9 representam cada uma das corridas, indicadas na Tabela 13.

Observa-se que a maioria das corridas apresentou o mesmo comportamento para a variação do pH final, com os valores concentrados ao redor de 3,5 e 4. Destaca-se a corrida 3, que representa a fermentação com maior valor de pH em 24 h (menor diminuição em relação ao pH inicial de 6,5), como já exposto. A corrida 5 apresenta

valores de pH um pouco mais baixos que as demais corridas, no entanto, o crescimento celular nessa fermentação também foi menor. Neste caso, possivelmente, a bactéria *Z. mobilis* foi submetida às condições de estresse que resultariam na síntese de outros metabólitos secundários, influenciando na diminuição do pH final.

### 5.6.3. Produção de etanol na fermentação com meio sintético

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das respostas para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético. A Tabela 14 apresenta a média das 8 combinações realizadas em triplicata e as 3 repetições no ponto central.

Tabela 14 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a produção de etanol (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Etanol (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	6,61	7,01	7,10
2	1	-1	-1	1	12,58	15,05	77,02
3	-1	1	-1	1	3,71	6,23	11,29
4	1	1	-1	-1	8,54	17,50	11,29
5	-1	-1	1	1	0,98	1,94	2,86
6	1	-1	1	-1	10,30	22,11	19,00
7	-1	1	1	-1	3,73	5,86	6,43
8	1	1	1	1	24,07	27,50	28,42
9*	0	0	0	0	26,14	27,27	44,84

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

Considerando a maior produção de etanol obtida por cada corrida nos três tempos, todas as fermentações realizadas com as co-culturas apresentaram maior produção de etanol do que as fermentações somente com a bactéria *Z. mobilis*,

possivelmente porque a maioria da xilose não pôde ser convertida em etanol pela *Z. mobilis*.

A quantidade de etanol produzida variou de 0,98 a 77,02 g/L. O menor valor foi obtido na fermentação somente com a bactéria *Z. mobilis*, pH de 4,5, agitação constante de 150 rpm e concentração inicial de açúcares de 250 g/L, depois de 24 h de fermentação (corrida 5, Tabela 14), essas condições propiciaram também a menor produção máxima obtida, que foi de 2,86 g/L após 72 h de fermentação. Assim como observado para o crescimento celular no meio sintético, o menor valor de etanol também foi obtido na fermentação que empregou somente *Z. mobilis*, maior aeração do meio, com agitação constante de 150 rpm, e concentração inicial de açúcares de 250 g/L.

A maior produção de etanol (77,02 g/L) foi obtida depois de 72 h de fermentação pela co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* em pH 4,5, agitação manual de 5 min ao dia e concentração inicial de açúcares de 250 g/L. Pela Tabela 14 é possível observar também que as maiores produções de etanol, para cada corrida, foram entre 48 e 72 h de fermentação.

As fermentações realizadas somente com *Z. mobilis* obtiveram maior produção de etanol de 7,10 e 11,29 g/L, nos meios com concentração inicial de açúcares de 50 e 250 g/L, respectivamente. Bodhisatta et al. (2011) encontraram em sua pesquisa com *Zymomonas mobilis* produção de etanol de 8,67 g/L, em meio de fermentação com concentração inicial de açúcares de 250 g/L e pH 5,8, durante 40 h de incubação a 40°C. Resultado similar foi encontrado neste trabalho para a fermentação somente com *Z. mobilis*, utilizando-se um conteúdo bem menor de açúcares e menor temperatura de incubação, o que se torna mais vantajoso também do ponto de vista econômico.

Já nas fermentações com co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* os valores máximos de etanol, para concentração inicial de açúcares de 50 e 250 g/L, foram de 22,11 e 77,02 g/L, representando cerca de 211 e 580% a mais que a maior produção observada no processo com *Z. mobilis* sozinha, respectivamente. Esses dados mostram que a utilização de co-culturas na fermentação de meios contendo glicose e xilose realmente proporciona maior produção de etanol, já que tanto as hexoses como as pentoses são metabolizadas pelos microrganismos. Além disso, todas as condições estudadas no presente trabalho permitiram o crescimento simultâneo de *Z. mobilis* e *P. stipitis* em meio sintético e a co-fermentação da glicose e xilose por esses

microrganismos, proporcionando uma maior produção de etanol quando comparada a fermentação de *Z. mobilis* sozinha.

Em estudo com co-culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis* a 30°C, pH 5,5 e concentração inicial de açúcares de 30 g/L, a maior produção de etanol foi de 12 g/L em 36 h de incubação a 150 rpm. Nas mesmas condições, a fermentação realizada somente com *Saccharomyces cerevisiae* apresentou quantidade máxima de etanol de 7,50 g/L (YADAV et al., 2011).

Em fermentação com monocultura de *Pichia stipitis* a 30°C e 250 rpm, a produção de etanol foi de 9,36 g/L, em meio contendo 50 g/L de xilose e pH 6, após 48 h de fermentação (OLIVEIRA, 2010). Ernandes (2009) avaliou a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* durante 24 h a 200 rpm. Em meio contendo 50 g/L de sacarose e pH 4 a 40°C, a produção foi de 11,43 g/L de etanol; em meio com 150 g/L de sacarose e pH 6 a 30°C, a produção de etanol foi de 15,50 g/L; já em meio com 250 g/L de sacarose e pH 4 a 40°C, o teor de etanol foi de 30,50 g/L.

Comparando-se as fermentações realizadas com monoculturas de *P. stipitis* e de *Z. mobilis* realizadas por Yadav et al. (2011), Oliveira (2010) e Ernandes (2009) com as fermentações com co-culturas desses dois microrganismos realizadas neste trabalho, pode-se perceber que a utilização dos dois microrganismos em conjunto proporcionou maior produção de etanol, partindo-se de fermentações com quantidade de açúcares de 50, 150 e 250 g/L. A levedura *Pichia stipitis* foi previamente catalogada como o microrganismo mais adequado para conversão de D-xilose a etanol (PEREIRA Jr., 1991).

Fu et al. (2009) avaliaram a produção de etanol por *Z. mobilis* e *P. stipitis* a partir de meio com concentração inicial de açúcares de 50 g/L, sendo 30 g/L de glicose e 20 g/L de xilose, temperatura de 30°C e 150 rpm. Dois tipos de inóculos foram testados: células livres de *Z. mobilis* e *P. stipitis*; e células imobilizadas de *Z. mobilis* inoculadas primeiro e inativadas antes da inoculação de células livres de *P. stipitis*, ao final da utilização da glicose. Esses dois inóculos apresentaram, respectivamente, máxima produção de etanol de 17 g/L, depois de 35 h de fermentação, e 25 g/L em 25 h de fermentação. Segundo estes autores, considerando a energia necessária para a inativação das células de *Z. mobilis* por autoclave antes da inoculação de *P. stipitis* e o prolongamento do processo fermentativo, que nesse caso é feito em duas etapas; a co-fermentação seqüencial

desses dois microrganismos, apesar de apresentar maior produção de etanol, é menos vantajosa do que a co-cultura simultânea.

Em outro trabalho, Fu e Peiris (2008) analisaram a produção de etanol a 30°C por co-culturas de *Z. mobilis* e *Pachysolen tannophilus* e culturas isoladas desses microrganismos. No ensaio com *Z. mobilis*, meio composto de 50 g/L de glicose e agitação de 100 rpm, a máxima produção de etanol foi de 23,5 g/L em 8 h de fermentação. No ensaio com *P. tannophilus*, meio com 50 g/L de xilose e agitação de 250 rpm, o maior teor de etanol foi de 7,31 g/L depois de 76 h de fermentação. No processo fermentativo com a co-cultura, meio com 60 g/L de glicose e 40 g/L de xilose e agitação de 100 rpm nas 12 primeiras h seguida de 250 rpm no tempo restante, a produção máxima de etanol foi de 32,55 g/L em 144 h de fermentação. A co-cultura empregada no trabalho de Fu e Peiris também proporcionou maior produção de etanol do que os microrganismos sozinhos, porém, esses valores foram menores do que os obtidos no presente trabalho para a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis*.

Na fermentação representada pela corrida 2, onde a produção de etanol foi a maior obtida pela co-cultura, o crescimento celular no meio sintético para os dois microrganismos juntos foi o menor observado. Da mesma forma para a monocultura de *Z. mobilis*, a corrida 3 que apresenta a maior produção de etanol obteve um dos menores crescimentos celulares. No entanto, vale ressaltar que houve uma baixa correlação entre o crescimento celular e a produção de etanol para a fermentação com o meio sintético, nos tempos de 24 e 48 de fermentação o valor de  $r^2$  (coeficiente de correlação) foi de 0,641 e 0,786, respectivamente. Em 72 h de fermentação essa correlação foi menor ainda, com valor de  $r^2$  de 0,048, mostrando que as duas respostas não dependem uma da outra. Isso pode ocorrer porque a *Z. mobilis* é um microrganismo com crescimento celular independente da produção de etanol, e devido a essa particularidade, este microrganismo é considerado um excelente produtor de etanol (KALNEINIEKS, 2006 ).

Quanto aos rendimentos da produção de etanol no meio sintético com concentração inicial de açúcar de 50, 150 e 250 g/L, a máxima produção de etanol (22,11; 44,84 e 77,02 g/L, respectivamente) correspondeu a cerca de 44%, 30% e 30% do substrato inicial presente no meio sintético, respectivamente, mostrando, portanto, que o rendimento em produto decresceu com o aumento do substrato inicial e o maior rendimento para a produção de etanol foi com concentração inicial de açúcar de 50 g/L.

Com relação a quantidade de açúcares consumidos durante a fermentação (Tabela 15), os rendimentos seguiram esse mesmo comportamento. As máximas produções de etanol nos meios de 50, 150 e 250 g/L (22,11; 44,84 e 77,02 g/L de etanol, respectivamente) apresentaram rendimento de 47%, 44%, 42%, respectivamente. Segundo alguns autores, em concentrações de açúcares inferiores a 100 g/L não há perdas de fonte de carbono para a formação de sorbitol ou frutooligossacarídeos, além de apresentarem maior eficiência de conversão em etanol e menor quantidade de açúcar residual (DOELLE; GREENFIELD, 1985; KIRK; DOELLE, 1993).

Tabela 15 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a concentração de AT no meio (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	AT (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	35,76	24,90	14,96
2	1	-1	-1	1	204,56	167,93	69,43
3	-1	1	-1	1	228,83	180,10	104,53
4	1	1	-1	-1	33,75	12,58	9,98
5	-1	-1	1	1	239,90	226,48	217,86
6	1	-1	1	-1	27,52	3,23	2,12
7	-1	1	1	-1	38,29	27,06	16,32
8	1	1	1	1	197,41	140,16	125,49
9*	0	0	0	0	95,53	60,78	48,50

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

A Tabela 16 apresenta a estimativa dos efeitos principais para cada variável, assim como as interações entre elas, e o valor de  $p$  para a resposta da produção de etanol, depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético.

Tabela 16 - Estimativa dos efeitos principais e valor de  $p$  referentes ao delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio sintético.

Variáveis	Etanol (h)					
	24		48		72	
	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$
Intercepto*	10,979	0,000	14,193	0,000	23,138	0,000
$X_1$ *	9,582	0,002	15,959	0,000	27,013	0,000
$X_2$	2,927	0,293	2,064	0,403	-12,138	0,007
$X_3$	2,442	0,378	2,519	0,309	-12,494	0,005
$X_4$	2,507	0,366	-0,056	0,982	18,946	0,000
$X_1X_2$	1,939	0,482	1,858	0,451	-16,016	0,001
$X_1X_3$	4,181	0,139	6,009	0,022	-7,949	0,061
$X_1X_4$	6,399	0,029	1,524	0,535	18,634	0,000

\* Variáveis que influenciaram nos três tempos do processo fermentativo ( $p < 0,05$ ).

$X_1$  (microrganismo);  $X_2$  (pH inicial);  $X_3$  (agitação);  $X_4$  (concentração inicial de açúcares).

Entre os efeitos principais, a variável independente  $X_1$  (microrganismo) foi a única significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os tempos de fermentação, apresentando efeito positivo para a resposta da produção de etanol, ou seja, a utilização da co-cultura proporcionou uma produção de etanol estatisticamente maior do que a bactéria *Z. mobilis* sozinha. Mais uma vez esses dados comprovam a maior eficiência da utilização da co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis*, possibilitando a fermentação da glicose e xilose do meio sintético, em comparação a cultura de *Z. mobilis* sozinha.

As variáveis independentes  $X_2$  (pH),  $X_3$  (agitação) e  $X_4$  (concentração inicial de açúcares) apenas influenciaram de forma significativa o processo fermentativo para a resposta da produção de etanol no tempo de 72 h. Além disso, o efeito destas variáveis oscilou nos três tempos de fermentação, no tempo de 24 h as três variáveis apresentaram efeito positivo sobre a produção de etanol, no tempo de 48 h só a concentração de açúcares apresentou efeito negativo, já no tempo de 72 h de fermentação, onde as três variáveis apresentaram efeito significativo, a produção de etanol foi favorecida pelo pH de 4,5, agitação manual e concentração inicial de açúcares de 250 g/L.

Quando as variáveis apresentaram significância estatística, o efeito das mesmas foi bem maior, causando maior variação na média da produção de etanol, por outro lado, quando as variáveis não influenciaram significativamente o processo causaram pouca oscilação na média e um baixo valor de efeito. Entre todas as variáveis analisadas, o microrganismo apresentou o maior efeito para a produção de etanol, seguida da concentração inicial de açúcares.

## **5.7. Fermentação com o meio de cascas de banana**

### **5.7.1. Crescimento celular na fermentação com meio de cascas de banana**

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das respostas para a concentração celular (biomassa) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de banana. A Tabela 17 apresenta a média das 8 combinações realizadas em triplicata e as 3 repetições no ponto central.

Verifica-se que as fermentações realizadas com as co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* apresentaram maior valor de biomassa do que as fermentações somente com *Z. mobilis*. Da mesma forma como observado para o meio sintético, esse maior crescimento celular das co-culturas foi visivelmente detectado após a centrifugação do caldo de fermentação, onde o precipitado formado pelas células das co-culturas era bem maior.

Tanto para as fermentações com *Z. mobilis* sozinha como para as co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* houve crescimento celular em relação ao valor de inóculo inicial, que foi de 0,07 e 0,24 g/L, respectivamente. Para todas as corridas com o meio de cascas de banana os valores de biomassa variaram de 0,56 a 15,19 g/L, esse intervalo de crescimento foi bem superior ao observado para as fermentações com o meio sintético (0,05 a 8,00 g/L). Na composição do meio de banana, além dos açúcares, podem existir outros nutrientes vindos da casca, principalmente sais minerais, que favoreceram uma melhor adaptação e maior crescimento celular dos microrganismos, em relação ao meio sintético.

Os principais sais minerais da casca de banana são o potássio, cálcio, sódio e magnésio, numa concentração de 300, 92; 66,71; 54,27 e 29,96 mg em cada 100 g de casca, respectivamente (GONDIM et al., 2005). Ernandes (2009) avaliou o efeito de sais minerais no crescimento de *Z. mobilis* e concluiu que a biomassa da bactéria foi

proporcional ao aumento de potássio e cálcio no meio de fermentação. Já a concentração de sais contendo magnésio apresentou grande influência sobre crescimento celular de *P. stipitis* (SLININGER et al., 2006).

Tabela 17 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Biomassa (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	1,73	1,87	1,73
2	1	-1	-1	1	2,33	2,42	2,84
3	-1	1	-1	1	0,90	1,02	1,12
4	1	1	-1	-1	8,97	11,00	15,19
5	-1	-1	1	1	0,78	0,95	0,92
6	1	-1	1	-1	1,83	4,07	6,36
7	-1	1	1	-1	0,56	1,16	0,81
8	1	1	1	1	2,10	2,25	2,16
9*	0	0	0	0	3,99	4,66	4,82

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

O máximo valor de biomassa foi obtido depois de 48 ou 72 h, para todas as fermentações. Para as co-culturas o máximo crescimento ocorreu depois de 72 h, exceto para a corrida 8; já para a *Z. mobilis* sozinha o máximo crescimento foi obtido em 48 h, exceto para a corrida 3.

O menor valor de crescimento máximo foi obtido depois de 48 h pela fermentação de *Z. mobilis* em pH 4,5, agitação constante de 150 rpm e concentração inicial de açúcares de 250 g/L. Essas mesmas condições propiciaram o menor crescimento celular também para o meio sintético, reforçando o fato da bactéria *Z. mobilis* desenvolver-se melhor em condições de menor agitação e menor concentração de substrato. Pela Tabela 17 é possível observar que o maior crescimento para a *Z.*

*mobilis* sozinha (1,87 g/L) ocorreu exatamente nessas condições, com pouca agitação e concentração inicial de açúcares de apenas 50 g/L.

Este comportamento da bactéria *Z. mobilis* pode ser devido à fisiologia do microrganismo, que é anaeróbio facultativo, e como a agitação pode promover a incorporação de oxigênio no meio, este passa a ser um fator limitante para seu desenvolvimento (ALTERTHUM, 2001). Cazetta et al. (2007) avaliaram o efeito da agitação na fermentação de melaço e também obtiveram maior biomassa de *Z. mobilis* (1,07-1,40 g/L) em meio sem agitação, em comparação ao meio agitado a 180 rpm.

Quanto a preferência por menores concentrações de açúcares, Oliveira et al. (2004) também relataram maior crescimento de *Z. mobilis* (0,88 g/L) em meio contendo menor teor de sacarose. Camilios Neto et al. (2005) compararam a produção de biomassa por *Z. mobilis* em fermentação de melaço de cana-de-açúcar com 55 e 100 g/L de açúcares redutores, o maior crescimento (1,81 g/L) foi observado na fermentação com menor concentração de açúcar, e foi semelhante ao obtido no presente trabalho.

A maior concentração celular (15,19 g/L) foi obtida pela co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* e, assim como observado para a fermentação com *Z. mobilis* sozinha, ocorreu nas condições de agitação manual e concentração inicial de açúcares de 50 g/L, porém com pH inicial ajustado para 6,5 e após 72 h de fermentação. No meio sintético (Tabela 11), a fermentação da co-cultura em 50 g/L de açúcar também resultou no maior valor de biomassa, porém com agitação constante de 150 rpm e pH de 4,5. O valor de 15,19 g/L de biomassa foi bastante elevado em comparação ao crescimento celular observado nas demais fermentações, sendo cerca de 238% maior do que a segunda maior biomassa, 6,36 g/L também na fermentação da co-cultura em meio com 50 g/L de açúcar; e 535% maior que o crescimento celular máximo nas fermentações com 250 g/L de açúcares totais, 2,84 g/L.

Altas concentrações celulares de *P. stipitis* também foram obtidas por Delgenes et al. (1996), a fermentação de meio com 72 g/L de xilose e pH 5, a 30°C e 150 rpm, produziu uma biomassa de 20 g/L. Com co-cultura de *P. stipitis* e *Saccharomyces diastaticus* em meio com 41 g/L de glicose e 9 g/L de xilose, esses autores obtiveram biomassa de 28 g/L, nas mesmas condições anteriores. De acordo com Rosa e Peter (2006), o interesse no potencial biotecnológico das leveduras, como a *P. stipitis*, foi impulsionado pela facilidade na obtenção de grandes quantidades de massa celular e

pela habilidade de crescimento em uma ampla variedade de substrato, faixas de pH e taxas de oxigênio.

A Tabela 18 apresenta a estimativa dos efeitos principais para cada variável, assim como as interações entre elas, e o valor de  $p$  para a resposta da biomassa, depois de 24, 48 e 72 h de fermentação.

Tabela 18 - Estimativa dos efeitos principais e valor de  $p$  referentes ao delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.

Variáveis	Biomassa (h)					
	24		48		72	
	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$
Intercepto*	2,577	0,000	3,264	0,000	3,992	0,000
$X_1^*$	2,818	0,000	3,682	0,000	5,490	0,000
$X_2^*$	1,463	0,000	1,525	0,000	1,863	0,000
$X_3^*$	-2,163	0,000	-1,965	0,000	-2,652	0,000
$X_4^*$	-1,745	0,000	-2,862	0,000	-4,268	0,000
$X_1X_2^*$	1,988	0,000	1,850	0,000	2,225	0,000
$X_1X_3^*$	-1,522	0,000	-1,573	0,000	-2,093	0,000
$X_1X_4^*$	-1,440	0,000	-2,330	0,000	-4,017	0,000

\* Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ( $p < 0,05$ ).

$X_1$  (microrganismo);  $X_2$  (pH inicial);  $X_3$  (agitação);  $X_4$  (concentração inicial de açúcares).

Entre os efeitos principais, todas as variáveis independentes testadas,  $X_1$  (microrganismo),  $X_2$  (pH),  $X_3$  (agitação) e  $X_4$  (concentração inicial de açúcares), foram significativas ( $p < 0,05$ ) para a resposta da biomassa em todos os tempos de fermentação. A variável que mais influenciou o crescimento celular foi  $X_1$  (microrganismo), que apresentou maiores valores para o efeito, seguida da concentração inicial de açúcares e agitação; o pH foi a variável que menos influenciou a fermentação, com menor valor para o efeito.

Verifica-se que as variáveis microrganismo e pH inicial apresentaram efeito positivo sobre a fermentação, enquanto que as variáveis agitação e concentração inicial de açúcares tiveram efeito negativo. Sendo assim, a biomassa no meio de cascas de

banana foi favorecida quando o microrganismo e pH estavam no nível maior e a agitação e concentração de açúcares no nível menor, ou seja, pela fermentação com as co-culturas, pH inicial de 6,5, agitação manual de 5 min ao dia e 50 g/L de açúcares. O mesmo comportamento quanto ao efeito das variáveis no crescimento celular foi observado para o meio sintético, exceto quanto à agitação do meio.

A variação de 100 a 200 rpm de agitação causou efeito positivo sobre o crescimento de *P. stipitis* em estudo de Silva (2007), com maior biomassa na agitação de 200 rpm. A agitação causou esse mesmo efeito positivo no crescimento celular para as fermentações com o meio sintético do presente estudo, porém o efeito foi negativo para o meio de cascas de banana.

A influência do pH também foi positiva para a obtenção da biomassa de *P. stipitis* em estudo realizado por Cabral et al. (2011), os autores analisaram a faixa de pH de 3,24 a 6,98, sendo o maior crescimento celular em pH 6,98. Cunha et al. (2004) avaliaram a influência de diferentes concentrações de açúcar para a fermentação com *P. stipitis*, variando o teor de xilose do meio de 20 a 100 g/L, e também reportaram um efeito negativo dessa variável, sendo o maior crescimento celular na concentração de 20 g/L de xilose.

### **5.7.2. pH final do caldo na fermentação com meio de cascas de banana**

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das medições para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de banana. A Tabela 19 apresenta as médias das 8 combinações realizadas em triplicata e as 3 repetições no ponto central.

Pode-se verificar que as fermentações com pH inicial ajustado para 4,5 apresentaram um aumento no pH final do caldo nos tempos de 24, 48 e 72 h, exceto para a corrida 5 nos tempos de 48 e 72 h, onde o pH final dos caldos diminuiu. Já para as fermentações com pH inicial ajustado para 5,5 e 6,5, o valor do pH final do caldo diminuiu durante os tempos de fermentação para todas as corridas.

A corrida número 5 apresentou os menores valores de pH final do caldo, sendo também a única fermentação com pH inicial ajustado para 4,5 que obteve queda desse valor. Essa fermentação foi realizada somente com a bactéria *Z. mobilis* e concentração inicial de açúcares de 250 g/L, a *Z. mobilis* quando em meio rico em açúcar tem a

capacidade de produzir, além de etanol, subprodutos como levana e sorbitol e pequenas quantidades de lactato, acetaldeído, glicerol, acetoína, manitol e ácidos acético e glicônico, que podem contribuir para a diminuição do pH (DOELLE et al., 1993). Nos três tempos de fermentação, o crescimento celular dessa corrida também foi um dos mais baixos para o meio de cascas de banana (Tabela 17), esse mesmo comportamento, quanto ao pH e crescimento celular, foi observado para a fermentação representada pela corrida 5 no meio sintético.

Tabela 19 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	pH		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	4,69	4,74	4,68
2	1	-1	-1	1	4,54	4,53	4,54
3	-1	1	-1	1	5,29	5,25	5,22
4	1	1	-1	-1	5,77	5,71	5,94
5	-1	-1	1	1	4,50	4,48	4,45
6	1	-1	1	-1	4,85	5,04	5,15
7	-1	1	1	-1	5,93	5,81	5,71
8	1	1	1	1	5,28	5,17	5,11
9*	0	0	0	0	5,40	5,37	5,36

\* pontos centrais.

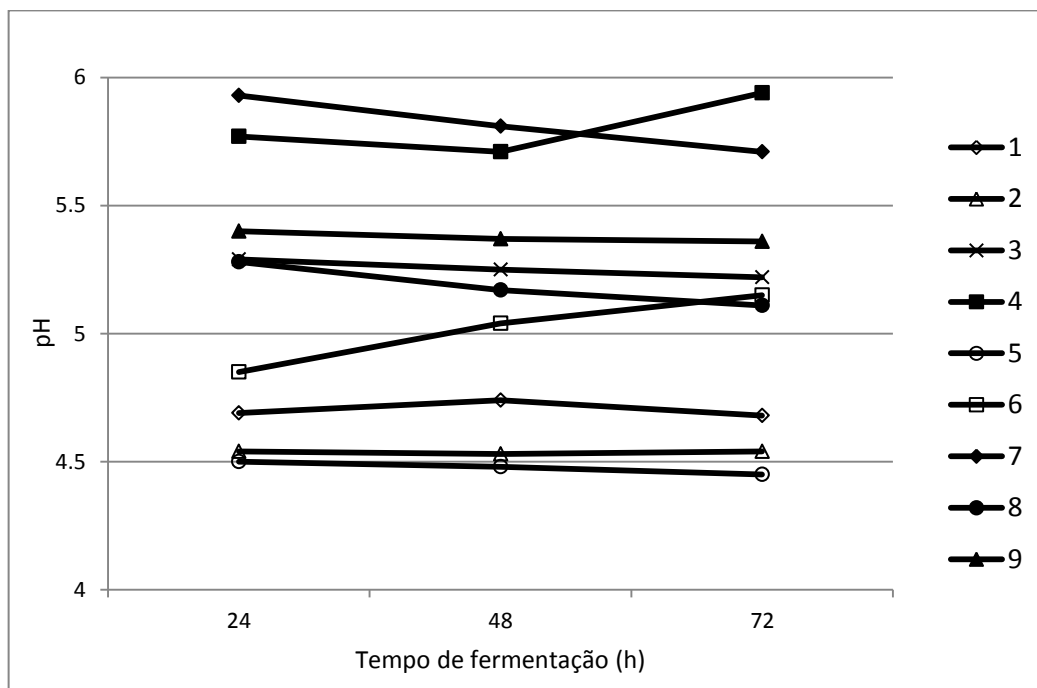
X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

A fermentação com a co-cultura e concentração inicial de açúcares de 250 g/L causou a maior variação do pH com relação ao valor inicial, uma queda de 1,39 do valor inicial de 6,5. O maior valor de pH foi obtido pela fermentação da corrida 4 (5,94) realizada com a co-cultura e concentração inicial de açúcares de 50 g/L depois de 72 h de fermentação, nessas mesmas condições também foi observado maior valor de biomassa para o meio de cascas de banana (Tabela 17). Cabral et al. (2011) também relataram que

o aumento do pH favoreceu o crescimento celular, a concentração máxima de células foi de 9,60 g/L em pH 6,98.

A partir das médias de pH final do caldo para cada tempo de fermentação (Tabela 19) foi construído um gráfico relacionando, para cada corrida, os valores de pH final depois de 24, 48 e 72 h de fermentação (Figura 16). Observa-se que para a maioria das fermentações o pH final do caldo pouco variou nos tempos de 24, 48 e 72 h de fermentação. Destacam-se as corridas 4 e 7 que apresentaram os maiores valores de pH nos três tempos de fermentação; e a corrida 5, que apresentou os menores valores de pH final do caldo.

Figura 16 - Valores de pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio de cascas de banana.



\* Legenda - os números de 1 a 9 representam cada uma das corridas, indicadas na Tabela 19.

Para o meio de cascas de banana, o pH final dos caldos ficou concentrado ao redor de 4,5 a 6,0, faixa de valores bem superior à encontrada no meio sintético (pH final entre 3,5 e 4,0). No entanto, cabe destacar que tanto a *Z. mobilis* sozinha como a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* puderam crescer e manter-se viáveis nas duas faixas de pH, sendo que o crescimento celular foi um pouco maior no pH entre 4,5 e 6,0. Segundo a literatura a bactéria *Z. mobilis* suporta valores de pH entre 2,5 e 7,5 (MESQUITA, 2008)

e a levedura *P. stipitis* consegue desenvolver-se na faixa de pH entre 3 e 7 (SLININGER et al., 1990).

### 5.7.3. Produção de etanol na fermentação com meio de cascas de banana

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das respostas para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de banana. A Tabela 20 apresenta a média das 8 combinações realizadas em triplicata e as 3 repetições no ponto central.

Considerando-se a máxima produção de etanol obtida nos três tempos de fermentação, de uma maneira geral as corridas com concentração inicial de açúcares de 50 g/L apresentaram maior produção de etanol do que os processos com 250 g/L de açúcar e, dentro dessa diferença, todas as corridas que empregaram as co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* também obtiveram maior biossíntese de etanol do que as fermentações com *Z. mobilis* sozinha. Esse fato indica que nos processos com as co-culturas, tanto as pentoses como as hexoses, provenientes da hidrólise dos carboidratos da casca de banana, puderam ser fermentadas pelos microrganismos e convertidas em etanol; já nas fermentações com *Z. mobilis* sozinha, a maioria da pentoses presentes não pôde ser metabolizada.

O teor de etanol nas fermentações com meio de cascas de banana variou de 0 a 23,92 g/L. A fermentação que não apresentou produção de etanol foi a realizada com a bactéria *Z. mobilis*, pH de 6,5, agitação manual de 5 min ao dia e 250 g/L de açúcar nos tempos de 48 e 72 h de processo; no entanto, essa corrida apresentou pequena produção em 24 h. A maior produção de etanol (23,92 g/L) foi obtida depois de 48 h de fermentação pela co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* em pH 6,5, agitação manual de 5 min por dia e concentração inicial de açúcares de 50 g/L.

Todas as fermentações realizadas somente com a bactéria *Z. mobilis* apresentaram maior produção de etanol em 24 h, mostrando uma leve queda nos demais tempos de processo, exceto para a corrida 7, que teve maior produção depois de 72 h de fermentação. Para os processos fermentativos com *Z. mobilis* e *P. stipitis*, a máxima produção de etanol ocorreu depois de 48 h, exceto para a corrida 6 que teve pico de produção em 24 h de fermentação.

Tabela 20 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a produção de etanol (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Etanol (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	4,16	3,83	2,29
2	1	-1	-1	1	0,63	1,17	0,46
3	-1	1	-1	1	0,51	0,00	0,00
4	1	1	-1	-1	23,16	23,92	19,34
5	-1	-1	1	1	1,28	1,24	1,22
6	1	-1	1	-1	13,39	11,38	9,74
7	-1	1	1	-1	0,62	1,50	2,09
8	1	1	1	1	1,45	2,20	1,01
9*	0	0	0	0	2,62	3,61	1,71

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

Para as fermentações com a bactéria *Z. mobilis* sozinha, as maiores produções de etanol foram de 4,16 e 1,28 g/L, nos meios com concentração inicial de açúcares de 50 e 250 g/L, respectivamente. Com relação às fermentações com as co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis*, as máximas produções de etanol foram de 23,92 e 2,20 g/L, representando cerca de 475% e 72% a mais do que a produção obtida pelas monoculturas de *Z. mobilis*, nos meios com 50 e 250 g/L de açúcar, respectivamente.

A levedura *Pichia stipitis* é conhecida como uma das mais eficientes para a fermentação de pentoses a etanol (EKEN-SARAÇOGLU; ARSLAN, 2000) e a mais promissora para aplicação industrial, devido a sua capacidade de fermentar xilose rapidamente com alto rendimento de etanol, sem aparentemente produzir xilitol como subproduto (NIGAM, 2002).

Nas fermentações com concentração inicial de açúcar de 50 g/L, a máxima produção de etanol tanto para a *Z. mobilis* sozinha como para a co-cultura ocorreu quando o meio foi agitado manualmente durante 5 min por dia e o pH inicial foi ajustado para 4,5 e 6,5, respectivamente. Já para os processos fermentativos com concentração

inicial de açúcares de 250 g/L, a maior produção de etanol ocorreu quando o meio foi agitado constantemente a 150 rpm enquanto o valor de pH inicial foi o mesmo observado para o meio com concentração inicial de açúcares de 50 g/L, ou seja, 4,5 para a fermentação com *Z. mobilis* sozinha e 6,5 para o processo com a co-cultura. De acordo com esses dados, pode-se inferir que o pH inicial de 4,5 favoreceu a fermentação alcoólica por *Z. mobilis* sozinha e o pH de 6,5 foi mais favorável para a produção pela co-cultura. No meio com 250 g/L de açúcar, por se tratar de uma solução bem mais concentrada, a agitação constante de 150 rpm pode ter possibilitado maior contato e melhor utilização do substrato disponível, pelos microrganismos, quando comparada a agitação de 5 min ao dia.

Em estudo para a biossíntese de etanol por *Z. mobilis* a partir do melão de cana, Maiti et al. (2011) obtiveram melhor produção (59,59 g/L) em pH inicial de 5,13 a 30°C, quando o pH foi aumentado para 6,5 verificou-se redução na produção de etanol (20,00 g/L). Tao et al. (2005) também observaram diminuição na produção de etanol quando o pH inicial do meio foi aumentado de 4,5 para valores entre 6 e 7, em fermentação de glicose por *Z. mobilis* a 37°C. Da mesma forma, o aumento do pH resultou em queda da produção de etanol por *Z. mobilis*, no presente trabalho.

É possível observar que as fermentações com casca de banana em meio de 150 e 250 g/L de açúcar apresentaram uma produção de etanol menor do que as obtidas para essas mesmas concentrações com o meio sintético. Mesmo assim, em ambos os substratos, de uma maneira geral, a produção foi baixa e menor do que nas fermentações com 50 g/L de açúcar. As altas concentrações de açúcar também inibiram o crescimento celular em ambos os meios, que apresentaram maior quantidade de biomassa nos processos com 50 g/L de açúcar. Possivelmente, com o menor crescimento celular, houve também uma menor adaptação dos microrganismos ao meio e menor produção de etanol em altas concentrações de açúcar.

Schulz (2010) avaliou a fermentação de rejeitos da bananicultura por *S. cerevisiae* a 30°C, pH de 4,5 e 150 rpm de agitação, em biorreator de 5 L e volume de trabalho de 2 L. Para a polpa da banana com teor de açúcares totais de 44,0 e 56,8 g/L, as maiores produções de etanol foram de 23,50 e 25,30 g/L depois de 8 e 9 h de fermentação, respectivamente. Para a casca de banana com teor de açúcares totais de 19,51 g/L, a máxima biossíntese de etanol foi de 7,88 g/L em de 4 h de fermentação.

Manikandan et al. (2008) realizaram a hidrólise ácida de cascas de banana previamente secas e avaliaram a fermentação desse substrato por *S. cerevisiae* a 33°C, pH de 4,5 em meio com 10% de cascas de banana. A máxima produção de etanol foi de 9,80 g/L em 120 h de fermentação. Os autores não citam a concentração de açúcares do substrato casca de banana utilizado na fermentação.

Oberoi et al. (2011) avaliaram a sacarificação e fermentação simultâneas de cascas de banana por *S. cerevisiae* e as enzimas comerciais celulase e pectinase. A maior produção de etanol foi de 28,20 g/L em meio contendo 10% de cascas de banana seca, 37°C e pH 5, depois de 12 h. Para essa fermentação, a máxima concentração de açúcar medida no meio foi de 45 g/L.

Em nenhum dos estudos citados foram atingidas as concentrações de açúcares totais de 150 e 250 g/L. Considerando as fermentações com 50 g/L de açúcar, a produção de etanol obtida pela co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* foi maior ou semelhante do que as pesquisas citadas anteriormente.

Nas fermentações representadas pelas corridas 1 e 4 (Tabela 19), houve a maior produção de etanol, respectivamente, pela bactéria *Z. mobilis* sozinha e pela co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* no meio de 50 g/L de açúcar; Coincidentemente, o crescimento celular no meio de cascas de banana também foi o mais elevado tanto para a monocultura como para a co-cultura (corridas 1 e 4, Tabela 17). No entanto, assim como observado para o meio sintético, não houve correlação significativa entre o crescimento celular e a produção de etanol.

Com relação ao rendimento do produto etanol em relação à concentração inicial de açúcar, nos meios de 50, 150 e 250 g/L de AT, a máxima produção de etanol (23,92, 3,61 e 2,20 g/L, respectivamente) correspondeu a cerca de 48%, 2,4% e 0,9% do substrato inicial presente no meio com cascas de banana, respectivamente, mostrando, portanto, que o rendimento em produto decresceu com o aumento do substrato inicial e o maior rendimento para a produção de etanol foi com concentração inicial de açúcar de 50 g/L. Calculando-se o rendimento em relação aos açúcares consumidos durante a fermentação (Tabela 21), para a máxima produção de etanol nos meios de 50, 150 e 250 g/L de AT, os rendimentos foram de 49%, 15% e 9%, respectivamente. Os rendimentos em etanol com relação aos açúcares consumidos também decresceram com o aumento

da concentração do meio, comportamento esse também apresentado pelos rendimentos em etanol nos processos com o meio sintético.

Tabela 21 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a concentração de AT no meio (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de banana.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	AT (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	39,81	36,22	33,12
2	1	-1	-1	1	241,75	234,56	228,95
3	-1	1	-1	1	246,13	243,65	243,10
4	1	1	-1	-1	2,19	1,45	0,81
5	-1	-1	1	1	244,48	242,98	238,52
6	1	-1	1	-1	15,87	9,17	4,51
7	-1	1	1	-1	45,69	39,46	34,06
8	1	1	1	1	238,90	226,04	224,86
9*	0	0	0	0	139,57	125,98	123,73

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

A Tabela 22 apresenta a estimativa dos efeitos principais para cada variável, assim como as interações entre elas, e o valor de  $p$  para a resposta da produção de etanol, depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de banana.

Entre os efeitos principais, todas as variáveis independentes X<sub>1</sub> (microrganismo), X<sub>2</sub> (pH inicial), X<sub>3</sub> (agitação) e X<sub>4</sub> (concentração inicial de açúcares) foram significativas ( $p < 0,05$ ); sendo que o microrganismo e o pH apresentaram efeito positivo, e a agitação e concentração inicial de açúcar efeito tiveram negativo para a resposta da produção de etanol em todos os tempos de fermentação. Assim, a utilização da co-cultura proporcionou uma produção de etanol estatisticamente maior do que a bactéria *Z. mobilis* sozinha e esta produção também foi favorecida com pH de 6,5, agitação manual e concentração de açúcares de 50 g/L. Assim como observado para o meio sintético,

esses dados ressaltam a maior eficiência da co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* na conversão de pentoses e hexoses em etanol, em comparação ao obtido pela monocultura de *Z. mobilis*.

Tabela 22 - Estimativa dos efeitos principais e valor de  $p$  referentes ao delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de banana.

Variáveis	Etanol (h)					
	24		48		72	
	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$
Intercepto*	5,316	0,000	5,257	0,000	4,376	0,000
$X_1^*$	8,012	0,000	8,408	0,000	5,858	0,000
$X_2^*$	1,568	0,008	2,884	0,000	1,801	0,004
$X_3^*$	-2,931	0,000	-2,768	0,000	-2,396	0,000
$X_4^*$	-9,366	0,000	-8,621	0,000	-8,079	0,000
$X_1X_2^*$	3,722	0,000	3,899	0,000	3,276	0,000
$X_1X_3^*$	-1,546	0,009	-2,992	0,000	-2,127	0,001
$X_1X_4^*$	-7,871	0,000	-7,343	0,000	-5,724	0,000

\* Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ( $p < 0,05$ ).

$X_1$  (microrganismo);  $X_2$  (pH inicial);  $X_3$  (agitação);  $X_4$  (concentração inicial de açúcares).

Na sacarificação e fermentação simultânea de uma mistura de resíduos de tangerina e cascas de banana, na proporção de 4:6, por *S. cerevisiae* e *P. tannophilus*, Sharma et al. (2007) relataram que a biossíntese de etanol também foi favorecida pela menor agitação do meio, sendo a máxima produção de 26,84 g/L depois de 48 h de fermentação a 30°C e concentração de açúcares de 63 g/L.

Opostamente ao encontrado no presente trabalho, a variação na concentração inicial de açúcares em 8, 16 e 40 g/L não influenciou de forma significativa o rendimento em etanol para a fermentação com polpa e casca de banana realizada por Schulz (2010). Já em estudo de Manikandan et al. (2008), a variação na concentração inicial do substrato em 50, 75, 100 e 125 g/L influenciou o processo fermentativo e o maior rendimento em etanol foi obtido na concentração de 100 g/L de cascas de banana.

Roberto et al. (1994) concluíram que o pH exerceu pouca influência sobre os parâmetros fermentativos de meio com xilose quando utilizou-se *P. stipitis* CBS 5773. Os rendimentos de etanol foram de 0,34 g/g e 0,37 g/g para fermentações com pH controlado em 6,0 e pH 4,5, respectivamente.

Em trabalho de Cabral et al. (2011) com a levedura *P. stipitis* NRRL-Y-7124, os resultados revelaram que a melhor faixa de pH para o processo de produção de etanol foi entre 4 e 6, onde obteve-se as maiores concentrações de etanol, em torno de 12 g/L, na fermentação de meio com 30 g/L de xilose, 30°C e agitação de 200 rpm.

## **5.8. Fermentação com o meio de cascas de laranja**

### **5.8.1. Crescimento celular na fermentação com meio de cascas de laranja**

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das respostas para a concentração celular (biomassa) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de banana. A Tabela 23 mostra as médias das 8 combinações realizadas em triplicata e as 3 repetições no ponto central. Assim como observado para os demais meios, as fermentações com a co-cultura apresentaram maior crescimento celular do que os processos com a monocultura. Fato este também observado pelo maior precipitado formado após a centrifugação do caldo das co-culturas.

Para todas as fermentações, as concentrações celulares variaram de 0,10 e 6,73 g/L. Esse intervalo foi bem menor do que o observado para o meio de cascas de banana; excluindo-se a corrida 4 que apresentou maior crescimento celular, a quantidade de biomassa das demais fermentações foi bem baixa, também em comparação ao meio sintético. Esse menor crescimento pode ter ocorrido por uma inibição dos microrganismos, já que não houve extração dos óleos essenciais naturalmente presentes na casca de laranja. Sabe-se que esses óleos contêm compostos, principalmente o limoneno, que podem inibir o crescimento de bactérias e leveduras, mesmo em baixas concentrações. Muitos estudos utilizando meio líquido mostraram uma inibição de leveduras pelo limoneno em concentração de 0,08 a 0,15% (SUBBA et al., 1967; URIBE; PENA, 1990; WILKINS et al., 2007). Uma vez que o limoneno é um valioso co-produto, os pré-tratamentos para maximizar a remoção e recuperação de limoneno seriam

vantajosos, já que esse composto pode ser vendido, tornando o processo mais viável economicamente (ZHOU et al., 2008).

Tabela 23 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Biomassa (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	0,28	0,33	0,39
2	1	-1	-1	1	1,02	1,16	1,79
3	-1	1	-1	1	0,20	0,35	0,37
4	1	1	-1	-1	1,10	4,96	6,73
5	-1	-1	1	1	0,13	0,14	0,15
6	1	-1	1	-1	0,37	0,42	0,47
7	-1	1	1	-1	0,10	0,20	0,32
8	1	1	1	1	0,59	0,72	0,96
9*	0	0	0	0	1,45	2,13	2,49

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

Para todas as fermentações com meio de cascas de laranja, a maior quantidade de biomassa foi observada depois de 72 h de fermentação. O maior valor de crescimento celular (6,73 g/L) foi obtido pela fermentação com co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis*, pH 6,5, agitação manual e concentração inicial de açúcares de 50 g/L,. Para a monocultura, o maior crescimento (0,39 g/L) foi obtido nas mesmas condições que a co-cultura, porém com pH de 4,5. Nas fermentações com meio de 250 g/L de açúcar, as maiores quantidades de biomassa também foram obtidas com agitação manual, tanto para a mono quanto para a co-cultura. Esse fato reforça mais uma vez a melhor adaptação da bactéria *Z. mobilis* à meios com menor aeração. Tanto para a co-cultura quanto para a monocultura, e nos meios de cascas de laranja com 50 e 250 g/L de açúcar, as maiores biomassas foram observadas exatamente nas mesmas condições que no meio de cascas de banana.

A Tabela 24 apresenta a estimativa dos efeitos principais para cada variável, assim como as interações entre elas, e o valor de  $p$  para a resposta da biomassa, depois de 24, 48 e 72 h de fermentação.

Tabela 24 - Estimativa dos efeitos principais e valor de  $p$  referentes ao delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a resposta da biomassa depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.

Variáveis	Biomassa (h)					
	24		48		72	
	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$
Intercepto*	0,581	0,000	1,178	0,000	1,500	0,000
$X_1^*$	0,595	0,001	1,545	0,000	2,197	0,000
$X_2^*$	0,050	0,747	1,063	0,000	1,374	0,000
$X_3^*$	-0,352	0,033	-1,288	0,000	-1,886	0,000
$X_4^*$	0,020	0,897	-0,927	0,000	-1,116	0,000
$X_1X_2^*$	0,103	0,507	0,962	0,000	1,359	0,000
$X_1X_3^*$	-0,228	0,152	-1,177	0,000	-1,681	0,000
$X_1X_4^*$	0,047	0,763	-0,848	0,000	-1,081	0,000

\* Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ( $p < 0,05$ ).

$X_1$  (microrganismo);  $X_2$  (pH inicial);  $X_3$  (agitação);  $X_4$  (concentração inicial de açúcares).

Entre os efeitos principais, todas as variáveis independentes testadas,  $X_1$  (microrganismo),  $X_2$  (pH),  $X_3$  (agitação) e  $X_4$  (concentração inicial de açúcares), foram significativas ( $p < 0,05$ ) para a resposta da biomassa, exceto as variáveis  $X_2$  e  $X_4$  que não foram significativas em 24 h de fermentação. A variável que mais influenciou o crescimento celular foi  $X_1$  (microrganismo), que apresentou maiores valores para o efeito, seguida da agitação. O valor do efeito de todas as variáveis aumentou com o tempo de fermentação, tornando-as cada vez mais significativa no crescimento celular.

As variáveis microrganismo e pH inicial apresentaram efeito positivo sobre a fermentação, enquanto que as variáveis agitação e concentração inicial de açúcares tiveram efeito negativo. Sendo assim, a biomassa no meio de cascas de laranja foi favorecida quando o microrganismo e pH estavam no nível maior e a agitação e concentração de açúcares no nível menor, ou seja, pela fermentação com as co-culturas,

pH inicial de 6,5, agitação manual de 5 min ao dia e 50 g/L de açúcares. O mesmo comportamento quanto ao efeito das variáveis no crescimento celular foi observado para o meio de cascas de banana e sintético, esse último exceto quanto à agitação do meio.

### 5.8.2. pH final do caldo na fermentação com meio de cascas de laranja

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das medições para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de banana. A Tabela 25 apresenta essa matriz contendo as 8 combinações realizadas em triplicata e as 3 repetições no ponto central.

Tabela 25 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para o pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	pH		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	4,50	4,46	4,45
2	1	-1	-1	1	4,80	4,80	4,80
3	-1	1	-1	1	5,64	5,62	5,62
4	1	1	-1	-1	6,04	6,00	6,04
5	-1	-1	1	1	4,63	4,63	4,59
6	1	-1	1	-1	4,27	4,25	4,27
7	-1	1	1	-1	5,88	5,79	5,73
8	1	1	1	1	5,45	5,40	5,38
9*	0	0	0	0	5,37	5,34	5,32

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

Pode-se verificar que para todas as fermentações, em todos os tempos, o valor de pH diminuiu em comparação ao pH inicial da fermentação, exceto para as corridas 2 e 5 com pH inicial de 4,5, que apresentaram um leve aumento de pH com o decorrer do processo fermentativo. O menor valor de pH (4,25) ocorreu na fermentação com a co-

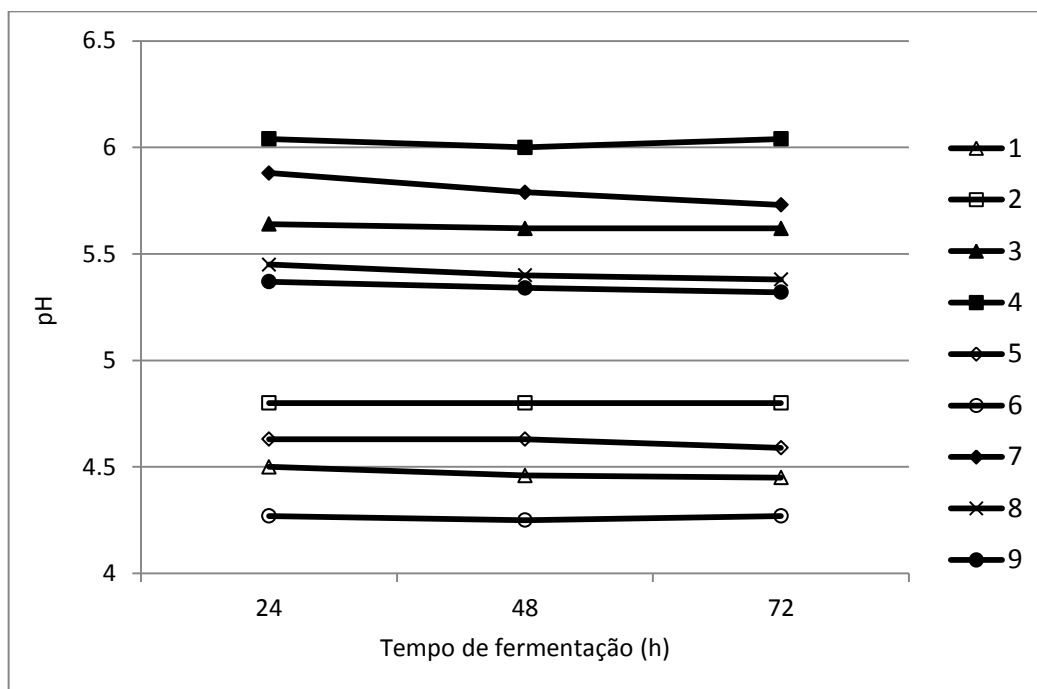
cultura, agitação constante de 150 rpm e 50 g/L de açúcar, com pH inicial de 4,5. Nessas mesmas condições, a co-cultura apresentou seu menor crescimento celular depois de 72 h de fermentação.

A fermentação com a co-cultura e concentração inicial de açúcares de 250 g/L causou a maior variação do pH com relação ao valor inicial, uma queda de 1,12 do valor inicial de 6,5, nessas mesmas condições foi observada a maior queda de pH no meio com cascas de banana. O maior valor de pH foi obtido pela fermentação da corrida 4 (6,04) realizada com a co-cultura e concentração inicial de açúcares de 50 g/L depois de 72 h de fermentação, nessas mesmas condições também foi observado maior valor de biomassa para o meio de cascas de laranja (Tabela 23). Na fermentação com as cascas de banana também foi verificado o mesmo comportamento, quanto para o pH quanto para a biomassa na corrida 4.

A partir das médias de pH final do caldo para cada tempo de fermentação (Tabela 25) foi construído um gráfico relacionando, para cada corrida, os valores de pH final depois de 24, 48 e 72 h de fermentação (Figura 17). Observa-se que para a maioria das fermentações o pH final do caldo pouco variou nos tempos de 24, 48 e 72 h de fermentação. Destacam-se as corridas 4 e 7 que apresentaram os maiores valores de pH nos três tempos de fermentação; e a corrida 6, que apresentou os menores valores de pH final do caldo.

Os valores de pH final das fermentações com o meio de cascas de laranja ficaram entre 4,25 e 6,04, intervalo este semelhante ao apresentado pelo meio de cascas de banana (4,5 a 6,0), essa faixa relativamente ampla de atividade pode ser interessante industrialmente. Tanto para o meio de cascas de laranja quanto para o meio de cascas de banana, a variação de pH foi bem inferior à observada no meio sintético. Possivelmente, a solução tampão adicionada na etapa de hidrólise enzimática das cascas de banana e laranja continuou no meio de fermentação, dificultando a variação de pH.

Figura 17 - Valores de pH final do caldo depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com meio de cascas de laranja.



\* Legenda - os números de 1 a 9 representam cada uma das corridas, indicadas na Tabela 25.

### 5.8.3. Produção de etanol na fermentação com meio de cascas de laranja

Com auxílio do software Minitab 14 foi construída a matriz do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , a partir das respostas para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de laranja. A Tabela 26 apresenta a média das 8 combinações realizadas em triplicata e as 3 repetições no ponto central.

Da mesma forma como observado para o meio com cascas de banana, as corridas com concentração inicial de açúcares de 50 g/L apresentaram máxima produção de etanol maior do que os processos com 250 g/L de açúcar. O crescimento celular nas fermentações de 50 g/L também foi superior ao observado com 250 g/L, para os dois meios com cascas de frutas. Para o preparo do meio de 250 g/L de açúcar, o hidrolisado obtido após o processo enzimático foi concentrado em banho-maria a 80°C até atingir o teor desejado de açúcar, esse aquecimento durou em média 3 dias. Possivelmente, o processo de concentração em banho-maria pode ter reduzido a facilidade de metabolização dos açúcares pelos microrganismos, ou ainda essa alta quantidade de açúcares não foi favorável à produção de etanol. Observa-se também que no meio com 250 g/L de açúcar, apesar da desintoxicação ter sido eficiente, os teores de compostos

fenólicos ficaram mais altos do que nos meios com 50 e 150 g/L de açúcar, a presença de maior quantidade desses compostos inibidores também pode estar desfavorecendo a fermentação nesse meio.

Tabela 26 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a produção de etanol (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Etanol (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	1,85	1,65	0,73
2	1	-1	-1	1	0,27	0,40	0,30
3	-1	1	-1	1	0,00	0,00	0,00
4	1	1	-1	-1	8,22	9,75	11,36
5	-1	-1	1	1	0,55	0,66	0,56
6	1	-1	1	-1	2,13	2,00	1,90
7	-1	1	1	-1	1,53	1,46	1,41
8	1	1	1	1	1,23	1,33	1,17
9*	0	0	0	0	0,38	0,50	0,43

\* pontos centrais.

X1 (microrganismo); X2 (pH inicial); X3 (agitação); X4 (concentração inicial de açúcares).

Todas as corridas que empregaram as co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* obtiveram maior biossíntese de etanol do que as fermentações com a monocultura, com exceção da corrida 2, na qual a produção de etanol pela co-cultura em meio com 250 g/L de açúcar e agitação manual foi menor do que a observada pela monocultura em outras condições. No entanto, nessa mesma condição de agitação e concentração de açúcares, a monocultura não produziu etanol (corrida 3, Tabela 26), fato também observado para a fermentação com meio de cascas de banana nos tempos de 48 e 72 h (corrida 3, Tabela 20). A menor agitação em meio com alta concentração de açúcar também foi desfavorável para a produção de etanol no meio com cascas de banana. Possivelmente uma maior agitação é necessária para que os microrganismos entrem em contato com o substrato de forma eficiente, podendo então fermentar os açúcares.

O teor de etanol nas fermentações com meio de cascas de laranja variou de 0 a 11,36 g/L. A maior produção de etanol foi obtida depois de 72 h de fermentação pela co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* em pH 6,5, agitação manual de 5 min por dia e concentração inicial de açúcares de 50 g/L. No meio com cascas de banana, a maior produção de etanol (23,92 g/L) também ocorreu nessas condições. O processo fermentativo nos meios estudados com cascas de frutas apresentou comportamento bastante semelhante. Nas fermentações com meio de cascas de laranja e concentração inicial de açúcar de 50 e 250 g/L, a máxima produção de etanol tanto para a *Z. mobilis* sozinha como para a co-cultura ocorreu nas mesmas condições observadas para as maiores produções com o meio de cascas de banana.

Para as fermentações com a bactéria *Z. mobilis* sozinha, as maiores produções de etanol foram de 1,85 e 0,66 g/L, nos meios com concentração inicial de açúcares de 50 e 250 g/L, respectivamente. Com relação às fermentações com as co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis*, as máximas produções de etanol foram de 11,36 e 1,33 g/L, representando cerca de 1000% e 100% a mais do que a produção obtida pelas monoculturas de *Z. mobilis*, nos meios com 50 e 250 g/L de açúcar, respectivamente. Comparativamente, o meio com cascas de banana apresentou maiores produções de etanol nas fermentações com 50 e 250 g/L de açúcar do que o meio com cascas de laranja, tanto para a co-cultura quanto para a monocultura. No entanto, a diferença entre a produção de etanol pela monocultura e pela co-cultura apresentou uma porcentagem maior no meio com cascas de laranja.

Em outro estudo com cascas de laranja, Tejeda et al. (2010) trataram esses resíduos com hidrólise ácida e efetuaram a fermentação com *S. cerevisiae*, a 30°C e pH de 4,5 a 5,0. Após a hidrólise obtiveram-se 80 g/L de açúcares fermentescíveis, que produziram 13,9 g/L de etanol.

Albán e Freire (2009) compararam a produção de etanol a partir de casca de laranja por monoculturas de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*. As cascas de laranja foram previamente hidrolisadas por enzimas produzidas por *A. niger*, atingindo uma concentração de açúcares totais de 56 g/L. A fermentação dos hidrolisados ocorreu a 30°C, agitação manual de 5 min ao dia e pH 4. A média de produção de etanol foi de 10,19 e 7,32 g/L por *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*, respectivamente. Apesar da bactéria *Z. mobilis* apresentar uma média maior, os autores afirmaram não haver diferença

estatística entre a quantidade de etanol produzida pelos dois microrganismos. Essa quantidade foi maior do que a obtida pela fermentação de meio de casca de laranja com 50 g/L de açúcar por monocultura de *Z. mobilis* no presente trabalho, no entanto, quando comparamos com a co-cultura, a produção obtida pelo presente trabalho foi ligeiramente maior.

Da mesma forma como observado para a biomassa e produção de etanol nos meios com casca de banana, nas fermentações com meio de casca de laranja representadas pelas corridas 1 e 4 (Tabela 26), houve a maior produção de etanol, respectivamente, pela bactéria *Z. mobilis* sozinha e pela co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* no meio de 50 g/L de açúcar. Coincidentemente, o crescimento celular no meio de cascas de laranja também foi o mais elevado tanto para a monocultura como para a co-cultura (corridas 1 e 4, Tabela 23). No entanto, também não houve correlação significativa entre o crescimento celular e a produção de etanol.

Com relação ao rendimento do produto etanol em relação à concentração inicial de açúcar, no meio com concentração inicial de açúcar de 50, 150 e 250 g/L, a máxima produção de etanol (11,36, 0,50 e 1,33 g/L, respectivamente) correspondeu a cerca de 23%, 0,3% e 0,5% do substrato inicial presente no meio com cascas de laranja, respectivamente. O rendimento em etanol observado para os meios com 150 e 250 g/L foi muito baixo e ainda menor do que o observado para as fermentações com meio de casca de banana, que foi de 2,4% e 0,9%, respectivamente. O meio de casca de laranja com 50 g/L de açúcar apresentou um melhor rendimento em etanol, porém ainda bem inferior ao rendimento teórico em etanol, que é de 51,1% (JACKMAN, 1991). O rendimento em etanol para os meios sintético e meio com casca de banana com 50 g/L de açúcar foi mais próximo ao rendimento teórico, sendo de 44% e 48%, respectivamente. O meio de casca de banana com 50 g/L de açúcar foi o que apresentou rendimento em etanol mais próximo ao teórico.

Considerando o rendimento em etanol baseado na quantidade de açúcar total consumido durante a fermentação (Tabela 27), para as máximas produções de etanol com o meio de cascas de laranja, 11,36, 0,50 e 1,33 g/L (nos meios de 50, 150 e 250 g/L, respectivamente), esse rendimento foi de 38%, 7% e 24%, respectivamente. Para os meios com 50 e 250 g/L de açúcares iniciais, o rendimento com base na quantidade de açúcar consumido foi razoável, porém, deve-se levar em conta que, nessas condições, a

produção de etanol e a quantidade de substrato consumido foram muito baixas. Esse fato indica novamente que algo inibiu a fermentação, como já citado no item 5.7.1, o óleo essencial da casca da laranja não foi extraído para estes experimentos, o que possivelmente influenciou no baixo crescimento celular observado e, conseqüentemente, no baixo consumo de açúcar do meio e na baixa produção de etanol.

Tabela 27 - Médias das triplicatas das 8 combinações e das 3 repetições no ponto central obtidas a partir do delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a concentração de AT no meio (g/L) depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de laranja.

Corrida	Variáveis independentes				Resposta		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	AT (g/L)		
	Microrganismo	pH	Agitação	Concentração de açúcares	24 h	48 h	72 h
1	-1	-1	-1	-1	45,33	45,70	44,54
2	1	-1	-1	1	245,64	244,17	244,08
3	-1	1	-1	1	246,12	246,48	245,21
4	1	1	-1	-1	31,59	24,21	19,88
5	-1	-1	1	1	249,30	247,62	247,37
6	1	-1	1	-1	46,04	45,86	45,59
7	-1	1	1	-1	44,95	43,89	43,25
8	1	1	1	1	247,38	244,47	243,06
9*	0	0	0	0	147,96	143,15	142,32

\* pontos centrais.

$X_1$  (microrganismo);  $X_2$  (pH inicial);  $X_3$  (agitação);  $X_4$  (concentração inicial de açúcares).

A Tabela 28 apresenta a estimativa dos efeitos principais para cada variável, assim como as interações entre elas, e o valor de  $p$  para a resposta da produção de etanol, depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de cascas de laranja.

Entre os efeitos principais, todas as variáveis independentes  $X_1$  (microrganismo),  $X_2$  (pH inicial),  $X_3$  (agitação) e  $X_4$  (concentração inicial de açúcares) foram significativas ( $p < 0,05$ ); sendo que o microrganismo e o pH apresentaram efeito positivo, e a agitação e concentração inicial de açúcar tiveram efeito negativo para a resposta da produção de etanol em todos os tempos de fermentação. Assim, a utilização da co-cultura

proporcionou uma produção de etanol estatisticamente maior do que a bactéria *Z. mobilis* sozinha e esta produção também foi favorecida com pH de 6,5, agitação manual e concentração de açúcares de 50 g/L. Assim como observado para o meio sintético e meio com casca de banana, esses dados evidenciam mais uma vez a maior eficiência da co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* na conversão de pentoses e hexoses em etanol, em comparação ao obtido pela monocultura de *Z. mobilis*.

Tabela 28 - Estimativa dos efeitos principais e valor de  $p$  referentes ao delineamento fracionado  $2^{4-1}$ , para a produção de etanol depois de 24, 48 e 72 h de fermentação com o meio de laranja.

Variáveis	Etanol (h)					
	24		48		72	
	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$	Efeitos	$p$
Intercepto*	1,796	0,000	2,861	0,000	3,095	0,000
$X_1$ *	1,981	0,000	4,426	0,000	5,506	0,000
$X_2$ *	1,544	0,000	3,958	0,000	5,114	0,000
$X_3$ *	-1,226	0,000	-3,586	0,000	-4,336	0,000
$X_4$ *	-2,919	0,000	-5,121	0,000	-5,841	0,000
$X_1X_2$ *	1,981	0,000	4,381	0,000	5,051	0,000
$X_1X_3$ *	-1,336	0,000	-3,822	0,000	-4,959	0,000
$X_1X_4$ *	-1,502	0,000	-3,894	0,000	-5,051	0,000

\* Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ( $p < 0,05$ ).

$X_1$  (microrganismo);  $X_2$  (pH inicial);  $X_3$  (agitação);  $X_4$  (concentração inicial de açúcares).

## 5.9. Fermentação com o meio sintético em biorreator

A fermentação em biorreator com o meio sintético foi realizada nas condições que apresentaram o maior rendimento de etanol com relação à concentração inicial de açúcares do meio: utilização da co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* inoculadas simultaneamente no início da fermentação, pH de 4,5, agitação constante de 150 rpm e concentração inicial de açúcares de 50 g/L. A temperatura foi mantida em 30°C e as amostras foram retiradas após 18, 24, 48, 72 e 96 h de processo. Utilizou-se um

biorreator com capacidade para 5 L e a fermentação foi realizada com volume de trabalho de 3,5 L (Figura 18).

Figura 18 - Biorreator com o meio sintético após 24 h do início da fermentação.



Fonte: Autor

As amostras foram retiradas nos intervalos de tempo descritos com auxílio de uma seringa conectada a uma mangueira e um tubo para armazenamento da amostra, como ilustra a Figura 19. Após coletadas, as amostras foram avaliadas em duplicata quanto ao crescimento celular, concentração de etanol e açúcar total, de acordo com os mesmos métodos utilizados nas análises das fermentações descontínuas. As medições de pH foram feitas pelo pHmetro contido no próprio biorreator. A Tabela 29 apresenta os resultados para essas análises, nos tempos de 18, 24, 48, 72 e 96 h de fermentação.

Figura 19 - Forma de coleta das amostras nos diferentes tempos de fermentação em biorreator de 5 L.



Fonte: Autor

Tabela 29 - Médias de pH, biomassa (g/L), etanol (g/L) e açúcares totais (AT) (g/L) da fermentação realizada com meio sintético em fermentador de 5 L nos tempos de 18, 24, 48, 72 e 96 h de processo.

Tempo (h)	pH	Biomassa (g/L)	Etanol (g/L)	AT (g/L)
18	3,51	7,20 ± 0,55	7,72 ± 0,30	37,22 ± 0,24
24	3,54	8,70 ± 0,37	18,72 ± 0,45	14,13 ± 1,07
48	3,60	9,83 ± 0,09	22,80 ± 1,07	5,16 ± 0,91
72	3,64	11,69 ± 0,37	24,88 ± 1,01	0,68 ± 0,78
96	3,64	6,49 ± 0,31	20,37 ± 0,86	0,47 ± 0,06

O pH do meio, que era inicial de 4,5, caiu logo nas primeiras 18 h de fermentação, chegando a 3,51, após esse período apresentou um leve aumento, chegando a 3,64. Na fermentação descontínua nessas mesmas condições, o pH do meio manteve-se um pouco mais elevado, ficando na faixa de 3,75.

O crescimento celular na fermentação com o biorreator aumentou até 72 h de processo, com valor máximo de 11,69 g/L. Após esse período apresentou uma leve queda, quando a quantidade de açúcares no meio chegou próximo a 0 (zero). Esse valor foi maior que o observado na fermentação descontínua, onde a maior biomassa foi de 8 g/L após 48 h de fermentação.

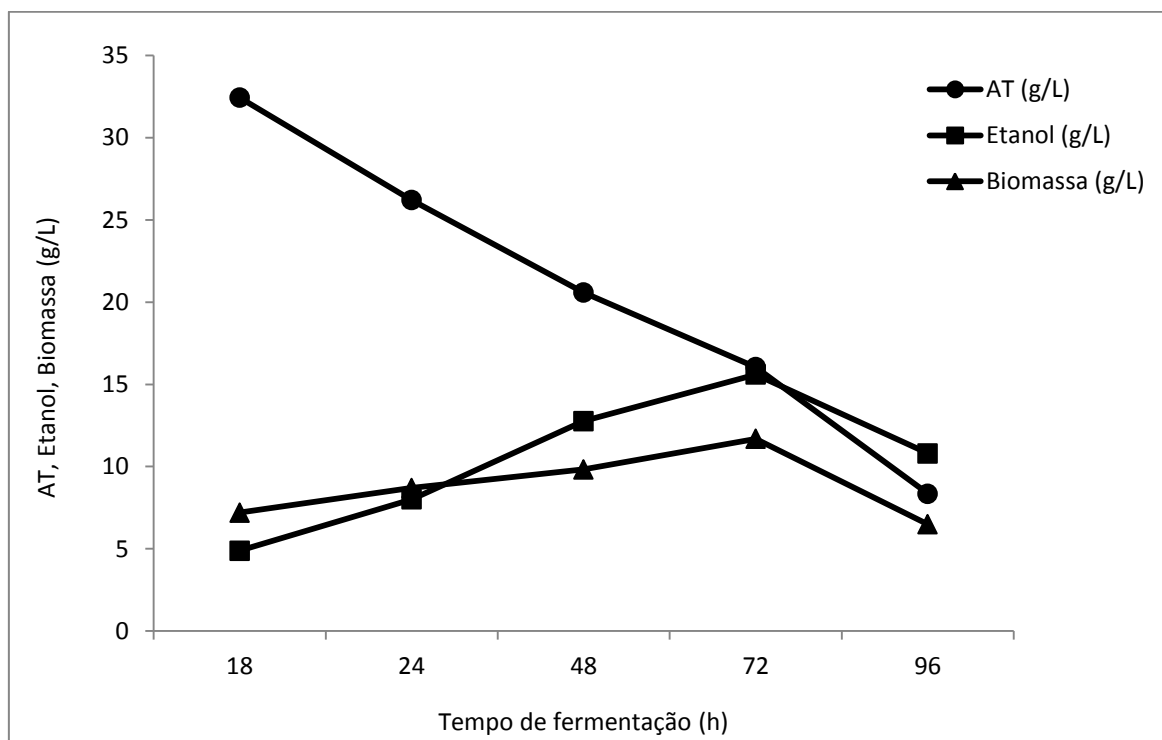
A produção de etanol, assim como o crescimento celular, também aumentou até 72 h de fermentação atingindo o valor máximo de 24,88 g/L. Na fermentação descontínua, o valor de etanol para essas condições aumentou até 48 h de processo, atingindo o valor máximo de 22,11 g/L, bem próximo a concentração de etanol nesse mesmo período para o processo com aumento de escala.

Os valores de biomassa e produção de etanol na fermentação com o biorreator foram bem próximos e até superiores aos observados no processo descontínuo, mostrando assim que a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* adaptou-se bem ao aumento de escala com meio sintético contendo glicose e xilose, mantendo as respostas apresentadas na fermentação em Erlenmeyer.

A Figura 20 mostra o gráfico da cinética do consumo de açúcar total, produção de etanol e crescimento celular apresentada na fermentação conduzida em biorreator. Como observado, o crescimento celular e a produção de etanol aumentaram até 72 h de

fermentação, mesmo tempo de processo no qual a concentração de açúcares totais no meio chegou próximo a 0 (zero).

Figura 20 - Cinética do consumo de açúcar total, produção de etanol e crescimento celular da co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* apresentada na fermentação conduzida em biorreator com meio sintético.



### 5.10. Fermentação com o meio de cascas de banana em biorreator

A fermentação em biorreator com o meio de cascas de banana foi realizada nas condições de processo que apresentaram o maior rendimento de etanol com relação à concentração inicial de açúcares do meio: utilização da co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* inoculadas simultaneamente no início da fermentação, pH de 6,5, agitação de 150 rpm durante 5 min por dia e concentração inicial de açúcares de 50 g/L. Após a etapa de desintoxicação, o meio de cascas de banana produzido para a fermentação em biorreator apresentou 58 g/L de açúcares totais, sendo utilizado nessa concentração para o processo. Para a fermentação com meio de cascas de banana foi utilizado o mesmo biorreator do processo com o meio sintético, também com volume de trabalho de 3,5 L.

A temperatura foi mantida em 30°C e as amostras foram retiradas após 18, 24, 48, 72 e 96 h.

Após coletadas, as amostras foram avaliadas em duplicata quanto ao crescimento celular, concentração de etanol e açúcar total, de acordo com os mesmos métodos utilizados nas análises das fermentações descontínuas. As medições de pH foram feitas pelo pHmetro contido no próprio biorreator. A Tabela 30 apresenta os resultados para essas análises, nos tempos de 18, 24, 48, 72 e 96 h de fermentação.

Tabela 30 - Médias de pH, biomassa (g/L), etanol (g/L) e açúcares totais (AT) (g/L) da fermentação realizada com meio de cascas de banana em fermentador de 5 L nos tempos de 18, 24, 48, 72 e 96 h de processo.

Tempo (h)	pH	Biomassa (g/L)	Etanol (g/L)	AT (g/L)
18	5,93	3,33 ± 0,17	4,89 ± 0,31	32,43 ± 0,69
24	5,88	6,97 ± 1,04	8,01 ± 0,76	26,20 ± 0,16
48	5,83	9,83 ± 1,13	12,77 ± 0,41	20,58 ± 1,24
72	5,85	11,76 ± 0,59	15,60 ± 0,17	16,05 ± 1,09
96	5,83	8,64 ± 0,42	10,80 ± 0,34	8,35 ± 1,13

O pH do meio, que era inicial de 6,5, caiu nas primeiras horas de fermentação, mantendo-se na faixa de 5,83-5,88. Como já mencionado, a pouca variação do pH pode ser devida a ação da solução tampão, adicionada na hidrólise enzimática, e que permanece no meio de fermentação.

O crescimento celular na fermentação com o biorreator aumentou até 72 h de processo, com valor máximo de 11,76 g/L. Após esse período apresentou uma leve queda, porém, ao contrário do que observado na fermentação em biorreator com meio sintético (na qual a queda da biomassa ocorreu quando a quantidade de açúcar estava próximo a 0), no meio com cascas de banana não foi consumido um teor de 8,35 g/L de açúcar. Como o crescimento celular diminuiu, possivelmente trata-se de açúcares que não puderam ser metabolizados pelos microrganismos.

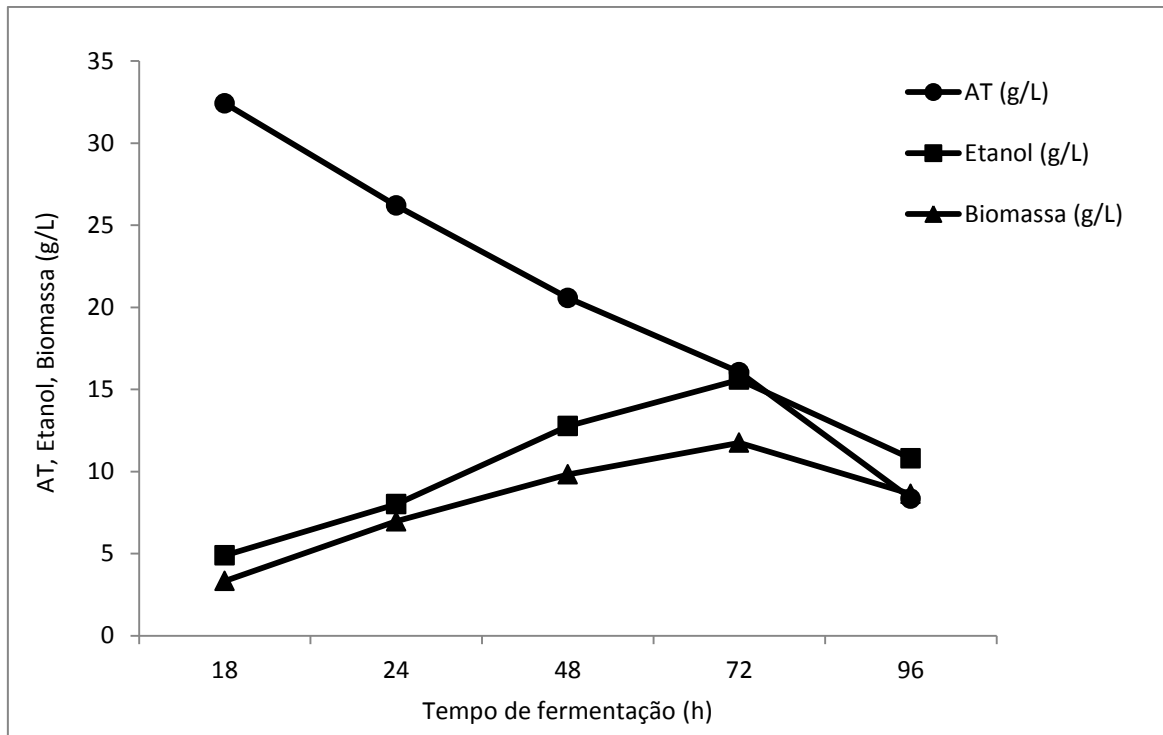
A produção de etanol, assim como o crescimento celular, também aumentou até 72 h de fermentação atingindo o valor máximo de 15,60 g/L. Na fermentação descontínua, o valor de etanol para essas condições aumentou até 48 h de processo,

atingindo o valor máximo de 23,92 g/L, um pouco superior ao apresentado pela fermentação com aumento de escala. Após 72 h de fermentação, ainda houve consumo de açúcar, porém não foi observado crescimento celular nem produção de etanol. Possivelmente, outros compostos foram metabolizados pelos microrganismos a partir desse açúcar consumido. A levedura *P. stipitis*, por exemplo, pode estar produzindo xilitol, interferindo assim no aumento da concentração de etanol.

O rendimento em etanol (para a máxima produção de 15,60 g/L), com relação aos açúcares consumidos, foi de 37%. Na fermentação em Erlenmeyer, nessas mesmas condições com o meio de cascas de banana, a máxima produção de etanol correspondeu a um rendimento de 49% em relação aos açúcares consumidos. Esse dado reforça a possibilidade de que, na fermentação do meio de cascas de banana em maior escala, a produção de outros compostos, que não o etanol, foi favorecida. Na fermentação em biorreator com o meio sintético, o aumento de escala favoreceu a produção de etanol, porém esse processo foi realizado em pH mais baixo e agitação constante, o que pode justificar essa diferença. Roberto et al. (1996), trabalhando com a levedura *C. guilliermondii*, constatou que o pH inicial do meio afetou a produção de xilitol e obteve melhores resultados com um pH inicial de 5,3. Esse valor de pH é bem próximo ao pH do meio de cascas de banana (5,8), já o pH do meio sintético manteve-se bem mais baixo, em torno de 3,6.

A Figura 21 mostra o gráfico da cinética do consumo de açúcar total, produção de etanol e crescimento celular apresentada na fermentação conduzida em biorreator com o meio de cascas de banana. Como observado, o crescimento celular e a produção de etanol aumentaram até 72 h de fermentação, no entanto, os açúcares do meio não se esgotaram. Ao contrário do meio sintético (composto somente por glicose e xilose), o meio de cascas de banana contém outros açúcares provenientes da hidrólise da hemicelulose e que, possivelmente, não puderam ser metabolizados pelos microrganismos.

Figura 21 - Cinética do consumo de açúcar total, produção de etanol e crescimento celular da co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* apresentada na fermentação conduzida em biorreator com meio de cascas de banana.



## 6. CONCLUSÕES

A hidrólise ácida foi eficiente para a liberação de açúcares fermentescíveis das cascas de banana e cascas de laranja, os melhores resultados para ambas as frutas foram obtidos com ácido sulfúrico a 5% e 15 min em autoclave elétrica a 121°C e pressão de 1 atm. A utilização da hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática como pré-tratamentos para liberação de açúcares fermentescíveis, a partir da casca de banana e laranja, mostrou-se eficiente e esses dois processos juntos foram importantes para uma maior produção na posterior etapa de fermentação alcoólica.

Tanto *Z. mobilis* quanto a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* foram capazes de crescer em meio sintético contendo glicose e xilose, meio hidrolisado de cascas de banana e meio hidrolisado de cascas de laranja. Em todos os meios, o crescimento celular foi maior nas fermentações com cultura simultânea dos dois microrganismos do que nas fermentações com a monocultura. Os maiores valores de biomassa foram obtidos nos processos fermentativos com o meio de cascas de banana. No meio de cascas de laranja o crescimento foi menor, possivelmente a presença dos óleos essenciais da casca de laranja pode ter inibido o crescimento microbiano.

Para o meio sintético, as variáveis que influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de biomassa foram o microrganismo inoculado e a agitação, sendo o crescimento favorecido pelas co-culturas e agitação constante de 150 rpm. Para o meio de cascas de banana e meio de cascas de laranja todas as variáveis testadas tiveram influência significativa no crescimento celular, que foi favorecido pela co-cultura, pH de 6,5, agitação manual de 5 min ao dia e concentração inicial de 50 g/L de açúcares.

A obtenção de etanol também mostrou-se viável pela fermentação do meio sintético, meio com cascas de banana e meio de cascas de laranja. Nos processos que empregaram co-culturas de *Z. mobilis* e *P. stipitis* a produção de etanol foi significativamente maior do que nas fermentações com monocultura de *Z. mobilis*, para os três tipos de meios avaliados. As fermentações com casca de banana e casca de laranja apresentaram o mesmo comportamento para o produção de etanol, com a biossíntese sendo favorecida pela utilização da co-cultura, pH de 6,5, agitação manual de 5 min ao dia e concentração inicial de 50 g/L de açúcares; condições iguais as observadas para o maior crescimento celular nos dois meios.

O emprego de cascas de banana para a biossíntese de etanol por fermentação descontínua mostrou-se bastante atraente, sendo os valores de etanol obtidos nas fermentações com 50 g/L bem próximos aos apresentados pelo meio sintético e com rendimento em etanol próximo a 51,1%, que seria o rendimento teórico para a fermentação. Para o emprego das cascas de laranja, a extração do óleo essencial da casca seria uma etapa importante para um maior crescimento dos microrganismos no meio e, assim, maior produção de etanol.

O aumento da escala para a fermentação com o meio sintético em biorreator propiciou um maior crescimento celular da co-cultura do que o observado na fermentação descontínua. A produção de etanol também foi maior, mostrando a viabilidade do aumento de volume de trabalho da fermentação com co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis*. Já para o meio de cascas de banana, a fermentação em maior escala apresentou bons resultados de produção de etanol, porém menores do que os obtidos no processo em Erlenmeyer. Um estudo mais aprofundado das variáveis do processo em biorreator seria interessante para aumentar a obtenção de etanol.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECITRUS. História da Laranja e Subprodutos da Laranja. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br>. Acesso: agosto de 2008.
- AGUILAR, R.; RAMIREZ, J. A.; GARROTE, G.; VASQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, v. 55, n. 4, p 309-318, 2002.
- ALBÁN, D.; FREIRE, D. Obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja “*Citrus sinensis*” provenientes del proceso agroindustrial en la provincia de Bolívar. 2009. 115 f. Informe del proyecto de investigación. Escuela Politécnica del Ejército, El Prado, 2009.
- ALTERTHUM, F. Elementos de microbiologia - Biotecnologia Industrial - Fundamentos 1. Edgard Blucher Ltda: São Paulo, 2001.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ALZATE, C.; TORO, A. C.; SÁNCHEZ, O. J. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy*, n. 31, p. 2447-2459, 2006.
- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioálcool-Brasil, 30 anos na vanguarda, *Multiciência- construindo a história dos produtos naturais*, 2006. Disponível em [http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_02\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_02_7.pdf).
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, n. 86, p. 2273-2282, 2009.
- BALAT, M.; BALAT, M.; KIRTAY, E.; BALAT, H. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. *Energy Conversion and Management*, v. 50, p. 3147-3157, 2009.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J. P.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1843-1848, 2004.

- BETANCUR, G. J. V. Avanços em Biotecnologia de Hemicelulose para Produção de Etanol por *Pichia stipitis*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. 2005.
- BODHISATTA, M.; ANKITA, R.; SAURAV, S.; MITALI, S.; PRADEEP, S. Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 90, p. 385-395, 2011.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-09315-7, 1978.
- BUCKERIDGE, M.; SANTOS, W. D.; DE SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B.; EDGARD, B. *Etanol: Pesquisa e Desenvolvimento*, 2009.
- CABRAL, J. C. A.; SILVA, J. P. A.; ROBERTO, I. C. Influência do pH na produção de etanol por *Pichia stipitis*. In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação - Universidade Vale do Paraíba, 2011.
- CAMILIOS NETO, D.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; OLIVEIRA, M. R. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melaço de cana-de-açúcar. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológica*, v. 26, n. 1, p. 17-22, 2005.
- CAZZETA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2824-2828, 2007.
- CEPA-Centro de Socieconomia e Planejamento Agrícola, Epagri, governo do estado de Santa Catarina. *Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina*, 2010. Disponível em: [www.cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese\\_2009/banana\\_2010.pdf](http://www.cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese_2009/banana_2010.pdf).
- CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: *Manejo, Uso e Tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. São Paulo: Fundação Cargill, v. 4, p. 13-37, 2001.
- CHANDEL, A. K.; ES, C.; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M. L.; RAO, L. V.; RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, v. 2, n. 1, p. 14-32, 2007.
- CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, n. 1-9, p. 5-37, 2000.

- CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total abthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal Food Chemistry and Toxicology*, v. 69, p. 67-72, 2004.
- CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; AYARZA, J. A. C. Biomassa no Brasil e no mundo. In: CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GOMEZ, E. O. *Biomassa para energia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2008.
- CRUEGER, W; CRUEGER, A. *Biotechnologia: Manual de microbiologia industrial*. Zaragoza: Editora Acribia, Espanha. 414 p. 1993.
- CUNHA, H. C. M.; PAIVA, T. C. B.; SILVA, F. T. Fermentação de xilose a etanol pela levedura *Pichia stipitis* CBS 5774. In: *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável*, Instituto de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável, Florianópolis-SC, 2004.
- DELGENES, J. P.; LAPLACE, J. M.; MOLETTA, R.; NAVARROT, J. M. Comparative study of separated fermentations and cofermentation processes to produce ethanol from hardwood derived hydrolysates. *Biomass and Bioenergy*, v. 11, n. 4, p. 353-360, 1996.
- DEMIRBAS, A. The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. *Energy Source*, v. 3, p. 177-185, 2008.
- DERMIRBAS, A. *Biofuels-Green Energy and Technology*. London: Springer-Verlag, 2009.
- DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. *Zymomonas mobilis*-Science an industrial application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 13, p. 57-98, 1993.
- DOELLE, M. B.; GREENFIELD, P. F. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 405-410, 1985.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*,v. 28, p. 350-356, 1956.
- EKEN-SARAÇOĞLU, N.; ARSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 855-858, 2000.
- EL-ZAWAWY, W. E.; IBRAHIM, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; MAHMOUD, M. M. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials

- into glucose for ethanol production. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 865-871, 2011.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AG01/Abertura.html> e <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaRondonia/importancia.htm>. Acesso: 2008.
- ERNANDES, F. M. P. G. Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis*. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campos de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista, 2009.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. *Ciências Agrárias*, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.
- ESSIEN, J. P.; AKPAN, E. J.; ESSIEN, E. P. Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1451-1456, 2005.
- FAO. Food and Agriculture Organization. *World production banana*. Miami: FAO Statistics. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567>. 2008.
- FERREIRA, L. C. Aspectos microbiológicos da conservação de polpas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): qualidade, higiene, adaptação de bactérias ao estresse ácido e isolamento de microrganismos com potencial para bioconservação. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- FINGUERUT, J.; MEIRELLES, A. J. A.; GUIRARDELLO, R.; COSTA, A. C. Fermentação, hidrólise e destilação. In: CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GOMEZ, E. O. (org). *Biomassa para energia*. Campinas, São Paulo. Editora da UNICAMP, 2008.
- 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.

- GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.
- GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science Technology*, v. 122, p. 1-22, 2008.
- GROHMANN, K.; CAMERON, R. G.; BUSLIG, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 54, p. 129-141, 1995.
- GUTIERREZ, T.; BUSKO, M. L.; INGRAM, L. O.; PRESTON, J. F. Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanogenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 327-340, 2002.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24, p. 549-556, 2006.
- HAMMOND, J. B.; EGG, R.; DIGGINS, D.; COBLE, C.G. Alcohol from bananas. *Bioresource Technology*, v. 56, p. 125-130, 1996.
- HINMAN, N. D.; WRIGHT, J. D.; HOAGLAND, W.; WYMAN, C. E. Xylose Fermentation: An Economic Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 20-21, p. 391-401, 1989.
- HUANG, H. J.; RAMASWAMY, S.; TSCHIRNER, U. W. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, v. 62, p. 1-21, 2008.
- IBGE. Censo Agropecuário. 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/mapasite/mapasite.php#download>.
- JACKMAN, E. A. Alcohol industrial. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. *Biología básica*. Zaragoza: Acríbia, 1991. 577p.
- KALNENIEKS, U. Physiology of *Zymomonas mobilis*: some unanswered questions. *Advanced Microbiology Physiology*, v. 51, p. 73-117, 2006.

- KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 207-213, 2003.
- KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOU V.; CHRISTAKOPOULOU, P. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 501-506, 2006.
- KAYE, S.; HAAG, H. B. Determination of ethyl alcohol in blood. *Journal of Forensic Medicine*, v. 1, p. 373, 1954.
- KIRK, L. A.; DOELLE, H. W. Rapid ethanol production from sucrose without by-product formation. *Biotechnology Letters*, v. 15, p. 985-990, 1993.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 726-732, 2005.
- LAPLACE, J. M.; DELGENES, J. P.; MOLLETA, R. Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: process considerations in relation to ethanol tolerance. *Biotechnology Letters*, v. 13, p. 445-450, 1991.
- LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, n. 136, p. 281-288, 2007.
- LEMOS, J. L. S. Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. 2001.
- LUZ JUNIOR, L. F. L.; KAMINSKI, M.; KOZAK, R. H.; NDIAYE, P. M. Bioetanol, biodiesel e biocombustíveis: perspectivas para o futuro. *Boletim regional, urbano e ambiental*, v. 3, 2009.
- MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and bioenergy*, v. 32, p. 682-595, 2008.

- MAITI, B.; RATHORE A.; SRIVASTAVA, S.; SHEKHAWAT, M.; SRIVASTAVA, P. Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 90, p. 385-395, 2011.
- MANIKANDAN, K.; SARAVANAN, V.; VIRUTHAGIRI, T. Kinetics studies on ethanol production from banana peel waste using mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 83-88, 2008.
- MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, v. 8, p. 195-204, 2005.
- MESQUITA, A. R. C. Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como microrganismo probiótico. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
- MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy Fuels*, v. 20, p. 848-889, 2006.
- MOHAPATRA, D.; MISHRA, S.; SUTAR, N. Banana and its by-product utilization: an overview. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 69, p. 323-329, 2010.
- MOREIRA, J. R. Obtenção de etanol a partir de material celulósico. In ROSILLO-CALE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. *Uso da Biomassa para Produção de Energia na Indústria Brasileira*. ISBN 85-268-0685-8. Campinas: Editora da UNICAMP, 2005.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. *Biotechnonology advances*, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 94-100, 2004.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry*, v. 153, p. 375-380, 1944.

- NIGAM, J. N. Bioconversion of water-hyacinth (*Euchhornia crassipes*) hemicelluloses acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology*, v. 97, p. 107-116, 2002.
- NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G. Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. *Ciências Agrárias*, v. 26, n. 2, p. 187-194, 2005.
- OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; SAIDA, L.; BANSAL, S.; HUGHES, J. D. Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. *Waste Management*, v. 31, p. 1576-1584, 2011.
- OINEGUE, F. O mundo do etanol depois da euforia. *Anuario 2009*, São Paulo, p. 57-59, 2009.
- OLIVEIRA, F. P. Avaliação da aclimatação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola de Química - Universidade Federal Do Rio De Janeiro, 2010.
- OLIVEIRA, M. R.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B. B.; SILVA, R. S. S. F. Experimental Study of Sorbitol Production by *Zymomonas mobilis* in High Sucrose Concentration. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 25, p. 197-202, 2004.
- OZBAY, N.; PUTUN, A. E.; UZUN, B. B.; PUTUN E. Biocrude from biomass: pyrolysis of cotton seed cake. *Renew Energy*, v. 24, p. 615-625, 2001.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulose hydrolysates: inhibitors and mechanisms. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 25-33, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 81-87, 2000.
- PEREIRA Jr., N. Investigation of D-xylose fermenting yeast. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry, The University of Manchester, U.K. 1991.
- PRAMANIK, K. Kinetic study on ethanol fermentation of grape waste using *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolated from toddy. *Journal of the Institution of Engineers*, v. 85, p. 53-58, 2005.

- RAJEEV, K. S.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and it's application in saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, p. 421-424, 2009.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, p. 863-871, 2003.
- RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRES, P.; CONVERTI, A.; DOMINGUÉX, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 2380-2387, 2008.
- ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S.; SATO, S. Influence of the aeration and pH on the xylose fermentation to ethanol by *Pichia stiptis*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 37, n. 1, p. 55-63, 1994.
- ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate for the Production of xylitol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.57/58, p. 339-347, 1996.
- 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.
- RODRIGUEZ-CHONG, A.; RAMIREZ, J. A.; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, v. 61, p. 143-152, 2004.
- ROSA, C. A.; PETER, G. In: The Yeast Handbook. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer. Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- ROSSELL, C. E. V. *Fermentação do hidrolisado*. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas. 2006.
- SAEED, A. A. W. S. Microbiological conversion of waste fruits and vegetables into ethanol. 2005. 398 f. Tese (Doutorado em Zoologia). University of the Punjab, Lahore, 2005.
- SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5270-5295, 2008.
- SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 89, p. 246-291, 2005.

- SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 13, p. 167-178, 2009.
- SHELL, D. J.; DOWE, N.; IBSEN, K. N.; RILEY, C. J.; RUTH, M. F.; LUMPKIN, R. E. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2942-2948, 2007.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. S.; AQUARIBE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1ª edição. 541 p. 2001.
- SCHULZ, M. A. Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade da Região de Joinville-UNIVILLE, Joinville, 2010.
- SHARMA, N.; KALRA, K. L.; OBEROI, H. S.; BANSAL, S. Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. *Indian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 310-316, 2007.
- SILVA, J. P. A. Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.
- SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 727-731, 1990.
- SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; GORSICH, S. W.; LIU, Z. L. Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 6, p. 1285-1296, 2006.
- SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, v. 24, p. 475-486, 2003.
- SOMAVILLA, C.; GOMES NETO, E. H. *Etanol e as células combustíveis*. Brasil H<sub>2</sub> Fuel Cell Energy. Disponível em: <http://www.celulaacombustivel.com.br>. Acessado em: 20 de Agosto de 2011.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, v. 195, p. 19, 1952.

- STEINER, R. *Utilización energética de residuos orgánicos en la industria bananera, cafetalera e azucarera en Costa Rica*. Costa Rica: Fachhochschule Nordwestschweiz Hochschule Fur Life Sciences, 2006. 25 p.
- SUBBA, M. S.; SOUMITHRI, T. C.; RAO, R. S. Antimicrobial action of citrus oils. *Journal of Food Science*, v. 32, p. 225-227, 1967.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, v. 41, p. 1-46, 1977.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*, v. 2, p. 707-738, 2007.
- TAO, F.; MIAO, J. Y.; SHI, G. Y.; ZHANG, K. C. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 183-187, 2005.
- TEJEDA, L. P.; TEJADA, C.; VILLABONA, A.; ALVEAR, M. R.; CASTILLO, C. R.; HENAO, D. L.; MARIMÓN, W.; MADARIAGA, N.; TARÓN, A. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*, n. 10, p. 120-125, 2010.
- TOSETTO, G. M. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de Bioetanol. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 2008.
- URIBE, S.; PENA, A. Toxicity of allelopathic monoterpene suspensions on yeast. *Journal of Chemical Ecology*, v. 16, p. 1399-1408, 1990.
- VIGNOLI, J. A. Efeito da osmolalidade do meio, permeabilização e imobilização de *Zymomonas mobilis* na produção de sorbitol. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, 2003.
- WILKINS, M. R. Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 538-541, 2009.
- WILKINS, M. R.; SURYAWATI, L.; MANESS, N.O.; CHRZ, D. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 23, p. 1161-1168, 2007.

- YADAV, K. S.; NASEERUDDIN, S.; PRASHANTHI, G. S.; SATEESH, L.; RAO, L. V. Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6473-678, 2011.
- ZHANG, P.; WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; HAMAKER, B. R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility-a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 59, p. 443-458, 2005.
- ZHOU, W.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Developments in ethanol production from citrus peel waste. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, v. 121, p. 307-310, 2008.

## **ANEXO**

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

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

Figura 1.A - Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de *Z. mobilis* CCT 4494 a 570 nm, utilizando caldo Zm após pré-fermentação a 30°C por 72 h.

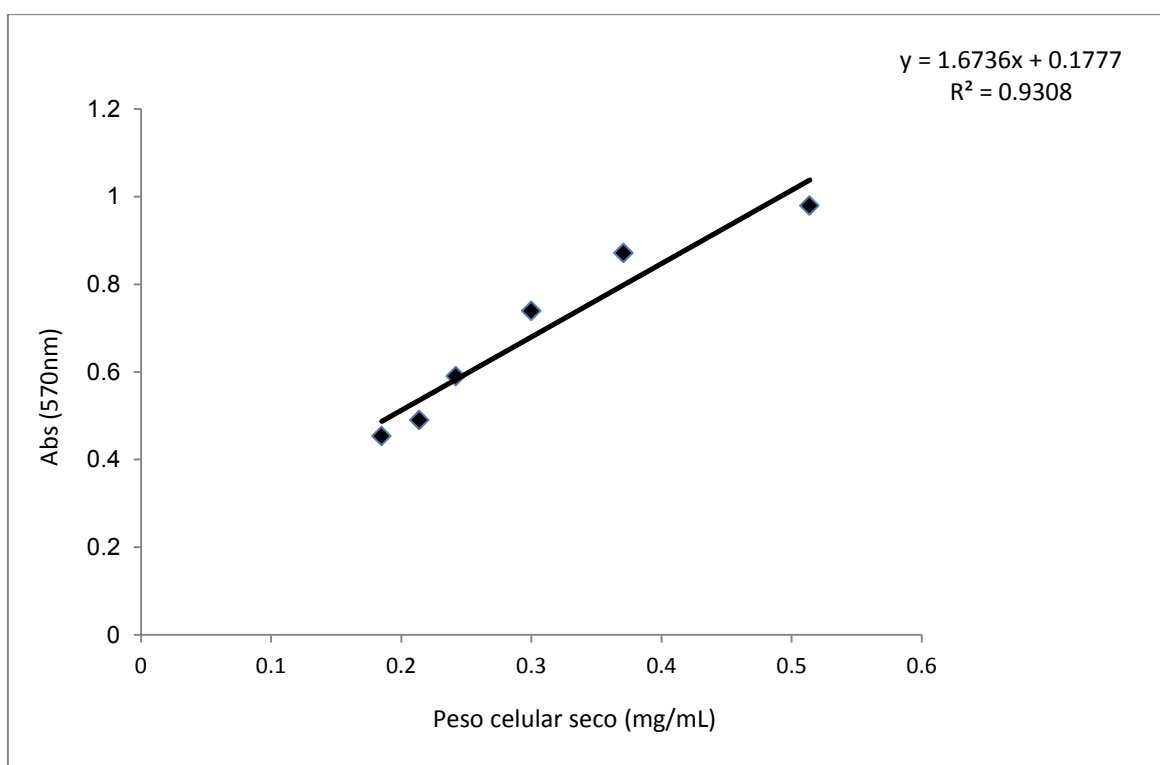


Tabela 2.A - Valores de absorvância de suspensões de *P. stipitis* CCT 2617 a 570 nm, utilizando caldo Ps após pré-fermentação a 28°C e 150 rpm, por 24 h.

Diluição	Peso celular seco (g/L)	Abs (570 nm)
1:9	0,586	0,741
1:15	0,428	0,613
1:17	0,357	0,555
1:20	0,300	0,419
1:25	0,257	0,385

Figura 2.A - Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de *P. stipitis* CCT 2617 a 570 nm, utilizando caldo Ps após pré-fermentação a 28°C e 150 rpm, por 24 h.

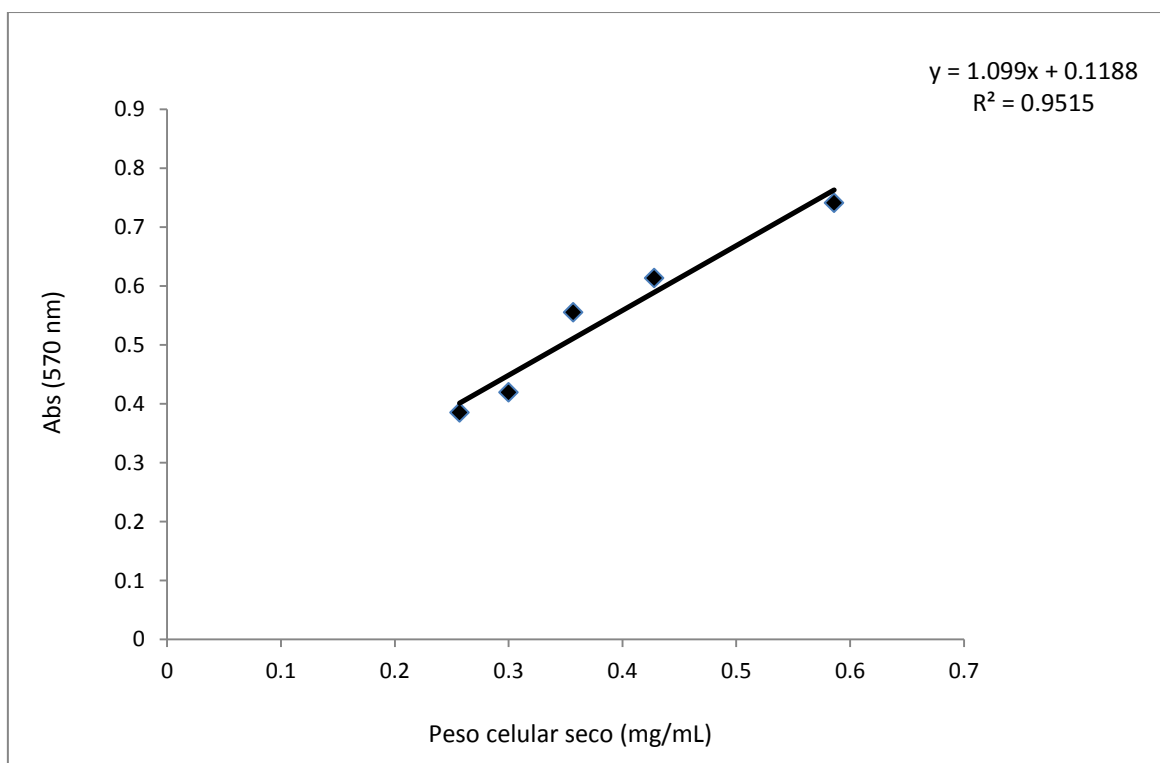


Tabela 3.A - Valores de absorvância de suspensões de *Z. mobilis* CCT 4494 e *P. stipitis* CCT 2617 a 570 nm, utilizando meio sintético com concentração inicial de açúcares de 50 g/L após pré-fermentação a 30°C e 150 rpm, por 24 h.

Diluição	Peso celular seco (g/L)	Abs (570 nm)
1:5	0,828	0,924
1:9	0,485	0,712
1:12	0,342	0,496
1:20	0,214	0,340
1:25	0,157	0,303
1:30	0,128	0,257

Figura 3.A - Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de *Z. mobilis* CCT 4494 e *P. stipitis* CCT 2617 a 570 nm, utilizando meio sintético com concentração inicial de açúcares de 50 g/L após pré-fermentação a 30°C e 150 rpm, por 24 h.

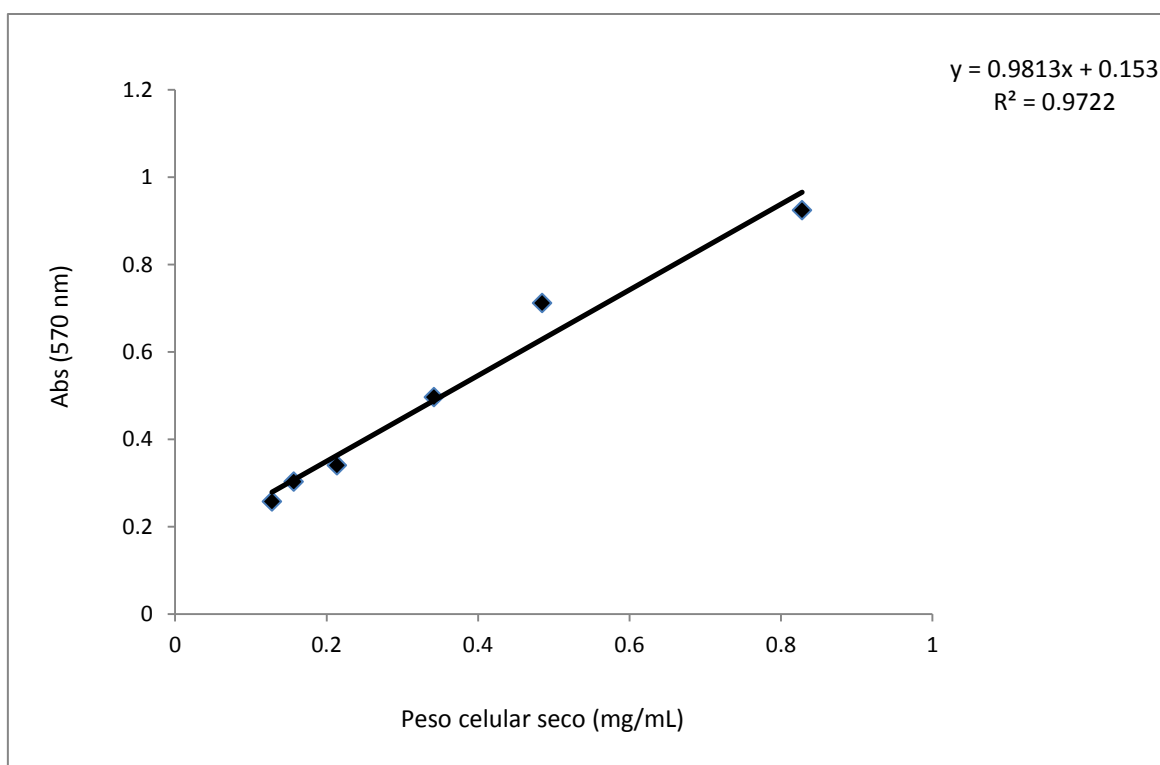


Tabela 4.A - Valores de área do pico cromatográfico de amostras contendo diferentes concentrações de etanol (g/L) para a confecção da curva de calibração pela análise de cromatografia gasosa.

Etanol (g/L)	Área do pico (mV)
7,89	784442
15,78	1465411
31,56	2703111
63,12	4803088
78,90	5995345

Figura 4.A - Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de etanol (g/L) por cromatografia gasosa.

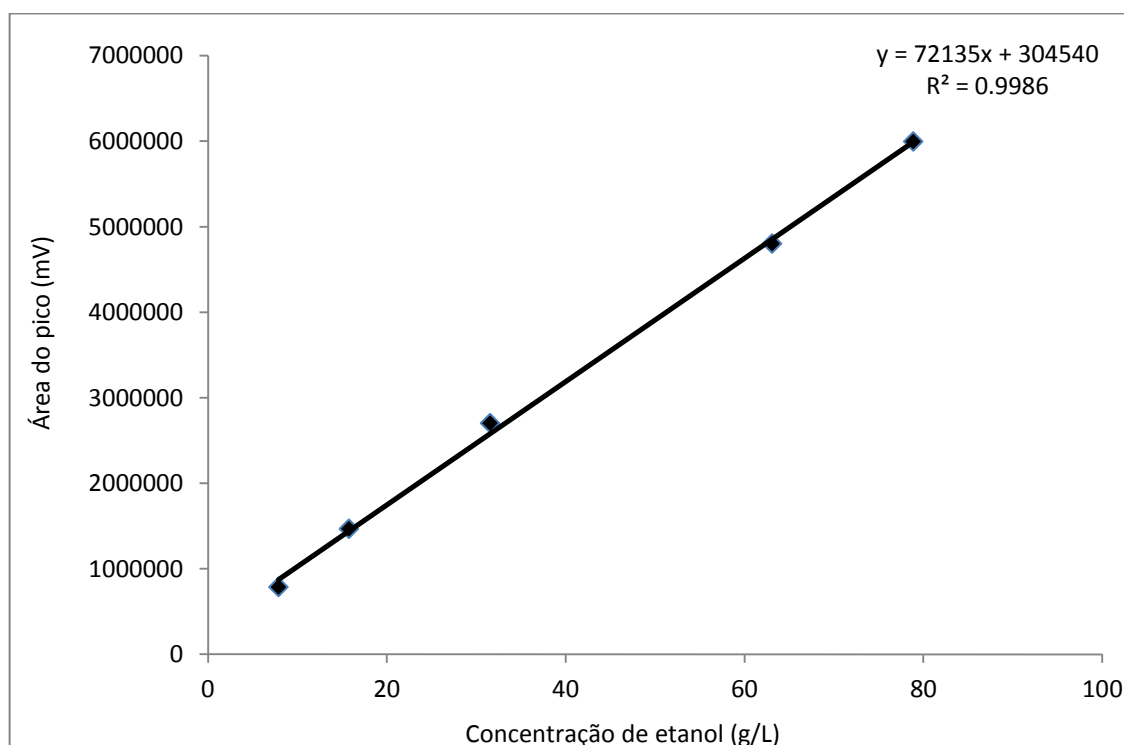


Tabela 5.A - Valores de absorvância a 490 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Dubois et al. (1956).

Glicose (g/L)	Abs (490 nm)
0,02	0,106
0,04	0,208
0,05	0,313
0,06	0,348
0,08	0,443
0,10	0,54

Figura 5.A - Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Dubois et al. (1956).

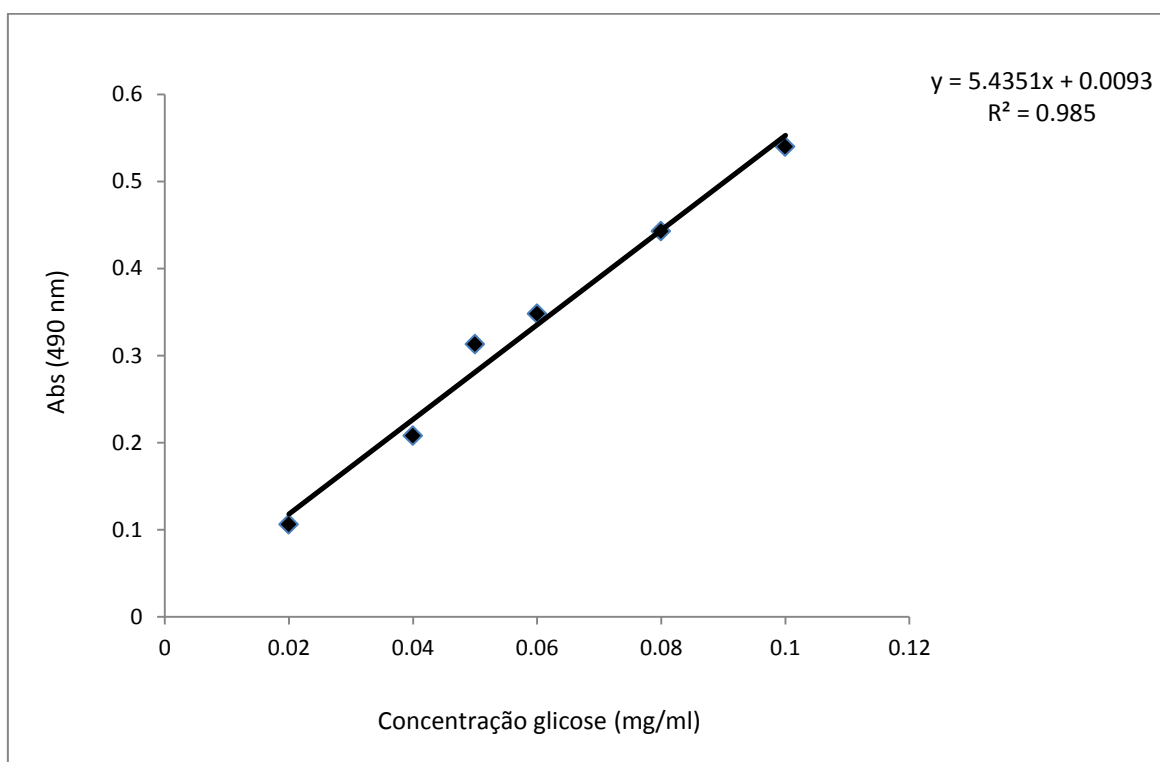


Tabela 6.A - Valores de absorvância a 540 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

Glicose (g/L)	Abs (540 nm)
0,02	0,085
0,04	0,201
0,05	0,243
0,06	0,301
0,08	0,427
0,1	0,566

Figura 6.A - Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

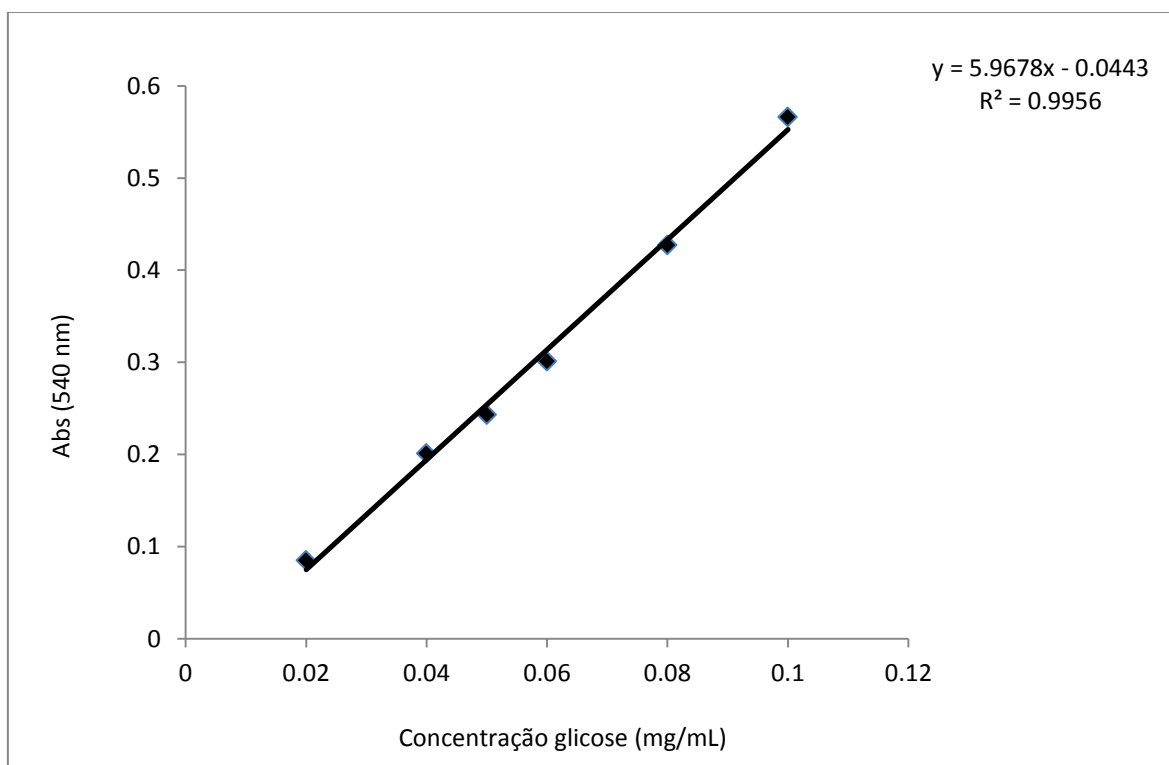
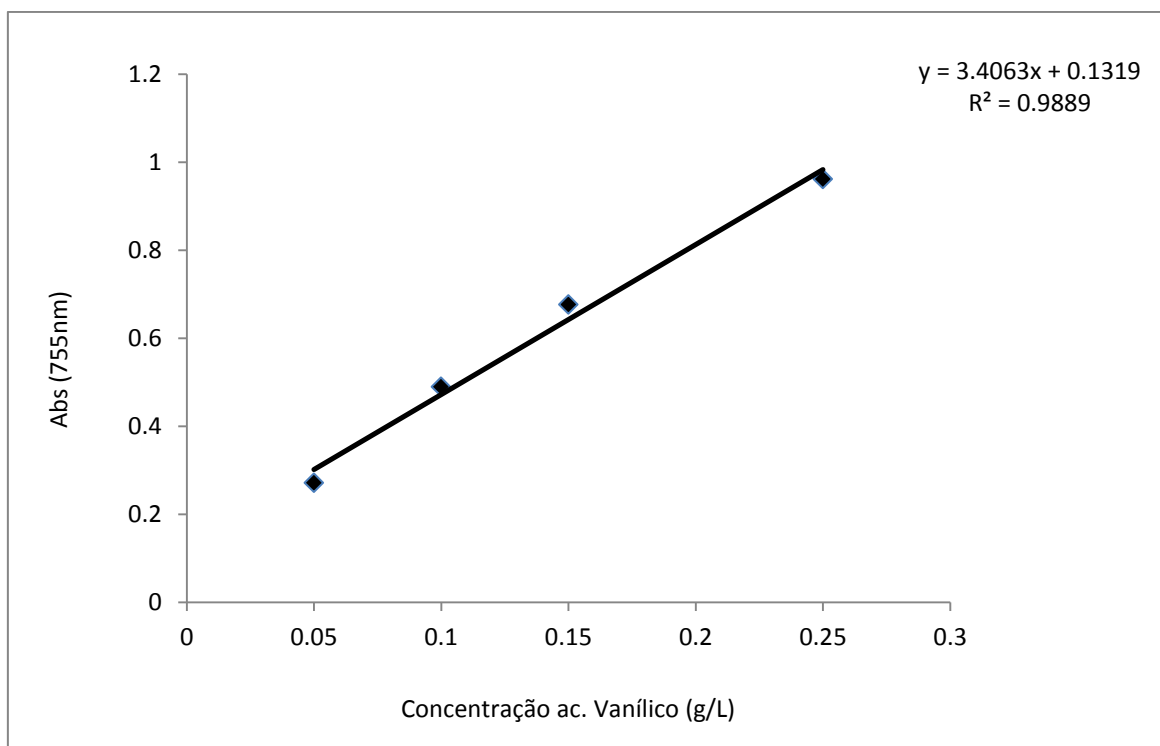


Tabela 7.A - Valores de absorvância a 755 nm de amostras contendo diferentes concentrações de ácido vanílico (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Chaovanalikit e Wrolstad (2004).

Ácido vanílico (g/L)	Abs (755 nm)
0,05	0,272
0,1	0,49
0,15	0,677
0,25	0,962

Figura 7.A - Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de ácido vanílico (g/L) pelo método Chaovanalikit e Wrolstad (2004).



Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura